

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR –
ANNABA



جامعة باجي مختار -
عنابة

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE VÉGÉTALE ET ENVIRONNEMENT

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat
Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biologie Végétale et Pharmacognosie

Intitulé

ESSAI DE RÉHABILITATION PAR LES MICROORGANISMES DES SITES CONTAMINÉS PAR LES HYDROCARBURES

Presentée par : KOUT Samia

Directeur de thèse : HASSAINE Amina (MCA, Université Badji Mokhtar -
Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. SERIDI Ratiba	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. HOUHAMDI Moussa	Examineur	Université 8 Mai 1945 -Guelma
Dr. KETIF Amel	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
Dr. SLIMANI Abderachid	Examineur	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. ALI RACHEDI Fahima	Examinatrice	Université Med Cherif Messaadia- Souk Ahras

Année universitaire : 2023/2024



REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu de m'avoir donné le courage, la santé physique et mentale pour compléter ce travail.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs et sincères remerciements à mon directeur de thèse, Madame **HASSAINE Amina**, pour son expérience, son temps, ses conseils constructifs, sa confiance tout au long de ces années et qui m'ont fait vivre cette unique expérience très enrichissante. Qu'elle trouve ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de ma grande estime.

*J'*exprime ma gratitude aux membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail ainsi que pour la discussion apportée sur ce projet.

Je témoigne mes vifs remerciements à Mme. **SERIDI Ratiba** professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, qui me fait l'honneur de présider le jury ;

Monsieur **HOUHAMDI Moussa** professeur à l'Université 8 Mai 1945 de Guelma ;

Madame **ALI RACHEDI Fahima** professeur à l'université M^{ed} Cherif Messaadia de Souk Ahras ;

Madame **KETIF Amel** maître de conférences A à l'université Badji Mokhtar d'Annaba;

Monsieur **SLIMANI Abderachid** maître de conférences A à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, d'avoir tous accepté de juger ce travail.

Je souhaite vraiment adresser mes plus sincères remerciements et ma gratitude à mes deux professeurs :

Mme **BORDJIBA Ouahiba**: votre créativité et votre professionnalisme ont grandement contribué à notre réussite ;

Mr **TAHAR Ali**, je suis sincèrement impressionnée et reconnaissante pour vos engagements

Un projet de thèse ne se réalise jamais seul, c'est pourquoi je souhaiterais ici remercier toutes les personnes qui ont participé à des années d'aventure scientifique et humaine :

Monsieur **SELLAM Mohamed** chef de division à la Société Nationale pour la recherche, production, transport, transformation et commercialisation des hydrocarbures (SONATRACH) ainsi que Messieurs **ABDESSEMED Ala** et **BELAHMADI Mohamed Seddik Oussama**, chercheurs au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine pour leurs précieuses aides.

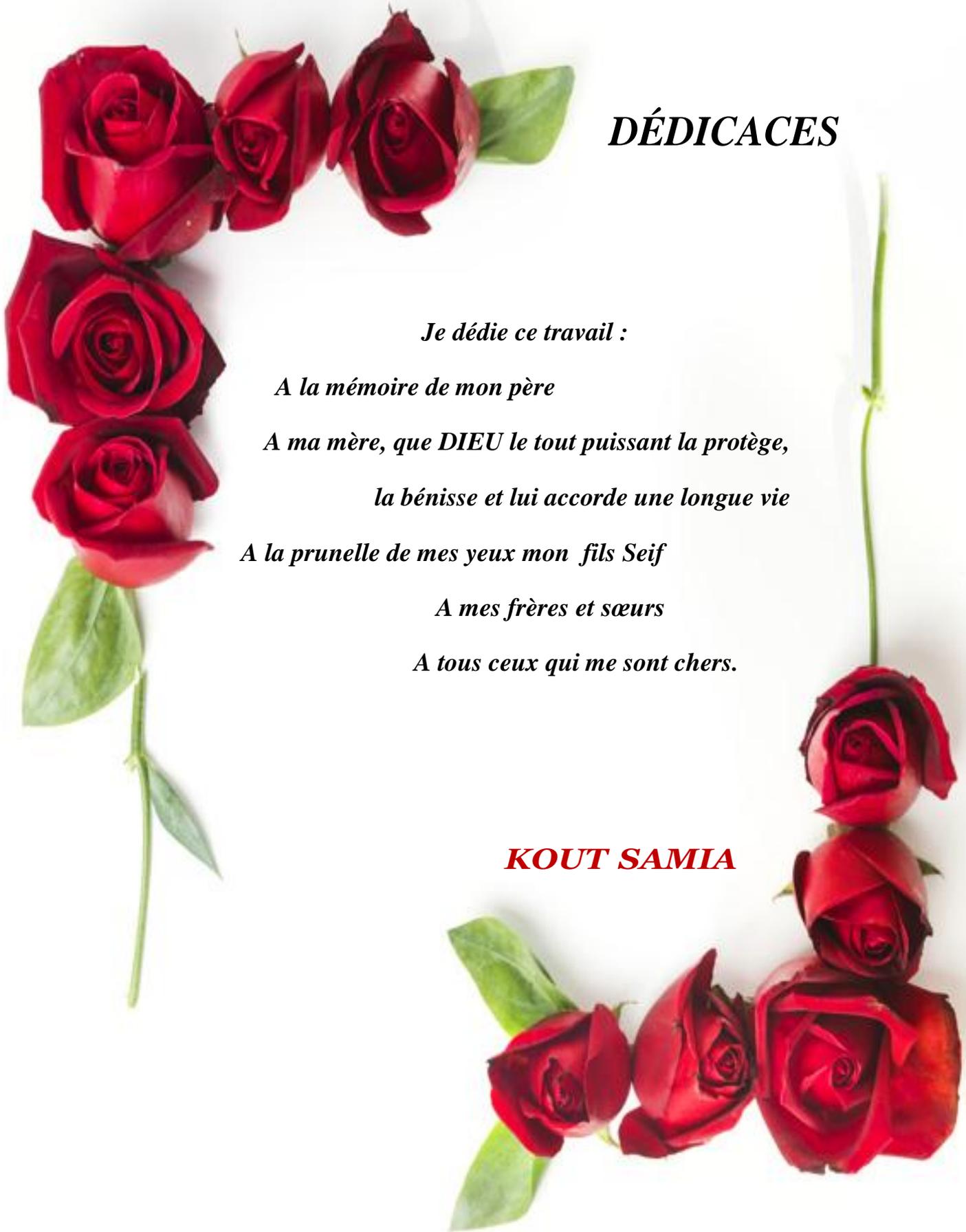
Je remercie chaleureusement Madame **BELAIB Ahlam** maître assistante A à l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie (ENSB) de Constantine qui a été toujours présente et pour son soutien tout au long de la réalisation de mon stage.

Sans oublier ma compagne de chemin **Fattouma** pour son soutien moral.

Je tiens également à remercier tous ceux et celles qui m'ont aidé, dans le cadre de ce projet, tout au long du parcours de ces années consacrées à l'achèvement de ma thèse.

En raison du confinement mis en place par l'État pour lutter contre la pandémie du Covid-19, nos déplacements sont fortement réduits, voir même interdits. Malgré cela, on a gardé la motivation au travail ! Aucun mot ne pourrait exprimer des sentiments comme l'entraide, l'amour, le respect et la reconnaissance.





DÉDICACES

Je dédie ce travail :

A la mémoire de mon père

A ma mère, que DIEU le tout puissant la protège,

la bénisse et lui accorde une longue vie

A la prunelle de mes yeux mon fils Seif

A mes frères et sœurs

A tous ceux qui me sont chers.

KOUT SAMIA

TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des abbréviations	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Introduction générale	1
Intérêt et objectifs de l'étude.....	4
Chapitre .1. Les hydrocarbures : concepts généraux	
1. Définition	6
2 Les familles des hydrocarbures pétroliers	6
2.1 Les hydrocarbures saturés (alcanes)	7
2.2. Les hydrocarbures insaturés.....	8
2.3 Les composés polaires	8
2.4 Les asphaltènes et les résines.....	8
3 Produits pétroliers commerciaux	9
3.1 Pétrole brut	9
3.2 Les produits pétroliers	10
3.3 Gaz de Pétrole Liquéfié (GPL).....	11
3.4 Essences.....	11
3.5 Le kérosène	12
3.6 Le diesel.....	12
3.7 Autres produits.....	12
4 Forages, Fluides de forage et borbiers pétroliers	12
4.1 Forage pétrolier	12
4.2 Fluides de forage	13
4.3 Les lagunes à hydrocarbures	14
5 Empreinte du secteur énergétique sur l'environnement.....	16
5.1 Les hydrocarbures dans l'air	17
5.2 Les hydrocarbures dans l'eau	17
5.3 Les hydrocarbures dans les sols.....	18

5.3.1	Cas des bourbiers pétroliers.....	19
-------	-----------------------------------	----

Chapitre.2. Le champ pétrolier de Hassi Messaoud

1.	Présentation de la ville de Hassi Messaoud	21
2.	Généralités sur le champ de Hassi Messaoud	22
2.1.	Historique du champ	22
2.2.	Situation géographique et géologique.....	23
2.3.	Structure du champ HMD	24
2.4.	Zonation du champ HMD	25
2.5.	Description du réservoir du champ de HMD	26
3.	Activités industrielles du champ HMD.....	26
4.	Problèmes d'exploitation du gisement.....	28
4.1.	Problèmes de forage.....	28
4.2.	Les dépôts organiques.....	29
4.3.	Les dépôts minéraux	29
4.4.	Autres problèmes	29
5.	Les rejets d'un champ pétrolier	30
6.	Impact des bourbiers sur l'environnement	32
7.	Stratégies de l'état Algérien dans le domaine environnemental	33

Chapitre. 3. Evaluation de la contamination du sol de la zone d'étude

1.	Description de la zone d'étude.....	35
2.	Prélèvement des échantillons.....	37
3.	Les analyses physico-chimiques et quantification des fractions d'hydrocarbures	37
3.1.	Les analyses physico-chimiques des sols	37
3.2.	Analyses des hydrocarbures pétroliers	39
3.2.1.	Détermination des hydrocarbures totaux (THC).....	39
3.2.2.	Analyses des fractions d'hydrocarbures pétroliers.....	39
3.3.	Analyses statistiques	41
4.	Résultats & discussion.....	41
4.1.	Les analyses physico-chimiques des sols	41
4.1.1.	Granulométrie	41
4.1.2.	Valeurs du pH.....	42
4.1.3.	Température	42
4.1.4.	Conductivité électrique (CE).....	43
4.1.5.	Matière sèche	43
4.1.6.	Humidité.....	44
4.1.7.	Densité	44
4.1.8.	Les cations échangeables	44
4.1.9.	Azote Kjeldahl	45

4.2.	Analyses des hydrocarbures pétroliers	46
4.2.1.	Fractions d'hydrocarbures pétroliers	46
4.2.2.	BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl benzène et (O, m+p)-Xylène.....	48
4.3.	Analyse statistique.....	48
4.3.1.	Analyse descriptive des différentes caractéristiques des sols	48
4.3.2.	Comparaison des caractéristiques des sols étudiés	51
4.3.3.	Les hydrocarbonée dans les sols	57
4.3.4.	Analyse de la variance (ANOVA) pour comparer les caractéristiques moyennes des sols échantillonnés.....	61
4.3.5.	L'analyse en composantes principales.....	64
4.4.	Discussion.....	65
	Conclusion.....	71
	Chapitre .4. Les champignons microscopiques : cas des hydrocarbonoclastes	
	Introduction	72
1.	Présentation et caractéristiques principales	73
2.	Systématique des champignons	74
2.1.	Les Chytridiomycètes.....	74
2.2.	Les Zygomycètes.....	74
2.3.	Les Glomérromycètes	75
2.4.	Les Ascomycètes	75
2.5.	Les Basidiomycètes	75
3.	Reproduction	76
4.	La mycoécologie	77
4.1.	Les champignons et le milieu physique	77
4.2.	Champignons et autres êtres vivants (stratégie nutritionnelle).....	79
5.	Rappel sur les champignons hydrocarbonoclastes	81
5.1.	Spécificité des champignons hydrocarbonoclastes.....	82
6.	Analyses et contexte expérimental.....	84
6.1.	Echantillonnage et sites de prélèvement	84
6.2.	Analyse microbiologique.....	85
6.2.1.	Dénombrement de la mycoflore totale.....	85
6.2.2.	Milieus de culture.....	85
6.2.3.	Préparation des dilutions-suspensions	86
7.	Résultats.....	88
7.1.	Evaluation de la charge fongique isolée et fréquence centésimale	90
8.	Discussion.....	95
	Conclusion	99

Chapitre.5. Réhabilitation de bourbiers pétroliers : 1.Essai de mycoremediation

1. La réhabilitation : concepts généraux	101
2. La bioremédiation (biodégradation stimulée)	103
3. La Mycoremediation : généralités	104
4.1. Mécanismes de Mycoremediation	105
4.2. Les agents de la mycoremediation des hydrocarbures	106
4.2.1. Les champignons de la pourriture du bois	106
4.2.2. Les champignons endophytes	107
4.2.3. Les mycorhizes	107
4.2.4. Les levures	108
5. Limites et défis de mycoremediation	108
5.1. Nature et concentration des hydrocarbures	109
5.2. Structure et nature du milieu récepteur	109
5.3. Facteurs environnementaux	110
5.4. Facteurs microbiologiques	112
6. Matériel & Méthodes	113
6.1. Les produits chimiques utilisés	113
6.1.1. Le pétrole brut	113
6.1.2. Le gasoil	113
6.2. Microorganismes et milieux de culture	114
6.3. Identification moléculaire des isolats	115
6.4. Etude de la cinétique de la biodégradation des hydrocarbures	115
6.4.1.Préparation des pré-cultures et protocole expérimental	115
6.4.2.Etude de la croissance fongique en présence des produits hydrocarbonés	116
6.5. Evaluation du taux de biodégradation des hydrocarbures	117
6.6. Analyse statistique	118
7. Résultats et discussion	118
7.1. Résultats	118
7.1.1. Identification moléculaire des souches	118
7.1.2. Etude de la croissance fongique en présence des hydrocarbures	120
7.1.3. Evaluation du taux de biodégradation des hydrocarbures	131
7.1.4. Analyses statistiques	133
7.2. Discussion	133
Conclusion	139
Chapitre .5. Réhabilitation de bourbiers pétroliers : 2. Essai de phytoremediation	
1. Définition et principes	141
2. Mécanismes	142
3. La phytotransformation ou phytodégradation	143

3.1. La phytoextraction/ phytoaccumulation	143
3.2. La phytostabilisation.....	144
3.3. Phytovolatilisation.....	144
3.4. Rhizodégradation	145
3.5. Rhizofiltration	145
4. Phytoremédiation des déchets industriels : cas des hydrocarbures	145
4.1. Critère de sélection des plantes phytoremédiatrices.....	145
4.2. Passage des hydrocarbures du sol/air vers la plante.....	146
4.3. Devenir des hydrocarbures dans la cellule végétale.....	147
4.4. Interactions plante-microorganismes pour remédier aux hydrocarbures	148
5. Les facteurs affectants la phytoremediation	150
5.1. Caractéristiques du site et propriétés des polluants	151
5.2. Les caractéristiques environnementales	151
5.3. Les caractéristiques du végétal	152
6. Analyses et protocole expérimental	153
6.1. Les produits pétroliers.....	153
6.2. Le matériel fongique	153
6.3. Le matériel végétal	154
6.4. L'expérimentation.....	155
6.4.1. Le support de culture	155
6.4.2. Mise en germination.....	155
6.4.3. Inoculation et semi des platules.....	156
6.4.4. Mise en place de l'essai	156
6.5. Paramètres physiologiques.....	158
6.5.1. Le taux de germination	158
6.6. Les paramètres biométriques.....	158
6.6.1. La croissance en longueur	158
6.6.2. Le nombre de feuilles	158
6.6.3. Croissance pondérale	158
6.6.4. Rapport de la partie aérienne et racinaire.....	158
6.7. Les paramètres biochimiques	158
6.7.1. La chlorophylle.....	158
6.7.2. Dosage de la proline	159
6.7.3. Dosage des sucres solubles	159
6.8. Dosage des enzymes de l'activité anti-oxydante et des protéines.....	159
6.8.1. Le dosage du malondialdéhyde (MDA).....	159
6.8.2. Le dosage des protéines.....	159
6.8.3. Le dosage de la Superoxyde dismutase (SOD).....	159

6.8.4. Le dosage de la catalase	159
6.9. Analyses statistiques des données	159
7. Résultats	160
7.1. Paramètres physiologiques	160
7.1.1. Le taux de germination	160
7.2. Les paramètres biométriques	160
7.2.1. La croissance en longueur	160
7.2.2. Le nombre de feuilles	162
7.2.3. Croissance pondérale	163
7.2.4. Rapport de la partie aérienne et racinaire	163
7.3. Les paramètres biochimiques	164
7.3.1. La Chlorophylle	164
7.3.2. La proline	164
7.3.3. Dosage des sucres solubles	165
7.4. Dosage des enzymes de l'activité anti-oxydante et des protéines	166
7.4.1. Le dosage du malonedialdéhyde (MDA)	166
7.4.2. Le dosage des protéines solubles totales	167
7.4.3. Le dosage de la Superoxyde dismutase (SOD)	168
7.4.4. Le dosage de la catalase	168
8. Discussion	169
Conclusion	176
Conclusion générale & Perspectives	177
Références bibliographiques	179

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition élémentaire de quelques pétroles bruts (Speight, 2014)	10
Tableau 2. Composition des fluides de forages (Parigot et Garcia, 1974).....	14
Tableau 3. Les principaux bourbiers de la région de Hassi Messaoud	31
Tableau 4. Valeurs limites pour la mise en décharge des déblais de forage selon le Standard Européen.....	34
Tableau 5. Méthodes d'analyse des différents paramètres étudiés	38
Tableau 6. Echelle d'interprétation de pH extrait 1/5 (Soil Survey Staff, 1999).....	38
Tableau 7. Classe de la qualité des sols selon l'échelle de Durand (1983).....	38
Tableau 8 . Composition des milieux de culture utilisés	85
Tableau 9. Les souches fongiques isolées et identifiées	91
Tableau 10 : Taxonomie fongique des souches inventoriées.....	94
Tableau 11 . Classification des méthodes de remédiation des sols (In Stepanova <i>et al.</i> , 2022)	102
Tableau 12. Flux de gradient de phase mobile avec composition et temps	118
Tableau 13 : Identification des souches fongiques selon les résultats de l'analyse ADN.....	119
Tableau 14 . Classification botanique du soja (NCBI Taxonomy Browser, 1988).....	154
Tableau 15 . Position systématique de l'Arachide (Singh et Simpson, 1994)	155

Liste des figures

Figure 1. Classes des hydrocarbures pétroliers (Kuppusamy <i>et al.</i> , 2020)	7
Figure 2. Produits de raffinage du pétrole (Naudot, 2019).....	10
Figure 3. Composition de l'essence	11
Figure 4. Répartition en masse des BTEX dans l'essence (Ata Mitra & Roy, 2011).....	11
Figure 5. Plateforme de forage (Ba, 2010)	13
Figure 6. Préparation d'un bournier (a) et bournier à Hassi Messaoud (b) (Hadj Abbas, 2023)	16
Figure 7. Comportement des hydrocarbures lors d'un déversement en milieu aquatique (GENIVAR, 2013)	18
Figure 8. Le devenir des polluants dans le sol (Maes <i>et al.</i> , 2007)	19
Figure 9. Carte de la localisation géographique de Hassi Messaoud (In Bouselsal, 2017).....	22
Figure 10. Localisation du champ pétrolier de Hassi Messaoud (Zeroug <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figure 11. Zones et numérotation des puits de HMD (Sonatrach, 2002).....	25
Figure 12. Localisation du complexe Gassi El Agreb et ses trois gisements (Agreb, Zotti et Gassi).....	36
Figure 13. Composition granulométrique des sols étudiés.....	41
Figure 14. Valeurs du pH des sites étudiés	42
Figure 15. Valeurs de la température des sites étudiés.....	42
Figure 16. Valeurs de la CE des sols.....	43
Figure 17. Valeurs des matières sèches	43
Figure 18. Valeurs de l'humidité des sols	44
Figure 19. Valeurs de la densité des sols.....	44
Figure 20. Valeurs des cations échangeables : ions sodium (a), ions potassium (b), ions magnésiums (c) et ions calcium (d).....	45
Figure 21. Valeurs de l'azote Kjeldhal.....	46
Figure 22. Indice des hydrocarbures (C10-C40) dans les sites étudiés.....	46
Figure 23. Les fractions des hydrocarbures des sites : F1 (a), F2 (b) et F3 (c).....	47
Figure 24. Les valeurs des BTEX selon les profondeurs des sites étudiés.....	48
Figure 25. Distribution des sols en fonction de leurs pH	52
Figure 26. Distribution des sols en fonction de leurs températures	52
Figure 27. Distribution des sols en fonction de leurs CE.....	53
Figure 28. Distribution des sols en fonction de leur teneur en matière sèche	54
Figure 29. Distribution des sols en fonction de l'humidité	54
Figure 30. Distribution des sols en fonction de leurs densités	55
Figure 31. Distribution des sols en fonction de leur teneur en cations échangeables : ions sodium (a), ions potassium (b), ions magnésiums (c) et ions calcium (d)	56
Figure 32. Distribution des sols en fonction de leurs teneurs en azote	57
Figure 33. Indices des hydrocarbures (C10- C40) dans les sols en fonction des sites.....	57
Figure 34. Teneur des sols en fractions d'hydrocarbures : F1 (a), F2 (b), F3 (c) et F4(d).....	58
Figure 35. Teneur des sols en BTEX en fonction des sites : Benzène (a), Toluène (b),.....	60
Figure 36. ACP des concentrations de THC, fractions en HC, BTEX et propriétés physicochimiques des sols échantillonnés	65
Figure 37. Structure de l'hyphe : (a) hyphe coenocytique, (b) hyphe cloisonné (Chabasse <i>et</i> <i>al.</i> , 2002)	73
Figure 38. Classification générale des champignons (Chabasse <i>et al.</i> , 2002).....	76
Figure 39. Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Lecellier, 2013).....	77
Figure 40. Les mécanismes cellulaires impliqués en mycoremediation (In Ghosh <i>et al.</i> , 2023)	83

Figure 41. Distribution des genres fongiques selon le gradient de profondeur de chaque site	92
Figure 42. Fréquence des différents taxons isolés des trois sites	93
Figure 43. Taux de fréquence des différents genres fongiques isolés des bourières pétrolières	94
Figure 44. Les mécanismes de mycomédiation cellulaire (Adapté et modifié de Kumar et al., 2021).....	106
Figure 45. Protocole expérimental des cultures en batch	116
Figure 46. Cinétique de croissance des souches sans hydrocarbures à pH : A :4.5, B :7, C : 9.5	121
Figure 47. Valeurs de la DO en présence des HC à 25°C avec (a) : pH=4.5 ; (b) : pH=7 ; (c) : pH=9.5	123
Figure 48. Valeurs de la DO à 35°C et en présence des HC avec (a) : pH=4.5 ; (b) : pH=7	124
Figure 49. Valeurs de la DO à 40°C et en présence des HC avec (a) : pH=4.5 ; (b) : pH=7	125
Figure 50. Valeurs du pH après 4 semaines d'incubation en présence des HC	128
Figure 51. Biomasse sèche après 4 semaines de culture en présence des hydrocarbures à température (a) : 25°C; (b) : 35°C ; (c) : 40°C	130
Figure 52. Biodégradation de cinq hydrocarbures sous condition de culture pH et température (a) : 25°C; (b) : 35°C et pH 7 ; (c) : 40°C	132
Figure 53. Principaux mécanismes de phytoremédiation.....	142
Figure 54. Processus de détoxification des xénobiotiques dans la cellule végétale	148
Figure 55. Interactions à l'échelle de la rhizosphère causées par l'exsudation de composés riches en C et entraînant un effet d'activation positif sur la minéralisation de l'N de la matière organique du sol (selon Clarholm, 1985 et Zwart et al., 1994 ; reproduit d'après Kuzyakov <i>et al.</i> , 2000).	150
Figure 56. Schéma conceptuel des interactions entre les acteurs majeurs de la rhizodégradation (In Dupuy, 2014)	151
Figure 57. Protocole expérimental schématisé	157
Figure 58. Taux de germination des plantes.....	160
Figure 59. Valeurs de la longueur aérienne des plantes	161
Figure 60. Valeurs de la longueur racinaire des plantes.....	162
Figure 61. Nombre des feuilles des plantes.....	162
Figure 62. Les valeurs de la croissance pondérale des plantes	163
Figure 63. Les valeurs du rapport en longueur (LR/LT)	163
Figure 64. Valeurs des teneurs moyennes en chlorophylle des plantes	164
Figure 65. Valeurs de la proline des plantes	165
Figure 66. Valeurs des sucres solubles des plantes	166
Figure 67. Évolution de la teneur en MDA du Soja et de l'arachide	167
Figure 68. Quantité de protéines solubles dans les plantes	167
Figure 69. Variation de l'activité SOD des plantes	168
Figure 70. Variation de l'activité de la catalase des plantes	169

Liste des photos

Photo 1. Caractéristiques macroscopiques de quelques isolats fongiques	90
Photo 2. Caractéristiques macroscopiques des souches sélectionnées	119
Photo 3. Les graines de Soja.....	154
Photo 4. Graines d'Arachide	155
Photo 5. Germination des graines d'arachide après levée de la dormance.....	156
Photo 6. Les cultures en pots	157

Liste des abréviations

Abs : absorbance.
ANOVA : analyse de la variance
As : Arsenic.
ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
BSA : biomasse sèche aérienne.
BSR : biomasse sèche racinaire.
BTEX : Benzène, Toluène Ethylbenzène et Xylène
CAT : catalase.
CE : La conductivité électrique
Cst : centistoke
CP1K : complexe pétrochimique de Skikda
DBO : La demande biologique en oxygène
DCO : La demande chimique en oxygène
DO : Densité Optique
ERO : Espèces Réactive de l'Oxygène.
HAP : les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
HCL : le chlorure d'hydrogène.
HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance.
Koc : coefficient de partage carbone organique /eau.
Kow : coefficient octanol_eau.
M : masse molaire.
MDA : malonedialdéhyde.
MF : matière fraîche.
mg : milligramme.
min : minute.
ml : millilitre.
Moy : moyenne.
nm: nanomètre.
PDA : potato dextrose agar.
pH : potentiel d'hydrogène.
POPs : polluants organiques persistants.
POP : population (souche1+souche2).
PS : poids sèche
SOD : superoxyde dismutase.
SPAD : Soil plant analysis development.
U : unité enzymatique.
USEPA : United States environmental protection agency.
µl: microlitre.

ملخص

لقد أدت الحاجة إلى إعادة تأهيل بيئتنا إلى تطوير عدد كبير من التقنيات، نظرا لتزايد خطورة ظاهرة التلوث النفطي. غير أن منطقة حاسي مسعود (جنوب شرق الجزائر) تتميز بصناعة نفطية قوية جدا لأنها تحتوي على أكبر مخزون نفطي في الجزائر والذي لا يزال يولد نفايات خطيرة فضلا عن انتشار مستنقعات ناقلات النفط. يعتمد عملنا على جمع العينات من المستنقعات الموجودة في مجمع (Agreb) (GEA و Zotti و Gassi) وتقييم درجة تلوثها من خلال تحليل الخصائص المختلفة (الخصائص الفيزيوكيميائية وحجم الجسيمات والهيدروكربونات (الإجمالية BTEX)). أظهرت النتائج تركيب تلوث هيدروكربوني قوي مع وجود الهيدروكربونات الثابتة. من المعروف أن العديد من فئات الكائنات الحية الدقيقة قد تم وصفها على أنها قادرة على تحليل الهيدروكربونات، بما في ذلك ما يسمى بالفطريات "الهيدروكربونوكلاستية"، والتي لها خصائص كيميائية/بنيوية محددة. تشير المجموعات الفطرية التي تم عزلها وتحديدها من مستنقعات النفط المختلفة وعلى أعماق مختلفة إلى تواجد متنوع وتوزيع غير متجانس في المواقع المدروسة لـ 69 سلالة تنتمي إلى الأجناس التالية:

Aspergillus (40 %), *Trichoderma* (24 %), *Penicillium* (15%), *Cladosporium* 2% et *Bipolaris et Mucor* (5%), *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Acremonium* وبنسبة ظهور 1% *Cladophialophora*.

بهدف التأهيل عن طريق المعالجة الفطرية للمواقع الملوثة، قمنا باختبار تحمل خمس سلالات فطرية لـ 3% من النفط الخام والديزل في ثقافة الدفعات في ظل ظروف معينة: pH ودرجة الحرارة لمدة 4 أسابيع، بالإضافة إلى التحلل الحيوي لخمسة جزيئات من النفط الخام. وكانت النتائج واعدة حيث أظهرت السلالات إمكانات كبيرة لاستخدام الهيدروكربونات. يتم إيلاء اهتمام خاص لسلالة *Trichoderma* (MT671930.1) (*ghanense* 18ASMA011) التي تتحلل بنسبة 100% من البنزو[b]الفلورانتين والبنزو[a]بيرين، و (*Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) للبنزو[a]بيرين. ومن منظور آخر للمعالجة النباتية للتربة الملوثة بالنفط الخام (10%)، تمت تجربتها باستخدام اثنين من البقوليات (فول الصويا والفول السوداني) وتم تعزيزها بيولوجيًا بواسطة سلالتين فطريتين، بالإضافة إلى السلالتين المختلطتين. تتضمن نتائج العلاقات بين العوامل النشطة في هذه العملية: التربة المستعملة، والنبات، والملوث، والسلالات الفردية، والمجموعات الفطرية.

الكلمات الاستدلالية: إعادة التأهيل، المستنقع النفطي، الهيدروكربونات، الفطريات الهيدروكربونية، المعالجة الفطرية، المعالجة النباتية.

Résumé

Le besoin de réhabiliter notre environnement a mené au développement d'un nombre important de technologies, vu que le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une dangerosité de plus en plus grande. Cependant, la région de Hassi-Messaoud (Sud-Est d'Algérie) est caractérisée par une industrie pétrolière très forte car elle renferme le plus grand gisement de pétrole d'Algérie qui ne cesse de générer des déchets dangereux ainsi que la prolifération des borbiers pétroliers. Notre travail repose sur la collecte d'échantillons de borbiers situés au complexe GEA (Agreb, Gassi et Zotti) et d'apprécier leur degré de pollution par l'analyse de différents paramètres de caractérisation (paramètres physicochimiques, granulométrie et les hydrocarbures (totaux et BTX)). Les résultats témoignent de l'installation d'une forte pollution hydrocarbonnée avec présence d'hydrocarbures persistants. Il est connu que de nombreuses classes de microorganismes ont été décrites comme aptes à dégrader des hydrocarbures, y compris les champignons dits « hydrocarbonoclastes », ayant des propriétés biochimiques/structurelles spécifiques. La population fongique isolée et identifiée des différents borbiers pétroliers à différentes profondeurs, indique une présence variée et une distribution hétérogène sur les sites étudiés, de 69 souches appartenaient aux genres *Aspergillus* (40 %), *Trichoderma* (24 %), *Penicillium* (15%), *Cladosporium* (5%), *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Acremonium* et *Mucor* ont enregistré un taux de 2% et *Bipolaris* et *Cladophialophora* avec un taux d'apparition de 1%. Dans une optique de mycoremédiation des sites contaminés, on a testé la tolérance de cinq souches fongiques à 3% de pétrole brut et de gasoil en culture en batch sous des conditions de pH, et température pendant 4 semaines, aussi que, la biodégradation de cinq molécules du pétrole brut. Les résultats sont prometteurs du fait que les souches ont montré un grand potentiel d'utilisation des hydrocarbures. Une attention particulière pour *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1) qui a dégradé 100% le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène, et *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) pour le benzo[a]pyrène. Dans une autre optique de phytoremediation des sols contaminés par le pétrole brut (10%), est expérimentée en utilisant deux légumineuses (Soja et arachide) et bioaugmentée par deux souches fongiques, ainsi que la population mixte. Nos résultats impliquent les relations entre les agents actifs de ce procédé : le substrat, la plante, le polluant, les souches individuelles et la population fongique.

Mots clés : Réhabilitation, borbier pétrolier, hydrocarbures, champignons hydrocarbonoclastes, mycoremediation, phytoremediation.

Abstract

The need to rehabilitate our environment has led to the development of a significant number of technologies, given the increasing dangerousness of hydrocarbon pollution. However, the region of Hassi-Messaoud (Southeast Algeria) is characterized by a robust oil industry as it houses Algeria's largest oil field, which continues to generate hazardous waste and the proliferation of oil quagmires. Our work revolves around collecting samples of sludge located at the GEA complex (Agreb, Gassi, and Zotti) and assessing their pollution levels by analyzing various characterization parameters (physicochemical, granulometric, and hydrocarbons - both total and BTX). The results indicate a substantial hydrocarbon pollution presence with the existence of persistent hydrocarbons.

It's known that numerous classes of microorganisms have been identified as capable of degrading hydrocarbons, including fungi known as "hydrocarbonoclastic" fungi, possessing specific biochemical/structural properties. The fungal population isolated and identified from different oil quagmires at various depths indicates a diverse presence and a heterogeneous distribution at the studied sites. Among these, 69 strains belonged to various genera: *Aspergillus* (40%), *Trichoderma* (24%), *Penicillium* (15%), *Cladosporium* (5%), while *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Acremonium*, and *Mucor* recorded a 2% occurrence, and *Bipolaris* and *Cladophialophora* appeared at a rate of 1%.

With the aim of mycoremediation of contaminated sites, the tolerance of five fungal strains to 3% crude oil and diesel was tested in batch culture under varying pH and temperature conditions for four weeks. Additionally, the biodegradation of five crude oil molecules was examined. The results are promising as the strains demonstrated a significant potential for hydrocarbon utilization. Particularly noteworthy is *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011 (MT671930.1), which degraded 100% of benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene, as well as *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) for benzo[a]pyrene.

In another perspective, phytoremediation of soils contaminated by crude oil (10%) was experimented using two legumes (soybean and peanut) and bioaugmented by two fungal strains, along with a mixed population. Our findings implicate the relationships between the active agents in this process: the substrate, the plant, the pollutant, individual strains, and the fungal population.

Keywords: Rehabilitation, oil quagmires, hydrocarbons, hydrocarbonoclastic fungi, mycoremediation, phytoremediation.

C'est une triste chose de penser que la nature parle et que le genre humain n'écoute pas (Victor Hugo)

Introduction

générale



Introduction générale

Les progrès de la science et de la technologie depuis la révolution industrielle ont permis l'exploitation des ressources naturelles. Toutefois, le développement et l'amélioration de la société grâce à l'industrialisation et à l'urbanisation s'accompagne du coût d'une détérioration constante et dégradation de l'environnement naturel par la production de polluants toxiques et dangereux. Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique (Kuppusamy *et al.*, 2020) ; (Yap *et al.*, 2021). Le pétrole brut est un mélange complexe d'hydrocarbures de nature diverse et sa composition typique varie selon différentes sources. Il contient également de l'azote, du soufre, de l'oxygène et des traces de métaux comme le vanadium et le nickel. Le pétrole possède une stabilité chimique, une nature persistante et une toxicité élevée. Certains de ses composés ou dérivés sont reconnus comme carcinogènes, mutagènes, terratogène et cytotoxiques (Oyibo *et al.*, 2018).

En effet, l'exploitation du pétrole dans le Sud Algérien aurait comme conséquence la contamination de l'environnement, la disparition de quelques espèces végétales et animales, la stérilité du sol et la contamination des nappes souterraines. La région pétrolifère de Hassi Messaoud (HMD), où le pétrole a surgit pour la première fois, abrite plusieurs puits de pétrole et est jusqu'à l'heure actuelle le plus grand gisement de pétrole en Algérie et de tout le continent africain. HMD est connue par ses puits productifs de pétrole à savoir El Agreb, Zotti, El Gassi, Rhoude El Baguel et Mesdar. Cependant, après plusieurs années d'activité industrielle et d'exploitation du brut dans cette région, de nombreux bourbiers de superficies différentes ont été créés pour recevoir de différentes quantités de rejets (liquides et solides).

En fait, plusieurs lois et décrets sont formulés, dans le monde entier y compris l'Algérie, afin de protéger les écosystèmes et leurs composants des rejets des déblais de forages, le danger de contamination par les produits pétroliers ou ses dérivés persiste toujours. Cette situation, suscite plusieurs questions auxquelles les industriels dans le domaine doivent répondre, par exemple : que seraient les effets environnementaux (à moyen et à long terme) des bourbiers du désert algérien, quelle méthode de décontamination pour quel type de polluant, quel est le sort de ces bourbiers avant et après traitement et enfin l'efficacité du traitement lui-même reste en suspens.

Dans le besoin de remédier ou de réparer les dommages causés à notre « environnement », un certain nombre de procédés d'interventions correctives sont apparus: réaménagement, revégétalisation, restauration, réhabilitation, ...etc (Richardson, 2016). La réhabilitation d'un site consiste à restaurer la zone contaminée selon les critères

environnementaux en lien avec l'usage d'une propriété. Il existe plusieurs méthodes de réhabilitation environnementale y compris la remédiation biologique (biotechnique) (Huang *et al.*, 2021 ; Kang *et al.*, 2020), dont on cite : la bioremediation et la phytoremediation.

La bioremediation est l'approche écologique la plus simple, durable et très efficace à appliquer (Chen *et al.*, 2019), pour minéraliser ou convertir les hydrocarbures sous une forme moins toxique et moins mobile (Imam *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2020). Si les applications dans le domaine de la bioremediation se sont focalisées sur les bactéries et leur diversité métabolique, l'utilisation fongique se révèle également prometteuse (Kumar *et al.*, 2021).

Dans la nature, de nombreuses classes de champignons microscopiques ont été décrites comme capables d'assimiler et à dégrader des hydrocarbures pétroliers, ce sont des champignons hydrocarbonoclastes. Récemment, ces derniers ont fait l'objet d'une attention considérable en raison de leur capacité à synthétiser différents types d'enzymes telles que des monooxygénases, des dioxygénases, des oxydoréductases, des hydroxylases, des déshydrogénases, ...etc (Harms *et al.*, 2011), ce qui leur a permis de dégrader un large éventail de polluants récalcitrants tels que les hydrocarbures et leurs dérivés et les pesticides (Deshmukh *et al.*, 2016 ; Hasan Al-Jawhari, 2019). La mycoremédiation fait appel à plusieurs de ses agents spécifiés dans la remédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, c'est l'exemple des espèces appartenant aux genres *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Gaur *et al.*, 2022; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2018), *Cladosporium*, *Cunninghamella* et *Mucor* (Amend *et al.*, 2019). Le choix de cette mycoflore repose essentiellement sur les capacités métaboliques du règne fongique qui leur permettent de dégrader des molécules naturelles complexes, en particulier la lignine, un polymère de structure complexe contenant des noyaux aromatiques (Kumar *et al.*, 2011). En effet, il est à souligner que les conditions environnementales (pH, température, salinité, ..) peuvent affecter les caractéristiques intrinsèques des hydrocarbures pétroliers, le même constat peut être fait en ce qui concerne leur biodégradabilité par les agents microbiens actifs de ces milieux. Ils peuvent empêcher, inhiber ou favoriser leur croissance et prolifération. La mycomédiation des hydrocarbures et leurs dérivés doit être ajustée aux conditions spécifiques des sites contaminés et aux paramètres environnementaux qui interagissent avec le processus, y compris la population microbienne autochtone déjà présente sur le site. Cependant, isoler une souche capable de dégrader un large éventail d'hydrocarbures pourrait être très utile, mais des résultats valables ont été obtenus grâce à l'utilisation de consortiums (populations mixtes), dans lesquels une synergie microbienne peut les atténuer et les éliminer progressivement au lieu de les accumuler. sous une autre forme (Liu *et al.*, 2019). Au regard des informations apportées dans notre étude bibliographique, il est indéniable que les connaissances concernant le

fonctionnement des communautés microbiennes dans les environnements pollués par les hydrocarbures ont largement été améliorées. Il est possible d'isoler en laboratoire des microorganismes qui présentent une capacité accrue de dégradation des hydrocarbures, mais de tels agents risquent de ne pas avoir un effet important dans l'environnement.

La phytoremédiation est une technique verte émergente, qui s'appuie sur les plantes pour séquestrer ou détoxifier l'environnement, notamment des polluants organiques tels que les hydrocarbures (Song *et al.*, 2017). Généralement, elle repose sur les interactions entre les plantes, le sol et ses micro-organismes. Lorsqu'il s'agit de sol contaminé par les hydrocarbures, les plantes agissent par plusieurs mécanismes, y compris la phytodégradation, la rhizodégradation, la phytovolatilisation et la rhizofiltration (Corami, 2021). Habituellement, la sélection des plantes est essentielle pour réussir ce procédé et les plantes doivent avoir une croissance et une production de biomasse élevée, un système racinaire largement développé, et un potentiel de tolérance et d'accumulation (Khan *et al.*, 2023). Il est à noter que la mycoremédiation préconise entre autres l'utilisation de plantes colonisées par des champignons tolérants pour la végétalisation de sites perturbés par des contaminants de toute sorte. En phytoremediation, le choix de la plante (tolérante, accumulatrice ou hyperaccumulatrice) est basé sur ses caractéristiques de production de biomasse, sa tolérance aux contaminants et le temps nécessaire pour atteindre une remédiation adéquate du sol (Balseiro-Romero *et al.*, 2017).

Notre thèse comporte cinq grands chapitres. Le premier et le second chapitre présentent des concepts généraux sur les hydrocarbures, ainsi qu'une description de Hassi Messaoud et de ces bourbiers pétroliers. Les quatre autres chapitres mentionnent une requête bibliographique, l'ensemble du matériel et des méthodes utilisées, ainsi que les résultats obtenus et leur discussion. C'est alors que dans le quatrième chapitre, une évaluation de la contamination des bourbiers échantillonnés est présentée, le chapitre qui suit, dévoile la présence des champignons hydrocarbonoclastes, de leur distribution et structure dans les sols. Le dernier chapitre explique deux processus complémentaires dans la nature qui sont la mycoremediation et la phytoremediation. Une conclusion générale, des perspectives et une bibliographie complètent cette rédaction.

Intérêt et objectifs de l'étude

L'importance et le développement de l'industrie pétrolière dans le Sud algérien a généré des rejets industriels dangereux à cause de l'exploitation des forages pétroliers et la prolifération des bourbiers. Depuis l'émergence de la réhabilitation des sites contaminés, ainsi que ses outils, de nombreuses recherches se sont penchées sur la compréhension des techniques impliquées, la sélection des agents actifs et l'énumération des différentes conditions qui régissent ces procédés, afin de les'améliorer, de les développer et de les optimiser. Cependant, la complexité du processus de biodégradation choisi, la diversité génétique et métabolique des agents microbiens mis en jeu, des facteurs environnementaux affectant aussi bien le pétrole lui-même que les microorganismes dans leur fonction de biodégradation et enfin par la difficulté de prévoir précisément les effets de la bioremédiation sur les microorganismes autochtones ; nous invite à sélectionner plusieurs techniques de réhabilitation (mycoremediation et phytoremediation) afin de mieux cerner le problème des sites contaminés par les hydrocarbures.

Pour tenter d'apporter notre contribution à cette problématique environnementale, et proposer une ou des alternatives qui soient prometteuses, dans ce travail de thèse, nous avons mené une investigation dans une thématique focalisée sur divers objectifs et qui visent non seulement de se débarrasser des bourbiers polluants (sites très peu abordés dans la littérature), mais aussi de les rendre utiles. De ce fait, nous avons abordé les problématiques suivantes :

1. Évaluation des paramètres environnementaux qui interviennent dans la dépollution des sites, afin d'évaluer leur influence sur l'efficacité du traitement naturel par la microflore autochtone du milieu.
2. Mettre en valeur la nature du point de vue quantitatif et qualitative de la mycoflore des biotopes contaminée par les hydrocarbures et d'en dresser un inventaire non exhaustif des agents actifs peuplant ces sites (bourbiers) ;
3. L'adoption d'une méthodologie permettant la réhabilitation des bourbiers pétroliers par :
 - 3.1. Evaluer les capacités mataboliques de quelques souches fongiques hydrocarbonoclastes autochtones isolées des bourbiers pétroliers, à dégrader le pétrole brut et le gasoil sous des conditions physicochimiques controlées. La mycoremediation adoptée met en évidence la tolérance et la biodégradabilité de quelques composés du pétrole brut en conditions aérobies.

3.2. Mettre en évidence la complexité du système impliqué dans phytoremédiation des hydrocarbures par l'utilisation d'une bioaugmentation, ou les divers acteurs sont ainsi mis en relation : le substrat, la plante, le polluant, les souches individuelles et la population fongique.

L'intérêt de cette étude se situe à un triple niveau :

- ✓ D'abord, aux professionnels dans le domaine de l'industrie pétrolière, que cette étude pourra leur faire prendre conscience de l'impact de la pollution pétrolière et du danger de la création des bourbiers, vu que les risques de contamination par les hydrocarbures sont tragiques.
- ✓ Ensuite, aux scientifiques par l'utilisation d'une part de microorganismes, notamment des champignons microscopiques producteurs d'enzymes très spécifiques pour palier à cette pollution, sans porter atteinte à l'environnement. La sélection d'un microorganisme individuel ou d'une population mixte nécessite des études approfondies. D'autre part, l'utilisation et la sélection d'espèces végétales tolérantes, accumulatrices ou hyperaccumulatrices de polluants, afin de remédier et de particulariser l'idée du paysage dans les catégories esthétiques.
- ✓ Enfin, la réutilisation des déchets pétrolier dans des domaines vitaux (agronomie, bâtiments,..) pour assurer un développement durable.

Valorisation du thème

Il est utile de procéder à un bilan global pour marquer l'itinéraire parcouru, dans le cadre de cette modeste étude. Le sujet proposé a fait l'objet d'une production scientifique riche : communications orales et affichées dans des séminaires, ainsi que la publication d'un article scientifique classe A. Il est aussi à signaler que ce thème de thèse a bénéficié de formation en Master de recherche, nous a permis aussi d'explorer en profondeur ce vaste domaine d'étude, de générer des idées et même d'en développer une expertise qui a été essentielle pour proposer une idée de StartUp innovante et prometteuse.



Chapitre .1.
Les hydrocarbures :
concepts généraux



Chapitre .1. Les hydrocarbures : concepts généraux

Les hydrocarbures sont une ressource énergétique qui présente des avantages pour l'économie d'un pays (Faria, 2020) ; (Arent *et al.*, 2017), mais beaucoup de désavantages pour l'environnement (Patel *et al.*, 2019). Ils sont majoritairement utilisés comme combustible à des fins énergétiques, domestiques ou professionnelles. Leurs propriétés se révèlent très utiles pour évaluer leurs impacts potentiels dans l'environnement. Elles vont notamment permettre de mieux prévoir leur répartition, ainsi que leur comportement dans les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, sédiments, atmosphère, végétaux, êtres vivants).

1. Définition

Les hydrocarbures comprennent de nombreux produits pétroliers allant du pétrole brut jusqu'aux produits pétroliers raffinés. Leurs molécules résultent de la combinaison d'atomes de carbone tétravalents et d'atomes d'hydrogène monovalents, où le carbone présente 83 à 87% en volume et l'hydrogène 10 à 14 % (Durousset, 1999). Ils possèdent en conséquence une formule brute de type: C_nH_m , où n et m sont deux entiers naturels (Favennec, 1998). Les hydrocarbures sont, selon les conditions de température et de pression : solides (paraffine), liquides (essences, pétrole, etc.) ou gazeux (méthane, butane, etc.). Les hydrocarbures peuvent aussi comprendre des atomes d'oxygène, d'azote et de soufre (Lefebvre, 1986) et des métaux à l'état de traces (nickel, vanadium, etc.) (Bastien Ventura *et al.*, 2005).

Le terme «*Hydrocarbure*» est une appellation générique qui désigne le pétrole sous toutes ses formes (pétrole brut, le fuel-oil, les résidus d'hydrocarbures et les produits raffinés, «condensats», huiles minérales, gasoils et essences...etc.) (Cabane, 2012).

2. Les familles des hydrocarbures pétroliers

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique. Les composés pétroliers (pétroles bruts ou produits raffinés) peuvent être aussi classés en fonction de leur structure. C'est le classement le plus employé en raison de l'importance de l'arrangement moléculaire sur le devenir et la mobilité de ces molécules dans l'environnement (Gomez, 2010) (Fig1).

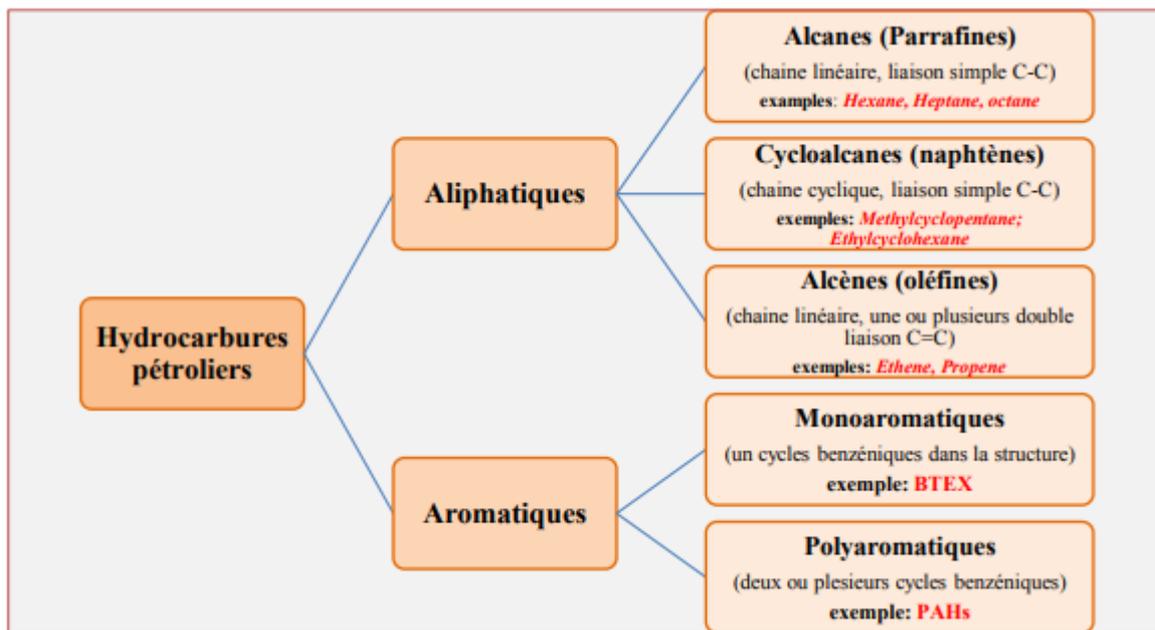


Figure 1. Classes des hydrocarbures pétroliers (Kuppusamy *et al.*, 2020)

Les produits pétroliers, sont alors groupés en quatre familles principales qui sont présentés en proportions variables selon l'origine: les asphaltènes (0 à 10 %), les composés polaires (5 à 25 %), les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40%) (Soltani, 2004).

2.1 Les hydrocarbures saturés (alcane)

Cette famille est composée uniquement de carbone et d'hydrogène, avec deux types de configuration :

- **Les aliphatiques** de formule C_nH_{2n+2} , sont aussi appelés respectivement paraffines et isoparaffines en industrie pétrolière. Ils regroupent les alcanes linéaires et les alcanes ramifiés et constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).
- **Les cycloalcane**s de formule générale C_nH_{2n} , sont aussi appelés respectivement naphènes ou cycloparaffines en industrie pétrolière. Ils referment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Cette famille représente entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

2.2. Les hydrocarbures insaturés

Cette classe possède au moins deux atomes de carbones reliés par une liaison multiple (double ou triple). On distingue :

- **Les alcènes (oléfines)** de formule C_nH_{2n} , sont linéaires, cycliques ou ramifiés et comprennent une ou plusieurs liaisons doubles. Le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes (Soltani, 2004).
- **Les alcynes** autrefois appelés hydrocarbures acétyléniques, sont des hydrocarbures insaturés. Leur formule générale est C_nH_{2n-2} . Ils sont aussi linéaires, cycliques ou ramifiés et comprennent une ou plusieurs liaisons triples.
- Les hydrocarbures aromatiques : plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans le pétrole brut. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri- aromatiques. Les hydrocarbures aromatiques sont répartis en deux familles d'hydrocarbures insaturés :
 - ❖ Des hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) tels que les BTEX ;
 - ❖ Des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

2.3 Les composés polaires

Cette fraction correspond aux constituants mineurs d'un pétrole brut, ce sont des molécules hétérocycliques dont le cycle excepté l'atome de carbone, renferme un ou plusieurs hétéroatomes, tels que :

- l'azote et l'hétérocycle est dit composé azoté tels que les pyridines, les quinoléines,...
- le soufre ici l'hétérocycle est dit composé soufré, tels que les mercaptans, les sulfures, les disulfures,...
- l'oxygène, l'hétérocycle est dit composé oxygéné comme exemple les phénols, les acides carboxyliques, les alcools, les aldéhydes,....

2.4 Les asphaltènes et les résines

Les résines contiennent des structures aromatiques (polycondensées ou non) dont le nombre de cycles est supérieur à 6 (Speight, 2004). Les composés appartenant à la fraction des résines et asphaltènes peuvent être liés à d'autres éléments outre l'hydrogène et le carbone tels que l'azote, l'oxygène et le soufre pour former des hétéroéléments. Ils constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5 % du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25 % d'asphaltènes et 20 % de résines (Soltani, 2004).

Enfin, des métaux sont présents dans les pétroles bruts à l'état de traces. Le vanadium, le nickel sont généralement les plus abondants mais du fer, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Bertrand *et al.*, 1989).

3. Produits pétroliers commerciaux

3.1. Pétrole brut

Le pétrole brut est présent, en général, dans des formations géologiques particulières, telles que les anticlinaux, les pièges de faille et les dômes de sel, que l'on trouve sous divers types de terrains et dans des climats très divers. En pratique, le lieu d'accumulation appelé "piège" constitue une nouvelle couche imperméable formant le plus souvent une espèce au-dessus de la roche poreuse dans laquelle le pétrole circule. La roche qui contient le pétrole s'appelle un réservoir. En s'accumulant en profondeur dans les terrains poreux et fissurés, les hydrocarbures forment ce qui est appelé des gisements. Le pétrole est un mélange extrêmement complexe comprenant plusieurs milliers de molécules différentes. Mis à part les produits acétyléniques, tous les types d'hydrocarbures sont présents dans le pétrole brut. C'est en fait, un mélange complexe d'hydrocarbures, ainsi que des traces d'hétéroatomes (soufre, d'azote, d'oxygène), d'eau salée, de métaux (Fer, nickel), ainsi que de vanadium, de nickel, et aussi de l'uranium (Soltani, 2004). La proportion de chaque élément (carbone ou hydrogène), surtout des hétéroatomes et métaux, dépend fréquemment de l'origine géographique du gisement de pétrole (Tab1). Ces éléments cités sont engagés dans des structures chimiques complexes (phénols, furannes, amines, amides,...etc), ou concentrées dans les fractions lourdes comme les résines et les asphaltènes (Darmendrail, 2000).

Les pétroles bruts sont produits essentiellement sous de hautes pressions et températures sur la matière organique à travers les ères géologiques. En effet, les bruts sont uniques et diversifiés en raison de leur composition, leur nature chimique et de leur origine (Fingas, 2013), aussi leur provenance : les bruts légers sont très riches en hydrocarbures saturés et très pauvres en asphaltènes (Arabian Light) (Syakti, 2004). Cette diversité dans la composition d'un brut est un aspect très important dans l'industrie du raffinage.

Tableau 1. Composition élémentaire de quelques pétroles bruts (Speight, 2014)

Composition	Bruts			
	Brent	Oural	Sahara Blend	Athabasca
Origine géographique	Royaume Uni	Russie	Algérie	Canada
Carbone (% poids)	86.1	85.8	88.2	83.9
Hydrogène (% poids)	13.14	12.6	11.6	10.8
Soufre (% poids)	0.4	1.4	0.13	4.8
Azote (ppm)	948	2050	310	4775
Métaux (ppm)	17.3	75.8	9.2	198.8
Densité à 15°C	0.833	0.869	0.804	1.011

3.2. Les produits pétroliers

La production des produits pétroliers s'effectue par le biais de différentes étapes de séparation et transformation du pétrole brut. On parle alors de raffinage du pétrole (Fig2) ; ou il est séparé en plusieurs sous-mélanges dénommés coupes pétrolières ou fraction pétrolière. Ces dernières sont traditionnellement caractérisées par un intervalle de distillation, exprimé en température d'ébullition normale ou en nombre d'atomes de carbone équivalent des paraffines. Selon le niveau de transformation, les dérivés du pétrole peuvent être des carburants, des gaz de pétrole liquéfié pour les voitures, du kérosène pour les avions ou encore toutes sortes de fioul pour les usages domestiques. Généralement, on regroupe les produits pétroliers en trois grandes catégories :

- Les produits légers : gaz de pétrole liquéfié (GPL: butane et propane), carburants auto (essences) et naphta pour la pétrochimie;
- Les produits intermédiaires: Jet A1 (aviation), gasoil moteur et fuel-oil domestique (FOD);
- Les produits lourds: fuels lourds industriels, bitumes, bases pour lubrifiants.

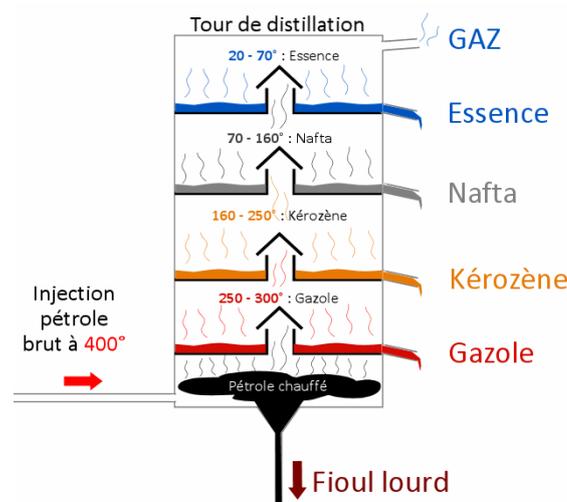


Figure 2. Produits de raffinage du pétrole (Naudot, 2019)

3.3. Gaz de Pétrole Liquéfié (GPL)

Les GPL sont utilisés comme combustible dans les cuisines domestiques, la production d'eau chaude ou de chauffage, et dans une moindre mesure comme carburant pour les véhicules. Ce sont un mélange d'hydrocarbures légers constitués principalement d'environ 80% de propane et de 20 % de butane, incolores et inodores, extrêmement inflammables et volatiles qui sont stockés sous forme liquide (250 litres de GPL gazeux égale à un litre de GPL liquide). Pour déceler d'éventuelles fuites, un additif est ajouté au mélange de gaz pour permettre une détection olfactive (mercaptan additif tel que le diéthylmercaptane ou le diméthylsulfide).

3.4. Essences

L'essence est un liquide inflammable, issu de la distillation du pétrole et utilisé comme carburant dans les moteurs à combustion interne. D'après Marchal *et al.* (2003), les essences sont des liquides qui possèdent une grande densité d'énergie dont le nombre de carbone est compris entre 4 et 10. Ce sont des mélanges d'hydrocarbures, auxquels peuvent être ajouté d'autres produits combustibles ou adjuvants (Colombano, 2010). On y trouve en moyenne (Fig3) :

- 20 % à 30 % d'alcane (hydrocarbures saturés) ;
- 5 % de cycloalcanes (hydrocarbures saturés cycliques) ;
- 30 % à 45 % d'alcènes (hydrocarbures insaturés) ;
- 30 % à 45 % d'hydrocarbures aromatiques, parmi lesquels les BTEX, dont la répartition est décrite dans la Figure 4.

L'essence se présente sous une couleur jaune très pâle voir transparente. Elle est par ailleurs fortement odorante, facilement inflammable et très volatile.

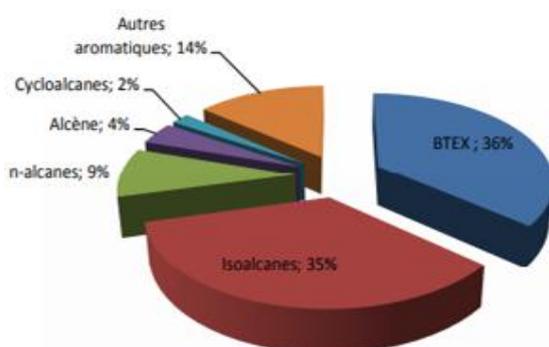


Figure 3. Composition de l'essence (Lemière *et al.*, 2001)

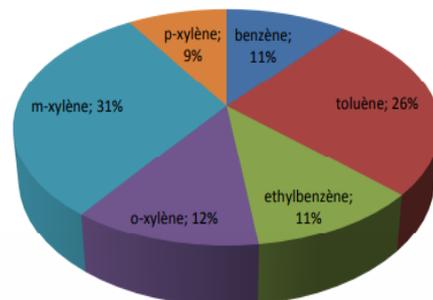


Figure 4. Répartition en masse des BTEX dans l'essence (Ata Mitra & Roy, 2011)

3.5. Le kérosène

Le kérosène ou pétrole lampant, est un mélange d'hydrocarbures issu de la distillation et du raffinage du pétrole brut. De formule chimique allant de $C_{10}H_{22}$ à $C_{14}H_{30}$; le kérosène est constitué de plus de 80 % d'hydrocarbures aliphatiques et de 0 à 15 % d'hydrocarbures aromatiques en C_8-C_{15} . Sa teneur en soufre est négligeable. Le kérosène est un liquide blanc ou légèrement jaune qui présente une légère odeur de pétrole.

3.6. Le diesel

Le diesel ou gasoil, est très largement utilisé comme carburant automobile dans les moteurs à allumage par compression. Sa présentation est plus détaillée dans la partie « Analyses et protocole expérimental » du Chap5.

3.7. Autres produits

- ❖ **Le fioul domestique** fait partie des énergies de chauffage. Comme il possède les mêmes caractéristiques que le gazole, un colorant rose lui est rajouté pour le différencier.
- ❖ **Les bitumes** sont des mélanges d'hydrocarbures à poids moléculaire élevé, utilisés fréquemment dans le façonnage des routes.
- ❖ **Les lubrifiants** sont utilisés pour réduire les frottements et limiter l'usure des pièces des moteurs et des machines.
- ❖ **Additifs oxygénés** qui sont rajoutés aux produits pétroliers, tels que les additifs antidétonants de l'essence ou ceux du gasoil. Les additifs les plus courants sont des éthers (le MéthylTertButyEther (MTBE) et l'EthylTertButyEther (ETBE), des alcools (alcool isopropinique et alcool isobutylique) (Bocard, 2006).

4. Forages, Fluides de forage et bourbiers pétroliers

4.1. Forage pétrolier

L'opération de forage est considérée comme l'une des principales opérations par laquelle les produits pétrochimiques sont extraits des terres (Onshore) et des eaux profondes (Offshore) (Hassan *et al.*, 2017). Le système de forage pétrolier est un ensemble structurel, visant à accéder aux roches sédimentaires pouvant contenir des hydrocarbures, c'est également le trou résultant de l'opération de forage. Dans l'industrie pétrolière le système de forage le plus répandu est le système de forage rotary qui nécessite des équipements sur la surface «l'installation» reliée avec d'autres équipements qui s'étend sous terre «la garniture»

(Fig5). Généralement son principe consiste à utiliser un outil qui détruit la roche sous l'effet du poids et de la rotation. Parmi les forages pétroliers les plus couramment connus on note : (1) forage d'exploration pour confirmer la présence d'hydrocarbures, (2) forages d'évaluation qui permettent d'estimer la viabilité économique du développement et forages de production pour aboutir à l'exploitation d'un gisement avec des puits de développement pour la mise en production

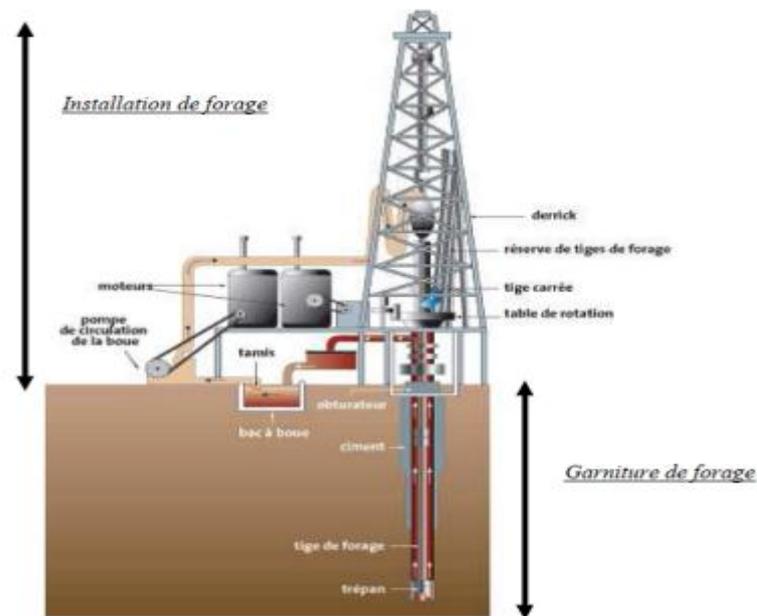


Figure 5. Plateforme de forage (Ba, 2010)

4.2. Fluides de forage

Un fluide de forage, appelé aussi boue de forage, est un système composé de différents constituants liquides (eau, huile) et/ou gazeux (air ou gaz naturel) contenant en suspension d'autres additifs minéraux et organiques (argiles, polymères, tensioactifs, déblais, ciment,...etc) (Malo *et al.*, 2015) (Tab2). Ils sont exploités pour la réalisation des excavations en terrains difficiles lors des travaux en forages dirigés. Le type de boue est choisi en fonction des performances recherchées et désigne les propriétés physico-chimiques du fluide de forage. Trois types de boues sont souvent employés : la boue à base d'eau (Water Based Mud, WBM), la boue à base d'huile (Oil Based Mud, OBM) et la boue synthétique (Synthetic Based Mud, SBM). Les boues de forage doivent avoir des propriétés telles qu'elles facilitent, accélèrent le forage, favorisent ou tout au moins ne réduisent pas d'une manière sensible et permanente les possibilités de production des sondages (Lummus et Azar, 1986). Elles sont généralement employées pour stabiliser les parois d'excavation (les parois latérales) et pour évacuer les déblais de forage.

Tableau 2. Composition des fluides de forages (Parigot et Garcia, 1974)

Composants	Exemples
Les colloïdes argileux	les bentonites, les attapulgites
Les colloïdes organiques	l'amidon ; CMC (carboxyle Méthyle cellulose.)
Fluidifiants et défloculants	les polyphosphates de sodium, les tanins, les lingosulfonates les lignines ; les tourbes, acides humique et lignites.
Les additifs minéraux	soude caustique (NaOH) ; le carbone de soude (Na ₂ CO ₃) le bicarbonate de sodium (NaHCO ₃) le gybse (CaSO ₄ hydraté) ; la chaux éteinte (Ca(OH) ₂) le chlorure de sodium (NaCl) ; le chlorure de calcium (CaCl ₂)
Les produits organiques	les antiferments ; les anti-mousses ; les agents de décoincement les antifrictions et extrême-pression ; les anti-corrosions les anti-bourrant et accélérateurs de vitesse d'avancement.
Alourdisants	la braytine ou sulfate de baryum (BaSO ₄ , densité : 4,3) carbonate de calcium (CaCO ₃ , densité : 2,7). la galène ou sulfure de plomb (PbS, densité : 7)
Les colmatants	colmatant granulaires ; colmatant fibreux ; colmatant gonflants colmatant lamellaires ; colmatant à prise (liant hydraulique)

4.3. Les lagunes à hydrocarbures

Les lagunes à hydrocarbures sont définies, comme étant des cavités naturelles ou artificielles creusées dans le sol, non équipées d'un fond étanche, d'une paroi latérale, d'une membrane ou de toute autre forme d'étanchéité. Les origines des lagunes ont été regroupées en cinq catégories distinctes: 1) l'exploration et la production pétrolière; 2) le raffinage des produits pétroliers; 3) la pyrolyse de la houille; 4) les accidents impliquant des hydrocarbures; et, 5) des origines autres (ex. lagune de déballastage des navires). En général, deux types de dépôts liés aux activités d'exploration et production pétrolière s'apparentent à des lagunes à hydrocarbures ; on distingue : (1) les dépôts de boues de forage ou « bourbiers » et (2) les fosses de brûlage (« burn pits »). La création d'un bourbier préalablement aux opérations de forage répond à plusieurs nécessités :

- ✓ la récupération et le stockage temporaire des déchets solides (cuttings) provenant de l'exécution du forage ;
- ✓ la récupération de l'écumage de la boue de forage associée aux déchets solides ;
- ✓ le stockage temporaire de la boue de forage avant tout changement de phase (ex : passage d'une boue salée à une boue à l'eau douce) ;

- ✓ le stockage temporaire des résidus liquides non pétroliers lors des essais de production (eau de la formation géologique), les résidus pétroliers pouvant être détruits dans une fosse de brûlage (« burn pit »).

Le bournier est une fosse de 2000 à 3000 m³ qui sert à recevoir les rejets d'effluents liquides et les déchets solides issus d'un forage. Il est aujourd'hui équipé d'un revêtement plastique étanche (liner) (Fig6a) qui joue le rôle d'une plateforme, et d'un déshuileur après la surverse. Les résidus sont ensuite récupérés par pompage à partir de camions sous vide et dirigés vers des décharges autorisées. Ce processus implique une ségrégation organisée des rejets au niveau du chantier de forage. A titre d'exemple, un bournier à HMD, en fin de forage, peut contenir jusqu'à 600 m³ de gasoil perdu par encapsulation. Ces quantités seront par la suite lessivées sous l'action des eaux de rejets qui peuvent atteindre jusqu'à 12000 m³. Cependant, les hydrocarbures non solubles dans l'eau se retrouvent en flottaison sur la surface du bournier, alors que ceux solubles se verront entraînés en profondeur par infiltration du fluide vecteur, en l'occurrence l'eau de rejet (Lounis et Daoud, 2005). Dans le passé, les bourniers étaient débarrassés de la phase liquide par infiltration dans les sols puis remblayés par une couche de matériaux terrigènes. Ces sites de dépôt de boues de forage (Fig 6b) sont principalement contaminés par des molécules toxiques telles que les hydrocarbures (gasoil ou pétrole), des métaux lourds et des métalloïdes (arsenic), du H₂S ou d'autres produits soufrés indésirables, voire même des radionucléides. La boue peut aussi être chargée de composés organiques ou explosifs inflammables (tels que du gaz naturel ou d'autres hydrocarbures gazeux). Vu le risque d'infiltration vers les nappes phréatiques qui sont très vulnérables à toutes contaminations, il est strictement indispensable d'imperméabiliser les bourniers, avant le démarrage du forage pétrolier et de les compartimenter en bassin pour séparer les types de rejets huileux et à base d'eau. L'imperméabilisation se fait par :

- * Enduit spécial (terre fine + argile).
- * Asphalte plus un produit bitumineux.
- * Bentonite qui présente aussi une action de détoxication.
- * Revêtir les parois du bournier par de larges pièces en plastique.

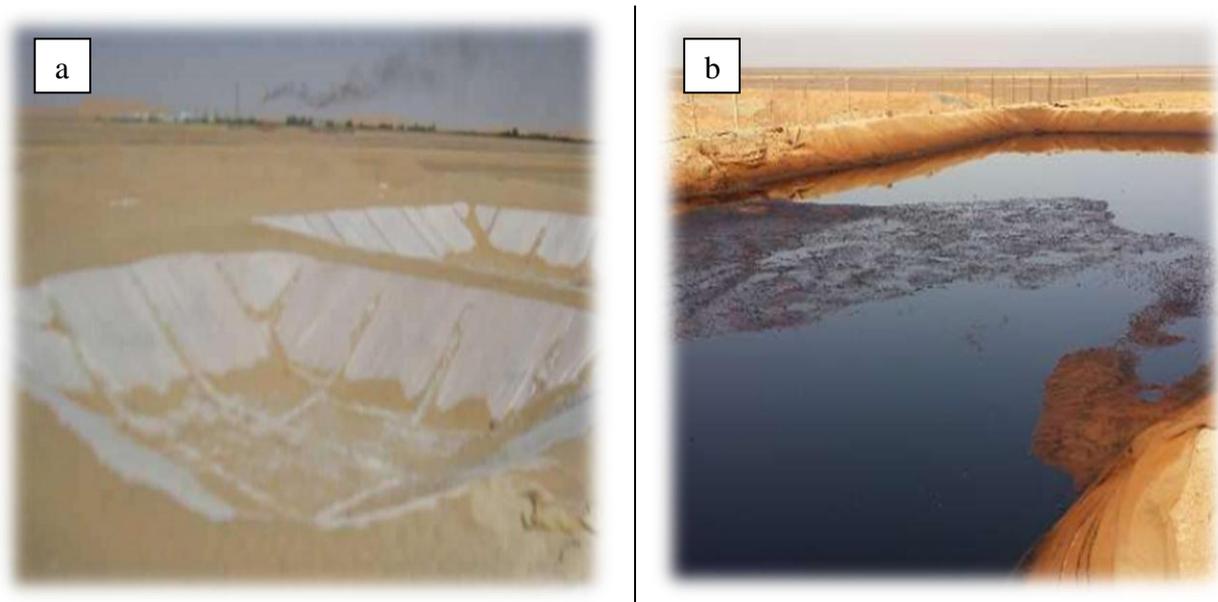


Figure 6. Préparation d'un borbier (a) et borbier à Hassi Messaoud (b) (Hadj Abbas, 2023)

5. Empreinte du secteur énergétique sur l'environnement

Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents qui peuvent être introduits dans l'environnement par diverses sources naturelles (éruptions volcaniques et incendies naturels) (Liu *et al.*, 2014) et anthropiques (incinération des déchets, émissions des véhicules à moteur, combustion du charbon, raffinage du pétrole, combustion des combustibles fossiles, industrie du coke et de l'acier) (Gupte *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2015 ; Callen *et al.*, 2014 ; Jang *et al.*, 2013 ; Hedberg *et al.*, 2005 ; Adeniji *et al.*, 2019). Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux et représentent une menace pour la santé publique (Kim *et al.*, 2018 ; Miri *et al.*, 2019). Ils sont persistants présentant des toxicités cancérogènes, tératogènes et mutagènes (Grimmer, 2018).

Les hydrocarbures pétroliers sont souvent détectés dans diverses matrices environnementales, y compris le sol, l'eau, les sédiments et les micro-organismes aquatiques (Wang *et al.*, 2019). Les HAP pétrogéniques et pyrogènes sont les plus abondants et généralement formés par la réduction des précurseurs biogènes (Tongo *et al.*, 2017 ; Xiao *et al.*, 2014). Ils présentent un certain nombre de problèmes s'ils sont rejetés dans l'environnement sous forme de matières premières ou de pétrole brut. Parmi ces problèmes, mentionnons les dangers d'explosion et d'incendie, la migration dans le sol, l'eau et l'air, les odeurs, et la perturbation des processus édaphiques comme la rétention d'eau et le cycle des éléments nutritifs.

5.1. Les hydrocarbures dans l'air

L'extraction, le transport et l'utilisation des produits pétroliers produit une grande quantité de substances chimiques qui sont émises dans l'atmosphère. Cela se remarque visiblement dans les puits de pétrole d'où jaillit un géant feu entretenu nuit et jour par une géante cheminée visible à des kilomètres à la ronde. Au cours de cette opération, des milliers de polluants et autres gaz nocifs sont rejetés dans l'atmosphère et s'incrustent dans la stratosphère. Il s'agit notamment du dioxyde de soufre, du monoxyde de carbone et d'azote, du soufre, du fluor, du plomb, etc. Il est à noter aussi que la croissance rapide de l'industrialisation a augmenté les émissions quotidiennes de HAP (Lang *et al.*, 2008 ; Zhang et Tao, 2009).

Les hydrocarbures pétroliers existent dans l'air ambiant en phase vapeur ou dans les aérosols en fonction de conditions atmosphériques (température ambiante, humidité, etc.), la nature de l'aérosol (origine et propriétés) et les propriétés de chaque hydrocarbure (Zhang et Tao, 2009 ; Wang *et al.*, 2017). Les hydrocarbures légers réagissent avec d'autres polluants environnementaux tels que l'ozone, les oxydes d'azote et le dioxyde de soufre et forment des diones, nitro- et des dinitro-hydrocarbures, ainsi que des acides sulfuriques.

Cependant, les émissions des véhicules à moteur demeurent une source significative d'hydrocarbures dans les aérosols atmosphériques (Kumari *et al.*, 2011) ce qui exprime leur concentration dans les environnements urbains. En général, les hydrocarbures entraînent des risques à l'atmosphère par le fait qu'ils réduisent la couche d'ozone et contribuent au phénomène planétaire du réchauffement climatique avec les gaz à effet de serre.

5.2. Les hydrocarbures dans l'eau

Les cours d'eau sont des milieux renouvelables. Ils sont dotés, comme le sol d'un pouvoir de régénération naturelle et d'une capacité de dilution. Les hydrocarbures pétroliers qui arrivent dans l'environnement marin peuvent avoir quatre origines majeures: les sources géochimiques, l'extraction de pétrole, le transport et la consommation, entraînant des risques de pollution (accidentelle et chronique) (Soltani, 2004). Une fois déversé en mer, le pétrole est soumis à différents processus qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques (Fig7). On distingue généralement une phase d'évolution à court terme qui intervient dans les premiers jours qui suivent le déversement marquée par :

- L'étalement de la nappe,
- L'évaporation des fractions légères,
- La dissolution des composés les plus solubles,
- L'émulsification du produit sous l'effet de l'agitation,
- La sédimentation par fixation du produit sur les matières en suspension.

C'est durant cette phase d'évolution que plusieurs phénomènes majeurs sont observés: le déplacement des nappes d'hydrocarbures à la surface de l'eau sous l'effet des vents et des courants, la pollution éventuelle du littoral, la dispersion des hydrocarbures dans la masse d'eau, la contamination des fonds marins, les effets écologiques immédiats par mortalités massives et fortes contaminations des espèces marines. On remarque aussi une phase d'évolution à long terme qui se déroule sur des semaines, des mois, voire plusieurs années. Cette seconde phase d'évolution est associée à la phase de décontamination de l'environnement sous l'effet du niveau d'énergie des sites contaminés : énergie solaire (photo-oxydation), énergie mécanique du milieu (dispersion naturelle), énergie biologique (biodégradation, métabolisation *in vivo*). Selon Noemie *et al.* (2003), 15% du pétrole brut s'évapore dans l'atmosphère, 16% se dispose dans l'eau, 22% est biodégradé, 3% s'agglomère en haute mer, 15% s'échoue sur les côtes et 28% non dégradé pénètre dans le sédiment.

