

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة الجيلالي بونعامة  
Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana  
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie



*Mémoire de fin d'études*

En vue de l'obtention de diplôme de **Master**

**Domaine:** Science de la nature et de la vie

**Filière:** Biotechnologie

**Spécialité:** Biotechnologie microbienne

**Etude de l'effet des hydrocarbures sur la  
croissance des bactéries nodulaire de *Scorpiurus  
muricatus* isolées de la raffinerie d'Arzew**

**Présenté par:**

- *Daoudi Ikram*
- *Belhadj Kouider Samia*

**Devant le jury :**

Mr Lazali M	Professeur	Président	(U.D.B Khemis Miliana)
Mme Bouchiba Z	MCB	Promoteur	(U.D.B Khemis Miliana)
Mr Bousalhih B	MCA	Examineur	(U.D.B Khemis Miliana)

**Année universitaire : 2021/202**

## *Remerciements*

Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à notre promotrice **Mme Bouchiba Z**, pour ses précieuses orientations, son aide, ses conseils, et tous les efforts qu'elle nous a donnés.

Nous remercions aussi très sincèrement les membres de jury le Président **Mr Lazali M** d'avoir accepté de présider le jury, et **Mr Bousalhih B** qui Nous a fait l'honneur d'accepté d'évaluer notre travail.

Nous voudrions aussi témoigner notre reconnaissance et exprimer toute notre gratitude à nos enseignants qui ont participé pour une grande Part dans notre formation.

Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années  
D'études.

Sans oublier l'ensemble de nos camarades de promotion de Biotechnologie Microbienne, ainsi Qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour*

*À mes parent ma mère "Zohra" et mon père  
" Abd El Kader " qui ont toujours cru en moi et  
Qui était présente quand j'en avais besoin, leurs encouragements, leurs patience, et  
Leurs sacrifices juste pour que je consacre tout mon temps rien que pour mes études,  
Que dieu les protèges.*

*A mon cher mari " Riadh " qui était toujours à mes  
Côtés toute ma gratitude pour son aide précieuse et  
Son soutien tout le long de mes études.*

*A Mon unique frère " Khaled " que dieu le garde  
À mes chères sœurs " Hanane, Imane, Houda, Meriem "  
Que j'aime plus que les mielleuses sœurs du monde.*

*A mes petites enfant " Djawad et Raouane " que je les aime trop.*

*A tous mes amis (es) et collègues de la promotion  
Sans oublier la meilleure déléguée au monde  
" Fatiha ".*

*Ikram*

# Dédicace

*Je remercie Allah le généreux pour m'avoir guidé Vers la lumière de la science.*

*Je Dédie ce travail*

*À la mémoire de mon très cher père (mhamed)*

*Qui a toujours voulu me voir en haut, ton visage, ton sourire, tes belles paroles,*

*Tes questions me manques énormément.*

*(رحمك الله)*

*À ma chère maman (aicha) qui est la lumière de ma vie,*

*Qui m'a éclairé sur mon chemin et qui m'a encouragé et soutenu tout au long de mes*

*Etudes, pourvu par Dieu d'une bonne santé et longue vie.*

*À mon cher frère **kadi**, à mes très chères sœurs **zole** et **malak** qui étaient toujours*

*À mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager*

*À mes amies, de la promotion de biotechnologie microbienne*

2022

*Sans oublier mon chat pillo qui étai toujours à mes côtés*

*Samia*

**Résumé :**

Les hydrocarbures sont des polluants majeurs dans l'environnement à cause de leurs propriétés toxiques et cancérogènes, d'où la nécessité de les dégrader. Différentes méthodes physique et chimique sont employées pour remédier à ce problème. Cependant de nouvelle technique de traitement biologique des sols pollués ont prouvé leur efficacité. Le développement de nouveaux procédés impliquant des microorganismes et les plantes représentent des solutions alternatives écologiques, pour dégrader les hydrocarbures. L'analyse physicochimique du sol de la raffinerie d'Arzew a révélé qu'il est fortement pollué par les hydrocarbures. Le dénombrement de ce sol a démontré qu'il est riche en microorganismes. Plusieurs espèce bactérienne appartenant à différent genre sont isolées à partir des nodules et de la rhizosphère de *Scorpiurus muricatus* ; légumineuse sauvage repéré dans raffinerie d'Arzew. Plusieurs isolats nodulaires et racinaires peuvent dégrader le pétrole sur boîte et en milieu liquide ; ce qui permet à leur plante hôte de se développer dans un milieu contaminé.

**Mots clés :** hydrocarbure, pollution, biodégradation, microorganisme, *Scorpiurus muricatus*

## ملخص :

تعتبر الهيدروكربونات من الملوثات الرئيسية في البيئة بسبب خصائصها السامة والمسرطنة ، ومن ثم الحاجة إلى تحللها. يتم استخدام طرق فيزيائية وكيميائية مختلفة لعلاج هذه المشكلة. ومع ذلك ، فقد أثبتت تقنيات المعالجة البيولوجية الجديدة للترربة الملوثة فعاليتها. يمثل تطوير العمليات الجديدة التي تشمل الكائنات الحية الدقيقة والنباتات حلاً بيئية بديلة لتحلل الهيدروكربونات. أظهر التحليل الفيزيائي الكيميائي لترربة مصفاة أرزيو أنها ملوثة بشدة بالهيدروكربونات. أظهر عدد هذه التربة أنها غنية بالكائنات الحية الدقيقة. يتم عزل العديد من الأنواع البكتيرية التي تنتمي إلى جنس مختلف من العقيدات وجذر المحيط من *Scorpiurus muricatus* ؛ بقوليات برية رصدت في مصفاة أرزيو. يمكن للعديد من العزلات العقدية والجزرية أن تتحلل من الزيت في العلبه وفي الوسط السائل ؛ مما يسمح للنباتات المضيفة بالتطور في بيئة ملوثة .

**الكلمات المفتاحية:** الهيدروكربون ، التلوث ، التحلل البيولوجي ، الكائنات الحية الدقيقة ، *Scorpiurus muricatus*

## **Abstract**

Hydrocarbons are major pollutants in the environment because of their toxic and carcinogenic properties, hence the need to degrade them. Different physical and chemical methods are used to remedy this problem. However, new biological treatment techniques for polluted soils have proven their effectiveness. The development of new processes involving microorganisms and plants represent alternative ecological solutions for degrading hydrocarbons. The physicochemical analysis of the soil of the Arzew refinery revealed that it is heavily polluted by hydrocarbons. The count of this soil has shown that it is rich in microorganisms. Several bacterial species belonging to different genus are isolated from the nodules and the rhizosphere of *Scorpiurus muricatus*; wild legume spotted in the Arzew refinery. Several nodular and root isolates can degrade oil on can and in liquid medium; which allows their host plant to develop in a contaminated environment.

**Keywords** : hydrocarbon, pollution, biodegradation, microorganism, *Scorpiurus muricatus*.

# Liste des abréviations

**HAM:** Hydrocarbures Aromatiques Monocycliques

**HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**BTEX:** Benzene Toluene Ethylbenzène Xylenes

**ARN:** Acide Ribonucléique

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**MES:** Matières En Suspension

**PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**BNF:** fixation biologique de l'azote

**AON :** Autoregulation de la nodulation

**COV :** Composés Organiques Volatils

**HPT :** Hydrocarbures Pétroliers Totaux

**AM :** Champignon mycorhizien arbusculaire

**THC:** Teneur totale en hydrocarbures

**CE :** Conductivité Electrique

**FN:** Facteur nod

**CK:** Cytokinine

**AUX :** Auxine



# Liste des figures

**Figure1** : Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers

**Figure 2:** Aspect de *Scorpiurus muricatus* ssp. *Sulcatus*

**Figure3:** Structure des facteurs Nod

**Figure 4:** Le dialogue moléculaire rhizobium-légumineuses

**Figure 5** : Les différents mécanismes des PGPR

**Figure 6:** Arrêt du port pétrolier et gazier d'Arzew

**Figure7** : Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau physiologique stérile

# Liste des tableaux

**Tableau 1:** principales souches bactériennes aérobies qui participent à la dégradation des HAP et des Alcanes

**Tableau 2 :** Nombre d'espèces de légumineuses fourragères dénombrées dans le monde et exclusivement Méditerranéennes ainsi que le pourcentage des espèces présentes dans les régions Ouest-Méditerranéennes