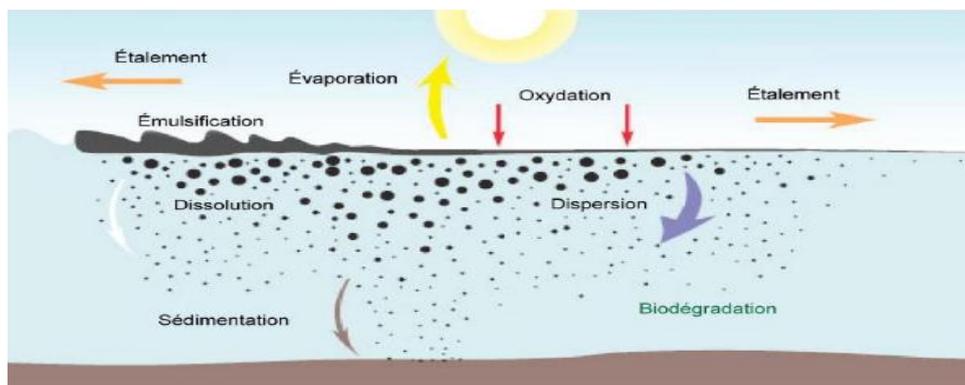


Figure 7. Comportement des hydrocarbures lors d'un déversement en milieu aquatique (GENIVAR, 2013)

5.3. Les hydrocarbures dans les sols

Le sol est un milieu dynamique et complexe. Il représente une interface entre la lithosphère dont il est la partie la plus superficielle, l'atmosphère, la biosphère, les activités humaines et l'hydrosphère (eaux superficielles ou de nappes). La contamination des sols a des origines diverses, qui résultent souvent de zones sources, autour desquelles se développent

des zones diffuses. À la suite d'un déversement, sous l'influence de processus de transports horizontaux et verticaux, les hydrocarbures vont se propager dans le sol. Ils seront également soumis à différents processus d'altération physique, chimique et biologique qui vont modifier leur composition chimique et leurs propriétés physiques ainsi que leur devenir dans le milieu. Il s'agit respectivement des processus de photo-oxydation et de biodégradation, d'évaporation, d'adsorption, de percolation, de dissolution et de sédimentation (Fokou Mbogne, 2017) (Fig8). Il a été rapporté que quelques jours après un déversement de pétrole, le taux de perte d'hydrocarbures dans le sol par évaporation atteint 5-10% pour les fractions lourdes, 40% pour les produits pétroliers bruts et 70% pour les fractions volatiles (Lee *et al.*, 2013).

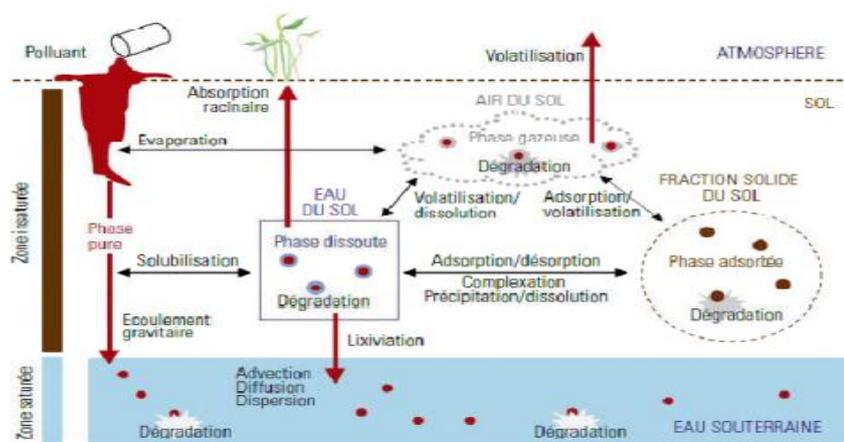


Figure 8. Le devenir des polluants dans le sol (Maes *et al.*, 2007)

5.3.1. Cas des bourbiers pétroliers

Le bourbier est un lieu d'isolement et de stockage des déchets de boue du forage. Les éléments essentiels qui constituent ces déchets sont des hydrocarbures (gasoil), de l'eau, des déchets solides (déblais de forage) qui contiennent des métaux lourds, des radionucléides, ...etc, et les sels. Ces substances chimiques sont connues pour le risque, la pollution et l'endommagement de l'environnement qu'elles présentent. Leur toxicité change de manière significative, de non toxique à extrêmement toxique.

Sur le plan environnemental, en plus des pertes de circulation des fluides pendant et après le forage, le bourbier, en tant que collecteur des produits liquides et solides issus du forage, représente une grande source de pollution et de danger. Dans la plupart des cas, les rejets et liquides de forage (boue de forage, cutting , ...,etc) sont déversés directement sur le sol sans aucune protection dans des fosses non conformes et non protégées. Les impacts environnementaux des activités de forage seraient minimaux si les déchets demeuraient à

leurs points de rejet. Malheureusement, ces déchets peuvent être transportés d'un point à un autre selon certaines voies de migration. La libération des polluants contenus dans la source vers l'environnement ne s'effectue pas de façon homogène, et elle dépend aussi bien des polluants que de la nature des solides porteurs. Elle s'effectue par les vecteurs suivants :

- Ruissellement des eaux de pluie ou de surface à la surface de la zone polluée, ou du tas de solides pollués; les polluants sont alors transportés par l'eau, jusqu'à infiltration dans le sol
- Infiltration des eaux de pluie ou de surface à travers la surface de la zone polluée, ou de tas de solides pollués, puis dans la zone non saturée sous-jacente ; les polluants sont alors déplacés par l'eau percolant vers les nappes ;
- Dispersion aérienne des polluants (poussières au vent, évaporation des polluants volatils), suivie de retombées sur les sols environnants sous forme de pollution diffuse.

Le borbier peut aussi représenter un danger pour les animaux, en effet après avoir fini le forage du puits et l'avoir mis en production l'appareil est démonté puis évacué, il ne reste que le borbier en attente d'être traité qui constitue un piège pour les animaux.

Chapitre .2.
Le champ pétrolier
de
Hassi Messaoud



Chapitre .2. Le champ pétrolier de Hassi Messaoud

1. Présentation de la ville de Hassi Messaoud

La ville de Hassi Messaoud (HMD) est considérée comme le poumon économique du pays étant donné qu'elle renferme des gisements de l'or noir. Cependant, l'activité pétrolière des différentes sociétés nationales et internationales qui y sont implantées, attire une population tributaire de l'extérieur, ce qui rend Hassi Messaoud un pôle cosmopolite. En effet, la commune de Hassi Messaoud (Fig9) se situe au Sahara septentrional, au sud-est d'Ouargla. Elle compte une population d'environ 45 147 habitants (ONS, 2008) et occupe une superficie d'ordre de 71 237 km² représentant 43.64% de la surface totale de la wilaya (DPAT Ouargla, 2013). Il est à noter que la moitié de cette surface est occupée par des grandes accumulations sableuses d'altitude qui dépassent 200 m formant des Ergs. Le climat est hyperaride avec une faible précipitation annuelle et une forte température.

Hassi Messaoud est le nom d'un puits d'eau ancien, halte caravanière sur les routes du Sud. Le premier puits pétrolier foré dans le Sahara algérien l'a été à proximité. Or, il s'est révélé par la suite que ce lieu était approximativement au centre géographique d'un vaste bassin pétrolifère. La ville de Hassi Messaoud est née du pétrole et vit aujourd'hui du pétrole (Seghiri, 2002). Cependant, les bassins les plus productifs d'hydrocarbures en Algérie demeurent ceux de l'Oued Mya où se trouvent les gisements géants de Hassi Messaoud et de Hassi R'mel, et de Berkine où se trouvent les gisements d'Ourhoud et Hassi Berkine Sud. Les forages dans le Sahara algérien se succédaient à un rythme rapide, tant sur l'énorme champ de gaz de Hassi R'Mel, que sur le gisement de pétrole géant de Hassi Messaoud, qu'on allait bientôt ranger ce dernier parmi les plus grands et plus complexes gisements de l'Algérie, de l'Afrique et du monde.

De nos jours, la création de la nouvelle ville de Hassi Messaoud résulte de l'application directe de la loi n° 04-20 du 25 décembre 2004 relative à la prévention des risques majeurs et à la gestion des catastrophes ; pour (1) faire face aux perspectives de développement des activités d'exploitations minières en direction de la ville existante et (2) prendre en compte les risques encourus par la population en égard à la proximité des installations pétrolifères et gazières.

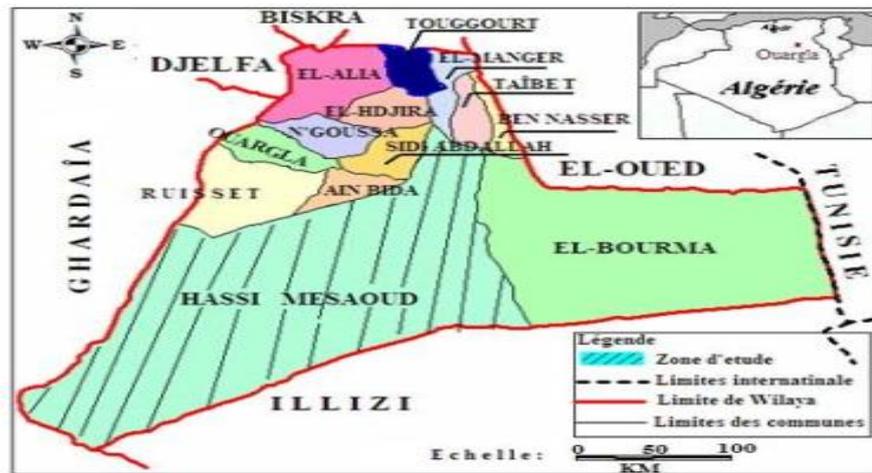


Figure 9. Carte de la localisation géographique de Hassi Messaoud (In Bouselsal, 2017)

2. Généralités sur le champ de Hassi Messaoud

2.1. Historique du champ

Après la mise en évidence par la sismique réfraction de la structure de Hassi Messaoud (HMD) comme étant un vaste dôme structural (une structure géologique capable de constituer un piège pour les hydrocarbures), les ingénieurs géologues et techniciens de la compagnie française SN.REPAL (Société Nationale de recherche pétrolière en Algérie Elf actuellement) ont amorcé le 1^{er} forage du puits MD1 (MD pour Messaoud) le 16 janvier 1956, non loin du puits chamelier de Hassi Messaoud du fameux Messaoud ROUABEH. Le 15 juin de cette même année, ce forage a découvert à 3338 mètres de profondeur de l'huile dans les grès du Cambrien.

En mai 1957 et à 7 km au Nord-Ouest de MD1, le forage OM1 foré par la C.F.P(A) (Compagnie Française des Pétroles (Algérie) TOTAL actuellement) confirmait l'existence d'une quantité très importante d'huile dans les grès du Cambrien. Depuis ces deux découvertes le forage n'a pas cessé. La mise en production avait commencé en 1958 avec 20 puits d'exploitation et vu la demande nationale et internationale en pétrole et à partir des mesures de nationalisation des hydrocarbures, le 24 Février 1971 en 2004 le nombre de puits forés est d'environ 1200. Par la suite, le champ de Hassi-Messaoud fut divisé en deux concessions distinctes : C.F.P(A) pour le champ Nord. SN.REPAL pour le champ Sud. De ce fait, le champ de Hassi Messaoud a connu plusieurs périodes de développement. Il a d'abord connu une phase de développement des « zones de production » par forages verticaux jusqu'à l'an 2000, et une phase de développement des zones structurellement complexes ainsi que des réservoirs de faibles propriétés matricielles (R2 supérieur) par forages non conventionnels,

depuis 1997. On peut distinguer deux (2) phases majeures, chacune comprend plusieurs périodes :

- Phase de développement par forages verticaux (1958-2000) ou le développement des «zones de production» s'est effectuée à travers le forage de 80 % des puits verticaux du gisement, dont 14 % sont des injecteurs. Des opérations de fracturation hydraulique ont concerné 250 puits verticaux,
- Phase de développement par forages non conventionnels (1997-2005) ou des programmes de forages type short radius ont été effectués. Plus de cent puits verticaux inexploitable ont été repris en short radius depuis 1997. Les statistique jusqu'à Mars (2008) ont montré que le nombre de puits foré est de 1369 puits.

2.2. Situation géographique et géologique

Hassi Messaoud se situe au Sahara septentrional à 850 km au sud-est d'Alger, à 350 km de la frontière Algéro-Tunisienne et à 86 km au sud-est de la ville d'Ouargla dont elle fait partie administrativement. Le gisement pétrolier de HMD occupe la partie centrale de la province triasique (vaste formation évaporitique du trias) dans le bassin de Berkine et s'élève à une altitude de 142 m. Sa localisation en coordonnées géographique est la suivante :

- au nord par la latitude 32°15.
- au sud par la latitude 31°30.
- à l'ouest par la longitude 5°40.
- à l'est par la longitude 6°35.

Sa localisation en coordonnées Lambert est la suivante : X= 790,000 – 840,000 Est. Y= 110,000 – 150,000 Nord. Le champ HMD est aussi limité (Fig 10):

- au Nord, par les structures de Djamâa-Tougourt ;
- à l'Ouest, par la dépression d'Oued M'ya,
- au Sud par le fond d'Amguid El-Biod ;
- à l'Est, par les hauts fonds de Dahar, Rhourd-El-Baguel et la dépression de Ghadames.
- Au NW par les gisements de Ouargla (Gellala, Ben Kahla et Houd Berkaoui)
- Au SW par les gisements d'El-Gassi, Zotti et El Agreb.
- Au SE par les gisements Rhoude El Baguel et Mesdar.

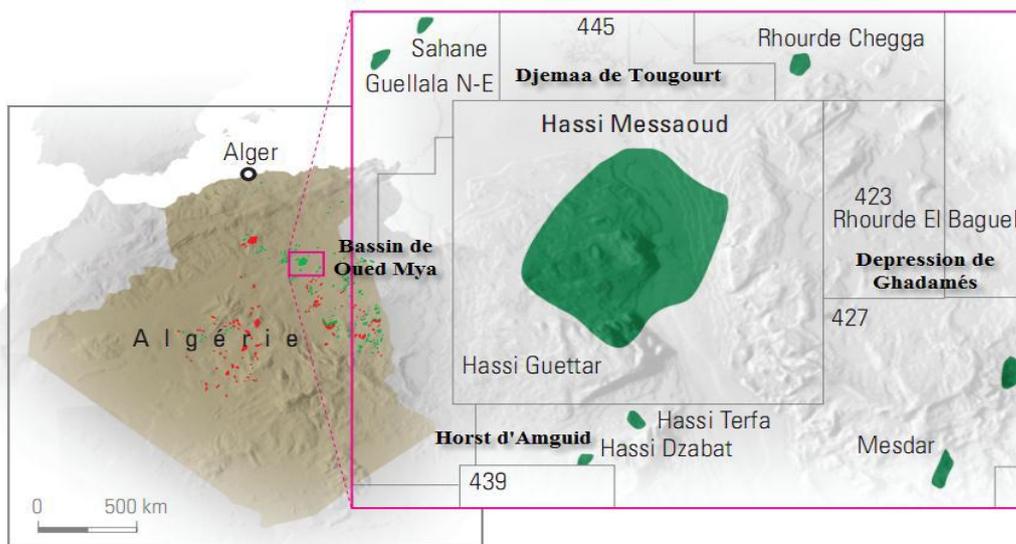


Figure 10. Localisation du champ pétrolier de Hassi Messaoud (Zeroug et al., 2007)

2.3. Structure du champ HMD

Le champ HMD est un vaste dôme anticlinal de 45 km de diamètre, de direction : N-NE/SS-O. Il est très fortement érodé et cisailé par un jeu de failles qui sont dues aux mouvements tectoniques des plaques, faisant apparaître une géométrie en Horst et Grabens. Ces failles sont détectées soit par décalage structural des formations ou encore lors de la répétition des séries sédimentaires. Ce gisement produit de l'huile dans le réservoir Cambro-Ordovicien formé essentiellement de grès compacts fins à grossiers est caractérisé par sa fissuration et son hétérogénéité qui se traduit remarquablement par les variations extrêmes des propriétés petro physiques, conduisant au changement de pression et de production d'une zone à une autre. Les accidents affectant le réservoir sont:

- Les failles de direction subméridienne et ainsi que d'autres failles qui sont perpendiculaire de direction Nord-Ouest / Sud-Est, ce qui fait ressortir le caractère tectonique ;
- Les cassures sans rejets qui ont un grand effet sur la fracturation du réservoir.

Les puits secs sont généralement liés aux accidents tectoniques aux fractures qui leurs sont associées. Du point de vue caractéristique du réservoir, le gisement de Hassi Messaoud est défini dans une trilogie parfaite :

- Hétérogène : sur une verticale et sur un plan.
- Discontinu : par l'écoulement des fluides.
- Anisotrope : par la présence de silt.

2.4. Zonation du champ HMD

L'évolution des pressions des fluides en fonction de la production a permis de subdiviser le gisement de Hassi Messaoud en 25 zones productrices numérotées et séparées par des hors zones (Fig11). Une zone de production est définie comme un ensemble de puits qui peuvent communiquer entre eux du fait de l'hétérogénéité du réservoir et/ ou de compartimentages structuraux dus à des blocs faillés (Farhat *et al.*, 2010). Le contour géologique de ces zones est constamment révisé au regard des nouvelles données obtenues (implantation de nouveaux puits). Il est à noter qu'une même zone (ex : la zone 1) peut être subdivisée en sous zones (ex : 1a, 1b, 1c). Le champ de Hassi Messaoud demeure traditionnellement divisé en Hassi Messaoud Nord et Hassi Messaoud Sud à chacun sa propre numérotation :

* **La numérotation du champ Nord** est une numérotation géographique complétée par une numérotation chronologique, exemple : Omo38

O : Majuscule, permis d'Ouargla ; m: superficie de la zone à huile: 1600 km² ;

o: Minuscule, superficie de la zone à huile de 100 km² ; 3 : Abscisse et 8 : Ordonnée

* **La numérotation du champ Sud** est principalement chronologique complétée par une numérotation géographique basée sur des abscisses et des ordonnées d'intervalle égale à 1,250 km et harmonisée avec les coordonnées Lambert. Exemple : MD10 (33) – (15).

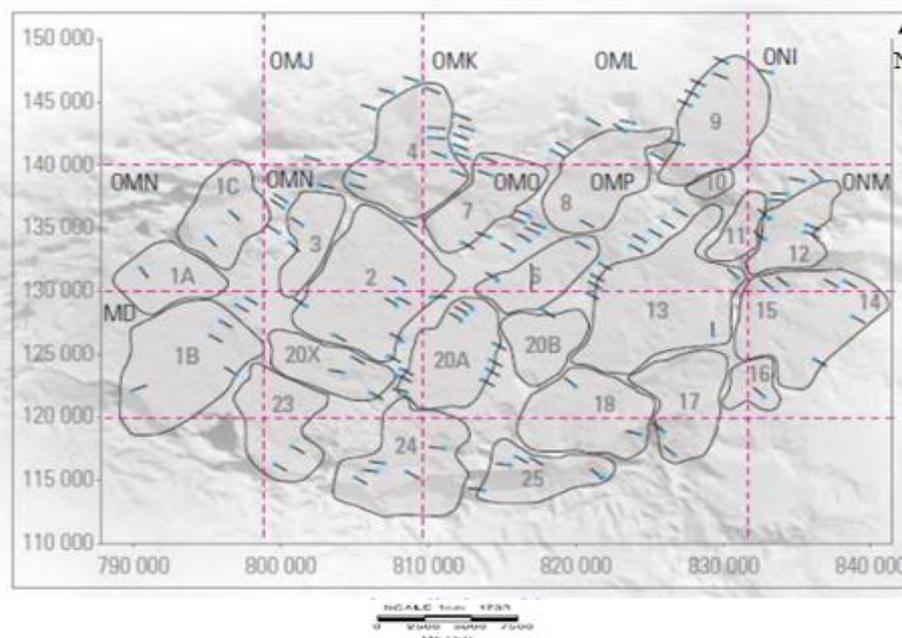


Figure 11. Zones et numérotation des puits de HMD (Sonatrach, 2002)

2.5. Description du réservoir du champ de HMD

Le gisement de Hassi Messaoud est à une profondeur qui varie entre 3100 et 3380 m. Son épaisseur va jusqu'à 200 m, il comprend trois réservoirs gréseux d'âge Cambrien, reposants directement sur le socle granitique. Il est représenté par une série gréseuse dont l'érosion post paléozoïque affecte une partie dans le centre du champ. Il se subdivise de haut en bas de :

- **Réservoir Ri** : c'est une zone isométrique dont l'épaisseur est de 45 m essentiellement quartzite à grains fins et à tigillites. Ce réservoir correspond au drain D5, qui est subdivisé en trois tranches 7, 8 et 9.
- **Réservoir Ra** : réservoir principal de Hassi Messaoud où tous les puits sont producteurs. Cette zone possède des caractéristiques pétrophysiques aptes à la production (68% des réserves). Elle est anisométrique dont l'épaisseur moyenne est de 120 m environ, composée de grès à ciment silico-argileux de grains moyens à grossiers. ce niveau se divise en trois zones de sédimentologie :
 - * **Zone I** : grossière inférieure subdivisée de bas en haut :
 - ✓ Drain D1 ;
 - ✓ Drain ID (Inter Drain) ;
 - ✓ Drain D2 ;
 - * **Zone II** : fine intermédiaire (D3) ;
 - * **Zone III** : grossière supérieure (D4).
- **Réservoir R2** : série gréseuse à ciment argileux, d'une épaisseur moyenne de 80 m.
- **Réservoir R3** : d'une hauteur d'environ 300 m, c'est une série gréseuse très grossière à micro conglomériques, très argileuse reposant sur le socle granitique qui a été rencontré à une profondeur inférieure à 4000 m, c'est un granite porphyroïde rose. Il se divise en deux sous niveaux ; le R2c et le R2ab. Cette zone est sans aucun intérêt pétrolier

3. Activités industrielles du champ HMD

Selon les données de l'Agence internationale de l'énergie (AIE) les réserves de pétrole de l'Algérie, à partir de 2021, s'élèvent à 12,2 milliards de barils. Ce chiffre place notre pays à la 16^{ème} place du classement mondial des 20 plus grandes réserves de pétrole. Le champ pétrolier de HMD, considéré comme l'un des dix plus grands champs pétroliers au monde, produit actuellement plus de 400 000 barils par jour et aurait une durée de vie de 80 ans. La

commune de Hassi Messaoud est considérée comme un ensemble de zones servant comme base opérationnelle pour les nombreuses entreprises nationales et internationales ayant une relation avec le pétrole soit pour la recherche des gisements soit pour la fouille des puits..., comme ENTP (Entreprise Nationale des Travaux Pétroliers), ENSP (Entreprise Nationale des Services des Puits), ENAFOR (Entreprise Nationale des Forages), ENGTP (Entreprise Nationale des Grands Travaux Pétroliers)...etc, travaillant en collaboration avec SONATRACH, ainsi qu'une concentration de logements (les bases de vie) construits provisoirement. Jusqu'au 10/09/2009, il compte 1393 puits de différents types, à savoir :

- 921 Puits producteurs de brut ;
- 62 Puits producteurs d'eau ;
- 57 puits injecteur d'eau ;
- 115 Puits injecteur de gaz ;
- 112 Puits abandonnés (huile + gaz + eau) ;
- 85 puits inexploitable ;
- 41 puits secs

Le gisement de HMD est caractérisé par ses puits productifs de pétrole, se formant principalement dans les réservoirs cambriens. Généralement, plusieurs gisements ont été mis en évidence, à savoir El Agreb, Zotti, El Gassi, Rhoude El Baguel et Mesdar. En plus des puits pétroliers, il en existe deux centres industriels :

- **Au Nord** : le Centre Industriel NAILI Abdelhalim (C.I.N.A) et deux unités stellites OMP-53 et OMN-77. Il est à noter que ce centre, recevant le brut du champ Nord de HMD est doté d'une unité de traitement de brut, d'une unité de GPL et d'une unité de compression.
- **Au Sud** : le Centre Industriel Sud (C.I.S) et six unités satellites W-1A, W-2A, E-1C, E-2C, S-1A et W-1C. Cependant, ce centre est constitué d'une unité de traitement de brut, de deux unités de GPL, d'une raffinerie (RHM2), d'une unité de compression et d'un laboratoire de qualité des produits finis.

Cependant, dans ces deux centres se fait le traitement du brut, qui sera par la suite acheminé vers le centre de collecte de Haoud El Hamra, puis expédié vers les centres industriels et les complexes d'exportation d'Arzew, Alger, Bejaia et Skikda. En effet, l'activité et la vocation de HMD est spécialement la production et l'exploitation du brut, secteur très convoité de par ses avantages.

4. Problèmes d'exploitation du gisement

Le champ HMD présente des problèmes de forage et de production qui sont généralement aggravés par les conditions sévères de températures et de pression régnant dans le gisement. Cependant, le premier problème est dû essentiellement aux pertes de boues et au temps de forage. Le second est dû aux dépôts d'asphaltènes dans le tubing à la présence, dans la formation, d'eau salée saturée dans les conditions de fond. Ces dépôts entraînent des bouchages et diminuent fortement la productivité des puits.

4.1. Problèmes de forage

Sur le champ de Hassi Messaoud, l'expérience montre que dans la même zone, avec une formation identique, en utilisant le même fluide, on peut rencontrer des problèmes différents. Lors de l'opération de forage, on rencontre des pertes de boues parfois brutales sont dues à la présence de fissurations assez développées, c'est le cas du puits OMOZ#84 qui fut abandonné en Septembre 2002 à la profondeur 334 m suite à un affaissement de la plate-forme dû à une perte importante de boue, provoquant la formation de caves. Plusieurs approches ont abordé le problème des vibrations et de la qualité des outils. L'analyse statistique montre que sur un nombre de 44 outils neufs de type PDC de diamètre 16" utilisés sur le champ de Hassi Messaoud entre 2002 et 2003, seulement 23 outils ont pu faire toute la phase, tandis que les autres outils ont été endommagés avant d'atteindre la cote finale, souvent à cause de vibrations excessives (Rachedi *et al.*, 2004). Ceci a eu comme conséquence l'utilisation d'un nombre supplémentaire d'outils de forage et une augmentation de la durée de réalisation de la phase 16", à la fois par une réduction de la vitesse d'avancement et par les manœuvres supplémentaires nécessaires pour changer l'outil de forage et pour nettoyer le trou des débris métalliques. En effet, les problèmes de vibration mènent souvent à une augmentation de la durée de forage, à l'usure prématurée des outils et à la fragilisation des parois du trou. Dans une autre optique, le risque de venues très probables d'eaux chlorurées calciques dans les niveaux de dolomie vacuolaire du lias dolomitique (LD2). C'est une formation caractérisée par une eau chlorurée calcique et une pression très élevée et il n'est pas possible de l'équilibrer par la pression hydrostatique sans provoquer des pertes : c'est l'exemple du puits OMKZ#712 où les opérations de logging intermédiaire furent annulées suite à la manifestation du LD2. Enfin, les pertes de boue dans le réservoir constituent une partie importante des incidents qui surviennent pendant la phase 6" ; une difficulté subsiste dans la façon de contrôler ces pertes sans endommager le réservoir. Elles sont liées à des zones de fissuration dont l'extension et l'intensité sont variables.

4.2. Les dépôts organiques

L'évacuation des hydrocarbures vers la surface provoque alors une sursaturation des alcanes les plus lourds. Il existe différents types de dépôts organiques (asphaltènes, résines, paraffines, cires ...etc.). Les asphaltènes et les paraffines sont des composés constituant la partie lourde du pétrole. Ils peuvent se déposer partout (matrice, les perforations, tubing) à cause du changement des conditions thermodynamiques (température ou/et pression). Généralement, le dépôt d'asphaltène est très fréquent dans les zones 1A, 1B, 1C et 23, par contre celui des paraffines s'observe le plus souvent en tête de puits.

4.3. Les dépôts minéraux

Les eaux des gisements pétrolifères sont en générale très chargées en sels et même saturées. On y trouve en prédominance le chlorure de sodium, il est toujours accompagné de sels de calcium, potassium, magnésium, baryum, strontium, en quantités très variables sous forme de sulfates, carbonates, bicarbonates, chlorures, iodures et bromures. La présence d'eau salée dans la formation provoque des dépôts de cristaux de sel dans le tubing dès que des quantités d'eau, même très faible, sont produites avec l'huile. C'est le résultat d'un changement des conditions thermodynamiques. Pour inhiber ces dépôts de sel, une injection d'eau douce en continu ou par bouchons est préconisée.

Il est à noter que le dépôt des sulfates représente le problème généralement le plus rencontré dans le champ de HMD. Les Sulfates (sulfate de calcium, sulfate de strontium ou sulfates de baryum) sont des dépôts difficiles à enlever chimiquement. Ils se forment principalement à cause de l'incompatibilité entre les eaux d'injection (eau d'injection-Albien qui est chargée en élément sulfate SO_4^{2-}) et les eaux de formation (eau de gisement-Cambrien-qui est chargée en baryum Ba^{2+}) soit pour l'adoucissement des puits salés ou pour le maintien de pression. Ils peuvent être présents dans le tubing, dans les perforations et même dans la formation. La formation de ces dépôts de sels donne des résultats néfastes sur les équipements utilisés lors le dessalage : bouchage des puits et corrosion des installations. Ces dépôts sont très difficiles à éliminer malgré l'injection d'un inhibiteur de dépôts (AD32).

4.4. Autres problèmes

Les particules fines qui proviennent d'habitude du réservoir, peuvent se déplacer et migrer avec la production du fluide et boucher les abords du puits causant ainsi une réduction de la production. La solution adoptée dans ce cas est le Mud acid. Aussi, les percées de gaz et d'eau dans les puits producteurs en zone d'injection posent des problèmes de production.

Un puit nécessite à court terme du gaz lift pour le maintenir en production d'où des investissements supplémentaires. Les percées de gaz sont moins dramatiques mais demandent une exploitation des puits à des pressions en tête élevées et occasionnent des pertes de charges supplémentaires dans la collecte.

5. Les rejets d'un champ pétrolier

Les bourbiers de forage posent des problématiques au niveau des volumes cumulés aux files des années d'exploitation. Au d'épis des efforts fournis par la SONATRACH le nombre de bourbiers traités reste plus inférieurs à celui accumulé. Les activités pétrolières sont accompagnées de rejets qui sont généralement de trois types :

- ❖ **Rejets gazeux** représentés essentiellement de NO_x , de CO et d'hydrocarbures imbrulés émis des torches des centres industriels.
- ❖ **Rejets liquides** qui proviennent des centres de production ou de réalisation de forage, sont principalement constitués d'eau de purge, d'eau de nettoyage et eau de refroidissement. Ces rejets sont caractérisés par des teneurs élevées en hydrocarbures et en métaux lourds et d'une forte salinité. Ajoutons à cette catégorie de rejets ceux des bases de vie. Lors d'un forage, une panoplie de produits chimiques est employée dans la formulation des boues de forage. En plus des hydrocarbures, on note des additifs spéciaux. Ces rejets liquides sont généralement stockés dans des bourbiers.
- ❖ **Rejets solides** renferment généralement des déchets industriels tels des batteries, des bidons, des câbles et même des cartouches de filtration. Ces déchets une fois triés sur site, seront envoyés vers des sites appropriés pour leur élimination. Les déblais de forages représentent la majorité des déchets générés lors du projet et leur composition reflète la géologie du sol. Il est à noter que ce type de rejet est généralement stocké dans des bourbiers.

Après plusieurs années d'activité industrielles et d'exploitation du brut dans la région de Hassi Messaoud, de nombreux bourbier de superficies différentes (Tab 3) ont été créés pour recevoir des différentes quantités d'eaux huileuses, voire du brut dans le cas de déversements accidentels. A titre d'exemple, deux principaux points de rejets à l'environnement des effluents liquides industriels du complexe CIS sont :

- ❖ Un bourbier d'une superficie de 5000 m² environ recevant les effluents liquides de l'unité RHM2, situé au nord-ouest du CIS ;
- ❖ Un bourbier Sud d'une superficie de 270 000 m² environ, recevant les eaux en sortie de l'unité de traitement des eaux huileuses (UTEH).

Ces deux bourbiers principaux (bourbier nord-ouest et bourbier sud) ne sont pas équipés d'un liner et ne sont pas étanches. Le bourbier nord-ouest a été réalisé par excavation du sol et compactage sommaire des berges. Le bourbier sud est une lagune endiguée dans une dépression naturelle et contenue par surcreusement. Ils ne sont pas équipés d'une clôture grillagée mais situés tous deux à l'intérieur de l'enceinte clôturée du CIS. Une opération de forage pétrolier, dans le champ pétrolier de Hassi Messaoud, génère en moyenne 1500 m³ de déchets solides, composés principalement de fluides résiduels et de déblais stockés en bourbier avant traitement (Ighilahriz *et al.*, 2020).

Tableau 3. Les principaux bourbiers de la région de Hassi Messaoud

Nom du bourbier	Superficie du bourbier	Type de Rejet	Distance par rapport aux habitations les plus proches	Distance par rapport aux établissements limitrophes	Date de mise en service du bourbier
Bourbier Unité Satellite OMN 77	Le 1 ^{er} bassin: 15000 m ² Le 2 ^{ème} bassin: 15000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs	12 km	05 Km	1980
Bourbier Unité Satellite S1A	Le 1 ^{er} bassin : 2400 m ² Le 2 ^{ème} bassin : 5000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs (lors de l'arrêt du bassin API)	05km	05km	1972
Bourbier Unité Satellite W1A	40000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs	15 km	15 km	1972
Bourbier Unité Satellite E1C	220 000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau Des séparateurs	17 km	05 Km	1978
Bourbier Unité Satellite W2A	Le 1 ^{er} bassin: 2000 m ² Le 2 ^{ème} bassin: 3000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs	15 km	10 Km	1975
Bourbier Unité Satellite E2A	20 000 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs	02 km	02 km	1973

Bourbier Unité Satellite W1C	Le 1 ^{er} bassin: 300 m ² Le 2 ^{ème} bassin 3000 m ² Le 3 ^{ème} bassin: 1200 m ²	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des séparateurs	01 km	15 km	1989
Bourbier02 Centre Industriel Sud (CIS)	800 m ² avec une extension	Eau huileuse provenant des piscines et des purgés.	03 km	A l'intérieur du CIS	1979
Bourbier Centre Industriel Sud (CIS)	270 000 m ² pellicule d'huile qui flotte sur environ 10	Eau huileuse provenant de la purge d'eau des déférentes unités.	02 km	-Centre enfûteur de NAFTAL Centrale électrique SONELGAZ	1959/ 1960

6. Impact des bourbiers sur l'environnement

Le bourbier est un lieu d'isolement et de stockage des déchets de boue du forage. Les éléments essentiels qui constituent ces déchets sont des hydrocarbures (gasoil), de l'eau, des déchets solides (déblais de forage) qui contiennent des métaux lourds, des radionucléides, ...etc, et les sels. Ces substances chimiques sont connues pour le risque, la pollution et l'endommagement de l'environnement qu'elles présentent. Leur toxicité change de manière significative, de non toxique à extrêmement toxique.

Sur le plan environnemental, en plus des pertes de circulation des fluides pendant et après le forage, le bourbier, en tant que collecteur des produits liquides et solides issus du forage, représente une grande source de pollution et de danger. Dans la plupart des cas, les rejets et liquides de forage sont déversés directement sur le sol sans aucune protection dans des fosses non conformes et non protégées. Les impacts environnementaux des activités de forage seraient minimaux si les déchets demeuraient à leurs points de rejet. Malheureusement, ces déchets peuvent être transportés d'un point à un autre selon certaines voies de migration. La libération des polluants contenus dans la source vers l'environnement ne s'effectue pas de façon homogène, et elle dépend aussi bien des polluants que de la nature des solides porteurs. Elle s'effectue par les vecteurs suivants :

- Ruissellement des eaux de pluie ou de surface ou les polluants sont alors transportés jusqu'à infiltration dans le sol ;
- Infiltration des eaux de pluie ou de surface à travers la surface de la zone polluée, ou de tas de solides pollués, puis dans la zone non saturée sous-jacente ; les polluants sont alors déplacés par l'eau percolant vers les nappes ;

- Dispersion aérienne des polluants (poussières au vent, évaporation des polluants volatils), suivie de retombées sur les sols environnants sous forme de pollution diffuse.

Le borbier peut aussi représenter un danger pour les animaux, en effet après avoir fini le forage du puits et l'avoir mis en production l'appareil est démonté puis évacué, il ne reste que le borbier en attente d'être traité qui constitue un piège pour les animaux.

7. Stratégies de l'état Algérien dans le domaine environnemental

L'importance et l'augmentation de l'activité industriel pétrolière en Algérie, crée de grands problèmes environnementaux. C'est ainsi que des lois et des décrets et des accords ont été formulés, dans le monde entier afin de protéger les écosystèmes et leurs composants des rejets des déblais de forages (Tab4). En Algérie, les grands principes qui régissent la réglementation en matière de protection du sol et du sous-sol sont formulés par les textes suivants :

- **La loi n°83-03 du 05/02/1993**, prend en considération la pollution du sol. Le législateur définit les déchets et pose les principes et les règles générales de leur gestion. Concernant cette dernière, la loi fait obligation à tout détenteur ou producteur de déchets d'assurer ou de faire assurer leur élimination en évitant seulement, et non en supprimant, les effets néfastes sur le sol, la faune, la flore, etc....
- **Le décret exécutif n°93-160 du 10/07/1993**, réglemente le déversement des huiles et lubrifiants aussi bien dans le milieu naturel que dans le réseau d'assainissement.
- **Le décret exécutif n°93-162 du 10/07/1993**, fixe les modalités de récupération et de traitement des huiles usagées.
- **Le décret exécutif n°94-43 du 30/01/1994**, fixe les règles de conservation des gisements d'hydrocarbures et de protection des aquifères.
- **Le décret du : 18/12/1992**, agissant en tant que norme européenne, publiée au Journal Officiel de la République Française le 30/03/1993, est la norme suivie par SONATRACH, pour le traitement des déblais de forage. Ce décret définit les paramètres qui devraient être analysés et leurs limites maximales à ne pas excéder pour que les déblais puissent être rejetés dans la nature.
- **Décret exécutif n°09-19 du 23 Moharram 1430 correspondant au 20 janvier 2009** portant réglementation de l'activité de collecte de déchets spéciaux ;

- **Décret exécutif n°06-104 du 28 février 2006** fixant la nomenclature des déchets, y compris les déchets spéciaux dangereux ;
- **Décret exécutif n° 05-314 du 10 septembre 2005** fixant les modalités d'agrément des groupements de producteurs et/ou détenteurs de déchets spéciaux ;
- **Décret exécutif n°05-315 du 10 septembre 2005** fixant les modalités de déclaration des déchets spéciaux dangereux ;
- **Décret exécutif n° 04-409 du 2 Dhou El Kaada 1425 correspondant au 14 décembre 2004** fixant les modalités de transport des déchets spéciaux dangereux ;
- **Décret exécutif n° 04-410 du 2 Dhou El Kaada 1425 correspondant au 14 décembre 2004** fixant les règles générales d'aménagement et d'exploitation des installations de traitement des déchets et les conditions d'admission de ces déchets au niveau de ces installations ;
- **Décret exécutif n° 04-410 du 14 décembre 2004** fixant les règles générales d'aménagement et d'exploitation des installations de traitement des déchets et les conditions d'admission de ces déchets au niveau de ces installations ;
- **Loi n° 01-19 du 27 Ramadhan 1422 correspondant au 12 décembre 2001** relative à la gestion, au contrôle et à l'élimination des déchets.

Tableau 4. Valeurs limites pour la mise en décharge des déblais de forage selon le Standard Européen

Eléments	Abréviation	Standard Européen
Les hydrocarbures totaux	HC	<5% (massique)
Chrome hexa valent	Cr ⁺⁶	<10mg/kg ou 1mg/l
Total chrome	Cr	<100mg/kg ou 10mg/l
Plomb	Pb	<100mg/kg ou 10mg/l
Zinc	Zn	<500mg/kg ou 50mg/l
Cadmium	Cd	50mg/Kg ou 5mg/l
Cyanure	CN	10mg/Kg ou 1mg/l
Nickel	Ni	<100mg/kg ou 10mg/l
Arsenic	As	<10mg/kg ou 1mg/l
Mercure	Hg	<10mg/kg ou 1mg/l

*Chapitre .3.
Evaluation de la
contamination du sol
de la zone d'étude*



Chapitre. 3. Evaluation de la contamination du sol de la zone d'étude

La région de Hassi-Messaoud est caractérisée par une industrie pétrolière très forte, elle renferme le plus grand gisement de pétrole d'Algérie - et de tout le continent africain. Le développement de cette industrie a permis de créer des rejets industriels dangereux sur l'écosystème à cause des forages pétroliers, de l'exploitation des unités de production ainsi que la prolifération des bourbiers. Le problème est ancien mais il se pose avec plus d'acuité aujourd'hui, étant donné l'accroissement préoccupant de ces rejets caractérisés par des teneurs élevées d'hydrocarbures et de métaux lourds. Qu'ils soient issus de forage, de Work Over des puits en production, ou tout type de rejet pétrolier solide ou semi-liquide, une caractérisation et gestion des projets de traitement de bourbiers y compris ceux ayant subi une transformation par solidification s'est avéré une nécessité.

Dans cette partie, sera présenté l'ensemble des moyens mis en œuvre pour pouvoir répondre à la problématique abordée dans cette thèse. Cependant, il est impératif d'apprécier le degré de pollution du sol du bourbier échantillonné, par l'analyse de différents paramètres de caractérisation.

1. Description de la zone d'étude

La zone étudiée est constituée par les gisements pétroliers de Gassi El Agreb, désigné par «complexe GEA » (Fig 12); qui se trouve dans le Sahara, à environ 900 km au sud-est d'Alger, dans le territoire de la wilaya d'Ouagla à environ 120 km et plus exactement au sud-ouest de la commune de Hassi Messaoud à 100 kms. Ces champs pétroliers sont situés entre la latitude 30° 48'N et la longitude 5° 30' E avec une altitude de 195 mètre.

Le complexe GEA est composé de trois champs producteurs de pétrole brut : El Gassi (ou Gassi), Zotti et El Agreb (ou Agreb), de quatre centres de traitement de brut (West Agreb, AR06, Old Zotti et GS01), d'un centre de réinjection d'eau (AR02) et d'un centre de compression et de réinjection de gaz (New Zotti). Toutefois, ces trois gisements indépendants sont caractérisés par :

- **Gassi**, découvert en 1956, est d'une superficie de 207 km². Il est divisé en deux principales entités : Gassi-North et Gassi-Core. Ce gisement est constitué de 24 puits producteurs de pétrole ou le brut est transporté via des pipes vers Haoud-El-Hamra « H.E.H » ;
- **Zotti**, découvert en 1959, est d'une superficie de 77 km² et contient 5 puits. Il est composé de deux centres Old Zotti et New Zotti ;

- **Agreb**, découvert en 1963, est d'une superficie de 162 km², et est formé de 34 puits. Il est constitué de deux unités de traitement d'huile WEST Agreb et AR06 et une autre unité d'injection d'eau AR02.

La production saharienne de pétrole occupe une place modeste à l'échelle mondiale, mais son importance est grande pour l'Algérie. En 2000, la société nationale algérienne en charge de la gestion de la filière des hydrocarbures SONATRACH a signé avec la société américaine Amerada HESS un contrat d'association (Production Sharing Agreement, ou PSA), constituant la société SONAHCESS, en charge de poursuivre et étendre l'exploitation des champs dans des conditions de rentabilité, de sécurité et de préservation de l'environnement satisfaisantes. Cependant, les déchets solides ou borbiers produits par les champs pétroliers du complexe Gassi El Agreb sont entreposés dans 90 Bourbiers répartis sur les 03 champs dont 49 bourbiers sont localisés au niveau du champ de Gassi d'un volume total estimé à 46 300 m³, 03 bourbiers se situent au niveau du champ de Zotti avec un volume total estimé à 2 300 m³ et 38 au niveau du champ de Agreb d'un volume total de ces bourbiers est estimé à 30 200 m³.

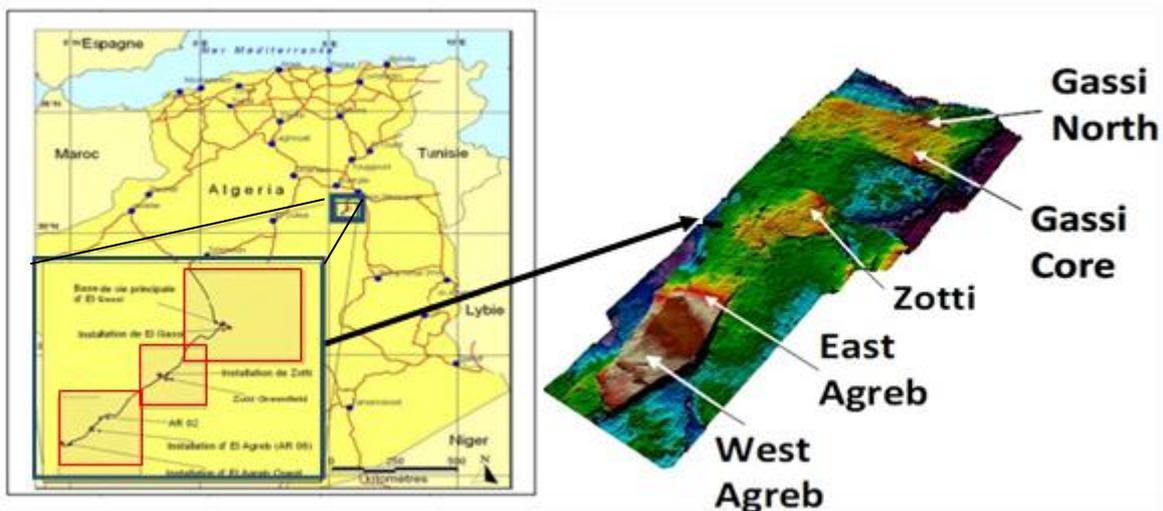


Figure 12. Localisation du complexe Gassi El Agreb et ses trois gisements (Agreb, Zotti et Gassi)

Parmi les activités et substances recensées dans le complexe GEA et figurant dans la nomenclature des installations classées (Décret exécutif 07-144), il y en a une qui requiert une autorisation ministérielle, il s'agit de la rubrique N° 1531 correspondant aux « liquides inflammables (fabrication industrielle de, dont le traitement de pétrole et de ses dérivés, désulfuration). Donc, conformément à l'article 03 du décret exécutif 06-198 (J.O.R.A.D.P. N° 37, 2006), le complexe GEA exploité par le Groupement SONAHCESS est un établissement

classé de première catégorie. Il est par conséquent soumis à la réglementation en vigueur applicable aux établissements classés, et requiert une étude d'impact et une étude de danger avant obtention de l'autorisation d'exploitation.

2. Prélèvement des échantillons

Notre travail consiste à prélever des échantillons de sol de borbier aléatoirement de différents endroits de la zone d'étude. Le choix des sites de prélèvement tient compte de leur position vis-à-vis du champ pétrochimique, l'accessibilité et la qualité de sol prise. L'échantillonnage a été accompli le 28/03/2018. Un prélèvement total de neuf échantillons des borbiers à partir des trois champs du GEA : Agreb, Gassi et Zotti à raison de trois échantillons de 1Kg environ par site pris d'une manière aseptique à l'aide d'une tarière manuelle. L'échantillonnage a été réalisé sur une profondeur de 20 cm de la surface, comme suit :

- Echantillon 1 (E1) : entre 20cm et 70cm ;
- Echantillon 2 (E2) : entre 70cm et 1,20m ;
- Echantillon 3 (E3) >1,20m.

Après réception des échantillons au laboratoire, le sol est séché, puis tamisé sur une maille inférieure à 2 mm (Baize, 2018). La conservation des échantillons se fait ensuite dans des sacs en polyéthylène et à 4°C avant préparation pour analyses selon les normes françaises NF ISO 11464.

3. Les analyses physico-chimiques et quantification des fractions d'hydrocarbures

3.1. Les analyses physico-chimiques des sols

L'analyse des sols est un procédé complexe de par la multiplicité des paramètres à mesurer pour caractériser complètement un échantillon. La connaissance de certains paramètres physico-chimiques donne une appréciation préliminaire de la qualité et le degré de la pollution d'un sol. Les paramètres étudiés ont été déterminés par des méthodes standardisées selon le guide général pour la conservation et la manipulation. Il s'agit des paramètres physiques et chimiques (pH, conductivité, densité, salinité, azote, ...etc) et analyse granulométrique (Tab 5).

Tableau 5. Méthodes d'analyse des différents paramètres étudiés

Paramètres	Méthodes d'analyses / Normes	Unités
Granulométrie	Méthode à la pipette de Robinson NF X31-107	%
Température	Thermomètre	°C
pH	Méthode électro métrique (pH-mètre type HORIBA L-PG7730)	
Conductivité électrique	Méthode Electrochimique (un rapport sol/eau 1/5) NF ISO 11265 (1995)	µSm/cm
Matière sèche	Gravimétrie NF ISO 11465 (1994)	%
Humidité	Gravimétrie NF ISO 11465 (1994)	%
Densité	Pycnomètre ASTM C 128-97	
Dosage de Sodium	Spectrophotomètre à flamme NT ISO 9964-3 (1993)	mg /Kg dw
Potassium, Calcium, Magnesium	Spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) - ICP NT ISO 11885 (2007)	mg / Kg dw
Nitrogen Kjeldhal	NF ISO 13878	mg / Kg dw

Remarque : on a utilisé une échelle d'interprétation du pH ci-dessous et celle de la conductivité électrique du sol (Tab 7).

Tableau 6. Echelle d'interprétation de pH extrait 1/5 (Soil Survey Staff, 1999)

Valeur du pH	Classe
< 4,5	Extrêmement acide
4,5-5,0	Très fortement acide
5,1-5,5	Fortement acide
5,6-6,0	Moyennement acide
6,1-6,5	Légèrement acide
6,6-7,3	Neutre
7,4-7,8	légèrement alcalin
7,9-8,4	Moyennement alcalin
8,5-9,0	Fortement alcalin
>9,0	Très fortement alcalin

Tableau 7. Classe de la qualité des sols selon l'échelle de Durand (1983)

Classes	CE (µs/cm à 25°C)	Qualité des sols
Classe 1	0 à 500	Non salé
Classe 2	500 à 1000	Légèrement salé
Classe 3	1000 à 2000	Salé
Classe 4	2000 à 4000	Très salé
Classe 5	Plus de 4000	Extremement salé

3.2. Analyses des hydrocarbures pétroliers

3.2.1. Détermination des hydrocarbures totaux (THC)

Les hydrocarbures totaux ont été déterminés à l'aide de la méthode gravimétrique décrite par Fusey *et al.* (1973, 1976, 1981). Cette méthode peut être réalisée simplement en évaporant le solvant d'extraction et en pesant le résidu. La perte abiotique (évaporation) a été précédemment estimée dans les flacons stériles marqués. Pour l'extraction du sol, la technique a été légèrement modifiée. Selon cette technique, on pourrait déterminer la quantité d'hydrocarbures présente dans l'échantillon à analyser. Le principe de la méthode consiste en les points suivants :

- (1) L'échantillon à analyser a été versé dans une ampoule à décanter.
- (2) Quelques gouttes de méthyl orange et 0,2 mL de HCl à 50 % ont été ajoutés afin d'acidifier l'échantillon.
- (3) Du chloroforme a été ajouté pour un volume égal à la moitié du volume de l'échantillon.
- (4) Le mélange a été bien agité en ouvrant de temps en temps pour laisser s'échapper le gaz puis il a été décanté pendant quelques minutes. Enfin, la phase supérieure a été filtrée sur Na₂SO₄ pour éliminer toute trace d'humidité. Le solvant contenant la phase organique a été récupéré dans un bêcher préalablement pesé et placé dans une étuve jusqu'à évaporation totale. L'échantillon final a été pesé et la quantité obtenue de résidu a été calculée à l'aide de la formule ci-dessous : $Q_{\text{Total}} \text{ (ppm)} = \frac{W_f - W_i}{V_s}$

Où : Q_{Total} : est la quantité d'hydrocarbure total,

W_f : la pesée finale de l'échantillon,

W_i : la pesée initiale de l'échantillon

V_s : le volume de l'échantillon.

3.2.2. Analyses des fractions d'hydrocarbures pétroliers

Cette analyse permet de connaître la teneur en hydrocarbure des sols (C10-C40) Les analyses chromatographiques des hydrocarbures pétroliers ont été effectuées conformément à la méthode de référence de niveau 1 du CCME pour le Standard pancanadien relatif aux hydrocarbures pétroliers (SP - HCP) dans le sol (CCME, 2001). Les quatre fractions d'hydrocarbures testées étaient de F1 à F4. Les hydrocarbures volatils sont la fraction F1 (gamme des hydrocarbures C6 à C10) et le Benzène, le Toluène, l'Ethylbenzène et le Xylène (BTEX). Les hydrocarbures extractibles sont les fractions F2 à F4 (F2 est la gamme des hydrocarbures C10 à C16, F3 est la gamme C16 à C34 et F4 est la gamme C34 à C50).

La description complète de la méthode est fournie dans CCME (2001). Brièvement, les hydrocarbures volatils (fraction F1) ont été extraits d'un échantillon de sol de 10 g avec du méthanol (en séparant le méthanol du sol puis en ajoutant le méthanol dans un récipient de purge utilisé pour la détermination des composés organiques volatils). Pour les fractions F2, F3 et F4, un mélange de solvants acétone/hexane (50:50) dans un appareil Soxhlet a été utilisé pour l'extraction. Le solvant récupéré de l'échantillon extrait a été séché à l'aide de sulfate de sodium puis traité par chromatographie sur colonne avec du gel de silice pour éliminer la matière polaire.

Une aliquote de 1,0 µL a été injectée dans un système de chromatographie en phase gazeuse Agilent Technology 7890A équipé d'un échantillonneur automatique 7693 (Agilent Technology) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les données ont été acquises et traitées à l'aide d'Agilent OpenLAB Chromatography Data System (CDS) Chemstation Edition pour les zones de pics intégrés, les hauteurs de pics et les temps d'élution et d'analyse. Le GC a utilisé une colonne MXT®-1 (phase non polaire ; Crossbond® diméthyl polysiloxane) avec une capacité de température maximale de 450 °C, dimension 15 m × 250 µm × 0,1 µm. L'injection sans division a été utilisée pour toutes les expériences. Le gaz porteur utilisé était l'hélium, le gaz d'appoint était l'azote et l'hydrogène était utilisé comme gaz combustible. La température de l'injecteur et du détecteur a été fixée à 350°C.

L'assurance et le contrôle de la qualité (AQ/CQ) consistaient en l'analyse de blancs de terrain et de laboratoire, de duplicatas de terrain et d'analyse et de contrôles dopés. Dans notre étude, la méthode blank et blank spike utilisait du sable propre. La pointe vierge et la pointe de matrice ont été extraites après l'ajout des normes commerciales. Pour le mélange standard de F1-BTEX, BTEX, la solution mère contenait 2000 mg L-1 de n-décane, n-hexane, toluène, benzène, éthylbenzène, o-xylène, m-xylène et p-xylène. Les étalons F2 et F3 contenaient 5 000 mg L-1 de phytane, de pristane, de n-octadécane, de n-heptadécane, de n-décane, de n-hexadécane, de n-tétratriacontane et d'o-terphényle. Tous les standards chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich. Les critères ont été remplis : les blancs étaient inférieurs à la limite de détection, les valeurs en double étaient à moins de 30 % les unes des autres et les contrôles dopés ont été renvoyés à moins de 10 % de la valeur cible. La méthode CWS prescrit des procédures complètes d'AQ/CQ qui ont été respectées (CCME 2001).

3.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (Inc. corporation, 2014). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Étant donné que les ensembles de données étaient normalement distribués, ils ont été analysés à l'aide d'une ANOVA et la comparaison des moyennes a été effectuée par le test de Tukey de différence franchement significative (HSD:Honestly Significant Difference) pour évaluer les variations des caractéristiques physicochimiques et des concentrations d'hydrocarbures des sites. En outre, l'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée pour mettre en évidence les principaux facteurs qui influencent la distribution des hydrocarbures, étudier la relation de dépendance entre eux et les paramètres physico-chimiques. Le niveau critique de signification a été fixé à ($p < 0,05$) pour tous les tests.

4. Résultats & discussion

4.1. Les analyses physico-chimiques des sols

4.1.1. Granulométrie

L'analyse granulométrique des sols des trois bourbiers pris à différentes profondeurs montre la dominance de la fraction sableuse, essentiellement la fraction sable fin aux sites Gassi et Zotti à 1m de profondeur avec respectivement 67,53% et 65,31%. Il est à noter que les taux d'argile et limon sont faibles (Fig 13). Le sol de Gassi est le plus riche en argile à plus de 1,20 m de profondeur avec 12,67% et le plus pauvre entre 70cm et 1,20m de profondeur avec 0,82%. Cet élément n'existe pas ou peu dans les échantillons pris entre 20cm et 70cm de profondeur. Le limon est fréquent dans tous les sols à toutes les profondeurs avec des pourcentages qui oscillent entre 3,28% (valeur minimale enregistrée au site Zotti E1) et 27,41% (valeur maximale enregistrée au site Agreb E1).

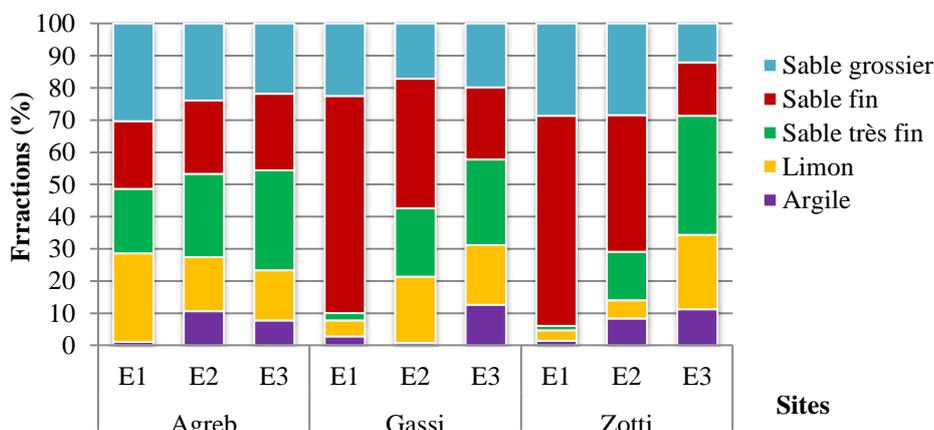


Figure 13. Composition granulométrique des sols étudiés

4.1.2. Valeurs du pH

On constate que selon l'échelle d'interprétation de pH extrait 1/5 (Tab 6), les sols des bourniers des trois sites ont un pH fortement alcalin qui oscille entre 8 et 10, avec une valeur maximale de 11,2 (très fortement alcalin) dans l'échantillon E2 de Agreb (Fig 14).

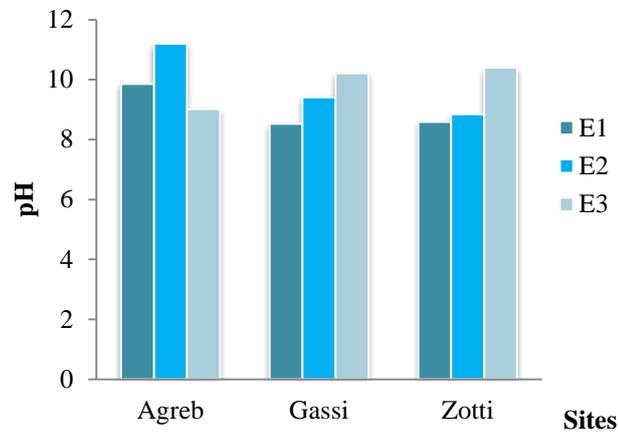


Figure 14. Valeurs du pH des sites étudiés

4.1.3. Température

Les valeurs de la température varient selon la profondeur de l'échantillon et selon le site étudié (Fig15). La valeur maximale est celle enregistrée au site Agreb de 21.7°C à l'échantillon E1 (pris entre 20cm et 70cm) et une minimale de 20.2°C notée en E2 des sites Agreb et Gassi. Le site Zotti quand à lui, a enregistré des valeurs qui diminuent avec la profondeur : 21,4 ; 20,9 et 20,3°C.

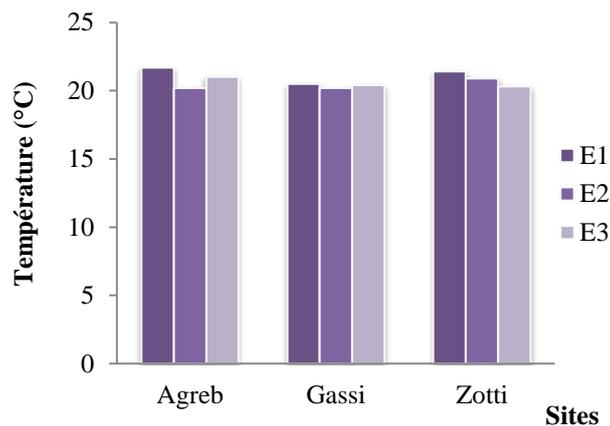


Figure 15. Valeurs de la température des sites étudiés

4.1.4. Conductivité électrique (CE)

On observe que les valeurs enregistrées de la CE sont très variables entre les sites (Fig 16). L'échelle de Durand (1983) (Tab 7) a été utilisée pour indiquer la classe de salinité des sols sur extrait 1/5. Pour la plus part des sites à différentes profondeurs, les sols sont classés « extrêmement salés » : il s'agit de E1 et E2 de Agreb, E1 de Gassi et les trois prises de Zotti E1, E2 et la maximale valeur notée à E3 (57600 $\mu\text{m/cm}$). L'échantillon de Agreb E3 quand à lui est classé « Très salé » avec une CE de 2210 $\mu\text{m/cm}$, vient ensuite E2 de Gassi qui est supposé « Salé » avec une CE de 1964 $\mu\text{m/cm}$ et enfin, en tenant compte la valeur minimale de 956 $\mu\text{m/cm}$ enregistrée à E3 de Gassi, il est classé « légèrement salé ».

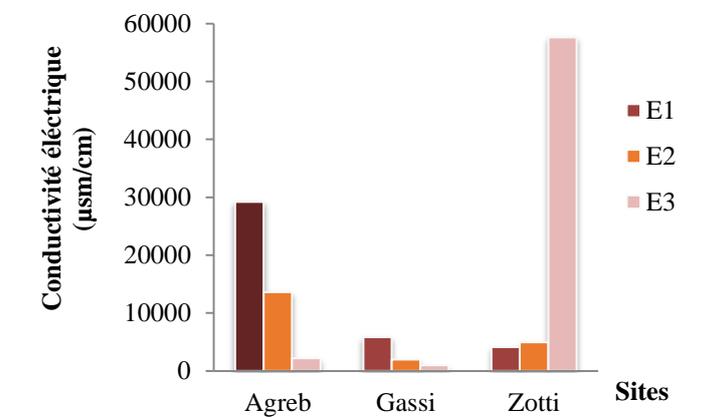


Figure 16. Valeurs de la CE des sols

4.1.5. Matière sèche

Les teneurs de sol en matière sèche varient d'un site à un autre et d'une profondeur à une autre au niveau du même site (Fig 17). Malgré que les valeurs maximales et minimales de matière sèche ont été observées dans le site Agreb avec 88,8% dans E3 et 32,1% dans E1, on perçoit que les échantillons des sites Zotti et Gassi sont plus riche en matière sèche par rapport à Agreb.

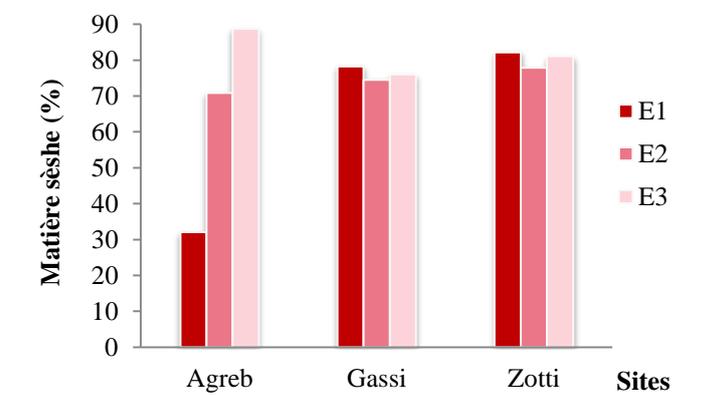


Figure 17. Valeurs des matières sèches

4.1.6. Humidité

Les valeurs de l'humidité des sols sont illustrées sur la figure 18. Vu que le sol est sableux, nos résultats montrent que le sol de l'E1 de Agreb est nettement humide (29,1%), puis diminue en allant en profondeur jusqu'à la valeur de 11,2% en E3 du même site. Le taux d'humidité des autres sites oscille entre 17 et 25%.

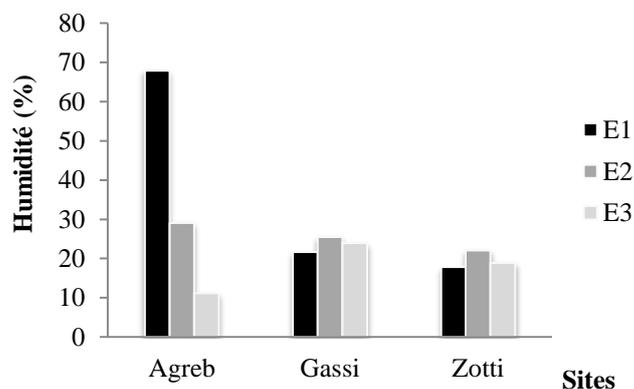


Figure 18. Valeurs de l'humidité des sols

4.1.7. Densité

Selon la figure 19, on remarque que la densité du sol dans les trois sites varie entre une valeur minimale de 2,25 g/cm³ dans E2 de Gassi et une maximale de 2,55 g/cm³ dans E3 de Zotti.

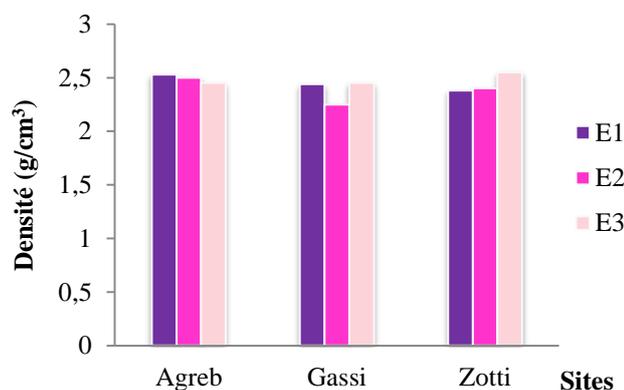


Figure 19. Valeurs de la densité des sols

4.1.8. Les cations échangeables

L'analyse des cations échangeables illustrée dans la figure 20, montre que le sol du site Zotti est riche en ions sodium (Na⁺) avec une valeur maximale de 72500 mg/kgMS enregistrée dans E3 de Zotti et une valeur minimale de 1450mg/kg MS notée dans E2 du site

Gassi (Fig 20a). En ce qui concerne les ions potassium (K^+), on distingue aussi que le sol du site Gassi en est riche avec une valeur maximale de 5780 mg/kg MS enregistrée dans E1, la valeur minimale est de 667 mg/kg MS présente dans E3 du même site (Fig 20b). Pareil pour les ions magnésium (Mg^{2+}) avec une valeur maximale de 18200 mg/kg MS enregistrée dans E3 de Zotti et une valeur minimale de 1460 mg/kg MS présente dans E1 du même site (Fig 20c). Les ions de calcium (Ca^{2+}) sont présents dans tous les échantillons étudiés, avec une valeur maximale de 221000 mg/kg Ms enregistrée dans E3 Gassi et une valeur minimale de 6880 mg/kg Ms présente dans E1 du site Zotti (Fig 20d).

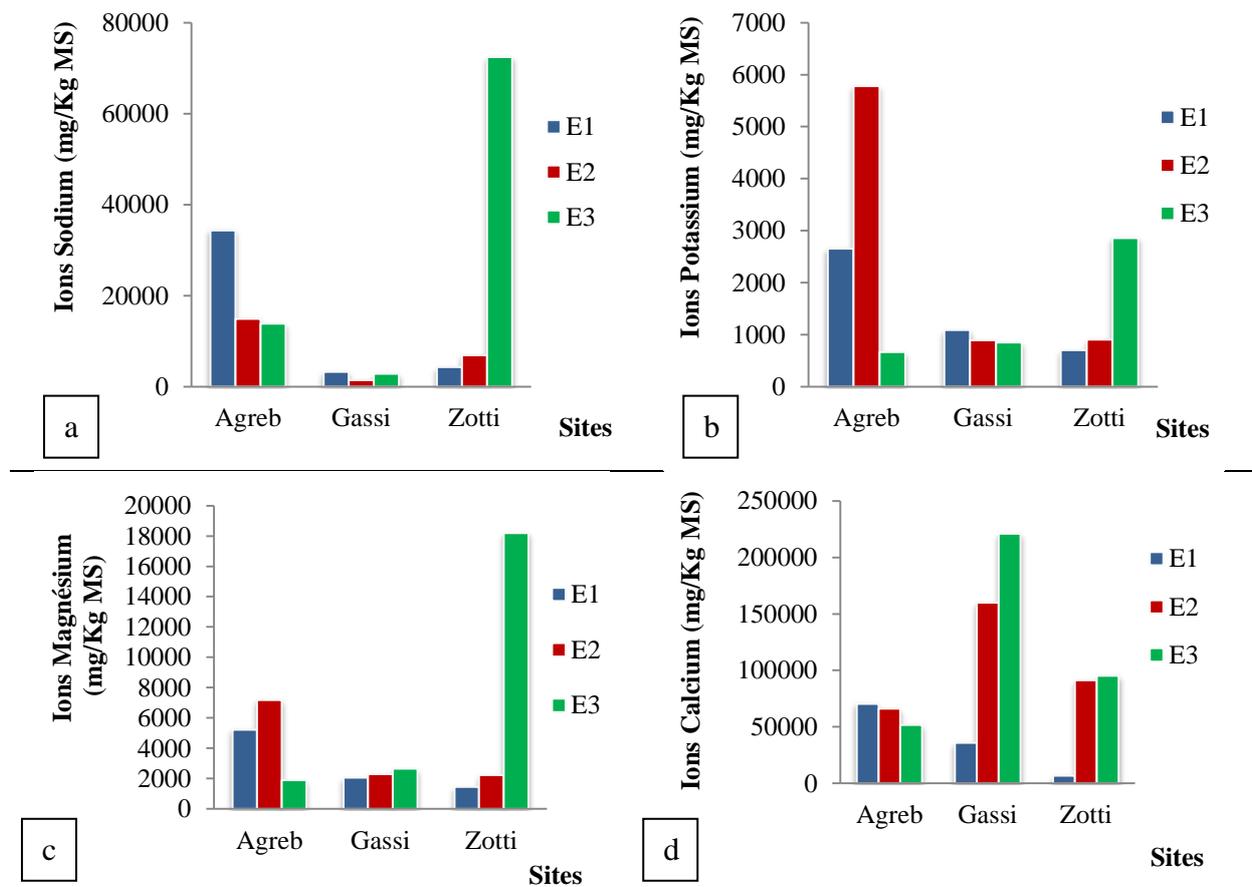


Figure 20. Valeurs des cations échangeables : ions sodium (a), ions potassium (b), ions magnésiums (c) et ions calcium (d)

4.1.9. Azote Kjeldahl

Les sols des trois sites d'étude à différentes profondeurs, sont riches en azote avec une valeur maximale de 781 mg/kg MS enregistrée dans E3 de Gassi et une valeur minimale est de 435 mg/kg MS présente dans E3 dans le site Zotti (Fig 21).

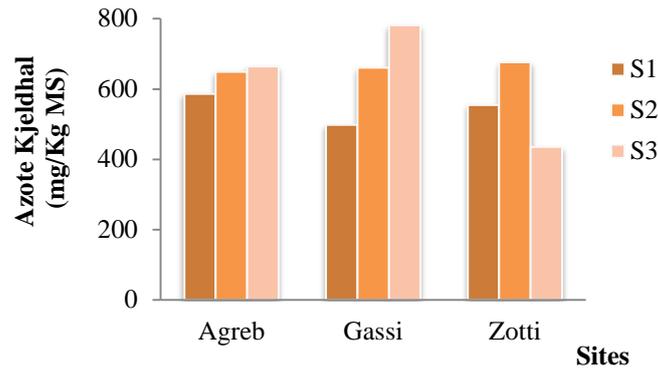


Figure 21. Valeurs de l'azote Kjeldhal

4.2. Analyses des hydrocarbures pétroliers

En se référant à la figure 22, l'indice des hydrocarbures (C10-C40) est indiqué le plus dans les deux sites : Gassi et Agreb dont la valeur maximale (120000 mg/kg de matière sèche) est enregistrée à E2 du site Agreb. L'on remarque aussi que cet indice est inversement proportionnel à la profondeur des échantillons du site Gassi. L'indice des hydrocarbures (C10-C40) du site Zotti en est de degré moindre, mais proportionnel à la profondeur du sol ; avec une valeur minimale de 18100 mg/kg de matière sèche présente dans E1.

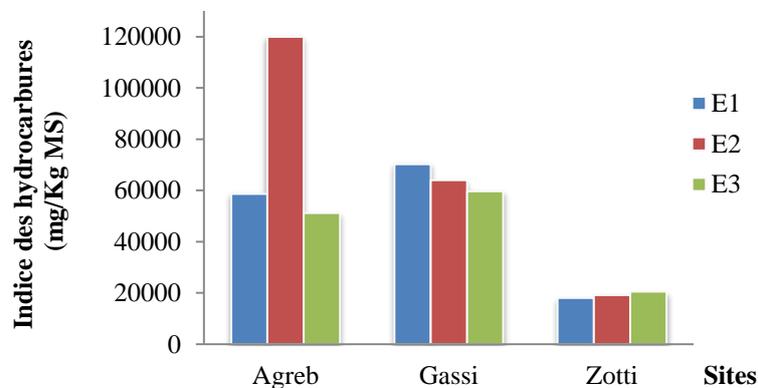


Figure 22. Indice des hydrocarbures (C10-C40) dans les sites étudiés

4.2.1. Fractions d'hydrocarbures pétroliers

- a. **La fraction (F1) (C6-C10) :** représente la fraction volatile de la plupart des mélanges d'hydrocarbures. En effet, elle est présente dans presque tous les sites étudiés ou il est possible de reconnaître deux situations : dans l'une F1 est proportionnelle avec la profondeur de l'échantillon (Gassi) et dans l'autre, elle est inversement proportionnelle à Agreb ; avec une valeur maximale de 914 mg/kg MS recensée dans E2 de Zotti (Fig 23a).

- b. La fraction (F2) :** représente la fraction semi-volatile des composés appartenant à l'intervalle d'équivalents en carbone C10-C16. Les sites Agreb et Gassi sont plus riches en F2 que Zotti (Fig 23b). On remarque que cette fraction est inversement proportionnelle à Gassi. La valeur maximale est notée à E2 (52300 mg/kg MS) du site Agreb, tandis que la valeur minimale (7930 mg/Kg MS) est enregistrée à E1 de Zotti.
- c. La fraction (F3) :** englobe l'intervalle d'équivalents en carbone allant de C>16 à C34 et comprend les composés aromatiques et aliphatiques. On constate que cette fraction est plus marquée dans Agreb et Gassi (Fig 23c), ou l'on note une valeur maximale de 69500 mg/kg MS à Agreb E2. Les valeurs de la fraction F3 du site Zotti sont les plus faibles et oscillent entre 10 et 12 mg/Kg MS.
- d. La fraction (F4) :** les hydrocarbures pétroliers inclus dans cet intervalle représentent souvent une proportion importante des huiles brutes et des produits pétroliers de faible mobilité (volatilité et solubilité). Nos résultats montrent une très faible quantité de cette fraction < 6 mg/Kg MS dans tous les sites.

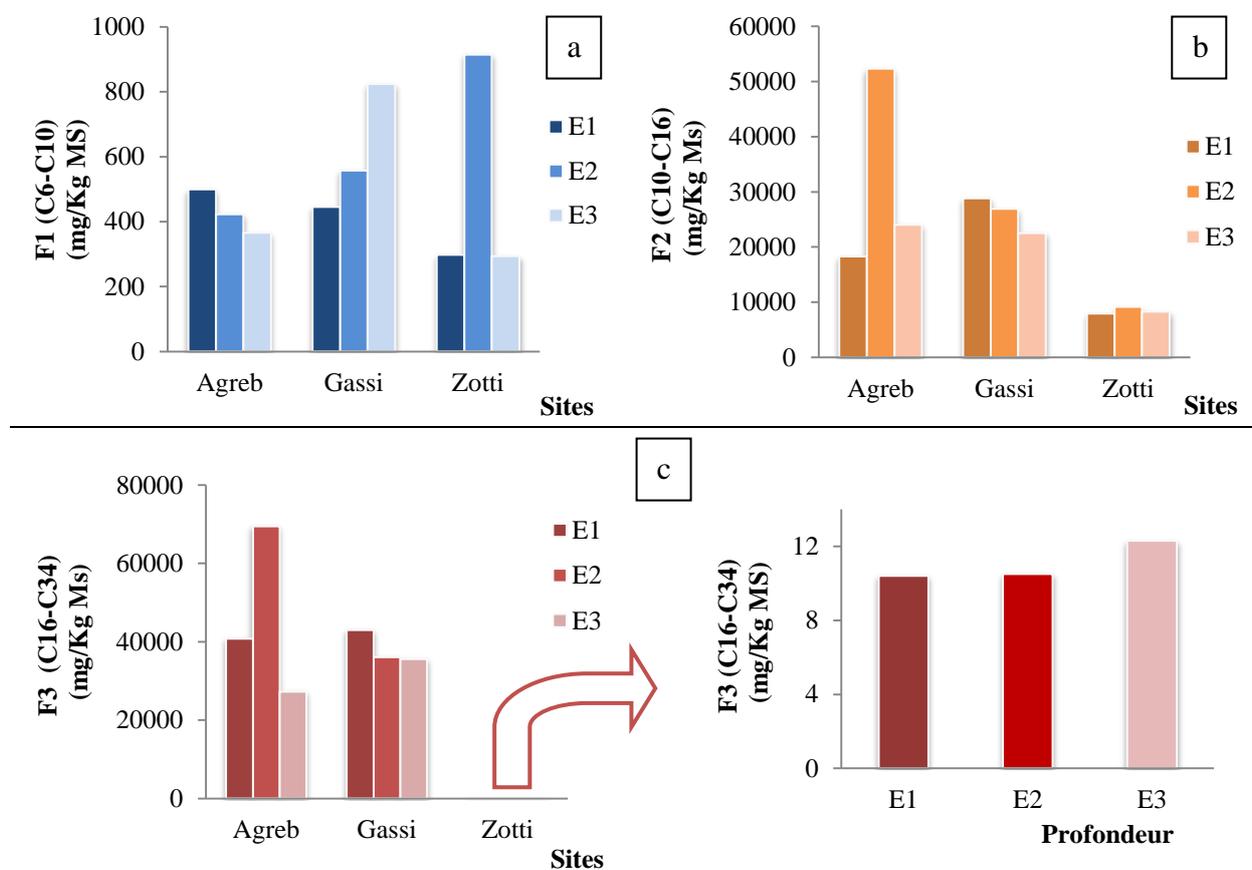


Figure 23. Les fractions des hydrocarbures des sites : F1 (a), F2 (b) et F3 (c)

4.2.2. BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl benzène et (O, m+p)-Xylène

Les BTEX sont présents dans tous les sites étudiés à différentes profondeurs des sols, avec une domination des Ethyl benzène et (O, m+p) Xylène (Fig 24). Il en ressort que ces hydrocarbures sont repérés à des quantités importantes dans E1 (entre 20 et 70 cm) de Agreb et Zotti et à E3 (>1,20 m) du site Gassi. De ce fait, on peut déduire que le site Gassi possède les valeurs les plus grandes des BTEX, suivit par Zotti et enfin Agreb, avec des valeurs maximales de Benzène, Toluène, Ethyl benzène et (O, m+p)-Xylène enregistrées respectivement de 112 mg/kg MS, 108 mg/kg MS, 116 mg/kg MS et (129 et 109) mg/kg MS.