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## I. PARTIE : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : LES HYDROCARBURES

1. Généralité.....	3
2. Impact et toxicité des hydrocarbures pour l'environnement et la santé humaine.....	4
3. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures.....	5
4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	6

### CHAPITRE II : LA BIOREMEDIATION

1. La bioremédiation.....	10
2. Les microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures.....	10
3. Importances des légumineuses et des microorganismes dans la bioremediation des sols contaminés.....	12
4. Les légumineuses .....	13
5. La fixation biologique de l'azote (BNF) par légumineuses.....	13
6. Les légumineuses spontanées du pourtour méditerranéen.....	14
7. Le genre <i>Scorpiurus</i> .....	15
a. <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	16
b. La Morphologie .....	17
8. Les bactéries associées aux légumineuses.....	18
8.1. Rhizobia.....	18
8.1.1. La symbiose légumineuses-rhizobia .....	18
8.1.2. Les étapes de la formation de nodules.....	19
8.2. Les bactérie rhizosphérique (Rhizobactérie) .....	21
8.2.1. Généralité.....	21
8.2.2. Aspects bénéfiques des PGPR.....	21
8.2.3. Mechanismes d'action des PGPR .....	21
<i>Les mécanismes directs</i> .....	23
<i>les effets indirects des PGPR</i> .....	23
8.2.4. Rhizoremediation.....	23

## II. PARTIE EXPERIMENTALE

### CHAPITRE I: MATERIELS ET METHODES

1.	Description de la zone d'étude.....	26
2.	Echantillonnage du sol et des nodules de <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	26
3.	Analyse physico-chimique du sol. ....	27
3.1.	Analyse physique.....	27
3.2.	Analyse chimique.....	28
4.	Isolement et sélection des isolats bactériens associés à <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	31
4.1	Isolement à partir des nodules .....	31
4.1.1.	Désinfection .....	31
4.1.2.	Ecrasement et purification.....	31
4.2.	Isolement à partir de rhizosphère .....	31
4.1.1	Dilution et ensemencement.....	31
4.1.2	Purification des isolats.....	32
5.	Etude morphologies des isolats.....	32
5.1	Etude macroscopique.....	32
5.2	Etude microscopique .....	32
6.	Conservation des souches.....	33
7.	Sélection des souches capables de dégrader les hydrocarbures.....	33
7.1.	Détermination du potentiel de biodégradation bactérienne sur milieu solide (MSM agar) .....	33
7.2.	Détermination du potentiel de biodégradation bactérienne par turbidimétrie (milieu liquide) .....	33
8.	Evaluation de la capacité des souches à améliorer la croissance de <i>Scorpiurus muricatus</i> .....	34
8.1.	Germination des graines.....	34
8.2.	Mise en pots des plantules, inoculation et evaluation de la croissance.....	34

### CHAPITRE II : ANALYSE DES TRAVAUX ANTERIEURS

1.	Analyse physicochimique du sol.....	35
1.1	Granulométrie.....	35
1.2	pH.....	36
1.3	Humidité, salinité et taux du calcaire.....	36

1.4	Les concentrations en HPT .....	37
1.5	Les éléments minéraux (P, N, C) et matière Organique .....	37
2.	Dénombrement des bactéries vivant dans la rhizosphère de <i>Scopius muricatus</i> poussant dans le sol contaminé de la raffinerie d'Arzew.....	38
3.	Isolement et sélection des isolats bactériens associés à <i>Scopius muricatus</i> .....	38
	à partir des nodules .....	38
	à partir de la rhizosphère.....	39
	Sélection des Bactéries déprédatrice de pétrole.....	39
4.	Evaluation de la capacité des souches à améliorer la croissance de <i>Scopius muricatus</i> .....	40
	Conclusion & Perspectives..... ;.....	41
	Reference bibliographique..... ;.....	42
	Annexe	

# *Introduction*

L'Algérie est un pays producteur de pétrole et son économie est étroitement liée aux hydrocarbures. La production, l'industrie du raffinage, le transport et l'utilisation du pétrole contribuent à la pollution de l'environnement et produisent des problèmes écologiques conséquents (Jurelevicius *et al.*, 2013 ; Riskuwa-Shehu *et al.*, 2017). La contamination des sols par des hydrocarbures pétroliers entraîne une baisse significative de sa qualité et deviennent inutilisables. (Gojgic-Cvijovic *et al.*, 2011).

La contamination par le pétrole continue d'être une grave préoccupation environnementale en raison de la croissance soutenue de l'extraction de pétrole brut et de la production associée (Jurelevicius *et al.*, 2013 ; Riskuwa-Shehu *et al.*, 2017). Par conséquent, la préservation des ressources en sols et en eau est très importante et très souhaitée dans le monde entier. Divers processus physiques et chimiques tels que l'extraction des vapeurs du sol, l'incinération et l'assainissement électrochimique sont déjà utilisés pour assainir les sols contaminés par le pétrole (Gao et Zhu 2003). Cependant, ces techniques présentent des limites du fait qu'elles sont relativement coûteuses et nécessitent également une restauration supplémentaire du site (Kuppusamy *et al.*, 2017). La bioremédiation et la phytoremédiation sont reconnues comme des alternatives précieuses pour la désintoxication et l'élimination de la substance toxique, en raison de leur rentabilité, leur respect à l'environnement, leur simplicité technologique et la conservation de la texture et des caractéristiques du sol (Agarry et Ogunleye, 2012)

La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes représente l'un des principaux mécanismes par lesquels le pétrole et les autres polluants hydrocarbonés peuvent être éliminés de l'environnement (Das et Chandran, 2011 ; Kumar *et al.*, 2011).

La grande diversité bactérienne et la versatilité métabolique liée aux gènes de dégradation a permis à des microorganismes de coloniser l'ensemble des niches écologiques de la planète en s'adaptant aux changements environnementaux. Ces microorganismes ubiquistes sont ainsi retrouvés de la stratosphère aux sous-sols profonds. Certaines bactéries possèdent par ailleurs la capacité d'adopter des formes de vie (spores, symbiose) tel *Bacillus* sp. (Dandie *et al.*, 2004) et des structures (biofilms, tapis microbiens) particulières leur permettant d'appréhender des contraintes environnementales plus ou moins extrêmes tel *Pseudomonas* sp. (Johnsen *et al.*, 2007). Ces microorganismes montrent par ailleurs un potentiel élevé d'adaptation aux pollutions aux hydrocarbures dans les stations de traitement des sites pollués (Molina *et al.*, 2009).

Les espèces de graminées et de légumineuses ont montré les meilleurs taux de réussite dans les expériences de phytoremédiation (Stephen et Ijah, 2011). *Scorpiurus muricatus* est une légumineuse spontanée, ayant été déjà repérée dans la raffinerie d'Arzew et qui peut avoir un bon potentiel de dégradation des hydrocarbures et de phytoremédiation. En effet, Différents travaux

ont montré l'efficacité des légumineuses spontanées dans la tolérance et la dégradation des hydrocarbures (Ismail, 2014).

Les légumineuses sélectionnent souvent les communautés microbiennes dégradant les hydrocarbures, en particulier celles ayant une capacité de dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La nature sélective des plantes envers la communauté microbienne de la rhizosphère qui sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers soutient la nécessité de cribler davantage de plantes à des fins de phytoremédiation (Muratova *et al.*, 2003 ; Phillips, 2008).

L'objectif de cette étude est d'isoler et sélectionner les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures à partir des nodules et de la rhizosphère de *Scorpiurus muricatus* présente dans la raffinerie d'Arzew à Oran.