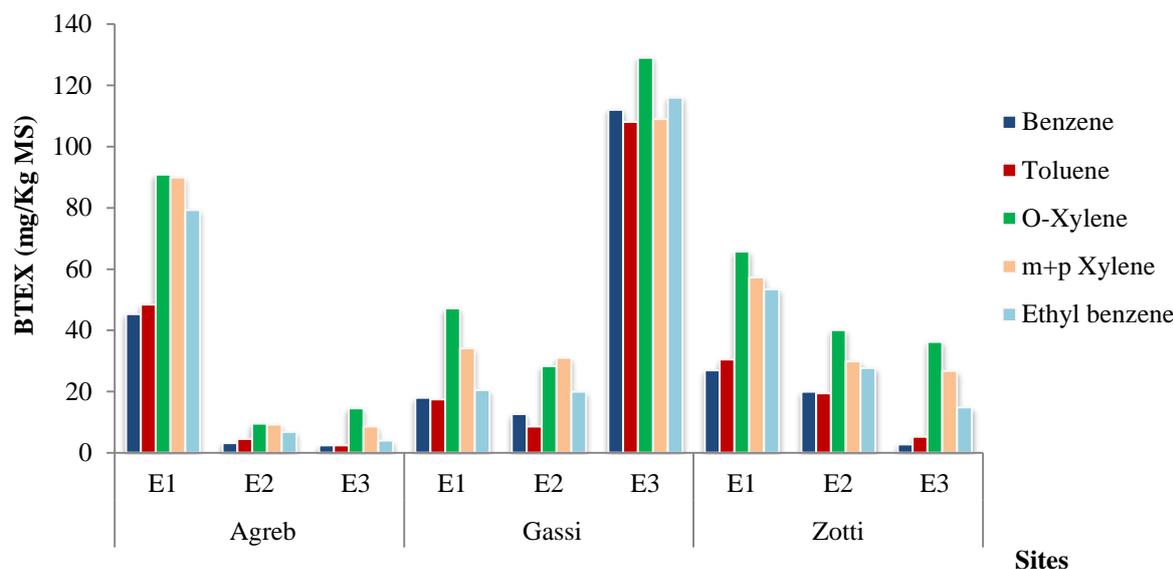


Figure 24. Les valeurs des BTEX selon les profondeurs des sites étudiés

4.3. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 25.

4.3.1. Analyse descriptive des différentes caractéristiques des sols

Les statistiques descriptives sont l'ensemble des méthodes et des techniques permettant de présenter, de décrire et de résumer, des données nombreuses et variées ; elles nous permettent de connaître les caractéristiques de notre échantillon : moyenne, médiane, et écart-type.

4.3.1.1. Sol d'Agreb

Les sols de Agreb sont sablo-limoneux avec des taux moyens de l'ordre de 78,53%, 19,92% et 6,54% pour le sable, le limon et l'argile respectivement. Le minimum d'argile est enregistré à la surface du sol (entre 20 et 70cm) avec 1,17% et il atteint son maximum entre

70cm et 1,20m de profondeur avec 10,65%. Pour le limon, le maximum est enregistré à la surface avec 27,41% et il diminue avec la profondeur. Le sable est omniprésent dans le sol dont le taux maximal de sable très fin et fin est enregistré à plus de 1,20m de profondeur et à la surface du sol pour le sable grossier. Ces sols sont riches en matière sèche avec taux moyen de 63,93%. Le taux de la matière sèche augmente avec la profondeur du sol où il atteint son maximum avec 88,88% à 2m de profondeur.

Les cations échangeables et l'azote sont présents avec des taux élevés. Pour les ions sodium et calcium les taux maximaux sont enregistrés à la surface avec 34400 mg/Kg et 70500 mg/Kg de matière sèche respectivement et ils diminuent avec l'augmentation de la profondeur jusqu'à 13900 mg/Kg pour l'ion sodium et 51800 mg/Kg de matière sèche pour l'ion calcium à 2m de profondeur. Le maximum des ions Potassium et Magnésium est enregistré à 1m de profondeur avec 5780 mg/Kg et 7180 mg/Kg de matière sèche et il diminue à 667 mg/Kg et 1890 mg/Kg de matière sèche à 2m de profondeur. Le taux d'azote augmente avec la profondeur, il est minimal à la surface avec 586 mg/Kg de matière sèche et atteint son maximum avec 664 mg/Kg de matière sèche à 2m de profondeur.

Les sols d'Agreb sont très alcalins avec un pH moyen égal à 10,02. Ils sont peu humides avec un taux d'humidité moyen égale 22,73%. Ils sont caractérisés par la faible densité et la température et la conductivité électrique élevée avec une moyenne de 2,49, 20,96°C et 15003,33 μ Sm/cm respectivement.

Par rapport à la moyenne de l'ensemble des variables à l'exception de taux d'azote, l'écart-type est plus petit donc la dispersion des mesures autour de la moyenne est plus étroite ce qui indique que les résultats sont donc plus cohérents.

4.3.1.2. Sol de Gassi

Les sols de Gassi sont sablo-limoneux avec des taux moyens de l'ordre de 79,91%, 14,65% et 5,44% pour le sable, le limon et l'argile respectivement. Le minimum d'argile est enregistré à 1 m de profondeur avec 0,82% et il atteint son maximum à 2m de profondeur avec 12,67%. Pour le limon, le maximum est enregistré à 1m de profondeur avec 20,52% et le minimum à la surface avec 4,96%. Le sable est omniprésent dans le sol dont le taux maximal de sable fin et grossier est enregistré à la surface du sol et à 2m de profondeur pour le sable très fin. Ces sols sont riches en matière sèche avec taux moyen de 76,3%. À la surface du sol, le taux de la matière sèche atteint son maximum avec 78,3%.

Les cations échangeables et l'azote Kjeldahl sont présents avec des taux élevés. Pour l'ion sodium le taux maximal est enregistré à la surface avec 3310 mg/Kg de matière sèche et le minimum à 1m de profondeur avec 1450 mg/Kg. Pour les ions Potassium, le maximum est noté à la surface du sol avec 1090 mg/Kg de matière sèche et il diminue avec l'augmentation de la profondeur jusqu'à 850 mg/Kg à 2m de profondeur. Le taux des ions Calcium et Magnésium et de l'Azote Kjeldahl augmente avec la profondeur, où les valeurs les plus basses sont enregistrées à la surface et le maximum est atteint à 2 m de profondeur avec 221000 mg/Kg, 2650 mg/Kg et 781 mg/Kg de matière sèche.

Un pH moyen égal à 9,37 rend les sols de Gassi très alcalins. Le pH minimal est enregistré à la surface avec 8,52 et il augmente en allant en profondeur jusqu'à 10,2 à 2m de profondeur.

Ces sols sont peu humides avec un taux d'humidité moyen égale 23,7%. Ils sont caractérisés par la faible densité et la température et la conductivité électrique élevée avec une moyenne de 2,38, 20,36°C et 2916,67 $\mu\text{Sm/cm}$ respectivement.

L'écart-type est influencé par les valeurs extrêmes dans l'argile ; ces valeurs pourraient avoir une grande influence sur les résultats de l'écart-type. Ceci dit, plus il y a d'hétérogénéité des scores, plus l'écart-type correspondra à une valeur élevée. A l'inverse, dans les autres variables où les scores sont relativement proches de la moyenne, l'écart type est plus petit, ce qui indique une homogénéité des échantillons vis-à-vis les paramètres étudiés.

4.3.1.3. Sol de Zotti

Les sols de Zotti sont à dominance sableuse avec un taux moyen égale à 82,28% tandis que les taux moyens sont de l'ordre de 10,72% et 6,99% pour le limon et l'argile respectivement. Le minimum d'argile, de limon et de sable fin, qui est de l'ordre de 1,4%, 3,28% et 1,39% respectivement, est enregistré la surface du sol et plus en allant en profondeur le taux augmente. A l'inverse, le taux de sable fin et de sable grossier diminue avec l'augmentation de la profondeur où le maximum est enregistré à la surface du sol avec 65,31% et 28,62% pour le sable fin et le sable grossier respectivement.

Le taux maximal de la matière sèche est enregistré à la surface du sol avec 82,2% et le minimum à 1M de profondeur avec 77,9%. Généralement, les sols de Zotti sont très riches en matière sèche avec taux moyen égale 80,4%.

Dans les sols de Zotti, les cations échangeables sont présents avec des taux élevés. Le taux des ions sodium, potassium, calcium et de magnésium augmente en allant en profondeur.

Le taux minimum de ces cations est enregistré à la surface du sol; Il est de l'ordre de 4360 mg/ Kg pour l'ion sodium, 703 mg/Kg pour l'ion potassium, 6880 mg/Kg pour l'ion calcium et 1460 mg/Kg pour l'ion magnésium. A 2m de profondeur le sol devient très riche en cations échangeables par rapport à la surface où les taux atteignent 72500 mg/Kg de matière sèche, 2860 mg/Kg, 95300 mg/Kg et 18200 mg/Kg pour le Na⁺, K⁺, Ca²⁺ et Mg²⁺ respectivement. Le taux minimal d'Azote est enregistré à 2 m de profondeur avec 435 mg/Kg et le maximum à 1 m de profondeur avec 676 mg/Kg de matière sèche. Ce contenu en ions rend les sols de Zotti salins avec une moyenne de conductivité électrique de l'ordre de 3218,67 µSm/cm.

Les sols de Zotti sont très alcalins ce qui est dû à un pH moyen de l'ordre de 9,27. Le pH augmente en allant en profondeur où le minimum est enregistré à la surface avec 8,59 et il atteint 10,4 à 2m de profondeur.

Ces sols sont peu humides avec un taux d'humidité moyen égale 19,6%. La densité augmente en allant en profondeur mais elle est faible avec une moyenne de 2,44. La température moyenne de ces sols est de l'ordre de 20,86°C.

L'écart-type est influencé par les valeurs extrêmes dans le Sodium, le Magnésium, le limon et le sable très fin ; ces valeurs pourraient avoir une grande influence sur les résultats de l'écart-type. Ceci dit, plus il y a d'hétérogénéité des scores, plus l'écart-type correspondra à une valeur élevée. A l'inverse, dans les autres variables où les scores sont relativement proches de la moyenne, l'écart type est plus petit, ce qui indique une homogénéité des échantillons vis-à-vis les paramètres étudiés.

4.3.2. Comparaison des caractéristiques des sols étudiés

4.3.2.1. pH

Les sols du complexe Gassi El agreb (GEA) sont très fortement alcalins avec des valeurs de pH qui dépassent 9. Les boites à moustaches (Fig 25) montrent que les sols d'Agreb ont un pH plus élevé que ceux de Gassi et de Zotti. Ceci est confirmé par la médiane qui est de l'ordre de 9,85 pour les sols d'Agreb, 9,41 pour les sols de Gassi et 8,84 pour les sols de Zotti. Malgré que tous les sols soient très alcalins, seulement les sols de Gassi sont homogènes alors que les sols d'Agreb et de Zotti sont hétérogènes avec des boites à moustaches asymétriques.

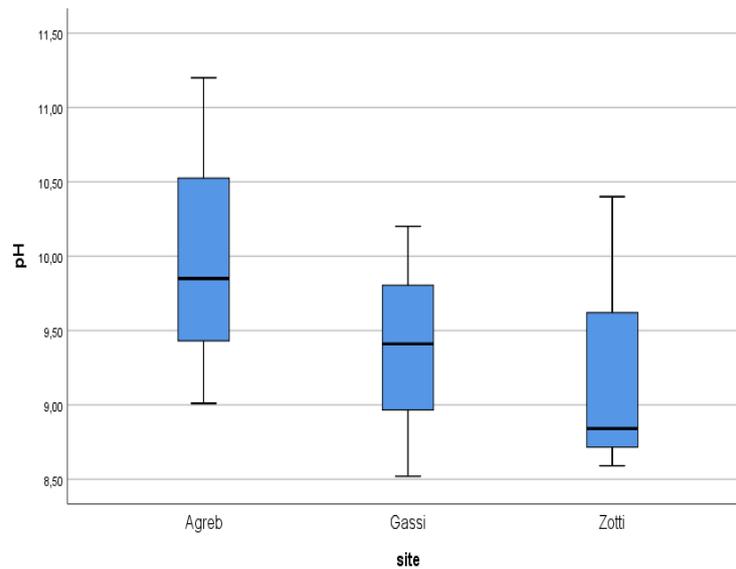


Figure 25. Distribution des sols en fonction de leurs pH

4.3.2.2. Température

Les sols des trois sites représentent une certaine homogénéité de point de vue température ce qui attribue une symétrie des boîtes à moustaches (Fig 26). Les sols d'Agreb ont la température la plus élevée avec une médiane égale 21. Les sols de Zotti viennent dans le second rang avec une médiane de 20,9 suivis par les sols de Gassi qui ont les faibles températures avec une médiane égale 20,4.

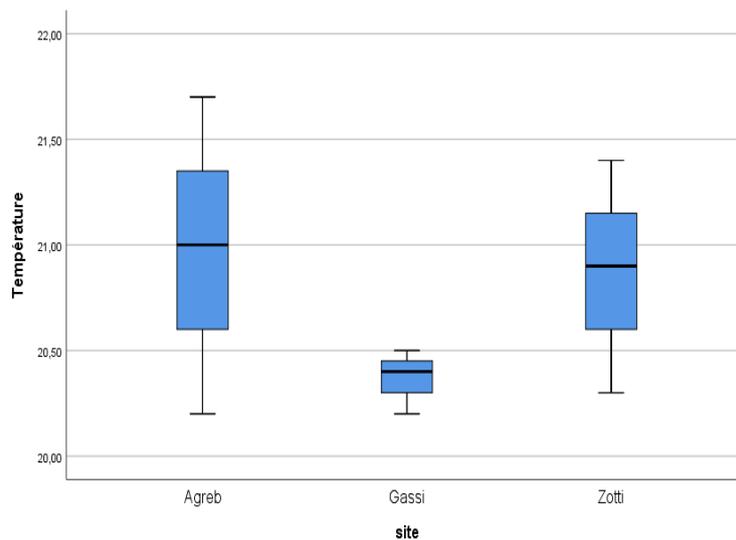


Figure 26. Distribution des sols en fonction de leurs températures

4.3.2.3. Conductivité électrique

L'asymétrie des moustaches (Fig 27) indique une hétérogénéité de la conductivité électrique (CE) des sols d'Agreb, Gassi et Zotti. Les valeurs de ce paramètre permettent de classer les sols du complexe El Agreb du plus conducteur au moins conducteur comme suit : les sols d'Agreb, les sols de Zotti et les sols de Gassi avec une médiane de l'ordre de 13600 $\mu\text{Sm/cm}$, 4110 $\mu\text{Sm/cm}$ et 1964 $\mu\text{Sm/cm}$ respectivement.

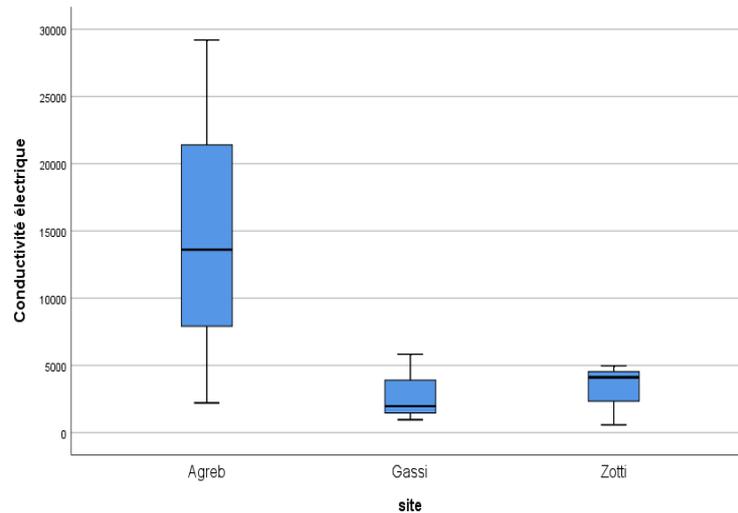


Figure 27. Distribution des sols en fonction de leurs CE

4.3.2.4. Matière sèche

Les boîtes à moustaches (Fig 28), montrent l'hétérogénéité des sols de Agreb vis-à-vis leur teneur en matière sèche alors que les sols de Zotti et de Gassi sont homogènes. Les sols de Zotti sont les plus riches en matière sèche, suivis par les sols de Gassi et les sols d'Agreb qui sont les moins riches avec une médiane de l'ordre de 81,1%, 76,1% et 70,9% respectivement.

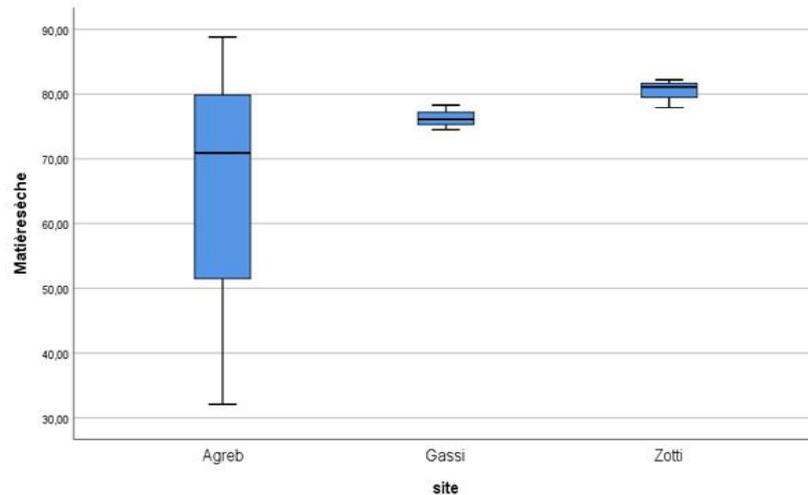


Figure 28. Distribution des sols en fonction de leur teneur en matière sèche

4.3.2.5. Humidité

La distribution des sols en fonction de leur humidité (Fig 29), montrent que les sols d'Agreb sont les plus humides avec une médiane égale 27,9%. Les sols de Gassi viennent en second rang suivis par les sols de Zotti qui sont les plus secs avec une médiane de l'ordre de 23,9% et 18,9 % respectivement. Les sols de Zotti et Gassi sont homogène du point de vue humidité tandis que dans les sols de Agreb une grande hétérogénéité de l'humidité est remarquée ce qui dû aux valeurs extrêmes à savoir le minimum qui est 11,2%.

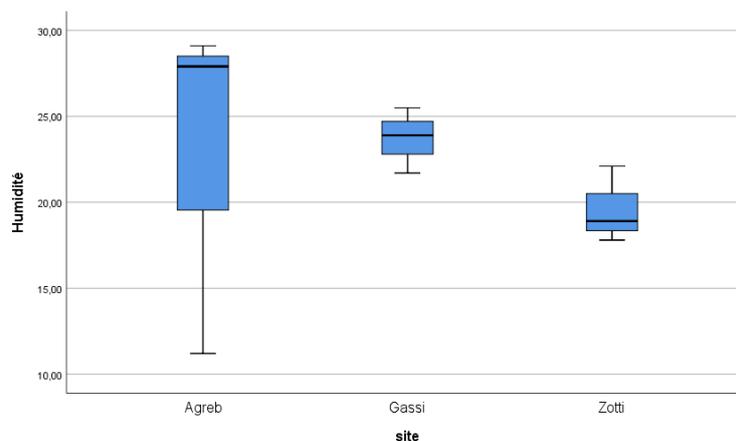


Figure 29. Distribution des sols en fonction de l'humidité

4.3.2.6. Densité

La figure 30 montre que les sols du complexe GEA sont hétérogènes du point de vue densité dont les sols de Gassi et Zotti sont plus hétérogènes que ceux d'Agreb. Cette hétérogénéité est due aux valeurs extrêmes. Les sols d'Agreb sont les plus denses avec une médiane égale 2,5 suivi par les sols de Zotti et les sols de Gassi sont les moins denses.

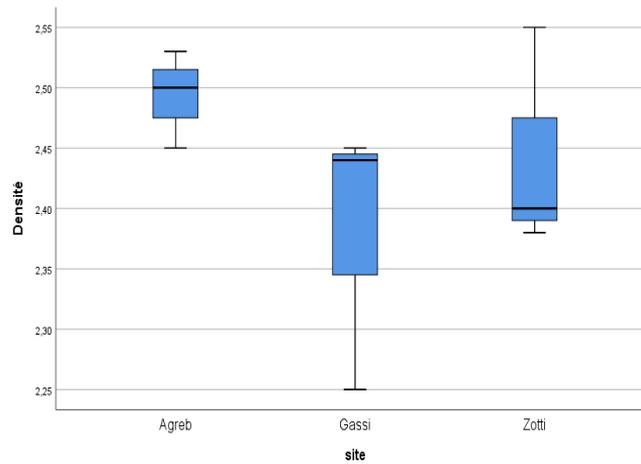


Figure 30. Distribution des sols en fonction de leurs densités

4.3.2.7. Les cations échangeables

- a. **Ions sodium (Na^+)** : les sols de Agreb, Gassi et Zotti sont des très riches en ions sodium mais une grande différence est remarquable dans chaque site ce qui a rendu les moustaches asymétriques (Fig 31a). Les sols de Zotti sont les plus riches en ions sodium suivis par les sols de Agreb tandis que les sols de Gassi en sont les plus pauvres. La médiane est 14900, 6900 et 2880 mg/Kg de matière sèche pour les sols d'Agreb, Zotti et Gassi respectivement.
- b. **Ions potassium (K^+)** : l'asymétrie des moustaches (Fig 31b) indique une hétérogénéité des teneurs en potassium des sols d'Agreb, Gassi et Zotti. Ces teneurs permettent de classer les sols du complexe GEA du plus au moins riches en potassium comme suit : les sols d'Agreb, les sols de Zotti et les sols de Gassi avec une médiane de l'ordre de 2660 mg/Kg, 908 mg/Kg et 895 mg/Kg de matière sèche respectivement.
- c. **Ions magnésium (Mg^{2+})** : malgré que les sols de Zotti en sont les plus riches, une grande hétérogénéité de la teneur du sol en ces ions est remarquée ce qui est du aux valeurs extrêmes, le minimum et le maximum qui sont respectivement 1460 mg/Kg et 18200 mg/Kg de matière sèche (Fig 31c). Les sols d'Agreb viennent en deuxième rang suivi par les sols de Gassi qui sont les plus homogènes. La médiane pour les sols de Zotti, Agreb et Gassi respectivement est 2240 mg/Kg, 5220 mg/Kg et 2300 mg/Kg de matière sèche.
- d. **Ions calcium (Ca^{2+})** : la teneur des sols du complexe GEA en ions calcium varie d'un site à l'autre et d'une profondeur à l'autre au niveau de même site ce qui donne des moustaches asymétriques (Fig 31d). Cette teneur atteint son maximum dans les sols de

Gassi avec une médiane de 160000 mg/Kg de matière sèche. Les sols de Zotti sont moins riches en ions calcium que les sols de Gassi et plus riches que les sols d'Agreb. La médiane est 91300 mg/Kg et 66200 mg/Kg de matière sèche pour les sols de Zotti et Agreb respectivement.

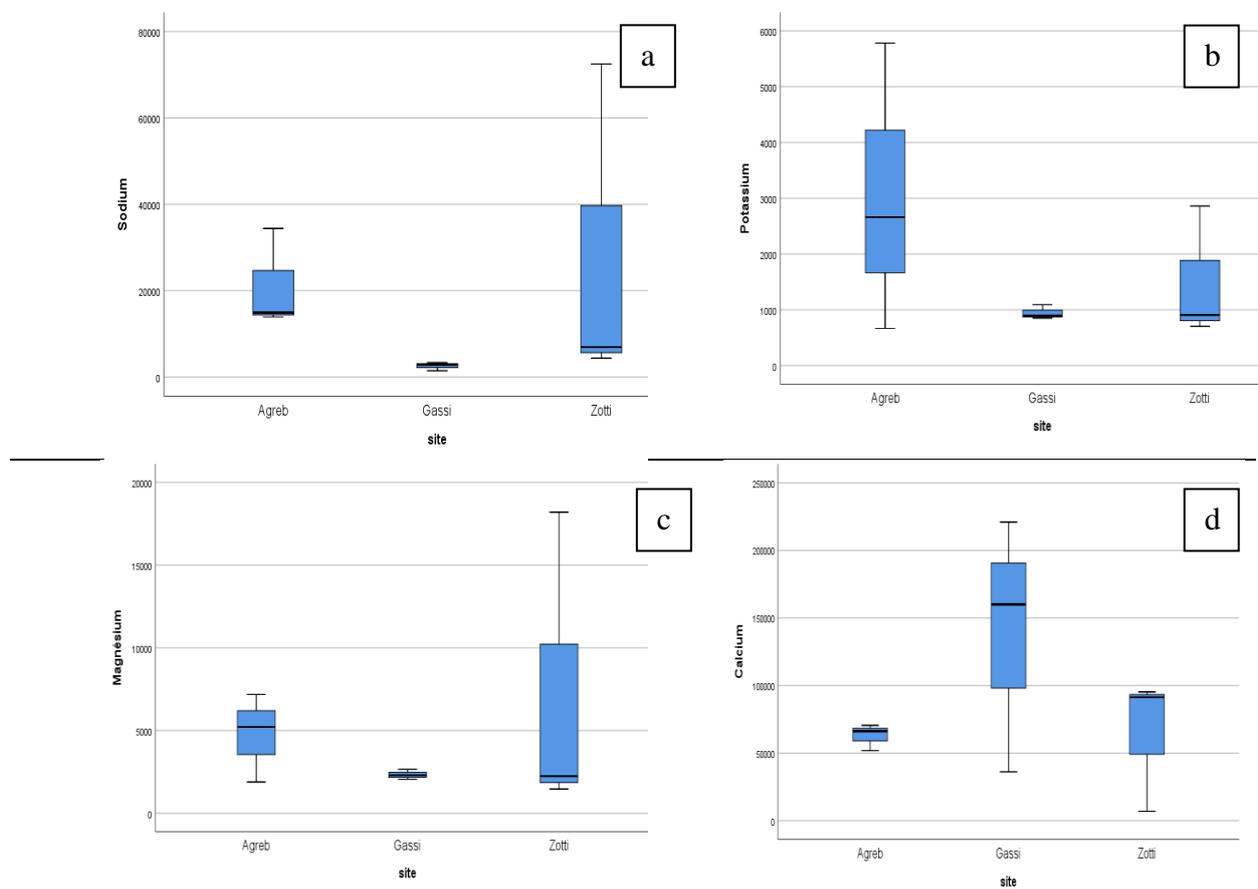


Figure 31. Distribution des sols en fonction de leur teneur en cations échangeables : ions sodium (a), ions potassium (b), ions magnésiums (c) et ions calcium (d)

4.3.2.8. Azote Kjeldahl

Les sols du GEA contiennent l'azote avec des concentrations très proches. La médiane est 660 mg/Kg, 649 mg/kg et 554 mg/Kg de matière sèche pour les sols de Gassi, Agreb et Zotti respectivement. Les concentrations les plus élevées sont enregistrées dans les sols de Gassi, par contre, les sols de Zotti présentent les concentrations les plus faibles. Les boîtes à moustaches (Fig 32) montrent que la teneur en azote est homogène dans les sols de Zotti, très hétérogènes dans les sols de Agreb et légèrement hétérogène dans les sols de Gassi.

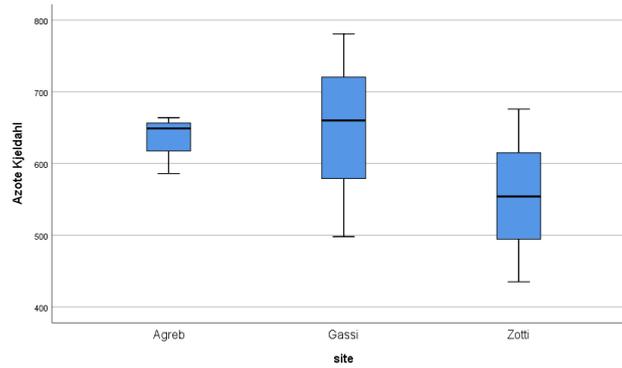


Figure 32. Distribution des sols en fonction de leurs teneurs en azote

4.3.3. Les hydrocarbonée dans les sols

4.3.3.1. Indice des HC (C10- C40)

L'analyse des hydrocarbures (C10-C40) dans les sols varie d'un site à un autre et d'une profondeur à une autre au niveau du même site (Fig 33). La moyenne la plus élevée est enregistrée à Gassi avec 64633,33 mg/Kg de matière sèche et la moyenne la plus faible est celle des sols de Zotti avec 19266,666 mg/Kg de matière sèche. Ces résultats indiquent que les sols de Gassi sont les plus pollués à la surface et en profondeur, suivis par les sols d'Agreb tandis que les sols de Zotti sont les moins pollués.

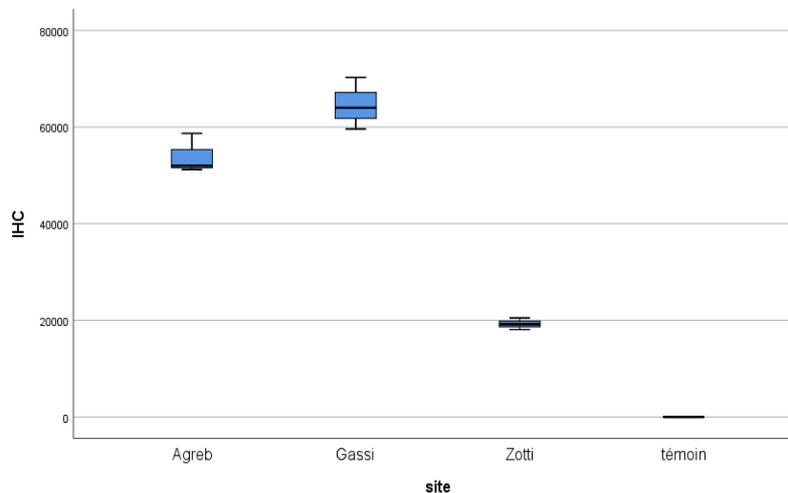


Figure 33. Indices des hydrocarbures (C10- C40) dans les sols en fonction des sites

4.3.3.2. Les fractions des hydrocarbures

- a. **La fraction F1 (C6- C10) :** Les teneurs de sol en hydrocarbures de la fraction F1 (C6-C10) varient d'un site à un autre et d'une profondeur à l'autre au niveau du même site (Fig 34a). La moyenne la plus élevée est enregistrée à Gassi avec 608,666 mg/Kg de matière sèche et la moyenne la plus faible est celle des sols d'Agreb avec 429,333

mg/Kg de matière sèche. Ces résultats indiquent que les sols les plus pollués à la surface sont les sols de Agreb, à 1m de profondeur sont les sols de Zotti, et à 2m de profondeur les sols de Gassi.

- b. La fraction F2 (C10-C16) :** à partir de la figure (34b), on constate que la plus faible teneur est relevée à Zotti à la surface et la plus grande valeur à Agreb à une profondeur de 1 m avec les valeurs respectives 7930 mg/Kg de matière sèche et 52300 mg/Kg de matière sèche. Les résultats montrent que les sols de Agreb sont les pollués en F2 suivis par ceux de Gassi et de Zotti.
- c. La fraction F3 (C16-C34) :** la moyenne la plus élevée en fraction F3 est enregistrée à Agreb avec 45866,66667 mg/Kg de matière sèche et la moyenne la plus faible est celle des sols de Zotti avec 11,0666 mg/Kg de matière sèche (Fig 34c). Ces résultats indiquent que les sols de Gassi sont les sols les plus pollués à la surface et à 2m de profondeur tandis que les sols d'Agreb sont les plus pollués à 1m de profondeur.
- d. La fraction F4 (C34-C40) :** les teneurs des sols en hydrocarbures F4 (C34-C40) est identique dans les sols de trois sites malgré la variation de la profondeur (Fig 34d).

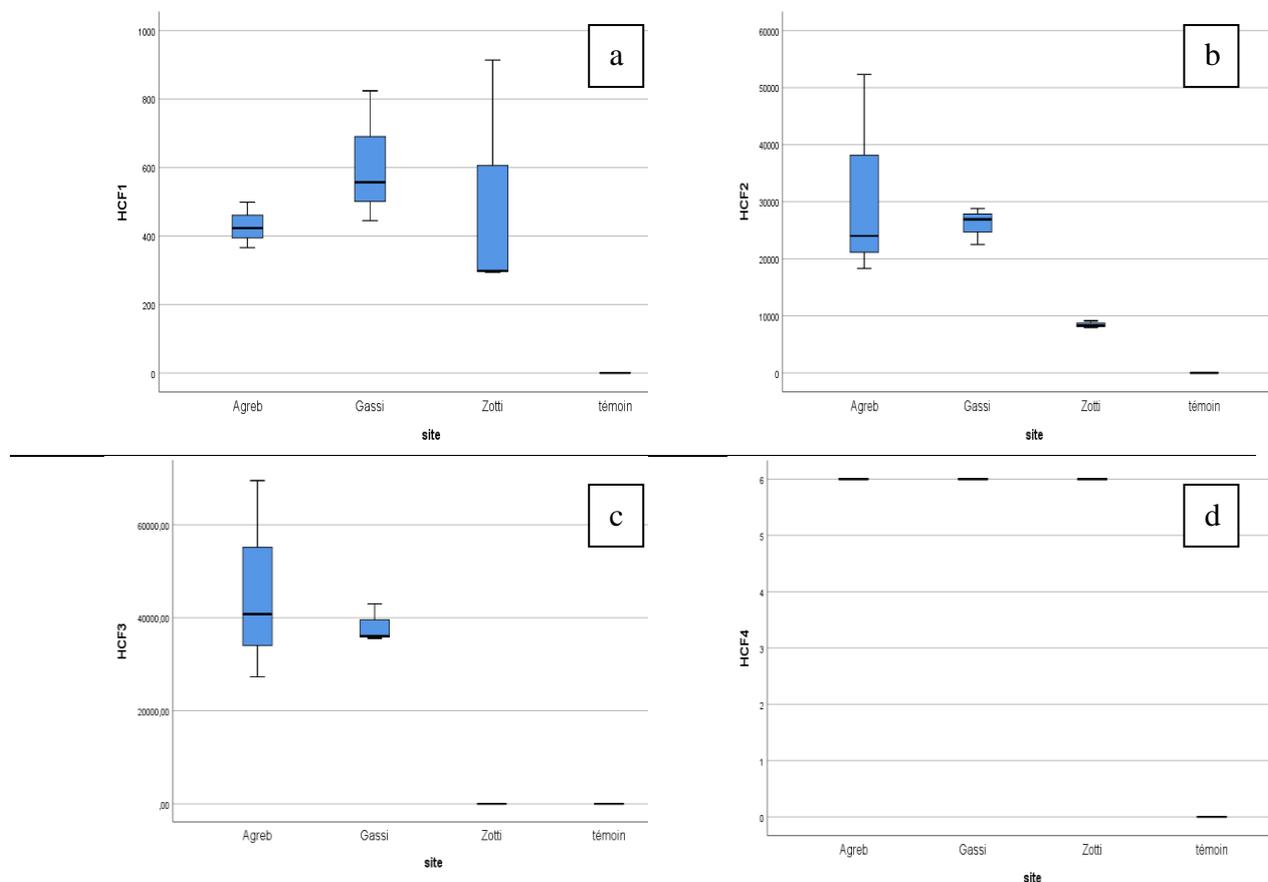


Figure 34. Teneur des sols en fractions d'hydrocarbures : F1 (a), F2 (b), F3 (c) et F4(d)

4.3.3.3. Les BTEX

- a. **Benzène** : on constate sa présence dans les sols de Gassi en profondeur et ceux d'Agreb à la surface avec les valeurs respectives 112 mg/Kg de matière sèche et 45,3 mg/Kg de matière sèche (Fig 35a). En matière de pollution benzénique : les sols de Gassi sont les pollués suivis par ceux de Agreb et enfin ceux de Zotti.
- b. **Toluène** : la moyenne la plus élevée en teneur des sols en toluène est enregistrée à Gassi avec 44,633 mg/Kg de matière sèche et la moyenne la plus faible est celle des sols de Zotti avec 18,323 mg/Kg de matière sèche (Fig 35b). Ces résultats indiquent que les sols d'Agreb sont les sols les plus pollués en toluène à la surface, les sols de Zotti sont les plus pollués à 1m de profondeur et les sols de Gassi sont les plus pollués à 2m de profondeur.
- c. **Ethylbenzène** : On constate que les sols pollués sont ceux de Gassi en profondeur et ceux de Agreb en surface avec les valeurs respectives 129 mg/Kg de matière sèche et 90,8 mg/Kg de matière sèche tandis que les sols de Zotti sont les plus pollués à 1m de profondeur avec 40 mg/Kg de matière sèche (Fig35c). En général, selon le degré de pollution, on peut classer les sols en ascendance : sols de Gassi, ceux de Zotti et ceux d'Agreb.
- c. **Xylène** : À partir de la figure (35d), on constate que la pollution des sols aux O-Xylène est à Gassi en profondeur et ceux d'Agreb à la surface avec les valeurs respectives 116 mg/Kg de matière sèche et 79,2 mg/Kg de matière sèche tandis que les sols de Zotti sont les plus pollués à 1m de profondeur avec 27,6 mg/Kg de matière sèche. Les résultats montrent que les sols de Gassi sont les pollués suivis par ceux de Zotti et de Agreb. En ce qui concerne les teneurs de sol en (m+p) Xylène, la moyenne la plus élevée est enregistrée à Gassi avec 58,033 mg/Kg de matière sèche et la moyenne la plus faible est celle des sols d'Agreb avec 35,88 mg/Kg de matière sèche (Fig35e). Ces résultats indiquent que les sols d'Agreb sont les sols les plus pollués en (m+p) Xylène à la surface, les sols de Gassi sont les plus pollués à 1m et à 2m de profondeur.

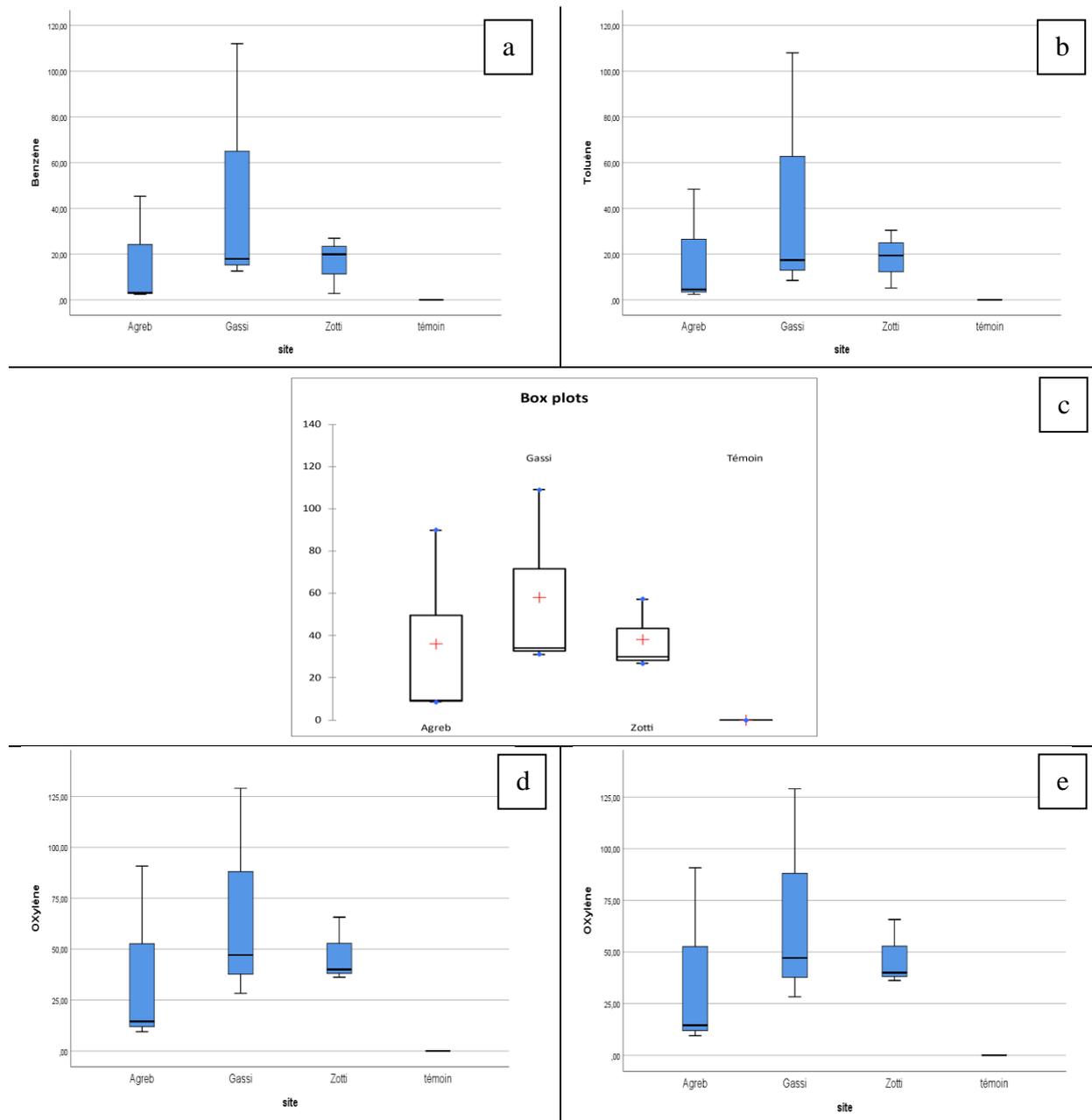


Figure 35. Teneur des sols en BTEX en fonction des sites : Benzène (a), Toluène (b), Ethyl benzène (c) ; O-Xylène (d), (p+m) Xylène (e)

Les analyses descriptives et les teneurs des sols du complexe GEA en fractions d'hydrocarbures (F1, F2, F3 et F4), ainsi que le benzène, toluène, O-xylène, m+p Xylène et Ethyle benzène mettent en évidence la pollution de ces sols avec des taux variant d'un site à un autre où les sols de Gassi sont les plus pollués suivis par les sols d'Agreb tandis que les sols de Zotti sont les moins pollués. Les résultats montrent aussi une variation du taux de la pollution en fonction de la profondeur dont les sols d'Agreb sont les plus pollués en surface et les sols de Gassi sont les plus pollués à 2 m de profondeur.

4.3.4. Analyse de la variance (ANOVA) pour comparer les caractéristiques moyennes des sols échantillonnés

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du Logiciel IBM SPSS Statistics 25. Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA l'analyse de la variance et la comparaison des moyennes a été faite par le test de Tukey. Le test a été appliqué à un niveau de probabilité de $p = 0,05$ à trouver des différences significatives entre les moyennes. Ces analyses ont été réalisées dans le but de comparer les caractéristiques moyennes des sols étudiés.

L'application de l'ANOVA, en utilisant le test de Tukey, montre une différence significative entre les sols de Gassi et le témoin pour les variables ions potassium et la fraction en hydrocarbure F1, entre les sols de Agreb et le témoin et les sols de Gassi et le témoin pour la variable fraction en hydrocarbure F2, entre les sols de Agreb et le témoin, le sol de Gassi et le témoin et les sols de Zotti et le témoin pour la variable densité. Elle est significative également entre les sols de Gassi, Agreb, Zotti et le témoin pour l'indice des hydrocarbures et entre les sols de témoin et de Agreb, du témoin et de Gassi, de Zotti et Agreb et Zotti et Gassi pour la variable fraction en hydrocarbure F3, donc on rejette l'hypothèse nulle H_0 . Pour les autres variables la différence n'est pas significative et donc on garde l'hypothèse nulle H_0 . La comparaison des moyennes des sols d'Agreb, Gassi, Zotti et le témoin a été réalisée en utilisant le test de Tukey. Ce dernier montre que dans les sols, la différence des moyennes est non significative pour tous les paramètres.

4.3.4.1. Effet des caractéristiques du sol sur la pollution hydrocarbonée des sols

L'effet des caractéristiques du sol sur la pollution hydrocarbonée des sols du complexe GEA est déduit par le test de corrélation de Pearson. Le coefficient de corrélation, qui présente finalement la covariance standardisée, varie entre (-1) et (1). Un coefficient de (1) indique une corrélation positive parfaite entre les deux variables. À l'inverse, un coefficient de (- 1) indique une corrélation négative parfaite. Nous regardons la valeur du coefficient et nous l'interprétons selon les balises :

- Autour de 0,10 : corrélation faible, effet de petite taille.
- Autour de 0,30 : corrélation moyenne, effet de taille moyenne.
- plus de 0,50 : corrélation forte, effet de grande taille.

Le coefficient de corrélation est significatif si la valeur de $P < 0,05$.

- **Effet du site :** la corrélation est négative et moyenne entre le site et les paramètres de pollution hydrocarbonée avec des valeurs de coefficient qui oscillent entre (-0,298) et (-0,885). Le site a un effet de taille moyenne sur la fraction d'hydrocarbure F1, le benzène, le toluène, l'O-Xylène, le (m+p) Xylène et l'éthyle benzène, mais sur le plan statistique il n'est pas significatif. Il a un effet de grande taille sur l'indice des hydrocarbures, les fractions d'hydrocarbures F2, F3 et F4. Cet effet est très significatif sur le plan statistique.
- **Effet de profondeur :** la profondeur est faiblement corrélée aux paramètres de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille faible sans signification statistique.
- **Effet de taux de la matière sèche :** il est faiblement corrélé aux paramètres de pollution du sol avec un effet de taille faible sans signification statistique.
- **Effet de l'humidité :** est faiblement à moyennement corrélée aux paramètres de pollution du sol avec un effet de taille faible à moyenne sans signification statistique.
- **Effet de la densité :** la corrélation est moyenne, mais négative entre la densité et les fractions d'hydrocarbures F2 et F3, le benzène, le toluène, l'O-Xylène et (m+p) Xylène et l'éthyle benzène. Ceci indique un effet de taille moyenne mais il n'est pas significatif sur le plan statistique. Les valeurs du coefficient de Pearson entre la densité et l'indice des hydrocarbures et les fractions d'hydrocarbures F1 et F2 indiquent que la corrélation est forte et négative entre eux et que la densité a un effet de grande taille sur ces indicateurs de pollution hydrocarbonée. Cet effet est très hautement significatif.
- **Effet du pH :** il est faiblement à moyennement corrélé aux paramètres de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille faible à moyenne sans signification statistique.
- **Effet de température :** ce paramètre a un effet de grande taille et très significatif sur les fractions d'hydrocarbures F4 et le (m+p) Xylène et un effet de taille faible à moyenne sur les autres indicateurs de la pollution hydrocarbonée mais sans signification statistique.
- **Effet de la conductivité électrique :** les valeurs du coefficient de Pearson reflètent un effet de taille faible à moyenne de la conductivité électrique sur les indicateurs de la pollution hydrocarbonée mais sans signification statistique.

- **Effet de la teneur en ions Sodium :** la teneur en ions sodium est faiblement corrélée aux paramètres de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille faible sans signification statistique.
- **Effet de la teneur en ions Potassium :** la teneur en ions potassium est négativement corrélée aux paramètres de pollution hydrocarbonée du sol. La corrélation est faible à moyenne ce qui indique un effet de taille faible à moyenne. Cet effet est significatif sur les fractions d'hydrocarbures F1 et F4 et l'O-Xylène et sans signification statistique sur les autres indicateurs.
- **Effet de la teneur en ions Calcium :** dans ce cas, la corrélation est positive et moyenne entre la teneur en ions calcium et l'indice des hydrocarbures ainsi que les fractions d'hydrocarbures F2, F3 et F4 ce qui indique un effet de taille moyenne mais non significatif. L'effet de la teneur en ions calcium est de grande taille et très significatif sur les fractions d'hydrocarbures F1, benzène, toluène, O-Xylène, m+p Xylène et l'éthyle benzène.
- **Effet de la teneur en ions Magnésium :** les valeurs du coefficient de Pearson reflètent un effet de taille faible de la teneur en ions magnésium sur les indicateurs de la pollution hydrocarbonée mais sans signification statistique.
- **Effet de la teneur en Azote Kjeldahl :** la teneur de cet élément a un effet significatif de grande taille sur la fraction d'hydrocarbures F1, le benzène et le Toluène et un effet de taille moyenne et non significatif sur les autres indicateurs de pollution hydrocarbonée.
- **Effet du taux d'argile :** il est moyennement corrélé aux paramètres de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille moyenne sans signification statistique.
- **Effet du taux de limon :** le limon a un effet significatif de grande taille sur l'indice des hydrocarbures et il est moyennement corrélé aux autres indicateurs de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille moyenne sans signification statistique.
- **Effet du taux de sable très fin :** il est significatif de grande taille sur la fraction d'hydrocarbures F4 et il est moyennement corrélé aux autres indicateurs de pollution hydrocarbonée du sol avec un effet de taille moyenne sans signification statistique.
- **Effet du taux de sable fin :** il est négativement corrélé aux indicateurs de pollution hydrocarbonée des sols. Il a un effet significatif de grande taille sur la fraction

hydrocarbonée F4 tandis qu'il est moyennement corrélé aux autres indicateurs de pollution du sol avec un effet de taille moyenne sans signification statistique.

- **Effet de taux de sable grossier :** la corrélation entre le taux de sable grossier et les indicateurs de pollution hydrocarbonée est négative et faible ce qui indique un effet de taille faible et non significatif.

4.3.5. L'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour mettre en évidence les principaux facteurs influençant la répartition des paramètres physico-chimiques et les concentrations en hydrocarbures dans les différents sites d'échantillonnage. Elle révèle également les dépendances et les relations ainsi que les similitudes entre ces paramètres (Fig 36). PC1 et PC2 représentent ensemble 55,52 % (38,14 % pour PC1 et 17,39 % pour PC2) de la variance totale. Les résultats obtenus ont montré trois grands groupes de paramètres étudiés selon les principaux facteurs F1 et F2. F1 représente la pollution par les hydrocarbures pétroliers, qui est positivement corrélée aux sites d'échantillonnage et à la concentration en calcium. Habituellement, les cations métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et K^+) sont fixés en grande quantité par les particules du sol ; ces éléments jouent un rôle essentiel dans la croissance des micro-organismes (Mansour *et al.*, 2016).

Nous remarquons également que la pollution pétrolière est positivement corrélée à la conductivité, ce qui est logique car il a été démontré que la contamination pétrolière augmente la conductivité électrique du sol (Devatha *et al.*, 2019). La pollution par les hydrocarbures pétroliers est négativement corrélée à la densité du sol et à la matière sèche. Selon Uquetan *et al.* (2017), le pétrole brut pourrait avoir des effets négatifs sur certaines propriétés physiques du sol, notamment une diminution des espaces interstitiels, une conductivité hydraulique saturée et une densité apparente accrue. En raison de leur faible pouvoir émulsifiant, leur faible densité et haute viscosité, les hydrocarbures modifient la porosité et perméabilité du sol (Wang *et al.*, 2017) et réduire la pénétration de l'eau et de l'oxygène. F2 représente la profondeur d'échantillonnage du sol qui est positivement corrélée à la concentration de sodium et de magnésium.

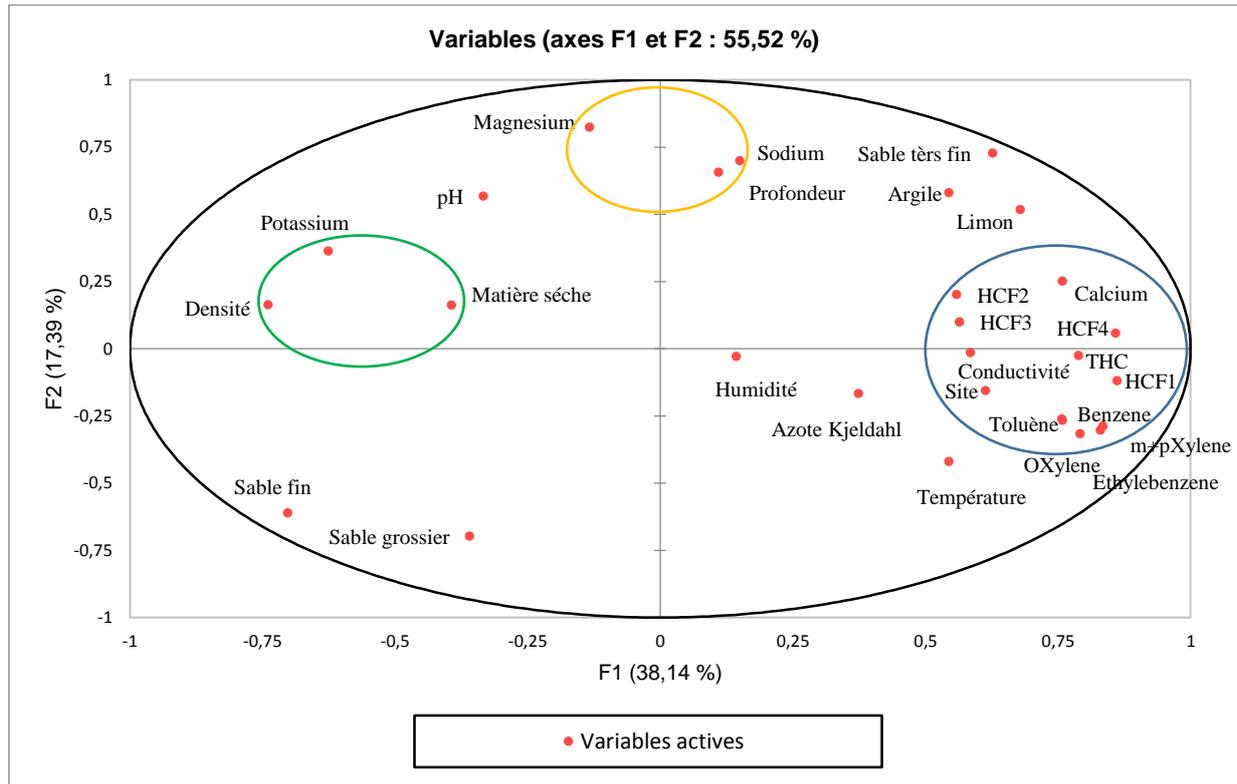


Figure 36. ACP des concentrations de THC, fractions en HC, BTEX et propriétés physicochimiques des sols échantillonnés

4.4. Discussion

Dans cette partie sont exposés les résultats liés aux analyses physico chimiques des échantillons des trois bourbiers à différentes profondeurs, ainsi que la quantification des hydrocarbures existants (hydrocarbures totaux, BTEX et différentes fractions des hydrocarbures). Il est à noter que généralement, la composition d'un bourbier est influencée par celle des boues (boues à base d'eau et boues à base d'huile) ou fluides de forage (déblais) traités et rejetés après une opération de forage ; cependant, le bourbier va subir des modifications biotiques (microorganismes hydrocarbonoclastes) ou abiotiques (lumière, eau) avec le temps. Après environ 4 jours, l'ensemble des rejets acheminés vers un bourbier (les boues à base d'huiles sont les plus utilisées en forage au champ de HMD) seront sous forme d'une matrice solidifiée.

En premier lieu, dans le Nord du Sahara algérien, les sols sont d'origine essentiellement éolienne et comportent principalement des sables ; c'est le cas des sols de la région de Ouargla. Nos résultats de l'analyse granulométrique montre une dominance de la fraction sableuse (sable fin), qui est un indicateur d'une bonne perméabilité facilitant ainsi la circulation des fluides contenant les nutriments et l'oxygène (Khokonov et Khokonov, 2021),

favorisant la croissance des microorganismes (Karabi, 2017) et causant une carence en éléments nutritifs minéraux (Omar *et al.*, 2022). La dominance de la fraction sable fin résulte de la nature géomorphologique des sols de la région de HMD qui sont à minéraux bruts d'apport. Cependant, le faible taux en argile affecte négativement l'activité microbienne, car dans cette fraction serait mis en réserve une partie de ressources nutritives et de l'eau. En effet, l'argile agit sur la distribution et l'activité des organismes du sol et sur leurs interactions (Lavelle et Spain, 2001). Il est à noter qu'à Hassi Messaoud, les sols sont recouverts d'un voile éolien de grains de sables plus au moins important qui limite leur évolution. Les bourbiers pétroliers sont implantés dans des zones désertiques formées dans leur quasi-totalité de sable. On peut même supposer que l'argile provient en grande partie des fluides de forage qui sont principalement à base de bentonite. Nos échantillons ont été prélevés à partir de 20 cm de profondeur car des études précédentes d'Amro *et al.* (2013) sur les déversements d'hydrocarbures, rapportent que la surface du sol est caractérisée par une adsorption élevée entraînant une infiltration à faible profondeur. Selon Takahashi et Shoji (2002) les matériaux pyroclastiques sont caractérisés par des coefficients d'adsorption élevés.

Dans une seconde optique, une analyse des divers paramètres physico chimiques des échantillons est indispensable. Selon Pathak *et al.* (2011) et Onojake et Osuji (2012), la qualité physique et chimique du sol telle que l'humidité, le pH, la CE et la capacité de rétention d'eau est significativement réduite par les contaminations aux hydrocarbures pétroliers. De nombreuses études ont montré que la pénétration de contaminants pétroliers dans le sol modifie plus ou moins toutes les propriétés du sol, y compris ses propriétés physiques, physico-chimiques et chimiques (Zahermand, *et al.*, 2020). En raison de la contamination, la couleur du profil du sol passe au gris et au brun foncé (Abu-Khasan et Makarov, 2021). Le pH est un élément clé de la composition chimique du sol et détermine la disponibilité des éléments nutritifs pour les plantes et les micro-organismes (Borah *et al.*, 2010). La contamination par le pétrole brut augmente considérablement le pH du sol jusqu'à 8,0 et réduit les concentrations de phosphore disponible dans le sol (Wang *et al.*, 2013). Le pH de nos échantillons est d'une manière générale très alcalin à très fortement alcalin (supérieur à 8) du fait que la plupart des sols désertiques sont caractérisés par un pH neutre à alcalin (Mchugh *et al.*, 2017). Aussi, le pH des échantillons prélevés des bourbiers est influencé par celui des boues rejetées qui présentent des pH alcalins entre 8.0 à 10.5 pour les boues à base d'eau (Peretomode, 2018). En effet, les additifs anticorrosion à caractère basique, la soude ajoutée aux fluides de forages (Johannes, 2012) et les opérations de traitement des

déblais de forages rendent les bourbiers plus alcalins. N'oublions pas que dans les sols calcaires, ce sont les carbonates qui contrôlent le pH. En général, la présence des hydrocarbures dans le sol n'affecte pas le pH. On peut même avancer et dire que les pH répondent à la limite préconisée par la norme française (Afnor X 31-210) ($4 < \text{pH} < 13$).

La conductivité électrique des échantillons prend des valeurs maximales, ceci est dû à la forte évaporation qui permet l'accumulation des sels à la surface des sols, également la présence des sels et additifs des boues de forages. Selon l'analyse statistique, nous remarquons que la présence des hydrocarbures est positivement corrélée à la conductivité, ce qui est logique car il a été démontré que la contamination par les hydrocarbures augmente la conductivité électrique du sol (Adebisi et Afedia, 2011 ; Arocena et Rutherford, 2005). L'augmentation de la température entraîne une diminution de la viscosité dynamique du pétrole brut (Mekkaoui *et al.*, 2017). Ce paramètre influence la biodégradation des hydrocarbures en modifiant leurs états physiques (viscosité, volatilité, solubilité) et composition chimique (Yadav *et al.*, 2012). La température des bourbiers est entre 20 et 21°C, ce qui constitue un environnement favorable pour la croissance des souches microbiennes mésophiles. Les hydrocarbures pétroliers, en dépit de leur hydrophobicité, se solubilisent graduellement dans l'eau en fonction de l'augmentation de la température.

La pollution par les hydrocarbures pétroliers est négativement corrélée à la densité de l'échantillon du bourbier et à sa matière sèche. Les particules de sol recouvertes de films hydrophobes de composants pétroliers de poids moléculaire élevé perdent leur capacité à absorber et à retenir l'humidité. Selon Abosedo (2013), le pétrole brut pourrait avoir des effets négatifs sur certaines propriétés physiques du sol, notamment la diminution des espaces poreux, la conductivité hydraulique saturée et l'augmentation de la densité apparente. Khamehchiyan *et al.* (2007) et Kuyukina *et al.* (2005) ont signalé que des concentrations élevées de pétrole brut dans le sol pouvaient colmater les pores du sol et réduire la pénétration de l'eau et de l'oxygène. Le taux d'humidité du sol est relativement important. Ceci est peut-être tributaire de la composition des fluides de forages, et les déversements des eaux lors des opérations d'exploitation des gisements (Khodja, 2008). Il se trouve que les rejets de forage gardent en rétention des quantités importantes du fluide porteur par un phénomène appelé enrobage ou encapsulation. En fait, les hydrocarbures empêchent l'eau de s'évaporer. La teneur en humidité est aussi fonction du climat et des propriétés de rétention de la matrice du sol. Le climat désertique caractérise la région de Ouargla, les températures varient de 0°C jusqu'à plus de 47°C, et les vents dominants sont NNE. Il est à noter qu'un fort taux

d'humidité peut avoir un effet positif sur l'activité microbienne en limitant le contact microorganisme / polluant, pour cela, Gabet (2004) a signalé que pour une meilleure activité de biodégradation, l'humidité doit être de 25 à 90%.

Nos résultats du dosage des cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ et K^+) dans les échantillons des trois bourbiers montrent que le sol à analyser est très minéralisé. Cependant, on remarque que l'ordre d'abondance des cations échangeables est le suivant : $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Mg}^{2+}$. Le calcium (Ca^{2+}), provient de la dissolution des roches carbonatées. Habituellement, les cations métalliques (Ca, Mg, K et Na) sont fixés en grande quantité par les particules du sol ; ces éléments jouent un rôle vital dans la croissance des micro-organismes (Mansour *et al.*, 2016). La saturation surtout en Ca^{2+} dans nos échantillons, reflète le pH alcalin des échantillons. Cependant, les processus de dissolution des roches contrôlent la présence du Ca qui proviennent des carbonates, mais aussi du Na du Mg et du K provenant des feldspaths et des micas ou des anions HCO_3^- et NO_3^- (Siddiqui et Bano, 2018). L'état calcique du sol est en étroite relation avec le pH. Un sol bien pourvu en Ca^{2+} , favorise le maintien d'une structure grumeleuse avec une bonne perméabilité à l'eau et à l'air avec des agrégats plus résistants à la dispersion causées par les pluies. A l'état dispersé, l'argile et l'eau ne peuvent pas être séparés, ils forment un mélange homogène. En revanche, si l'on ajoute un ion flocculant tel que le Ca^{2+} ou le Mg^{2+} , l'argile va changer d'état et passer sous forme flocculée ce qui a pour conséquence la création d'agrégats argileux qui vont se séparer en partie de l'eau. En général, les sols calcaires, sont très basiques et les cations y sont mal retenus. Selon Nnaji *et al.* (2005) le pétrole peut se décomposer et se minéraliser rapidement dans le sol, ce qui entraîne la libération de cations et d'oligoéléments.

Tous les pétroles contiennent des constituants majeurs (carbone et hydrogène) et des concentrations mineures de métaux et de composés d'oxygène, de soufre et d'azote. Généralement, les composés contenant de l'azote sont présents dans tous les combustibles fossiles. Selon Eckford *et al.* (2002), la pollution des sols par les hydrocarbures a pour conséquences un déficit en azote et en phosphore, ce qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes. Nos résultats montrent que ce paramètre augmente en allant en profondeur pour les sites Agreb et Gassi, par contre diminue pour Zotti. Cependant, les teneurs importantes en azote Kjeldhal (TKN) témoignent d'une grande présence de déchets organiques (détérioration), de composés hydrocarbonés et leurs dérivés. Tout sol abrite des communautés microbiennes à divers fonctions : il y a des micro-organismes qui utilisent les produits pétroliers et leurs dérivés comme source de carbone et

d'énergie, et d'autres en parallèle dites nitrifiantes intervenant dans le cycle de l'azote (Devatha *et al.*, 2019). La disponibilité de micronutriment s'est avérée être un facteur limitant potentiel qui contrôle la biodégradation des hydrocarbures sur les sites contaminés. On estime qu'environ 150 g d'azote et 30 g de phosphore sont consommés pour convertir 1 kg d'hydrocarbures en cellules bactériennes (Ron et Rosenberg, 2014). Zafra *et al.* (2015), ont observé que la concentration des polluants exerçait une pression sélective sur les organismes dégradant le pétrole. L'azote a été largement utilisé dans les travaux de forage lors de l'évacuation des boues (élimine le risque de corrosion) et pour dissiper les hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) dans le sol contaminé par le pétrole.

Une présence d'hydrocarbures est notée dans le sol de nos sites, exprimée par l'indice des HC (C10-C40) mg/Kg Ms. Cependant, les deux sites Gassi et Agreb montrent une présence d'hydrocarbures nettement importante (dépassant 50000 Mg/Kg Ms) par rapport à Zotti. Ceci explique l'ampleur et la nature de l'industrie existante dans chaque site : Agreb avec 34 puits producteurs et 38 bourniers pétroliers, Gassi comportant 24 puits et 49 bourniers de déchets, alors que Zotti avec 5 puits compte 3 bourniers. Il est à noter que les caractéristiques d'une pollution des hydrocarbures et de ces dérivés dans les sols dépendaient de nombreux facteurs, notamment la répartition spatiale et les historiques d'exploitation des puits de pétrole, les conditions climatiques et environnementales de la zone du champ pétrolifère et les principaux ingrédients du pétrole brut (Yuan *et al.*, 2018).

HC (C10-C40) est le composant le plus abondant du pétrole brut et l'un des éléments les plus préoccupants de l'environnement. Nos résultats de la concentration des hydrocarbures totaux (TPH) dans les échantillons de sol ont montré que les trois bourniers pétrolifères souffraient de degrés divers de pollution pétrolière. Selon la norme d'assainissement des sols contaminés par le pétrole (500 mg/kg) stipulé par l'État de l'Oklahoma aux États-Unis, les hydrocarbures totaux selon l'indice HC (C10- C40) de nos échantillons sont supérieurs à cette valeur critique (Bao, 2000 ; Wang *et al.*, 2009). L'importance et la cinétique des phénomènes de migration ou de transformation dépendent des caractéristiques physico-chimiques du sol, de la nature des polluants et des conditions climatiques/environnementales, sans oublier l'âge du bournier pétrolier. C'est ainsi que selon la complexité des mélanges, les fractions les plus légères pouvant se déplacer plus rapidement que les composés les plus lourds vont migrer (à la fois verticaux et latéraux), tandis que les plus visqueux restent liés à la matrice du sol.

Cependant, la caractérisation des fractions pétrolières F1 (C6-C10) (la plus volatile), F2 (C10-C16) (semi-volatile), F3 (C16-C34) et F4 (C34-C50) (HAPs les plus récalcitrants),

montre un profil contamination de la surface qui augmente en allant vers la profondeur. Sous l'effet de la gravimétrie, on remarque une succession de distribution de F1, F2 et F3. La fraction F4 est de valeur minime, par contre F3 est la plus dominante. En raison de leurs caractéristiques complexes, les fractions d'hydrocarbures les plus légères et les plus volatiles sont rejetées dans l'atmosphère, les fractions hydrophiles se dissolvent dans l'eau et les fractions lipophiles ont tendance à se lier aux particules de sol/sédiment et à la matière organique (Logeshwaran *et al.*, 2018).

Comparés aux HAP, les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène avec ses isomères) ou même hydrocarbures monoaromatiques, sont plus facilement transportés vers les sols profonds et les eaux souterraines en raison de leur forte solubilité dans l'eau et de leur mobilité dans les sols (Mohan *et al.*, 2020). Dans les sols à faible perméabilité, les BTEX ont tendance à se diffuser latéralement, à se disperser et à être adsorbés par les particules du sol, restant ainsi dans les pores du sol (Yang *et al.*, 2023). Par contre, dans les sols à forte perméabilité, les composés organiques ont tendance à migrer verticalement vers le bas en raison de la gravité et à se diffuser des zones à fortes concentrations vers les zones à faibles concentrations (Chen *et al.*, 2022). C'est ce qui confirme nos résultats par une présence de ces composés à une profondeur de plus de 1.20 m. En général, la migration des BTEX dans un sol est régie par les actions de volatilisation, de dissolution, de transport et d'adsorption. Par cette étude, on peut trier les BTEX dans nos échantillons selon l'ordre croissant suivant : le Xylène par ses deux isomères, l'Éthylbenzène, le Toluène et enfin le Benzène. D'après Zheng *et al.* (2023) et parmi les BTEX, le Benzène et le Toluène migrent le plus dans un sol. Le xylène (surtout l'O-Xylène) étant peu soluble dans l'eau, forme un film à la surface du sol qui favorise sa volatilisation et sa solubilisation. La phase adsorbée créée lors de l'infiltration met un certain temps avant de disparaître.

Conclusion

A travers ce modeste travail, deux approches ont été ciblées : la première consiste en une caractérisation physicochimique des bourbiers pétroliers du complexe GEA (Agreb, Gassi et Zotti) situé dans la région de Hassi Messaoud (Sahara algérien). La seconde vise la distribution spatiale des hydrocarbures totaux (THC), des quatre fractions d'hydrocarbures F1 (C6-C10), F2 (C10-C16), F3 (C16-C34), (F4>C34) et des BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène) dans nos échantillons à différentes profondeurs des sols.

L'analyse des sols est un procédé complexe et la compréhension de certains paramètres physico-chimiques (pH, température, conductivité électrique, densité, salinité, azote, ...etc) donne une estimation préliminaire sur la qualité et le degré de sa pollution. Les échantillons de sol des trois bourbiers pétroliers présentent une dominance de la fraction sableuse, à pH fortement alcalin et à profil affecté par la présence du pétrole brut et de ses dérivés. Ceci est représenté par de fortes valeurs de conductivité électrique, azote Kjeldahl, densité et cations échangeables (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}).

Une distribution spatiale hétérogène de grandes quantités d'hydrocarbures expérimentés, témoignent d'une pollution grave des sites. Une présence notée des mono- et poly aromatiques, spécialement les BTEX. Selon la littérature scientifique, leurs distribution est expliquée par leurs mouvements dans le sol qui sont régis par plusieurs facteurs, d'où leurs migration à des profondeurs de sol à 1.20 m.

Les deux volets étudiés facilitent le choix des méthodes de décontamination à utiliser pour les bourbiers pétroliers (physique, chimique, biologique). La plupart des déchets rejetés dans ces milieux doivent subir au préalable un ou plusieurs traitements, compte tenu de la complexité de ces déchets industriels. Généralement, plusieurs méthodes doivent être utilisées pour séparer l'huile, l'eau et les solides. L'implantation de la réhabilitation des sols nécessite une coopération interdisciplinaire telle que la biologie des sols, la chimie des sols, et des experts en ingénierie.

L'environnement est un patrimoine précieux, que chacun de nous doit protéger et préserver pour les générations futures.

*Chapitre .4.
Les champignons
microscopiques : cas des
Hydrocarbonoclastes*



Chapitre .4. Les champignons microscopiques : cas des hydrocarbonoclastes

Introduction

Sous le terme générique micro-organismes, sont regroupés des êtres vivants microscopiques (bactéries, champignons microscopiques, algues,...etc) et ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. Le caractère unique de ces micro-organismes, leur nature souvent imprévisible et leurs capacités de biosynthèse, compte tenu d'un ensemble spécifique de conditions environnementales et culturelles, en ont fait des candidats probables pour résoudre des problèmes particulièrement difficiles dans les sciences de la vie et dans d'autres domaines également.

Cependant, si les champignons sont bénéfiques pour de nombreux procédés, ils peuvent aussi être à l'origine de certaines maladies (Pointing et Hyde, 2001). Ce sont des organismes ubiquistes, dotés d'activités biologiques bénéfiques (Musavi et Balakrishnan, 2014). Ce sont les agents catalytiques centraux des grands cycles (carbone, azote, oxygène et des métaux de transition). Ces processus biogéochimiques sont liés à la grande diversité taxonomique (génétique) et fonctionnelle (phénotypique) des mycètes et à leur formidable flexibilité métabolique qui leur permet de tolérer et de s'adapter rapidement aux changements de conditions (Guerrero et Berlanga, 2006). Ces métabolismes sont versatiles et flexibles leur permettant de transformer des molécules d'origine anthropique ou encore des nutriments peu biodisponibles ou toxiques (Schmidt, 2006).

Dans la nature, de nombreuses classes de microorganismes ont été décrites comme aptes à dégrader des hydrocarbures. Toutefois, ce sont les bactéries qui sont les plus actives pour métaboliser les HAPs (Haritash et Kaushik, 2009). Les microorganismes hydrocarbonoclastes sont des organismes vivants microscopiques, capables d'assimiler les hydrocarbures pétroliers de façon naturelle afin de dépolluer les sites contaminés. Ces microorganismes regroupent les champignons et les bactéries, qui sont des médiateurs primaires dans la dégradation des hydrocarbures. Équipés de complexes multi-enzymes extracellulaires, les champignons sont les plus efficaces, en particulier pour décomposer les composés polymères naturels (Joutey *et al.*, 2013).

1. Présentation et caractéristiques principales

Les champignons sont un règne du vivant regroupant 2 à 4 millions d'espèces (Hawksworth et Lücking, 2017) en une dizaine de phylums, et dont la classification est régulièrement revue (McLaughlin et al., 2009 ; Blackwell, 2011). On estime que les champignons représentent le deuxième règne le plus riche en espèces de la biosphère après les insectes (Cordier, 2012). Ce sont des organismes ubiquitaires (Pitt et al., 2000), filamenteux (Guiraud, 2012) thallophytes car elles sont caractérisées par un appareil végétatif sous forme d'un thalle composé de longs filaments (hyphes) ramifiés souvent septés ou aseptés (Stajich et al., 2009), qui se propagent par extension polaire (Steinberg et al., 2017). Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » (Fig37). Les cloisons ou septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. De plus, les compartiments hyphes individuels peuvent être uninucléés ou multinucléés (Dorter et Momany, 2016).

Les mycètes sont des hétérotrophes eucaryotes (Botton et al., 1990), aérobies qui ne constituent pas une entité monophylétique mais forment au contraire un groupe très hétérogène dont la caractéristique essentielle commune est la nutrition hétérotrophe par absorption, celle-ci pouvant prendre la forme du saprophytisme, du parasitisme ou de la symbiose (Nasraoui, 2006). Les champignons incluent des espèces macroscopiques (Macro mycètes) et d'autres microscopiques (Micromycètes) (Tabuc, 2007). D'un point de vue structural, on trouve une grande variété de champignons. Ils sont classés en deux grandes catégories : la plus courante est la forme végétative sous forme de levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes (Redecker, 2002). Certaines espèces ont la capacité d'adopter les deux formes, levure et mycélienne (dimorphisme) (Ruiz-herrera et Campos-Góngora, 2012), tandis que d'autres sont restreintes à l'une ou l'autre (Jennings et Lysek, 1996).

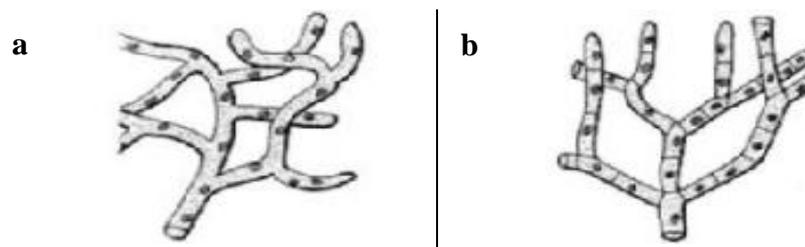


Figure 37. Structure de l'hyphe : (a) hyphe coenocytique, (b) hyphe cloisonnée (Chabasse et al., 2002)

2. Systématique des champignons

La systématique des champignons est basée essentiellement sur des critères morphologiques, bien que certaines approches modernes d'identification et de classification fongique sont développées, telles que les études nutritionnelles, les tests sérologiques, biochimiques, immunologiques, phylogénétiques et moléculaires, qui sont des outils de confirmation des données morphologiques (Tabuc, 2007; Marquez *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, la classification des champignons s'est considérablement simplifiée et le règne des « champignons vrais » ou Fungi, appelé Eumycota, comprend actuellement cinq phyla : Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Basidiomycota et Ascomycota (Blackwell, 2011) (Fig38).

2.1. Les Chytridiomycètes

Les Chytrides constituent la lignée évolutive la plus ancienne des champignons (James *et al.*, 2006). Ce groupe comprend 4 ordres, 13 familles, 99 genres et près de 686 espèces (Kirk *et al.*, 2008). Ils regroupent les espèces produisant des spores uniflagellées (zoospores), témoignant d'une vie majoritairement aquatique. Les organismes de ce phylum sont souvent microscopiques mais peuvent aussi produire un mycélium. La plupart des Chytrides sont saprotrophes, aérobies ou anaérobies ; ils sont capables de dégrader un grand nombre de substrats (Shearer *et al.*, 2007). Les Chytrides sont également connus pour causer des maladies chez les amphibiens et on pense qu'ils ont joué un rôle dans le déclin des populations d'amphibiens dans le monde (Codjo *et al.*, 2021).

2.2. Les Zygomycètes

Les Zygomycota constituent un groupe ancien des champignons ayant divergé après les Chytridiomycota (James *et al.*, 2006). Ce groupe formé d'organismes microscopiques hétérogènes est polyphylétique (James *et al.*, 2006 ; Bar-Hen *et al.*, 2008). Ce phylum comprend environ 900 espèces (Botton *et al.*, 1990 ; Carlile *et al.*, 2001) et deux ordres: les Mucorales et les Entomophthorales. Les zygomycètes sont caractérisés par leur production de zygosporanges, des structures spécialisées qui contiennent des spores sexuées dormantes appelés Zygosporangies (Chabasse *et al.*, 2002). Ils sont non flagellés et possèdent un thalle siphonné (Branger, 2007). On les trouve dans un large éventail d'habitats, y compris le sol, les matières végétales en décomposition et les excréments d'animaux. Différents modes de vie sont retrouvés, les plus communs étant le saprophytisme et le parasitisme (d'insectes principalement).

2.3. Les Glomérormycètes

Ce phylum regroupe des champignons symbiotiques et biotrophes stricts des plantes, qui forment des mycorhizes à arbuscules à bénéfices mutuels avec les racines fines de nombreuses plantes. Les champignons fournissent à la plante l'eau et des éléments minéraux prélevés dans le sol, et en retour, la plante fournit aux champignons des éléments carbonés issus de la photosynthèse. Ces micromycètes se trouvent dans le sol et jouent un rôle important dans le cycle des nutriments et la croissance des plantes.