Afin d'atteindre notre but, Nous avons envisagé de faire :

- Une analyse physicochimique du sol rhizosphérique pollué par les hydrocarbures
- Un dénombrement de la flore rhizosphérique
- Isolement des bactéries associées à *Scorpiurus muricatus* à partir des nodules et de la rhizosphère
- Sélection des bactéries capable de dégrader les hydrocarbures sur boîte et par turbidométrie
- Evaluer l'effet de ces isolats sur la croissance de *S.muricatus* cultivée sur sol pollué

Il est important de noter qu'il nous a été impossible d'accéder à la raffinerie, donc ce travail s'est limité qu'à l'analyse des travaux antérieurs



***PARTIE I :***  
***RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE***

***CHAPITRE I :***  
***LES HYDROCARBURES***

## 1. Généralité

Le pétrole brut est le terme utilisé pour décrire une grande variété de fluides riches en hydrocarbures qui se sont accumulés dans les réservoirs souterrains et qui présentent des propriétés considérablement simples (Speight, 2014). Les hydrocarbures constituent les éléments essentiels des pétroles bruts (Nouh, 2020).

C'est des mélanges complexes essentiellement composés de molécules résultant de la combinaison en d'atomes de carbone(C) tétravalents et d'atomes d'hydrogène monovalents , d'où l'appellation d'hydrocarbures. Les atomes de carbone se rejoignent pour former la charpente du composé et les atomes d'hydrogène s'y fixent dans de nombreuses configurations différentes (Nouh, 2019).

D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et des composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes.

Le carbone et l'hydrogène peuvent former des molécules saturées où insaturées, linéaires ou cycliques (Colombano *et al.*, 2008). Parmi les molécules cycliques, certains d'entre elles grâce à un type particulier d'insaturation ont des propriétés particulières qui les font classer à part (Manahanl, 2007).

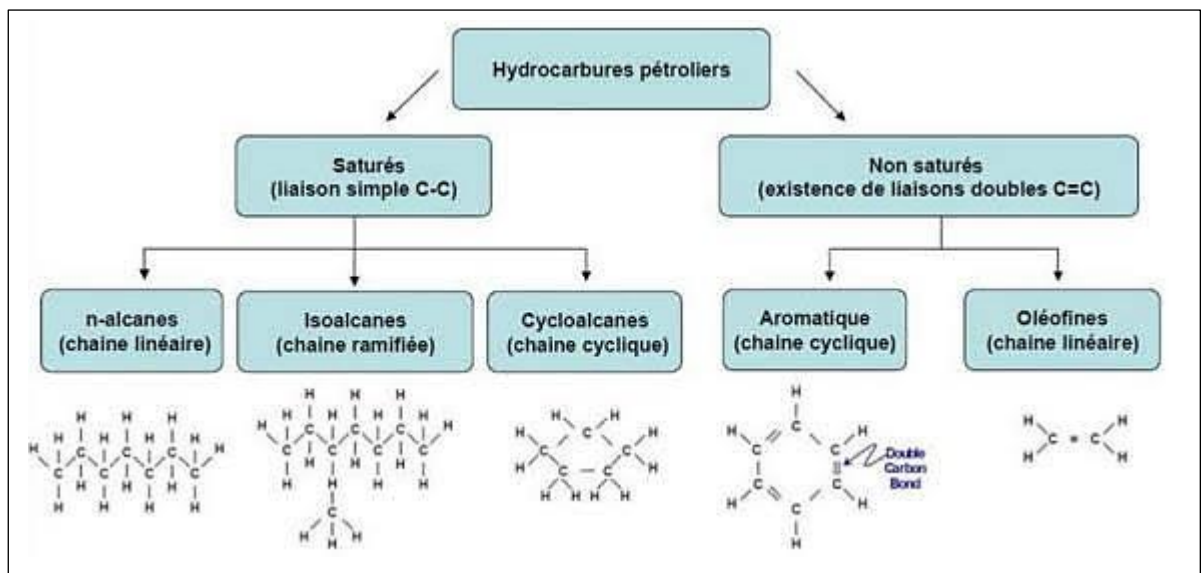


Figure 1: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano *et al.*, 2008)

Les hydrocarbures sont généralement classés en deux catégories: les composés saturés (alcane) et les composés insaturés (alcènes, aromatiques,...). (Fingas, 2015). Il est également possible de distinguer les hydrocarbures à chaîne ouverte, appelés hydrocarbures aliphatiques (alcane, alcène, alicyclique,...) (Benjamin, 2021), des hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) à savoir : BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes), et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).et dérivés benzéniques (Fingas, 2015).

Du fait de leur structure apolaire, les hydrocarbures sont des composés hydrophobes, faiblement solubles dans l'eau et stables. De plus, leur faible biodégradabilité, et leur haute viscosité les rendent très peu mobiles au sein d'une matrice poreuse polluée ainsi faiblement accessibles et assimilables par les microorganismes et végétaux présents dans le milieu (Benjamin, 2021).

## **2. Impact et toxicité des hydrocarbures pour l'environnement et la santé humaine :**

Les rejets d'hydrocarbures par déversements et fuites des réservoirs Souterrains, vapeurs, puits de pétrole et sites de raffineries de pétrole abandonnés causent la contamination des sols, des eaux souterraines et des océans (Zenati, 2018). Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique (Eriksson *et al.*, 2003)

En général, les composés aromatiques (HAP : composés de haut poids moléculaires) sont plus toxiques que les composés aliphatiques en raison de leur faible solubilité et de leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants, et les molécules de petites tailles sont plus toxiques que celles de grosses tailles dans la même famille (Harayama, *et al.*, 1999). Varjani (2017) a rapporté que les (HAP) ont le potentiel d'induire des tumeurs malignes qui affectent principalement la peau et les autres tissus épithéliaux, car ils ont une grande affinité pour le centre nucléophile des macromolécules comme l'ARN, la protéine et l'ADN.

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans les chaînes alimentaires. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (Scriban, 1999).

L'étouffement, l'anoxie, la croissance ralentie, les perturbations des réactions métaboliques et le déséquilibre hormonal dans les formes de vie sont notés comme des effets directs/indirects (Varjani, 2017)

### **3. Traitement des sols pollués par les hydrocarbures :**

La contamination par le pétrole continue d'être une grave préoccupation environnementale en raison de la croissance soutenue de l'extraction de pétrole brut et de la production associée (Jurelevicius *et al.*, 2013 ; Riskuwa-Shehu *et al.*, 2017). Les hydrocarbures en forte concentration dans l'environnement ainsi que leur transfert ont un effet néfaste vis-à-vis la santé de l'homme et les écosystèmes. Le Choix d'une méthode de dépollution doit être préalablement étudié à fin d'éviter la diffusion du polluant des sites contaminés. Les différents paramètres étudiés Généralement sont :

- ✓ Type de polluant Nature du sol et son accessibilité ainsi que sa localisation
- ✓ Date de la pollution (récente ou ancienne)
- ✓ L'étendu de la surface contaminée
- ✓ les exigences économiques et administratives (Bouderhem ,2011).

Les techniques de dépollution actuelles visent principalement à concentrer le polluant pour le traiter a posteriori ou l'éliminer, tout en s'adaptant au mieux au type de polluant et à son environnement. Ces techniques s'appuient sur une ou plusieurs manières de dépolluer : la séparation moléculaire (échange d'ions), la séparation de phase (désorption), la destruction chimique et la biodégradation. Elles peuvent être classées en trois grandes catégories :

- Les techniques physiques (incinération, stabilisation...) piègent ou dégradent thermiquement les polluants pour qu'ils ne représentent plus aucun danger.
- Les techniques chimiques (oxydation, réduction...) font appel à un principe réactionnel pour transformer le polluant en un composé moins toxique et à moindre impact sur l'environnement.
- Les techniques biologiques (Bioremédiation, Phytoremédiation, Bioaugmentation...) favorisent la biodégradation ou la bioaccumulation des composés polluants par les microorganismes ou les végétaux. (Benjamin, 2021).