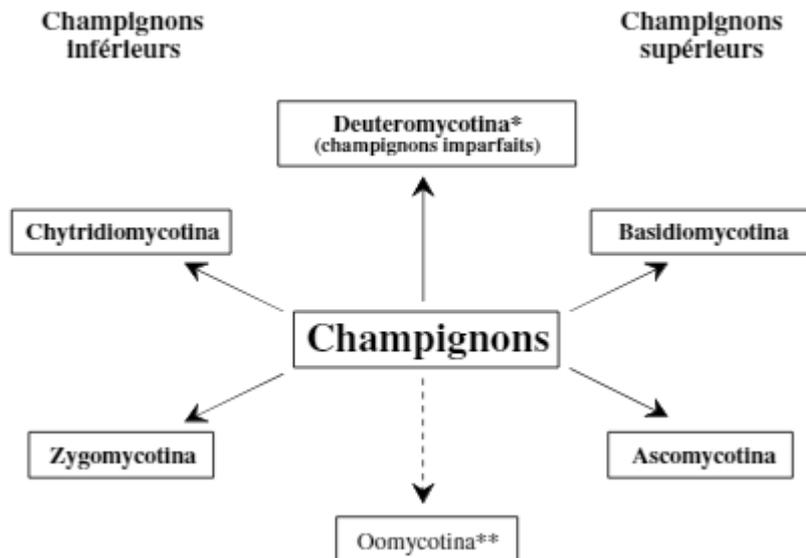
2.4. Les Ascomycètes

C'est le plus grand et le plus diversifié groupe de champignons microscopiques, comprenant 15 classes, 68 ordres, 327 familles et environ 64163 espèces (Kirk *et al.*, 2008). Ce phylum regroupe les champignons à lichens (Carlile *et al.*, 2001), de nombreux pathogènes des plantes et des levures utiles pour l'homme (*Saccharomyces cerevisiae*), ainsi que des champignons comestibles tels que les morilles et les truffes. Les ascomycètes sont caractérisés par leur production d'ascospores, qui sont contenues dans des sacs spécialisés appelés asques. On les trouve dans un large éventail d'habitats, y compris le sol, l'eau et le matériel végétal en décomposition.

2.5. Les Basidiomycètes

Ils regroupent la majorité des champignons mycorrhiziens à carpophores, mais aussi des parasites des plantes et des levures. Ce phylum est représenté en 31515 espèces rangées dans 1589 genres, 177 familles, 52 ordres et 16 classes (Lee *et al.*, 2013). Les basidiomycètes sont caractérisés par leur production de basidiospores, qui sont contenues dans des structures spécialisées appelées basides. On les trouve dans un large éventail d'habitats, y compris le sol, les matières végétales en décomposition et le bois. Beaucoup d'entre eux sont des Macromycètes (champignons à chapeau), certains sont des parasites de végétaux, d'autres de redoutables opportunistes chez l'homme (*Cryptococcus*, etc.).

Domaine : Eucaryotes
Règne : les champignons
Division (phylum) : Ascomycotina
Basidiomycotina
Zygomycotina
Chytridiomycotina
(Deuteromycotina)



* Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification.

** Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais

Figure 38. Classification générale des champignons (Chabasse *et al.*, 2002)

3. Reproduction

La reproduction est la formation de nouveaux individus ayant toutes les caractéristiques typique de l'espèce. Les modalités de la reproduction chez les champignons présentent une très grande variabilité. En effet, les champignons se reproduisent principalement par l'intermédiaire des spores qui sont des structures uni ou multicellulaires avec diverses formes et tailles, capable de reproduire l'espèce fongique après germination. Les spores peuvent se former à travers une voie asexuée (ressemblant à des bourgeons qui se forment sur des branches) ou à travers une voie sexuée après fécondation. En outre, certains phénomènes parasexuels peuvent aussi être observés chez les champignons (Nasraoui, 2006). Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction (Fig.39) :

- **une reproduction asexuée** (multiplication végétative anamorphe), au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat; elle peut être :
 - fragmentation d'une partie du thalle en fragments

- scission ou bourgeonnement du thalle en cellules-filles
 - bourgeonnement de novo de spores mitotiques "vraies" à partir du thalle.
- **une reproduction sexuée** (télémorphe), implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium haploïde va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium diploïde. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores.

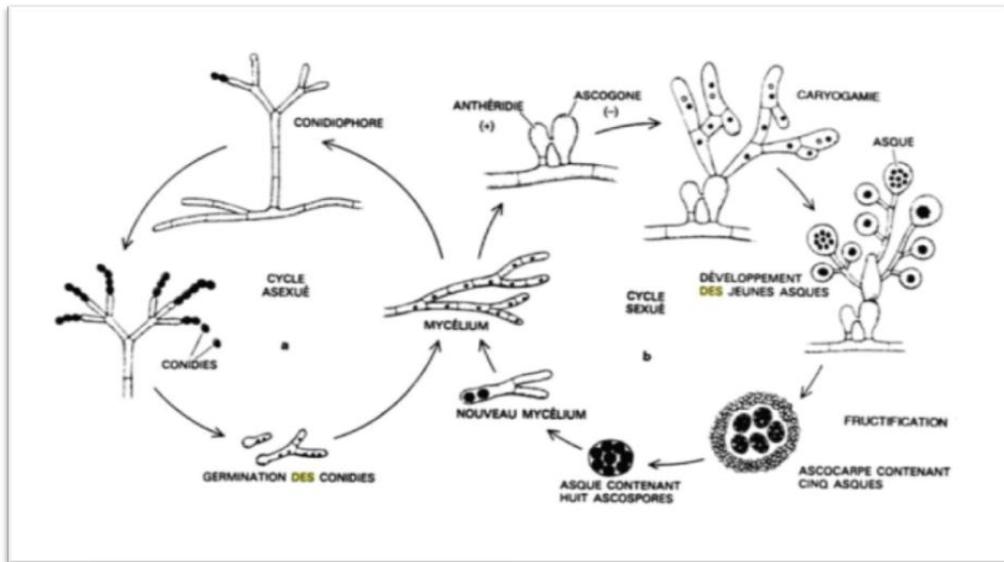


Figure 39. Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Lecellier, 2013)

4. La mycoécologie

4.1. Les champignons et le milieu physique

Bien qu'ils soient relativement peu exigeants, les champignons filamenteux ont besoin d'un certain nombre de facteurs nutritifs et environnementaux tels que l'aération, le pH du substrat, la disponibilité d'eau (teneur en humidité), les nutriments et la température pour leur colonisation et croissance (Zhang *et al.*, 2018).

- **Composition de l'air** : les moisissures sont, pour la plupart, des microorganismes strictement aérobies; ils ont besoin d'oxygène pour une croissance normale. Pourtant, des champignons anaérobies ont été trouvés dans des sédiments d'eau profonde (Nagano et Nagahama, 2012). Certaines espèces peuvent se développer en anaérobiose : c'est le cas de *Bysochlamys* qui contaminent les jus de fruits conservés par pasteurisation (Pfohl-Leszkwicz, 2001). La concentration en CO₂ influence aussi la croissance fongique et intervient au niveau de l'intensité respiratoire. L'élévation de la pression de CO₂ dans le

milieu inhibe la croissance fongique. Ainsi, le développement d'*Aspergillus ochraceus* est complètement inhibé par une teneur de 80% de CO₂ (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

- **pH** : les micromycètes peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 4.5 – 8.0 (Botton *et al.*, 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. En raison de leur acidité (pH < 6) de nombreux aliments comme les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne. La plupart des champignons préfèrent des milieux à pH acide.
- **Activité de l'eau (Aw) et humidité relative (HR)** : l'Aw représente la disponibilité de l'eau liquide dans un milieu liquide ou solide et l'HR représente la teneur en eau dans un milieu gazeux en équilibre (Zoz, 2016). la quantité d'eau disponible dans le substrat et dans l'air environnant est le facteur principal pour initier leur développement. Liu *et al.* (2018) ont rapporté qu'une communauté biologique se développe plus facilement dans des conditions d'infiltration d'eau et/ou d'humidité élevée. L'Aw s'exprime par un nombre sans dimension compris entre 0 et 1 et les besoins en eau varient selon l'espèce. Les moisissures peuvent être classées en trois catégories selon les gammes d'Aw favorables à leur développement : xérophiles, mésophiles et hydrophiles (Li et Yang, 2004). Lorsque l'activité de l'eau de l'extérieur de la spore est inférieure à celle de l'intérieur, elle est soumise à un stress osmotique et est incapable d'absorber l'eau nécessaire pour germer. Au contraire, si l'Aw augmente à l'extérieur, le transport d'eau vers la cellule a lieu et une série de réactions se déclenchent, permettant à la spore de s'hydrater (Boudih, 2011).

Dans un système en équilibre hydrique, l'HR de l'air correspond à l'HR de la surface du matériau, nommée humidité relative d'équilibre (HRE). Les matériaux deviennent la cible de la prolifération fongique lorsque les valeurs d'HRE sont supérieures à 70 % pour les matériaux à base de bois, 85 % les matériaux gypse et autour de 90-95 % pour les matériaux cimentaires (Verdier, 2015).

- **Température** : les moisissures peuvent répondre à une large gamme de températures de croissance allant de 0 et 10°C pour les minimales et de 35 à 52°C pour les maximales (Boudih, 2011). Ce paramètre affecte principalement leur cinétique de croissance (Joblin, 2012). Dans les environnements intérieurs, les moisissures sont principalement mésophiles : leur croissance est optimale à des températures proches de la température ambiante des locaux (Boudih, 2011; Méheust, 2012).

➤ **Nutriments** : les moisissures sont hétérotrophes et nécessitent de l'oxygène ainsi que de la matière organique disponible pour se développer. Les besoins nutritionnels de ces organismes peuvent être classés en deux catégories : les nutriments constitutifs comme le carbone, l'azote, l'hydrogène, le potassium, le soufre, le phosphore et le magnésium ; et les oligonutriments parmi lesquels figurent le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène (Méheust, 2012). Lors de leur croissance, les moisissures dégradent la matière organique complexe grâce à l'action d'enzymes hydrolytiques et d'acides. Les composants digérés, plus facilement assimilables, sont ensuite absorbés à travers la paroi cellulaire perméable. Certaines espèces ont la capacité de dégrader des polymères très complexes comme la lignine et la cellulose et d'autres, comme certaines espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*, préfèrent les sucres plus simples et se développent très rapidement (Méheust, 2012).

4.2. Champignons et autres êtres vivants (stratégie nutritionnelle)

L'hétérotrophie des champignons conditionne leur mode de vie qui peut prendre cinq aspects : saprotrophie, parasitisme, mutualisme symbiotique, commensalisme et carnivorie

❖ **Les saprotrophes (ou saprophytes)** vont se développer grâce à de la matière organique morte animale ou végétale (litière, cadavres) voire des déjections : ce sont des détritivores ou décomposeurs. Ils jouent un rôle très important dans le recyclage de la matière organique sur Terre (Despes, 2012). Cependant, leur richesse en enzymes leur permet de dégrader la cellulose et même la lignine et d'éviter l'accumulation des déchets végétaux en forêt notamment (Pichard, 2015). Leur capacité d'exploration via l'extension des hyphes, couplée à la capacité de largage d'enzymes hydrolytiques, ont permis une colonisation d'une grande variété de substrats. Dans le sol, les champignons participent au cycle de l'azote par la dégradation de l'humus. Ils ont la capacité de consommer la cellulose ainsi que la lignine et sont considérés comme les principaux recycleurs de matière organique à partir de matériels végétaux (Lutzoni *et al.*, 2004).

❖ **Les parasites et pathogènes** vont vivre aux dépens d'organismes vivants (champignons, plantes, insectes, animaux, homme). Certains parasites sont dits obligatoires alors que d'autres sont facultatifs ou opportunistes. Ils pénètrent chez l'hôte par des voies naturelles (stomates) ou occasionnelles (blessures) voire par effraction en synthétisant des enzymes. Les champignons parasites jouent un rôle important dans la régulation des populations animales et végétales d'un écosystème. La présence de champignons parasites obligatoires ou facultatifs cause plusieurs pathologies, induisant parfois la mort de

l'organisme hôte (Garon et Guéguen, 2015). 20% des champignons connus sont capables de parasitisme (Calvez, 2009).

❖ **Les mutualistes symbiotiques** vont contracter une association durable à bénéfices réciproques avec une espèce végétale pour former des mycorhizes ou avec des algues pour former des lichens. Généralement, dans une interaction mutuellement bénéfique, les champignons reçoivent du carbone dérivé de la photosynthèse, tel que des acides gras et des sucres, de la plante associée, tandis qu'ils fournissent à leur plante hôte de l'eau et des nutriments minéraux, en particulier du phosphore (P) et de l'azote (N), en échange. Cet échange de nutriments affecte les processus clés du sol et le cycle des nutriments, ainsi que la santé des plantes, et a donc une forte influence sur le fonctionnement de l'écosystème végétal. Les symbioses mycorhiziennes (AM) et ectomycorhiziennes (ECM) sont les deux types de symbioses les plus courants avec une histoire évolutive et des voies symbiotiques (intracellulaires vs intercellulaires) contrastées (Tedersoo *et al.*, 2020). Outre leur capacité à augmenter l'exploration du milieu extérieur, les champignons vont également contribuer à la phytoprotection contre la sécheresse, les ravageurs et d'autres facteurs de stress abiotiques externes (Begum *et al.*, 2019).

Une autre forme de symbiose fortement répandue sur Terre est représentée par les lichens, qui sont constitués d'une association entre champignon (principalement du phylum Ascomycota) et une cyanobactérie. Dans de nombreuses régions, les lichens contribuent à une proportion considérable de la biomasse globale (Miranda-González et McCune, 2020).

❖ A leur tour, les **commensaux** vont tirer leur matière organique sans réciprocité de leur hôte mais sans nuisance non plus. La levure *Candida albican* est un colonisateur commun des humains, avec entre 20 et 80% de la population mondiale estimée être colonisée de manière asymptomatique à un moment donné (Polvi *et al.*, 2015). La colonisation se produit à plusieurs endroits du corps présentant un large éventail de stress physiologiques pour les champignons colonisateurs, y compris la variation du pH, de la température et des niveaux d'oxygène, ainsi que la limitation des nutriments et les réponses immunitaires de l'hôte (Alves *et al.*, 2020). Cette interaction est neutre pour l'humain et positive pour le champignon.

❖ Dans le règne fongique, **les champignons carnivores** déploient diverses stratégies chimiques pour cibler leurs proies, c'est-à-dire les nématodes, les animaux les plus abondants dans le sol (Van Den Hoogen *et al.*, 2019). Cependant, les champignons de la famille Cordyceps infectent et tuent les insectes et les arthropodes, tels que les fourmis, les sauterelles ou les araignées. Aussi, les champignons du genre *Trichoderma* sont des microphages,

notamment des champignons de culture. Ils contrôlent la pathogénicité par différents mécanismes, notamment : le mycoparasitisme, la sécrétion de métabolites secondaires, la sécrétion d'antibiotiques et la compétition pour les nutriments et l'espace (Zeilinger *et al.*, 2016).

5. Rappel sur les champignons hydrocarbonoclastes

Les micro-organismes hydrocarbonoclastes sont impliqués dans la minéralisation des hydrocarbures dans l'environnement. Ces derniers représentent une riche source de carbone et d'énergie. De nombreuses classes de microorganismes ont été décrites comme aptes à dégrader des hydrocarbures dans les sols, les sédiments et les eaux contaminés par les produits pétroliers. Toutefois, si les bactéries sont les plus actives pour métaboliser les hydrocarbures polyaromatiques (HAPs) (Haritash et Kaushik, 2009), les champignons possèdent certains avantages en raison de leur tolérance aux contaminants hydrocarbonés, de leur capacité de pénétration dans le sol par les réseaux mycéliens et de la colonisation rapide des substrats solides (Batghare *et al.*, 2020). Plus de 100 genres fongiques sont connus pour jouer un rôle important dans la biodégradation des hydrocarbures (Prince, 2005). A titre d'exemples, parmi les champignons appartenant aux genres *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* semblent les plus efficaces (Prenafeta-Bold *et al.*, 2018). Concernant la spéciation, les champignons affiliés aux genres *Cladosporium* et *Aspergillus* font partie de ceux connus pour participer à la dégradation des hydrocarbures aliphatiques tandis que les représentants de *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Mucor* participent à la dégradation des hydrocarbures aromatiques plus récalcitrants (Amend *et al.*, 2019). Des études ont démontrées l'efficacité des champignons filamenteux pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Il s'agit des genres: *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Pencillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (Obire, 2008). Les champignons isolés n'ont généralement pas tous les éléments enzymes nécessaires pour métaboliser des substrats complexes. Mancera-Lopez *et al.* (2008), par exemple, ont démontré que les trois champignons *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sydowii* et *Penicillium funiculosum* peuvent éliminer totalement des hydrocarbures pétroliers des sols pollués. Mishra *et al.* (2019) ont de leur côté, confirmé la biodégradation des hydrocarbures aromatiques par les souches *Aspergillus sp.*, *Rhizophlyctis sp.*, *Candida sp.*, *Exophiala sp.*, *Cunninghamella sp.*, *Anthracophyllum sp.*, *Panaeolus sp.*, *Gilbertella sp.*, *Penicillium sp.*, *Linderina sp.*, *Thannidium sp.* La dégradation microbienne des hydrocarbures

implique des activités enzymatiques complexes telles que celles des monooxygénases, des dioxygénases, des oxydoréductases, des hydroxylases, des déshydrogénases, ...etc (Harms *et al.*, 2011).

Cependant, les levures sont aussi d'excellents microorganismes hydrocarbonoclastes que les bactéries (Farag et Soliman, 2011). Plusieurs espèces de levures, telles que *Candida lipolytica* et *Geotrichum sp.*, *Trichosporon mucoides* et *Yarrowia lipolytica*, dégradent efficacement les composés pétroliers (Beopoulos *et al.*, 2010). Ajoutons aussi les espèces les plus courantes, connues sous le nom de dégradeurs d'hydrocarbures, appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Leucosporidium*, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Trichosporon* et *Yarrowia* (Kashyap *et al.*, 2020).

5.1. Spécificité des champignons hydrocarbonoclastes

Les champignons jouent un rôle vital dans tous les écosystèmes et sont capables de contrôler le flux de nutriments et d'énergie à travers leurs réseaux mycéliens. La structure mycélienne avec sa nature invasive permet l'exploitation d'un grand volume de sites contaminés avec une très grande surface d'échange (Bennett *et al.*, 2002). Les champignons sont connus pour dégrader ou provoquer la détérioration d'une grande variété de matériaux et de composés, processus connus sous le nom de mycodégradation (Singh, 2006). Pour ce faire, ils utilisent différentes stratégies, parmi lesquelles la sécrétion d'enzymes dans l'environnement (Treu et Falandysz, 2017).

❖ **Les enzymes :** les champignons sont équipés d'un système enzymatique bien développé qui leur donne la possibilité de se développer sur une large gamme de substrats naturels et synthétiques. Ils sécrètent différentes enzymes extracellulaires dans leur environnement périphérique et dégradent divers substrats qui peuvent être métabolisés dans leurs cellules (Sardrood *et al.*, 2013). Les enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction assurant par la suite le fonctionnement du métabolisme du champignon. Les enzymes sont produites à l'intérieur de la cellule par diverses combinaisons d'organelles et seront après transportées partout à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule (Fig 40). Une fois présents dans l'environnement extracellulaire, les enzymes interagissent avec leur environnement, offrant la possibilité de catalyser des réactions génétiquement prédéterminées. Les enzymes peuvent rester dans l'environnement extracellulaire ou peuvent être perdues à l'environnement (Wingender *et al.*, 2012). Chez les champignons, parmi les voies d'attaque des HAP, il faut distinguer entre celles existant chez les champignons non lignolytiques (généralement majoritaires) de celles existant chez les autres champignons lignolytiques (connus sous le

terme de pourriture blanche). Au moins deux mécanismes sont appliqués dans la biodégradation des HAPs par les champignons : l'un fait intervenir le système enzymatique du Cytochrome P₄₅₀, (Boonchan *et al.*, 2000) et l'autre utilise les enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine : les lignine peroxydases (LiP), les manganèse peroxydases (MnP), les versatile peroxydases (VP) et les phénol-oxydases ou laccases (Dashtban *et al.*, 2010).

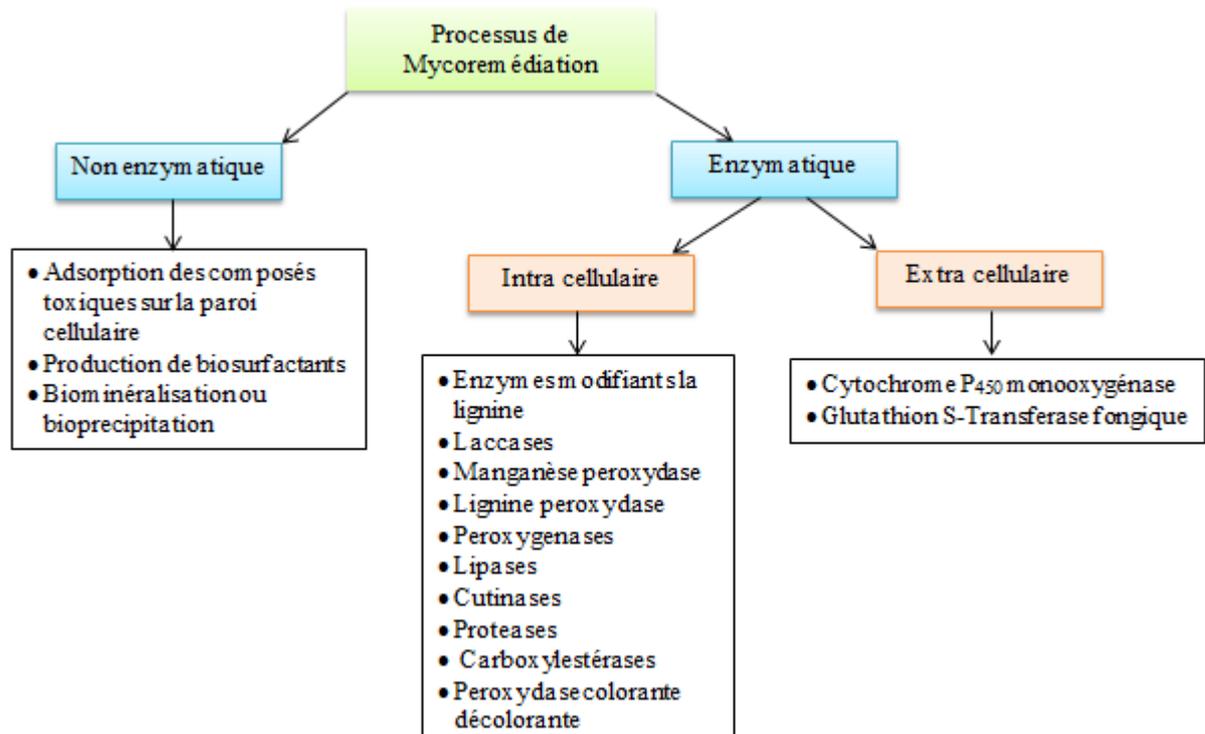


Figure 40. Les mécanismes cellulaires impliqués en mycoremédiation (In Ghosh *et al.*, 2023)

❖ **Biosurfactants / bio tensio-actifs:** c'est un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles (métabolites secondaires) produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures (Araújo *et al.*, 2019). Les champignons, en général, produisent une plus grande quantité de biosurfactants que les bactéries, ce qui peut s'expliquer par la forte teneur en composés amphiphiles des parois cellulaires rigides de ceux-ci (Luft *et al.*, 2020). Grâce à ces polymères, les hydrocarbures sont dégradés au travers de deux mécanismes. Le premier implique une augmentation de la biodisponibilité des hydrocarbures aux microorganismes, en réduisant la tension superficielle du milieu autour de la bactérie ainsi qu'une réduction de la tension interfaciale entre la paroi cellulaire et les molécules d'hydrocarbures. L'autre mécanisme implique, l'interaction entre le biosurfactant et la surface cellulaire, conduisant à des modifications de la membrane facilitant l'adhérence des hydrocarbures (augmentation de l'hydrophobicité), et réduisant l'indice lipopolysaccharidique de la paroi cellulaire sans

endommager la membrane. Ainsi, les biosurfactants permettent la formation d'interactions hydrophobes-hydrophiles (Aparna *et al.*, 2011). La plupart des biosurfactants sont des agents extracellulaires qui stimulent la biodégradation des substrats hydrophobes en améliorant leur biodisponibilité aux microorganismes par l'augmentation de leur surface d'échange et de leur concentration dans la phase aqueuse. Ils sont excrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse (Salihu *et al.*, 2009). Par ailleurs, on peut trouver des biosurfactants intracellulaires (Padmapriya *et al.*, 2013). Cependant, on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres. Les champignons sont connus comme l'un des producteurs prometteurs de différents types de biosurfactants, notamment les xylolipides, les sophorolipides, les hydrophobines, les lipides de cellobiose, les lipides de polyol et les lipides de mannosyl érythritol utilisant diverses ressources renouvelables (Da Silva *et al.*, 2021).

6. Analyses et contexte expérimental

Les échantillons des trois bourbiers analysés consistent en des microcosmes soumis à des conditions particulières sous l'effet de la pollution par les hydrocarbures. L'objectif visé étant de rechercher la nature des populations fongiques résistantes capables de s'adapter et de survivre dans des conditions difficiles, après avoir appréhendé dans le chapitre précédent, les paramètres environnementaux qui vont contrôler la structure et la dynamique des communautés microbiennes. Dans cette partie, nous aurons à utiliser plusieurs approches méthodologiques et diverses techniques d'analyses spécifiques en vue de mettre en valeur la nature du point de vue quantitatif et qualitative de la microflore des biotopes contaminée par les hydrocarbures et d'en dresser un inventaire non exhaustif.

6.1. Echantillonnage et sites de prélèvement

Il s'agit des mêmes échantillons des trois bourbiers pétroliers de Gassi, Zotti et Agreb. Le choix des sites de prélèvement repose sur l'accessibilité au bourbier pétrolier. La préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique comprend plusieurs étapes : la réception des échantillons, l'homogénéisation et la dilution. Les échantillons doivent être en tout temps minutieusement manipulés en respectant l'ensemble des règles d'asepsie de manière à éviter toute contamination.

6.2. Analyse microbiologique

6.2.1. Dénombrement de la mycoflore totale

Cette approche nous a permis de mettre en évidence la flore fongique existante dans les échantillons de sol des borbiers échantillonnés du complexe GEA, à différentes profondeurs.

6.2.2. Milieux de culture

Les milieux de culture choisis pour l'isolement des microorganismes sont purement synthétiques et favorables au développement des microorganismes (Tab 8). C'est un choix déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore. La composition chimique et le pH des milieux sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 8 . Composition des milieux de culture utilisés

Milieu PDA (Pomme de terre Dextrosée ou Potato Dextrose Agar)	
- pomme de terres épluchées.....	200g.
- Dextrose.....	20g.
- Agar	20g
- Eau distillée q.s.p.....	1000ml.
pH 6,8	
Milieu à l'extrait de malt- agar (MEA, d'après Blakeslee, 1915)	
- Extrait de malt.....	20g
- Peptone.....	1g
- Glucose.....	20g
- Agar.....	15g
- Eau distillée.....	1000ml
pH : 5,6	
Milieu Czapek Dox, 1909	
- NaNO ₃	3,0g
- KH ₂ PO ₄	1,0g
- MgSO ₄ , H ₂ O.....	0,5g
- Kcl.....	0,5g
- FeSO ₄ ,7H ₂ O.....	0,01g
- Sucre (morceaux)	30,0g
- Eau de robinet q.s.p.....	1000ml
pH : 6,8	
Milieu Sabouraud	
- Glucose.....	20 g
- Peptone.....	10 g
- Agar.....	20 g
- Eau distillée.....	1000 ml
PH = 6, 5	

Les différents milieux de culture sont additionnés d'antibiotiques sélectifs antibactériens le Chloramphénicol (5 mg/100 ml), afin d'éviter le développement des souches indésirables.

6.2.3. Préparation des dilutions-suspensions

C'est une technique directe qui permet la diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon à analyser, cette dilution a pour but de faciliter le dénombrement et l'isolement des souches en vue de leur purification. Une solution mère est constituée d'un mélange de 1 g de chaque sol séché et tamisé dans un tube à essai stérile contenant 9 ml d'eau distillée stérile. À partir de la solution mère, une série de dilution au dixième (10^{-1} à 10^{-6}) est réalisée. 1ml de la suspension mère est prélevé aseptiquement et versé dans 9ml d'eau distillée stérile ; la suspension obtenue correspond à la dilution 10^{-1} . Cette dernière est homogénéisée par agitation au vortex pendant deux minutes avant de prélever 1 ml que l'on ajoute à 9ml d'eau distillée stérile donnant ainsi la dilution 10^{-2} . On répète ainsi l'opération jusqu'à l'obtention d'une cascade de dilution décimale appropriée.

6.2.3.1. Ensemencement et isolement

La méthode utilisée est celle de l'ensemencement en surface par étalement d'une goutte de la suspension préparée sur le milieu de culture refroidi (Botton et *al*, 1990). Après homogénéisation, 1 ml de chaque suspension-dilution est déposé dans une boîte contenant le milieu de culture stérile puis ensemencées selon la technique. L'expérimentation est réalisée en triplicata. Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 37 °C. Les lectures sont faites après 5 à 7 jours.

6.2.3.2. Purification et conservation

La purification est une étape très délicate qui joue un rôle important dans l'identification des isolats. Les différentes espèces sont d'abord purifiées par plusieurs repiquages successifs monospore ou mono-colonie sur de nouveaux milieux de culture spécifiques ou non. Une fois purifié, chaque isolat est désigné par un numéro de code. La conservation des microorganismes se fait soit à une température de 4°C soit au congélateur à une température de -18°C. Dans les deux cas, aussi bien pour les bactéries que pour les champignons, des disques de gélose prélevés sur le pourtour de la culture purifiée, sont transférés dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, contenant du glycérol à 50% (Kebe et *al.*, 2009). Les souches peuvent être conservé jusqu'à 5 ans à température ambiante. Un repiquage préalable est nécessaire avant la réutilisation de la souche.

6.2.3.3. Lecture et identification

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité d'ordre physiologique en fonction des conditions de culture (nature du milieu de culture utilisé et température d'incubation), mais aussi une grande variabilité génétique. Généralement, l'identification des espèces fongiques repose sur l'observation de critères

morphologiques d'une part (aspect, couleur et taille des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices.

➤ **Examen macroscopique** : s'effectue à l'œil nu et avec la loupe binoculaire. On observe attentivement, dans un endroit bien éclairé, l'aspect du champignon, en vérifiant que toutes les colonies soient identiques, il faut noter :

- **La couleur** : du recto et du verso de la boîte de pétrie ;
- **La consistance de la colonie** : duveteuse, laineuse, cotonneuse, floconneuse, poudreuse,...etc ;
- **La taille** : en mesurant le diamètre de la colonie ;
- **La forme du contour** : régulier, irrégulier, lobé, dentelé, filamenteux,...etc ;
- **La pigmentation** : présence ou absence d'un pigment diffusible dans le milieu ;
- **La surface** : plane, plissée, cérébriforme ;
- **L'exsudat** : présence ou absence de gouttelettes.

➤ **Examen microscopique** : est basé sur les caractères morphologiques, tels les organes de fructifications, types de spores, aspect du thalle, taille, couleur et disposition des pores. Dans des conditions d'asepsie, la préparation du matériel fongique pour l'observation microscopique à l'état frais est réalisée en dilacérant un fragment mycélien dans une goutte d'eau physiologique sur une lame stérile. Recouvrir la préparation à l'aide d'une lamelle et la faire passer légèrement par-dessus la flamme pour éliminer les bulles d'air formées. L'observation est réalisée par microscope optique (LEIKA) aux grossissements : ($\times 10$), ($\times 20$) et ($\times 40$), celle des organes différenciés sera faite à immersion au grossissement ($\times 100$).

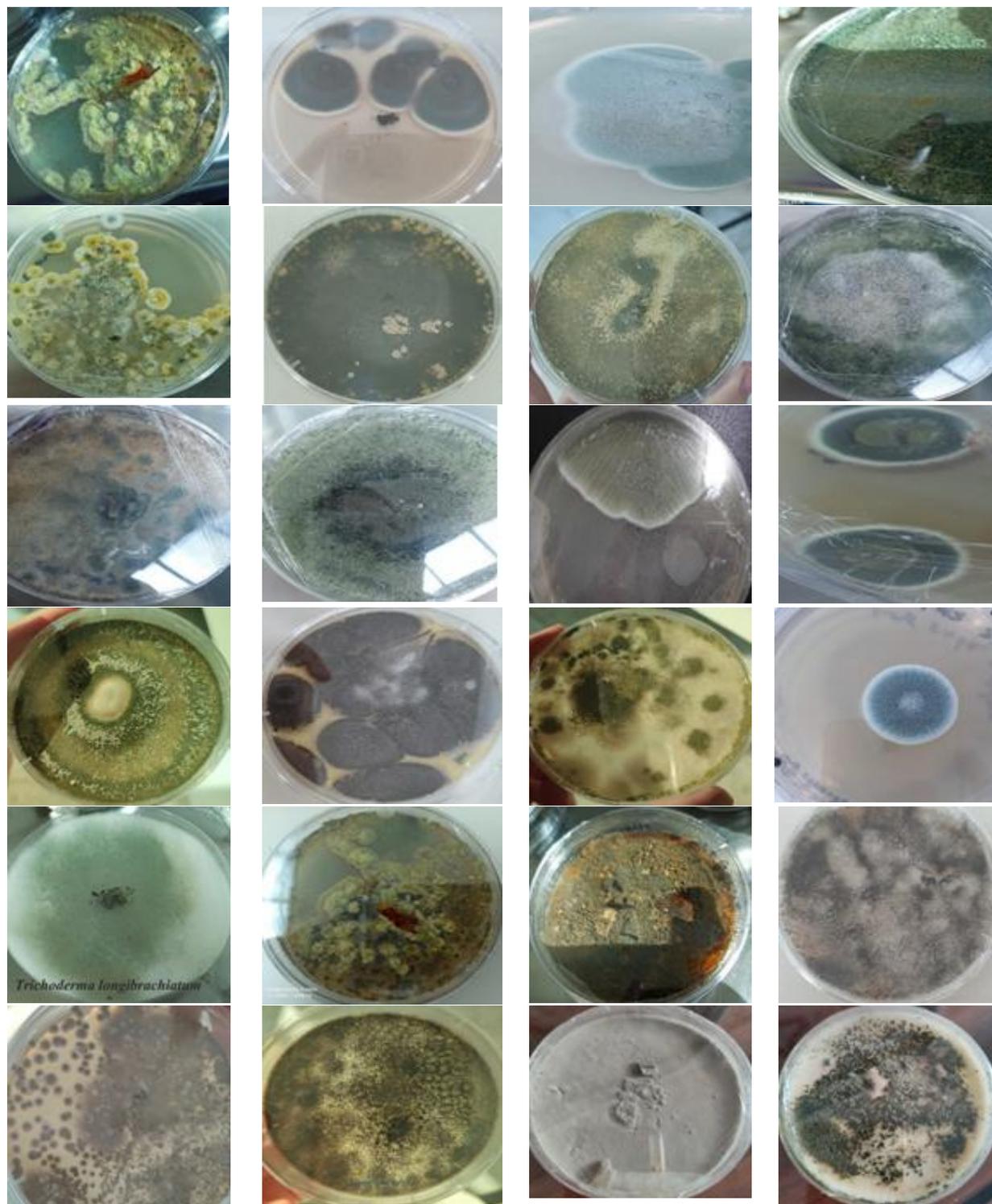
Les souches isolées ont été identifiées en se basant des clés de détermination complètes à partir des caractères cultureux et morphologiques (Botton et *al.*, 1990), (Domch et *al.*, 1980), (Kirk et *al.*, 2008), (Tabuc, 2007), (Wanatabe, 2002) et (Mueller et Schmit, 2007). La systématique adoptée est celle de Kirk et *al.* (2001).

6.2.3.4. Fréquence centésimale

C'est le pourcentage des individus d'une espèce par rapport au total des individus de toutes espèces confondues. Elle est calculée selon la formule suivante : $F = (ni / N) \times 100$ ou : ni: le nombre des individus de l'espèce prise en considération et N: est le nombre total des individus de toutes les espèces présentes confondues.

7. Résultats

L'étude de la mycologie pétrolière, nous a permis de mettre en évidence une flore fongique diversifiée (photo1). Les caractéristiques macroscopiques de quelques souches fongiques distinctives des borbiers pétroliers sont consignées dans l'ensemble des photos suivantes :



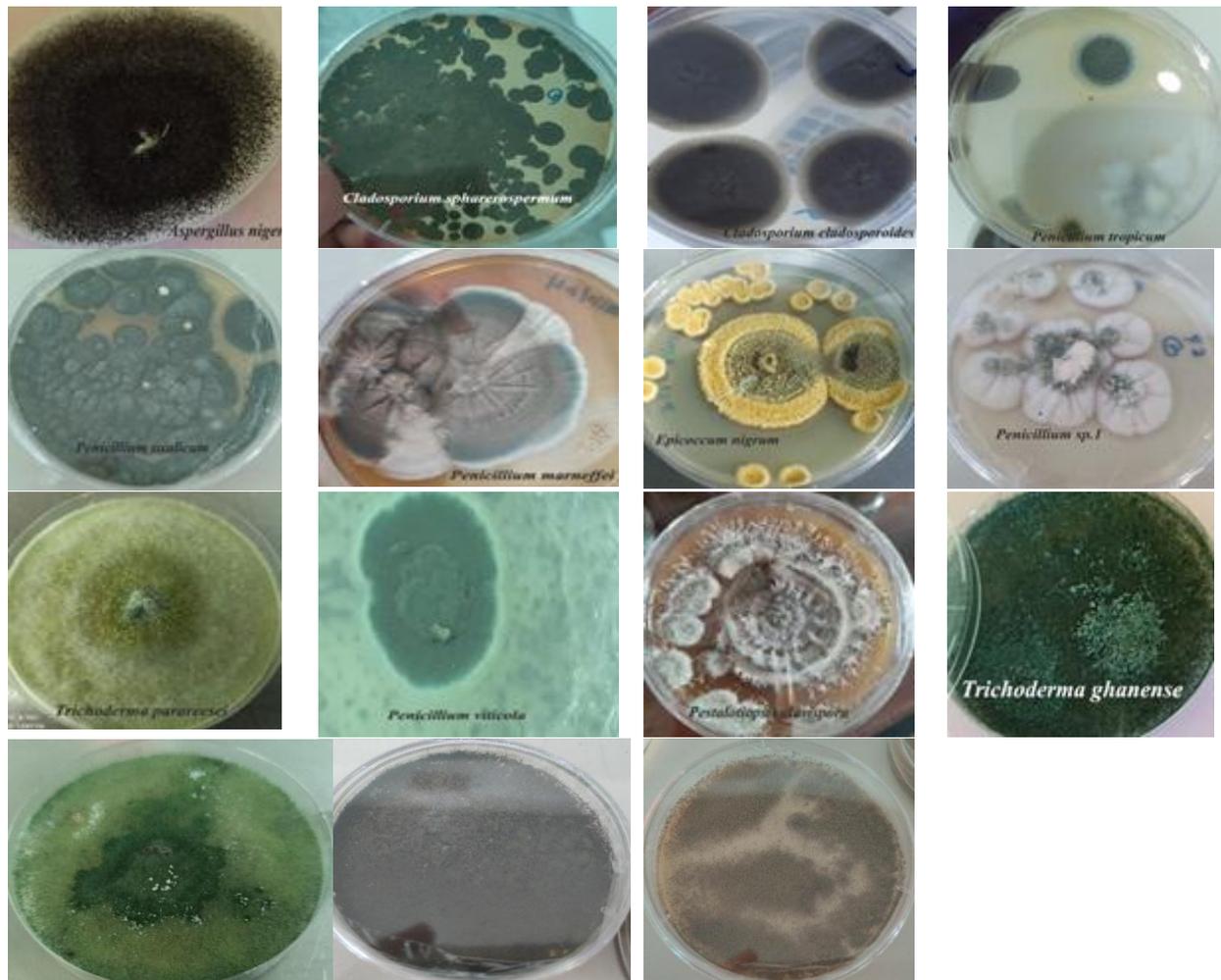


Photo 1. Caractéristiques macroscopiques de quelques isolats fongiques

7.1. Evaluation de la charge fongique isolée et fréquence centésimale

L'évaluation de la microflore fongique des sols des trois bourbiers pétroliers échantillonnés à différentes profondeurs, indique la présence d'une population fongique variée, distribuée d'une manière hétérogène dans l'ensemble des sites de prélèvement. La détermination de la charge fongique est exprimée en UFC (nombre d'Unités Formant Colonies) / ml. Un total de 180 souches fongiques a été isolé dont seulement 69 souches ont été identifiées à partir des échantillons analysés (Tab 9). L'identification microscopique a montré la dominance du genre *Aspergillus* représenté par 24 espèces fongiques, suivi par le genre *Trichoderma* (16 espèces), *Penicillium* (10 espèces), *Cladosporium* (5 espèces), *Alternaria* (3 espèces), *Acremonium*, *Epicoccum*, *Mucor* et *Pestalotiopsis* (2 espèces) et 1 espèce pour *Bipolaris* et *Cladophialophora*. L'identification pour certaines souches fongiques est parvenue au stade « genre » seulement et certaines souches n'ont pas pu être identifiées

Tableau 9. Les souches fongiques isolées et identifiées

N°	Souches	N°	Souches
1	<i>Aspergillus niger</i>	36	<i>T.sp8</i>
2	<i>A.nidulans</i>	37	<i>T. sp9</i>
3	<i>A. glaucus</i>	38	<i>T. sp10</i>
4	<i>A. tubingensis</i>	39	<i>T. sp11</i>
5	<i>A. candidus</i>	40	<i>T.sp12</i>
6	<i>A. fumigatus</i>	41	<i>T. sp13</i>
7	<i>A. brasiliensis</i>	42	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
8	<i>A. flavus</i>	43	<i>C. sphaerospermum</i>
9	<i>A. ochraceus</i>	44	<i>C. sp1</i>
10	<i>A. versicolor</i>	45	<i>C. sp2</i>
11	<i>A. sp1</i>	46	<i>C. sp3</i>
12	<i>A.sp2</i>	47	<i>Penicillium tropicum</i>
13	<i>A.sp3</i>	48	<i>P. oxalicum</i>
14	<i>A.sp4</i>	49	<i>P. marneffeii</i>
15	<i>A. sp5</i>	50	<i>P. viticola</i>
16	<i>A.sp6</i>	51	<i>P. sp1</i>
17	<i>A.sp7</i>	52	<i>P.sp2</i>
18	<i>A.sp8</i>	53	<i>P. sp3</i>
19	<i>A. sp9</i>	54	<i>P.sp4</i>
20	<i>A.sp10</i>	55	<i>P. sp5</i>
21	<i>A.sp11</i>	56	<i>P. sp6</i>
22	<i>A. sp12</i>	57	<i>Alternaria sp1</i>
23	<i>A.sp13</i>	58	<i>Alternaria sp2</i>
24	<i>A.sp14</i>	59	<i>Alternaria sp 3</i>
25	<i>A.sp15</i>	60	<i>Mucor sp1</i>
26	<i>Trichoderma ghanense</i>	61	<i>Mucor sp2</i>
27	<i>T. parareesei</i>	62	<i>Acremonium sp1</i>
28	<i>T. longibrachiatum</i>	63	<i>Acremonium sp2</i>
29	<i>T. sp1</i>	64	<i>Epicoccum nigrum</i>
30	<i>T. sp2</i>	65	<i>E. sp</i>
31	<i>T.sp3</i>	66	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>
32	<i>T. sp4</i>	67	<i>Pestalotiopsis sp</i>
33	<i>T. sp5</i>	68	<i>Bipolaris sp</i>
34	<i>T. sp6</i>	69	<i>Cladophialophora bantiana</i>
35	<i>T. sp7</i>		

L'évaluation quantitative de la charge fongique distribuée verticalement entre E1 (20cm - 70cm), E2 (70cm - 1,20m) et E3 (>1,20m) dans l'ensemble des sites Gassi, Agreb et Zotti, montre une présence variables et diversifiée de champignons microscopiques dans les échantillons du même site (pris à différentes profondeurs) et entre les trois sites aussi (Fig 41). On remarque une présence du genre *Aspergillus* dans tous les sites à divers profondeurs, qui est importante en E1 (75 UFC/ml) du site Zotti. De même pour le genre *Trichoderma* mais avec un nombre moindre (65 UFC/ml). En ce qui concerne *Penicillium*, sa présence est notée en nombre similaire (25 UFC/ml) en E2 Gassi et E1 Zotti ; le *Cladosporium* a enregistré une

valeur de 15 UFC/ml en E2 Agreb. Pour le reste des genres, leur présence est dite faible car elle oscille entre 5 UFC/ml (*Epicoccum*, *Alternaria* et *Bipolaris*), un 4 UFC/ml pour le *Mucor* et un 3 UFC/ml pour *Acremonium* et *Pestalotiopsis*. *Cladophialophora*.

Il apparait que la densité des espèces des deux genres dominants *Aspergillus* et *Trichoderma* est proportionnelle à la profondeur du site Gassi et l'est inversement proportionnelle au site Zotti.

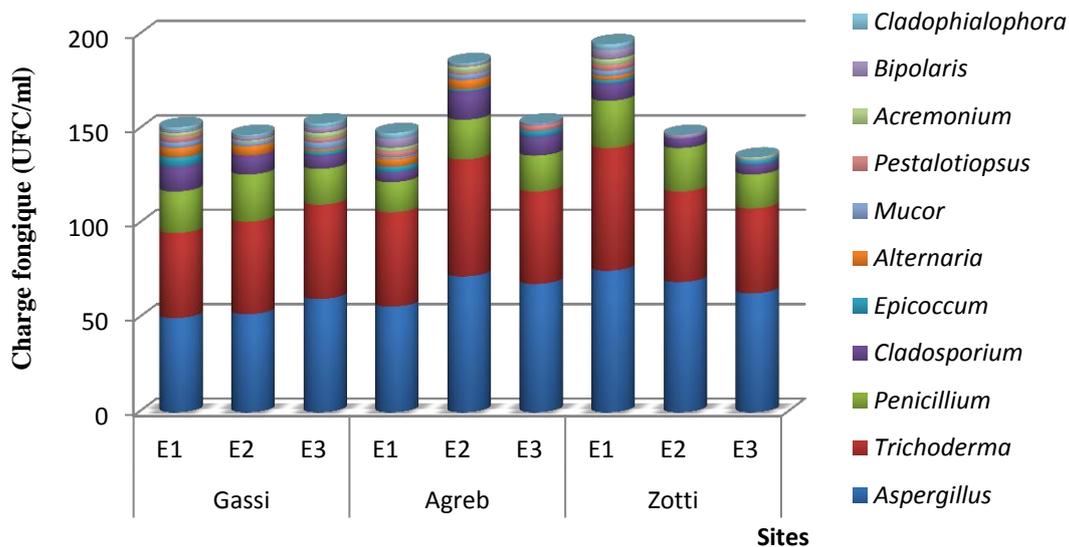


Figure 41. Distribution des genres fongiques selon le gradient de profondeur de chaque site

De ce fait, il en résulte une prédominance du genre *Aspergillus* qui a noté une fréquence d'apparition de 38, 34 et 36% respectivement pour les sites Gassi, Agreb et Zotti (Fig 42) regroupant 24 espèces fongiques différentes. Il s'agit particulièrement d'*A. niger* (31%) la plus dominante, suivie de l'espèce *A. fumigatus* (24%), vient ensuite *A. brasiliensis* (14%), le groupe d'*A. candidus*, *A. glaucus* et *A. nidulans*, présentant la même fréquence d'apparition (5%), et le groupe d'*A. flavus*, *A. ochraeus*, *A. versicolor*, *A. sp1* jusqu'à *A. sp15* avec une fréquence de 2%.

Le genre *Trichoderma* présentant une fréquence d'apparition de 21, 24 et 28% respectivement pour Gassi, Agreb et Zotti (Fig 42), renferme 16 espèces distinctes, dont une prédominance de l'espèce de *T. ghanense* (36%), suivie de *T. parareesei* (18%) et *T. longibrachiatum* (10%) puis viennent le restant des espèces de *T. sp1* jusqu'au *T.sp14* avec la même fréquence d'apparition de 2% pour chacune.

Penicillium montre un pourcentage de 15, 16 et 14% distribué respectivement sur Gassi, Agreb et Zotti (Fig 42). Il regroupe 10 espèces dominées par *P. sp3* et *P. sp4* ; avec

une fréquence d'apparition similaire (40%), suivi par *P. viticola* (30%), *P. oxalicum* et *P. marneffeii* avec 10% chacune et enfin 2% pour les souches de *P. sp1* jusqu'à *P. sp.5*.

Le genre *Cladosporium* exhibe une fréquence d'apparition de 10, 7 et 6% respectivement pour Gassi, Agreb et Zotti ; et renfermant 5 espèces fongiques : *C. sphaerospermum*, *C. cladosporoides* et 3 espèces nommées au rang du genre seulement. Cependant, le genre *Mucor* expose une fréquence d'apparition de 3% pour Gassi, Agreb et Zotti (Fig 42). Il est présenté de 3 espèces. L'*Alternaria* de son côté a une fréquence d'apparition de 2, 5 et 2% respectivement pour les sites étudiés. Ce genre renferme 2 espèces fongiques. Le groupe des genres *Epicoccum*, *Acremonium* et *Bipolaris* a noté un taux similaire de 2% pour les trois sites. Ils sont représentés par une seule espèce. Enfin, les genres *Pestalotiopsis* et *Cladophialophora* représentent le groupe minoritaire avec une fréquence de 1% comprenant une seule espèce pour chaque site.

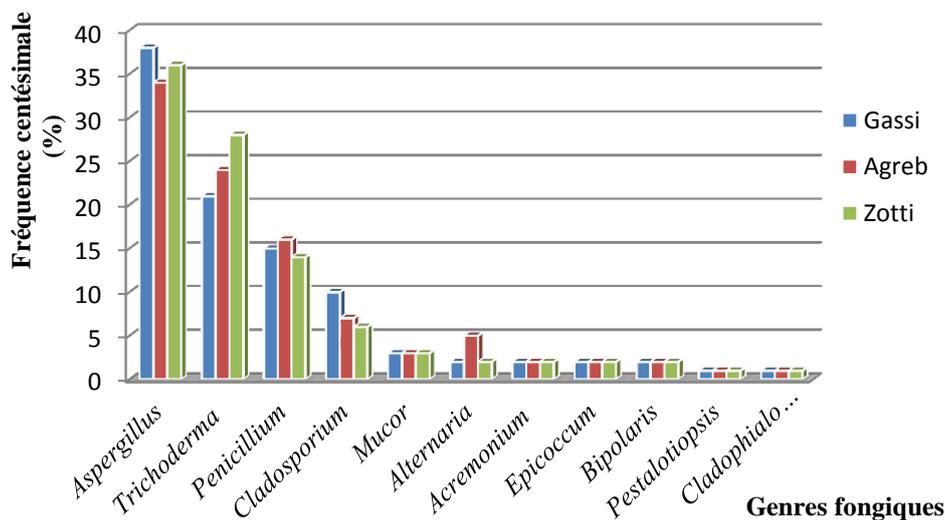


Figure 42. Fréquence des différents taxons isolés des trois sites

Cependant, on peut dire que la méthode de suspension/dilution utilisée a permis d'isoler et de purifier un nombre très important de 180 isolats fongiques, dont seulement 69 espèces fongiques appartenant à 11 genres. Il s'agit des genres fongiques suivants : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Mucor*, *Acremonium*, *Bipolaris* et *Pestalotiopsis* et *Cladophialophora*. La quasi-totalité des souches fongiques identifiées révèle une dominance du genre *Aspergillus* avec une fréquence d'apparition de 40%, suivi de *Trichoderma* (24%) puis *Penicillium* (15%). Apparemment, seul le genre *Cladosporium* a noté une fréquence d'apparition de 5% que les genres *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Acremonium* et *Mucor*, ont enregistré un taux similaire de 2% et

que les genres *Bipolaris* et *Cladophialophora* présentent un taux faible de l'ordre de 1% sur la majorité des échantillons analysés (Fig 43).

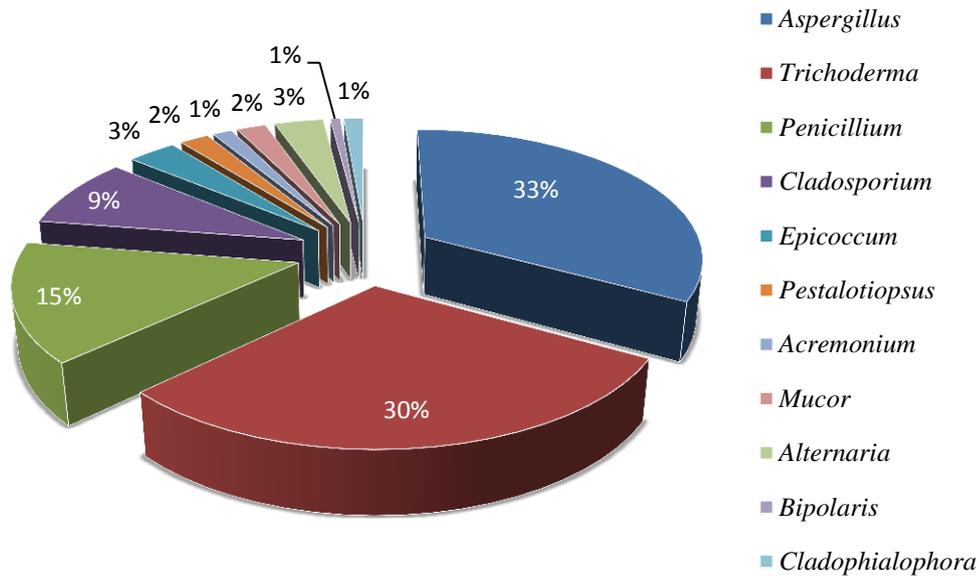


Figure 43. Taux de fréquence des différents genres fongiques isolés des borbiers pétroliers

L'inventaire de la microflore fongique isolée et identifiée des échantillons contaminés par les hydrocarbures, nous a permis de les classer en quatre grandes familles : la classe des Eurotiomycètes contenant les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladophialophora* ; la classe des Sordariomycètes qui englobe les genres *Trichoderma*, *Acremonium* et *Pestalotiopsis* ; la classe des Dothideomycètes contenant les quatre genres de *Cladosporium*, *Aletrnaria*, *Epicoccum* et *Bipolaris* et en dernier la classe des Zygomycètes représentée par le genre *Mucor* (Tab 10).

Tableau 10 : Taxonomie fongique des souches inventoriées

Classe	Ordre	Famille	Genre
Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
			<i>Penicillium</i>
	Chaetothyriales	Herpotrichiellaceae	<i>Cladophialophora</i>
Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>
			<i>Acremonium</i>
	Xylariales	Amphisphaeriaceae	<i>Pestalotiopsis</i>
Dothidiomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
			<i>Epicoccum</i>
			<i>Bipolaris</i>
	Capnodiales	Cladosporiaceae	<i>Cladosporium</i>
Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	<i>Mucor</i>

8. Discussion

Originaires de forage, ou tout type de déblais pétrolier solide ou semi-liquide, un borbier pétrolier représente un milieu complexe, contenant plusieurs types de polluants qui peuvent être même utilisé comme nutriments par des micro-organismes autochtones, comme les champignons hydrocarbonoclastes, ayant de bonnes potentialités pour la biodégradation des produits pétroliers. De nombreux champignons peuvent survivre dans des environnements pollués en fonction de leurs propriétés biochimiques/structurelles intrinsèques et peuvent se développer sur des hydrocarbures.

La population fongique isolée et identifiée des différents borbiers pétroliers à différentes profondeurs, indique une présence variée et une distribution hétérogène sur les sites étudiés. Cependant, dans les milieux pollués, la diversité microbienne diminue et seule des souches capables d'utiliser les hydrocarbures survient et prédominent (Amend *et al.*, 2019). A travers nos résultats, la plupart des souches actives de champignons isolés appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Alternaria* ainsi que des souches du genre *Acremonium*, *Epicoccum Mucor*, *Pestalotiopsis Bipolaris* et *Cladophialophora*. Plusieurs études sur l'isolement des champignons filamenteux dans des environnements contenant du pétrole ou de ses sous-produits ont trouvé une diversité de genres très similaire à celle trouvée dans notre étude. Il s'agit d'études sur des sols contaminés par des hydrocarbures ; notamment ceux d'Ikhajiagbe *et al.* (2017), qui ont pu isolés: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus sp.*, *Tricoderma sp.* et *Penicillium sp.* D'autres études munies par Medaura *et al.* (2021) ont montré la présence de *Penicillium spp.*, *Penicillium crysogenum*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus terreus* , ainsi qu' *Ulocladium spp.*, *Ulocladium atrum* et *Fusarium oxysporum*. De ceci, il apparaît qu'un groupe de champignons apparaît toujours dans les sites contaminés par les hydrocarbures : il s'agit essentiellement d'*Aspergillus* et *Penicillium*. A travers notre étude, on est entièrement en accord avec l'hypothèse émise par Bourceret *et al.* (2016) qui suggère qu'une contamination tend à diminuer l'abondance, la richesse et la diversité microbiennes, tandis qu'une contamination à long terme conduit à la sélection successive de communautés microbiennes uniques et relativement diverses adaptées à des types particuliers de polluants.

Parmi les champignons isolés et identifiés, une attention particulière sera accordée aux espèces des genres *Aspergillus* et *Trichoderma*, qui sont les plus dominants, dans la mesure où ils sont capables de croître dans tous les sites d'échantillonnage. Cette dominance pourrait être attribuée à leur ubiquité. Les *Aspergillus* ont été étudiés pour l'absorption et la

dégradation des hydrocarbures aliphatiques, des chlorophénols et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les hydrocarbures servant de source de carbone pour leur co-métabolisme et leur croissance (Li *et al.*, 2020). *Aspergillus spp.* ont reçu une attention considérable en tant que candidats potentiels pour la dégradation d'un large éventail d'hydrocarbures pétroliers de l'environnement (Zhang *et al.*, 2016). La dominance d'*Aspergillus spp* a été signalée dans des recherches utilisant divers substrat contaminés par les hydrocarbures : *A. niger* (Hassaine et Bordjiba, 2019) des eaux d'industrie pétrolière de Skikda, *A. flavus*, *A. niger* et *Trichoderma sp* (Ikhajiagbe *et al.*, 2017), *Aspergillus sp* et *Penicillium sp* (Abdullah *et al.*, 2020) ainsi que *A. niger*, *A. flavus* et *Penicillium citrinum* (Rodrigues *et al.*, 2020) sont tous isolés de sols contaminés par les hydrocarbures. A ceci s'ajoute une dominance d'*A. flavus*, *A.pseudoglaucus* et *Cladosporium cladosporioides* des eaux du port d'Oran (Maamar *et al.*, 2020) et de sédiments marins (Alwakeel, 2017). *Aspergillus* contient des enzymes uniques, rarement produites par d'autres micro-organismes, certaines d'entre elles aident l'espèce à déjouer les substances toxiques surtout qu'ils sont responsables de la bioremédiation d'un large éventail de substances toxiques (Ghosh *et al.*, 2023). Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, il serait intéressant de repérer de potentiels champignons indigènes des bourbiers qui sont capables de dégrader les hydrocarbures. Une attention particulière sera octroyée à l'espèce *A. niger*, qui a été fréquemment signalée comme champignon filamenteux capable de croître et se nourrir d'hydrocarbures (Jiji et Prabakaran, 2020 ; Al-Dhabaan, 2021). Cependant, il a été rapporté que le genre *Aspergillus* a des capacités de formation de spores supérieures à celles d'autres champignons filamenteux (Abdullahi, 2017). La littérature scientifique témoigne d'une détection naturelle des souches *A. niger*, *A. fumigatus* et *A. flavus* des sols contaminés par les produits pétroliers (Al-Dossary *et al.*, 2020). Par contre, *A. brasiliensis* a une considération au benzo[a]pyrene (Ismail *et al.*, 2020 ; Ismail *et al.*, 2023) et *A. tubingensis*, a la capacité particulière de s'attacher aux surfaces en plastique et de l'utiliser comme unique source de carbone, favorisant ainsi sa dégradation (Kaur *et al.*, 2023).

Par ailleurs, alors que la plupart des travaux déjà publiés montraient la capacité de *Trichoderma* à dégrader le pétrole brut ou les mélanges de HAP (Zafra *et al.*, 2015), notre investigation vient appuyer ce constat par la présence dominante de ce genre parmi nos isolats. Il est à noter que le genre *Trichoderma* est l'un des groupes de champignons les plus répandus dans les écosystèmes, il résiste aux métaux lourds, aux pesticides et aux HAPs (Tripathi *et al.*, 2013). *Penicillium spp.* qui prospèrent dans les sites contaminés ont reçu

beaucoup d'attention en raison de leur fort potentiel de bioremédiation (Al-Hawash *et al.*, 2018). Ce genre fongique est repéré dans tous nos sites échantillonnés.

Malgré la toxicité potentielle des hydrocarbures, de nombreux champignons peuvent prospérer et devenir dominants, bien qu'il ait des changements dans la richesse en espèces. D'autres mycomycètes peuvent survivre avec des fréquences limitées. C'est le cas de certains taxons détectés dans notre étude, à savoir *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Bipolaris* et *Cladophialophora*, représentés par 2 ou 1 espèce fongique et qui ont été signalés auparavant comme possédant un remarquable potentiel à dégrader les hydrocarbures. On cite les travaux de Bakri (2022) sur *Cladosporium*, Romero-Hernández *et al.* (2021) pour *Alternaria sp.*, Sawant et Rodrigues (2020) utilisant *Pestalotiopsis*, Heras-Martínez *et al.* (2022) par leurs études sur *Acremonium*, Abed (2021) en expérimentant *Epicoccum* et *Mucor* et enfin, Baron *et al.* (2021) qui ont aussi remarqué une faible présence de *Bipolaris* et *Cladophialophora*.

Il est maintenant bien établi que la formation, le développement et le fonctionnement des communautés microbiennes du sol sont confrontés à une forte sélection environnementale à différentes échelles géographiques (Makhalanyane *et al.*, 2015), c'est la cas de la variation des communautés fongiques en fonction de la profondeur du sol. Pour cette raison, la recherche sur la diversité et la distribution des champignons du sol dans les habitats contaminés est de la plus haute importance, car elle peut éclairer les mécanismes de survie et d'adaptation des micro-organismes dans des environnements extrêmes. En utilisant des approches dépendantes de la culture, notre étude a révélé divers mycobiotés du sol représentant 180 espèces, répartis de façon hétérogènes en fonction de plusieurs conditions y compris celles de l'environnement du site et des échantillons (du même site pris à différentes profondeurs et entre les trois sites aussi). Les résultats montrent que la profondeur du sol est un facteur puissant affectant la variation des communautés microfongiques (variations de composition, de structure et de diversité). Une augmentation de fréquence de mycobiotés dans un sol pollué par les hydrocarbures a été signalée par Shoukat *et al.* (2021). Ceci peut être dû aux propriétés physiques et physicochimiques du sol à différentes profondeurs qui peuvent conduire à un filtrage environnemental ou à une compétition nutritionnelle (Bahram *et al.*, 2015) et conduire à une structuration des communautés et des assemblages microbiens en fonction de la profondeur. Les champignons sont très compétitifs dans les niches écologiques perturbées car ils sont capables de se propager dans l'environnement via l'élongation des hyphes et d'adopter des stratégies de croissance pour résister aux stress physiques, tels que le

manque de nutriments et d'eau (Peidro-Guzmán *et al.*, 2021). A travers nos résultats, une diminution de la diversité fongique (disparition et/ou diminution du nombre d'espèces) est remarquée tout en allant en profondeur du sol des deux sites Agreb et Zotti à l'inverse du site Gassi qui en favorise une augmentation. Cependant, cette variation dans le temps est lié à plusieurs paramètres tels que : (i) la disponibilité des nutriments dans le temps ; (ii) la récalcitrance et/ou la toxicité de certains hydrocarbures; (iii) les conditions environnementales telles que la température ambiante qui varie d'une période de la journée à l'autre, d'un jour à l'autre et d'une saison à l'autre, influençant ainsi la croissance des microorganismes. L'augmentation de l'abondance des espèces pourrait être aussi associée à la pénétration de très petites spores fongiques produites massivement lors de l'infiltration de l'eau et à leur dépôt principalement dans les couches profondes du sol. Un site de contamination âgée par les hydrocarbures peuvent migrer vers le sol profond (Zhao *et al.*, 2018). C'est ainsi que l'analyse de la diversité microbienne et des modèles d'assemblage dans le sol (de la surface vers la profondeur) peuvent fournir des orientations stratégiques pour les futures pratiques de bioremédiation des sols contaminés.

Il est à préciser que les capacités métaboliques (activité microbienne) sont le principal moteur de la dégradation des polluants dans les sols (Zhu *et al.*, 2019). Des études antérieures ont montré que les activités vitales des micro-organismes nécessitent non seulement de l'énergie mais aussi des nutriments (Wang *et al.*, 2019). D'autres études ont indiqué que les communautés microbiennes semblent être liées à des propriétés édaphiques distinctes (pH du sol, texture, matière organique et teneur en azote et en phosphore) dans un sol non contaminé (Chen *et al.*, 2019 ; Ma *et al.*, 2019 ; Zhu *et al.*, 2019). En ce qui concerne les sols contaminés et selon Hamamura *et al.* (2006), le type de contaminant, les caractéristiques physico-chimiques et biologiques du sol et le temps de pollution pourraient être les facteurs prédominants influençant la structure de la communauté microbienne dans un sol contaminé. Il est à signaler que la plupart des études ont indiqué que la présence de HAP joue un rôle clé dans les changements dans la structure de la communauté microbienne et la fonction écologique (Su *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2014). Les interactions entre des taxons microbiens et la déficience en oxygène en profondeur sont cruciales pour la structure et la dynamique des communautés microbiennes du sol. De plus, la mycoremédiation (dégradation par les champignons) est limitée à la surface ou à la zone aérobie du sol où les mycéliums de champignons peuvent se développer.

Conclusion

Les populations microbiennes jouent un rôle primordial dans le sol (stabilité, nutrition des plantes et transfert de matière organique). Cependant, les polluants pétroliers peuvent changer la composition et la fonction de ces communautés en raison de leurs effets toxiques leur résistance à la biodégradation. La présence des hydrocarbures pétroliers et leurs dérivés entraînent un développement spécifique de microorganismes capables d'assimiler ces hydrocarbures de façon naturelle : ce sont des hydrocarbonoclastes parmi lesquels figurent les champignons.

L'objectif de notre travail était ambitieux puisqu'il visait à dresser une « mycothèque » de la flore fongique autochtone hydrocarbonoclaste peuplant les bourniers pétroliers (sites historiquement contaminés) dans la région de Hassi Messaoud, particulièrement, le complexe Gassi El Agreb (GEA), qui est connu par son industrie pétrochimique polluante. Cette étape nous a permis d'explorer la diversité des espèces fongiques capables de survivre ou de dégrader les hydrocarbures. D'un point de vue densité, il en ressort une distribution hétérogène sur les trois sites échantillonnés (Gassi, Agreb et Zotti), et à travers différentes profondeurs. Parmi 180 espèces fongiques isolées, uniquement 69 ont été identifiées représentées par 11 genres : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Epicoccum Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Bipolaris* et *Cladophialophora*. Malgré la toxicité potentielle des hydrocarbures, de nombreux champignons peuvent d'un côté, prospérer et devenir dominants, c'est le cas d'*Aspergillus* et *Trichoderma*, ce sont des souches dites « prometteuses » dans la décontamination et la réhabilitation des sites. Il est important d'explorer leurs diversités et caractériser leurs réponses à une contamination par le pétrole ou un de ses dérivés. D'un autre côté, des champignons minoritaires, vont diminuer en nombre ou même disparaître. La profondeur du sol régit la distribution et la variation des communautés microfongiques (variations de composition, de structure et de diversité).



*Chapitre .5.
Réhabilitation de
bourbiers pétroliers :
1. Essai de
mycoremediation*



Chapitre .5. Réhabilitation de bourbiers pétroliers :

1. Essai de mycoremediation

En partant du principe que le règlement de l'environnement nécessite des traitements adaptés aux déchets industriels, traiter le déchet est avant tout une action de dépollution. La protection des ressources naturelles est donc au cœur de la gestion des déchets. La région du sud Algérien est caractérisée par une industrie pétrolière très forte, ce qui a résulté des déchets industriels avec des éléments désastreux. Pendant les opérations de forage et de l'exploitation des unités de production et de raffinage, s'entassent de grandes quantités de rejets industriels de type liquide et solide dans des bourbiers pétroliers à ciel ouvert. Ces rejets renferment des produits toxiques principalement, les métaux lourds et les polluants organiques. Ces derniers, représentés essentiellement d'hydrocarbures (mono- Di et poly-aromatiques), constituent un problème environnemental préoccupant dans le monde entier en raison de leur stabilité et durabilité dans l'environnement (Song *et al.*, 2021; Uddin *et al.*, 2021). Ils entraînent des risques potentiels élevés et des impacts dangereux sur les humains et les autres organismes vivants entourant les écosystèmes pollués (Haider *et al.*, 2021).

À partir de l'année 1990, l'Algérie, par le biais de la société SONATRACH, cherchait une stratégie pour dépolluer voire même éliminer les rejets des bourbiers des forages pétroliers (0% décharges). Pour cela, elle a créé des législations nationales pour la protection de son environnement et discernée de grandes dépenses budgétaires pour trouver des solutions envers ces rejets.

Afin de mettre un terme à la dégradation des polluants et, si possible, de réparer les dommages causés à notre « environnement », un certain nombre de concepts d'interventions correctives sont apparus: réaménagement, revégétalisation, reconstitution, réclamation, restauration, réhabilitation, ...etc. De ce fait, nous assistons depuis deux décennies à l'évolution des techniques de dépollution avec le passage progressif des techniques dites traditionnelles (tous les procédés physico-chimiques et mécaniques utilisés pour la dépollution des sites) aux techniques de remédiation biologique (biotechniques) (Huang *et al.*, 2021 ; Kang *et al.*, 2020). Les techniques de bioremédiation comprennent la phytoremédiation (rhizodégradation, phytoextraction, phytovolatilisation, phytodégradation, rhizofiltration et rhizostabilisation), la mycoremediation, la remédiation bactérienne et la phycoremediation. Ces techniques biologiques de dépollution ont été abondamment utilisées depuis longtemps dans les systèmes clos tels que les bassins de décantation, les systèmes de

dépollution aérobie des eaux usées ou les digesteurs anaérobies (Roger et Jacq, 2000). Des études ont précisé que la bioremédiation est la technique la plus efficace pour convertir les polluants sous une forme moins toxique et moins mobile ou minéraliser les hydrocarbures en H₂O, CO₂ et biomasse microbienne (Imam *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2020). La remédiation et le suivi du site sont basés sur l'évaluation des risques; la pollution est traitée sur la base d'un cahier des charges défini en accord avec les pouvoirs publics. Cependant, certaines difficultés techniques, problèmes théoriques, coûts et/ou efficacité de la remédiation limitent l'application à grande échelle (Li et Zhou, 2019).

1. La réhabilitation : concepts généraux

Une réhabilitation (mise en état) est l'ensemble d'opérations (réaménagement, traitement de dépollution, confinement, résorption des déchets, contrôles institutionnels...) effectuées en vue de rendre un site apte à un usage donné. Dans une perspective écologique, la réhabilitation vise à redonner à un site dégradé, contaminé ou complètement artificialisé certaines caractéristiques naturelles minimales (Limoges *et al.*, 2013). Les termes « restauration » et « réhabilitation » sont utilisés comme synonymes. Dans une optique, réhabiliter un écosystème consiste à lui permettre de retrouver ses fonctions essentielles (y compris la productivité) grâce à une intervention forte mais limitée dans le temps ("démarrage forcé"). Dans une autre, la restauration est une amélioration de la qualité, assainissement, nettoyage ou autre gestion d'un sol, d'une eau souterraine ou des sédiments afin de permettre l'utilisation convenable d'un lieu. Tous deux, restauration et réhabilitation ont comme objectif commun de rétablir des écosystèmes autonomes, caractérisés par l'existence d'une dynamique dans les communautés végétales et animales et par leur capacité à réparer eux-mêmes les méfaits de perturbations modérées (résilience). Cependant, restaurer un écosystème consiste à rétablir les fonctions qu'il a perdues, à remplacer des fonctions superflues ou à le remplacer entièrement par un autre écosystème qui remplira les fonctions visées. La réhabilitation ne concerne que certaines fonctions et/ou une ou plusieurs espèces sélectionnées. On aboutit alors à un écosystème « simplifié » par rapport à l'écosystème initial. Au cours de la réhabilitation, la réaffectation décrit ce qui se passe lorsqu'un écosystème est transformé par l'homme et qu'un nouvel usage en est fait. Le nouvel état est éventuellement sans relation de structure ou de fonctionnement avec l'écosystème qui préexistait. La réaffectation peut être appliquée à tous les stades de développement d'un écosystème et même, bien entendu, à un écosystème non encore perturbé. L'auto-restauration des sols peut prendre une longue période, de 10 à 30 ans ou plus, selon le type de sol (Lifshits *et al.*, 2018). Toute une gamme de

technologies existe pour réhabiliter un terrain contaminé. Le choix d'un traitement dépend, entre autres, des facteurs économiques et géographiques. Les traitements peuvent détruire les contaminants ou les rendre immobiles. Parfois, un prétraitement est utilisé pour réduire le volume de sol à traiter. D'abord, les techniques de traitement sont séparées en prétraitement, destruction de contaminant et immobilisation. Les plus courantes de ces technologies sont actuellement classées en mesures physiques, physico-chimiques, chimiques et biologiques (Tab 11). Parfois, des mesures mécaniques sont utilisées. En fonction du mécanisme d'action sur le sol, les mesures peuvent être subdivisées davantage.

Tableau 11 . Classification des méthodes de remédiation des sols (In Stepanova *et al.*, 2022)

Méthodes		Mode d'action (Exemples)
Mécanique	Mécanique	Excavation mécanique
Physique	Hydrodynamique	Rinçage, filtrage
	Aérodynamique	Aspiration, purge, extraction
	Thermique	Thermo-osmose
	Electrique	Blanchiment électrochimique, osmose électrique, électrophorèse, électromigration, électrodialyse
	Electromagnétique	Séparation magnétique
Physico-chimique	Volatilisation	Élimination des produits pétroliers volatils
	Dissolution, diffusion	Dissolution, lessivage, diffusio-phorèse
	Échange d'ion	
	Adsorption	
Chimique	Hydrolyse	
	Photolyse	
	Neutralisation	Lixiviation des réactifs
	Oxydation	Oxydation
Biologique	Phytoremédiation	Phytodégradation, rhizodégradation, phytovolatilization, phytoextraction, rhizofiltration, phytostabilization
	Bioremédiation	Oxydation, biosurfactant

Les stratégies de réhabilitation des sols contaminés par le pétrole sont influencées par l'ampleur du déversement particulier, par le paysage et la zone géographique du déversement, et par les mesures de nettoyage disponibles. Cependant, de nombreux chercheurs notent que les mesures traditionnelles de remise en culture utilisées pour la restauration des écosystèmes pollués par le pétrole présentent un certain nombre de défauts ; en particulier, ils ne facilitent pas toujours la restauration des sols et de la flore et nuisent souvent durablement à l'environnement (García-Villacís *et al.*, 2021). La remise en culture du sol réduit les taux de

décomposition du pétrole. L'enlèvement d'une couche de sol contaminée produit de nouvelles taches de pollution secondaire. Il est donc conseillé de terminer la remise en culture des sols par l'application de méthodes d'assainissement biologique, c'est-à-dire par la bioremédiation et la phytoremédiation.

2. La bioremédiation (biodégradation stimulée)

La bioremédiation fait référence à l'élimination, la destruction, l'immobilisation, la minéralisation ou la transformation des contaminants du sol avec l'utilisation de plantes, de protozoaires, de champignons et de microalgues (Akerman-Sanchez et Rojas-Jimenez, 2021 ; Ajona et Vasanthi, 2021) et de leurs produits en présence de conditions optimales. Elle est principalement appliquée à des matrices telles que le sol, les boues et plusieurs types d'eaux résiduelles (Zhang *et al.*, 2018). De plus, les techniques de bioremédiation peuvent être divisées en trois catégories selon l'endroit où le traitement de remédiation est effectué, à savoir *in situ*, *ex situ* ou *sur site*.

La microbiologie de la dégradation des hydrocarbures est un domaine de recherche en plein développement. C'est à la fois le devenir dans l'environnement de ces composés ubiquistes, génotoxiques et persistants ; et l'utilisation de procédés microbiologiques de dépollution qui motivent cet intérêt. La biodégradation exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Les systèmes biologiques des microbes et leur fort potentiel d'adaptation font d'eux un choix idéal pour l'élimination des polluants d'un environnement (Hussain *et al.*, 2022). Le principe de la biodégradation se réfère au processus de dégradation des composés carbonés par des microorganismes, dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie (Wang *et al.*, 2019). Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutées au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans un écosystème pollué (bioaugmentation). Les réactions initiales de transformation des hydrocarbures font intervenir une grande diversité d'enzymes spécifiques (Khan *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020). Les micro-organismes peuvent dégrader les HAP en produisant trois produits primaires. (a) des enzymes : la monooxygénase et la dioxygénase sont les enzymes essentielles à la décomposition des hydrocarbures, et leur résultat est l'alcool (Eze *et al.*, 2021) ; (b) des biosurfactants : les micro-organismes créent des matériaux biologiques avec des groupes hydrophiles et hydrophobes à la surface des cellules.

Ils sont classés en fonction de leur structure chimique en glycolipides, phospholipides, acides gras et lipopolysaccharides. En émulsifiant les hydrocarbures adsorbés et en les libérant dans la matière organique du sol, les biosurfactants améliorent le taux de transfert de masse en augmentant la concentration en eau des molécules hydrophobes. Ils contribuent à l'accélération de la biodégradation (Gayathiri *et al.*, 2022); (c) de nombreuses bactéries peuvent utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie pour produire des acides et des solvants tels que l'acétone, l'éther, le benzène et l'acide oxaloacétique, qui dissolvent les hydrocarbures pétroliers (Mousavi *et al.*, 2020). Habituellement, les hydrocarbures peuvent être sélectivement métabolisés par une souche individuelle de microorganisme ou un consortium de souches microbiennes appartenant à des genres identiques ou différents (Varjani *et al.*, 2015). Cependant, il a été démontré que les consortiums sont plus efficaces que les cultures individuelles pour métaboliser/dégrader des groupements complets d'hydrocarbures (Varjani, 2017).

3. La Mycoremediation : généralités

C'est une technologie active récente de bioremédiation des sols, des sédiments et des eaux contaminés par le biais de divers micromycètes et macromycètes. Autrement dit, c'est une dégradation ou transformation fongique de composés organiques dangereux (Kumar *et al.*, 2021). Elle en fait partie des techniques efficaces et respectueuses de l'environnement en raison de sa simplicité et de son processus de mise en œuvre actif (Kumar et Dwivedi, 2021). La mycodégradation et la mycodétérioration sont deux approches dans lesquelles les champignons dégradent un large éventail de contaminants (Singh *et al.*, 2021). La mycomédiation, quant à elle, est l'utilisation de champignons dans l'écosystème pour dégrader les déchets et les contaminants. Cette technologie est très efficace au sujet d'élimination des polluants compte tenu de la polyvalence des champignons en termes d'écologie, de modes nutritionnels, d'adaptabilité, de morphologie, de physiologie et de métabolisme. Il est à noter que grâce aux relations symbiotiques avec des plantes, la mise en œuvre de la mycoremédiation facilite également la phytoremédiation (Ali *et al.*, 2017).