Les technique de traitement basées sur des méthodes physic-chimique sont parfois caractérisées par une consommation d'eau irrationnelle et peuvent entraîner une contamination des ressources d'eau par des produits pétroliers, des acides, des alcalis, des phénols, des composés soufrés et des substances tensioactives, en plus du cout élevé de ses techniques. Cela a conduit à la recherche de méthodes durables pour l'assainissement des environnements contaminés (Pizarro-Tobías *et al.*, 2015). La bioremédiation remplit ces conditions.

La bioremédiation est l'utilisation de micro-organismes pour détoxifier ou éliminer les polluants en raison de leurs diverses capacités métaboliques. C'est une méthode évolutive pour l'élimination et la dégradation de nombreux polluants environnementaux, y compris les produits de l'industrie pétrolière (MedinaBellver *et al.*, 2005; Das et Chandra 2011; Alkhatib *et al.*, 2011). La

bioremédiation de l'environnement pollué peut être réalisée par la biostimulation (ajout de nutriments tels que les engrais organiques et inorganiques), la bioaugmentation (ajout de micro-organismes) et la phytoremédiation (utilisation de plantes).

La phytoremédiation pour l'assainissement in situ des sols contaminés par le pétrole est considérée comme une technique d'assainissement efficace, durable et rentable par rapport aux techniques physico-chimiques conventionnelles (Pizarro-Tobías *et al.*, 2015).

Lors de la phytoremédiation, la biodégradation des composants organiques du pétrole est favorisée par la synergie entre les plantes et les micro-organismes présents dans la rhizosphère (Yateem, 2013). De ce fait l'exploration de systèmes plantes-microbes pour des applications de bioremédiation améliorées semble nécessaire. (Durand, 2018)

L'identification de micro-organismes capables de favoriser la rhizoremédiation à la fois par des processus de promotion de la croissance des plantes et de dégradation des hydrocarbures est importante pour le succès et l'adoption de techniques de remédiation à base de plantes. Le consortium rhizosphérique des plantes permet d'améliorer la rhizoremédiation des hydrocarbures pétroliers (Michael *et al.*, 2021).

#### **4. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement**

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacer, transformer ou éliminé, après avoir été diffusé dans l'environnement. Les facteurs environnementaux sont parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure (Guermouche, 2014).

**a. L'évaporation** est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ( $T^{\circ}$  ébullition  $< 270^{\circ}\text{C}$ ), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère (Soltani, 2004).

**b. La solubilisation** est la capacité d'une substance à se dissoudre dans la colonne d'eau. La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée tels que les composés aromatiques légers comme le benzène (Fingas, 2013). Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont assimilable par la faune et la flore (Bouchez *et al.*, 1995).

**c. L'émulsification** est un processus d'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers. Pour que le produit obtenu soit appelé « émulsion », il doit avoir une certaine stabilité (Fingas, 2013). L'émulsification modifie considérablement les propriétés et les

caractères du pétrole déversé. Lorsque les conditions d'agitation sont suffisantes et en présence des composés ayant des propriétés tensioactives (comme les asphaltènes), deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée «mousse au chocolat », et huile-dans-eau (Council, 2003).

**d. La sédimentation** est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (Gong *et al*, 2014; Fitzpatrick *et al*, 2015) La formation d'agrégats hydrocarbures-MES est due à des interactions de charges électriques (ponts cationiques) entre les surfaces des particules et les composés polaires des hydrocarbures (Bandara *et al*, 2011). Les hydrocarbures dissous peuvent également interagir avec les sédiments par agrégation directe pour former les agrégats hydrocarbures-MES ou par adsorption sur les sédiments (Lee, 2002). Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (Dachs *et al*, 2002). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.

**e. La Photo-oxydation :** la photo- oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcanes (Wilcke *et al*, 2000). La photolyse correspond à la transformation des hydrocarbures sous l'effet d'un rayonnement lumineux. Après absorption de l'énergie lumineuse, la molécule est déstabilisée et peut réagir (généralement avec de l'oxygène) pour former une molécule oxydée, plus polaire et généralement plus toxique (Lampi, 2005). Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface (Park *et al*, 2001).

**f. La Biodégradation** la biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries (Vogel *et al*, 2001).

L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation seront traitées plus loin. Particulièrement intéressantes dans le cadre de dépollution de sites contaminés en hydrocarbures pétroliers, la bioremédiation est considéré comme une façon

écologique de diminuer la teneur de ces polluants récalcitrants notamment les HAP (Guermouche, 2014).

C'est en vue d'exploiter la faculté de certains organismes à dégrader les hydrocarbures que des études s'attachent à caractériser, quantifier et comprendre ces mécanismes de dégradation. Il est important de souligner que la durée de demi-vie des hydrocarbures aromatiques dans les sols est régie par différents mécanismes, dont les biodégradations. Elle consiste en une attaque des molécules organiques par les micro-organismes du sol, les bactéries, champignons et algues peuvent en effet cataboliser les hydrocarbures d'origine pétrolière (Guermouche, 2014).



***CHAPITRE II***  
***LA BIOREMEDIATION***

## **1. La bioremédiation :**

La bioremédiation est une technique écologiquement rationnelle et de pointe qui utilise des processus biologiques naturels pour éliminer complètement les contaminants toxiques. Tout processus qui utilise des micro-organismes, des champignons, des plantes vertes ou leurs enzymes pour ramener l'environnement naturel altéré par des contaminants à son état d'origine (V.Mary Kensa, 2011).

La structure moléculaire des hydrocarbures est complexe, plus le taux de biodégradation est faible. La biodégradation des hydrocarbures est influencée par plusieurs paramètres dont les principaux sont la texture du sol, ses caractéristiques biologiques, sa structure, la concentration et les caractéristiques physico-chimiques et la concentration des polluants ainsi que les facteurs environnementaux (p. ex., concentrations d'oxygène et de nutriments, température, salinité et pression) (Kumar et Gopal, 2015) .

Les technologies de bioremédiation peuvent généralement être classées comme *in situ* ou *ex situ*. La bioremédiation *in situ* implique le traitement des matériaux contaminés sur le site, tandis que l'*ex situ* implique l'élimination des matériaux contaminés à traiter ailleurs. Quelques exemples de technologies de bioremédiation sont la bioventilation, le landfarming, le bioréacteur, la composition, la bioaugmentation, la rhizofiltration et la biostimulation (V.Mary Kensa, 2011).

## **2. Les microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures:**

La plupart des hydrocarbures pétroliers rencontrés dans l'environnement sont dégradés ou métabolisés par des bactéries indigènes en raison de leurs besoins en énergie et en carbone pour leur croissance et leur reproduction. (Hazen *et al.*, 2010 ; Kleindienst *et al.*, 2015a; Koshlaf et Ball, 2017).

Les composés d'hydrocarbures pétroliers se lient aux composants du sol, et il est difficile de les éliminer ou de les dégrader. Les hydrocarbures diffèrent dans leur sensibilité aux attaques microbiennes. Ils sont plus ou moins sensibles à la dégradation microbienne, généralement comme suit : alcanes linéaires > alcanes ramifiés > petits aromatiques > alcanes cycliques (Barathi *et al.*, 2001) ; aromatiques > alcanes cycliques (Perry, 1984 ; Ulrici ,2000)

La dégradation microbienne est le mécanisme naturel majeur et ultime par lequel on peut nettoyer les polluants d'hydrocarbures pétroliers de l'environnement (Jones *et al.*, 1983; Lal et Khanna, 1996). Certains composés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques de poids moléculaire élevé (HAP), peuvent ne pas être dégradés du tout (Atlas et Bragg, 2009). Des études récentes ont identifié des bactéries de plus de 79 genres qui sont capables de dégrader les

hydrocarbures pétroliers. (Tremblay *et al.*, 2017). Plusieurs de ces bactéries telles que *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Alteromonas*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Dietzia*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Mycobacterium*, *Pandoraea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptobacillus*, *Streptococcus*, et *Rhodococcus* jouent un rôle essentiel dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Margesin *et al.*, 2003 ; Chaerun *et al.*, 2004 ; Jin *et al.*, 2012 ; Nie *et al.*, 2014 ; Varjani et Upasani, 2016 ; Sarkar *et al.*, 2017 ; Varjani, 2017 ; Xu *et al.*, 2017). (Tableau1)

Les hydrocarbures aliphatiques peuvent être dégradés par diverses voies, telles que l'oxydation terminale, l'oxydation sub-terminale,  $\alpha$ -oxydation et  $\beta$ -oxydation (Salleh *et al.*, 2003; Abbasian *et al.*, 2015).