Les champignons sont le groupe le plus diversifié d'organismes hétérotrophes et le deuxième après les insectes sur Terre (Biedermann et Vega, 2020). Par leur hétérotrophie, ils se nourrissent par absorption (Jain et Pandey, 2021). Ce phylum a déjà été décrit amplement dans le chapitre précédent. Divers caractéristiques rendent les champignons attractifs pour une utilisation dans la mycoremédiation : (1) la capacité de décomposer et de minéraliser une large gamme de composés aromatiques persistants qui sont structurellement similaires aux

composés formés lors de la biosynthèse ou de la biodégradation de la lignine ; (2) la large distribution dans la nature; (3) la capacité de se développer sur des substrats naturels bon marché qui peuvent facilement être introduits dans un sol pollué ; (4) la croissance sous forme d'hyphes, leur permettant d'atteindre des polluants inaccessibles aux bactéries ; (5) la production d'un puissant système enzymatique oxydatif non spécifique extracellulaire ; (6) la présence de médiateurs de faible poids moléculaire qui peuvent augmenter la sensibilité des polluants à l'attaque enzymatique ; (7) la production de formes constitutives d'enzymes ligninolytiques indépendamment de la présence de polluants, qui empêchent l'adaptation de l'organisme aux conditions de contamination (Treu, et Falandysz, 2017).

4.1. Mécanismes de Mycoremediation

La mycoremédiation est régie par de nombreux facteurs cellulaires, moléculaires et métaboliques. Le transport actif ou la diffusion passive sont deux méthodes par lesquelles la cellule du champignon peut absorber les polluants (bioabsorption). Ces derniers sont par la suite biotransformés, séquestrés, etc., dans la cellule pour minimiser leurs toxicités (Fig 44). Les champignons possèdent une machinerie enzymatique non spécifiques et complexes et présentent donc de meilleures capacités de dégradation que les bactéries ou les algues (Sen *et al.*, 2023). De nombreuses espèces de champignons synthétisent des enzymes ligninolytiques extracellulaires, qui ont une faible spécificité de substrat et peuvent donc être utilisées dans les processus de biodégradation, biosorption et bioconversion de composés aromatiques qui ont une similitude structurelle avec la lignine (Tkaczyk et Kowalska, 2020). Les champignons de la pourriture blanche produisent des enzymes oxydoréductases telles que la laccase, la lignine peroxydase (LiP) et la manganèse peroxydase (MnP). Ces enzymes peuvent dégrader les polluants toxiques dans les eaux usées tels que les HAPs, (Yanto *et al.*, 2019).

Cependant, la dégradation la plus complète et la plus rapide des polluants organiques se produit dans des conditions aérobies (Raju et Scalvenzi, 2017). Les processus de dégradation anaérobie des hydrocarbures pétroliers peuvent avoir lieu in situ, dans des environnements profondément contaminés, tels que les sols, les sédiments et les aquifères (Gray *et al.*, 2010), ou peuvent être réalisés ex situ à l'aide de différents types de bioréacteurs.

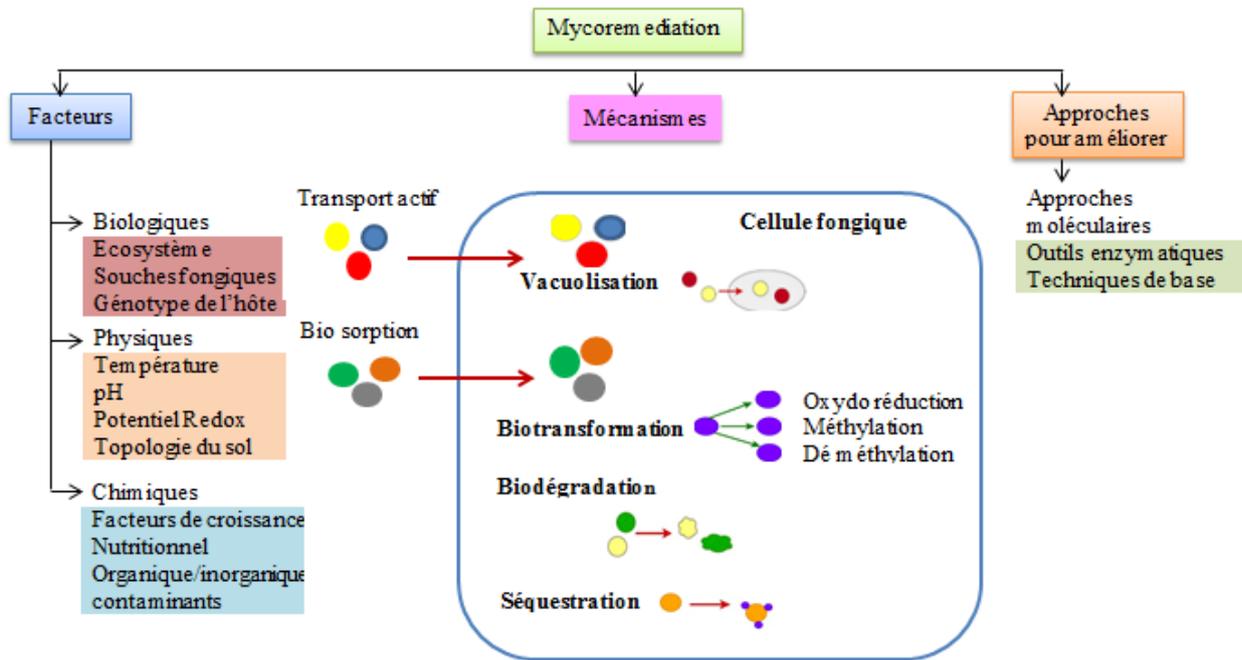


Figure 44. Les mécanismes de mycomédiation cellulaire (Adapté et modifié de Kumar *et al.*, 2021)

4.2. Les agents de la mycoremédiation des hydrocarbures

4.2.1. Les champignons de la pourriture du bois

Les champignons de la pourriture du bois sont classés comme *Basidiomycota* (Basidiomycètes). Ces espèces fongiques jouent un rôle essentiel dans la bioremédiation des contaminants organiques en plus de leur rôle dans l'enracinement du bois. Par conséquent, ils ont une grande flexibilité et capacité de dégrader les tissus. Les espèces de champignons dégradant le bois se distinguent comme des concurrents puissants comme *Trametes versicolor*, *Phanerochaete sp.*, *Pleurotus ssp.*, etc., et des concurrents faibles comme *Ganoderma applanatum* et *Dichomitus squalens* en fonction de leur capacité à coloniser de nouveaux environnements. Selon leur mode d'action dans les tissus du bois, ils peuvent être classés en champignons de la pourriture brune et en champignons de la pourriture blanche. Il a été démontré que de nombreux champignons dégradent les HAPs, notamment *Agrocybe dura*, *A. praecox*, *Gymnopilus luteofolius*, *Irpex lacteus*, *Mycenagaleri culata*, *Trametes ochracea*, *Stropharia aeruginosa*, *Stropharia rugosoannulata*, *Phanerochaete velutina* et *Physisporinus rivulosus*. Certains champignons dits de la pourriture blanche (*Polyporus sp.* et *Phanaerochaete sp.*) produisent, les laccases pour faciliter la dégradation totale des produits pétroliers et des HAPs (Kristanti *et al.*, 2011). Selon Zafra *et al.* (2016), le consortium fongique *Aspergillus nomius*, *Rhizomucor variabilis*, *Aspergillus flavus* et *Trichoderma*

asperellum a joué un rôle vital dans la dégradation du pyrène et du benzo [α] pyrène phénanthrène. Plusieurs études ont montré qu'au moins 30% des processus de mycoremédiation impliquent des champignons de la pourriture blanche (Esther *et al.*, 2004).

4.2.2. Les champignons endophytes

Les plantes ont un grand potentiel pour former de grands microbiomes végétaux pour de nombreux micro-organismes, y compris les champignons (Dhyani *et al.*, 2019). Les groupes fongiques endophytes peuvent coloniser les plantes sans nuire à l'hôte ou à eux-mêmes (Rout, 2014). On les trouve en particulier dans les tissus végétaux, y compris les faisceaux vasculaires, les espaces apoplastiques, les racines et cellules corticales mortes et les jeunes bourgeons. Ils ont généré de nombreux groupes d'enzymes, dont la lipase et la cellulase, la peroxydase et la protéase, pour la détérioration des produits chimiques environnementaux, tels que les produits pétrochimiques, les HAPs, les pesticides, les polychlorobiphényles, le polyester polyuréthane, etc., et la biotransformation des métaux lourds à l'état réduit (Purohit *et al.*, 2018). De cette façon, ils améliorent la capacité et la flexibilité de la tolérance aux toxines et autres poisons, y compris les métaux lourds. Par conséquent, ces groupes sont des outils précieux pour la bioremédiation (Hossain *et al.*, 2012). De plus, le champignon endophyte *Phomopsis liquidambari*, utilise l'acide phénolique 4-hydroxybenzoïque, comme seule source de carbone pour dégrader des HAPs en culture pure. Mohsenzadeh *et al.* (2010) ont analysé sept espèces végétales de zones polluées par les hydrocarbures. De plus, plusieurs souches endophytes de *Fusarium*, à savoir *Fusarium acuminatum*, *Fusarium reticulatum* et *Fusarium equiseti* ont également un potentiel important de dégradation des hydrocarbures.

4.2.3. Les mycorhizes

Les interactions mycorhiziennes entre les champignons et les racines des plantes se présentent sous diverses formes, notamment ectomycorhize, mycorhize d'orchidée, mycorhize éricoïde, mycorhize monotropeïde, mycorhize arbutoïde, mycorhize arbusculaire et ectendomycorhize. La littérature scientifique explique l'importance des champignons mycorhiziens dans la structure du sol, l'absorption des macro et micro nutriments nécessaires, développement des pousses et racines, la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques, et la réalisation de caractéristiques à valeur ornementale, telles que le diamètre de la fleur, le nombre de pétales, etc (Huang *et al.*, 2019).

La plante hôte profite également du champignon en maintenant une zone contaminée autour d'elle et en non seulement tolérant mais métabolisant de nombreux produits pétroliers, des HAP et des pesticides aromatiques chlorés, comme l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

(2,4-D) et l'atrazine par dégradation enzymatique (John, 2013). Les exsudats racinaires des plantes sont composés de glucides, d'acides organiques, d'acides aminés, de composés phénoliques, de mucilage, de vitamines et de stérols qui agissent comme sources de carbone et d'énergie pour les micro-organismes de la rhizosphère, améliorant ainsi la biomasse et l'activité microbiennes dans les sols pollués par les HAPs (Kadri *et al.*, 2017).

4.2.4. Les levures

Farag et Soliman (2011), ont rapporté que les levures dégradent mieux le pétrole brut que les bactéries. En effet, ce groupe fongique peut dégrader les HAPs comme le Benzo(a)Pyrène (B(a)P), le chrysène et l'Indeno[1,2,3-cd]pyrene, etc., individuellement ou en consortium. Le principal mécanisme biocatalytique derrière une telle performance est la production de NADPH-cytochrome C réductase et de dioxygénase (Padilla-Garfias *et al.*, 2022). Cette voie métabolique enzymatique de dégradation du B(a)P, a été signalé chez *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630, *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Padilla-Garfias *et al.*, 2022). La levure *Moesziomyces* s'est récemment révélée être un dégradeur efficace du tétradécane (Mikolasch *et al.*, 2019) et du carburant diesel (Martin-Sanchez *et al.*, 2018). En outre, les levures qui sont connus comme bons dégradeurs d'hydrocarbures, appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, *Leucosporidium*, *Lodderomyces*, *Pichia*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Stephanoascus*, *Trichosporon* et *Yarrowia* (Deeba *et al.*, 2018 ; Kashyap *et al.*, 2020).

5. Limites et défis de mycoremediation

L'hétérogénéité de la communauté fongique, le degré d'adaptabilité, la sensibilité aux contaminants, les propriétés structurelles de la molécule, les propriétés de transport cellulaire, la barrière chimique dans les milieux de croissance et l'environnement propice sont les facteurs clés qui décident de l'efficacité de la mycoremediation des HAPs (Ali *et al.*, 2022). Plusieurs variables reconnues influencent la biodégradation des hydrocarbures pétroliers. L'existence de micro-organismes dotés de capacités métaboliques suffisantes est un besoin crucial. Le taux idéal de croissance et de biodégradation des hydrocarbures peut être amélioré lorsque ces micro-organismes sont présents, mais seulement s'il y a une concentration suffisante de nutriments et d'oxygène et que le pH est optimal. Les propriétés physiques et chimiques du pétrole et les facteurs environnementaux tels que la température, les nutriments, l'oxygène, la biodégradabilité, la photooxydation, la biodisponibilité, l'humidité du sol, l'acidité et l'alcalinité du sol, la disponibilité de l'eau et les effets de l'absorption du pétrole dans le milieu sont décisifs pour le succès de la biodiversité (Meckenstock *et al.*, 2016). De

plus, la température, la disponibilité des nutriments, la teneur en humidité et la demande en oxygène peuvent influencer le processus de biodégradation dans le sol (Okolafor et Ekhaïse , 2022).

5.1. Nature et concentration des hydrocarbures

Les boues de forage pétrolier, en tant que mélange complexe, contiennent différents types d'hydrocarbures, dont le processus de dégradation est variable (Gielnik *et al.*, 2019). Ce dernier dépend de la concentration, de la composition et de la nature des hydrocarbures présents dans l'environnement. La biodégradation des hydrocarbures débute par les composés simples et se termine par les composés complexes dans l'ordre suivant : n-alcanes > alcanes ramifiés > aromatiques de faible poids moléculaire > composés aromatiques de haut poids moléculaire > asphaltènes (Imam *et al.*, 2019). Cependant, la composition d'un pétrole détermine sa toxicité et son potentiel de dégradation. Aussi, la composition et la concentration d'un produit pétrolier déterminent la façon dont les communautés microbiennes s'adaptent à la pollution. Les concentrations des hydrocarbures, de leur côté, affectent les taux d'absorption, de transformation et de minéralisation microbienne. Des concentrations extrêmement élevées sont connues pour être toxiques et influencent négativement le taux de croissance et la production de biomasse spécifique et nécessitent alors une longue durée de traitement (Martinez *et al.*, 2019).

5.2. Structure et nature du milieu récepteur

Dans les sols à grains fins, les hydrocarbures sont capables d'induire des changements dans la texture, la granulométrie, la forme et la porosité des particules dans une mesure telle qu'ils réduisent considérablement à la fois le nombre de micropores et la surface globale, tandis que les caractéristiques des macropores restent à peu près les mêmes. Dans le cas de sols à grains grossiers, la contamination peut créer des particules recouvertes d'hydrocarbures et remplir à la fois les macropores et les micropores (Izdebska-Mucha *et al.*, 2011). Étant donné que les interactions physiques entre particules sont dominantes dans un tel type de sol, les caractéristiques telles que la texture, la porosité, le caractère cireux et la cohésion sont les plus affectées (Rajabi et Sharifipour, 2019). Les hydrocarbures sont des polluants typiques du sol qui entraînent une altération de la taille des grains, de la porosité et de la capacité de rétention d'eau du sol et affectent négativement la diversité/population microbiennes. Des changements importants dans la perméabilité, le volume, la plasticité, etc., sont également provoqués, entraînant une mauvaise qualité des sols contaminés. (Sakshi *et al.*, 2019). Un

déversement de pétrole submerge les particules du sol, ce qui bloque à son tour la diffusion de l'air dans ses pores (Sutton *et al.*, 2013).

5.3. Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter, positivement ou négativement, le biorestauration fongique, il s'agit essentiellement de la température, pH, salinité, ressources en oxygène, pression et des rayonnements UV (Rangel *et al.*, 2018). Ces facteurs, contribuent généralement de manière significative à la structuration des communautés microbiennes.

La température a un effet significatif sur la vitesse de croissance microbienne, l'activité des enzymes, la chimie des polluants, la physiologie et diversité de la communauté responsable des processus de dégradation (Koshlaf et Ball, 2017). En fonction de la température, la dégradation des hydrocarbures peut se produire dans trois conditions: psychrophile, mésophile et thermophile. En général, la plupart des champignons sont mésophiles en termes d'isolement, de croissance et de reproduction. La température est essentielle pour les besoins de croissance de certains champignons avec le pétrole comme substrat. Comme la température augmente, la solubilité, la biodisponibilité, la diffusion et les activités enzymatique des micro-organismes augmentent également (Singh et Chandra, 2014), alors que, à une température plus élevée (au-dessus de 40°C), la solubilité de l'oxygène diminue, et l'activité métabolique des microorganismes aérobies diminue; la membrane cellulaire devient plus sensible à la toxicité des hydrocarbures et réduit par conséquent le taux de biodégradation des hydrocarbures (Sihag *et al.*, 2014). À l'inverse, à des températures plus basses, la viscosité de l'hydrocarbure augmente; sa volatilité diminue; sa solubilité diminue; sa toxicité augmente; les taux d'activité enzymatique diminuent; et donc là est un retard de la biodégradation microbienne (Dindar *et al.*, 2016).

L'étape initiale de la dégradation des hydrocarbures par les champignons inclut l'oxydation des hydrocarbures par l'intermédiaire des hydroxylases et dioxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable. En anaérobie, l'oxygène est remplacé par d'autres types d'accepteurs d'électrons mais la biodégradation est particulièrement lente (ex : sédiments). Dans ce cas, les hydrocarbures, peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons nécessaires aux voies métaboliques et parfois comme seule source de carbone (Liu *et al.*, 2020). En effet, la dégradation fongique des hydrocarbures en conditions aérobies donne de meilleurs résultats que la dégradation en conditions anaérobies (Abdel-shafy et Mansour,

2019). Généralement, la biorestauration est plus susceptible de se produire lorsque les niveaux d'oxygène augmentent (Okolafor *et al.*, 2022).

Les biotopes naturels peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des micro-organismes à dégrader les hydrocarbures. Un certain type de champignon est plus capable de biodégrader les hydrocarbures à un pH de 7 que les bactéries, qui ne peuvent dégrader les hydrocarbures qu'à un pH de 5 (Okolafor *et al.*, 2022).

Sur la base de la qualité et des exigences vitales des micro-organismes hydrocarbonoclastes, les nutriments sont classés en macro, micro et oligoéléments. Ils peuvent influencer la biodégradation de composants pétroliers à divers niveaux. La disponibilité de macronutriments (N, P et K) dans le milieu récepteur est donc un élément limitant de la biodégradation des hydrocarbures, dont leur ajout augmente la biostimulation (Martinez *et al.*, 2019) et détermine la distribution et la dégradation des hydrocarbures polluants (Hamzah *et al.*, 2017).

Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation des hydrocarbures. De hautes teneurs en sel augmentent la pression osmotique, gênent les activités métaboliques microbiennes, ainsi que la solubilité et les systèmes de transport des ions essentiels (Abdulrasheed *et al.*, 2020) et engendrent un manque d'oxygène pour la flore microbienne (Imron *et al.*, 2020). Des études de Sihag *et al.* (2014), ont indiqué qu'une dégradation importante des hydrocarbures a été détecté avec 0,1 à 2 M de NaCl mais au maximum 0,4 M et un niveau élevé de salinité du sol réduit le taux et l'étendue de la biodégradation des hydrocarbures. De plus, le supplément de sels tels que NaCl et NH₄Cl dans les sols pauvres en nutriments améliore la dégradation microbienne des hydrocarbures (Martins et Peixoto, 2012). C'est à cause de la présence de tels sels, que la biodégradation des hydrocarbures dans le sol augmente avec leur augmentation. Cependant, des concentrations plus élevées de cations, peut entraver le consortium microbien dans le sol et réduire la biodégradation microbienne des hydrocarbures (Zhong *et al.*, 2020).

Pour les HAP de haut poids moléculaire ou de structure moléculaire complexe, une nouvelle technique prometteuse et très efficace est envisagée, à savoir la dégradation photocatalytique ou la photodégradation (Wang *et al.*, 2019). Le pétrole brut, recouvrant la surface du sol, constitue une barrière physique entre le sol et l'air, entravant ainsi les échanges de matières entre ceux-ci et réduisant la fertilité du sol (Ali *et al.*, 2020). Les chromophores tels que les alcènes ou aromatiques et certains complexes métalliques sont sensibles à la

photolyse directe (Snyder *et al.*, 2021). Ce processus est limité au infime fraction de composants pétroliers qui absorbe la lumière du soleil (Shankar *et al.*, 2015). La photooxydation indirecte se produit lorsque d'autres molécules présentes dans le pétrole brut absorbent la lumière du soleil, un autre composé présent dans l'environnement, à savoir les photosensibilisants (par exemple les quinones, l'acide humique, les flavines, ainsi que les traces de métaux, nitrate, nitrite et peroxyde d'hydrogène) absorbe l'énergie lumineuse et la transfère ensuite soit indirectement via divers intermédiaires réactifs tels que les oxydants ou directement au composé d'intérêt provoquant son altération structurelle (Wang *et al.*, 2020).

5.4. Facteurs microbiologiques

La compréhension du processus de biodégradation nécessite une connaissance des micro-organismes qui font fonctionner ce mécanisme. Les champignons hydrocarbonoclastes modifient les hydrocarbures par des transformations métaboliques ou enzymatiques. Ils reposent sur deux processus: la croissance et le cométabolisme. Par conséquent, il n'est pas garanti qu'un composé soit dégradé dans un environnement particulier. D'abord, un organisme susceptible de dégrader doit être présent; ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées; enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative (Borah, 2019). Le degré de dégradation des hydrocarbures est en corrélation avec l'augmentation des populations de micro-organismes et l'activité de l'oxygénase (Mahmud *et al.*, 2020). Le pétrole induit la mise en place d'un consortium fongique de biodégradation des hydrocarbures avec une alternance de différents types de champignons comportant des capacités métaboliques complémentaires (Ramoutar *et al.*, 2019). Dans des consortiums fongiques, trois stratégies de bioremédiation sont représentées : (1) le composé hydrocarboné cible est utilisé comme source de carbone par les champignons ; (2) le composé hydrocarboné cible est attaqué par voie enzymatique mais n'est pas utilisé comme source de carbone (cométabolisme) ; (3) le composé cible n'est pas du tout métabolisé mais est absorbé et accumulé dans les champignons (bioaccumulation). Parfois, l'ajout d'un inoculum sur des sites contaminés peut empêcher la démonstration de leur potentiel maximum. Cela peut être dû aux raisons suivantes : 1) incapacité à adapter les conditions environnementales dominantes (fluctuations ou extrêmes de température, de teneur en eau, de pH et/ou de disponibilité de nutriments) ; 2) tolérer les co-contaminants comme les métaux lourds ; 3) compétition avec le microbiote indigène en cas de nutriments limités ; et/ou 4) incapacité de

survivre aux prédateurs (protozoaires et bactériophages) ou aux antibiotiques produits par des micro-organismes concurrents (Siles et García-Sánchez, 2018).

6. Matériel et Méthodes

Ce volet d'étude met en évidence les capacités métaboliques de quelques souches fongiques hydrocarbonoclastes autochtones isolées des bourbiers pétroliers, à dégrader le pétrole brut et le gasoil. Pour cela, deux objectifs ont été avancés :

- En premier lieu, il a été nécessaire de vérifier la tolérance de ces souches sélectionnées en déterminant l'effet des deux hydrocarbures sur leur croissance en milieu liquide.
- Le second objectif est de déterminer le taux de biodégradation de cinq hydrocarbures contenus dans le pétrole brut.

6.1. Les produits chimiques utilisés

Les hydrocarbures utilisés sont le pétrole brut : fournis par Sonatrach de Hassi Messaoud et le gasoil acheté d'une station d'essence.

6.1.1. Le pétrole brut

Le pétrole (or noir) est un mélange complexe non raffiné d'hydrocarbures, ainsi que des traces de soufre, d'azote, d'oxygène, d'eau salée et de métaux (Fer, nickel). En fait, c'est un liquide visqueux dont la viscosité varie en fonction de sa teneur en fractions légères. Le pétrole est de couleur qui va de l'ambre claire ou noir opaque (brut asphalténique), d'un vert fluorescent (paraffinique) ou bleu (naphténiques). La présence de composés sulfureux lui confère une odeur déplaisante.

Le pétrole brut provient directement de l'exploitation d'un puit de pétrole et son raffinage nous donne plusieurs produits tels que le gaz naturel, l'essence, le kérosène, le gazole et d'autres produits. Il est hautement inflammable (point d'éclair inférieur à 30°C).

6.1.2. Le gasoil

Le gazole, gasoil, gas-oil ou encore diésel, est est l'une des principales sources d'énergie actuellement utilisées dans les moteurs à combustion interne (Da Silva *et al.*, 2013). C'est un liquide jaune clair, légèrement visqueux et distillant habituellement entre 190°C et 300 °C. Il s'agit d'une fraction de la distillation du pétrole brut et composée d'hydrocarbures pétroliers complexes (alcanes, cycloalcanes, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et autres composés récalcitrants) (Kaur *et al.*, 2015), ayant un nombre de carbone majoritairement

compris entre C9 et C20. La composition type des hydrocarbures du diesel (volume) comprend 64% d'hydrocarbures aliphatiques, 1 à 2% d'hydrocarbures oléfiniques et 35% d'hydrocarbures aromatiques (Kuppusamy *et al.*, 2020).

6.2. Microorganismes et milieux de culture

Dans cette partie, on a sélectionné cinq souches fongiques isolées, purifiées et identifiées à partir d'échantillons de sol des bourbiers pétroliers. Ces espèces testées sont supposées adaptées aux conditions du milieu pollué et ont acquis une certaine performance vis-à-vis des molécules hydrocarbonées. Ces souches sont entretenues sur milieu gélosé et conservées à 4°C. Il s'agit de 3 souches appartenant au genre fongique *Aspergillus* et 2 du genre *Trichoderma*. Le choix porte particulièrement sur leur dominance dans les sites échantillonnés (voir chapitre précédent).

Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des souches microbiennes sélectionnées pour le processus de dégradation sont :

➤ Milieu à l'extrait de malt- agar (MEA, d'après Blakeslee, 1915)

- Extrait de malt.....20g
- Peptone.....1g
- Glucose.....20g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000ml

pH : 5,6

➤ Milieu liquide de Galzy et Slonimski (GS) 1957

Solution de sels minéraux	100 ml
Solution d'oligo éléments	1 ml
Solution de FeCl ₃ , 6H ₂ O à 200 mg/l	1 ml
Solution de vitamines	5 ml
Solution de mesoinositol à 4 mg/l	5 ml
Glucose	5 g
Eau distilléeq.s.p	1000 ml

A. Solution de sels minéraux

(NH ₄)H ₂ PO ₄	60 g
(NH ₄)H ₂ SO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄	10 g
NaCl	1 g
CaCl ₂	1 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	5 g
Eau distillée q.s.p	1000

B. Solution d'oligo éléments

H ₃ BO ₄	0,5 g
--------------------------------	-------

MnSO ₄	0,4 g
ZnSO ₄	0,4 g
Na ₂ MoO ₄	0,2 g
KI	0,1 g
CuSO ₄	0,04 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml
C. Solution de vitamines	
Pantothénate de calcium	0,4 g
Thiamine chlorhydrate	0,4 g
Inositol	0,4 g
Pyridoxyne	0,4 g
Acide nicotinique	0,1 g
Biotine	0,004 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

➤ **Milieu Czapek Dox, 1909.**

- NaNO₃.....3,0g
- KH₂PO₄..... 1,0g
- MgSO₄, H₂O.....0,5g
- Kcl.....0,5g
- FeSO₄,7H₂O.....0,01g
- Sucre (morceaux)30,0g
- Eau de robinet q.s.p.....1000ml

6.3. Identification moléculaire des isolats

Les résultats de l'identification morphologique des champignons isolés ont été confirmés par une identification moléculaire à l'aide des séquences ITS de l'ADN ribosomale amplifiées par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) qui sont actuellement utilisées comme méthode de détection sensible et spécifique pour les champignons (Yang *et al.*, 2018). Une sélection de 5 isolats a été faite pour cette analyse génétique. Sur la base du séquençage des fragments ITS de l'ADNr 18S, les isolats ont été identifiés par comparaison avec les espèces les plus proches dans la base de données GenBank avec similarité de 98 à 99%.

6.4. Etude de la cinétique de la biodégradation des hydrocarbures

6.4.1. Préparation des pré-cultures et protocole expérimental

Les pré-cultures de réactivation des souches fongiques sélectionnées sont effectuées sur boîtes de Pétri sur un milieu de culture gélosé, extrait de malt agar (EMA). Les boîtesensemencées sont ensuite mises en incubation pendant une période de cinq à huit jours à la température de 28°C.

Les cultures sont conduites en mode batch sur milieu liquide synthétique Galzy et Solninski (GS), additionné de glucose (5g/l) à différentes valeurs de pH (4.5, 7 et 9.5), de salinité (NaCl (1M) et de température de (25, 35 et 40°C) pendant 28 Jours dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml à raison de 150 ml de milieu de culture par fiole, l'ensemble est alors stérilisé sous pression vapeur saturante (20 min à 120°C). Des explants de mycélium (0,5 Mc Farland correspondant à 10^8 UFC/ml pour chaque souche fongique) prélevés sur les bords des cultures actives, ont été inoculés aseptiquement dans chaque fiole.

Chaque essai est réalisé en triplicata, et l'incubation se fait en agitation plaque orbitale (dans des agitateurs incubateurs), à une vitesse de rotation de 180 tr/mn et sous éclairage de 1200Lux (12H/24H) pendant deux jours. Après, 3% d'hydrocarbures (pétrole brut et/ou gasoil) est ajouté dans les cultures d'une façon aseptique, après stérilisation par filtration à travers un filtre à seringue de 0,45 μ m. Des témoins (milieu et souches sans hydrocarbures) sont inclus dans les essais. Les valeurs sont exprimées en moyennes. (Fig 45).

6.4.2. Etude de la croissance fongique en présence des produits hydrocarbonés

Cinq souches fongiques ont été testées individuellement en présence du pétrole brut et du gasoil. Plusieurs paramètres ont été pris en considération, il s'agit notamment de la densité optique (DO) déterminée à partir d'un prélèvement de culture prélevé au temps t_0 et une fois chaque semaine pendant 28 jours (4 semaines). Le pH, et la biomasse totale (poids sec de la charge fongique) a été calculé en fin de l'essai et le filtrat de chaque culture sert à évaluer la biodégradation des hydrocarbures par LC/MS.

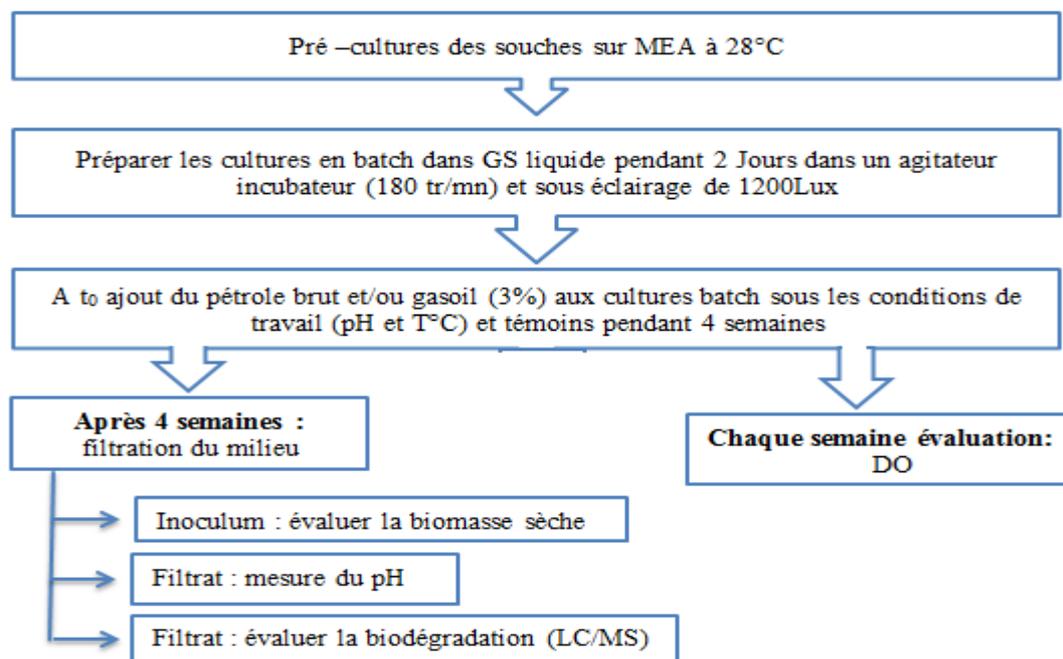


Figure 45. Protocole expérimental des cultures en batch

6.4.2.1. Détermination de la cinétique de croissance

Dans une population fongique en croissance, la biomasse peut être évaluée par sa densité optique. Dans notre travail, la densité optique est déterminée pendant la période d'incubation à des intervalles de temps d'une semaine. Elle est mesurée à une longueur d'onde de 550 nm sur un spectrophotomètre (Agilent Cary 60 UV-Vis). La courbe d'étalonnage réalisée séparément permet de relier la densité optique obtenue au nombre réel de microorganismes.

6.4.2.2. Mesure du pH

Le pH est l'un des facteurs les plus importants qui influe sur l'activité biologique microbienne. Il est mesuré la dernière semaine des cultures à l'aide d'une sonde d'un analyseur multi-paramètre de paillasse (Consort C6030).

6.4.2.3. Détermination de la biomasse fongique

Après 28 jours, le contenu des Erlenmeyers est récupéré, filtré à travers une membrane cellulosique de 0,45 µm Millipore. Le filtrat est récupéré dans un tube en vue des dosages chromatographiques pour la détermination du pourcentage de la biodégradation des hydrocarbures. Le contenu de la membrane est pesé (M_0) puis mis à sécher à une température de 105°C pendant 24h puis pesé une autre fois afin de déterminer son poids (M) en mg/ml. Le poids sec est calculé selon l'équation suivante : $Ps = (M - M_0)$

6.5. Evaluation du taux de biodégradation des hydrocarbures

La gamme étalon des 5 composés est préparée à partir d'une solution mère de 1g/l. Les HAP ont été déterminés comme décrit dans (Tadashi et *al.*, 2011). Les molécules sélectionnées pour cette étude : l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo (b) fluoranthène et le benzo (a) pyrène font partie des 16 HAP les plus dangereux pour l'environnement et sont répertoriés comme polluants de contrôle prioritaires selon l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA) (USEPA, 2014 et Keith, 2014).

Les concentrations résiduelles des différentes molécules ont été déterminées par HPLC. 20 ml d'échantillon a été acidifiés avec HCl 1 N, agités pendant 3 min avec un volume égal de 1:1 (v: v) n-hexane: acétate d'éthyle, et centrifugés (9600 tr/min; 4°C; 10 min). La couche organique a ensuite été collectée. L'extrait a été séché sous un courant d'azote et l'extrait sec a été dissous dans de l'acétonitrile et analysé. L'analyse a été réalisée en utilisant un système HPLC Agilent Technology (Agilent 1260 Infinity Quaternary) par injection d'échantillon de

20 µL, un détecteur UV/Vis et une colonne analytique (Stable Bond C18 (Zorbax) (4,6 × 150 mm × 15 µm). La phase mobile est un gradient d'écoulement (1 ml/min) avec de l'acétonitrile (AC) et de l'eau avec détection à des longueurs d'onde de 235 nm, 254 nm, 253 nm, 239 nm et 295 nm respectivement pour l'antracène, le fuloranthen, le pyrène le benzo (b) fuloranthen et le benzo (a) pyrène (Tab 12). La température dans le four à colonne a été réglée à 25°C. Une phase mobile avec des conditions d'élution en gradient à étapes multiples a été utilisée avec un temps de fonctionnement total de 60 min par injection d'extrait d'échantillon.

Tableau 12. Flux de gradient de phase mobile avec composition et temps

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

6.6. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (Inc. corporation. 2014). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test « Shapiro-wilk » et comme l'ensemble des données ne suivait pas la loi normale (n'étaient pas normalement distribués), un test non paramétrique de « Kruskal-wallis » (pour remplacer l'ANOAVA) a été appliqué pour étudier les effets de la température, le pH et même l'espèce de champignon utilisée sur le taux de dégradation des cinq molécules d'HAP suivies dans cette étude. D'autre part un test de « Dunn » a été réalisé pour détecter des différences significatives entre les différents pH, température et espèces de champignons utilisées. Le niveau critique de signification a été fixé à (p <0,05) pour tous les tests.

7. Résultats et discussion

7.1. Résultats

7.1.1. Identification moléculaire des souches

L'identification fongique des espèces selon l'analyse de l'ADN, est illustrée sur le tableau suivant (Tab 13). Une fois les séquences obtenues et après une analyse BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) sur le site NCBI, les espèces correspondantes ont été déterminées. Cependant, les souches les plus similaires sont :

- **Souche 1** : *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1)

- **Souche 2** : *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1)
- **Souche 3** : *A. tubingensis* (AtWU_00159)
- **Souche 4**: *T. parareesei* FW-04 (OL743181.1)
- **Souche 5** : *A. flavus* isolate S7L6A (ON171640.1)

Tableau 13 : Identification des souches fongiques selon les résultats de l'analyse ADN

Souches	Identification (GenBank accession number)	Nbr de nucleotide	Souche type la plus similaire (Numéro d'accès GenBank)	% de similitude
1	<i>Aspergillus</i> sp. Strain SK1(OQ711959.1)	551	<i>Aspergillus niger</i> CBS 101883 (XM_025601974.1)	100
2	<i>Trichoderma</i> sp. strain SK2 (OQ711960.1)	597	<i>Trichoderma ghanense</i> strain 18ASMA011(MT671930.1)	98
3	<i>Aspergillus</i> sp. Strain SK3(OQ711961.1)	555	<i>Aspergillus tubingensis</i> (AtWU_00159)	100
4	<i>Trichoderma</i> sp. strain SK4	579	<i>Trichoderma parareesei</i> FW-04 (OL743181.1)	84.5
5	<i>Aspergillus</i> sp. strain SK5 (OQ711963.1)	553	<i>Aspergillus flavus</i> isolate S7L6A (ON171640.1)	99.82

Les cinq moisissures sélectionnées sont déjà soumises à une identification macroscopique par un examen de la culture sur milieux gélosés (voir chapitre précédent). Cet examen permet de déterminer les quatre caractères cultureux suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (Photo 2).

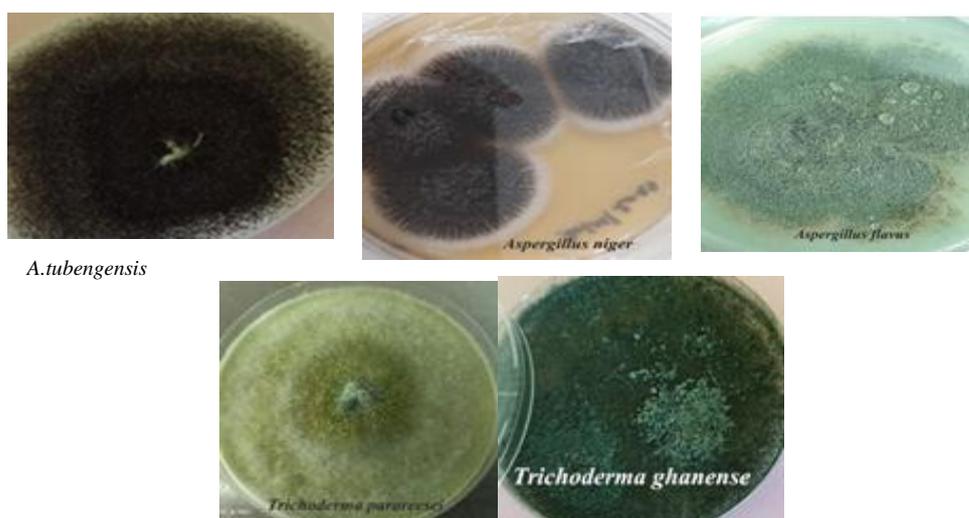


Photo 2.Caractéristiques macroscopiques des souches sélectionnées

7.1.2. Etude de la croissance fongique en présence des hydrocarbures

7.1.2.1. Détermination de la cinétique de croissance

- **Condition n° 1 de travail** : culture sans hydrocarbures (Témoins)

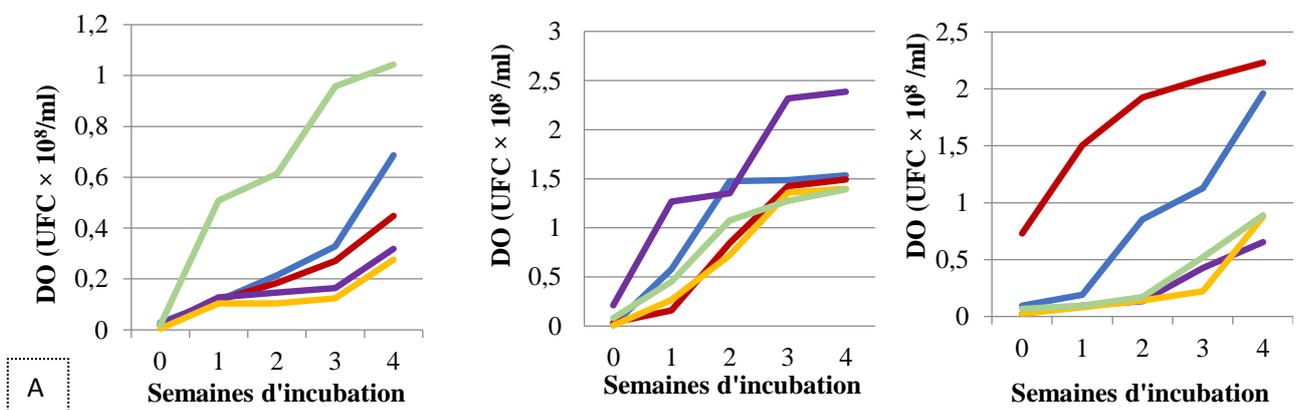
Dans cette condition de travail et en absence des hydrocarbures (HC), deux variables sont prises en considération : il s'agit de la température d'incubation et le pH initial du milieu de culture. Il est à signaler que le glucose ajouté au milieu de culture GS est la seule source de carbone et d'énergie qui y existe.

Selon la figure (46), la courbe de croissance est une augmentation continue du t_0 jusqu'à la 4^{ème} semaine. Pour les cinq souches étudiées, nous distinguons, d'une part, que la concentration fongique moyenne augmente dès la 1^{ère} semaine de l'essai jusqu'à atteindre des valeurs maximales. Cette augmentation correspond à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat (glucose) suffit aux besoins métaboliques de chaque souche individuelle. La concentration fongique moyenne qui augmente, reflète une courbe de croissance modèle, sauf que des fois, elle prend l'allure d'un zigzag. Ce phénomène nous laisse supposer que le niveau des exigences nutritionnelles surpasse la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitée, on enregistre une croissance qui se traduit par des diauxies alternées.

Pour le pH de 4.5, les croissances des souches fongiques sont affectées par le changement de température d'incubation (25, 35 et 40°C). En effet, ces températures ont respectivement supportées la croissance des souches *A. flavus*, *A. tubengensis* et *T. ghanense*. Ces souches ont enregistrées les moyennes de DO suivantes selon l'ordre 1.043, 2.386 et 2.23×10^8 UFC/ml (Fig 46A).

Le pH neutre (Fig 46 B), semble très favorable, et les cinq souches ont enregistrées des valeurs moyennes de densité optique (DO) qui augmentent de t_0 allant vers la 4^{ème} semaine, sauf pour l'*A. niger* dont la cinétique de croissance semble être ralentie à température 35°C.

En ce qui concerne le pH de 9.5, seule l'expérience de température 25°C a donné un résultat. L'incubation à 35 et 45°C n'ont pas favorisé la croissance des cinq souches en culture batch (Fig 46C). A cette expérience, seule *A. flavus* a marqué une courbe de croissance croissante, à l'opposé des quatre souches restantes dont la croissance est ralentie.



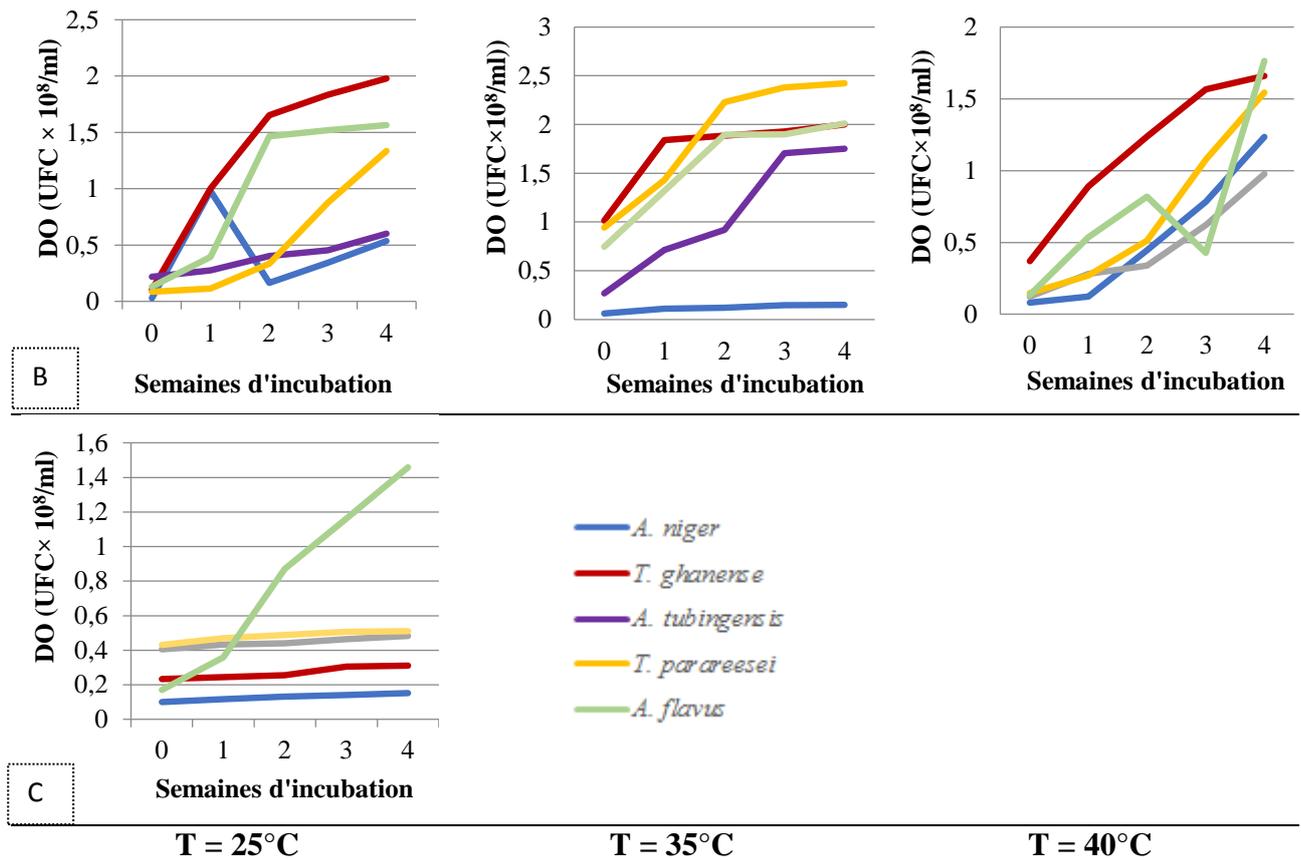


Figure 46. Cinétique de croissance des souches sans hydrocarbures à pH : A :4.5, B :7, C : 9.5

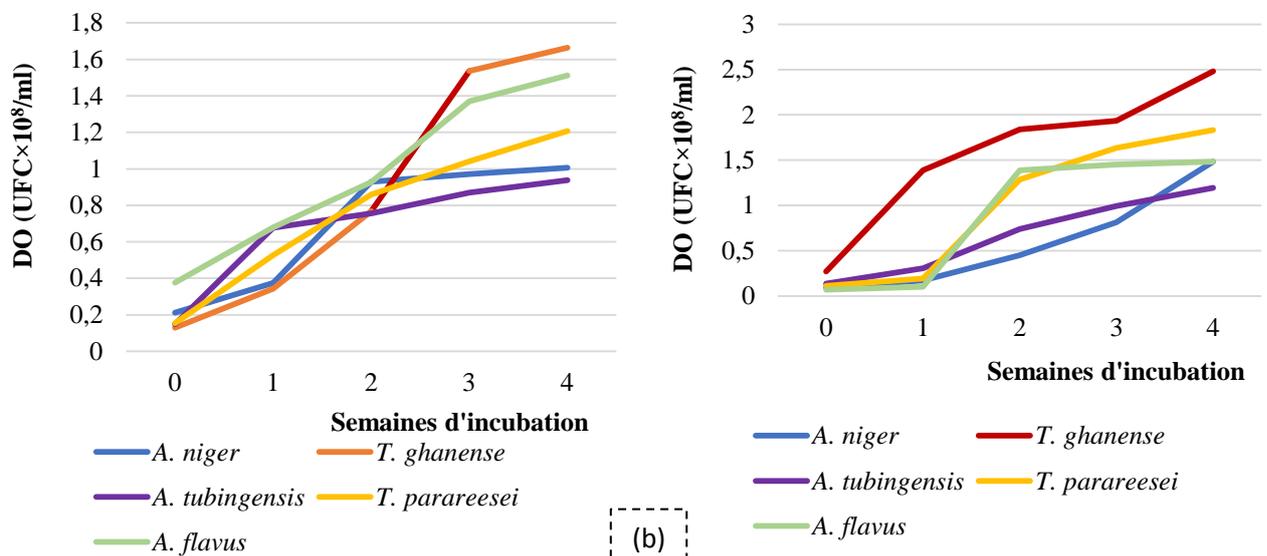
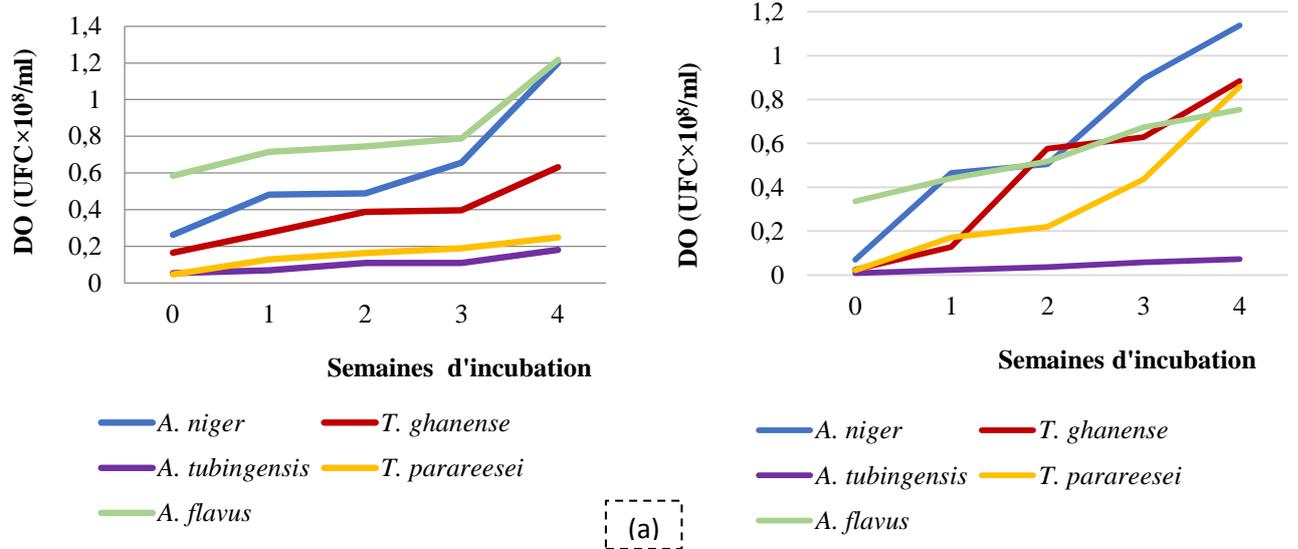
➤ **Condition n° 2 de travail : température d'incubation T = 25°C en présence d'HC**

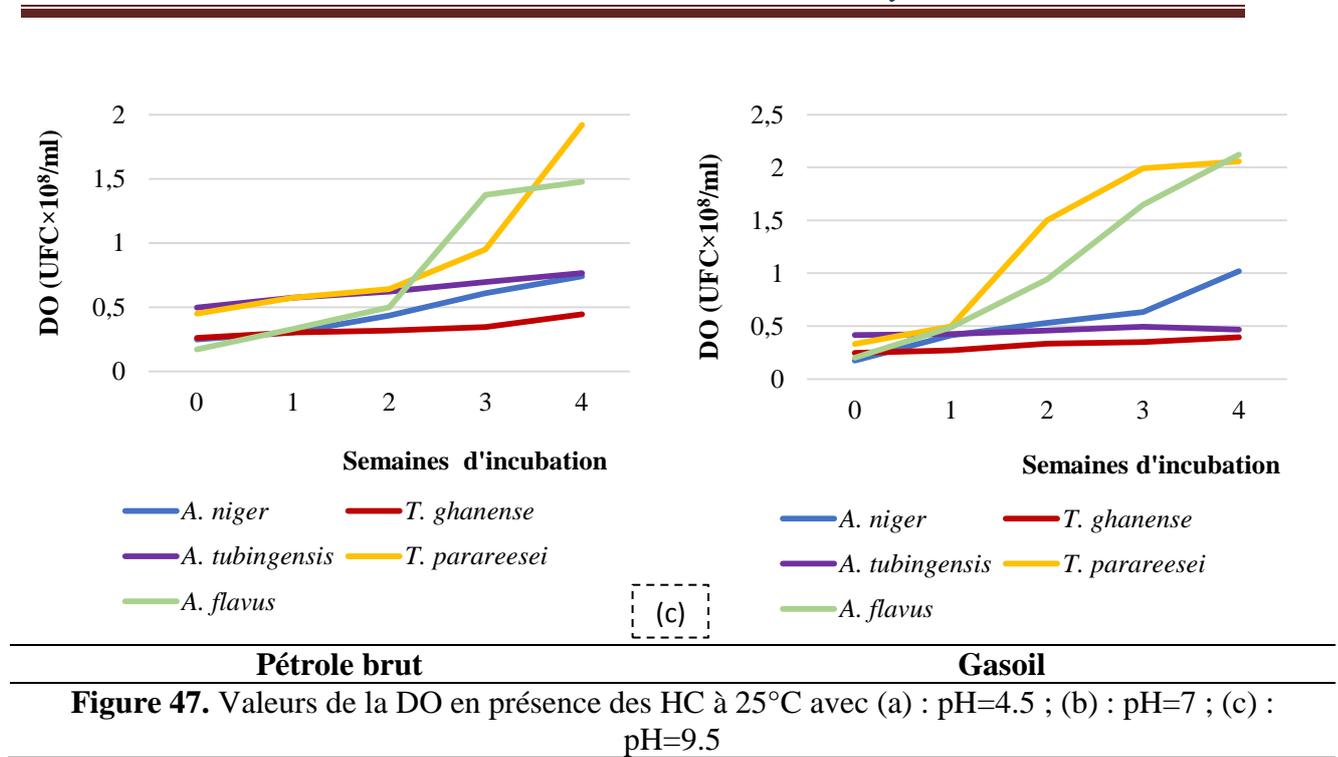
L'effet combiné température d'incubation et pH du milieu de culture en présence du pétrole brut et/ou du gasoil sur la cinétique moyenne de croissance des cinq souches fongiques (Fig 47), montre que le pH 7 a donné un résultat favorable en présence du gasoil par rapport au pétrole brut. A pH (4.5) et par rapport aux témoins; la présence du pétrole brut à favorisée *A. niger*, et *A. flavus*. Leurs densité optiques moyennes sont passées respectivement de $0,262 \times 10^8$ et $0,584 \times 10^8$ UFC/ml à t_0 pour arriver à $1,199 \times 10^8$ et $1,216 \times 10^8$ UFC/ml la 4^{ème} semaine d'incubation en présence du pétrole brut et de 0,069 et 0,336 UFC/ml à t_0 avec le gasoil pour donner la dernière semaine les valeurs respectives de $1,137$ et $0,754 \times 10^8$ UFC/ml (47a). En général, les moyennes de DO varient d'une souche à l'autre et selon le type d'hydrocarbures. L'ANOVA montre que cette variation est statistiquement significative avec $p=0,000$.

D'autre part, il paraît que le pH neutre du milieu de culture, aide l'espèce *T. ghanense* à mieux tolérer les deux hydrocarbures par rapport au témoin. Sa moyenne de DO est la plus élevée, elle est de $1,665 \times 10^8$ UFC/ml en présence du pétrole brut et de $2,48 \times 10^8$ UFC/ml à

l'égard du gasoil (47b). Il est à noter que la variation des cinétiques de croissance moyenne entre les cinq souches, selon l'ANOVA est statistiquement significative avec $p=0,000$.

Enfin à pH 9.5, la cinétique de la courbe de croissance d'*A. flavus* et *T. parareesei* traduit la meilleure croissance avec un maximum noté la 4^{ème} semaine en présence du pétrole brut et du gasoil respectivement avec les valeurs moyennes de $1,476$ et $1,919 \times 10^8$ UFC/ml (47c). En effet, selon l'ANOVA, ces variations sont statistiquement significatives avec $P < 0,05$ en présence du gasoil et du pétrole brut.





➤ **Condition n° 3 de travail : température d'incubation T = 35°C en présence d'HC**

D'après la figure 48 et en comparaison avec celle des témoins, les densités optiques (DO) moyennes des souches fongiques en présence du gasoil sont les plus meilleures. La DO moyenne la plus élevée est enregistrée avec *A.tubingensis* avec 2.228×10^8 UFC/ml en 4 semaines et à pH 4.5 (Fig 48a). Sur le plan statistique, l'ANOVA montre que la variation des cinétiques de croissances des souches est significative en présence du gasoil. Ceci traduit une tolérance de quatre souches fongiques aux molécules d'hydrocarbures, sauf la cinétique de croissance moyenne d'*A. niger* à pH neutre paraît être ralentie en présence du gasoil (Fig 48b). En effet, les souches présentent des courbes de croissance ascendantes et variable, l'ANOVA montre que la variation de ces résultats est significative. A pH 9.5, la croissance des souches est inhibée en présence des deux hydrocarbures.

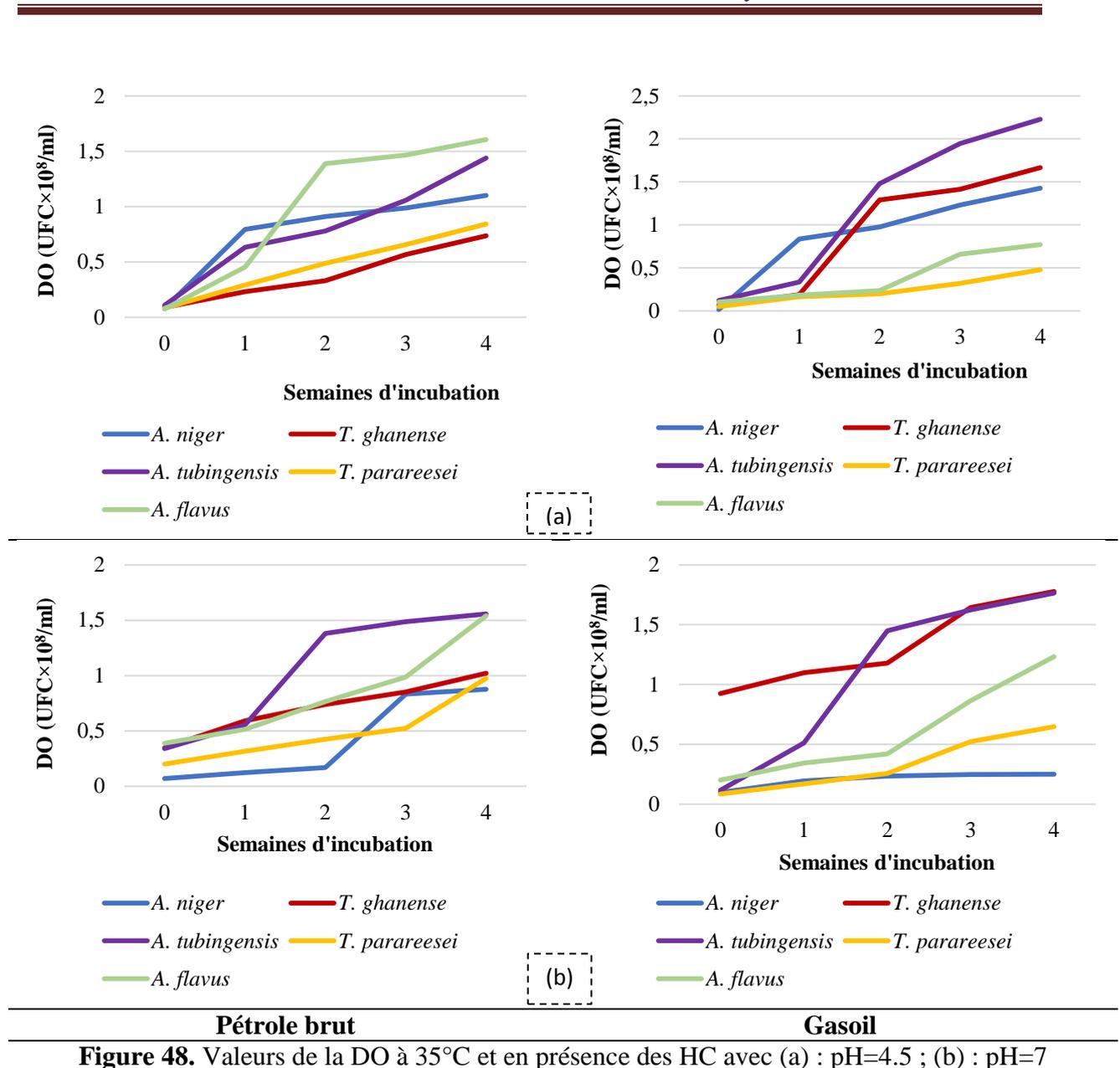


Figure 48. Valeurs de la DO à 35°C et en présence des HC avec (a) : pH=4.5 ; (b) : pH=7

➤ **Condition n° 4 de travail : température d'incubation T = 40°C en présence d'HC**

Les cinétiques de croissance moyennes des cinq souches montrent des courbes de DO ascendantes en présence des deux hydrocarbures et à différentes valeurs de pH (4.5 et 7) (Fig 49). A pH 9.5, on a constaté une inhibition totale de croissance. Cependant, à pH 4.5, la DO moyenne des souches fongiques est meilleure que celle à pH 7 (Fig 49a) ; on peut remarquer que la valeur maximale est atteinte par *T. ghanense* en présence du pétrole brut ($1,98 \times 10^8$ UFC/ml) et du gasoil ($1,753 \times 10^8$ UFC/ml) à la 4^{ème} semaine d'incubation. En général, la densité optique (DO) varie d'une souche à l'autre et selon le type d'hydrocarbures. En tenant compte l'ANOVA, cette variation est significative.

À température 40°C et pH 7, la DO moyenne varie d'une souche à l'autre et selon le type d'hydrocarbures. La valeur maximale en présence du gasoil est allouée aux souches *T. ghanense*, *T. parareesei*, *A. tubingensis* et *A. flavus* avec respectivement 1,321, 1,225, 1,227 et 1,376×10⁸ UFC/ml. En présence du pétrole brut, la DO moyenne la plus élevée est enregistrée en présence *T. ghanense*, *T. parareesei*, et *A. flavus* avec respectivement avec 1,321, 1,123 et 1,354×10⁸ UFC/ml (Fig 49b). Sur le plan statistique, l'ANOVA montre que la variation des DO est significative.

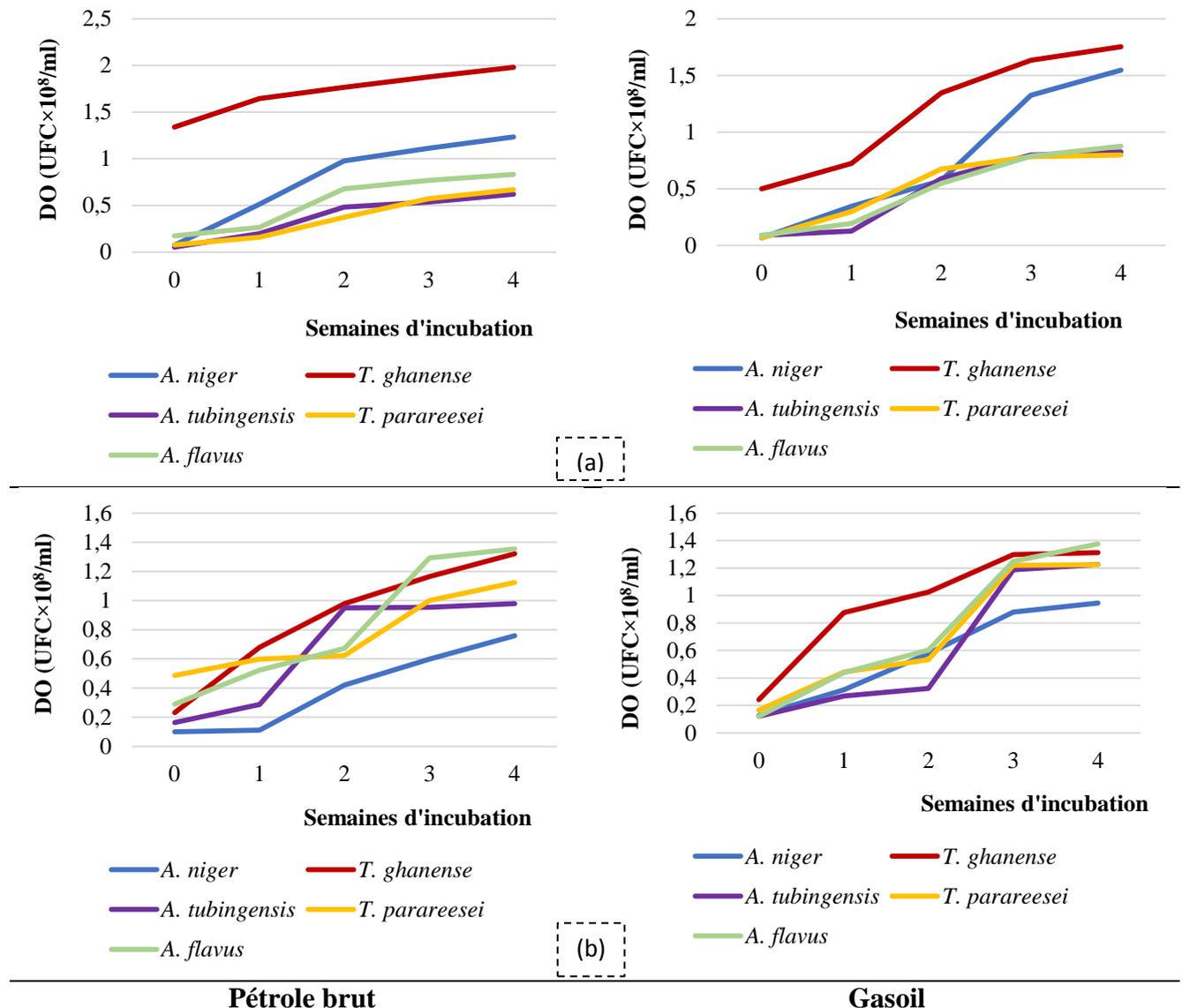


Figure 49. Valeurs de la DO à 40°C et en présence des HC avec (a) : pH=4.5 ; (b) : pH=7

7.1.2.2. Mesure du pH

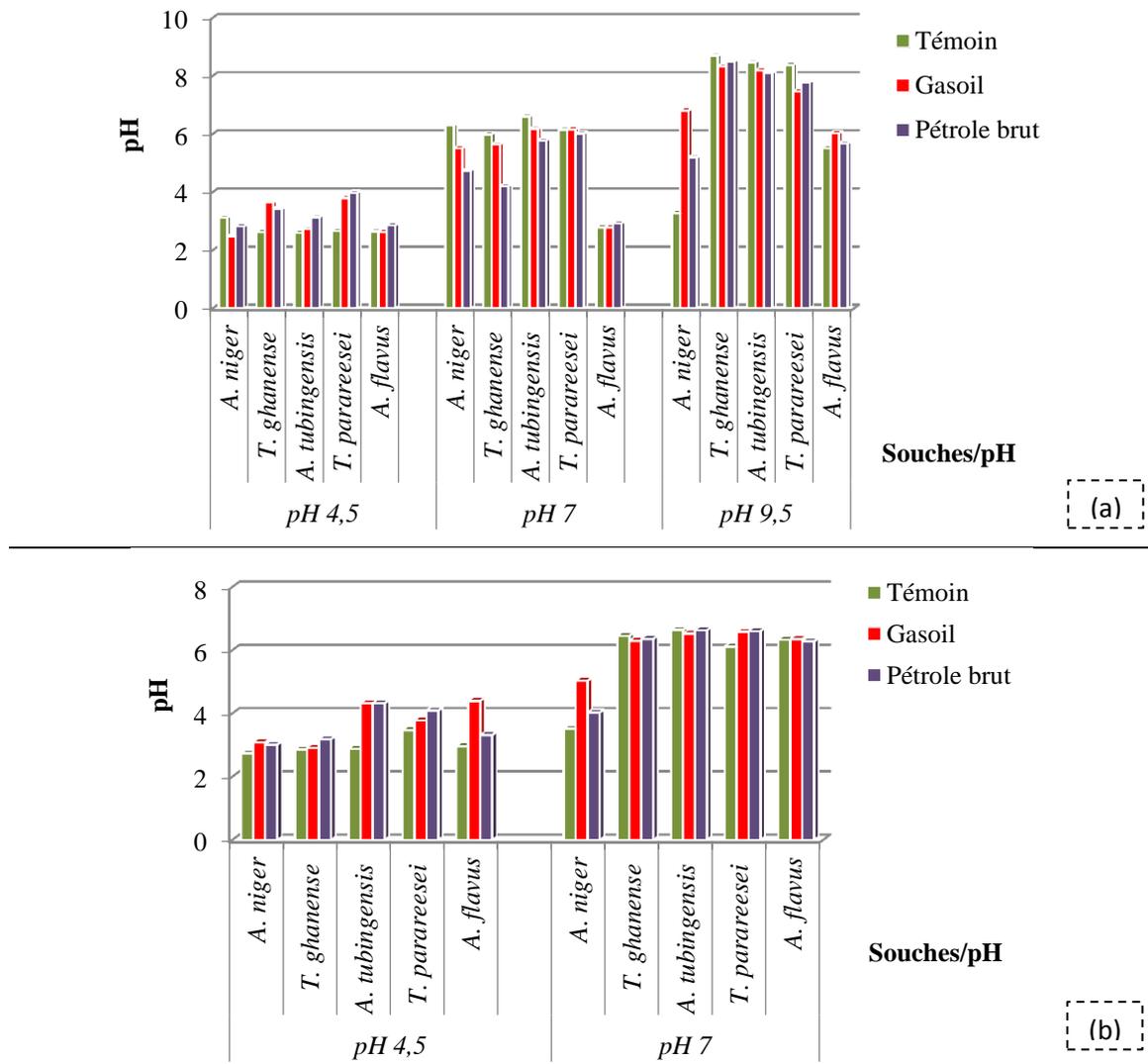
Il est à noter que le pH est mesuré après 4 semaines de culture en batch et que le pH initial était de 4.5, 7 et 9.5. Généralement, on observe des diminutions des valeurs moyennes

du pH après 4 semaines par rapport aux valeurs initiales, selon la présence de l'hydrocarbure ou son absence (Témoin) et la température d'incubation (Fig 50). Cependant, les cultures en batch avec un pH de 9.5 à température de 35 et 40°C n'ont pas donné de résultat, car les souches sont mortes (le test sur milieu solide n'a pas donné de croissance fongique).

À température 25°C, pour une valeur initiale de pH de 4.5, une diminution importante des valeurs moyennes du pH du milieu de culture avec ou sans hydrocarbures sont enregistrées. Ceux avec le gasoil sont plus marqués que ceux du pétrole brut, avec une maximale chez *T. parareesei* de 3,8 par rapport à 2,67 du témoin et une minimale de 2,48 / 3,13 du témoin chez *A. niger* (Fig 50a). Par contre, le pétrole brut a favorisé une acidification minimale enregistrée chez *A. niger* de 2,83. Dans ce cas, l'ANOVA montre que la variation des valeurs moyennes du pH est statistiquement significative avec $p = 0,000$. Pour une autre valeur de pH initial neutre, on a noté une acidification du milieu de culture dont l'expérience menée en présence du pétrole brut est plus basse qu'en présence du gasoil. Cependant, *A. flavus* est la seule souche qui a noté une importante diminution allant jusqu'à 2,79 et 2,93 respectivement en présence du gasoil et du pétrole brut (Fig 50a). En effet, la diminution du pH chez les 3 premières souches en valeurs descendantes est comme suit : pH (*A. niger*), pH (*T. ghanense*) et pH (*A. tubingensis*). En général, la diminution des valeurs moyennes du pH varie d'une souche à l'autre et selon le type d'hydrocarbures présent. L'ANOVA montre que cette variation est statistiquement significative avec $p = 0,000$. Même constat en allant vers un pH initial de 9.5. L'*A. niger* et *A. flavus* sont les seules souches à avoir marqué une diminution importante de 6,81 et 6,83 respectivement en présence du gasoil et 5,2 et 5,68 avec le pétrole brut (Fig 50a). L'ANOVA montre que cette variation est statistiquement non significative en présence du gasoil et en présence du pétrole brut.

À température 35°C et pH initial de 4,5, les valeurs moyennes les plus basses de pH du milieu de culture après 4 semaines d'incubation, sont repérées en présence du gasoil dans la culture de *T. ghanense* (2,91) et en présence du pétrole brut dans la culture d'*A. niger* (3,00) (Fig 50b). L'ANOVA montre que cette variation est statistiquement significative en présence du gasoil et non significative en présence du pétrole. Lorsque le pH initial est de 7, les diminutions des valeurs moyennes du pH après 4 semaines de culture et en présence des deux hydrocarbures, sont proches. En effet, *A. niger* et en présence du pétrole brut a notée une valeur de 4,02 et 3,04 avec le gasoil (Fig 50b). La valeur de p , obtenue par l'ANOVA, qui est égale à 0,000 montre que cette variation est statistiquement significative.

Enfin, à température 40°C et pH initial 4.5 et parmi les cinq souches testées, on remarque une faible diminution notée chez *T. parareesei* et *A. tubingensis* de 4,41 et 4,47 des valeurs moyennes du pH du milieu de culture après 4 semaines de culture en présence du gasoil et de 4,43 et 4,41 en présence du pétrole brut (Fig 50c). La valeur de p obtenue par l'ANOVA, qui est égale à 0,000 montre que la variation des valeurs du pH est statistiquement significative. A pH initial neutre, les valeurs notées avec le gasoil sont plus inférieurs que ceux du pétrole brut. *A. flavus* et *T. ghanense* ont enregistré respectivement un pH très bas de 1,2 et 1,02 en présence du gasoil (Fig 50c). Par contre *A. niger* a marqué les valeurs de 2,35 et 4,96 en présence respectivement du gasoil et du pétrole brut. La valeur de p obtenue par l'ANOVA, qui est égale à 0,000 montre que la variation des valeurs du pH est statistiquement significative.



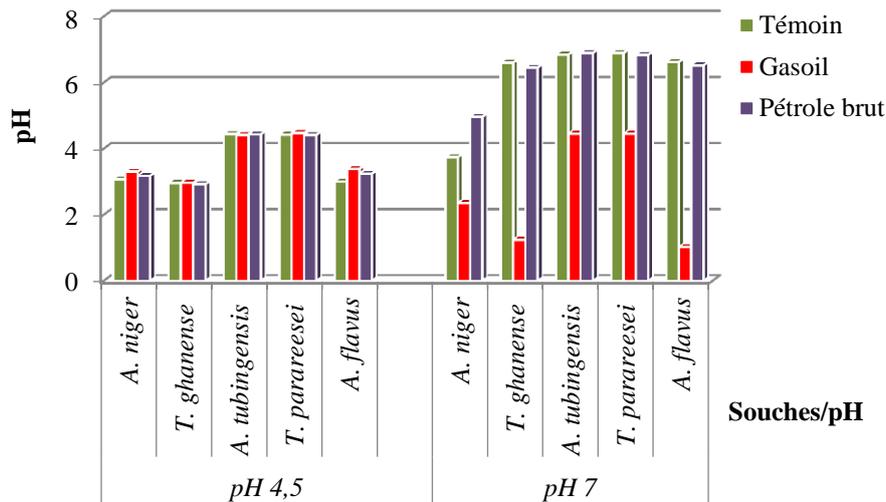


Figure 50. Valeurs du pH après 4 semaines d'incubation en présence des HC
(a) : T 25°C; (b) : 35°C ; (c) : 40°C

7.1.2.3. Détermination de la biomasse totale

La figure 51 présente le poids sec moyen de l'inoculum fongique, obtenu à partir des cultures après 4 semaines d'incubation en présence des hydrocarbures. Il s'est avéré que le poids sec moyen des cultures est variable par rapport à celui enregistré à partir des cultures sans hydrocarbures. Une biomasse qui répond aux conditions de culture (pH et température d'incubation).

C'est ainsi, à température de 25°C et à pH 4.5, toutes les souches ont marquées une biomasse fongique moyenne inférieure à celle du témoin en présence du gasoil. La valeur la plus importante est celle du poids d'*A. tubingenensis* (5,23 g) dont le témoin a noté 9,52 g. En présence du pétrole brut, une augmentation du poids moyen de biomasse est perçue avec *A. niger* qui a noté 3,7g par rapport au témoin de 3,5g, ainsi que l'*A. flavus* qui a donné un poids moyen de 5,64 g à l'égard du témoin de 3,23g (Fig 51a). L'ANOVA montre que la variation des biomasses est statistiquement non significative avec $p=0,157$ en présence du gasoil et significative avec $p=0,001$ en présence du pétrole brut. Cependant, le meme constat est observé en travaillant sur pH neutre, des variations de poids moyen de biomasse sont observées en fin de culture par comparaison aux témoins. En présence du gasoil, *A.niger* est la seule souche qui a donné une biomasse moyenne élevée contrairement aux quatre souches restantes. Leurs biomasses moyennes sont légèrement inférieures à celles des témoins. En présence du pétrole brut, seule *T. ghanense* a enregistré un poid sec moyen de l'inoculum inférieure à celui du témoin, le reste des souches a marqué une biomasse moyenne importante (Fig 51a). Sur ce, l'ANOVA montre que la variation en biomasse totale est statistiquement

non significative avec $p= 0,335$ en présence du gasoil et significative en présence du pétrole. Enfin, en présence du gasoil et à pH .9.5, *A. niger*, *A. flavus* et *T. ghanense* ont marqués des biomasses moyennes supérieures aux témoins. Par contre, en présence du pétrole brut c'est *A. niger* et *A. flavus* qui ont notés un résultat supérieur aux témoins (Fig 51a). L'ANOVA montre que la variation en biomasse totale est statistiquement non significative en présence du gasoil et en présence du pétrole brut.

Si la température d'incubation des cultures est de 35°C et que le pH des milieux de culture est acide (4.5), une augmentation de la biomasse totale est aperçue en présence du gasoil chez *A. flavus* et *T. parareesei* qui ont enregistrés respectivement 7,27g / 4,08g du témoin et 3,46g / 2,44 g du témoin. Même constat est observé en présence du pétrole brut avec toutes les souches (Fig51b). Le changement en biomasse selon l'hydrocarbure et la souche dans ces conditions est statistiquement significatif selon les résultats de l'ANOVA. Entre autre, dans le cas du pH neutre, une augmentation de biomasse est notée en présence du pétrole brut et du gasoil chez *A. tubengensis* et *T. ghanense* (Fig 51b). L'ANOVA montre que la variation des poids secs est statistiquement non significative en présence du gasoil et du pétrole brut.