**Tableau 1:** principales souches bactériennes aérobies qui participent à la dégradation des HAP et des Alcanes (Guermouche, 2014)

Composés	Microorganismes	Références
Naphtalène	<i>Pseudomonas Sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i>	Eaton et Chapman.,1992 Grund <i>et al.</i> , 1983 Daane <i>et al.</i> 2001
Fluorène	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i>	Genney <i>et al.</i> , 2004 Boldrin <i>et al.</i> , 1993
Anthracène	<i>Pseudomonas sp.</i>	Juhasz <i>et al.</i> , 2009
Phénanthrène	<i>Pseudomonas sp.</i>	Kang <i>et al.</i> , 2005
Fluoranthène	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Paucimobilis sp.</i>	Lopez <i>et al.</i> , 2005
Pyrène	<i>Mycobacterium sp.</i>	Boldrin <i>et al.</i> ,1993
Benzo[a]pyrène	<i>Beijerinckia sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Jerina <i>et al.</i> , 1976 Kanaly <i>et al.</i> , 2000
N-alcanes : C5- C10 C10- C20  C20-C32	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i>	Zhang <i>et al.</i> ,2010 Zuber <i>et al.</i> ,2008 Snapper <i>et al.</i> , 1990 Sokplovskaja <i>et al.</i> ,2003 Whyte <i>et al.</i> ,1998
Isoalcanes	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Solano-Serena <i>et al.</i> , 2000
Cycloalcanes	<i>Nocardia sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Bouchez-Naitali <i>et al.</i> ,1999 Smith <i>et al.</i> , 2004

### 3. Importances des légumineuses et des microorganismes dans la bioremediation des sols contaminés

Les espèces de graminées et de légumineuses ont montré les meilleurs taux de réussite dans les expériences de phytoremédiation (Aprill et Sims 1990 ; Muratova *et al.*, 2003 ; Merkl *et al.*, 2004 ; Gaskin, 2008 ; Njoku *et al.*, 2009 ; Stephen et Ijah, 2011 ; Ismail *et al.*, 2014a, b).

Les légumineuses sont considérées comme particulièrement prometteuses en raison de leur indépendance en azote, ce qui est important dans les sols contaminés par les hydrocarbures caractérisés par un rapport carbone/azote (C/N) élevé (Frick *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2008 ; Hall *et al.*, 2011). En outre, certains rapports (Nichols *et al.*, 1997 ; Muratova *et al.*, 2003 ; Phillips, 2008) ont montré que les légumineuses sélectionnent souvent les communautés microbiennes dégradant les hydrocarbures, en particulier celles ayant une capacité de dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). La nature sélective des plantes envers la communauté microbienne de la rhizosphère qui sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers soutient la nécessité de cribler davantage de plantes à des fins de phytoremédiation.

Différents travaux ont montré l'efficacité des légumineuses spontanées dans la tolérance et la dégradation des hydrocarbures. Les espèces *Medicago sativa* L., *Glycine max*, *Lablab purpureus*, *Phaseolus vulgaris* et *Cajanus cajan*, avaient une capacité efficace à tolérer les polluants du pétrole brut dans le sol (Stephen et Ijah, 2011 ; Ismail *et al.*, 2014 a, b ; Ibrahim et Ijah, 2014). *C. cajan* et *L. purpureus* se sont révélés très efficaces pour assainir les sols pollués par le pétrole brut, car ces légumineuses ont provoqué une dégradation à 100 % des fractions de pétrole brut (Ibrahim et Ijah 2014 ; Ismail *et al.*, 2014a, b).

Le succès de la phytoremédiation dépend de la survie et de la croissance des plantes sur les sites contaminés, ainsi que de la capacité de la rhizosphère à supporter une population microbienne active du sol (Cook et Hesterberg, 2013). Dans les zones contaminées, les populations microbiennes du sol sont souvent réduites par les toxines pétrolières et les carences en nutriments (Wang *et al.*, 2011).

De nombreuses expériences ont rapporté le succès de l'élimination totale des hydrocarbures pétroliers en utilisant des inoculums de PGPR en association avec des plantes tolérantes (Agarry *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). La survie des PGPR introduits et les modifications ultérieures de la structure de la communauté microbienne associée à la rhizosphère sont considérées comme des facteurs clés pour une phytoremédiation réussie (Agarry *et al.*, 2013).

#### **4. Les légumineuses :**

*Leguminosae* appelé aussi *Fabaceae*, est une famille importante et variée des Angiospermes. C'est la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Doyle et Luckow, 2003). Elle comprends 19 500 espèces repartis en 750 genre et 35 tribus (LPWG, 2013a). Sur la base des caractéristiques morphologiques la famille des légumineuse est divisée en trois sous-familles : *Mimosoideae* (parfois considérée comme la famille *Mimosaceae* avec quatre tribus et 3 270 espèces) ; *Papilionoideae* (ou famille *Fabaceae/Papilionaceae* avec 28 tribus et 13 800 espèces) et *Caesalpinoideae* (ou famille *Caesalpiniaceae* avec quatre tribus et 2 250 espèces) (Lewis *et al.*, 2005 ; Smýkal *et al.*, 2015).

La famille des légumineuses est la deuxième famille après celle des graminées en termes de valeur économique, mais elle présente une diversité de fleurs et de fruits beaucoup plus grande. Les légumineuses sont omniprésentes dans les principaux biomes et sont présentes dans presque tous les types de végétation du monde. (Doyle et Luckow, 2003; Schrire *et al.*, 2005).

#### **5. La fixation biologique de l'azote (BNF) par légumineuses :**

L'azote est le nutriment le plus limitant pour la croissance des légumineuses (Simon *et al.*, 2014), est un le principal composant de l'atmosphère, constituant 79 % du volume total sous forme d'azote gazeux (N<sub>2</sub>). C'est aussi l'un des composants fondamentaux de tout organisme vivant, car il entre dans la composition de plusieurs biomolécules, dont les bases azotées des acides nucléiques ADN/ARN ou la fonction amine (-NH<sub>2</sub>) des protéines et de la chlorophylle et donc essentiel pour la croissance des plantes et la production de nourriture et d'aliments pour animaux. (Simon *et al.*, 2014), Cependant, malgré son apparente disponibilité due à son abondance dans l'atmosphère, le N<sub>2</sub> ne peut être assimilé que par certains procaryotes, appelés diazotrophes (Cherni, 2019).

La fixation biologique de l'azote (BNF) est considérée comme un processus important qui détermine l'équilibre de l'azote dans l'écosystème du sol (Khosro & Yousef, 2012) , se déroule dans des organes végétaux spécialisés appelés nodosités(Oldroyd *et al.*, 2011), est un moyen de convertir l'azote élémentaire en une forme utilisable par les plantes. Un certain nombre de microbes sont impliqués dans le processus de BNF, qui contient une enzyme nitrogénase responsable de la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol (Gothwal *et al.*, 2008)

Ce processus est couteux en énergie, ce qui nécessite un apport important de photosynthétats (approximativement équivalent à 25% de la matière sèche de la pousse à la récolte) de la part de l'hôte (Schulze *et al.*, 1999). Pour minimiser le coût énergétique, les plantes légumineuses utilisent de préférence toute source alternative d'azote pour leur croissance (Ma et Chen,2021), et lorsque des sources alternatives d'azote ne sont pas disponibles ou que les conditions environnementales

sont défavorables à la croissance, elles limitent la fixation de N<sub>2</sub> des nodules au niveau minimal nécessaire pour soutenir la croissance de la plante.

Pour une croissance optimale, les légumineuses ont développé un mécanisme de régulation à longue distance (systémique) [appelé autoregulation de la nodulation (AON)] pour contrôler le nombre de nodules formés sur les racines d'une plante, et donc l'activité totale de la nitrogénase et les mécanismes qui inhibent rapidement et efficacement l'activité de fixation de l'azote des nodules lorsque des sources alternatives d'azote sont disponibles ou en cas de stress environnemental (Ma et Chen, 2021).

Lors de la fixation biologique de l'azote, des bactéries fixatrices d'azote réduisent le N<sub>2</sub> en ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) qui est transformé par les bactéries nitrifiantes en nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) puis en nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Les nitrates et/ou l'ammonium sont les formes directement assimilables par les racines des végétaux (Cherni, 2019).

## **6. Les légumineuses spontanées du pourtour méditerranéen**

L'ensemble du pourtour méditerranéen abrite une diversité biologique très importante. La plupart des espèces de la flore spontanée, en Afrique du Nord notamment, sont remarquablement résistantes et bien adaptées à la sécheresse et à la salinité (Bekki *et al.*, 2006 ; Merabet *et al.*, 2006) et constituent une part non négligeable des ressources génétiques locales à valeurs pastorale, fourragère, alimentaire, aromatique et médicinale (Abdelguerfi et Laouar, 1999 ; Ohba et Amirouche, 2003). Cette flore est très riche en légumineuses adaptées aux diverses conditions pédoclimatiques de ces régions. Certaines ont développé des mécanismes d'adaptation particuliers, avec des systèmes racinaires puissants et pivotant ou des cycles végétatifs incluant une période de dormance estivale.

Hamilton *et al.* (2011), rapportent que le degré d'endémisme de la flore du bassin méditerranéen est très élevé ; sur 967 espèces appartenant à 18 genres de fabacées fourragères et/ou pastorales, 336 espèces sont endémiques à la région méditerranéenne (Tableau 2).

En raison de sa situation particulière en région méditerranéenne et de l'impressionnant gradient bioclimatique Nord-Sud qui la caractérise, l'Algérie s'individualise par une flore spontanée très spécifique, caractérisée par une diversité génétique fortement corrélée aux conditions écologiques du pays. Dans cette flore, les légumineuses sont représentées par environ 360 espèces et sous-espèces, dont 41 % rares à très rares et 13% endémiques de l'Algérie au sens large (Quézel et Santa, 1962). Du fait de son importance fourragère et pastorale, cette famille a bénéficié d'une attention particulière de la part de différentes équipes nationales de recherche. Divers travaux sur les genres *Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Hedysarum* et *Onobrychis* (Abdelguerfi et Laouar, 1999 ; Yahia et Fyad-Lameche, 2003) ont montré une corrélation positive entre les paramètres

biogéographiques, particulièrement l'altitude et la pluviosité, et les traits biologiques liés à la croissance et à la reproduction floraison, inflorescences, gousses et graines. Parallèlement, peu d'études ont été réalisées sur les partenaires symbiotiques de ces légumineuses (Benhizia *et al.*, 2004 ; Sebbane *et al.*, 2006 ; Bekki *et al.*, 2006 ; Merabet *et al.*, 2006 ; Boulila *et al.*, 2009 ; Nouredine *et al.*, 2010 ; Benslama *et al.*, 2015. Bouchiba *et al.*, 2017).

**Tableau 2 :** Nombre d'espèces de légumineuses fourragères dénombrées dans le monde et exclusivement Méditerranéennes ainsi que le pourcentage des espèces présentes dans les régions Ouest-Méditerranéennes (Hamilton *et al.*, 2001).

Genres	Nombre d'espèces de légumineuses dans le monde	Nombre d'espèces de légumineuses Méditerranéennes	Nombre d'espèces de légumineuses exclusivement Méditerranéennes	% d'espèces de légumineuses dans les régions Ouest-Méditerranéennes *
<i>Hippocrepis</i>	29	28	19	54
<i>Ononis</i>	66	63	43	86
<i>Anthyllis</i>	16	16	10	56
<i>Onobrychis</i>	118	91	68	10
<i>Hedysarum</i>	69	37	28	30
<i>Omithopus</i>	6	6	2	100
<i>Trigonella</i>	71	44	22	11
<i>Coronilla</i>	10	10	3	70
<i>Vicia</i>	110	87	32	38
<i>Lathyrus</i>	80	61	22	41
<i>Medicago</i>	70	60	19	43
<i>Lotus</i>	99	58	25	60
<i>Trifolium</i>	161	117	37	43
<i>Dorycnium</i>	5	5	1	80
<i>Melilotus</i>	19	17	3	59
<i>Lupinus</i>	42	6	2	50
<i>Biserrula</i>	2	2	0	/0
<i>Scorpiurus</i>	2	2	0	100
<b>Total</b>	<b>976</b>	<b>710</b>	<b>336</b>	<b>/</b>

\* Régions Ouest-Méditerranéennes (Algérie, Maroc, Tunisie).

## 7. Le genre *Scorpiurus* :

Communément appelés cheniettes, Tagourit ou El ghagfa, les espèces du genre sont connues comme adventices des cultures et surtout comme plantes fourragères et pastorales spontanées très recherchées par le cheptel (Hamdani, 2001 ; M'hammedi Bouzina *et al.*, 2010). L'origine du genre semble être l'ouest du bassin méditerranéen et son aire de répartition est surtout méditerranéenne, avec une présence des espèces tétraploïdes sur tous les continents

La classification du genre *Scorpiurus* a été étudiée par plusieurs auteurs. Dominguez et Galiano ( 1974a, 1974b ) dans une révision du genre *Scorpiurus* Basé sur des tests d'hybridation et par

l'étude des Caryogrmmes ont reconnu quatre espèces : *Scorpiurus vermiculatus*, *S. muricatus*, *S. sulcatus* et *S. subvillosus* (M'Hammedi-Bouzina et al., 2005), tandis que L' Index synonymique de la flore de France de Bock (2004 ), ne reconnaît que trois espèces valides pour *Scorpiurus* : *S. vermiculatus*, *S. sulcatus* et *S. muricatus* avec deux sous-espèces : *muricatus* et *subvillosus* .(M'Hammedi-Bouzina et al., 2005); L'espèce *S. vermiculatus* se distingue nettement par ses gousses couvertes de tubercules aplatis au sommet (en forme de champignon) et *S. muricatus* subsp. *muricatus* par des tubercules sub-globuleux (M'Hammedi-Bouzina et al., 2005) Selon Abbate et al. (2010), ce genre comprend deux espèces : *S. muricatus* L. (incl. *S. subvillosus* L. et *S. sulcatus* L.) et *S. vermiculatus*.

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Famille</b>	Fabaceae
<b>Sous Famille</b>	Papilionaceae
<b>Tribu</b>	Hedysareae
<b>Genre</b>	<i>Scorpiurus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Scorpiurus vermiculatus</i> L. <i>Scorpiurus muricatus</i> L.: espèce polymorphe dans laquelle on rencontre deux sous espèces: ssp <i>sulcatus</i> ssp <i>subvillosus</i>

*a. Scorpiurus muricatus* : *Scorpiurus muricatus* est une légumineuse annuelle largement distribuée comme plante spontanée dans les zones méditerranéennes, notamment au Maroc, en Algérie, au Portugal, en Espagne, au sud de la France, au sud de l'Italie et en Sicile (Bensalem et al., 1990 ; Beale et al., 1991 ; Licitra et al., 1997), en raison de sa large tolérance au type de sol et au pH (Ehrman et Cocks 1990) et de sa grande tolérance à la sécheresse (El Shaer, 1995). La queue de scorpion épineux produit une biomasse importante (Le Houerou 2001) de bonne qualité (Licitra et al., 1997) ainsi que de son palatabilité élevée et de ses effets galactagogues (Di Giorgio et al., 2009), elle est considérée comme une culture fourragère potentielle ; il est hautement préféré par le bétail ruminant (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Berrekia, 1989), a une concentration élevée en protéines brutes (CP) (Maymone et al., 1953 ; Licitra et al., 1997) et donne un goût et une saveur distincts aux produits laitiers (Carpino et al., 2004a,b). En outre, un effet positif sur le rendement des cultures céréalières ultérieures a été démontré (Pülschen, 1992).

se divise en deux sous espèces *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* et *Scorpiurus unuricatus* ssp. *subvillosus*. Ces deux espèces ont une action prometteuses sur les pâturages car ce sont des plantes qui ont une masse végétative importante qui recouvre le sol et le protège des érosions.