Enfin, à une température de 40°C et un pH 4.5, toutes les souches ont enregistrés une biomasse inférieure à celle des témoins, mais en présence du gasoil l'est plus (Fig51c). L'ANOVA montre que la variation des poids des biomasses fongiques est statistiquement non significative en présence du gasoil et significative en présence du pétrole brut. Cependant, à pH neutre, le poids sec moyen varie d'une souche à l'autre et selon le type d'hydrocarbures. Seule *A. flavus* a noté le poids sec moyen le plus important parmi les quatre souches et en présence du pétrole brut (Fig 51c). L'ANOVA montre que la variation en poids sec moyen est statistiquement non significative.

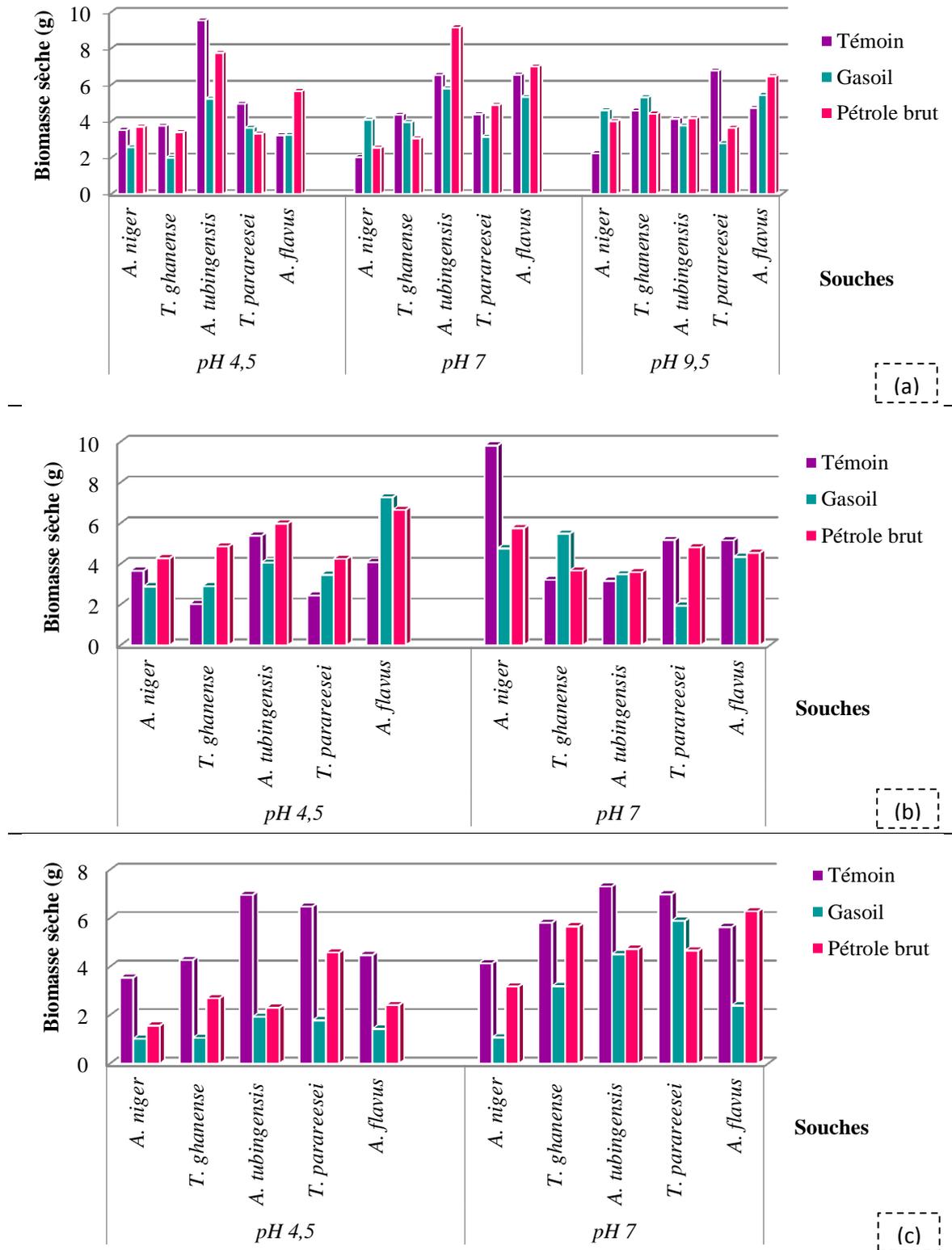


Figure 51. Biomasse sèche après 4 semaines de culture en présence des hydrocarbures à température (a) : 25°C; (b) : 35°C ; (c) : 40°C

7.1.3. Evaluation du taux de biodégradation des hydrocarbures

Les taux de biodégradation évalués en fin de culture (4 semaines) sont ceux de l'anthracène (3 cycles) (ANT), le fluoranthène (4 cycles) (FLT), le pyrène (4 cycles) (PYR), le benzo[b]fluoranthène (5 cycles) (BbFA) et le benzo[a]pyrène (5 cycles) (BaP) existants dans les cultures en batch en présence du pétrole brut, sous les conditions de travail de pH (4.5, 7 et 9.5) et de température (25°C et 40°C) (Fig 52). Ils ont été évalués par LC/MS.

En effet, sous température 25°C d'incubation et pH 4.5, les taux de biodégradation des cinq molécules sont entre 89 et 99% pour presque l'anthracène, le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Par contre, celui du pyrène est de degré moindre entre 86 et 98%. En parlant de souches, l'*A. niger* est la seule à avoir dégradé 99% des cinq molécules, suivie par *T. parareesei* avec un taux de 99%, sauf le pyrène, son taux de dégradation est de 98%. Dans la condition du pH neutre, une attention particulière pour l'*A. flavus* qui a enregistré un taux de 99% pour toutes les molécules, suivie par *A. niger* qui a dégradé 99% de quatre molécules sauf le pyrène a noté un taux de 95%. Il paraît que le pyrène est le seul hydrocarbure à être difficile à dégrader par *T. ghanense*. Le taux est évalué à 76%. Enfin, à pH 9.5, les taux de biodégradation des molécules sont les plus performants. *A. flavus* a enregistré les taux de dégradation les plus importants (99%) pour les cinq molécules. *T. ghanense* a enregistré à son tour des taux de 99% pour quatre molécules d'hydrocarbures et 95% pour le pyrène (Fig 52a).

Dans la condition de température 35°C, seule la biodégradation des cinq hydrocarbures à pH neutre a été prise en compte. En effet, le benzo[b]fluoranthène (BbFA) est le plus dégradé (99%), suivi par le benzo[a]pyrène (BaP) (99%) par toutes les souches sauf *T. ghanense* et *A. flavus* avec 98%. Le reste des souches, les taux de biodégradation sont variables, dont le plus bas est celui d'*A. tubingensis* dégradant 87% du fluoranthène (Fig 52b).

En allant vers la dernière condition de température 40°C et pour un pH fixé à 4.5, les taux de dégradation sont très importants. Par souches, ces taux sont classés par ordre croissants : *A. niger*, *A. flavus* et *T. parareesei*, puis *T. ghanensis* et *A. tubingensis*. Par famille d'hydrocarbure, les cinq molécules sont classées par ordre croissant de taux de dégradation : anthracène et BaP, fluoranthène, pyrène puis BbFA. Pour un pH neutre, *A. niger* et *T. ghanense* ont donné des taux remarquables de biodégradation allant entre 99 et 100% noté pour le BaP (pour les deux souches) et BbFA pour la seconde souche. *A. tubingensis* de son côté a noté des taux de 88% pour le pyrène, le fluoranthène et le BbFA (Fig 52c).

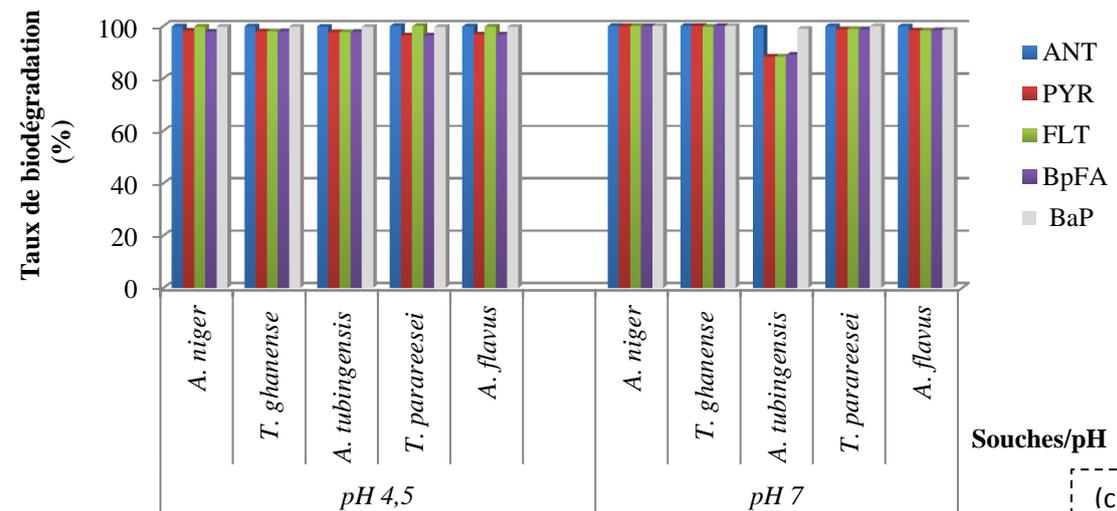
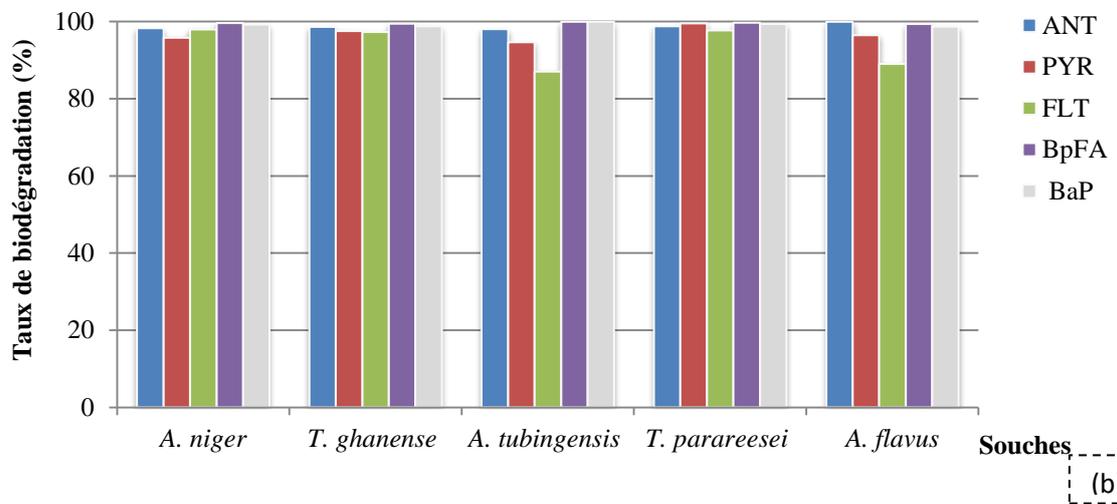
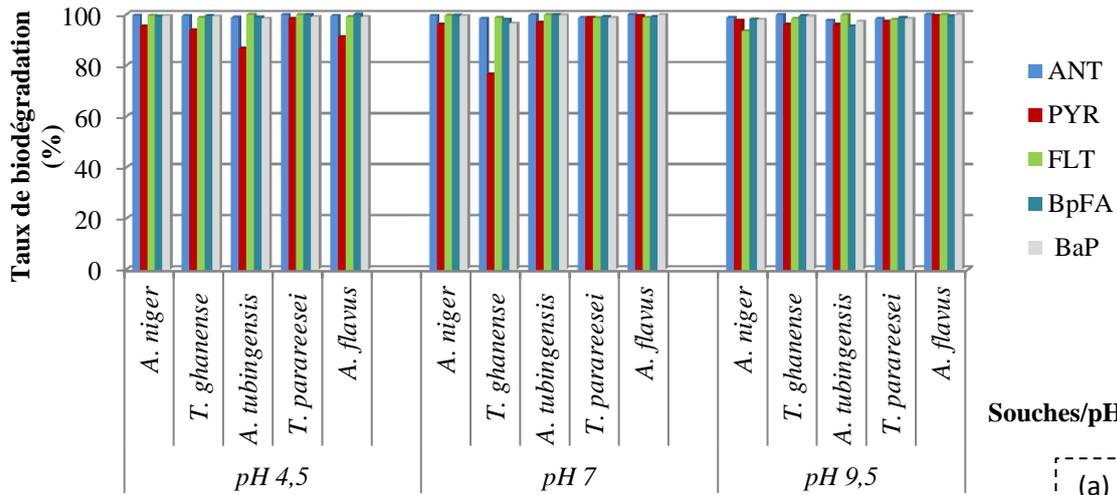


Figure 52. Biodégradation de cinq hydrocarbures sous condition de culture pH et température (a) : 25°C; (b) : 35°C et pH 7 ; (c) : 40°C

7.1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (Inc. corporation. 2014). La normalité des données a été vérifiée à l'aide du test « Shpiro-wilk ». En effet, comme l'ensemble de données ne suivait pas la loi normale (n'étaient pas normalement distribués), un test non paramétrique de « Kruskal-wallis » (pour remplacer l'ANOVA) a été appliqué pour étudier les effets de la température, le pH et même l'espèce de champignon utilisée sur le taux de dégradation des Cinq hydrocarbures. D'autre part un test de « Dunn » a été réalisé pour détecter des différences significatives entre les différents pH, Température et espèces de champignons utilisées. Le niveau critique de signification a été fixé à ($p < 0,05$) pour tous les tests.

7.1.4.1. Effet de la Température

Les résultats de l'analyse statistique notamment le test de « Kruskal-wallis » ne montre que les différentes températures n'ont aucun effet significatif sur la dégradation des molécules d'HAP sauf pour Benzo(a)pyrene ($p=0.04$). Même le test de « Dunn » regroupe les températures utilisées dans le même groupe sauf pour le Benzo(a)pyrene.

7.1.4.2. Effet du pH

D'après les analyses statiques, la variation du pH n'influence que la cinétique de dégradation du Fluoranthene où on trouve que l'effet du changement du pH et hautement significatif ($p=0.014$) et le test de « Dunn » regroupe les pH 4.5 et 9.5 dans des groupe différents alors que le pH 7 peut être regroupé avec les deux. Pour le reste des molécules d'HAP le changement de pH n'influence pas leurs cinétiques de dégradation.

7.1.4.3. Effet souche fongique utilisée

Les résultats obtenus montrent que les cinq souches utilisées dégradent les cinq molécules d'HAP avec la même efficacité dans les différentes conditions de température et de pH, ce qui est confirmé par le test de « Kruskal-wallis » et « Dunn » qui montrent que la nature de la souche de champignon utilisée n'a pas d'influence sur le taux de dégradation des HAP.

7.2. Discussion

Les tests de biodégradation des deux hydrocarbures ont été réalisés dans le cadre d'expériences batch en présence d'oxygène, dans des conditions de culture déterminées. Il s'agit essentiellement des conditions de température d'incubation (25, 35 et 40°C) et de pH du

milieu de culture (4.5, 7 et 9.5). A travers notre étude et afin de vérifier la capacité des cinq souches fongiques à dégrader le pétrole brut et le gasoil sous ces conditions expérimentaux, on a déterminé en premier lieu les cinétiques de croissance des souches individuelles, les pH des milieux de culture en fin de l'expérience (après 4 semaines) ainsi que les biomasses fongiques.

De ce fait, nos analyses ont fait ressortir (i) un développement des souches testées en présence d'hydrocarbures avec (ii) une biomasse qui est relativement importante et ce, en présence du pétrole brut que du gasoil. Notons que le pétrole brut et le gasoil sont des mélanges de différents hydrocarbures, notamment des alcanes, des cycloalcanes et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Ameen *et al.*, 2016 ; Hazen *et al.*, 2016). Généralement, le pétrole brut contient de nombreux composants toxiques, non biodégradables et chacun a sa propre toxicité (Di Toro *et al.*, 2007). En revanche, le gasoil fait partie des produits pétroliers issues du raffinage du pétrole brut, peut donc avoir perdu une partie des composants toxiques contenus dans le pétrole brut lors du raffinage (Willey *et al.*, 2011). Il est aussi clair que nos résultats indiquent un comportement indifférent des souches en présences des hydrocarbures. Les champignons filamenteux, *Aspergillus spp.* ont acquis une attention considérable en tant que candidats potentiels à la dégradation d'un large éventail d'hydrocarbures de l'environnement (Zhang *et al.*, 2016). *Aspergillus niger* est l'un des micro-organismes les plus utilisés pour la dégradation du pétrole brut (Hassaine et Bordjiba, 2019), et du gasoil (Olukunle *et al.*, 2021; Ughamba *et al.*, 2021). Selon Ughamba *et al.* (2021), *A. flavus* est impliqué dans la dégradation du gasoil, ainsi que du pétrole brut (Al-Dossary *et al.*, 2020). Hormis ces deux souches, peu de travaux scientifiques témoignent sur l'utilisation d'*A. tubingensis* comme agent de dégradation des hydrocarbures. Il s'agit particulièrement des travaux de Daâssi et Almaghribi (2023) sur la métabolisation du pétrole brut. Khan *et al.* (2017), Varshney *et al.* (2023), supposent qu'*A. tubingensis* est responsable de la dégradation des polymères plastiques.

Trichoderma se distingue comme un genre fongique avec une large gamme d'utilisations de substrats, une production élevée de composés antimicrobiens et sa capacité d'opportunisme environnemental. C'est un organisme puissant et efficace dégradant les hydrocarbures aromatiques (Mutlag *et al.*, 2023 ; Makut *et al.*, 2022). Plusieurs espèces de *Trichoderma* sont associées à la capacité de métaboliser une variété d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de poids moléculaire élevé et faible, tels que le naphthalène, le phénanthrène, le chrysène, le pyrène et le benzo[a]pyrène (Zafra et Cortés-Espinosa, 2015). En ce qui concerne

T. parareesei, ancêtre de *T. reesei* (téléomorphe *Hypocrea jecorina*), codant pour une série de cellulases et d'hémicellulases, est l'un des micro-organismes cellulolytiques les plus étudiés pour la dégradation de la biomasse (Fonseca *et al.*, 2020). Son apport à la bioremediation des sites contaminés par les HAPs est justifié par les travaux de Yao *et al.* (2015), ainsi que Elkhateeb *et al.* (2021). Une étude précédente a démontré le potentiel de *Trichoderma parareesei* pour favoriser la croissance des plantes dans un sol contaminé par du diesel (Elkhateeb *et al.*, 2021 ; Mishra et Nautiyal, 2019). *T.ghanense*, de son côté a été signalé pour sa résistance aux métaux lourds tels que l'arsenic, le plomb, le cuivre, le fer, le cadmium, l'argent et l'atrazine, respectivement (Oladipo *et al.*, 2018). Notons que les hydrocarbures et les métaux lourds sont contenus dans les bourbiers pétroliers.

Expérimenter des champignons microscopiques autochtones (plus adaptés aux conditions de pollution aux hydrocarbures), s'avère plus avantageuse que d'utiliser des souches obtenues à partir de collections de cultures. Les champignons filamenteux indigènes deviennent hautement adaptés à la survie dans des environnements terrestres contaminés par des hydrocarbures grâce à un enrichissement sélectif et à des modifications génétiques qui leur permettent de cataboliser les hydrocarbures (Ramdass et Rampersad, 2021).

Dans une première mesure, il est important à signaler le temps (période) d'incubation pendant le traitement : dans notre cas, il s'agit de 4 semaines (28 jours). Selon Al-Hawash *et al.* (2018), plus le temps de culture est long, mieux est amélioré le taux de dégradation des hydrocarbures. Cela concorde aussi avec un rapport de Mukherjee *et al.* (2017) où les résultats de leur étude ont montré qu'il faut suffisamment de temps pour une biodégradation rentable et efficace. Dans une seconde, c'est la cinétique de croissance des cinq souches fongiques, qui témoigne d'une bonne adaptation aux deux types d'hydrocarbures. Seulement, le pétrole brut l'est mieux, chose supportée par Makut *et al.* (2022) et Subathra *et al.* (2013) qui ont en outre expliqué que la viscosité accrue des hydrocarbures réduit son taux d'utilisation microbien. Ceci dit, le gasoil est moins visqueux que le pétrole. Également, l'aptitude de certains champignons à croître en présence d'hydrocarbures, confirme l'utilisation de ces hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance, ce qui est en accord avec les résultats de Daccò *et al.* (2020).

Afin de confirmer la capacité des cinq souches fongiques à dégrader le pétrole et le gasoil, on a mesuré la biomasse accumulée à la fin de l'expérience. La majorité des isolats fongiques ont montré une accumulation de biomasse proche ou égale à leurs témoins. Par contre, la littérature scientifique dans ce cas, montre une augmentation relative de la

biomasse, ce qui est soutenu par les travaux de Bankole *et al.* (2022). Cependant, des travaux ont montré aussi une exception de légère diminution observée de biomasse fongique (Egbewale *et al.*, 2023). En général, une croissance fongique ainsi observée, est accompagnée d'une acidification du milieu; traduisant ainsi une activité microbienne par utilisation du pétrole brut et du gasoil comme source de carbone. La diminution du pH est probablement causée par la production d'acides organiques et d'autres produits métaboliques lors de la dégradation microbienne des hydrocarbures (Sari *et al.*, 2019).

Cependant, parmi les paramètres influençant la biodégradation des hydrocarbures, la température est connue pour avoir un effet significatif sur la vitesse de croissance microbienne, l'activité des enzymes, la chimie des polluants, la physiologie et la diversité de la communauté microbienne responsable des processus de dégradation (Koshlaf et Ball, 2017). C'est un facteur important pour les souches utilisant les hydrocarbures, comme seule source de carbone et d'énergie. En cultures batch, différentes températures (25, 35 et 40°C) ont été appliqués pour étudier le comportement biochimique des micromycètes expérimentées vis-à-vis des deux hydrocarbures. Nos résultats de l'analyse statistique montrent que les trois températures n'ont aucun effet significatif sur la dégradation des hydrocarbures sauf pour le BaP. Dans la littérature scientifique, le taux maximum de dégradation des hydrocarbures se situe entre 30 et 40 °C (Victor *et al.*, 2020 ; Abdullah *et al.*, 2020). Chose qui est confirmée par les résultats enregistrés lors de la condition expérimentale de température de culture de 40°C, ou on a eu un taux de dégradation de 100% du BaP avec *A. niger* et *T. ghanense* et 100% du BpFA par *T. ghanense*. Selon Varjani (2017), la température peut affecter la biodégradation d'un hydrocarbure en modifiant sa nature physique et sa composition chimique, son taux de métabolisation et la composition de la culture microbienne.

Lors de nos cultures fongiques, la valeur du pH de 9.5 n'a donné aucune croissance fongique pour une température d'incubation de 35 ou de 40°C. La plupart des micro-organismes ont un intervalle de pH optimal pour leur survie et leur fonction. Le pH affecte directement la croissance fongique en nuisant à la surface cellulaire ou indirectement en lésant la disponibilité des nutriments, sachant que le pH requis pour la croissance fongique varie de 3,0 à 8,0, avec un niveau optimal d'environ 5,0 sous un niveau satisfaisant d'état nutritionnel (Naseer *et al.*, 2020). Le pH peut être très variable et doit être pris en compte lors de l'amélioration des méthodes de traitement de biodégradation (El Aziz *et al.*, 2021). Il est à noter que les hydrocarbures et leur accumulation peuvent interagir avec les composants lipophiles de la membrane cytoplasmique fongique, modifiant ainsi la perméabilité, ce qui

peut induire des effets toxiques et des perturbations de la structure membranaire et des fonctions cellulaires (Li et Gadd, 2020 ; Zafra *et al.*, 2015). Cependant, l'effet des hydrocarbures aromatiques sur le taux de croissance mycélienne et la sporulation des champignons tolérants/dégradants pourrait être un facteur important non seulement pour l'adaptation microbienne mais également pour le développement cellulaire adéquat et la dégradation des hydrocarbures (Zafra *et al.*, 2015). Dans notre cas, un pH alcalin associé à une présence d'hydrocarbures peut avoir des conséquences mortelles pour les mycomycètes. Selon Petrisor *et al.* (2016), certains champignons se sont montrés peu favorables à dégrader les polluants dans des conditions alcalines.

Hormis, le fait de déterminer les cinétiques de croissance des souches individuelles, des pH des milieux de culture en fin de l'expérience et les biomasses fongiques, l'un de nos objectifs tracés est d'évaluer le plus précisément possible le taux de biodégradation de l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène existants dans les cultures en batch en présence du pétrole brut, sous les conditions de travail de pH (4.5, 7 et 9.5) et de température (25, 35 et 40°C). Si on classe ces hydrocarbures en fonction du nombre de cycle benzénique, on aura deux classes : celle à faible poids moléculaire (3 cycles) référant à l'anthracène et celle à haut poids moléculaire (4 et 5 cycles) composée du fluoranthène, le pyrène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Il est admis que le mécanisme de biodégradation dépend du poids moléculaire de l'hydrocarbure. Si ce dernier est faible, il peut être directement absorbé car il est soluble et pénètre facilement dans les cellules fongiques. Les champignons microscopiques produisent des enzymes multifonctionnelles impliquées dans la dégradation d'une grande variété d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. Dans leur sensibilité aux attaques fongiques, les composés hydrocarbonés varient et sont généralement classés dans l'ordre croissant suivant : composés aromatiques polycycliques > aromatiques de haut poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques de faible poids moléculaire > alcanes ramifiés > n-alcanes (Varjani *et al.*, 2015).

Généralement, et en aérobie, les micro-organismes dégradent les HAP à faible poids moléculaire plus rapide que les HAP à haut poids moléculaire. Il y en a quatre raisons possibles (1) solubilité dans l'eau assez faible, (2) capacité insuffisante à stimuler les enzymes dégradantes, (3) absorption plus lente dans les cellules et (4) un rendement énergétique inférieur à la croissance (Kanaly et Harayama, 2000). Nos résultats de la biodégradation sont très prometteurs, car les cinq composés hydrocarbonés ont été biodégradé à des taux plus que 80%, dont la majorité est de 99%. L'*A. niger* est l'une des souches qui a donné un résultat très

encourageant envers la famille d'hydrocarbure à 5 cycles benzéniques, à différentes température. Chose qui a été approuvé par les travaux de Burghal *et al.* (2016) et Mohsen *et al.* (2020). Nos recherches ont démontré aussi que le champignon *Trichoderma ghanense* est capable de dégrader totalement le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Bien que que la littérature scientifique présente *T.ghanense* comme agent de bioremediation aux métal(loïdes) (Oladipo *et al.*, 2019), très peu de travaux la présente comme biodégradant les hydrocarbures.

Bien que la dégradation des polluants organiques et notamment celle des HAP ait été initiée il y a plusieurs décennies, les recherches visant à trouver la meilleure méthode de dégradation à travers diverses approches sont toujours en cours. La voie métabolique de la plupart des HAP de bas et haut poids moléculaires est profondément étudiée et maîtrisée. Malgré que la dégradation microbienne des HAP de faible poids moléculaire (HAP-LMW) soit bien comprise, celle des HAP de haut poids moléculaire (HAP-HMW) est loin d'être maîtrisée (Elyamine *et al.*, 2021). Cependant, grâce aux nouveaux outils technologiques, plusieurs espèces fongiques qui sont impliqués dans les études sur la dégradation des HAP et présentant une plus grande capacité à dégrader les HAP HMW et LMW sont isolés et étudiés de manière approfondie pour lever le voile sur leurs mécanismes de dégradation, y compris les acteurs enzymatiques et moléculaires. Cependant, le métabolisme des hydrocarbures chez les champignons est en grande partie lié au catabolisme des lipides. L'activité lipolytique intracellulaire et les complexes enzymatiques extracellulaires contribuent à la biodégradation des hydrocarbures (Al-Hawash *et al.*, 2019). Cependant, la voie métabolique fongique de l'anthracène et du pyrène, a été largement étudié, en comparaison, peu de travaux ont été menés sur la biodégradation du BaP ou même le benzo(p) fluoranthène (BpFL), en raison de leur récalcitrance à la biodégradation due à la stabilité des doubles liaisons conjuguées dans leurs anneaux fusionnés (Ostrem Loss et Yu, 2018). En outre, nos résultats soulignent l'importance des souches fongiques testées pour la dégradation des polluants aromatiques récalcitrants. Les espèces fongiques *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) et *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1) sont particulièrement intéressantes, car elles peuvent exposer en condition de culture (pH de 7 et température d'incubation 40°C) une dégradation préférentielle du BaP et du BpFL, ou le taux est à 100%. Ces deux souches dites lignolytiques sont dotés d'enzymes ligninolytiques: la lignine peroxydase (LiP, EC 1.11.1.14), peroxydase de manganèse (MnP, EC 1.11.1.13) et laccase (Lac, EC 1.10.3.2), ainsi que d'autres enzymes accessoires, qui ont pour fonction de catalyser ou dégrader la lignine en molécules moins complexes (Asemoloye *et al.*, 2020). Ces enzymes ont une grande

polyvalence qui couvre un large spectre d'utilisation en bioremédiation, surtout dans la dégradation des composés récalcitrants complexes, tel que le pétrole et ses dérivés (Asemoloye *et al.*, 2020).

Conclusion

Ce travail de thèse a été réalisé d'une part dans un but de tester l'abilité de cinq souches fongiques autochtones et individuelles à tolérer le pétrole brut et le gasoil, sous des conditions de cultures en batch de pH et de température d'incubation. Les souches sélectionnées sont *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1), *A. tubingensis* (AtWU_00159), *Aspergillus flavus* isolate S7L6A (ON171640.1), *Trichoderma parareesei* FW-04 (OL743181.1) et *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1). Il s'est avéré qu'il y a une indifférence de comportement de ces souches envers les deux hydrocarbures, avec une faible tendance pour le pétrole brut. On a remarqué aussi une bonne croissance fongique, accompagnée d'une acidification du milieu de culture qui témoigne d'une biodégradation ou utilisation des hydrocarbures. Reste à noter que les deux conditions de cultures de pH 9.5 et température 35 et 40°C, en présence des deux hydrocarbures sont mortels pour nos souches.

Dans une seconde optique, on visait à déterminer le taux de biodégradation de cinq hydrocarbures contenus dans le pétrole brut, dans un contexte de bioremédiation. Il s'agit de l'anthracène, du fluoranthène, le pyrène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Nos résultats sont très satisfaisant du faite que la biodégradation est parfaite sous les conditions de cultures (de température et de pH), sauf une attention particulière aux deux souches fongiques hydrocarbonoclastes *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1) qui a réussi à dégrader à 100% deux hydrocarbures à haut poids moléculaires: le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène et l'*Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) qui a anéanti le benzo[a]pyrène.

En général, les champignons microscopiques utilisées s'ajoutent à la collection des souches fongiques hydrocarbonoclastes terrestres isolées de bourbiers pétroliers, qui ont un potentiel pour la bioremediation des hydrocarbures notamment les récalcitrants.

Chapitre .5.
Réhabilitation de
bourbiers pétroliers :
2. Essai de
phytoremediation



Chapitre .5. Réhabilitation de bourbiers pétroliers : 2. Essai de phytoremediation

Le sol, l'eau et la végétation sont étroitement liés. La réhabilitation des sols pollués afin de maintenir les processus et les fonctions des écosystèmes est l'un des défis majeurs auxquels notre société est aujourd'hui confrontée. Les techniques biologiques de dépollution ont été abondamment utilisées. La phytoremédiation est une technologie verte émergente qui utilise des plantes (arbres, espèces hyper accumulatrices, plantes cultivables, etc.) pour contenir, séquestrer ou détoxifier l'environnement (le sol, les sédiments et l'eau) (Ashraf *et al.*, 2019), notamment des polluants organiques tels que les hydrocarbures (Song *et al.*, 2017). En plus d'être reconnue comme un choix économique, elle est aussi considérée comme la plus esthétique des techniques de réhabilitation.

1. Définition et principes

- La phytoremédiation est une des techniques naturelles utilisées dans les processus de décontamination des milieux à pollution diverse (organiques, inorganiques). Elle compte parmi les méthodes innovantes de dépollution (Liu *et al.*, 2020) de plus en plus utilisées dans des milieux complexes en fonction de la nature des polluants à traiter. Elle fait simplement partie de la famille des traitements biologiques appliqués aux sols pollués, s'appuie sur les plantes et implique des processus de translocation, d'accumulation, de transport, de transformation et de volatilisation (Shah et Daverey, 2020).
- La Phytoremédiation est aussi l'utilisation des plantes annuelles herbacées ou ligneuses forestières et des microorganismes qui leurs sont associés (sous forme association symbiotique) pour remédier à la pollution de l'environnement. C'est donc un ensemble de techniques in situ misant sur les plantes pour extraire, dégrader ou immobiliser les contaminants dans les sols, les sédiments, les boues ainsi que dans l'eau de surface ou souterraine (Dickinson, 2017) et dans l'air.
- Jacobs *et al.* (2018) ont rapporté que la phytoremédiation est une méthode autotrophique alimentée par l'énergie solaire et présentant plusieurs avantages, notamment la faisabilité économique, la facilité de gestion, sa rentabilité, et un entretien minimal. En tant que technologie respectueuse de l'environnement, elle peut être mise en œuvre à grande échelle et réduire le risque de propagation de produits polluants toxiques.

La phytoremédiation repose essentiellement sur les interactions entre les plantes, le sol et ses micro-organismes. Les plantes vont soit absorber le contaminant pour le métaboliser ou le stocker, soit réduire voire empêcher la libération du contaminant dans d'autres compartiments de l'environnement. Certaines plantes ont la capacité d'extraire les polluants du sol par les racines et les transférer ou les concentrer dans d'autres endroits de la plante (tiges, feuilles, racines,...etc).

2. Mécanismes

Lorsqu'il s'agit de sols contaminés par les HAPs, la phytoremédiation comprend six mécanismes régies par l'absorption directe; la volatilisation, les sécrétions végétales et la décomposition enzymatique. La dégradation par les communautés microbiennes telluriques peut aussi avoir lieu (Chen *et al.*, 2016). Cependant, la phytoremédiation des hydrocarbures repose avant tout sur l'interaction de plantes avec un sol contaminé. Les plantes réduisent le niveau de pollution des sols par plusieurs mécanismes, y compris la phytostabilisation, la phytoextraction, la phytodégradation, la rhizodégradation, la phytovolatilisation ou l'évapotranspiration et la rhizofiltration (Corami, 2021 (Fig53)). Il est à noter que la phytodégradation, la phytoextraction et la phytovolatilisation appartiennent à la phytodécontamination, c'est-à-dire qu'elles visent à réduire la teneur des contaminants dans le sol. Chacun de ces mécanismes ont des effets sur le volume, la mobilité ou la toxicité des contaminants. Mis à part la phytostabilisation qui s'applique préférentiellement *in situ*, toutes les autres techniques de phytoremédiation peuvent être également appliquées *ex situ*.

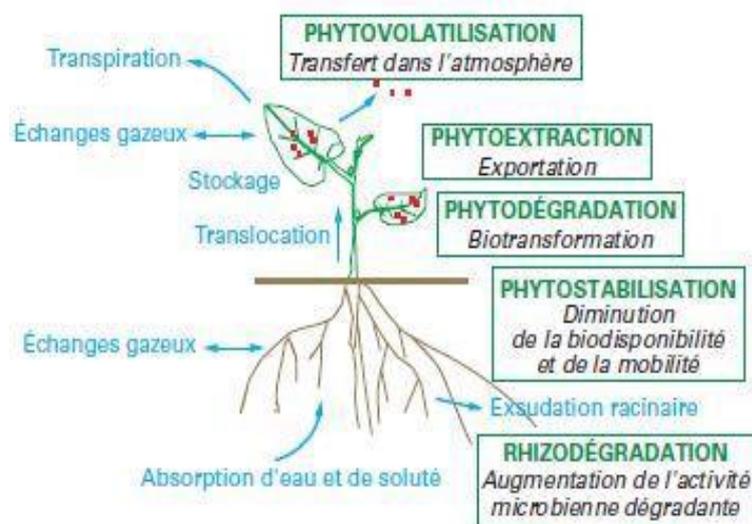


Figure 53. Principaux mécanismes de phytoremédiation
(Sterckeman *et al.*, 2012)

3. La phytotransformation ou phytodégradation

C'est la principale voie de recherche et d'application de la phytoremediation qui concerne essentiellement la pollution organique. Elle est basée sur la culture de plantes possédant des propriétés de tolérance et d'accumulation des polluants. C'est un processus par lequel les plantes absorbent, mobilisent et dégradent certains contaminants organiques dans les tissus végétaux eux-mêmes à travers l'activité métabolique de la plante (production d'enzymes de type monooxygénases, cytochrome P450s, laccase, peroxydase, oxygénase, dioxygénase, nitrilase, phénol 2-monooxygénase (PMO), and cytochrome P45090B1) (Kurade *et al.*, 2021). Si les molécules toxiques sont trop concentrées ou si la vie microbienne du sol n'est pas assez développée, ce processus sera ralenti voir irréalisable. L'apparition d'une dégradation et d'une réduction à l'intérieur du corps végétal en tant que processus physiologique sans dépendre des micro-organismes constitue le principal avantage de cette approche. En revanche, l'apparition de produits finaux toxiques est difficile à détecter, ce qui crée un inconvénient. Le mécanisme de phytodégradation a été prouvé pour éliminer de multiples contaminants dans le sol et l'eau, y compris les hydrocarbures pétroliers, résidus pharmaceutiques, insecticides, pesticides et tensioactifs (Grzegórska *et al.*, 2020). Cependant, l'absorption des composés organiques par la plante dépend du type de plante, du temps de séjour du contaminant dans le sol et des propriétés chimiques et physiques du sol.

3.1. La phytoextraction/ phytoaccumulation

Les plantes absorbent du sol les contaminants et les accumulent dans leurs parties aériennes que l'on peut par la suite récolter. (Yanitch *et al.*, 2020). Ces plantes accumulatrices sont capables, grâce à une physiologie adaptée, d'accumuler jusqu'à 1% de leur matière sèche en métaux lourds, ce qui est un taux très supérieur à la normale. L'efficacité de la phytoextraction dépend de divers paramètres, notamment la biodisponibilité des métaux lourds, les caractéristiques du sol, la capacité de la plante à absorber les métaux et à les accumuler dans ses parties aériennes (Yan *et al.*, 2020). Environ 450 à 500 plantes différentes ont été reconnues comme hyperaccumulatrices (Chaudhary *et al.*, 2018). Les espèces végétales doivent avoir les caractéristiques suivantes pour être adaptées à la phytoextraction : (i) une tolérance aux métaux nocifs, (ii) la production d'une biomasse élevée et (iii) des accumulateurs actifs de métaux lourds dans des parties facilement récoltables (Suman *et al.*, 2018).

Le problème des métaux dans l'environnement est qu'ils ne sont pas toujours bio-disponibles (solubles dans l'eau), les ions métalliques peuvent être fixés à d'autres ions et deviennent indisponibles pour les plantes. Dans ce cas il faudra parfois ajouter des molécules que l'on appelle " chélateurs " afin de " libérer " les métaux. Cependant, un hyperaccumulateur a le potentiel d'acquérir des concentrations élevées de métaux et de métalloïdes, mais son taux de croissance lent limite souvent son application (Ranieri *et al.*, 2020).

3.2. La phytostabilisation

La phytostabilisation consiste à établir une végétation recouvrant la surface des sites pollués pour limiter la mobilité et la biodisponibilité des contaminants dans le sol ou la rhizosphère par immobilisation chimique (précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage) ou prévention des mouvements latéraux ou en profondeur via l'érosion ou le lessivage par accumulation de racines ou immobilisation à l'intérieur de la rhizosphère, réduisant ainsi la pollution hors site. Cette technique est utilisée dans la stabilisation des sols contaminés par des métaux (bismuth, cadmium, chrome, cuivre, nickel, plomb, zinc) et métalloïdes (arsenic, antimoine). Mahdavian *et al.* (2022) ont rapporté que *Scariola orientalis* peut être utilisée comme espèce végétale efficace dans la phytoremédiation (phytostabilisation) des sols pollués par Zn et Fe.

3.3. Phytovolatilisation

La phytovolatilisation fait référence à l'utilisation de plantes pour absorber des polluants et des métaux lourds et les transformer en formes chimiques volatiles moins dangereuses via la transpiration. Il a été démontré qu'un petit nombre de plantes naturelles ou génétiquement modifiées, telles que la moutarde indienne (*Brassica juncea*) et l'*Arabidopsis thaliana*, sont capables d'évapotranspirer les polluants par leurs stomates dans l'environnement (Khalid *et al.*, 2017).

L'avantage de la phytovolatilisation par rapport aux autres stratégies de phytoremédiation est que les contaminants (métaux lourds, métalloïdes) sont éliminés du site et dispersés sous forme de composés gazeux, sans qu'il soit nécessaire de récolter et d'éliminer les plantes. Cependant, en tant que stratégie corrective, la phytovolatilisation n'élimine pas complètement les polluants: ils sont toujours dans l'environnement. De plus, ils peuvent être redéposés sur le sol par les précipitations (Vangronsveld *et al.*, 2009).

3.4. Rhizodégradation

La phytostimulation ou rhizodégradation désigne le processus par lequel les exsudats racinaires, tels que des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des acides gras et des stéroïdes et d'autres enzymes, essentiels au maintien de la diversité et l'activité microbienne rhizosphérique (Lareen *et al.* 2016). Cependant, les racines peuvent augmenter l'aération et l'humidité du sol, ce qui rend les conditions de biodégradation par les micro-organismes plus favorables (Corami 2017). De plus, les micro-organismes rhizosphériques peuvent accélérer les processus en volatilisant les contaminants (Corami 2017).

3.5. Rhizofiltration

La rhizofiltration (contrôle hydraulique), est la méthode basée sur la capacité des racines des plantes à adsorber ou absorber les polluants dans la solution autour de la zone racinaire (Chandra et Kumar, 2017). Grâce à ce mécanisme de phytoremédiation, il est possible d'éliminer les métaux tels que Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et V ainsi que les radionucléides (U, Cs, Sr) (Kaur *et al.*, 2020). Plus de 100 familles de plantes hyperaccumulatrices les plus courantes parmi celles-ci les *Brassicaceae*, les *Fabaceae*, les *Asteraceae*, les *Poaceae*, les *Euphorbiaceae*, etc. (Sarma *et al.* 2011). Il est également rapporté que les plantes appartenant à une région particulière devraient être utilisées pour la technologie verte plutôt que les espèces végétales exotiques en raison d'un meilleur taux de croissance et de survie des espèces indigènes.

4. Phytoremédiation des déchets industriels : cas des hydrocarbures

Les déchets industriels complexes générés par différentes industries de transformation, tels que les hydrocarbures, sont une source majeure de pollution des sols et des eaux de surface dans l'environnement. En raison de leurs propriétés intrinsèques, les hydrocarbures sont des polluants persistants présentant une large gamme de toxicité biologique; dont l'élimination de l'environnement est une préoccupation mondiale. Ces polluants sont omniprésents dans les écosystèmes aquatiques et terrestres ainsi que dans l'atmosphère (Adeniji *et al.*, 2019).

4.1. Critère de sélection des plantes phytoremédiatrices

La sélection des espèces végétales est un facteur essentiel pour une phytoremédiation réussie et les plantes doivent avoir (i) taux de croissance élevé, (ii) une forte production de biomasse, (iii) système racinaire largement développé, (iv) faciles à récolter et (v) d'un

potentiel de tolérance et d'accumulation (Khan *et al.*, 2023). Les espèces de plantes ligneuses à croissance rapide, telles que le peuplier et le saule, sont faciles à régénérer grâce à leurs étendues racinaires et leur taux d'évapotranspiration élevé qui stabilisent les polluants ; ce qui fait qu'ils peuvent prospérer sur des sols contaminés. Ces plantes ont également des taux de production de biomasse plus élevés et peuvent résister à un large éventail d'éléments potentiellement nocifs dans leur système racinaire (Wani *et al.*, 2020). Cependant, la sélection de plante repose principalement sur les caractéristiques des contaminants et leurs niveaux de concentration (Pilon-Smits, 2005), la profondeur et les taux de volatilisation (Ghosh et Singh, 2005), l'âge de l'emplacement (Hutchinson *et al.*, 2001) et la biodégradabilité (Joner et Leyval, 2003). Dans le processus de phytoremédiation, il est préférable d'utiliser des plantes indigènes puisque les plantes introduites pourraient affecter la biodiversité. De plus, la phytoremédiation dépend de nombreux facteurs, tels que la biodisponibilité des polluants dans le sol, les propriétés du sol et les espèces végétales impliquées (Raklami *et al.*, 2020).

4.2. Passage des hydrocarbures du sol/air vers la plante

Le transfert des hydrocarbures du sol à la plante par les racines est la voie d'entrée principale identifiée dans les cas de pollutions supérieures à 100 mg kg^{-1} sol sec (Collins et Finnegan, 2010). Selon Trapp et Legind (2011), les différentes voies de passage sont :

- * prélèvement depuis le sol par les racines via le courant de transpiration ;
- * prélèvement depuis l'air par les feuilles ;
- * diffusion via les stomates et les cuticules des feuilles à partir de la phase gazeuse) ;
- * translocation des racines vers les feuilles (ou les fruits) avec le flux de transpiration dans le xylème ; et des feuilles vers les racines dans la sève élaborée via le phloème.

Le transport des polluants hydrocarbonés dans la plante est un phénomène de translocation (diffusion des polluants et/ou de leurs métabolites dans la plante). Ils vont utiliser les systèmes de transport de la sève (xylème et phloème) afin d'être transférés au sein de la plante. Selon leurs pressions de vapeur, certains composés peuvent également se volatiliser depuis le sol et pénétrer la plante par le système foliaire mais en des quantités négligeables (Jia *et al.*, 2021).

Diverses plantes ont été identifiées pour leur potentiel à faciliter la phytoremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures. Il s'agit de jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), fétuque élevée (*Festuca arundinacea*), ray-grass (*Lolium perenne*), luzerne (*Brassica campestris*), pâturin lisse (*Poa pretensis*), digitale sanguine [*Digitaria sanguinalis* (L.)

Scop.], Bermudes l'herbe [*Cynodon dactylon* (L.) Pers] et le panic raide (*Panicum virgatum* L.) (Qixing *et al.*, 2011).

4.3. Devenir des hydrocarbures dans la cellule végétale

Au niveau des cellules végétales, les xénobiotiques semblent suivre deux voies principales : soit ils sont retenus de manière passive par les composés pariétaux, soit ils entrent dans un processus de biotransformation. Dans une cellule végétale, les polluants organiques tels que les hydrocarbures, ils peuvent être dégradés par divers mécanismes:

- une capacité de détoxification importante,
- l'utilisation d'enzymes spécifiques,
- l'élimination des polluants des tissus sensibles.

En général, la dégradation se déroule en quatre étapes : prélèvement et transport, réactions de transformations (oxydation, réduction), conjugaison ou association à d'autres composés (par exemple, acides aminés, sucres, acides organiques), et séquestration ou compartimentation. Il s'agit ainsi pour la plante de transformer le contaminant en une molécule moins toxique puis de l'isoler de ses zones d'activité métabolique. (Leglize *et al.*, 2011). Le métabolisme des xénobiotique (dont les HAPs) dans la plante se déroule en trois phases, comparable à celles du métabolisme animal (Fig 54) :

- **La Phase I** : est une phase d'oxydation, au cours de laquelle la molécule est fonctionnalisée. Cette étape est catalysée par des enzymes de type monooxygénase à cytochrome P₄₅₀ et des peroxydases (Lyubun *et al.*, 2020). Elle donne lieu à la formation d'époxydes, de quinones et de phénols. Cette capacité à métaboliser les HAP a souvent été montrée pour des cellules végétales en cultures (Coleman *et al.*, 1997).
- **La phase II** : procède par conjugaison à diverses molécules hydrosolubles, parmi lesquelles des sucres, des acides aminés, l'acide élлагique (Sayer *et al.*, 1982) et le glutathion, grâce à l'action de glutathion-transférases. Cette molécule a un rôle central car elle est présente en grande quantités au niveau des centres de la photosynthèse, son rôle principal étant la protection contre les radicaux libres qui s'y forment, a travers son action de detoxication et d'élimination des xenobiotiques a travers les glutathion-transferases (Coleman *et al.*, 1997). Tandis que l'acide ellagique neutralise les fonctions diols.
- **La phase III** : se produit lorsque le composé n'est pas totalement libéré ou métabolisé par la plante une fois l'étape de conjugaison passée. Le but de cette étape est de rendre les polluants non extractibles et inertes. A cet effet, ces xénobiotiques sont déposés dans la

vacuole ou incorporés dans les tissus structuraux comme la paroi pectocellulosique. Pour ce faire, les produits conjugués doivent être liés à des molécules structurales tels que la lignine ou l'hémicellulose dans les feuilles ; la pectine et la lignine au niveau des tiges.

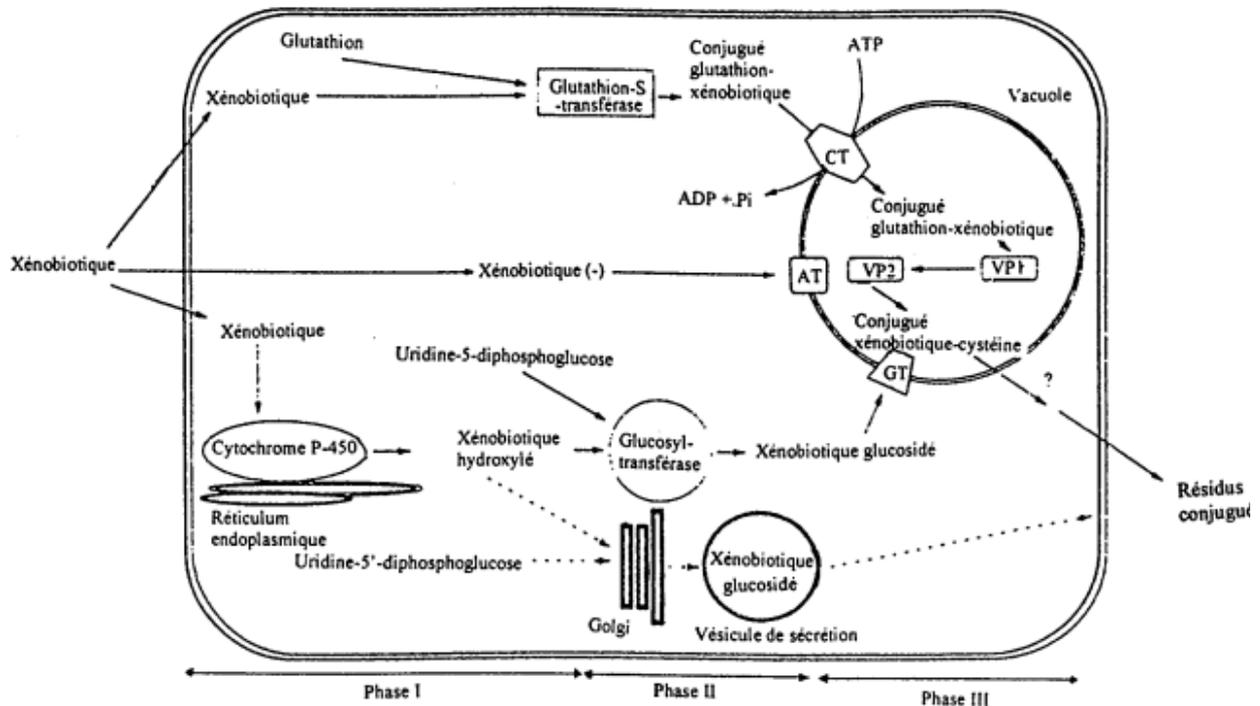


Figure 54. Processus de détoxification des xénobiotique dans la cellule végétale (Coleman et al., 1997)

CT: transporteur conjugué du glutathion; AT: transporteur ATP dépendant des xénobiotique anioniques; GT: transporteur ATP-dépendant conjugué des glucosides; VP : peptidase vacuolaire.

4.4. Interactions plante-microorganismes pour remédier aux hydrocarbures

Dans le sol, les micro-organismes (symbiotiques, non symbiotiques-rhizoéphytes et/ou endophytes) et les plantes interviennent à la fois individuellement et en synergie pour la dégradation ou la transformation des hydrocarbures pétroliers en produits moins nocifs pour l'environnement et moins persistants que les composés d'origine (Kotoky *et al.*, 2018). Le terme « microbiome » ou « phytomicrobiome » fait généralement référence à l'ensemble des communautés microbiennes (champignons, levures, bactéries, algues, nématodes, archées, etc.) qui colonisent les différentes parties d'une plante (Bhatt *et al.*, 2020). Les microorganismes occupent la plupart des compartiments végétaux, notamment la surface des feuilles (phyllosphere), la surface des racines (rhizoplane), la zone de sol qui s'étend environ 1mm autour des racines (rhizosphere), ainsi que les parties internes des différents organes aériens et souterrains (endosphere) (Bhatt *et al.*, 2020). Les interactions entre les plantes et les

communautés microbiennes du sol reposent essentiellement sur des bases de signalisation/communication mais surtout sur des relations trophiques. Les plantes dépendent des microorganismes pour leur nutrition et leur santé et les microorganismes dépendent des plantes pour leur fournir les nutriments nécessaires à leur croissance.

Plusieurs micro-organismes, notamment les rhizobactéries, les mycorhizes et les levures, ont été proposés comme inoculants cibles pour améliorer la croissance, la tolérance, les performances et le processus de phytoremédiation des plantes (Raklami *et al.*, 2020). Une attention particulière pour les rhizobactéries car ils ont un potentiel considérable pour améliorer l'efficacité de la phytoremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. Ils peuvent favoriser la croissance des plantes, améliorer l'absorption des nutriments, protéger les plantes contre divers stress abiotiques et biotiques et améliorer la fertilité et la structure du sol (Ben-Laouane *et al.*, 2021). Ceci est réalisé grâce à divers mécanismes directs et indirects, notamment la fixation de l'azote atmosphérique, la solubilisation du phosphore et du potassium, la production de phytohormones (Raklami *et al.*, 2019). Cependant, les champignons mycorrhiziens forment une relation symbiotique intime avec les plantes hôtes, ont été appliquées dans de nombreux processus de bioremédiation (Rubin et Görres, 2021).

L'action des végétaux sur la dégradation des hydrocarbures peut se faire de manière directe ou indirecte. En effet, les racines produisent des enzymes de type peroxydase, capables d'oxyder les hydrocarbures. Ils libèrent du carbone par la perte de tissus ou cellules et l'exsudation de différents types de métabolites primaires et secondaires (acides organiques, acides aminés, acides gras, glucides, vitamines, polysaccharides, protéines, etc.) qui attirent et nourrissent les microorganismes du sol (Rohrbacher et St-Arnaud, 2016). La majorité des molécules excrétées est utilisée comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes environnant et va ainsi stimuler l'activité microbienne de la rhizosphère. Il est à noter aussi que les bactéries (endophytes ou rhizobactéries) dégradant les hydrocarbures sont à l'origine de leur choix pour une bonne phytoremédiation (Afzal *et al.* 2019). En faite, l'une des phytohormones les plus étudiées est l'acide indole-3-acétique (AIA) qui est une auxine importante pour plusieurs processus physiologiques, y compris la signalisation inter cellulaire, la régulation du développement des plantes et l'induction des systèmes de défense des plantes (Afzal *et al.*, 2019). De plus, l'AIA peut augmenter le nombre de poils absorbants, le nombre de racines latérales et la surface racinaire totale, conduisant à une amélioration de l'exsudation racinaire et de l'absorption des minéraux du sol (Kong *et al.*, 2015). Les rhizobactéries peuvent également se comporter comme des phytostimulants en produisant des phytohormones responsables de l'amélioration de la croissance des plantes comme l'IAA ou

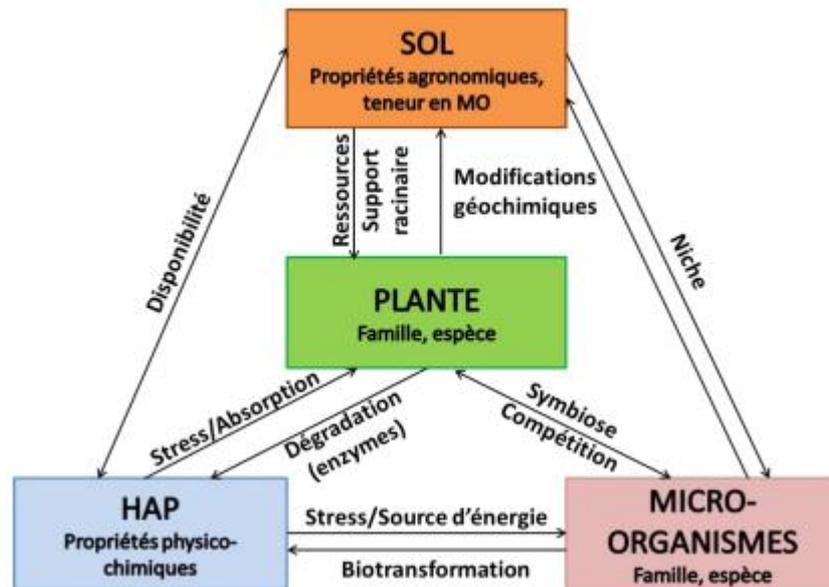


Figure 56. Schéma conceptuel des interactions entre les acteurs majeurs de la rhizodégradation (In Dupuy, 2014)

5.1. Caractéristiques du site et propriétés des polluants

Pour pouvoir dépolluer des sols, les plantes et les micro-organismes qui leur sont associés doivent être en contact avec le polluant. Le devenir d'un polluant dans le système sol/plante est donc déterminé par sa biodisponibilité qui dépend d'un ensemble de caractéristiques physicochimiques de la molécule et d'interactions complexes de celle-ci avec le milieu. Les premiers et les plus importants facteurs qui affectent le processus de phytoremédiation sont l'emplacement et les caractéristiques du site contaminé. L'étendue et le type de contaminants présents sur le site déterminent l'efficacité de la rémédiation (Abatenh *et al.*, 2017). La composition chimique des hydrocarbures pétroliers est un élément clé qui influe sur la biodégradation (Al-Hawash *et al.*, 2018). Ces facteurs peuvent être surmontés et gérés par une enquête et une caractérisation préalables suffisantes des sites avant le choix et la mise en œuvre du processus d'assainissement.

5.2. Les caractéristiques environnementales

Les paramètres du sol comme la température, le pH, la teneur en matière organique, l'humidité du sol peuvent influencer la croissance de la plante et l'activité des microorganismes susceptibles de dégrader les polluants. Ces interactions sol/plante (Fig57) peuvent modifier la biodisponibilité des polluants organiques et métalliques.

La température est le facteur qui détermine la survie et la croissance des micro-organismes ainsi que les propriétés physiques et chimiques des hydrocarbures (Al-Hawash *et al.*, 2018). Ce paramètre joue un rôle essentiel dans le processus de remédiation assisté par les microorganismes en affectant à la fois les états physiques et chimiques des contaminants présents dans les sites pollués et en interrompant les métabolismes microbiens, le taux de croissance, la matrice du sol et la solubilité des gaz (Megharaj *et al.*, 2011).

Le pH a ses propres impacts sur l'activité métabolique des micro-organismes, ce qui peut augmenter ou diminuer le processus d'élimination. La phytodégradation peut être appliquée dans une large gamme de pH. Cependant, un pH de 6,5 à 8,5 est considéré comme le potentiel maximum pour assainir la plupart des systèmes terrestres et aquatiques (Abatenh *et al.*, 2017).

De même, la concentration, la disponibilité et le type des nutriments sont également importants pour la croissance et l'activité microbienne dans le processus de bioremédiation. Les éléments fondamentaux (tels que le carbone, l'azote et le phosphore) aident les microbes à produire les enzymes nécessaires pour décomposer les polluants. Il a été rapporté qu'un excès d'azote dans le milieu contaminé entraîne une croissance microbienne (Varjani et Upasani, 2017). De plus, une concentration plus élevée d'azote, de phosphore et de potassium entrave l'efficacité de la biodégradation des hydrocarbures. En raison de l'activité métabolique microbienne, des matières organiques carbonées vont s'accumuler dans les zones contaminées par des hydrocarbures et entraîne un épuisement rapide des nutriments inorganiques, comme l'azote, le phosphate et le potassium ce qui va limiter par la suite le taux et le degré de biodégradation et biotransformation des hydrocarbures (Kebede *et al.*, 2021).

D'autres facteurs environnementaux tels que l'oxygène, l'humidité, potentiel redox, salinité...) qui conduisent à des modifications des propriétés biologiques et microbiologiques.

5.3. Les caractéristiques du végétal

La sélection judicieuse des végétaux est une étape critique qui aura une influence déterminante sur le succès d'un traitement par phytoremediation. Plusieurs centaines de végétaux, incluant des plantes ligneuses et des herbacées, ont été étudiés et identifiés pour leur capacité phytoremediatrice (Khan *et al.*, 2021; Patra *et al.*, 2021). Bien que toutes les plantes n'aient pas le même potentiel d'action sur les contaminants environnementaux, elles doivent, d'abord et avant tout, être bien adaptées aux conditions climatiques et édaphiques du site à traiter. Il est généralement souhaitable de sélectionner des plantes qui ont une croissance rapide; qui produisent des quantités élevées de biomasse aérienne; qui ont un système

racinaire largement répandu et ramifié; qui sont faciles à cultiver et à récolter; et qui sont tolérantes aux contaminants, aux ravageurs et aux autres facteurs de stress (Gerhardt *et al.*, 2017).

Une plante serait intéressante pour la dépollution si elle est capable de stabiliser, accumuler ou dégrader les hydrocarbures et sécréter les exsudats afin de stimuler les microorganismes qui vont dégrader ces polluants organiques dans le sol. La plante doit aussi être capable d'absorber des concentrations élevées en polluants organiques et métalliques, de les transformer par activités enzymatiques. Par la phytoextraction, la plante envisagée doit avoir un niveau élevé d'absorption, de translocation et d'accumulation dans les parties aériennes qui seront ensuite récoltées (Kumar *et al.*, 2021). Cependant, les plantes ont la capacité de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales grâce à leur plasticité phénotypique, c'est-à-dire les différents phénotypes qu'elles peuvent exprimer à partir de leur unique génotype (Nicotra *et al.*, 2010).

Tous ces facteurs n'agissent pas au même niveau pour modifier la biodisponibilité du polluant. Ils peuvent avoir un rôle dans l'interaction sol-eau et/ou eau-plante et jouer un rôle important dans le devenir du polluant au cours d'un processus de phytodépollution.

6. Analyses et protocole expérimental

Cette partie décrit successivement le matériel et les méthodes de préparation communs et les plans d'expérimentation des cultures réalisées. Nos cultures et analyses expérimentales ont été effectuées au niveau de l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie Taoufik Khaznadar (ENSB) de Constantine. Ce travail met en évidence la complexité du système impliqué dans la phytoremédiation des hydrocarbures par l'utilisation d'une bioaugmentation. Cinq principaux acteurs sont ainsi mis en relation : le substrat, la plante, le polluant, les souches individuelles et la population fongique.

6.1. Les produits pétroliers

Le pétrole brut utilisé lors de la phase expérimentale. Il a été fourni par SONATRACH.

6.2. Le matériel fongique

Les souches *Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) et *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1) isolées et identifiées des bourbiers pétroliers sont repiquées sur milieu PDA et incubées à 30⁰ C. L'inoculum sporal est préparé à partir d'une jeune culture, puis filtré à travers une double couche de mousseline stérile. Le filtrat récupéré

est dilué avec de l'eau distillée stérile pour obtenir une concentration de 10^8 spore/ml. Le comptage des spores a été réalisé à l'aide d'une cellule de Malassez.

6.3. Le matériel végétal

Les graines utilisées dans notre expérimentation sont celles du soja et d'arachide.

➤ **Le soja** (*Glycine max* L. Merr) est une plante herbacée annuelle; dressée, elle ressemble aux haricots, qui peut atteindre 2 m de haut selon les variétés et les conditions de culture. C'est une légumineuse (Tab 14) dont les graines sont riches en protéines. Les feuilles sont alternes, trifoliées selon les variétés. L'inflorescence est une fausse grappe qui se forme à l'aisselle des feuilles, densément poilue. La fleur est petite de couleur blanche rose violette ou bleuâtre. Le fruit est une gousse verte déhiscence, grise ou brune à maturité, généralement comprimé avec 2 à 3 graines (photo3) suivant les variétés. Le système racinaire est pivotant avec de nombreuses nodosités.

Tableau 14 . Classification botanique du soja (NCBI Taxonomy Browser, 1988).

Règne	<i>Viridiplantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Super-classe	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Sous-famille	<i>Papilionoideae</i>
Tribu	<i>Phaseoleae</i>
Genre	<i>Glycine</i>
Espèce	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill (1917)



Photo 3. Les graines de Soja

➤ **L'arachide** (*Arachis hypogea* L.) est une légumineuse (Tab 15), appartenant à la famille de Fabacées, dont la culture est répandue en climat tropical ou subtropical et qui fournit une matière grasse utilisée en huilerie. L'arachide est une plante annuelle bien que certaines formes soit vivaces. Les arachides sont de plantes autogames, de 30 à 70 cm de haut, érigées ou rampantes, à croissance continue dont le fruit mûrit en terre. Sa forme peut être sphérique, elliptique ou plus ou moins allongée avec une partie souvent aplatie dans la zone de contact avec la graine voisine, la couleur de tégument séminal est blanche, rose, rouge ou violacée (Abdoul Habou, 2003) (photo4).

Tableau 15 . Position systématique de l'Arachide (Singh et Simpson, 1994)

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Fabales</i>
Famille	<i>Fabaceae</i>
Tribu	<i>Aschnomeneae</i>
Sous tribu	<i>Stylosanthenae</i>
Genre	<i>Arachis</i>



Photo 4. Graines d'Arachide

Le choix du Soja et de l'Arachide, utilisés comme plante modèle dans cette étude, s'est fait sur plusieurs critères : (i) Les deux plantes sont des légumineuses ayant une association symbiotique bénéfique. Leur fonctionnement a été et continue d'être fortement étudié en termes de physiologie mais également pour leur potentiel dans la rhizodégradation. Ces légumineuses sont connues pour leur tolérance à différents stress biotiques et abiotiques (tolérante aux sels, à la sécheresse et à quelques maladies). (ii) Elles ont une croissance rapide avec une biomasse élevée, grâce à la relation symbiotique.

6.4. L'expérimentation

6.4.1. Le support de culture

Deux types de culture ont été menés, selon l'objectif des investigations:

- * **Substrat 1 (Subst 1)** constitué de 100% terreau,
- * **Substrat 2 (Subst 2)** constitué d'un mélange terreau/sable (50/50)

Les deux substrats ont été pollués par le pétrole brute à 10 % (w\v), bien mélangés et laisser sous serre pendant 15 jours.

6.4.2. Mise en germination

En première étape, le 20 Mars 2021, des graines saines sont sélectionnées selon leur taille, leur forme et leur couleur, elles, sont désinfectées avec l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 3 minutes ensuite rincées à l'eau distillée stérile trois fois pendant 5min. Après, elles ont subi un choc thermique de 4°C pendant 24h, pour lever la dormance tégumentaire, puis sont réparties en lots de 20 graines disposées dans des boites de pétri tapissées de deux couches de papier filtre stérile pendant une semaine, a une température ambiante. L'essai de germination a duré 3 jours.

6.4.3. Inoculation et semi des platules

En seconde étape, les graines germées sont mises en culture dans des alvéoles contenant seulement du terreau (photo 5). Après 15 jours, au stade de 3 feuilles, les jeunes plantules vont subir un stress hydrique de 2 jours, puis sont soigneusement déterrées des alvéoles. Leurs racines sont bien rincées puis on coupe le bout des racines à 5 cm avec des ciseaux stériles. Ils sont ensuite plongés dans 10 ml d'inoculum pendant 30 minutes. Les plantes sont inoculées par *Aspergillus niger*, *Trichoderma ghanens* et la population (consortium) fongique (*A. niger* + *T. ghanens*).



Photo 5. Germination des graines d'arachide après levée de la dormance

6.4.4. Mise en place de l'essai

La troisième étape, consiste à mettre les plantes inoculées dans des pots (photo 6) contenant chacun 1 kg de chaque substrat pollué avec 10% de pétrole brut. L'expérience est réalisée en 5 répétitions avec deux témoins : un témoin positif (substrat pollué et plante non inoculée), et un témoin négatif (substrat non pollué et plante non inoculée) (Fig 57). La culture a duré 45 jours.



Photo 6. Les cultures en pots

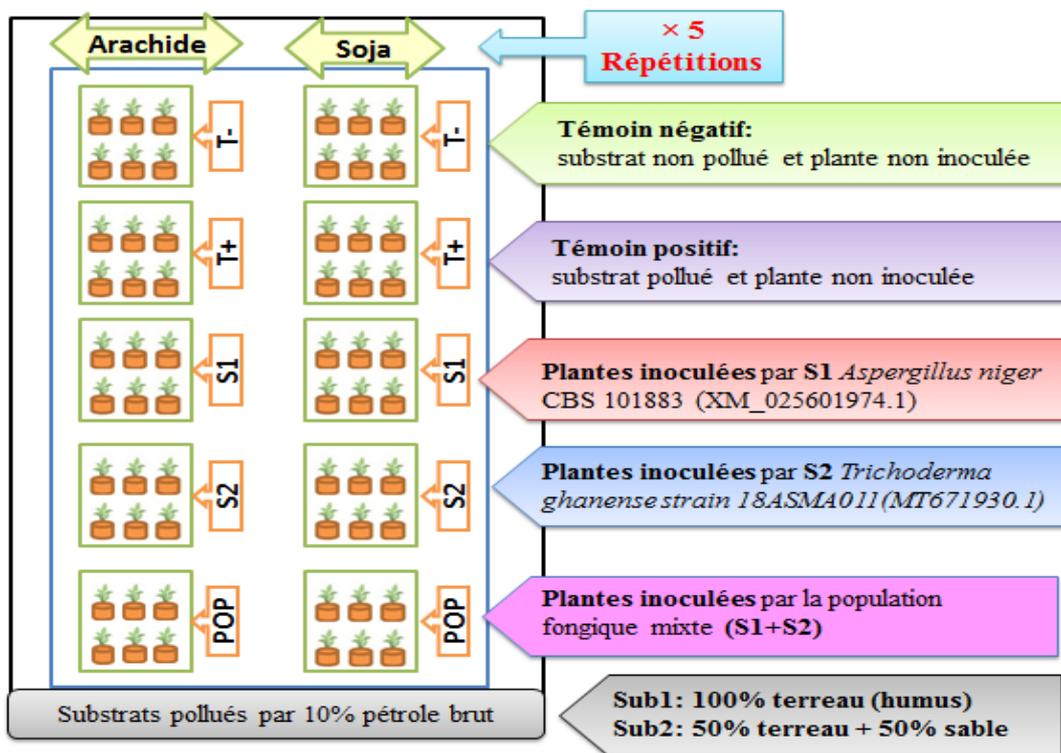


Figure 57. Protocole expérimental schématisé

6.5. Paramètres physiologiques

6.5.1. Le taux de germination

Sur le nombre de graines utilisées en test de germination (Nt), et le nombre de graine germées (Ni), nous calculons le taux de germination (Tg) d'après (Zemani, 2009) selon la relation suivante : $Tg = \frac{Ni}{Nt} \times 100$

6.6. Les paramètres biométriques

6.6.1. La croissance en longueur

Afin de suivre la croissance de la plante durant la période de stress, la partie aérienne et racinaire de la plante ont été mesurées à l'aide d'une règle graduée. La partie aérienne a été mesuré à partir de la première semaine de plantation dans les pots jusqu'à la dernière semaine, la partie racinaire a été mesuré le dernier jour de l'essai après avoir déposé les plantes.

Différence de longueur aérienne = longueur finale - longueur initiale

6.6.2. Le nombre de feuilles

Les feuilles ont été comptées chaque semaine pour évaluer la croissance des plantes.

Différence de nombre de feuilles = nombre final – nombre initial

6.6.3. Croissance pondérale

La biomasse sèche aérienne (BSA) et racinaire (BSR), exprimée en gramme a été effectuée par pesée de la matière sèche après étuvage à 60⁰ C de la matière fraîche pendant 48h.

6.6.4. Rapport de la partie aérienne et racinaire

Le rapport en longueur: longueur de la racine/longueur de la tige (LR/LT) et celui en biomasse : biomasse sèche racinaire/biomasse sèche aérienne (BSR/BSA) ont été déduits à partir des valeurs moyennes des longueurs et des poids de la matière sèche.

6.7. Les paramètres biochimiques

6.7.1. La chlorophylle

La mesure de la teneur en chlorophylle a été réalisée à l'aide d'un SPAD-mètre .Un appareil portatif largement utilisé pour la mesure précise rapide et surtout non destructive pour la plante, les valeurs ont été proportionnelles à la quantité de chlorophylle qui est

présente dans les feuilles de notre plante. Le taux de chlorophylle est estimé par les valeurs du SPAD.

6.7.2. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par Troll et Lindesly (1955), simplifiée et mise au point par Dreier et Goring (1974) et modifiée par Monneveux et Nemmar (1986). Ce paramètre est quantifié en $\mu\text{g/gMF}$.

6.7.3. Dosage des sucres solubles

L'extraction et le dosage des sucres solubles, dans les feuilles et les racines des plantes, sont réalisés selon la méthode de Dubois (1956).

6.8. Dosage des enzymes de l'activité anti-oxydante et des protéines

Les échantillons destinés aux dosages des activités enzymatiques sont préparés selon le protocole décrit par Mukherjee *et al.* (2017) et Benhamdi *et al.* (2014) (*In Meghnous, 2020*).

6.8.1. Le dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est dosé selon la méthode de Kosugi et Kujikawa (1985)

6.8.2. Le dosage des protéines

La technique de dosage adoptée est celle de Lowry (1951).

6.8.3. Le dosage de la Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est dosée par la méthode décrite par Marklund (1974).

6.8.4. Le dosage de la catalase

Ce dosage est réalisé selon Chance *et al.* (1955).

6.9. Analyses statistiques des données

Une analyse de la variance à trois facteurs avec un seuil de signification $\alpha = 0.05$ a été effectué, une fois l'ANOVA est significative une comparaison multiple des moyennes a été réalisée (Duncan's multiple range) pour évaluer l'effet des facteurs sur nos paramètres. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du programme statistique Genstat release 11.1 software (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK).

7. Résultats

Rappel :

Substra 1	100% terreau	Substrat 2	50% sable, 50% terreau
Témoin (+)	Substrat pollué et plante non inoculée	Témoin (-)	Substrat non pollué et plante non inoculée
Souche 1	<i>Aspergillus niger</i> CBS 101883 (XM_025601974.1)	Souche 2	<i>Trichoderma ghanense</i> strain 18ASMA011(MT671930.1)
POP	Souche 1 + Souche 2		

7.1. Paramètres physiologiques

7.1.1. Le taux de germination

Selon les résultats, le soja a un taux de germination de 80%, tandis que l'arachide est de 100% (Fig 58). En présence du pétrole brut (10%), on remarque une diminution de ce taux avec le Soja plus que l'arachide.

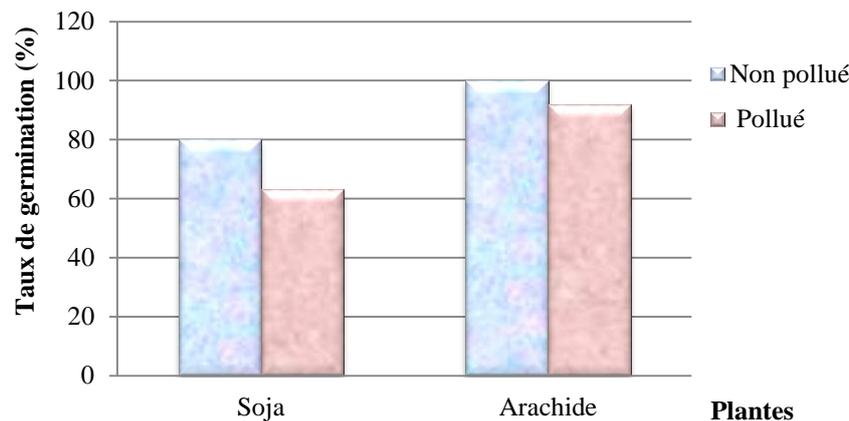


Figure 58. Taux de germination des plantes

7.2. Les paramètres biométriques

7.2.1. La croissance en longueur

7.2.1.1. La longueur aérienne des plantes

Selon la figure ci-dessous (Fig59), les longueurs moyennes aériennes des plantes cultivées sur le substrat 1 sont plus importantes que ceux du substrat 2. Cependant, nos témoins négatifs des deux plantes cultivées sur Sub1 ou Sub 2, sont presque similaires, par contre, nos résultats des témoins positifs sont dissemblables. En ce qui concerne les plantes testées, on remarque bien une diminution de ce paramètre, noté pour le Soja, d'une culture sur Sub1, les valeurs moyennes des longueurs aériennes de la population fongique (POP) ont enregistré une légère diminution (valeur maximale de 7,5 cm) ; à l'opposition du Sub 2, où la

valeur notée est minimale de 1 cm. Cependant, l'arachide de son coté a eu une valeur de 7,6 cm sur culture en Sub1, similaire à celle du T-. La souche 2 inoculée a donné un résultat presque similaire pour les deux substrats : 5,3 cm pour Sub1 et 5 cm pour le Sub2.

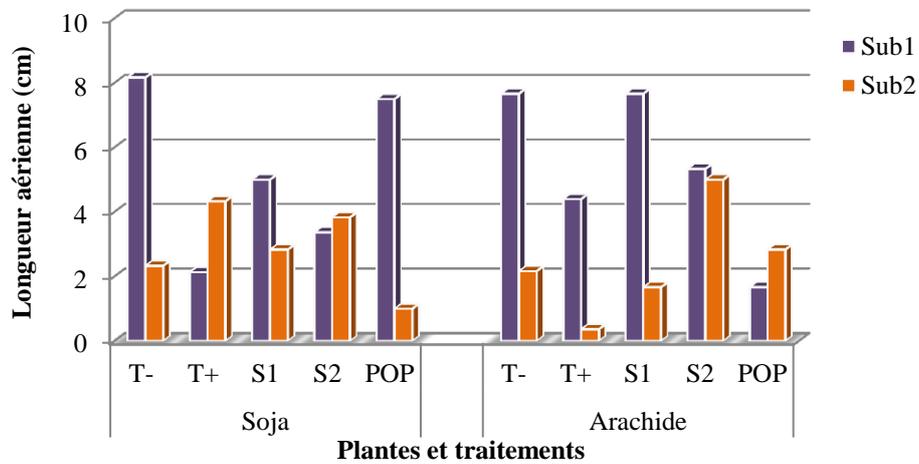


Figure 59. Valeurs de la longueur aérienne des plantes

7.2.1.2. La longueur racinaire des plantes

Selon la figure ci-dessous (Fig 60), l'on remarque que le substrat1 a donné un meilleur résultat. Selon la plante cultivée, les valeurs moyennes des longueurs racinaires enregistrés de l'arachide le sont ainsi meilleurs que le Soja. En effet, par rapport au témoin négatif, une diminution des résultats est notée avec le Sub 2, ou S1 a enregistré une minimale de 10,83 cm, à l'opposé du Sub 1 qui a supporté une augmentation des longueurs racinaires du Soja. Pour qui est de l'arachide, on remarque aussi une diminution des longueurs racinaires de cette plante cultivée sur les deux substrats et inoculée avec POP (13,16 cm) et S2 (15,5 cm), ainsi qu'une augmentation avec S1 sur Sub 2 (21,6 cm). Il paraît que les valeurs moyennes de S1 sur arachide sont presque similaires sur les deux substrats (21,4 et 21,6 cm).

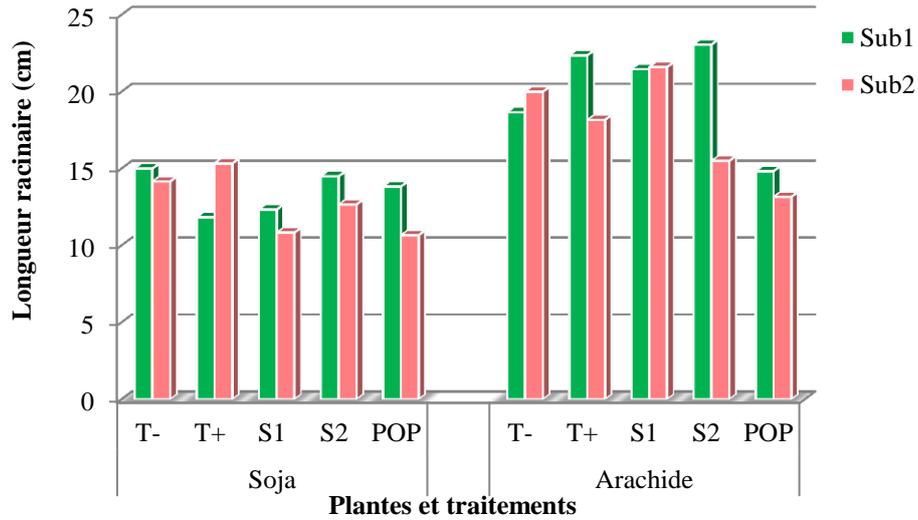


Figure 60. Valeurs de la longueur racinaire des plantes

7.2.2. Le nombre de feuilles

Entre les deux témoins (pollué et non pollué), on observe une augmentation du nombre de feuilles du Soja et de l'arachide cultivé sur Sub2. On remarque clairement une diminution du nombre des feuilles des deux plantes utilisées (Fig 61) par rapport aux témoins. En effet, le nombre moyen de feuilles comptées pour le Soja cultivée sur Sub1, sont importantes à ceux du Sub 2 avec une légère exception par le test avec S2. Par contre, le nombre moyen de feuilles d'arachide diminue dans le sens S1, S2 et POP ; pour les deux substrats, ou on note un nombre moyen du Sub1 respectivement de 7,6, 7,3 et 6,6 et du Sub2 un 4 recensé dans les trois tests.

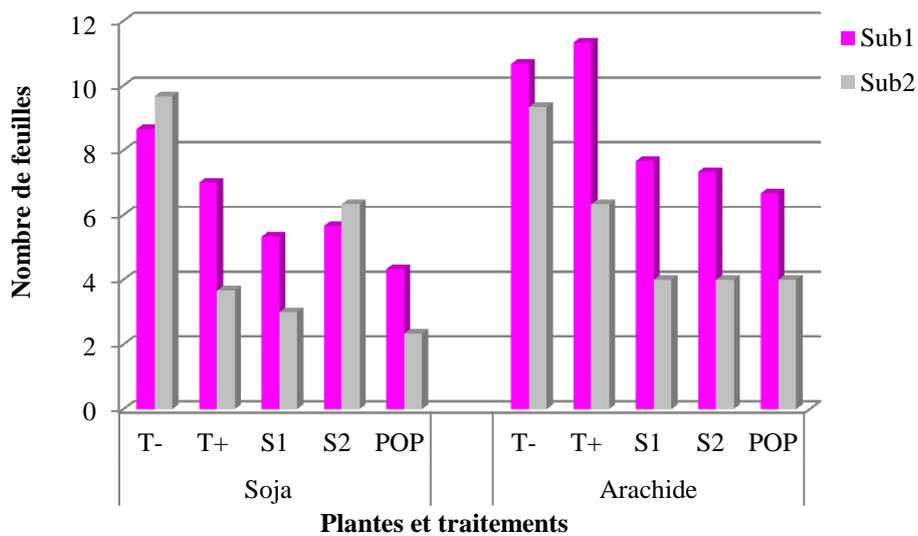


Figure 61. Nombre des feuilles des plantes

7.2.3. Croissance pondérale

Les valeurs moyennes de la croissance pondérale de la biomasse sèche aérienne (BSA) sur la biomasse sèche racinaire (BSR) (Fig 62), de la culture du Soja sur Sub 1 sont meilleurs que ceux du Sub2 avec une exception pour la S2. En effet, l'utilisation de la POP a donné les valeurs les plus basses de 0,3 et 0,4 pour respectivement Sub1 et Sub2. En parallèle, les valeurs enregistrées pour l'arachide cultivé sur Sub1 sont ainsi meilleurs que Sub2, ou on remarque que les valeurs moyennes de la croissance pondérale sont classées par ordre croissant comme suit : S1, S2 et S3 (0,9, 1,1 et 1,3).

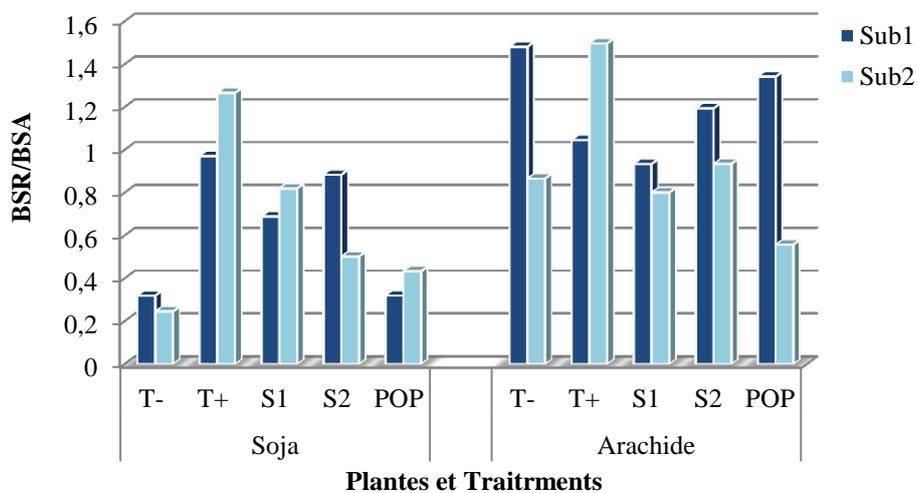


Figure 62. Les valeurs de la croissance pondérale des plantes

7.2.4. Rapport de la partie aérienne et racinaire

Les valeurs calculées du rapport en longueur (LR/LT) (Fig 63) par rapport aux témoins négatifs, montrent une maximale enregistrée avec le Soja inoculée avec POP, cultivée sur Sub2 de 10,66, et aussi avec l'arachide inoculée avec S1 et cultivée sur Sub2 de 12,96. Pour le reste des plantes traitées, on enregistre une diminution.

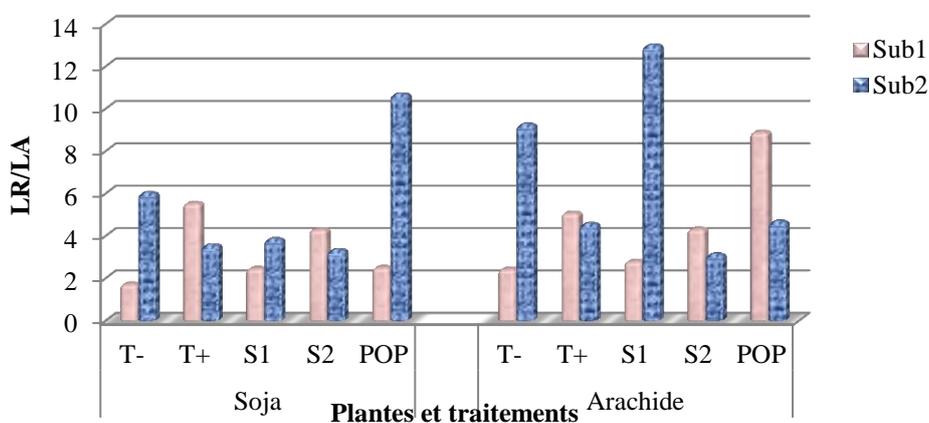


Figure 63. Les valeurs du rapport en longueur (LR/LT)

7.3. Les paramètres biochimiques

7.3.1. La Chlorophylle

Pour ce paramètre et par rapport aux témoins positifs cultivés sur Sub1 et Sub 2 (10.7 et 14.9 U. SPAD), les valeurs moyennes recensées de chlorophylle totale pour le Soja cultivés sur Sub 2 sont meilleures et la valeur moyenne maximale est notée avec POP de 18.96 U.SPAD (Fig 64). Une exception pour S1 ou les valeurs moyennes de chlorophylle totale de la plante cultivée sur Sub1 et Sub2 sont presque proches (14.13 et 13.66 U.SPAD. En ce qui concerne l'arachide, les valeurs moyennes de la chlorophylle totale cultivé sur Sub 2 sont meilleures. C'est ainsi que les valeurs des tests avec S1 et S2 sont presque proche ; ils sont respectivement pour le Sub 1 de 16 et 15.76 U.SPAD et pour le Sub2 de 10.3 et 10.2 U. SPAD.

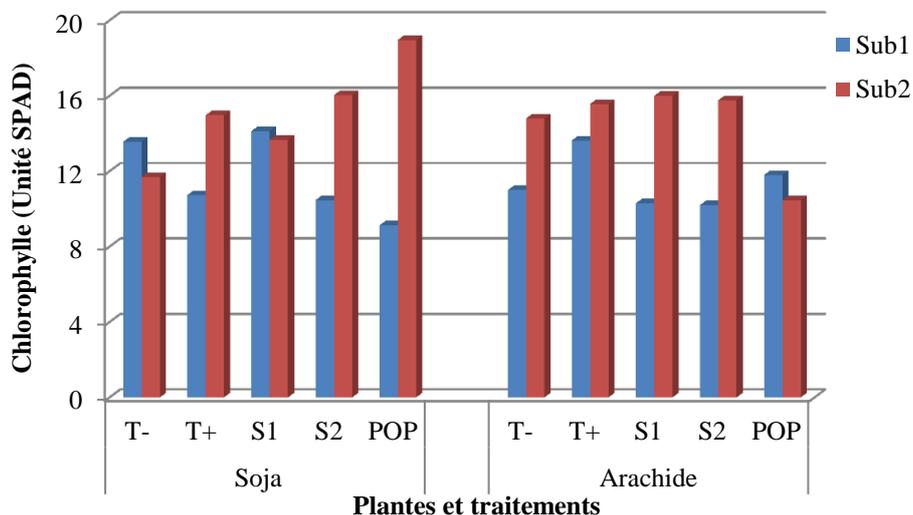


Figure 64. Valeurs des teneurs moyennes en chlorophylle des plantes

7.3.2. La proline

Les valeurs enregistrées de la prolines dans les racines et les feuilles du Soja (Fig 65), montrent par rapport au témoin positif (T+) et négatif (T-) du traitement sous substrat 1, une augmentation dans les feuilles et les racines marquée avec S1 de respectivement 5,34 et 5,76 µg/mg de MF). On remarque aussi une diminution de la proline racinaire du Soja inoculée par la population fongique. Elle est de 2,71 µg/mg de MF. En général, sous des conditions de présence de pétrole brut, on note des valeurs de la proline foliaires supérieurs que ceux racinaires. En ce qui concerne l'usage du substrat 2, une augmentation importante est decelée dans les trois tests (S1, S2 et POP), qui est plus marquée dans les racines que les feuilles du Soja en présence de S1. Les valeurs enregistrées sont respectivement pour les racines et les

feuilles de 7,97 et 6,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF. On note aussi une faible diminution de la valeur de la proline racinaire du Soja inoculée par S2.

Dans le cas de l'utilisation de l'arachide, les valeurs enregistrées de la prolines (Fig 64), montrent une augmentation considérable notée pour les plantes inoculées par la population fongique (POP) et cultivées sur le substrat 1, par rapport aux témoins. Ces valeurs sont respectivement pour les racines et les feuilles de 5,11 et 4,55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF. Les résultats de la proline racinaire et foliaire de l'arachide cultivée sur substrat 2, sont différents de ceux du substrat1. On remarque une augmentation importante de la proline foliaire des plantes inoculées par S1 (valeur moyenne maximale de 6,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF), suivie par les valeurs moyennes de la proline racinaire et foliaire des plantes inoculées par S2 (5,57 et 5,43 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF respectivement). En ce qui concerne le témoin négatif, la proline racinaire dépasse de loin celle foliaire, elle est respectivement de 4,04 et 2,84 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF. Tandis que le témoin positif est, au contraire, d'une proline foliaire de 3,30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF, dépassant faiblement celle racinaire de 3,05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF.

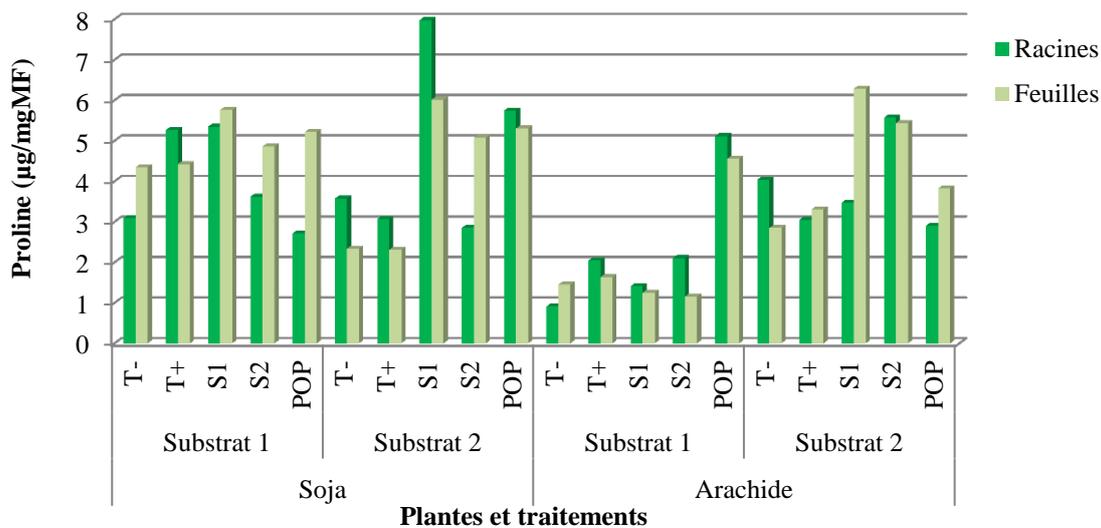


Figure 65. Valeurs de la proline des plantes

7.3.3. Dosage des sucres solubles

Les valeurs moyennes enregistrées de sucres solubles du Soja (Fig 66), sont supérieures par rapport à ceux du témoin (+) qui à enregistré respectivement les valeurs de 28 et 32,28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF de proline racinaire et foliaire. Il est à noter que les valeurs moyennes de prolines foliaires sont plus marquées par rapport aux racinaires. Elles peuvent être classées en valeurs descendantes selon que les plantes soient inoculées avec POP, S2 et enfin S1 ; pour donner en chiffre les valeurs de 71,06, 52,08 et 33,71 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF. Dans le cas des valeurs

moyennes de prolines racinaire, une diminution est perçue en présence de la POP (26,16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF) après une augmentation en S1 et S2 (29,63 et 33,30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF).

Dans le cas de l'utilisation de l'arachide, les valeurs moyennes de sucres solubles sont importantes dans les racines que les feuilles du témoin négatif, mais qui d'un degré moindre que le témoin positif du substrat1 (Fig 65). Chez les plantes inoculées, les valeurs moyennes de sucres solubles foliaires sont plus importantes que ceux racinaires. On peut les classer en ordre ascendant comme suit : S1 (20,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF), suivi de POP (30,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF) et enfin S2 (39,63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF). Ceux du substrat 2, montrent des valeurs moyennes ascendante entre S1 et S2 avec une maximale notée chez l'arachide inoculée par S2 de 48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MF.

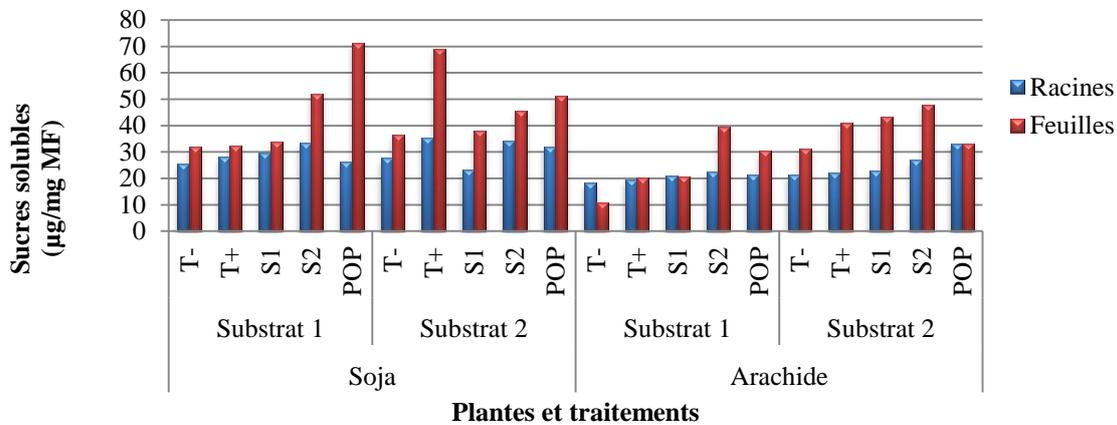


Figure 66. Valeurs des sucres solubles des plantes

7.4. Dosage des enzymes de l'activité anti-oxydante et des protéines

7.4.1. Le dosage du malonedialdéhyde (MDA)

Pour rappel, le malonedialdéhyde (MDA) est un bio-marqueur couramment utilisée dans l'évaluation du stress oxydatif. Ce paramètre varie entre plantes et entre substrats (Fig 67). Chez le Soja, on remarque par rapport au témoin une accumulation foliaire du MDA des plantes inoculée de S1 (17.4 $\mu\text{Mol}/\text{g}$ tissu frais) et POP (28.6 $\mu\text{Mol}/\text{g}$ tissu frais) sur Sub1. Une exception de MDA racinaire important de S2. Pour la culture du Soja sur Sub 2, on remarque une accumulation du MDA foliaire très importante pour S1 et S2, et de degré moindre pour POP. Chez l'arachide cultivé sur Sub 1, on remarque une accumulation racinaire du MDA avec S1 (50.02 $\mu\text{Mol}/\text{g}$ tissu frais) ; à l'opposé de S2 et POP ou le MDA racinaire est le plus important. Pour le Sub 2, l'accumulation est racinaire dans les trois tests.

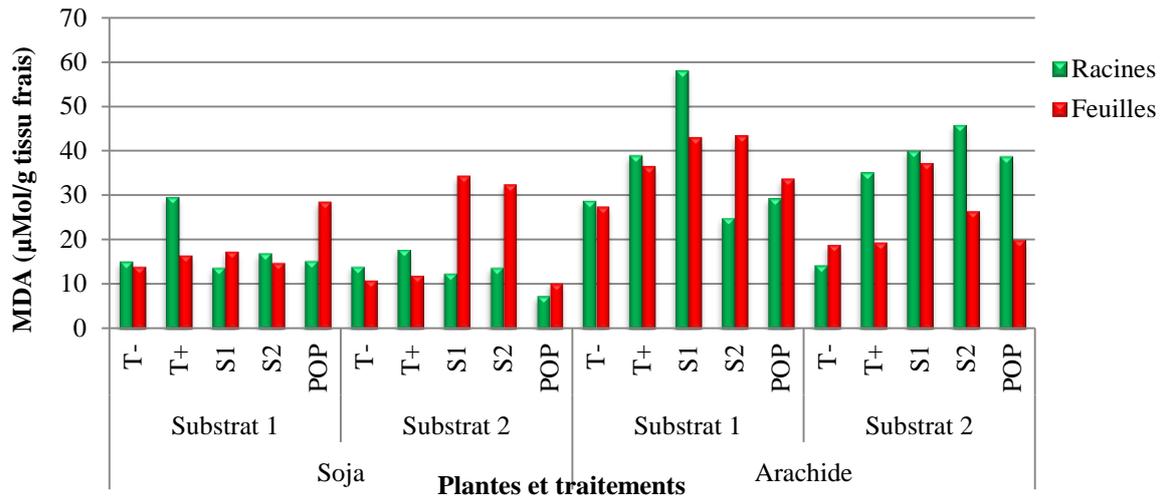


Figure 67.Évolution de la teneur en MDA du Soja et de l’arachide

7.4.2. Le dosage des protéines solubles totales

Les quantités totales moyennes de protéines solubles dans les racines et les feuilles des deux plantes sont illustrées dans la figure 68. Les valeurs moyennes de ce paramètre semblent élevées dans les racines du Soja cultivée sur les deux substrats, avec une exception pour POP sur Sub1 ou on a noté 766 µg/g MF de protéines racinaires contre 630 µg/g MF de protéines foliaires. Sur Sub 2, la valeur moyenne de protéines foliaires maximale est enregistrée avec S2 (830 µg/g MF) et la minimale de 423 µg/g MF avec S1. L’arachide à son tour a donné des valeurs de protéines totaux foliaires supérieurs à ceux racinaires. On remarque une existence importante de ce paramètre avec les tests sur Sub 1 que le Sub 2, ou on note une valeur moyenne maximale S1 (901 µg/g MF) sur Sub1.

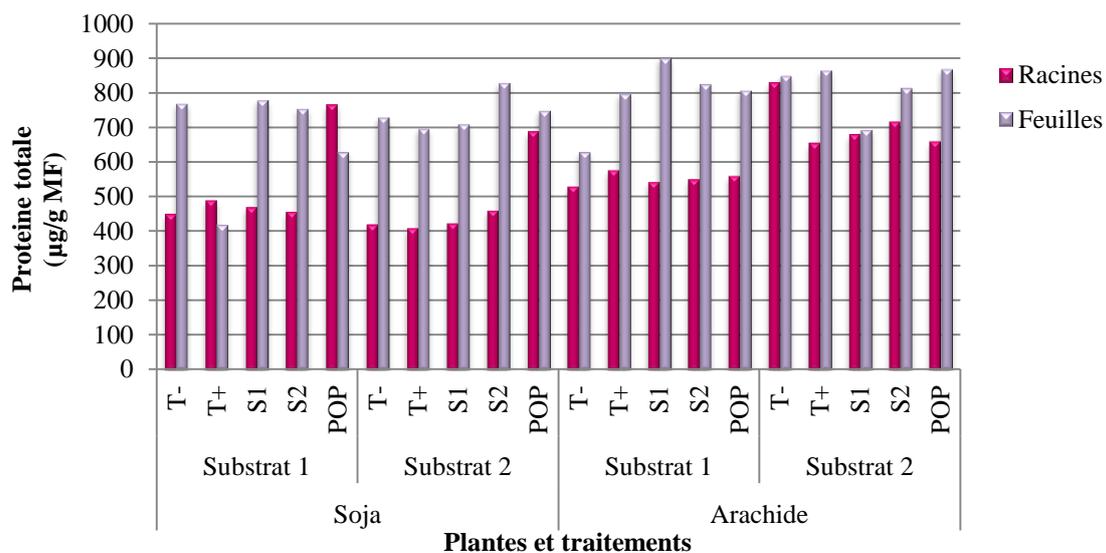


Figure 68. Quantité de protéines solubles dans les plantes

7.4.3. Le dosage de la Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme « clé » dans la protection antioxydative des plantes. Ce paramètre varie entre les plantes et les substrats de culture (Fig 69). Nos résultats révèlent d'une part, un accroissement du SOD foliaire du Soja cultivée sur Sub1 et inoculée de S2 (14,07 U/ml), ainsi que sur Sub2 et inoculée de S1 (15,46 U/ml). Pour les autres tests, on remarque une accumulation racinaire pour les deux substrats. Pour l'arachide, l'expression de ce paramètre se fait par une accumulation racinaire sur les deux substrats sauf pour S1 dans Sub2.

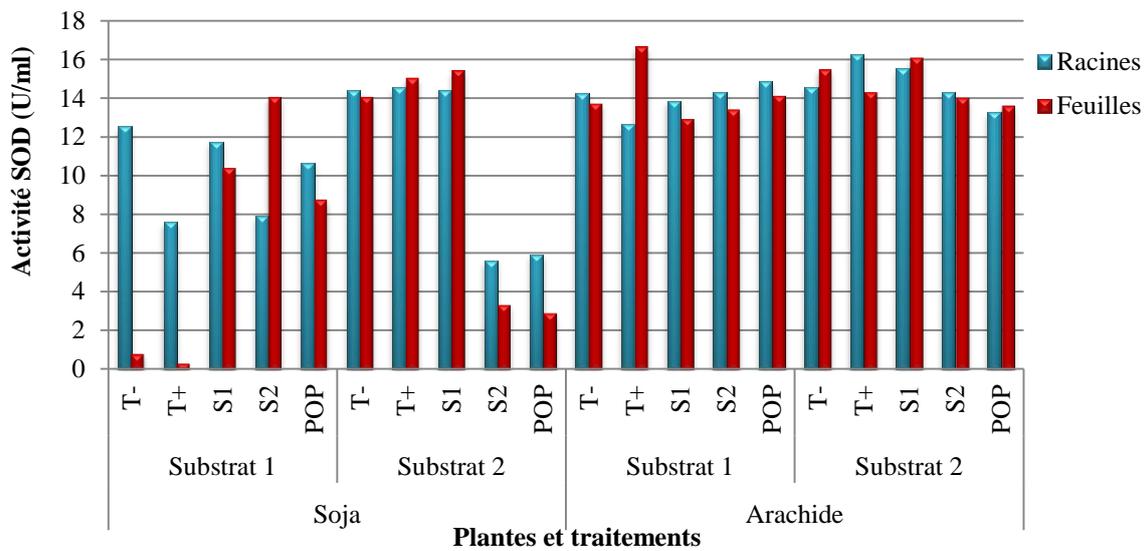


Figure 69. Variation de l'activité SOD des plantes

7.4.4. Le dosage de la catalase

Le Soja cultivé sur Sub1, a enregistré de très faibles valeurs de catalase (Cat) chez les témoins suivis d'une diminution de ce paramètre chez les tests (Fig 70). Par contre, le Sub2 a montré une diminution de la Cat racinaire et une augmentation de la Cat foliaire pour S1 et S2 (0,028 et 0,029U). En ce qui concerne l'arachide cultivé sur Sub1, on constate une augmentation foliaire. A son opposé, la culture sur Sub2, a donné une augmentation racinaire.

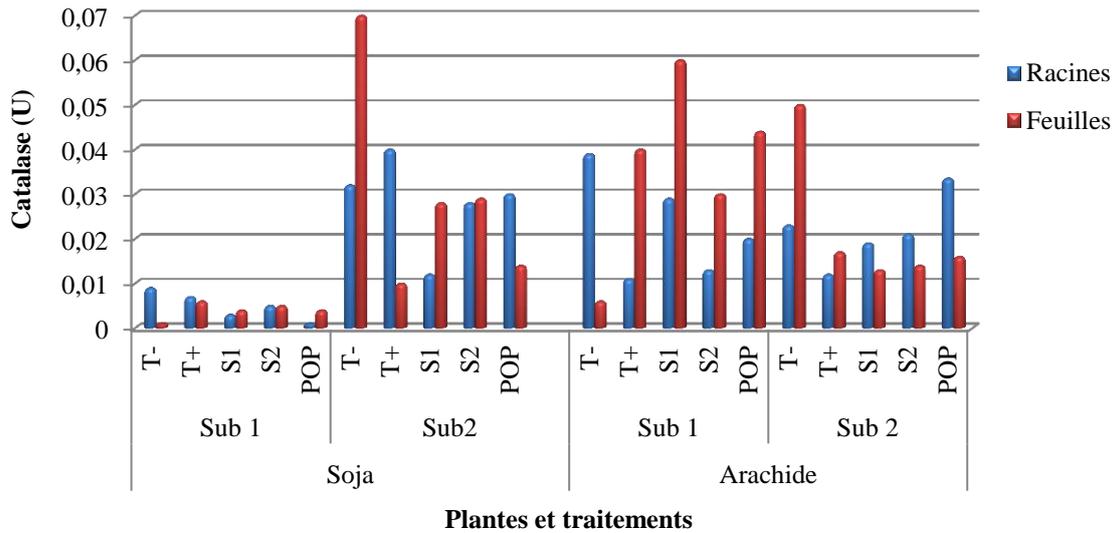


Figure 70. Variation de l'activité de la catalase des plantes

8. Discussion

La phytoremediation compte parmi les méthodes innovantes de dépollution. Elle permet le traitement d'une grande diversité de polluants y compris le pétrole brut et ses dérivés. Il est à signaler qu'on a cultivé nos plantes sur deux types de substrats : l'un constitué seulement d'humus et l'autre est un mélange (humus-sable ; 50/50). Le terreau (humus) utilisé est connu pour être très riche en matière organique. Il doit avoir une bonne porosité en air et en eau, permettant à la fois l'ancrage des racines et un bon drainage. Cependant, un mélange de terreau et sable permet d'ailleurs une amélioration du drainage. Généralement, les hydrocarbures déversés dans un sol vont migrer à travers le milieu poreux perméable, interagir avec la matrice et s'y adsorber (Humel *et al.*, 2017), ce qui rend leur remédiation difficile (Rajabi et Sharifipour, 2019). Ils diffuseront non seulement horizontalement avec le temps, mais migreront également vers le bas par gravité, obstruant ainsi les pores du sol. Cependant, la contamination du sol par le pétrole entraîne une diminution de sa capacité de rétention d'eau et de son aération, ainsi qu'une modification d'un certain nombre de propriétés chimiques, ainsi que de la disponibilité des nutriments minéraux et de l'activité enzymatique (Bungau *et al.*, 2021).

Dans une première optique, l'utilisation des deux substrats visait à donner des éléments de repères dans le processus de dépollution des sols. C'est ainsi que la matière organique du sol est le principal facteur qui influence le devenir des hydrocarbures dans le sol (Bielińska *et al.*, 2018), sa quantité et sa composition affectent potentiellement la rétention de ces contaminants dans les sols. Plus le pourcentage de matière organique est élevé, plus

l'élimination des polluants est importante. Les substances humiques ont une capacité de sorption considérablement élevée en raison de leur quantité importante de pores flexibles, facilitant la rétention des contaminants organiques dans les sols. Cependant, ils influencent la mobilité de la matière organique, les interactions avec les surfaces argileuses et l'agrégation des particules du sol (Klučáková, 2018), ainsi qu'une activité biologique plus élevée (Lasota et Błońska, 2018). La présence de plus forte teneur en sable, conduit à une infiltration d'eau et d'hydrocarbures rapide, une faible rétention d'eau et hydrocarbures, ainsi qu'une très faible capacité de stockage des nutriments, ce qui entraîne un rapport C/N élevé (Oyem et Lawrence, 2013). Les microorganismes de leur côté, améliorent la fertilité du sol, l'absorption des nutriments et la décomposition des résidus végétaux, en augmentant la teneur en matière organique et en favorisant la disponibilité des nutriments.

Dans une seconde optique, les paramètres qui interprètent la phytotoxicité du pétrole brut sur les plantes expérimentées sont d'ordre biométriques, physiologiques, biochimiques et enzymatiques. Habituellement, par une contamination du pétrole brut, on assiste à des modifications de : (1) la composition et les paramètres physico chimiques de ce dernier dès son entrée en contact avec le sol, (2) des propriétés mécaniques, physico chimiques et structurales du sol contaminé, (3) de la structure et diversité microbienne du sol et (4) le couvert végétal. Dans cette partie de notre étude, on a opté pour la culture du Soja et de l'arachide sur deux substrats différents, contaminés par 10% de pétrole brut. Les HAP sont considérés comme des facteurs de stress abiotique qui induisent un stress oxydatif par génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Demidchik, 2015). De plus, le stress oxydatif peut entraîner des dommages cellulaires et la mort (Kordrostami *et al.*, 2019). La technique de phytoremédiation appliquée est supportée par une bio augmentation de deux souches fongiques autochtones, isolées de bourbier pétrolier (supposées tolérantes aux hydrocarbures), ainsi qu'une population mixte des deux souches ensembles. Notre hypothèse de travail repose sur la qualité des performances de chaque souche et population vis-à-vis des plantes cultivées sur substrat contaminé par le pétrole brut, ainsi que le potentiel bénéfique de la matière organique dans le sol. On accorde une attention particulière à la famille des Fabacées, afin d'identifier son importance par rapport à la phytoremédiation des sols contaminés aux hydrocarbures. Compte tenu de leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, les légumineuses sont connues par leur formation de nodules, contrôlées par l'association symbiotique. La littérature scientifique a rapporté que les plantes appartenant aux familles des Fabaceae effectuent une meilleure phytoremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures (Hussain *et al.*, 2018). L'association symbiotique influence les activités de

phytoremédiation (Arshad *et al.*, 2020). Les effets toxiques des hydrocarbures dépendent d'une part de leurs propriétés physicochimiques et de la tolérance de la plante et d'autre part de la capacité des populations microbiennes à dégrader ces hydrocarbures et de la capacité d'une plante à stimuler les microorganismes du sol à dégrader les contaminants. Selon la littérature scientifique, les Fabaceae ont montré une meilleure capacité de germination dans un sol contaminé par les hydrocarbures par rapport à d'autres plantes, telles que les Brassicaceae, les Poaceae et les Asteraceae (Potashev *et al.*, 2014). En fait, la germination des graines a souvent été utilisée comme test d'indice physiologique pour examiner les effets toxiques d'un certain contaminant sur les plantes. La germination mobilise les réserves de l'endosperme d'une graine. Il est connu que le processus de germination des graines dans un sol contaminé par le pétrole diffère considérablement selon les espèces végétales (Han *et al.*, 2016). Nos résultats présentent un taux de germination qui regresse en présence du pétrole brut pour les deux plantes, ce qui est en accord avec la littérature (Hussaine *et al.*, 2019). Il est à noter que dans des conditions de pollution par les hydrocarbures, le taux de germination n'est pas trop affecté du fait que, lors de la germination, les graines utilisent les nutriments de réserve qu'elles contiennent, cependant, le pétrole brut peut affecter la croissance en la diminuant ou en l'augmentant (Davin *et al.*, 2020). Des symptômes visuels de réduction de croissance, de chlorose et de lésions nécrotiques ont été observés chez les espèces végétales, ce qui a été signalé par Molina et Segura (2021). Les hydrocarbures peuvent affecter la croissance et le développement d'un végétal par blocage de l'aération du sol et colmatage des infiltrations d'eau (Hou *et al.*, 2021). Ils peuvent avoir un effet sur la germination et sur la croissance végétative qui, à son tour, a un impact négatif sur le rendement de la matière sèche. Les effets des hydrocarbures sur les végétaux sont très divers selon la famille du végétale, la concentration de l'hydrocarbure et le type de substrat. Concernant les paramètres biométriques, nos résultats montrent tantôt une diminution et tantôt une augmentation de la longueur aérienne ou racinaire ou même totale foliaire (biomasse) en présence du pétrole brut. En effet, la diminution signalée reflète d'un côté, l'effet phytotoxique du pétrole brut sur les plantes. Effet qui a été signalé par Peretiemo-Clarke et Achuba (2007) avec l'arachide en présence du pétrole brut, Achuba (2018) avec des semis de niébé et de maïs et Mortet (2019) sur le Soja en présence de divers dérivés du pétrole. D'un autre côté et pour s'adapter au stress, la plante peut éviter les dommages par la réduction de la croissance aérienne et élongation des racines (Yadav *et al.*, 2020) ; (Hasanuzzaman *et al.*, 2019). C'est l'effet le plus commun des stress abiotiques sur la physiologie des plantes. En effet, le retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie et des ressources pour combattre

le stress. La diminution du nombre de feuilles des deux plantes est en concordance avec les résultats obtenus antérieurement de Mortet (2019) sur l'effet des hydrocarbures sur le Soja. De même, les valeurs moyennes de la croissance pondérale de la biomasse sèche aérienne (BSA) sur la biomasse sèche racinaire (BSR) ont diminué, cela pourrait être dû aux hydrocarbures qui réduisent l'absorption de nutriments et d'eau par des changements dans la perméabilité des membranes cellulaires (Khan *et al.*, 2017). Par contre l'augmentation, traduit l'effet de la bio-augmentation, que peut refléter l'action de la souche individuelle ou en population. Les micro-organismes de la rhizosphère, qui sont en contact étroit avec les racines des plantes, peuvent participer directement à la régulation de la croissance des plantes et du métabolisme secondaire en libérant des hormones, en inhibant les agents pathogènes et en facilitant l'absorption des nutriments (Alawiye et Babalola, 2021). L'introduction des champignons filamenteux a partiellement compensé l'effet néfaste du polluant. Il a été prouvé que l'application simultanée des champignon (*Aspergillus niger*) et du sorgho peut être des candidats appropriés pour remédier au pétrole et augmenter la tolérance du sorgho au stress pétrolier (Koohkan *et al.*, 2023).

À propos des paramètres biochimiques, il a été démontré que les hydrocarbures ont un effet inhibiteur sur la photosynthèse (Mostafa *et al.*, 2021) et sur la teneur en chlorophylle, en particulier (Kreslavski *et al.*, 2017). Dans notre étude, on remarque bien une remarquable diminution des valeurs de la chlorophylle, ce qui est appuyé par Hussain *et al.* (2019). Il est même proposé que la diminution de la quantité de chlorophylle soit un indicateur de pollution environnementale (Al-Hawas *et al.*, 2012). La présence de proline aide à maintenir les structures cellulaires, à synchroniser les processus métaboliques cellulaires, à détruire les radicaux libres et à activer les systèmes liés au stress (Molina et Segura, 2021).

Les plantes utilisent une augmentation de la synthèse de proline comme mécanismes d'adaptation aux environnements stressants (Ghaleh *et al.*, 2020). Les données sur l'évolution du niveau de la proline dans les plantes à différentes concentrations d'hydrocarbures dans le sol sont assez contradictoires et sont déterminées à la fois par le type de polluant et par le type (et même la variété) des plantes (Skrypnik *et al.*, 2021). Par exemple, il a été démontré que la présence de carburant diesel et d'essence dans le sol augmente l'accumulation de cet acide aminé dans les plants de blé, tandis que la pollution par les produits pétroliers provoque sa diminution dans les feuilles des plants de haricots (Rusin *et al.*, 2020). Dans la présente étude, la présence du pétrole brut a entraîné une forte augmentation de sa teneur dans les feuilles du Soja inoculée par S1 et cultivée sur Sub1 par rapport au témoin et inoculée par POP sur Sub2.

L'accumulation de la proline serait reliée directement à l'application du stress hydrique (Cechin *et al.*, 2006) ; ce qui reflète l'effet du pétrole brut sur les particules du sol. Nos résultats indiquent aussi une diminution de la quantité de proline, qui renvoie à la réduction du niveau de stress abiotique par la souche S1 inoculées sur les deux substrats.

Les sucres jouent un rôle prédominant dans la vie d'une plante, ils sont produits pendant la photosynthèse, transportés vers les tissus, convertis en composés de réserve qui sont éventuellement dégradés en carbohydrates. L'accumulation des sucres solubles est un moyen adopté par les plantes en cas de stress, afin de résister aux contraintes du milieu. La littérature met en évidence une accumulation en sucres solubles chez différents types de plantes soumises à différents stress. L'accumulation des sucres solubles dans nos résultats est vérifiée par les travaux d'Ashraf *et al.* (2023), Sami *et al.* (2016) et Mortet (2019). Un niveau de sucre élevé dans des conditions de stress aide à maintenir les rôles physiologiques tels que la photosynthèse, la mobilisation des nutriments et les exportations, tandis qu'un niveau de sucre inférieur stimule le stockage des glucides et la sénescence (Sami *et al.*, 2016). Des troubles métaboliques chez les plantes ont été attribués au stress oxydatif induit par le pétrole brut (Achuba et Oshiokpu, 2019). Dans ce cas, les cultures végétales soumises à un stress d'hydrocarbure se sont révélées très efficaces pour moduler les activités de CAT, SOD et MDA. Han *et al.* (2016) ont rapporté que le pétrole brut peut entraver l'absorption d'eau et de nutriments pour les plantes, ce qui provoque des lésions membranaires dues à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, le malondialdéhyde (MDA) en est un de ces biomarqueurs. L'induction du MDA notée chez les plantes, témoigne d'un stress au niveau cellulaire résultant probablement de la contamination par le pétrole brut. Notre étude actuelle a révélé que la pollution du sol par le pétrole a entraîné une augmentation de la teneur en MDA des deux plantes. Les résultats obtenus sont cohérents avec les données publiées précédemment de l'effet de la pollution pétrolière sur la production active d'espèces réactives de l'oxygène : Skrypnik *et al.* (2021), Adeyemi, (2020) et Tarik *et al.* (2021). La Superoxyde dismutase (SOD), un autre biomarqueur de stress, expérimenté dans notre étude, a révélé une augmentation foliaire et racinaire. La résistance des plantes aux radicaux libres est associée à une augmentation des activités des enzymes antioxydantes après exposition à des polluants (Maslennikov *et al.*, 2018). Des revues de littérature récemment publiées ont souligné l'accumulation de la SOD sous effets du stress oxydatif induit par le pétrole brut. Il s'agit des travaux de Skrypnik *et al.* (2021), Tarik *et al.* (2021). La présente étude a révélé une augmentation de l'activité de la SOD, ce qui indique que les mécanismes de défense

antioxydants étaient activés dans la plante. Les protéines, de leur côté, sous conditions de stress environnemental, s'accumulent chez les plantes. C'est le cas de nos résultats en présence du pétrole brut ; ou l'accumulation foliaire des protéines est largement supérieure à celle des racines. Le constat est en désaccord avec les résultats de Mortet (2019), qui a testé l'effet du gasoil sur le Soja. Dans ces résultats, l'accumulation des protéines est racinaire. L'interaction avec les plantes en activant diverses enzymes antioxydantes, c'est-à-dire l'activité de la catalase, a montré que les plantes présentaient une certaine accumulation. Ces antioxydants atténuent les effets négatifs du stress oxydatif chez les plantes (Shah *et al.*, 2020). Nos résultats sur la proline sont en accord avec ceux de (Panwar et Mathur, 2019), (Chakravarty et Deka, 2021) qui suggèrent qu'une augmentation des concentrations des hydrocarbures est accompagnée d'une augmentation de la proline. Dans certains cas, une diminution de l'activité de la catalase peut être une réponse adaptative de la plante pour réguler le stress oxydatif. Lorsque les niveaux de stress oxydatif sont élevés, les plantes peuvent réduire l'activité de la catalase afin de favoriser d'autres mécanismes de défense antioxydants plus efficaces. Cela peut inclure l'activation d'autres enzymes antioxydants ou l'accumulation de composés antioxydants non enzymatiques (par exemple la vitamine E) (Atkinson *et al.*, 2008).

D'après l'étude statistique faite sur les paramètres de l'activité anti-oxydante on peut dire que le substrat, le type de plante et les espèces fongiques peuvent avoir un effet sur la teneur des enzymes antioxydants. En effet :

1. L'effet du substrat sur l'activité anti-oxydante peut être influencé par la présence de matières organiques (qui peuvent fournir des nutriments essentiels aux plantes, tels que l'azote, le phosphore, le potassium) et les micronutriments. Ces nutriments sont nécessaires pour la synthèse des enzymes antioxydants, la composition minérale (Par exemple, des minéraux tels que le cuivre, le zinc et le manganèse peuvent agir comme cofacteurs nécessaires pour l'activité de la SOD), les micro-organismes du sol (stimuler le métabolisme antioxydant des plantes) et le pH du sol (certaines études ont montré que des variations du pH du sol peuvent altérer l'activité des enzymes antioxydants (Canali *et al.*, 2014 ; Boubali, 2017). L'effet du substrat mélangé de sable et de terreux sur l'activité anti-oxydante dépendra de plusieurs facteurs tels que la rétention d'eau et de nutriments (le sable a une capacité de rétention d'eau plus faible, ce qui peut entraîner une disponibilité réduite d'eau pour les plantes). Une disponibilité adéquate en eau est essentielle pour le bon fonctionnement des enzymes antioxydants, la composition minérale et l'interaction avec les racines (le mélange de

sable et de terreaux peut influencer la disponibilité des minéraux essentiels nécessaires au fonctionnement des enzymes antioxydants, et il peut aussi affecter la disponibilité des nutriments et l'aération des racines). Une structure du sol favorable et une bonne aération des racines sont importantes pour le fonctionnement optimal des enzymes antioxydants. Il est important de trouver un équilibre approprié entre ces facteurs pour favoriser un fonctionnement optimal de l'activité de la SOD (Boubali, 2017).

2. L'effet de la plante sur l'activité anti-oxydante : débute par le fait qu'une graine est riche en différents composés biochimiques, notamment des antioxydants (la SOD, la catalase et le MDA), qui jouent un rôle clé dans la protection des graines contre les dommages oxydatifs, résultant de l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pendant leur développement. Plusieurs études ont été menées pour évaluer l'activité anti-oxydante des graines et son lien avec la germination et la croissance des plantes. Par exemple, une étude publiée par Yang *et al.* (2018) a examiné l'activité anti-oxydante des graines de soja pendant la germination et a constaté une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la catalase au fur et à mesure que la germination progressait. Cette augmentation de l'activité anti-oxydante a été associée à la neutralisation des ROS et à la protection des cellules végétales contre les dommages oxydatifs.

Conclusion

Dans l'ensemble, cette étude contribue à comprendre les différences de potentiel de remédiation des plantes soumises à une pollution hydrocarbonée, ainsi que la complexité du système impliqué. Dans ce contexte et à partir de différentes analyses (biométriques, physiologiques, biochimiques et enzymatiques) nous avons distingué qu'en présence du pétrole brut, l'arachide cultivée sur le substrat1, s'est montrée plus résistante que le Soja. Cependant, le choix du substrat est une étape importante qui régit le processus de phytoremediation du fait qu'il est responsable d'une grande partie sur la rétention d'eau, la disponibilité des minéraux essentiels, des nutriments de la plante, l'aération des racines ainsi que la stimulation des microorganismes du sol. La phytoremediation couplée à une bioaugmentation par les deux souches fongiques, adaptées aux hydrocarbures, qu'ils soient individuelles ou en population, s'est avérée indifférente, des fois même le travail de la population fongique est réduit.

Conclusion générale
&
Perspectives



Conclusion générale

Les bourbiers pétroliers et la pollution qu'ils génèrent constituent un risque majeur sur l'environnement. Notre travail de thèse tient compte des hypothèses de compréhension des différents objectifs tracés. Dans un premier volet, la caractérisation physicochimique (pH, température, conductivité électrique, densité, salinité, azote, ...etc) des bourbiers pétroliers du complexe GEA (Agreb, Gassi et Zotti) situé dans la région de Hassi Messaoud (Sahara algérien) présente une dominance de la fraction sableuse, un pH fortement alcalin et un profil affecté par la présence des hydrocarbures, vu les fortes valeurs de conductivité électrique, azote Kjeldahl, densité et cations échangeables (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}). La distribution spatiale des hydrocarbures expérimentés est hétérogène, témoignant d'une pollution hydrocarbonnée grave, vu la présence notée des BTEX.

Dans le second volet, une « mycothèque » de la flore fongique autochtone hydrocarbonoclaste peuplant les bourbiers pétroliers du complexe Gassi El Agreb (GEA), a été dressée. Généralement, l'inventaire s'ajoute à la collection des souches fongiques hydrocarbonoclastes terrestres.

Ces deux volets abordés, facilitent le choix des méthodes de décontamination à utiliser pour les bourbiers pétroliers. Le premier procédé utilisé est la mycoremediation, par lequel cinq souches fongiques autochtones ont toléré le pétrole brut et le gasoil, sous des conditions de cultures en batch de pH et de température d'incubation. Il s'agit d'*Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1), *A. tubingensis* (AtWU_00159), *A. flavus* isolate S7L6A (ON171640.1), *Trichoderma parareesei* FW-04 (OL743181.1) et *T. ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1). Ces souches fongiques ont aussi dégradé cinq hydrocarbures contenus dans le pétrole brut, c'est le cas de l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Une attention particulière aux deux souches fongiques hydrocarbonoclastes *Trichoderma ghanense* strain 18ASMA011(MT671930.1) qui a réussi à dégrader à 100% le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène et l'*Aspergillus niger* CBS 101883 (XM_025601974.1) qui a anéanti le benzo[a]pyrène.

Par le second procédé choisi, la phytoremediation des sols contaminés par le pétrole brut (10%), est expérimentée en utilisant deux légumineuses (Soja et arachide) et bioaugmentée par deux souches fongiques, ainsi que la population mixte. Le paradigme de la complexité du système impliqué lors du processus de phytoremediation tire son origine des

relations entre le substrat, la plante, le polluant, les souches individuelles et la population fongique. De ce fait, l'implantation de la réhabilitation des sols contaminés par les hydrocarbures nécessite une coopération interdisciplinaire.

Perspectives

En perspectives, il serait souhaitable de compléter cette étude par une approche plus approfondie et complémentaire.

- ❖ Sur le plan technique et aménagement des sites, on opte pour la mise en place de:
 - * Endroit sécuritaire ou lieu sûr pour aménager le borbier, selon une étude approfondie ;
 - * Stations d'épuration pour contrôler les différents types de rejets ;
 - * Personnel qualifié, maîtrisant les données environnementales ;
- ❖ Le côté scientifique suscite un intérêt imminent pour améliorer les méthodes et conditions des biotests, voire en proposer d'autres. Il serait intéressant de proposer:
 - * Une étude de l'historique de la pollution pétrolière du site et en dresser un profil numérique ;
 - * Une sélection de souches prometteuses, identifier les enzymes impliqués ainsi que d'identifier les métabolites de dégradation et évaluer leur degré de toxicité ;
 - * Optimiser les conditions de cultures pour connaître les conditions environnementales qui régissent la biodégradation ;
 - * Utiliser des biomarqueurs de la pollution par le pétrole ou de ses dérivés, pour une éventuelle biosurveillance.
 - * Faire appel aux techniques de pointes pour mieux comprendre les relations entre divers agents actifs.

*Références
bibliographiques*



Références bibliographiques



- [1] Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z., and Wassie M. 2017. The role of microorganisms in bioremediation- A review. *Open J. Environ. Biol.* 2, 38–46. doi: 10.17352/ojeb.000007.
- [2] Abbas A.H., *et al.* 2023. Solidification/Stabilization Treatment for organic oil immobilization in Algerian petroleum drill cuttings : Optimization and acceptance tests for landfilling. *Archives of Environmental Protection*.
<https://doi.org/10.24425/aep.2022.140770>
- [3] Abdel-shafy H., and Mansour M.S.M. 2019. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment : an overview. *Microbiol Act Hydrocar.* 353-386.
- [4] Abdoul Habou Z. 2003. Effets de la qualité de semences sur la production de l'arachide au Sénégal. Mémoire pour obtenue de diplôme d'Ingénieur Agronome. Sénégal. ENSA. 59 p.
- [5] Abdullah O.A., Fathi R.A. and Fadhel M.N. 2020. Use of fungi in bioremediation of contaminated sites with hydrocarbons. *Plant Archives* Vol. 20, Supplement 2, pp. 1406-1410.
- [6] Abdullah S.R.S., Al-Baldawi I.A., Almansoori A.F, Purwanti I.F, Al-Sbani N.H., and Sharuddin S.S.N. 2020. Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges and opportunities. *Chemosphere*, Volume 247, 125932, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125932>.
- [7] Abdullahi M.A. 2017. Removal of heavy metals from refinery effluent using sugarcane bagasse inoculated with *Aspergillus flavus* and *Trichophyton* species. Master's Thesis, Department of Microbiology, Faculty of Life Science, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.
- [8] Abdulrasheed M., Zakaria, Ahmad Roslee A.F. *et al.* 2020. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted bacterial strains of *Arthrobacter spp.* from Antarctica. *Antarctic Science*, vol. 32, no. 5, pp. 341–353.
- [9] Abed R.M. 2021. Exploring Fungal Biodiversity of Genus *Epicoccum* and Their Biotechnological Potential. In: Abdel-Azeem, A.M., Yadav, A.N., Yadav, N., Usmani, Z. (eds) *Industrially Important Fungi for Sustainable Development*. *Fungal Biology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_7.
- [10] Abosede E.E. 2013. Effect of crude oil pollution on some soil physical properties. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 6(3):14–17.
- [11] Abu-Khasan M.S., and Makarov Y.I. 2021. Analysis of soil contamination with oil and petroleum products. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 937, 022046.
- [12] Achuba F. I. 2018. Effects of hydrocarbon polluted soil on the biomass and protein content of cowpea and maize seedlings. *Ife Journal of Agriculture*, Volume 30, Number 3.
- [13] Achuba F.I., and Oshiokpu M.N. 2019. Growth and metabolic activities of cowpea seedlings exposed to artificial pond wastewater-treated soil. *Int. J. Recycl. Organ. Waste Agric.* 8: 351-359.

- [14] Adebisi F. M., and Afedia M. O. 2011. The ecological impact of used petrochemical oils on soil properties with special reference to physicochemical and total petroleum hydrocarbon contents of soils around automobile repair workshops. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 33(16): 1556-1565.
- [15] Adeniji A.O., Okoh O.O., Okoh O.I. 2019. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water and sediment of Buffalo River estuary, South Africa and their health risk assessment. *Arch Environ Contam Toxicol* **76**, 657–669. <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00617-w>
- [16] Adeyemi O. 2020. Effect of Crude Oil Contaminated Soil on *Phaseolus Vulgaris* L. *World Journal of Innovative Research (WJIR)*, Volume-8, Issue-2, Pages 28-33.
- [17] Afzal I., Zabta K. S. , Shomaila S., and Shaheen S. 2019. Plant Beneficial Endophytic Bacteria: Mechanisms, Diversity, Host Range and Genetic Determinants. *Microbiological Research*. 221: 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>.
- [18] Ajona M., Vasanthi P. 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils – a review. *Mater. Today Proc.* Volume 45, Part 7, Pages 7117-7122.
- [19] Akerman-Sanchez G., Rojas-Jimenez K. 2021. Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: a bioengineering approach to water treatment. *Environmental Advances*. Volume 4, 100071.
- [20] Alawiye T. and Babalola O. 2021. Metagenomic insight into the community structure and functional genes in the sunflower rhizosphere microbiome. *Agriculture*, 11, 167.
- [21] Al-Dhabaan F. A. 2021. Mycoremediation of crude oil contaminated soil by specific fungi isolated from Dhahran in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 28, Issue 1, Pages 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.033>.
- [22] Al-Dossary M.A., Abood S.A., and Al-Saad H.T. 2020. Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. *Remediation*. Volume 30, Issue 4, Pages 17-25. <https://doi.org/10.1002/rem.21658>.
- [23] Al-Dossary M.A., Abood S.A., and Al-Saad H.T. 2020. Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. *Remediation*. 30: 17–25. <https://doi.org/10.1002/rem.21658>.
- [24] Al-Hawas G.H.S., Sukry W.M., Azzoz M.M., and Al-Moaik R.M.S. 2012. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the metabolism of *Jojoba (Simmondsia chinensis)* seedlings. *Int. Res. J. Plant Sci.* 3, 54–62.
- [25] Al-Hawash A.B., Alkooranee J.T., Abbood H.A., Zhang J., Sun J., Zhang X., and Ma F. 2018. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnol. Rep.* 17, 104–109.
- [26] Al-Hawash A.B., Dragh M.A., Li S., Alhujaily A., Abbood H.A., Zhang X., *et al.* 2018. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44, 71–76.
- [27] Al-Hawash A.B., Zhang J., Shue L., Jiashu L., Hussein B.G., Xiaoyu Z., *et al.* 2018. Biodegradation of n-hexadecane by *Aspergillus* sp. RFC-1 and its mechanism. *Ecotoxicol Environ Saf.* 30: 398–408. [pmid:30142606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30142606/).
- [28] Ali A., Guo D., Mahar A., Wang P., Shen F., Li R., and Zhang, Z. 2017. Mycoremediation of potentially toxic trace elements—a biological tool for soil cleanup: A Review. *Pedosphere*, 27(2), 205-222. [10.1016/s1002-0160\(17\)60311-4](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(17)60311-4).

- [29] Ali M., Song X., Ding D., Wang Q., Zhang Z., and Tang Z. 2022. Bioremediation of PAHs and heavy metals co-contaminated soils: challenges and enhancement strategies. *Environ. Pollut.* Volume 295, 118686.
- [30] Ali N., Bilal M., Khan A., Ali F., Hafiz M. N. and Iqbal H.M.N. 2020. Effective exploitation of anionic, nonionic, and nanoparticle-stabilized surfactant foams for petroleum hydrocarbon contaminated soil remediation. *Science of the Total Environment.* 135391.
- [31] Al-Jawhari I. F. H. 2019. Degradation of pollutants using advanced ecomaterials. Dans *Springer eBooks* (p. 495-512). https://doi.org/10.1007/978-3-319-68255-6_29.
- [32] Allaoua Seghiri. 2002. Méditerranée Année. 99-102 pp. BOOK.
- [33] Alves R., Barata-Antunes C., Casal M., Brown A.J.P., Van Dijck P., and Paiva S. 2020. Adapting to survive: How *Candida* overcomes host-imposed constraints during human colonization. *PLoS Pathog.*16:e1008478. pmid:32437438.
- [34] Alwakeel S.S. 2017. Molecular identification of fungi isolated from coastal regions of Red Sea, Jeddah, Saudi Arabia. *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* 24, 115–119.
- [35] Ameen F., Moslem M., Hadi S., *et al.* 2016. Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia Saudi. *J Biol Sci.*23:211–218. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.04.005.
- [36] Amend A., Burgaud G., Cunliffe M., Edgcomb V.P., Ettinger C.L., Gutiérrez M.H., Heitman J., Hom E.F.Y., Ianiri G., Jones A.C., *et al.* 2019. Fungi in the Marine Environment: Open questions and unsolved problems. *mBio*, 10, 1–15.
- [37] Amro M., Benzagouta M. S. and Karnanda W. 2013. Investigation on crude oil penetration depth into soils. *Arabian Journal of Geosciences*, 6(3), 873–880. <https://doi.org/10.1007/s12517-011-0392-6>.
- [38] Aparna A., Srinikethan G., Hedge S. 2011. Effet de l'addition d'un biosurfactant produit par *Pseudomonas* spp. sur la biodégradation du pétrole brut. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, 71–75.
- [39] Aranda E., Godoy P., Reina R., Badia Fabregat M., Rosell M., Marco-Urrea E., and García-Romera I. 2017. Isolation of Ascomycota fungi with capability to transform PAHs: Insights into the biodegradation mechanisms of *Penicillium oxalicum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*122, 141–150.
- [40] Araújo H. W. C., Andrade R. F.S., Montero-Rodríguez D., Rubio-Ribeaux D., Silva C. A.A., and Campos-Takaki G.M. 2019. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*. 18(1): [https://doi: 10.1186/s12934-018-1046-0](https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0).
- [41] Arent D., Arndt C., Miller M., Tarp F., Zinaman O. 2017. The Political Economy of Clean Energy Transitions, A study prepared by the United Nations University World Institute for Development Economics Research (UNU-WIDER). Oxford University Press. DOI: 10.1093/oso/9780198802242.001.0001.
- [42] Arocena J. M., and Rutherford P. M. 2005. Properties of hydrocarbon- and salt contaminated flare pit soils in northeastern British Columbia (Canada). *Chemosphere*, (60): 567-575.
- [43] Arshad M., Ali Khan A.H., Hussain I., Zaman B., Anees M., Iqbal M., Soja G.,

- Linde C., Yousaf S. 2017. The reduction of chromium (VI) phytotoxicity and phytoavailability to wheat (*Triticum aestivum* L.) using biochar and bacteria. *Applied Soil Ecology*, Volume 114, Pages 90-98
- [44] Asemoloye M. D., Tosi S., Daccò C., Wang X., Xu S., Marchisio M. A., Gao W., Jonathan S. G. and Pecoraro V. L. 2020. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted sites. *Microorganisms*, 8(12), 1912.
- [45] Ashraf M.A., Rasheed R., Hussain I. *et al.* 2023. Allicin Decreases Phytotoxic Effects of Petroleum Hydrocarbons by Regulating Oxidative Defense and Detoxification of Cytotoxic Compounds in Wheat. *J Plant Growth Regul* 42, 3632–3649. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10826-8>.
- [46] Ashraf S., Ali Q., Zahir Z.A., and Asghar H.N. 2019. Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 174, pp. 714-727.
- [47] Ata Mitra S., Roy P. 2011. BTEX: A serious ground-water contaminant. *Res J Environ Sci* 5:394–398.
- [48] Atkinson, G. & Mourato, S. 2008. Environmental Cost-Benefit Analysis. *Annual Review of Environment and Resources*, 33(1), 317-344. <https://doi.org/10.1146/annurev.envIRON.33.020107.112927>

B.....

- [49] BA. A.A. 2010. Contribution à la surveillance d'un processus de forage pétrolier, thèse de doctorat Paris Tech.
- [50] Bahram M., Peay K.G., and Tedersoo L. 2015. Local-scale biogeography and spatiotemporal variability in communities of mycorrhizal fungi. *New Phytol* 205:1454–1463. <https://doi.org/10.1111/nph.13206>.
- [51] Baize D. 2018. Guide des analyses en pédologie. Éditions Quae - Torrossa. <https://www.torrossa.com/gs/resourceProxy?an=5063813&publisher=FZZ759>.
- [52] Bakri R., Ramlan, Basir-Cyio M., Napitupulu M., Inoue T., Anshary A., Mahfudz, Isrun, Rusydi M., Golar G., Sulbadana. 2021. Pollution and contamination level of CU, CD, and HG heavy metals in soil and food crop. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(3), 1153-1164. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03345-8>.
- [53] Balseiro-Romero M., Gkorezis P., Kidd P. S., Hamme J.V., Weyens N., Monterroso C., et Vangronsveld J., 2017. « Use of Plant Growth Promoting Bacterial Strains to Improve *Cytisus Striatus* and *Lupinus Luteus* Development for Potential Application in Phytoremediation ». *Science of The Total Environment* 581-582 (mars): 676-88. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.180>.
- [54] Bankole P.O., Omoni V.T., Mulla S.I., Adebajo S.O., and Adekunle A.A. 2022. Co-biomass degradation of fluoranthene by marine-derived fungi; *Aspergillus aculeatus* and *Mucor irregularis*: Comprehensive process optimization, enzyme induction and metabolic analyses. *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 15, Issue 9, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104036>
- [55] Bao S.D. 2000. Soil agrochemical analysis. China Agriculture Press.

- [56] Bar-Hen A., Mariadassou M., Poursat M.A., and Vandenkoornhuyse P. 2008. Influence function for robust phylogenetic reconstructions. *Molecular Biology and Evolution*. 25:869–873.
- [57] Baron N.C., Pagnocca F.C., Otsuka, A.A., Prenafeta-Boldú F.X., Vicente, V.A., and Attili de Angelis D. 2021. Black Fungi and Hydrocarbons: An Environmental Survey for Alkylbenzene Assimilation. *Microorganisms* 9, 1008. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051008>.
- [58] Bastien-Ventura C., Girin M. Coordinateurs 2005. Marées noires et environnement, coll. Propos, Institut Océanographique, Paris, 365.
- [59] Batghare A.H., *et al.* 2020. Mechanistic investigations in ultrasound-induced intensification of fermentative riboflavin production. *Bioresour. Technol. Reports*.
- [60] Begum N., Qin C., Ahanger M. A., Raza S., Khan M. I., Ashraf M., Ahmed N., and Zhang L. 2019. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 1068.
- [61] Benhamdi A. 2014. Etude Des Enzymes De Stress Oxydatif Chez Hedysarum.
- [62] Ben-Laouane R., Ait-El-Mokhtar M., Anli M., Boutasknit A., Ait Rahou Y., Raklami A., Oufdou K., Wahbi S., and Meddich A. 2021. Green compost combined with mycorrhizae and rhizobia: A strategy for improving alfalfa growth and yield under field conditions. *Gesunde Pflanz*. 73, 193–207.
- [63] Benmessaoud S., Kara M., El asm H., Assouguem A., and Bahhou J. 2021. Biotypology of Yeast in Soils Polluted by Hydrocarbons in Fez-Meknes Region, Morocco. *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 5, 1606–1613.
- [64] Bennett J. W., Wunch K. G., & Faison B. D. 2002. Use of fungi in biodegradation. In C. J. Hurst (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*, Second Edition (pp. 960-971). Washington: ASM Press.
- [65] Beopoulos A., Desfougeres T., Sabirova J., Zinjarde S., Neuvéglise C., and Nicaud J.M. 2010. The Hydrocarbon-Degrading Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Timmis, K.N., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, pp. 2111–2121. ISBN 978-3-540-77587-4.
- [66] Bhatt P., Verma A., Verma S., Anwar M. S., Prasher P., Mudila H. and Chen S. 2020. Understanding phytomicrobiome: A potential reservoir for better crop management. *Sustainability (Switzerland)*, 12(13), 1-20. <https://doi.org/10.3390/su12135446>.
- [67] Bianco F., Race M., Papirio S., Oleszczuk P., and Esposito G. 2021. The addition of biochar as a sustainable strategy for the remediation of PAH-contaminated sediments. *Chemosphere*, Volume 263, 128274.
- [68] Biedermann P.H.W., and Vega F.E. 2020. Ecology and Evolution of Insect–Fungus Mutualisms. *Annual Review of Entomology*, 65:431–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024910>.
- [69] Bielińska J., Futa B., Ukalska-Jaruga A., Weber J., Chmielewski S., Wesołowska S., Mocek-Płóćiniak A., Patkowski K., and Mielnik L. 2018. Mutual relations between PAHs derived from atmospheric deposition, enzymatic activity, and humic substances in soils of differently urbanized areas. *J Soils Sediments* 18:2682–2691.
- [70] Blackwell M. 2011. The fungi : 1, 2, 3 . . . 5.1 million species ? *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>.

- [71] Boonchan S., Britz M. L., and Stanley G.A. 2000. Degradation and Mineralization of High- Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures Applied and Environmental Microbiology, 66 (3) : 1007 – 1019.
- [72] Borah D. 2019. Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon: a review. In *Microbial Action on Hydrocarbons*, pp. 321–341, Springer, Cham, Switzerland.
- [73] Borah K. K., Bhuyan B. and Sarma H. P. 2010. Lead, arsenic, fluoride, and iron contamination of drinking water in the Tea Garden belt of Darrang district, Assam, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 169(1-4), 347-352. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-1176-2>.
- [74] Botton B., Breton A., Fever M., Ganthier S., Gyp H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J. J., Vayssier Y., et Veau P. 1990. *Moisissures utiles et nuisibles, importance Industrielle*, 2ème Ed. Masson, Paris.
- [75] Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., vayssier Y., and veau P. 1999. *Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle*. Masson. Paris. pp. 12-426.
- [76] Boubali Z. 2017. *Biomarqueurs Du Stress Oxydatif*. These De Doctorat. Université Mentouri.
- [77] Boudih S. 2011. *Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro*. Paris-Est. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00781807/document>
- [78] Bourceret A., Cébron A., Tisserant E., Poupin P., Bauda P., Beguiristain T., and Leyval C. 2016. The bacterial and fungal diversity of an aged PAH- and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters. *Microb Ecol* 71: 711–724.
- [79] Bouselsal B. 2017. *Groundwater Quality in Arid Regions: The Case of Hassi Messaoud Region (SE Algeria)*. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 9(1), 528-541. doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i1.30>.
- [80] Branger A. *et al.* 2007. *Alimentation et contrôle microbiologiques : champignons et mycètes : educ ; agri*. 203p.
- [81] British Petroleum Company (bp). 2022. *bp Statistical Review of World Energy 2022*.
- [82] Bungau S., Behl T., Aleya L., Bourgeade P., Aloui-Sossé B., Purza A.L., Abid A., and Samuel A.D. 2021. Expatriating the impact of anthropogenic aspects and climatic factors on long term soil monitoring and management. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 30528–30550.
- [83] Burghal A.A., Abu-Mejdad N.M.J.A., Al-Tamimi W.H. 2016. Mycodegradation of Crude Oil by Fungal Species Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 5 (2): 1517-1524.
- [84] Bocard C. 2006. *Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures*. (s. d.). Google Books. <https://books.google.com/books?hl=fr&lr=&id=9GVtMrioJQIC&oi=fnd&pg=PP16&dq=Bocard+2006&ots=JJjkvZLKxJ&sig=uz4aG4djLICDRjic9HecEVxIOWs>

C.....

- [85] Cabane F. 2012. *Lexique d'écologie, d'environnement et d'aménagement du littoral*. Version 24. Ifremer : 342 p.

- [86] Callen M.S., *et al.* 2014. Source apportionment of the carcinogenic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) associated to airborne PM₁₀ by a PMF model. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.*
- [87] Calvez T. 2009. Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. Université de Rennes 1/CNRS. Ecole Doctorale VieAgro-Santé. UFR Sciences de la vie et de l'environnement.
- [88] Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), 2001. Canadian- Wide Standards for Petroleum Hydrocarbons (PHC) in soil, 8p
- [89] Canali S., Diacono M., Ciaccia C., Masetti O., Tittarelli F. and Montemurro F. 2014. Alternative strategies for nitrogen fertilization of overwinter processing spinach (*Spinacia oleracea* L.) in southern Italy. *European Journal of Agronomy*, 54, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.11.013>.
- [90] Carlile J.M., Watkinson C.S., and Goody W.G. 2001. *The Fungi*. 2ème Ed. Academic press. London. pp: 25-65.
- [91] Carrouée B., Bourgeois E., Aveline A. 2006. Nitrate leaching related to dry pea in arable crop rotations. In: *Grain legumes and the environment: how to assess benefits and impacts?* AEP Eds, 117-124.
- [92] Cechin I., Rossi S.C., Oliveira V.C. *et al.* 2006. Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. *Photosynthetica* 44, 1, 143-146.
- [93] Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., and Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Angers : Bioforma. 161p.
- [94] Chaîneau C.H., Morel J.L., and Oudot J. 1996. Biodegradation of Fuel Oil Hydrocarbons in the Rhizosphere of Maize. *Phytoremediation*, IBC Conference, Arlington, VA.
- [95] Chakravarty P. and Deka H. 2021. Enzymatic defense of *Cyperus brevifolius* in hydrocarbons stress environment and changes in soil properties. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80854-5>.
- [96] Chance M., Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymology*. 2 : 764-817.
- [97] Chandra R., and Kumar V. 2017. Phytoextraction of heavy metals by potential native plants and their microscopic observation of root growing on stabilised distillery sludge as a prospective tool for in situ phytoremediation of industrial waste. *Environmental Science and Pollution Research* 24(3):2605–2619.
- [98] Chaudhary K., Agarwal S., and Khan S. 2018. Role of phytochelatins (PCs), metallothioneins (MTs), and heavy metal ATPase (HMA) genes in heavy metal tolerance in Mycoremediation and environmental sustainability (*Cham: Springer*), 39–60. doi: 10.1007/978-3-319-77386-5_2.
- [99] Chen F., Tan M., Ma J., Zhang S., Li G., and Qu J., 2016. Efficient Remediation of PAH Metal Co-Contaminated Soil Using Microbial-Plant Combination: A Greenhouse Study. *Journal of Hazardous Materials* 302 (Janvier): 250-61. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.09.068>.
- [100] Chen P. *et al.* 2015. Characteristics and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols in the Kathmandu Valley, Nepal. *Sci. Total Environ.*

- [101] Chen X., Han X., You M., Yan J., Lu X., Horwath W.R., and Zou W. 2019. Soil macroaggregates and organic-matter content regulate microbial communities and enzymatic activity in a Chinese Mollisol. *Journal of Integrative Agriculture*. (2019)
- [102] Chen X., Sheng Y., Wang G., Guo L., Zhang H., Zhang F., Yang T., Huang D., Han X., and Zhou L. 2022. Microbial compositional and functional traits of BTEX and salinity co-contaminated shallow groundwater by produced water. *Water Res.* 215, 118277.
- [103] Clarholm M. 1985. Possible roles of roots, bacteria, protozoa and fungi in supplying nitrogen to plants, pp. 355-365. In: H. Fitter, D. Atkinson D.J. Read and M.B. Usher (eds), *Ecological interactions in soils: plants, microbes and animals*. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- [104] Codjo L., Attakpa E. Y., Fayalo S.S., Sidi Orou Massara Z., and Imorou Toko I. 2021. Pathogenic Germs of West African Anurans: Bibliographical Summary International. *Journal of Progressive Sciences and Technologies (IJPSAT)*, ISSN, 28(2), 295-306.
- [105] Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., and Davies T.G.E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* 2, 144-151.
- [106] Colin F. 2000. Pollution localisée des sols et sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés. Edition TEC et DOC. 417p.
- [107] Collins C.D., and Finnegan E. 2010. Modeling the Plant Uptake of Organic Chemicals, Including the Soil Air Plant Pathway. *Environmental Science & Technology* 44(3): 998-1003.
- [108] Colombano S., Saada A., Guerin V., Bataillard P., Bellenfant G., Beranger S., Hube D., Blanc C., Zornig C., et Girardeau I. 2010. Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices ; BRGM/RP - 58609 – FR. 399 p.
- [109] Corami A. 2017. Soil pollution and phytoremediation. In: IIT Roorkee Executive, editor. *Environmental science and engineering* p 1–11.
- [110] Corami A. 2021. Phytoremediation impacts on water productivity. *Water Product J* 1(2):13–22.
- [111] Cordier T. 2012. Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale: Sciences et Environnements. Spécialité : Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés. Université Bordeaux 1. Pp: 3-16.
- [112] Crist E., Mora C., and Engelman R. 2017. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science* 356, 260–264.

D.....

- [113] Da Silva M.J., De Souza S.N.M., Chaves L.I., Rosa H.A., Secco D., Santos R.F., Baricatti R.A., and Nogueira C.E.C. 2013. Comparative analysis of engine generator performance using diesel oil and biodiesels available in Paraná State. *Braz. Renew. Sustain. Energy Rev*, Volume 17, Pages 278-282.
- [114] Da Silva A.F., Banat I.M., Giachini A.J., and Robl D. 2021. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 44, pp. 2003-2034.
- [115] Daâssi D., and Almaghribi F.Q. 2023. Petroleum-Degrading Fungal Isolates for the Treatment of Soil Microcosms. *Microorganisms*, 11 (5) :1351. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051351>.

- [116] Daccò C., Girometta C., Asemoloye M., Carpani G., Picco A., and Tosi S. 2020. Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 147, 104866.
- [117] Darmendrail D. 2000. Soils pollution; pollution des sols. <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20205739>
- [118] Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., and Qin W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol* 1, 36–50.
- [119] Davin M., Renard E., Lefébure K., Fauconnier M.L., and Colinet G. 2020. Temporal Evolution of PAHs Bioaccessibility in an Aged-Contaminated Soil during the Growth of Two Fabaceae. *Int. J. Environ. Res. Public Health* , 17, 4016. <https://doi.org/10.3390/ijerph17114016>
- [120] De pétrole : Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication, Tome 1. Technip.
- [121] Deeba F., Pruthi V., and Negi Y.S. 2018. Aromatic hydrocarbon biodegradation activates neutral lipid biosynthesis in oleaginous yeast. *Bioresour. Technol.* Volume 255, Pages 273-280.
- [122] Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.*, 109, pp. 212-228, 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021
- [123] Deshmukh R., Khardenavis A. A., and Purohit H. J. 2016. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247-264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>.
- [124] Despes J. 2012. L'univers des champignons, Editeur Les Presses de l'Université de Montréal, p6.
- [125] Devatha C. P., Vishnu Vishal A., and Purna Chandra Rao J. 2019. Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Appl. Water Sci.* 9(4), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0970-4>
- [126] Dhyani A., Rahul J., and Anita P. 2019. Contribution of root-associated microbial communities on soil quality of Oak and Pine forests in the Himalayan ecosystem. *Tropical Ecology* 60, no. 2: 271-280.
- [127] Di Toro D. M., McGrath J.A., and Stubblefield W.A. 2007. Predicting the toxicity of neat and weathered crude oil: Toxic potential and the toxicity of saturated mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 24–36.
- [128] Dickinson N. 2017. Phytoremediation, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edition), B. G. Murray and D. J. Murphy, eds., pp. 327-331, Oxford: Academic Press. Alchimia. La phytoremédiation : du Cannabis pour nettoyer les sols. Blog Growshop Alchimia.
- [129] Dindar E., Olcay F., Bas kaya H.S., and Agban T.S. 2016. Bio- degradation of used engine oil in a wastewater sludgeamended agricultural soil, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 40, pp. 631–641.
- [130] Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Volume 1. 860pp.
- [131] Dorter I., Momany M. 2016. Fungal cell cycle: a unicellular versus multicellular comparison. *Microbiol. Spectr.*, 4, 10.1128/microbiolspec.FUNK-0025-2016

- [132] Dreier W. and Göring M. 1974. Der Einfluss hoher Salzkonzentration auf verschiedene physiologische Parameters von Maiswurzeln. *Wiss. Z. Humboldt Univ. Berlin, Reihe/Math. Naturwiss* 23,641-644.
- [133] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [134] Dupuy J. 2014. Interactions entre les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les plantes supérieures : prélèvement et réponses toxiques. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Université de Lorraine.
- [135] Durand J.H., 1983. Les sols irrigables, Agence de coopération culturelle et technique. P.U. France, 190 p
- [136] Durousset, M. 1999. The oil market ; Le Marche du petrole. <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/20045079>

E.....

- [137] Eckford R. E., Cook F. D., Saul D., Aislabie J. and Foght J. M. 2002. Free-Living heterotrophic Nitrogen-Fixing bacteria isolated from Fuel-Contaminated Antarctic soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5181-5185. <https://doi.org/10.1128/aem.68.10.5181-5185.2002>.
- [138] Egbewale S.O., Kumar A., Mokoena M.P., and Olaniran A.O. 2023. Metabolic Biodegradation Pathway of Fluoranthene by Indigenous *Trichoderma lixii* and *Talaromyces pinophilus* spp. *Catalysts*, Vol. 13, Issue 5.
- [139] El-Aziz A.R.M.A, Al-Othman M.R., Hisham S.M., Shehata S.M. 2021. Evaluation of crude oil biodegradation using mixed fungal cultures. *PLoS ONE* 16(8): e0256376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256376>.
- [140] Elkhateeb W.A., Elnahas M.O., Daba G.M., Zohri A.A. 2021. Biotechnology and environmental applications of *Trichoderma spp.* *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 13(3).
- [141] Elyamine A.M., Kan J., Meng S., Tao P., Wang H., Hu Z. 2021. Aerobic and Anaerobic Bacterial and Fungal Degradation of Pyrene: Mechanism Pathway Including Biochemical Reaction and Catabolic Genes. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 8202. <https://doi.org/10.3390/ijms22158202>.
- [142] Esther F., Tibor C., Gyula O. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environ. Int.*, 30, 953–971
- [143] Eze M.O., Hose G.C., George S.C., Daniel R. 2021. Diversity and metagenome analysis of a hydrocarbon-degrading bacterial consortium from asphalt lakes located in Wietze, Germany. *AMB Express*, 11, 89.

F.....