**b. La Morphologie :**

*Scorpiurus muricatus* n'a pas de véritable tige, mais des branches qui, à partir du nœud cotylédonaire, se déploient radialement sur le sol. (Figure 2) (Dormer, 1945) ; l'extrémité de chaque branche se développe jusqu'à une hauteur qui dépasse rarement 60-65 cm. Le nombre de branches ainsi formées (3-10, parfois plus) est très variable selon la fertilité du sol et la vigueur de la plante. Pendant la croissance végétative, les branches sont solides à l'intérieur, turgescents et glabres, et charnus au moment de la formation des gousses. Les feuilles sont simples, solitaires ou, de forme oblongue (en forme d'oreille de lièvre ou bupleurifolia), avec 3-5 nervures parallèles. Les feuilles ont une largeur de 1-2 cm, une longueur de 4-7 cm, avec des stipules longues et pointues. Le stipe légèrement ailé, est à peu près aussi long que le limbe foliaire et glabre, de couleur bleu-vert sur les deux faces et souvent charnu. Les petites fleurs sont initialement jaunes et deviennent rouges à maturité. Les graines (4-9 dans chaque gousse) sont réniformes, grandes au milieu et plus fines et arrondies aux deux extrémités, de couleur jaune clair ou brune, brun foncé (Maymone *et al.*, 1953 ; Tutin *et al.*, 1968; Dominguez et Galiano, 1974b).



**Figure 2:** Aspect de *Scorpiurus muricatus* ssp. *sulcatus* (a : Plante ; b : Fleur ; c : Gousse ; d : Graines).

## **8. Les bactéries associées aux légumineuses**

### **8.1. Rhizobia:**

Les rhizobia sont reconnus comme étant des bactéries fixatrices d'azote, Gram négatives, aérobies et présentes soit à l'état libre et en général dans le sol soit en association avec des légumineuses, possédant une forme de bâtonnets de 0,6 à 0,9 µm de largeur et de 1,2 à 3µm de longueur et non sporulant. Ce sont des bactéries mobiles grâce à un flagelle polaire ou subpolaire ou 2 à 6 flagelles péritriches. Leur croissance est optimale à une température de 28 °C et un pH entre 6 et 7 (Burton, 1985).

L'existence de nodules dans les racines des légumineuses a été signalée pour la première fois au XVIIe siècle par Malpighi, mais c'est à la fin du XIXe siècle que Beijerinck (1888) a isolé pour la première fois une bactérie des nodules de *Vicia*, initialement nommée *Bacillus radicicola*. Plus tard, cette bactérie a été rebaptisée *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889) et, jusqu'à présent, les bactéries qui nodulent les légumineuses sont appelées génériquement rhizobia.

Les rhizobia forment actuellement un groupe complexe de bactéries qui appartiennent à différents phyla, classes, ordres, familles et genres et sont capables d'établir des symbioses fixatrices d'azote avec différentes légumineuses dans le monde entier dont la plupart appartiennent à la sous-classe des Alphaproteobacteria. (Velázquez *et al.*, 2019)

Depuis la découverte de la symbiose rhizobia-légumineuse fixatrice d'azote, beaucoup de ces relations symbiotiques ont été analysées, montrant que la nodulation est commune chez les Papilionoideae, moins abondante chez les Mimosoideae et rare chez les Cesalpinoideae (Peix *et al.*, 2015)

#### **8.1.1. La symbiose légumineuses-rhizobia :**

La symbiose Rhizobium-légumineuse est le résultat d'une interaction hautement spécifique entre la plante et la bactérie. Elle dépend de la spécificité, de l'infectivité et de l'efficacité des rhizobia. A la suite de mécanismes complexes de reconnaissance entre les deux organismes via un dialogue moléculaire, il en résulte la formation d'un nouvel organe au niveau des racines appelé nodule. à l'intérieur du nodule, la bactérie intracellulaire se différencie en bactéroïde capable de fixer l'azote atmosphérique en le réduisant en ammonium, via le complexe nitrogénase. Certains rhizobiums sont spécifiques d'une plante hôte particulière tandis que d'autres sont adaptés à une gamme d'hôtes. cette spécificité d'hôte-bactérie est sous le contrôle génétique de chacun des deux partenaires (Jury, 2018).

La symbiose Améliore non seulement la disponibilité de l'azote de la plante hôte, mais stimule également la photosynthèse (Concha et Doerner, 2020), comme elle améliore l'activité de la Ferredoxine-Nitrogénase racinaire (Derylo et Skorupska, 1992 ; Jin *et al.*, 2014).

### **8.1.2. Les étapes de la formation de nodules**

La symbiose rhizobia-légumineuse dépend de la spécificité, de l'infectivité et de l'efficacité des rhizobia et suit une série d'étapes, qui sont le résultat de l'expression de différentes molécules par la bactérie, la plante hôte, ou les deux. Des flavonoïdes spécifiques libérés par les racines des légumineuses servent de chimioattractants pour le symbiote rhizobien (Gulash, 1984) et ils activent également l'expression de gènes de nœuds rhizobiens, responsables de la synthèse de facteurs de nœuds (lipochitine-oligosaccharides) en effet, les flavonoïdes sont perçus par le rhizobium *via* une protéine régulatrice (*NodD*). Cette protéine va déclencher l'expression des gènes *nod* aboutissant à la synthèse d'une molécule signal appelé le facteur *nod* (FN). (Peix *et al.*, 2015) (Figure 2). Ces derniers initient les processus de nodulation et de colonisation cellulaire. Les FN sont des molécules de N acétyl-glucosamine substitués par des radicaux (sulfate, acétate, méthyle...) qui déterminent l'espèce avec laquelle le microorganisme interagit. Les gènes *nodA*, *nodB* et *nodC* sont requis pour la synthèse du squelette de base du FN alors que les gènes spécifiques à l'hôte sont *nodP*, *nodQ* et *nodH* ; ou *nodF*, *nodE* et *nodL* qui varient selon les espèces bactériennes et définissent le spectre d'hôtes. ). Ces facteurs Nod sont perçus par la légumineuse pour promouvoir la division des cellules racinaires et d'autres réponses en aval (Geurts et Bisseling, 2002) (Figure 3). Les rhizobiums se développent au tours des poils absorbants et induisent une boucle dans le poil racinaire appelée cross de berger. une structure tubulaire et intracellulaire contenant les bactéries, appelée cordon d'infection, se forme. Au fur et à mesure que les rhizobiums se reproduisent, La formation de ce cordon d'infection est également induite par la présence des hormones végétales cytokinine (CK) et auxine (AUX) (Roy *et al.*, 2020). le cordon d'infection se développe et atteint d'abord la base de la cellule du poil racinaire, puis le primordium nodulaire (Geurts et Bisseling, 2002). Ce dernier est le résultat de la division des cellules du cortex racinaire induite par une protéine produite par la plante appelée noduline (Vance *et al.*, 1998). A ce stade le cordon d'infection commence à libérer des cellules bactériennes dans les cellules du parenchyme du nodule en développement. Les cellules bactériennes subissent des changements morphologiques et physiologiques et se différencient en bactéroïdes, capable de fixer l'azote atmosphérique (Haag *et al.*, 2013).