- [144] Farag S., Soliman N.A. 2011. Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida Tropicalis* Strain. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54, 821–830.
- [145] Farhat A., Zeghouani R., Sanders T., Saad M.A., Roushdy M. 2010. Open-Hole Solid Expandables Eliminate Slim-Hole Configuration in Integrated Solution Workover Well. Acte de conference: the North Africa Technical Conference and Exhibition,

- Cairo, Egypt, February 2010. Paper Number: SPE-127792-MS.
<https://doi.org/10.2118/127792-MS>
- [146] Faria J. 2020. Main oil producing countries in Africa 2019. Retrieved 11 Dec from <https://www.statista.com/statistics/1178514/main-oil-producing-countries-in-africa>
- [147] Favennec J.P. 1998. Raffinage du pétrole (LE). Tome 5. Exploitation et gestion de la raffinerie.(s. d.).GoogleBooks. <https://books.google.com/books?hl=fr&lr=&id=4ARA Pp01AugC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Favennec+1998&ots=itatYCiBRv&sig=1EmS4h4fU2EaS8dBvSOtLdN5-4>
- [148] Feillet P. 2000. Le grain de blé : composition et utilisation. INRA Editions, ISBN 978-2-7380-0896-1.308 pp.
- [149] Fingas M. 2013. The basics of oil spill cleanup. Troisième Edition, Boca Raton. CRC Press, 266p.
- [150] Fokou Mbogne P.M. 2017. Biodégradation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout des substrats organiques. Mémoire de la maîtrise avec mémoire en génie de l'environnement. Université du Québec à l'école de technologie supérieure, Québec, Canada. Page : 1-15.
- [151] Fonseca L.M., Parreiras L.S., Murakami M.T. 2020. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. *Biotechnol Biofuel* 13:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01732-w>
- [152] Franennec J. P., Leprince P., Trembouze P. et Favennec J. P., 1998. Le raffinage
- [153] Fusey, P. and Oudot, J. 1973. Note sur l'accélération de la biodégradation d'un pétrole brut par des bactéries. *Mater. U. Organ.* (8): 158-163.
- [154] Fusey, P. and Oudot, J. 1976. Comparaison de deux méthodes d'évaluation de la biodégradation des hydrocarbures in vitro. *Mater. U. Organ.* 4, 241-251.
- [155] Fusey, P. Lampin, M. F. Oudot, J. 1981. Recherche sur l'élimination des hydrocarbures par voie biologique. *Mater. U. Organ.* (2): 109-147.

G.....

- [156] Gabet S. 2004. Remobilisation d'Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. <http://www.theses.fr/>. <https://www.theses.fr/2004LIMO0016>.
- [157] Galagan J.E., Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., *et al.* 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422: 859-868.
- [158] Garcia A. C. F. S., Birolli W. G., Araújo B. R., Marques C. G., Barbosa-Junior A. M., Diniz L. E. C., Porto A. L. M., and Romão L. P. C. 2021. Biodegradation of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fluoranthene by Fungi Strains from a Brazilian Tropical Peat. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 32(9), 1874–1883. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20210078>
- [159] García-Villacís K., Ramos-Guerrero L., Canga J.L., Hidalgo-Lasso D., Vargas-Jentzsch P., Govindan M. 2021. Environmental Impact Assessment of Remediation Strategy in an Oil Spill in the Ecuadorian Amazon Region. *Pollutants* 2021, 1, 19.

- [160] Garon D., Guéguen J.C. 2015. Biodiversité et évolution du monde fongique. Edition Science.
- [161] Gaur V. K., Sharma P., Sirohi R., Varjani S., Taherzadeh M. J., Chang J., Ng H. Y., Wong J. W. C., and Kim, J. S. 2022. Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a Circular Bioeconomy : An Overview. *Bioresource Technology*, 343, 126059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>
- [162] Gayathiri E., Prakash P., Karmegam N., Varjani S., Awasthi M.K., Ravindran B. 2022. Biosurfactants: Potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental safety—A review. *Agronomy*, 12, 662.
- [163] GENIVAR. 2013. Évaluation environnementale stratégique sur la mise en valeur des hydrocarbures dans les bassins d'Anticosti, de Madeleine et de la baie des Chaleurs. Rapport de GENIVAR au ministère des Ressources naturelles, 660 p.
- [164] Gerhardt K. E., Gerwing P. D. and Greenberg B. M. 2017. Opinion : Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Science*, 256, 170-185. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.016>.
- [165] Ghaleh Z.R., Sarmast M.K., Atashi S. 2020. 6-Benzylaminopurine (6-BA) ameliorates drought stress response in tall fescue via the influencing of biochemicals and strigolactone-signaling genes. *Plant Physiol. Biochem*, 155, 877–887.
- [166] Ghosh M., Singh S.P. 2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of Its Byproducts. *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 3, 1–18.
- [167] Ghosh S., Rusyn I., Dmytruk O.V., Dmytruk K., Onyeaka H., Gryzenhout M., Gafforov Y. 2023. Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol11. DOI=10.3389/fbioe.2023.1106973.
- [168] Ghosh S., Rusyn I., Dmytruk O.V., Dmytruk K.V., Onyeaka H, Gryzenhout M., and Gafforov Y. 2023. Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11:1106973. doi: 10.3389/fbioe.2023.1106973
- [169] Gielnik A., Pechaud Y., Huguenot D., Cébron A., Riom G., Esposito G., van Hullebusch E.D. 2019. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. *Sci. Total Environ.*, 670, pp. 271-281, [10.1016/j.scitotenv.2019.03.176](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.176).
- [170] Gomez D., 2010. Etude approfondie de l'influence de la nature chimique fine des polluants hydrocarbures sur le calcul du risque sanitaire." Technical report, AXE environnement, Ecole de Hautes Etudes En Sante Publique : 74.
- [171] Gray N. D., Sherry A., Hubert C., Dolfing J., Head I. M. 2010. Methanogenic degradation of petroleum hydrocarbons in subsurface environments: remediation, heavy oil formation, and energy recovery. *Adv. Appl. Microbiol.* 72 137–161. [10.1016/S0065-2164\(10\)72005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)72005-0)
- [172] Grimmer G. 2018. Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Crc Press, Boca Raton, Florida, USA.
- [173] Grishkan I., Lazaro R., Kidron G.J. 2021. Weak effect of plant canopy but strong impact of depth on variation of cultivable microfungus communities through soil profiles in semiarid Spain. *Pedobiologia* 85–86, 150710.

- [174] Grzegórska A., Rybarczyk P., Rogala A., Zabrocki D. 2020. Phytore-mediation — from environment cleaning to energy generation —current status and future perspectives. *Energies* 13:2905. <https://doi.org/10.3390/en13112905>.
- [175] Guerrero R. and Berlanga M. 2015. From the cell to the ecosystem : the physiological evolution of symbiosis. *Evolutionary Biology*, 43(4), 543-552. <https://doi.org/10.1007/s11692-015-9360-5>.
- [176] Guiraud J. 2012. *Microbiologie alimentaire*. Paris: Dunod. 651p.
- [177] Gupte A., *et al.* 2016. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs): a perspective *Open Biotechnol. J.*

H.....

- [178] Haider F.U., Ejaz M., Cheema S.A., Khan M.I., Zhao B., Liqun C., Salim M.A., Naveed M., Khan N., Núñez-Delgado A., Mustafa A. 2021. Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: sources, impacts and remediation strategies. *Environ. Res.*, p. 111031, [10.1016/j.envres.2021.111031](https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111031).
- [179] Hamad A. A., Moubasher H. A., Moustafa Y. M., and Mohamed N. H. 2021. Petroleum hydrocarbon bioremediation using native fungal isolates and consortia. *The Scientific World Journal*.
- [180] Hamamura N., Olson S.H., Ward D.M., and Inskeep W.P. 2006. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9), 6316-6324, doi:10.1128/AEM.01015-06.
- [181] Hamzah A., Manikan V., and Abd Aziz N.A.F. 2017. Biodegradation of tapis crude oil using consortium of bacteria and fungi: optimization of crude oil concentration and duration of incubation by response surface methodology. *Sains Malaysiana*, vol. 46, no. 1, pp. 43–50.
- [182] Han G., Cui B.X., Zhang X.X., Li K.R. 2016. The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2016, 13, 2383–2392.
- [183] Haritash A.K., Kaushik C.P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous –Materials*.169 (1-3) p. 1-15.
- [184] Harms H., Schlosser D., Wick L.Y. 2011. Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 177–192.
- [185] Hasanuzzaman M., Hakeem K.R., Nahar K., Alharby H.F. 2019. Plant Abiotic Stress Tolerance. *Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*. Springer Cham. XXIX, 490.
- [186] Hassaine A., Bordjiba O. 2019. Removal of hydrocarbons from liquid media by *Aspergillus niger* van Tieghem. *Acta Ecologica Sinica*, Volume 39, Issue 4, Pages 300-305, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.009>.
- [187] Hassan R.B., Asad M.M., Soomro Q.M., and Sherwani F. 2017. Severity of the Casing and Cementing Operation with Associated Potential Hazards in the Drilling Process in the On and Offshore Oil and Gas Industry: A Cross-Sectional Investigation into Safety Management, *Pertanika Journal of Social Sciences & Humanities*.
- [188] Hawksworth D. L., and Lücking R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol. Spectr.* 5 (4). doi: 10.1128/microbiolspec.

- [189] Hazen T.C., Prince R.C., Mahmoudi N. 2016 Marine oil biodegradation. *Environ Sci Technol.*50:2121–2129. doi: 10.1021/acs.est.5b03333.
- [190] Healy M.G., Fenton O., Forrestal P.J., Danaher M., Brennan R.B., Morrison O. 2016. Metal concentrations in lime stabilized, thermally dried and anaerobically digested sewage sludges, *Waste Management*, 48, 404-408.
- [191] Hedberg E., *et al.* 2005. Source contributions to PM₁₀ and arsenic concentrations in Central Chile using positive matrix factorization. *Atmos. Environ.*
- [192] Heras-Martínez H. M., Muñoz-Castellanos L. N., Bugarín A., Ramos-Sánchez V. H., Salmerón Ochoa I., and Chávez-Flores D. 2022. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Acremonium sp.* activity. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 38, 261–269. <http://orcid.org/0000-0001-6852-0406>
- [193] Hossain M.A., Piyatida P., da Silva J.A.T., Fujita M. 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.*, 872875.
- [194] Hou J., Wang Q., Liu W., Zhong D., Ge Y., Christie P., Luo Y. 2021. Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Science of The Total Environment*, Volume 792, 148411
- [195] Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chi Chang C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem.* 45(1):62-9.
- [196] Huang C., *et al.* 2021. Influence of surface functionalities of pyrogenic carbonaceous materials on the generation of reactive species towards organic contaminants: a review *Chem. Eng. J.*
- [197] Huang Y.F., Wu Q.L., Wan Q., *et al.* 2019. Research progress of Arbuscular Mycorrhizal fungi. *Modern Agriculture*, 12: 9-12.
- [198] Humel S., Schmidt S.N., Sumetzberger M., Mayer P., Loibner A.P. 2017. Enhanced accessibility of PAHs and heterocyclic PAHs in industrially contaminated soil after passive dosing of a competitive sorbate. *Environ.Sci.Technol.*51(14). 8017–8026. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01198>.
- [199] Hussain A., Rehman F., Rafeeq H., Waqas M., Asghar A., Afsheen N., Rahdar A., Bilal M., Iqbal H.M. 2022. In-situ, Ex-situ, and nano-remediation strategies to treat polluted soil, water, and air—A review. *Chemosphere* , 289, 133252.
- [200] Hussain F., Hussain I., Ali Khan A.H., Muhammad Y.S., Iqbal M., Soja G., Reichenauer T.G., Zeshan, Yousaf S. 2018. Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany*, Volume 153, Pages 80-88.
- [201] Hussain I., Puschenreiter M., Gerhard S., Sani S.G.A.S., Khan W., Thomas G. 2019. Reichenauer1 Differentiation between physical and chemical effects of oil presence in freshly spiked soil during rhizoremediation trial. *Environmental Science and Pollution Research*, 26:18451–18464 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04819-6>.

- [202] Hussein Z.S., Hamido N., Hegazy A.K., El Dessouky M.A., Mohamed N.H., Safwat G. 2022. Phytoremediation of Crude Petroleum Oil Pollution: A Review. Egypt. J. Bot., Vol. 62, No.3, pp. 611-640.
- [203] Hutchinson S.L., Banks M.K., Schwab A.P. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. J. Environ. Qual., 30, 395–403.

I.....

- [204] Idongesit A.V., Ebuana O.I., Iquo A.A. , Orok E.E. , Emmanuel O., Andem B. 2022. IEA Oil Information 2022 <https://www.iea.org/data-and-statistics/data-product/oil-information>.
- [205] Ighilahriz K., Khodja M., Haddadi S., Benchouk A., and Boutamine H. 2020. Bioremediation of Oily Sludge Contaminated Site—A Pilot-Scale Study. Dans Springer eBooks (p. 241-250). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9223-2_12
- [206] Ikhajagbe B., Edegbai B.O., and Aibuedefe F. 2017. Hydrocarbon Utilization by Culturable Microbial Species in the Rhizosphere of *Eleusine indica* in Oil-Polluted Soils. NISEB Journal Vol. 17, No. 1.
- [207] Imam A., Suman S.K., Ghosh D., and Kanaujia P.K. 2019. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge, TRAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 118, pp. 50–64.
- [208] Imam A., Suman S.K., Ghosh D., and Kanaujia P.K. 2019. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. TRAC Trends in Analytical Chemistry, vol. 118, pp. 50–64.
- [209] Imron M.F., Kurniawan S.B., Ismail N.I., and Abdullah N.R.S. 2020. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: a review. Journal of Cleaner Production, vol. 251, pp. 1–18.
- [210] Ismail N.A., Kasmuri N., Hamzah N., Jaafar J., Mojiri A., Kindaichi T. 2023. Influence of pH and concentration on the growth of bacteria - fungus and benzo[a]pyrene degradation. Environmental Technology & Innovation, Volume 29, 102995. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102995>.
- [211] Ismail N.A., Hamzah N., Kasmuri N., Jaafar J., Ali M.F., Khalil K.A., Singhal N. 2020. Optimization and interaction analysis of bacterial and fungal growth in the presence of benzo (a)pyrene in wastewater. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 616 012067. DOI 10.1088/1755-1315/616/1/012067.
- [212] Izdebska-Mucha D., TrzcíńSk J., Żbik M.S., Frost R.L. 2011. Influence of hydrocarbon contamination on clay soil microstructure. Clay Miner., 46, 47–58.

J.....

- [213] Jacobs A., De Brabandere L., Drouet T., Sterckeman T., Noret N. 2018. Phytoextraction of Cd and Zn with *Noccaea caerulea* for urban soil remediation: influence of nitrogen fertilization and planting density. Ecol Eng 116:178–187.
- [214] Jain R., Bhardwaj P., Pandey S. S. and Kumar S. 2021. *Arnebia euchroma*, a plant species of cold desert in the Himalayas, harbors beneficial cultivable endophytes in roots and leaves. Frontiers in Microbiology, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696667>.

- [215] James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Vilgalys R., *et al.* 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822.
- [216] Jang E., *et al.* 2013. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air using positive matrix factorization and spatial distribution analysis. *Atmos. Environ.*
- [217] Jennings D.H. and Lysek G. 1996. Nuclear relationships. In: *Fungal Biology: Understanding the Fungal Life Style* (Jennings D.H. Lysek G., Eds.), pp.114–115 Bios Scientific Publishers, UK.
- [218] Jia J., Zong S., Hu L., Shi S., Zhai X., Wang B., Li G., Zhang D. 2017 The dynamic change of microbial communities in crude oil-contaminated soils from oil fields in China. *Soil Sediment Contam. Int. J.*, 26, 171–183.
- [219] Jia M., Zhou D., Lu S., Yu J. 2021. Assessment of foliar dust particle retention and toxic metal accumulation ability of fifteen roadside tree species: relationship and mechanism. *Atmos. Pollut. Res.* Volume 12, Issue 1, Pages 36-45.
- [220] Jiji J., et Prabakaran P. 2020. Isolation and Identification of Microorganisms From Total Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil Sites. *Malaysian Journal of Soil Science*, Vol. 24: 107-119.
- [221] Jirát J., Zvoníček V., Babor M., Ridvan L., Skořepová E., Dušek M., and Šooš M. 2020. Formation of the First Non-Isostructural Cocrystal of Apremilast Explained. *Crystal Growth & Design*. 20 (9), 5785-5795. DOI: 10.1021/acs.cgd.0c00393
- [222] Joblin Y. 2012. Thèse: Elaboration d'un microsystème d'analyse de l'air destiné à la détection rapide d'un développement fongique dans les espaces clos. Phd thesis, Université Paris-Est. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00696618/document>.
- [223] Johannes K.F. 2012. *Drilling Muds. Petroleum engineer's guide to oil field chemicals and fluids.* Gulf Professional Publishing, Oxford, pp 1–59.
- [224] John J. 2013. *Assessment of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Green Roof System;* Dalhousie University: Halifax.
- [225] Joner E., Leyval C. 2003. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: A new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, 23, 495–502.
- [226] J.O.R.A.D.P. (Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire). 2006. Décret exécutif n° 06-198 du 4 Joumada El Oula 1427 correspondant au 31 mai 2006 définissant la réglementation applicable aux établissements classés pour la protection de l'environnement.
- [227] Joutey T. N., Bahafid W., Sayel H., and El Ghachtouli N. 2013. Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In.: *Agricultural and Biological Sciences: Biodegradation, Life of Science.* Eds.: Chamy R. and Rosenkranz F.

K.....

- [228] Kadri T., Rouissi T., Brar S.K., Cledon M., Sarma S., and Verma M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by 3 fungal enzymes: a review. *J. Environ. Sci.*, 51, pp. 52-74

- [229] Kanaly R.A., and Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria, *Journal of bacteriology*, 182: 2059-2067.
- [230] Kang Z.M., *et al.* 2020. Yield advantage and cadmium decreasing of rice in intercropping with water spinach under moisture management. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- [231] Karabi M. 2017. Fonctionnement microbiologique des sols oasiens : cas de quelques sols de la région de Ouargla. Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Ouargla : Université Kasdi Merbah, 221 p. URL: <https://dspace.univ-ouargla.dz › jspui › bitstream › Mokhtar-KARABI-D>.
- [232] Kashyap N., Roy K., Moholkar V.S. 2020. Mechanistic investigation in Co-biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Candida tropicalis* MTCC 184. *Chem. Eng. J.* Volume 399, 125659.
- [233] Kashyap N., *et al.* 2020. Mechanistic investigation in Co-biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Candida tropicalis* MTCC 184. *Chem. Eng. J.*
- [234] Kaur M., Kumar A., Mehra R., and Kaur I. 2020. Quantitative Assessment of Exposure of Heavy Metals in Groundwater and Soil on Human Health in Reasi District, Jammu and Kashmir. *Environmental Geochemistry and Health* 42 (1): 77–94. doi:10.1007/s10653-019-00294-7.
- [235] Kaur S., Midha T., Verma H., Muduli R.R., Dutta O., Saini O. 2023. Bioremediation: A favorable perspective to eliminate heavy metals from polluted soil, In *Developments in Applied Microbiology and Biotechnology, Metagenomics to Bioremediation*, Academic Press, Pages 209-230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96113-4.00030-5>.
- [236] Kaur T., Toor A.P., Wanchoo R.K. 2015. Parametric study on degradation of fungicide carbendazim in dilute aqueous solutions using nano TiO₂. *J. Desalination Water Treatment*, 54 (1), pp. 122-131
- [237] Kébé I. B., Mpika J., N'guessa K., Hebbar P., Samuels G. and Aké S. 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de Cacaoyères en Côte d'Ivoire Et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. *Sciences & nature*, 6(1). <https://doi.org/10.4314/scinat.v6i1.48581>.
- [238] Kebede G., Tafese T., Abda E.M., Kamaraj M., Assefa F. 2021. Factors influencing the bacterial bioremediation of hydrocarbon contaminants in the soil: Mechanisms and impacts. *Journal of Chemistry*, 1–17.
- [239] Keith L. H. 2014. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAHs Priority Pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 35 (2-4), 147–160.
- [240] Khalid A., Zhang Q., Yasir M., Li F. 2017. Small RNA based genetic engineering for plant viral resistance: application in crop protection. *Front. Microbiol.* 8:43.
- [241] Khamchhiyan M., Charkhabi A.H., Tajik M. 2007. Effects of crude oil contamination on geotechnical properties of clayey and sandy soils. *Engineering Geology*. 89(3):220–229.
- [242] Khan A. H. A., Kiyani A., Mirza C. R., Butt T. A., Barros R., Ali B., Iqbal M., and Yousaf S. 2021. Ornamental plants for the phytoremediation of heavy metals: Present

- knowledge and future perspectives. *Environmental Research*, 195, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110780>.
- [243] Khan A.Z., Bilal M., Rasheed T., Iqbal H.M.N. 2018. Advancements in biocatalysis: from computational to metabolic engineering. *Chinese Journal of Catalysis*. Volume 39, Issue 12, Pages 1861-1868.
- [244] Khan M.A.I., Biswas B., Smith E., Naidu R., Megharaj M. 2018. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil - a review. *Chemosphere* 212:755–767. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.094>.
- [245] Khan S., Masoodi T.H., Pala N.A., Murtaza S., Mugloo J.A., Sofi P.A., Zaman M.U., Kumar R., Kumar A. 2023. Phytoremediation Prospects for Restoration of Contamination in the Natural Ecosystems. *Water* 15, 1498. <https://doi.org/10.3390/w15081498>.
- [246] Khan S., Nadir S., Shah Z.U., Shah A.A., Karunarathna S.C., Xu J., Khan A., Munir S., Hasan F. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environ Pollut* 225:469–480.
- [247] Khodja M. 2008. Les fluides de forage : étude des performances et considérations environnementales. PhD, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- [248] Khokonov M. Kh., Khokonov A. Kh. 2021. Cluster Size Distribution in a System of Randomly Spaced Particles. *Journal of Statistical Physics*, 182(1)3.
- [249] Kim A.W., *et al.* 2018. PAH, PCB, TPH and mercury in surface sediments of the Delaware river estuary and Delmarva Peninsula, USA. *Mar. Pollut. Bull.*
- [250] Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. (eds). 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, ninth ed. CABI Publishing, Wallingford.
- [251] Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W. et Stalpers J.A. 2008. *Dictionary of the Mycota*. 10th Edition. Cromwell Press, Trowbridge.
- [252] Klučáková M. 2018. Size and Charge Evaluation of Standard Humic and Fulvic Acids as Crucial Factors to Determine Their Environmental Behavior and Impact. *Front. Chem.*, 6, 235.
- [253] Kong Z., Mohamad O.A., Deng Z., Liu X., Glick B.R., and Wei G., 2015. Rhizobial Symbiosis Effect on the Growth, Metal Uptake, and Antioxidant Responses of *Medicago Lupulina* under Copper Stress . *Environmental Science and Pollution Research* 22 (16): 12479-89. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4530-7>.
- [254] Koohkan H., Mortazavi M.S., Golchin A. *et al.* 2023. Comparison of Native Bacterial and Fungal Bioaugmentation in the Removal of Petroleum from Soil in the Presence of Sorghum. *Water Air Soil Pollut* 234, 309. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06298-5>.
- [255] Kordrostami M., Ebadi A., Rabiei B. and Mafakheri M. 2019. Plant heavy metal interactions and pollution stress. Dans *CRC Press eBooks* (p. 469-477). <https://doi.org/10.1201/9781351104609-24>
- [256] Koshlaf E. and Ball A. 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, vol. 3, no. 1, pp. 25–49.
- [257] Kosugi H., and Kikugawa K. 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids*. 20:915–920.
- [258] Kotoky R., Das S., Paikhomba Singha L., Pandey P., Malabika Singha K. 2018. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm-forming and plant growth

- promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB4. Environ. Technol. Innovation. Volume 8, Pages 256-268.
- [259] Kreslavski V.D., Brestic M., Zharmukhamedov S.K., Lyubimov V.Y., Lankin A.V., Jajoo A., Allakhverdiev S.I. 2017. Mechanisms of inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in photosynthetic primary processes in pea leaves and thylakoid preparations. Plant Biol., 19, 683–688.
- [260] Kristanti R.A., Hadibarata T., Toyama T., Tanaka Y., Mori K. 2011. Bioremediation of crude oil by white rot fungi *Polyporus* sp. S133. J. Microbiol. Biotechnol., 21, 995–1000.
- [261] Kumar A., Yadav A.N., Mondal R., Kour D., Subrahmanyam G., Shabnam A.A., Khan S.A., Yadav K.K., Sharma G.K., Cabral-Pinto M., *et al.* 2021. Mycoremediation: A mechanistic understanding of contaminants alleviation from natural environment and future prospect. Chemosphere, 284, 131325.
- [262] Kumar S., Upadhyay S.K., Kumari B., Tiwari S., Singh S.N., and Singh P.K. 2011. In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge. Bioresour. Technol, 102, 3709–3715.
- [263] Kumar V., Dwivedi S.K. 2021. Mycoremediation of Heavy Metals: Processes, Mechanisms, and Affecting Factors. Environ. Sci. Pollut. Res., 28, 10375–10412.
- [264] Kumar A., Gudiukaite R., Gricajeva A., Sadauskas M., Malunavicius V., Kamyab H., Sharma S., Sharma T., Pant D. 2020. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. Energy. Volume 192, 116674.
- [265] Kumar M., Seth A., Singh A.K., Rajput M.S., Sikandar M. 2021. Remediation strategies for heavy metals contaminated ecosystem: a review. Environ. Sustain. Indic., 12, Article 100155, 10.1016/j.indic.2021.100155
- [266] Kumari R., Attri A.K., and Gurjer B.R. 2011. Impact of CNG on emissions of PAHs and PCCDs/Fs from the road transport in Delhi. Atmospheric Pollution Research, 2: 394-399.
- [267] Kuppusamy S., Maddela N. R., Meghara, M., and Venkateswarlu K. 2020. An overview of total petroleum hydrocarbons. In Total Petroleum Hydrocarbons (pp. 1-27). Springer, Cham.
- [268] Kurade M.B., Ha Y.H., Xiong J.Q., Govindwar S.P., Jang M., Jeon B.H. 2021. Phytoremediation as a green biotechnology tool for emerging environmental pollution: A step forward towards sustainable rehabilitation of the environment. Chem. Eng. J., 415, Article 129040.
- [269] Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Makarov S.O., Litvinenko L.V., Cunningham C.J., Philp J.C. 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ Int* ; 31(2) :155-61.
- [270] Kuzyakov Y., Friedel J. K. and Stahr K. 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. Soil Biology & Biochemistry, 32(11-12), 1485-1498. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(00\)00084-5](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(00)00084-5)

L.....

- [271] Lang C., Tao S., Liu W., Zhang Y., and Simonich S. 2008. Atmospheric transport and outflow of polycyclic aromatic hydrocarbons from China. *Environ. Sci. Technol.*, 42, pp. 5196-5201.
- [272] Lareen A., Burton F., Schäfer P. 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant Mol Biol* 90:575–587.
- [273] Lasota J. and Błońska E. 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons content in contaminated forest soils with different humus types. *Water Air Soil Poll.* 229, 204. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3857-3>
- [274] Lavelle P., Spain A. 2001. Soil Ecology [en ligne]. Allemagne : Springer Science and Business Media. 654. URL: https://books.google.fr/books/about/Soil_Ecology.html?id=iCC1sOmFTSMC
- [275] Lecellier A. 2013. Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et RAMAN. <http://www.theses.fr/> <https://www.theses.fr/2013REIMS023>.
- [276] Lee S. *et al.* 2013. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*, 93, 434–440.
- [277] Lefebvre G. 1986. Notions de chimie du pétrole. Editions TECHNIP, 1232 pages.
- [278] Legind C.N. 2011. Uptake of organic contaminants from soil into vegetables and fruits. Dans Springer eBooks (p. 369-408). https://doi.org/10.1007/978-90-481-9757-6_9.
- [279] Léglise F., Luo M., Casellas M. and Dagot C. 2011. Impact of copper and cadmium on aerobic and anaerobic digestibility of sonicated sludge. *Water Science and Technology*, 63(9), 1955-1966. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.125>.
- [280] Lemiere B., Seguin J.J., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger P.H. 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Ed BRGM. France.
- [281] Li C., Zhou K., Qin W., Tian C., Qi M., Yan X. and Han W. 2019. A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 28:4, 380-394. DOI: 10.1080/15320383.2019.1592108.
- [282] Li D.W., and Chin Y. 2004. Fungal Contamination as a Major Contributor to Sick Building Syndrome. *Advances in Applied Microbiology*: 31–112.
- [283] Li Q., Liu J. and Gadd G.M. 2020. Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 8999–9008. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10854-y>.
- [284] Lifshits S.K., Glyaznetsova Y., Chalaya O.N. 2018. Self-Regeneration of Oil-Contaminated Soils in the Cryolithozone on the Example of the Territory of the Former Oil Pipeline «Talakan- Vitim». In Proceedings of the INTEREKSP0 GEO-SIBIR, Novosibirsk, Russia, 23–27 April 2018; pp. 199–206.
- [285] Limoges B., Boisseau G., Gratton L. et Kasisi R. 2013. Terminologie relative à la conservation de la biodiversité in situ, *Le Naturaliste canadien*, 137 N°2, pp. 21 à 27.
- [286] Liu B., Wang S., Wang J., Zhang X., Shen Z., Shi L., *et al.* 2020. The great potential for phytoremediation of abandoned tailings pond using ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Sci. Total Environ.* 719:137475. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137475.

- [287] Liu H., Tan X., Guo J., Liang X., Xie Q., and Chen S. 2020. Bioremediation of oil-contaminated soil by combination of soil conditioner and microorganism, *Journal of Soils and Sediments*, vol. 19 pages.
- [288] Liu J., Bacosa H.P., and Liu Z. 2017. Potential environmental factors affecting oil-degrading bacterial populations in deep and surface waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 2131.
- [289] Liu J.L., Zhang J., Liu F., Zhang L.L. 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment of typical estuaries and the spatial distribution in Haihe river basin cotoxicology, 23 (4), pp. 486-494.
- [290] Liu L., Bilal M., Duan X., Iqbal H.M.N. 2019. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria—current challenges and future perspectives. *Sci Total Environ.* 667:444–454. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.390.
- [291] Liu SL., Cao ZH., Liu HE. 2013. Effect of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) growth on degradation of phenanthrene and enzyme activity in soil. *Plant Soil Environ.* Vol. 59, No. 6: 247-253.
- [292] Liu X., Meng H., Wang Y., Katayama Y., and Gu J. 2018. Water is a critical factor in evaluating and assessing microbial colonization and destruction of Angkor sandstone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 133, 9–16.
- [293] Logeshwaran P., Megharaj M., Chadalavada S., Bowman M., Naidu R. 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers; An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innov.*, 10, 175–193.
- [294] Lounis S. et Daoud I. 2005. Analyse microbienne et physicochimique des sols contaminés par les hydrocarbures à Hassi-Messaoud. *Memoir de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en écologie option pathologie des écosystèmes*, 63p.
- [295] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- [296] Luft L., Confortin T. C., Todero I., Zabet G. L., and Mazutti M. A. 2020. An overview of fungal biopolymers: bioemulsifiers and biosurfactants compounds production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1059-1080. doi:10.1080/07388551.2020.1805405.
- [297] Lummus J. L. 1986. *Drilling Fluids Optimization : A Practical Field approach*. <https://www.osti.gov/biblio/5695375>.
- [298] Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., *et al.* 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany.* 91: 1446–1480.
- [299] Lyubun Y., Muratova A., Dubrovskaya E., Sungurtseva I., Turkovskaya O. 2020. Combined effects of cadmium and oil sludge on sorghum: Growth, physiology, and contaminant removal. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 22720–22734.

M.....

- [300] Ma L., Zhao B., Guo Z., Wang D., Li D., Xu J., Li Z. and Zhang J., 2019. Divergent responses of bacterial activity, structure, and co-occurrence patterns to long-term unbalanced fertilization without nitrogen, phosphorus, or potassium in a cultivated

- vertisol. *Environmental Science and Pollution Research* 26(13), 12741-12754, doi:10.1007/s11356-019-04839-2.
- [301] Ma X.D., Li X., Liu J.X., *et al.* 2021. Soil microbial community succession and interactions during combined plant/white-rot fungus remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* ;752:142224 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142224>.
- [302] Maamar A., Lucchesi M.E., Debaets S., *et al.* 2020. Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria). *Diversity*, 12, 196. <https://doi.org/10.3390/d12050196>.
- [303] Maes E., Schadeck S., Brahy V. 2007. Sols 5: La contamination locale des sols, p 500-519, in chapitre [11] – les sols et l’environnement terrestre.
- [304] Mahdavian K., Asadigerkan S., Sangtarash M. H., Nasibi F. 2022. Phytoextraction and phytostabilization of copper, zinc, and iron by growing plants in chahar gonbad copper mining area, Iran, in *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, Vol. 92. 319–327.
- [305] Mahmud T., Sabo I.A., Isa S. *et al.*, 2020. Roles and applications of bacteria in petroleum industry: a review. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*, vol. 6, pp. 198–214.
- [306] Makhalanyaane T.P., Valverde A., Gunnigle E., Frossard A., Ramond J.B., Cowan D.A. 2015. Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 203–222.
- [307] Makut M.D., Oyegue A.O., Owuna J., Maichiki A. 2022. Optimization of indigenous hydrocarbon Degradingmicrobial niche for effective bioremediation of petroleum contaminated soil. *BIOMED Natural and Applied Science*, 1(3):24-34.
- [308] Malo M., Lefebvre R., Comeau F A. and Séjourné S. 2015. Synthèse des connaissances portant sur les pratiques actuelles et en développement dans l’industrie pétrolière et gazière. Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau Terre Environnement, 490 de la Couronne, Québec. Rapport de recherche 1553.
- [309] Mancera-Lopez M.E., Esparza-Garcia F., Chavez-Gomez B., Rodriguez-Vazquez R., SaucedoCastaneda G., Barrera-Cortes J., 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61: 151–160.
- [310] Mansour D., Nasrallah N., Djenane D., Amrane A., Maachi R. 2016. Richness of drilling sludge taken from an oil field quagmire: potentiality and environmental interest. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13:2427–2436.
- [311] Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., & Vandecasteele, J. P. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology – Revue d’IFP Energies nouvelles*, 58(4), 441-448. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003027>.
- [312] Marchant R., Banat I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30 (11), 558-565.
- [313] Marklund S. and Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469–474.

- [314] Marquez S.S., Bills G.F. and Zabalgoeazcoa I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Divers.* 27: 171-195.
- [315] Martinez L.M., Ruberto L.A.M, Gurevich J.M., and Mac Cormack W.P. 2019 Environmental factors affecting reproducibility of bioremediation field assays in Antarctica. *Cold Regions Science and Technology*, vol. 169, pp. 1–9.
- [316] Martins L.F., and Peixoto R.S. 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline Environments. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 865872 pages.
- [317] Martin-Sanchez P.M., Becker R., Gorbushina A.A., Toepel J. 2018. An improved test for the evaluation of hydrocarbon degradation capacities of diesel-contaminating microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 129, 89–94.
- [318] Marwah B. 2022. Assessing some Cladosporium species in the biodegradation of petroleum hydrocarbon for treating oil contamination, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 133, Issue 6, 1 December 2022, Pages 3296–3306, <https://doi.org/10.1111/jam.15815>.
- [319] Mascarin G.M., Jaronski S.T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 177.
- [320] Maslennikov P.V., Chupakhina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Melnik A.S. 2018. The contribution of polyphenols to plant resistance to Pb soil pollution. *Int. J. Environ. Stud.*, 75, 719–731.
- [321] Mchugh T.A., Compson Z., Van Gestel N., *et al.* 2017. Climate controls prokaryotic community composition in desert soils of the southwestern United States. *FEMS Microbiology Ecology* [en ligne], 93 (10), 1-13. (page consultée le 10 mai 2020) URL: <https://academic.oup.com/femsec/article/93/10/fix116/4111145>.
- [322] McLaughlin D.J., Hibbett D.S., Lutzoni F., Spatafora J.W., Vilgalys R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*. Vol (17) n°11 : 488-497.
- [323] Meckenstock R.U., Boll M., Mouttaki H., Koelschbach J.S., Tarouco P.C., Weyrauch P., Dong X., Himmelberg A.M. 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microb. Physiol.*, 26, 92–118.
- [324] Medaura M.C., Guivernau M., Moreno-Ventas X., Prenafeta-Boldú F.X., and Viñas M. 2021. Bioaugmentation of Native Fungi, an Efficient Strategy for the Bioremediation of an Aged Industrially Polluted Soil With Heavy Hydrocarbons. *Front. Microbiol.* 12:626436. doi: 10.3389/fmicb.2021.626436.
- [325] Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375. doi: 10.1016/j.envint.2011.06.003.
- [326] Meghnous O. 2020. Etude de l'aptitude des souches fongiques, isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques de la région minière d'Ain-Babouche, à la remédiation des sols métallifères. Université des Frères Mentouri (Constantine 1).
- [327] Mehassouel A. 2009. Détermination des propriétés physiques des hydrocarbures purs et de leurs mélanges par la méthode de contribution de groupes avec interactions intramoléculaires : Mémoire de Magister en Génie Chimique : Ecole Nationale Supérieure Polytechnique Alger .
- [328] Méheust D. 2012. Exposition Aux Moisissures En Environnement Intérieur: Méthodes de Mesure et Impacts Sur La Santé. Université Rennes 1. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00768444/>

- [329] Mekkaoui M., Belhadri M., Hammadi L. and Boudjenane N. 2017. Rheological behaviour of crude oil : effect of temperature and seawater. *Petroleum Chemistry*, 57(10), 843-848. <https://doi.org/10.1134/s0965544117100127>
- [330] Mikolasch A., Donath M., Reinhard A., Herzer C., Zayadan B., Urich T., Schauer F. 2019. Diversity and degradative capabilities of bacteria and fungi isolated from oil-contaminated and hydrocarbon-polluted soils in Kazakhstan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 7261–7274.
- [331] Miranda-González R., McCune B. 2020. The weight of the crust: biomass of crustose lichens in tropical dry forest represents more than half of foliar biomass. *Biotropica* 52: 1298– 1308.
- [332] Mishra A., and Nautiyal C.S. 2009. Functional diversity of the microbial community in the rhizosphere of chickpea grown in diesel fuel-spiked soil amended with *Trichoderma reesei* using sole-carbon-source utilization profiles. *World J Microbiol Biotechnol*, 25, 1175-1180.
- [333] Mishra S., Singh S. N., Pande, V. 2014. *Bioresour. Technol.*, 164, 299.
- [334] Mohan H., Lim J.M., Cho M., Park Y.J., Seralathan K.K., Oh B.T. 2020. Remediation of BTEX and Cr(VI) contamination in soil using bioelectrochemical system-an eco-friendly approach. *Environ Sci Pollut Res.*;27:837–845.
- [335] Mohsen E. I., Mohamed A. I. M., and El-Boughdady N.A. 2020 Efficiency of Some Egyptian Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon. *American Journal of Microbiological Research*, vol. 8, no. 1: 1-6. doi: 10.12691/ajmr-8-1-1.
- [336] Mohsenzadeh F., Nasser S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., Khodakaramian G., Chehregani A. 2010. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:613–619.
- [337] Molina L., and Segura A. 2021. Biochemical and metabolic plant responses toward polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals present in atmospheric pollution. *Plants*, 10, 2305.
- [338] Monneveux P. and Nemmar M. 1986. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie, EDP Sciences*, 6 (6), pp.583- 590.
- [339] Moore D. D., Bencheikh A., Chopty J. R. 2004. Drilling Underbalanced in Hassi Messaoud. SPE 91519, présenté à la conférence IADC/SPE sur les technologies en UBD, Houston, Texas, USA.
- [340] Mortet A. 2019. Etude du rôle de quelques plantes graminées et légumineuses dans la phytoremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Thèse de Doctorat de 3^{ème} Cycle LMD. Université Abdelhamid Ben Badis Mostaganem.
- [341] Mostafa A.A., Hafez R.M., Hegazy A.K., Fattah A.M.A.E., Mohamed N.H., Mustafa Y.M., Gobouri A.A., Azab E. 2021. Variations of structural and functional traits of *Azollapinnata* R. Br. in response to crude oil pollution in arid regions. *Sustainability*, 13, 2142.

- [342] Mousavi S.M., Zarei M., Hashemi S.A., Ramakrishna S., Chiang W.H., Lai C.W., Gholami A. 2020. Gold nanostars-diagnosis, bioimaging and biomedical applications. *Drug Metab. Rev.*, 52, 299–318.
- [343] Mueller G.M., Schmit J.P. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*. 16: 99-111.
- [344] Mukherjee A.K., Bhagowati P., Biswa B.B., Chanda A., Kalita B. 2017. A comparative intracellular proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strain ASP-53 grown on pyrene or glucose as sole source of carbon and identification of some key enzymes of pyrene biodegradation pathway. *Journal of proteomics*, 167, 25-35.
- [345] Muratova A., Hubner T., Narula N., Wand H., Turkovskaya O., Kusch P., Jahn R., Merbach W. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiol. Res.* 158, 151-161.
- [346] Musavi S.F., Balakrishnan R.M. 2014. A Study on the Antimicrobial Potentials of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. *Journal of Medical and Bioengineering Vol(3) n°3* : 162-166.
- [347] Mutlag N.H., Hamoudi S.A., Radhi W.N. 2023. Bioremediation of Polluted Soil with Hydrocarbons by Some of *Trichoderma* Spp in Al-Najaf-Iraq. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, Vol. 90 (2), Page 2620-2627.

N.....

- [348] Nadim F., *et al.* 2000. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview *J. Pet. Sci. Technol.*
- [349] Nagano Y., and Nagahama T. 2012. Fungal diversity in deep-sea extreme environments. *Fungal Ecol.* 5, 463–471. doi: 10.1007/978-3-642-23342-5_9.
- [350] Naranjo-Briceño L., Pernía B., Guerra M., Demey J.R., De Iusto A., Inojosa Y., González M., Fusella E., Freitas M., Yegres F. 2013. Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. *Microbial Biotechnology*, 6, pp. 720-730.
- [351] Naseer O., Khan J.A., Omer M.O., Naseer J., Sohail M.L., Munir M.A., Saleem M.U., Imran M. and Shahid M. 2020. Exogenous factors affecting growth of *Aspergillus* species. *Indian Journal of Animal Research*. 54(8): 994-999.
- [352] Nasraoui, B.2006. Les champignons parasites des plantes cultivées, biologie systématique pathologie maladies. Chapitre 4 : Centre de Publication Universitaire, Tunis, p 363-42
- [353] National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Browser. 1988.Glycine max. consulté le 12/12/2015 sur le site : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3847&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s>
- [354] Naudot E. 2019. Comment sont produits et extraits l'essence et le diesel ? Consulté du site : <https://www.fiches-auto.fr/articles-auto/fonctionnement-d-une-auto/s-2130-comment-sont-produits-et-extraits-l-essence-et-le-diesel-.php> le 07/01/2019.
- [355] Nicotra A.B., Atkin O.K., Bonser S.P., Davidson A.M., Finnegan E.J., Mathesius U., Poot P., *et al.* 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15, 684-692.

- [356] Nnaji G. U., Mbagwu S. C., and Asadu C.A. 2005. Changes in physical properties of soil under cassava monocropping and organic waste amendments. Proceedings of the 19th Annual Conference of Farm Management Association of Nigeria (FAMAN'05), October 18 – 20, Delsu, Asaba Campus, Delta State, pp: 374-377.
- [357] Noemie E., Castallenet F., Debas L., 2003. 20 Prestiges souilleront la méditerranée cette année ! Rapport sur la pollution marine par hydrocarbures et les dégazages sauvages en méditerranée. WWF. France.

O.....

- [358] Obire O., Anyanwu E.C., and Okigbo R. N. 2008. Impact of various concentrations of crude-oil on the physicochemical properties of a soil in Nigeria. Environment Research Journal. Volume 2, Issue 2/3, pp.249-258.
- [359] Okolafor F., and Ekhaise F.O. 2022. Microbial Enzyme Remediation of Poly-Aromatic Hydrocarbon (PAH's): A review. J. Int. Environ. Appl. Sci., 17, 10–21.
- [360] Oladipo O.G., Awotoye O.O., Olayinka A., Bezuidenhout C.C., Maboeta M.S. 2019. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. Braz. J. Microbiol., 49, pp. 29-37, 10.1016/j.bjm.2017.06.003.
- [361] Olukunle O.F., Oyelere B.R. et Sanni I.O. 2021. Screening for Biodegradative Activity of Diesel Oil by Microorganisms Isolated from Petroleum Polluted Soil of a Mechanic Workshop at AKAD Community, Akure, Nigeria. African Scientist. Vol. 22, No. 1.
- [362] Oluwatuyi O., Ashaka E.C., and Ojuri O.O. 2019. Cement stabilization treatment of lead and naphthalene contaminated lateritic soils. J. Environ. Eng. Landsc. Manag., 27, 41–48.
- [363] Omar M., Rabie H. A., Mowafi S. A., Othman H. T., Abd El-Moneim D., Alharbi, K., et al. 2022. Multivariate analysis of agronomic traits in newly developed maize hybrids grown under different agro-environments. *Plants* 11:1187. doi: 10.3390/plants11091187.
- [364] Onojake M. C., Eromosele G. O. O. and Osuji L. C. 2021. Profiling of polycyclic aromatic hydrocarbons and diagnostic ratios of KPITE Oil spill impacted site in Rivers State, Nigeria. *Pollution*, 7(1), 17-24. <https://doi.org/10.22059/poll.2020.303392.827>.
- [365] Onojake M.C., Osuji L.C. 2012. Assessment of the Physico-chemical Properties of Hydrocarbon Contaminated Soil. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4(1):48-58
- [366] Oros G, Naár Z. and Cserhádi T. 2011. Growth response of *Trichoderma spp.* to organic solvents. *Molecular informatics*, 30, 276-285.
- [367] Ostrem Loss E.M., and Yu J.H. 2018. Bioremediation and Microbial Metabolism of Benzo(a)Pyrene. *Mol. Microbiol.*;109:433–444. doi: 10.1111/mmi.14062.
- [368] Oyem and Lawrence I. 2013. Effects of Crude Oil Spillage on Soil Physico-Chemical Properties in Ugborodo. Community. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 3(2013), pp. 3336-3337.
- [369] Oyibo J.N., Wegwu M.O., Uwakwe A.A., and Osuoha J.O. 2018 Analysis of total petroleum hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons and risk assessment of heavy metals in some selected finfishes at Forcados Terminal, Delta State, Nigeria, *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management* 9, 128–135.

P.....

- [370] Padilla-Garfias F., Sánchez N.S., Calahorra M., Peña A. 2022. DhDIT2 Encodes a *Debaryomyces hansenii* cytochrome P450 involved in benzo (a) pyrene degradation a proposal for mycoremediation. *Journal of Fungi*. 8(11):1150. <https://doi.org/10.3390/jof8111150>.
- [371] Padmapriya B., Suganthi S., Anishya, R. 2013. Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13(2), 227-233.
- [372] Panwar R. and Mathur J. 2019. Comparative assessment of physiological and biochemical changes in the selected plant species growing under hydrocarbon stress. *Plant science today*, 6(sp1), 560-567. <https://doi.org/10.14719/pst.2019.6.sp1.666>.
- [373] Parigot P., Garcia G., *et al.* 1974. Boues de forage. france : institut de petrol, société des éditions technip,. 27.
- [374] Patel A.B., Singh S., Patel A., Jain K., Amin S., and Madamwar D. 2019. Synergistic biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by mixed bacterial cultures. *Bioresour Technol* 284:115–120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.097>
- [375] Pathak H, Bhatnagar K, Jaroli DP (2011). Physico-chemical Properties of Petroleum Polluted Soil Collected from Transport Nagar (Jaipur). *IJFALS* 1(3):84-89
- [376] Patra D. K., Acharya S., Pradhan C., and Patra H. K. 2021. Poaceae plants as potential phytoremediators of heavy metals and eco-restoration in contaminated mining sites. *Environmental Technology and Innovation*, 21, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101293>.
- [377] Peidro-Guzmán H., Pérez-Llano, Y., González-Abradelo, *et al.* 2021. Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions. *Environ. Microbiol.*, 23, 3435.
- [378] Peretiemo-Clarke B.O., and Achuba F.I. 2007. Phytochemical effect of petroleum on peanut (*Arachis hypogea*) seedlings. *Plant Pathology Journal*, 6:179-182.
- [379] Peretomode J.P. 2018. Plantain Peels Powder, Burnt Palm Head Powder and commercial Sodium Hydroxide as additives for water Base Drilling mud. *J App Sci. Environ. Manage.* 22(7). 1009-1012.
- [380] Petrisor C., Paica A., and Constantinescu F. 2016. Influence of abiotic factors on in vitro growth of *Trichoderma* strains *Proc. Rom. Acad. Ser. B*, 18 (1), p. 11e14.
- [381] Pfohl-Leskowicz A. 2001. Définition et origines des mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc, 3-14.
- [382] Pichard G. 2015. Le champignon, allié de l'arbre et de la forêt. Centre National de la Propriété Forestière CNPF-IDF, 46 p. Paris.
- [383] Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Review of Plant Biol.*, 56, 15–39.
- [384] Pitt J.I., Basilico J.C., Abarca M.L, and Lopez C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, Purchase. 38, 41–46.
- [385] Pointing S.B., and Hyde K.D. 2001. Bio-exploitation of filamentous fungi. *Fungal Diversity Press*, Hong Kong.

- [386] Polvi E.J., Li X., O'Meara T.R., Leach M.D., and Cowen L.E. 2015. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci.*72:2261–2287. pmid:25700837.
- [387] Potashev, K., Sharonova N., and Breus I. 2014. The use of cluster analysis for plant grouping by their tolerance to soil contamination with hydrocarbons at the germination stage. *Sci. Total Environ.* 485, 71–82.
- [388] Prenafeta-Bold F. X., De Hoog G. S., and Summerbell R. C. 2018. Fungal communities in hydrocarbon degradation. In *Microbial communities utilizing hydrocarbons and lipids: Members, metagenomics and ecophysiology, handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, McGenity, T.J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 1- 36.
- [389] Prince R. 2005. The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation. In *Petroleum Microbiology*; Ollivier B., *et al.* 2005. Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA. pp. 317–335.
- [390] Prince R.C. 2005. The microbiology of marine oil spill bioremediation, in *Petroleum microbiology*, American Society of Microbiology. p. 317-335.
- [391] Purohit J., Chattopadhyay A., Biswas M.K., and Singh N.K. 2018. Mycoremediation of agricultural soil: Bioprospection for sustainable development. In *Mycoremediation and Environmental Sustainability*; Springer: Cham, Switzerland; pp. 91–120.

Q.....

- [392] Qixing Z., Zhang C., Zhineng Z., Weitao L. 2011. Ecological remediation of hydrocarbon contaminated soils with weed plant. *J Resour Ecol.* 2:97–105.

R.....

- [393] Rachedi R., Kichou Y. et Bencheikh A. 2004 Traitement des problèmes de vibrations lors du forage de la phase 16" sur le champ de Hassi Messaoud. 6èmes Journées Scientifiques et Techniques de Sonatrach, 20 au 22 juin, Alger, Algérie.
- [394] Rafiee M., Jahangiri Rad M., and Afshari A. 2017. Bioaccumulation and translocation factors of petroleum hydrocarbons in *Aeluropus littoralis*. *Environmental Health Engineering and Management*, vol. 4, no. 3, pp. 131–136.
- [395] Rajabi H., and Sharifipour M. 2019. Geotechnical properties of hydrocarbon-contaminated soils: A comprehensive review. *Bull. Eng. Geol. Environ.* 78, 3685–3717.
- [396] Rajabi H., Sharifipour M. 2019. Geotechnical properties of hydrocarbon-contaminated soils: a comprehensive review. *Bull Eng Geol Env* 78(5):3685–3717.
- [397] Raju M.N., and Scalvenzi L. 2017. Petroleum Degradation: Promising Biotechnological Tools for Bioremediation. In *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*; Intech Publishers: London, UK.
- [398] Raklami A., Bechtaoui N., Tahiri A.I., Anli M., Meddich A., and Oufdou K. 2019. Use of rhizobacteria and mycorrhizae consortium in the open field as a strategy for improving crop nutrition, productivity and soil fertility. *Front. Microbiol.*, 10, 1106.
- [399] Raklami A., Tahiri A., Bechtaoui N., *et al.* 2020. Restoring the plant productivity of heavy metal-contaminated soil using phosphate sludge, marble waste, and beneficial microorganisms. *J. Environ. Sci.*, 99, 210–221.

- [400] Ramdass A.C., and Rampersad S.N. 2021. Diversity and oil degradation potential of culturable microbes isolated from chronically contaminated soils in Trinidad. *Microorganism* 9: 1-16. DOI: 10.3390/microorganisms9061167.
- [401] Ramoutar S., Mohammed A., and Ramsabhag A.. 2019. Laboratory-scale bioremediation potential of single and consortia fungal isolates from two natural hydrocarbon. Seepages in Trinidad, West Indies. *Bioremediat J.*, 23: 131–141.
- [402] Rangel D.E., Finlay R.D., Hallsworth J.E., Dadachova E., and Gadd G.M. 2018. Fungal strategies for dealing with environment-and agriculture-induced stresses. *Fungal Biol* 122(6):602–612. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.002>.
- [403] Ranieri E., Moustakas K., Barbafieri M., Ranieri A.C., Herrera-Melián J.A., Petrella A., and Tommasi F. 2020. Phytoextraction technologies for mercury- and chromium-contaminated soil: a review. *J Chem Technol Biotechnol.* 95(2):317–327.
- [404] Redecker D. 2002. New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Research in Microbiology*, 153(3), 125–130. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(02\)01297-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(02)01297-4)
- [405] Reguieg Yssaad H., 2007. Effet de la bentonite sur les sols sableux de la région de Mostaganem , étude de comportement d'une association blé pois chiche. Algérie :Institut National Agronomique El Harrach ALGER ,21p .Thèse de Doctorat d'Etat en Science Agronomique.
- [406] Ren W., Zhou Q., and Wang M. 2009. Environmental behavior of BTEX in soil: A review. *Chin. J. Ecol.*, 28, 1647–1654.
- [407] Richardson A., Banerjee S., Kirkby C. A., Schmutter D., Bissett A., and Kirkegaard J. A., 2016. Network analysis reveals functional redundancy and keystone taxa amongst bacterial and fungal communities during organic matter decomposition in an arable soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 188-198. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.03.017>.
- [408] Rodrigues de I.V.P., Borges K.R.A., Neto da Silva M.A.C., Nascimento M.S.B., dos Santos J., Azevedo A.S., and Bezerra G.F. 2020. Diversity of Soil Filamentous Fungi Influenced by Marine Environment in São Luís, Maranhão, Brazil. *The Scientific World Journal* Volume 2020, Article ID 3727453, 6 pages <https://doi.org/10.1155/2020/3727453>.
- [409] Roger P., Jacq V. 2000. Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air. Laboratoire de microbiologie institut de recherche pour le développement. Marseille.
- [410] Rohrbacher F., and St-Arnaud, M. 2016. Root exudation: The ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation - Review. *Agronomy*, 6(19), 1-27. <https://doi.org/10.3390/agronomy6010019>.
- [411] Romero-Hernández L., Velez P., Betanzo-Gutiérrez I., Camacho-López M.D., Vázquez-Duhalt R., and Riquelme M. 2021. Extra-Heavy Crude Oil Degradation by *Alternaria* sp. Isolated from Deep-Sea Sediments of the Gulf of Mexico. *Appl. Sci.*, 11, 6090. <https://doi.org/10.3390/app11136090>
- [412] Ron E. Z., and Rosenberg E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 191–194. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.004.
- [413] Roshchin V.V. 2012. *The Excretory Function of Higher Plants*; Springer Science & Business Media: Cham, Switzerland.

- [414] Rout M.E. 2014. The plant microbiome. In *Advances in Botanical Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 279–309.
- [415] Rubin J. A., Görres J. H. 2021. Potential for mycorrhizae-assisted phytoremediation of phosphorus for improved water quality. *Int. J. Env. Res. Public Health*. 18:7. doi: 10.3390/ijerph18010007.
- [416] Ruiz-herrera J., and Campos-Góngora E. 2012. An Introduction to Fungal Dimorphism. In: Ruiz-herrera J, editor. *Dimorphic Fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis*. Bentham Science. p. 3–15.
- [417] Rusin M., Gospodarek J., and Nadgórska-Socha A. 2020. Soil pollution by petroleum-derived substances and its bioremediation: The effect on *Aphis fabae* Scop. infestation and antioxidant response in *Vicia faba* L. *Agronomy*, 10, 147.

S.....

- [418] Sakshi, Singh S.K., and Haritash A.K. 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 6489–6512. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02414-3>.
- [419] Salihu A., Abdulkadir I., and Almustapha M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4(5), 111- 117.
- [420] Sami F., Yusuf M., Faizan M., Faraz A., and Hayat S. 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem.*, 109 (2016), pp. 54-61.
- [421] Sardrood B. P., Goltapeh E. M., Varma A. 2013. An introduction to bioremediation fungi as bioremediators. *Environmental Science, Biology*. pp. 3-27
- [422] Sari E.M., Novianty R., Awaluddin A., and Saryono. 2019. Effectiveness of crude oil degrading fungi isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil in Sia, Riau J. *Acta Biochimica Indonesiana* 2: 15-22. DOI: 10.32889/actabioina.v2i1.35.
- [423] Sarma H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4, pp. 118-138.
- [424] Sawant A., and Rodrigues B.F. 2020. Biodegradation of residual petroleum hydrocarbons by using fungal endophytes from the mangrove ecosystem. *J Adv Scie Res.*;11(4):257–64.
- [425] Sayer J.M., Yagi H., Wood A.W., Conney A.H., Jerina D.M. 1982. Extremely facile reaction between the ultimate carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide and ellagic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 5562-5564.
- [426] Schmidt T.M. 2006. The maturing of microbial ecology. *Int Microbiol.* 9(3):217-23.
- [427] Schneider A., Flénet F., Dumans P., Bonnin E., De Chezelles E., Jeuffroy M.H., Hayer F., Nemecek T., et Carrouée B. 2010. Diversifier les rotations céréalières notamment avec du pois et du colza –Données récentes d’expérimentations et d’études. 17, 301-311
- [428] Seghiri A. 2002. Hassi-Messaoud est-elle une ville ? (Note). *Méditerranée*, 99(3), 99-102. <https://doi.org/10.3406/medit.2002.3268>.
- [429] Sen S.K., Raut S., and Raut S. 2023. Mycoremediation of anthraquinone dyes from textile industries: a mini-review. *BioTechnologia (Pozn)*. Mar 27;104(1):85-91. doi: 10.5114/bta.2023.125088. PMID: 37064274; PMCID: PMC10091455.

- [430] Shah A.A., Khan W.U., Yasin N.A., Akram A., Ahmad A., Abbas M., Ali A., and Safdar M.N. 2020. Butanolide alleviated cadmium stress by Improving plant growth, photosynthetic parameters and antioxidant defense system of *brassica oleracea*. *Chemosphere*, Volume 26, 127728.
- [431] Shah V., and Daverey A. 2020. Phytoremediation: a multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environ. Technol. Innov.* 18:100774. [10.1016/j.chemosphere.2022.134788](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134788).
- [432] Shankar R., Shim W.J., An J.A., and Yim H. 2015. A practical review on photo oxidation of crude oil: laboratory lamp setup and factors affecting it. *Water Research*; 68:304-315.
- [433] Shearer C. A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanová L., Padgett D. E., Porter D. D., Raja H. A., Schmit J. P., Thorton H. A. and Voglymayr H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 49-67. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z>
- [434] Shoukat W., Hussain S., Noureen A., Khan G., Ujjan J.A., Zohra A., Ullah H., Zohra A., Ullah H., and Saeed H. 2021. Bacterial and Fungal Species of Oil Contaminated Soil of Banda Dauood Shah, KP Pakistan. *Elementary Education Online* 20 (3), 2175-2180.
- [435] Siddiqui S. and Bano A. 2018. Hydrocarbon degradation. Dans Springer eBooks (p. 615-641). https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_26.
- [436] Sihag S., Pathak H., and Jaroli D.P. 2014. Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons,” *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, vol. 2, no. 3, pp. 185–202.
- [437] Siles J. and García-Sánchez M. 2018. Microbial dynamics during the bioremediation of petroleum Hydrocarbon-Contaminated soils through biostimulation : An overview. Dans *Nanotechnology in the life sciences* (p. 115 -134). https://doi.org/10.1007/978-3-030-02369-0_7.
- [438] Singh A.K., and Simpson C.E. 1994. Biosystematics and genetic resources. In: Smartt J, ed. *The Groundnut Crop: a Scientific Basis for Improvement*. Chapman & Hall, London, pp. 96–137.
- [439] Singh H. 2006. *Mycoremediation: fungal bioremediation*. John Wiley & Sons.
- [440] Singh K., and Chandra S. 2014. Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 17, no. 1, pp. 1–8.
- [441] Singh M., Singh D., Rai P., Suyal D.C., Saurabh S., Soni R., Giri K., and Yadav A.N. 2021. Fungi in remediation of hazardous wastes: current status and future. In: Yadav AN (ed) *Recent trends in mycological research, fungal biology*. Springer Nature, Cham.
- [442] Site de l'ONS. 2008. <http://www.ons.dz>.
- [443] Skrypnik L., Maslennikov P., Novikova A., and Kozhikin M. 2021. Effect of crude oil on growth, oxidative stress and response of antioxidative system of two rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Plants*, 10, 157.
- [444] Skrypnik L., Maslennikov P., Novikova A., and Kozhikin M. 2021. Effect of Crude Oil on Growth, Oxidative Stress and Response of Antioxidative System of Two Rye (*Secale cereale* L.) Varieties. *Plants*, 10, 157. <https://doi.org/10.3390/plants10010157>.

- [445] Snyder K., Mladenov N., Richardot W., Dodder N., Nour A., Campbell C., and Hoh E. 2021. Persistence and photochemical transformation of water soluble constituents from industrial crude oil and natural seep oilin seawater. *Marine Pollution Bulletin*; 165:112049.
- [446] Soil Survey Staff. 1999. *Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys*. 2nd Edition. Agric. Handbook 436. Washington, DC, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture.
- [447] Soltani M., 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries.
- [448] Soltani N., *et al.* 2015. Ecological and human health hazards of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Isfahan metropolis, Iran *Sci. Total Environ.*
- [449] SONATRACH. 2002. Subdivision des zones du champ Hassi Mesaoud, Rapport interne, Division Production. 25p.
- [450] SONATRACH. 2005. La stratigraphie du champ Hassi Messaoud, Rapport interne, Division Exploration. 35p.
- [451] Song B., Zeng G., Gong J., Zhang P., Deng J., Deng C., Yan J., Xu P., Lai C., and Zhang C. 2017. Effect of multi-walled carbon nanotubes on phytotoxicity of sediments contaminated by phenanthrene and cadmium. *Chemosphere*, 172, pp. 449-458.
- [452] Song X., Wu X., Shi C., and Zhang Z. 2021. Sorption and desorption of petroleum hydrocarbons on biodegradable and non-degradable microplastics. *Chemosphere*, 273, p. 128553. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128553>.
- [453] Speight, J.G. 2014. *The Chemistry and Technology of Petroleum*, 5th Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, États-Unis, 984 p.
- [454] Speight, J. G. 2004. Petroleum Asphaltenes - Part 1 : Asphaltenes, resins and the structure of petroleum. *Oil and Gas Science and Technology – Revue d'IFP Energies nouvelles*, 59(5), 467-477. <https://doi.org/10.2516/ogst:2004032>
- [455] Stajich J.E., Berbee M.L., Blackwell M. and Hibbett D.S. 2009. The fungi- *Current Biology*, Vol 19 No 18.
- [456] Steinberg G., Penalva M.A., Riquelme M., Wosten H.A., Harris S.D. 2017. Cell biology of hyphal growth. *Microbiol. Spectr.*, 5, 10.1128/microbiolspec.FUNK-0034-2016
- [457] Stepanova A.Y., Gladkov E.A., Osipova E.S., Gladkova O.V., and Tereshonok D.V. 2022. Bioremediation of Soil from Petroleum Contamination. *Processes* , 10, 1224. <https://doi.org/10.3390/pr10061224>.
- [458] Sterckeman T., Ouvrard S. et Leglize P. 2012. Phytoremédiation des sols. Les techniques de l'ingénieur, BIO5300.
- [459] Su J., Ouyang W., Hong Y., Liao D., Khan S. and Li H., 2015. Responses of endophytic and rhizospheric bacterial communities of salt marsh plant (*Spartina alterniflora*) to polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Journal of Soils and Sediments* 16(2), 707-715, doi:10.1007/s11368-015-1217-0.
- [460] Subathra M.K., Immanuel G., and Suresh A.H. 2013. Isolation and Identification of hydrocarbon degrading bacteria from Ennore creek. *Bioinformation*, 9, 150.

- [461] Suman J., Uhlik O., Viktorova J., and Macek T. 2018. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? *Front. Plant Sci.* 9 1476. doi: 10.3389/fpls.2018.01476.
- [462] Sutton N. B., Maphosa F., Morillo J. A., Al-Soud W. A., Langenhoff A., Grotenhuis J., Rijnaarts H. and Smidt H. 2013. Impact of Long-Term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2), 619-630. <https://doi.org/10.1128/aem.02747-12>.
- [463] Syakti A.D. 2004. Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. <http://www.theses.fr/>. <https://www.theses.fr/2004AIX30017>

T.....

- [464] Tabuc N. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti.
- [465] Takahashi T. and Shoji S. 2002. Distribution and Classification of Volcanic Ash Soils. *Global Environmental Research*, Vol. 6, pp. 83-97.
- [466] Tariq M., Shah A.A. Nasim Yasin A., Ahmad A., and Rizwan M. 2021. Enhanced performance of *Bacillus megaterium* OSR-3 in combination with putrescine ameliorated hydrocarbon stress in *Nicotiana tabacum*, *International Journal of Phytoremediation*, 23:2, 119-129.
- [467] Tay C.C., Abidin N.Z., Talib S.A. 2017. Occurrence and bioremediation of anthracene in the Environment. *J. Fundam. Appl Sci*, 9(6S) :214-226.
- [468] Taylor. 2009. The fungi. *Curr. Biol.*, 19, pp. R840-R845.
- [469] Tedersoo L., Bahram M., and Zobel M. 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science* 367: eaba1223.
- [470] Terrain C., et Graallet H. 2003. Séchage des grains en organisme stockeur: guide pratique. Ed : ARVALIS, Institut du végétal et FFCA. (1-5).
- [471] Tkaczyk-Rybczyńska K., and Kornilowicz-Kowalska T. 2020. Biodecolorization of anthraquinone dyes using immobilised mycelium of *Bjerkandera adusta* CCBAS930. [in:] *E3S Web of Conferences* 171: 01013.
- [472] Tocque E. et Travers C. 2010. *Petrole. Techniques de l'ingenieur. Genie energetique*, BE8520.
- [473] Tongo I., Ezemonye L., Akpeh K. 2017. Distribution, characterization, and human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Ovia River, southern Nigeria *Environ. Monit. Assess.*, 189 (6), p. 247.
- [474] Treu R., and Falandysz J. 2017. Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes—A review. *J. Environ. Sci. Health Part B*, 52, 148–155.
- [475] Tripathi P., Singh P.C., Mishra A., Chauhan P.S., Dwivedi S., Bais R.T., and Tripathi R.D. 2013. *Trichoderma*: A potential bioremediator for environmental cleanup. *Clean Technol. Environ. Policy*, 15, 541–550.
- [476] Troll W. and Lindsley J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *Journal of biological chemistry*.

U.....

- [477] Uddin S., Fowler S.W., Saeed T., Jupp B., and Faizuddin M. 2021. Petroleum hydrocarbon pollution in sediments from the Gulf and Omani waters: status and review. *Mar. Pollut. Bull.*, 173, p. 112913, 10.1016/j.marpolbul.2021.112913.
- [478] Ughamba K.T., Nnaji N., Ogbonna K.E. and Anyanwu. 2021. Selling Points of Sewage Sludge as an Enhancing Agent of Bioremediation of Diesel Oil-Polluted Soil. *J Environment Analytic Toxicol* 11: 629.
- [479] Uquetan U.I., Osan, J.E., Alozie S.I., Bawan A.M. 2017. A case study of the effects of oil pollution on soil properties and growth of tree crops in cross river state, Nigeria. *International Research Journal of Pure and Applied Physics*, 5, 19–28.
- [480] United States Environmental Protection Agency (US EPA) 2014. 16 PAHs on the Clean Water Act List of Priority Pollutants.

V.....

- [481] Van Den Hoogen J., Geisen S., Routh D., Ferris H., *et al.* 2019. Crowther, Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572, 194–198.
- [482] Van der Vossen H.A.M., Mkamilo G.S., Corbière H., et Agrooh. 2007. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 14. Oléagineux. Fondation PROTA. ISBN.
- [483] Vangronsveld J., Herzig R., Weyen N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., *et al.* 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. R* 16, 765–794. doi: 10.1007/s11356-009-0213-6.
- [484] Varjani S. J., Upasani V. N. 2017. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 120, 71–83. doi: 10.1016/j.ibiod.02.006.
- [485] Varjani S.J., 2017. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons . *Bioresource Technology* 223. 277-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
- [486] Varjani S.J., Rana D.P., Jain A.K., Bateja S., and Upasani V.N. 2015. Synergistic ex situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 103: 116–124.
- [487] Varshney S., Gupta V., Yadav A.N., Rahi R.K., Devki Neelam D.K. 2023. An overview on role of fungi in systematic plastic degradation. *J App Biol Biotech.* 11(3):61-69. DOI: 10.7324/JABB.2023.108929.
- [488] Verdier et Thomas. 2015. Elaboration de Revêtements Pour Matériaux de Construction Visant à Lutter Contre La Prolifération Microbienne à l'intérieur Des Bâtiments: Efficacité et Mode d'action. Université Paul Sabatier-Toulouse III. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01332618>.
- [489] Victor I.A. , Iwok E.O., Archibong I.A., Effiom O.E., Okon E., Andem A.B. 2020. The biochemical mechanisms of petroleum degradation by bacteria. *International Journal of Scientific & Engineering Research* Volume 11, Issue 7, 1258-75.
- [490] Viguri J., Verde J., and Irabien A. 2002. Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain. *Chemosphere*, vol. 48, no. 2, pp. 157–165.

W.....

- [491] Wang F., Bai L. J., Zhang K. Q., *et al.* 2009. Effects of soil particle sizes irrigated with nitrogen on the N₂O flux in the freezing and thawing process[J]. Transactions of the CSAE, 25: 69-73.
- [492] Wang J., Wang D. and Wang B. 2019. Soil bacterial diversity and its determinants in the riparian zone of the Lijiang River, China. Current Science 117(8), 1324-1332,doi:10.18520/cs/v117/i8/1324-1332.
- [493] Wang Q., Leonce B., Seeley M.E., Adegboyega N., Lu K., Hockaday W., and Zhanfei L. 2020. Elucidating the formation pathway of photo-generated asphaltenes from light Louisiana sweet crude oil after exposure to natural sunlight in the Gulf of Mexico. Organic Geochemistry.150: 104126.
- [494] Wang Q., Liu W., Zhong D., Ge Y., Christie P., and Luo Y. 2021. Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Science of the Total Environment, Volume 792, 148411.
- [495] Wang S., Xu Y., Lin Z., Zhan, J., Norbu N., and Liu W. 2017. The harm of petroleum-polluted soil and its remediation research. AIP Conference Proceedings, 1864, 020222.
- [496] Wang K, Huang H, Zhu Z, Li T, He Z, Yang X, Alva A. 2013.Phytoextraction of metals and rhizoremediation of PAHs incocontaminatedsoil by co-planting of Sedum alfrediwith ryegrass(Lolium perenne) or castor (Ricinus communis). Int. J. Phytoremed.15:283-298
- [497] Wani K.A., Sofi Z.M., Malik J.A., and Wani J.A. 2020. Phytoremediation of Heavy Metals Using Salix (Willows). In Bioremediation and Biotechnology; Bhat, R., Hakeem, K., Dervash, M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, p. 2.
- [498] Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi -morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press.
- [499] Wauquier J.P. 1994. Pétrole brut, produits pétroliers. Schema de fabrication, Tome 1, Edition Technip.
- [500] Willey J. M., Sherwood L. M., and Woolverton C. J. 2011. Prescott's Microbiology, 8th Ed. McGraw-Hill Companies, New York.
- [501] Wingender J., Neu T. R. and Flemming H.C. 2012. Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function. Heidelberg: Springer Science & Business Media.
- [502] Wu M., Ma C., Wang D., Liu H., Zhu C., and Xu H. 2020. Nutrient drip irrigation for refractory hydrocarbon removal and microbial community shift in a historically petroleum-contaminated soil. Science of The Total Environment. Volume 713, 136331.

X.....

- [503] Xiao R., Bai J., Wang J., Lu Q., Zhao Q., Cui B.,and Liu X. 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wetland soils under different land uses in a coastal estuary: toxic levels, sources and relationships with soil organic matter and water-stable aggregates Chemosphere, 110, pp. 8-16.

Y.....

- [504] Yadav B.K., Shrestha S.R., Hassanizadeh S.M. 2012. Biodegradation of toluene under seasonal and diurnal fluctuations of soil-water temperature. *Water Air Soil Pollut* 223(7):3579–3588.
- [505] Yadav S., Modi P., Dave A., Vijapura A., Patel D., and Patel M. 2020. Effect of abiotic stress on crops In Hasanuzzaman M., Carvalho M., Filho M.T., Fujita M., and Nogueira T.A.R. 2020. Sustainable crop production. IntechOpen, p 3-23.
- [506] Yan A., Wang Y., Tan S. N., Mohd Yusof M. L., Ghosh S., and Chen Z. 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Front. Plant Sci.* 11, 359. doi: 10.3389/fpls.2020.00359.
- [507] Yan Y., Li J., Lv N., Wang H., and Zhang H. 2023. Multiphase migration and transformation of BTEX on groundwater table fluctuation in riparian petrochemical sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 30, 55756–55767.
- [508] Yang R. H., Su J. H., Shang J. J., Wu Y. Y., Li Y., Bao D. P., and Yao Y. J. 2018. Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PloS one*, 13(10), 0206428.
- [509] Yang Y., Zheng J., Li J., Huan H., Zhao X., Lv N., Ma Y and Zhang H. 2023. Modeling BTEX Multiphase Partitioning with Soil Vapor Extraction under Groundwater Table Fluctuation Using the TMVOC Model. *Water*, 15, 2477. <https://doi.org/10.3390/w15132477>
- [510] Yanitch A., Kadri H., Frenette-Dussault C., Joly S., Pitre F. E., and Labrecque M. 2020. A four-year phytoremediation trial to decontaminate soil polluted by wood preservatives: phytoextraction of arsenic, chromium, copper, dioxins and furans. *Int. J. Phytoremediation* 22, 1505–1514. doi: 10.1080/15226514.2020.1785387.
- [511] Yanto D.H.Y., Auliana N., Anita S.H., and Watanabe T. 2019. Decolorization of synthetic textile dyes by laccase from newly isolated *Trametes hirsuta* EDN084 mediated by violuric acid. [in:] *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 374: 012005.
- [512] Yao L., Teng Y., Luo Y., Christie P., Ma W., Liu F., Wu Y., Luo Y., and Li Z. 2015. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by *Trichoderma reesei* FS10-C and Effect of Bioaugmentation on an Aged PAH-Contaminated Soil, *Bioremediation Journal*, 19:1, 9-7, DOI: 10.1080/10889868.2014.939137.
- [513] Yap Y. H., Vo D. N., Ibrahim M. L., Abdulkareem-Alsultan G., Rashid, U., *et al.* 2021. Advances in physiochemical and biotechnological Approaches for sustainable metal Recovery from e-waste : A Critical review. *Journal of Cleaner Production*, 323, 129015. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129015>
- [514] Yoon J., Cao X., Zhou Q., and Ma L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 368: 456 - 464.
- [515] Yousaf S. 2017. The reduction of chromium (VI) phytotoxicity and phytoavailability to wheat *Triticum aestivum* L. using biochar and bacteria. *Applied Soil Ecology*, Volume 114, Pages 90-98.
- [516] Yuan S.H., Liu X., Liao W., Zhang P., Wang X., and Tong M. 2018. Mechanisms of electron transfer from structural Fe(II) in reduced nontronite to oxygen for production

of hydroxyl radicals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Volume 223, Pages 422-436, <https://doi.org/10.1016/j.gca.2017.12.025>.

Z.....

- [517] Zafra G., Moreno-Montano A., Absalon A.E., and Cortes-Espinosa D.V. 2015. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22, 1034–1042.
- [518] Zafra G., Absalón A.E., Cortés-Espinosa D.V. 2015. Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. *Braz. J. Microbiol.*, 46 (3), pp. 937-941.
- [519] Zahermand S., Vafaeian M., and Baziyar M.H. 2020. Analysis of the physical and chemical properties of soil contaminated with oil (Petroleum) hydrocarbons. *Earth Sci. Res. J.*, 24, 161–166.
- [520] Zeilinger S., Gruber S., Bansal R., and Mukherjee P. K. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – chemistry meets genomics. *Fungal Biol. Rev.* 30, 74–90.
- [521] Zemani N. 2009. Réponse De La Germination Des Graines Du Gombo (*Abelmoschus Esculentus* L.) à l'action combinée de la salinité et de la Gibbérelline (GA3). [Mémoire de Magister, Université Ahmed Ben Bella - Oran 1].
- [522] Zeroug S., Bounoua N., Lounissi R. 2007. Well Evaluation Conference - Algeria 2007. PY - 2007/12/30
- [523] Zhang J. H. , Xue Q. H. , Gao H. , Ma, X. , and Wang P. 2016. Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 865–875. <https://doi.org/doi/10.1002/jctb.4650>
- [524] Zhang X., Ge Q., Zhu Z., Deng Y., and Gu J. D. 2018. Microbiological community of the Royal Palace in Angkor Thom and Beng Mealea of Cambodia by Illumina sequencing based on 16S rRNA gene. *International Biodeterioration and Biodegradation* 134, 127–135.
- [525] Zhang X.Z., Xie J.J., and Sun F.L. 2014. Effects of three polycyclic aromatic hydrocarbons on sediment bacterial community. *Current Microbiology* 68(6), 756-762, doi:10.1007/s00284-014-0535-6.
- [526] Zhang Y., and Tao S. 2009. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004 *Atmos. Environ.*, 43, pp. 812-819.
- [527] Zhao Y., Li Z., Ma J., Yun H., Qi M., Ma X., *et al.* 2018. Enhanced bioelectroremediation of a complexly contaminated river sediment through stimulating electroactive degraders with methanol supply. *J. Hazard Mater.* 349, 168–176. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.01.060.
- [528] Zheng J., Yang Y., Li J., Zhang H., and Ma Y. 2023. The Migration Mechanism of BTEX in Single- and Double-Lithology Soil Columns under Groundwater Table Fluctuation. *Toxics*. 11(7):630. <https://doi.org/10.3390/toxics11070630>
- [529] Zhong C., Nesbo C.L., Goss G.G., Lanoil B.D., and Alessi D.S. 2020. Response of aquatic microbial communities and bioindicator modelling of hydraulic fracturing flowback and produced water. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 1, no. 5, p. 96.

- [530] Zhu Q., Wu Y., Zeng J., Wang X., Zhang T. and Lin X. 2019. Influence of bacterial community composition and soil factors on the fate of phenanthrene and benzo[a]pyrene in three contrasting farmland soils. *Environ. Pollut.*
- [531] Zoz F. 2016. Impact Des Fluctuations de l'humidité Relative de l'air Sur La Survie de *Listeria Monocytogenes*: Application à l'amélioration de l'hygiène Dans Les Ateliers de Production Alimentaire. Bourgogne-Franche Compté.
- [532] Zwart K., Bouwman L., Burgers S., Vos J., De Ruyter P., Bloem J. and Lebbink G. 1994. Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralisation in winter wheat fields under conventional and integrated management. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 51(1-2), 129-143. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90039-6)