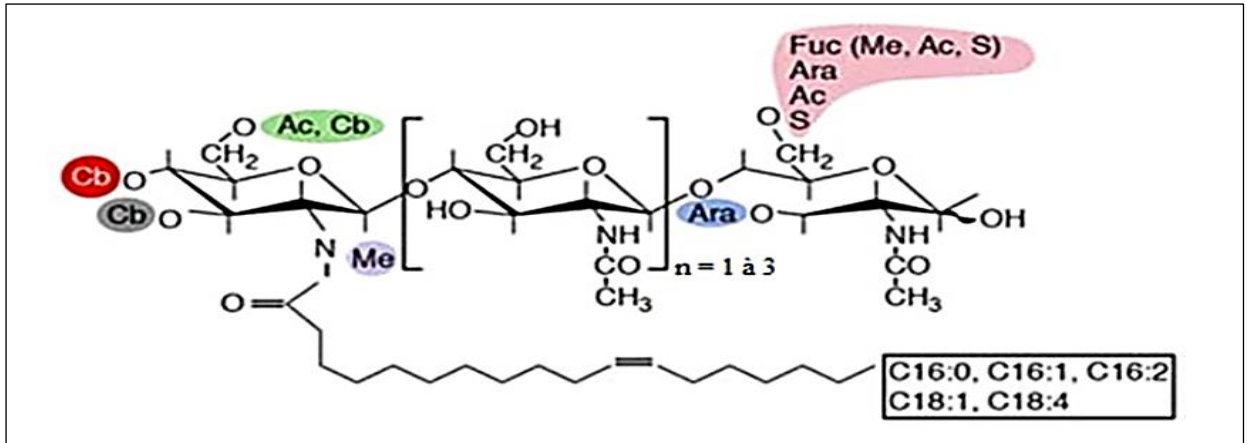


Figure3 : La structure des facteurs Nod

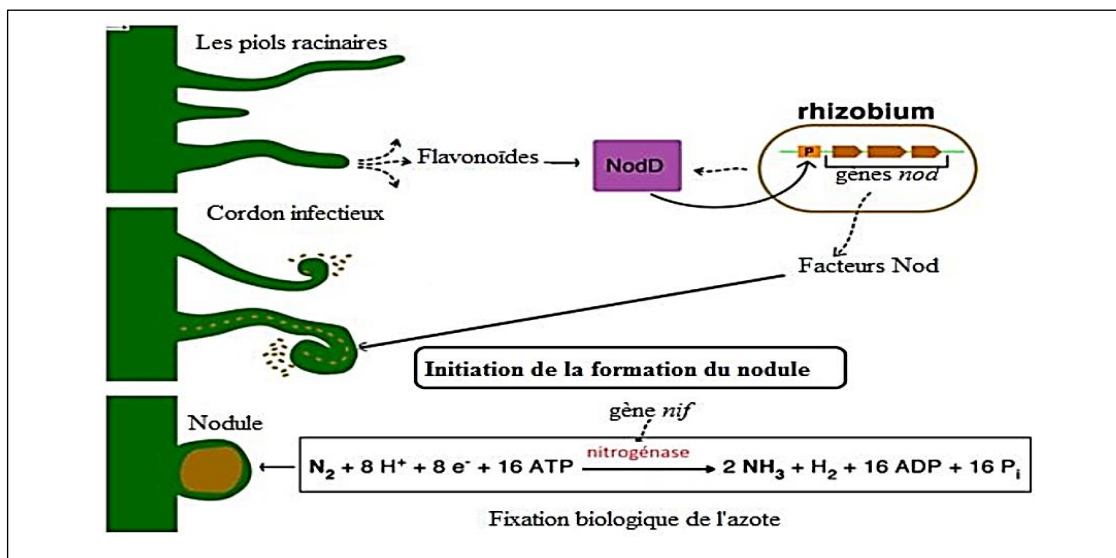


Figure 4 : Le dialogue moléculaire rhizobium-légumineuses (Laranjo *et al.*, 2014)

En fonction de la nature transitoire et persistante de la prolifération des cellules de l'hôte, les nodules des légumineuses peuvent avoir deux types de structure de nodule: déterminé ou indéterminé (Sprent *et al.*, 2013). Les nodules à croissance indéterminée maintiennent le tissu méristématique et prennent une forme allongée, tandis que les nodules déterminés ont un méristème transitoire et présentent une forme sphérique, où toutes les cellules centrales sont plus ou moins dans le même stade de développement.

Il a été démontré que deux voies génétiques contrôlent le nombre de nodules produits dans la symbiose des nodules racinaires, l'une contrôlant l'infection rhizobienne et l'autre contrôlant l'organogenèse des nodules (Penmetsa *et al.*, 2003).

## **8.2. Les bactérie rhizosphérique (Rhizobactérie):**

### **8.2.1. Généralité**

Le terme "rhizobactéries" a été inventé par Kloepper et Schroth (1978). il désigne ces bactéries comme une communauté qui colonise de manière compétitive les racines des plantes, améliore leur croissance et réduit les maladies des plantes. Les rhizobactéries présentent toutes les interactions positives, négatives et neutres avec les plantes (Whipps, 2001).

Une rhizobactérie putative est qualifiée de PGPR lorsqu'elle est capable de produire un effet positif sur la plante lors de l'inoculation, démontrant ainsi de bonnes capacités de compétition par rapport aux communautés rhizosphériques existantes. En général, environ 2-5% des bactéries de la rhizosphère sont des PGPR (Jha *et al.*, 2010). (PGPR) est l'acronyme de "rhizobactéries favorisant la croissance des plantes". Jusqu'à présent, un nombre considérable d'espèces bactériennes, principalement associées à la rhizosphère des plantes, ont été testées et se sont révélées bénéfiques pour la croissance, le rendement et la qualité des cultures à travers divers mécanismes ; comme la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate, la détection du quorum, agent bio-pesticides, etc. (Bhattacharya et Jha, 2012).

Ces dernières années, le nombre de PGPR recensées a augmenté de manière significative, principalement puisque le rôle de la rhizosphère comme écosystème a gagné de l'importance dans le fonctionnement de la biosphère et que les mécanismes d'action des PGPR ont été suffisamment étudiés.

Ces microorganismes cultivables, présentant une diversité de genres et d'espèces, appartiennent majoritairement aux quatre phyla suivants: Proteobacteries, Firmicutes, Actinobacteries et Bacteroidetes (Hugenholtz, 2002).

### **8.2.2. Aspects bénéfiques des PGPR:**

les PGPR peuvent provoquer des changements spectaculaires dans la croissance des plantes en produisant des régulateurs de croissance et/ou en améliorant la nutrition des plantes en fournissant et en facilitant l'absorption des nutriments du sol (Zahir *et al.*, 2004). En outre, beaucoup de ces souches rhizobactériennes peuvent également améliorer la tolérance des plantes à la salinité, à la sécheresse, aux inondations et à la toxicité des métaux lourds et, par conséquent, permettre aux plantes de survivre dans des conditions environnementales défavorables (Belimov *et al.*, 2001 ; Glick, 2010 ; May *et al.*, 2011 ; Mayak *et al.*, 2004b ; Nadeem *et al.*, 2007 ; Sandhya *et al.*, 2009 ; Zahir *et al.*, 2008).

### **8.2.3. Mécanismes d'action des PGPR :**

Les PGPR favorisent la croissance des plantes par des mécanismes directs et indirects (Niranjan *et al.*, 2006 ; Van Loon 2007). La différence entre les deux n'est pas toujours évidente. Les

mécanismes indirects, en règle générale, sont ceux qui se produisent à l'extérieur de la plante, tandis que les mécanismes directs sont ceux qui se produisent à l'intérieur de la plante et affectent directement le métabolisme de la plante (Antoun et Prévost, 2006 ).

### ***Les mécanismes directs***

comprennent la production de composés organiques volatils (COV) bactériens stimulants et de phytohormones, la réduction du niveau d'éthylène dans les plantes, l'amélioration de l'état nutritif des plantes (libération de phosphates et de micronutriments à partir de sources insolubles ; fixation biologique de l'azote) (Etsami et Maheshwari, 2018).

### ***les effets indirects des PGPR***

incluent le fonctionnement comme agents de biocontrôle pour réduire les maladies, la promotion d'autres symbioses bénéfiques, et la protection des plantes en dégradant les xénobiotiques dans les sols contaminés (Figueiredo *et al.*, 2010). Il s'agit notamment de l'inhibition des pathogènes par la production de substances, ou par l'augmentation de la résistance de la plante hôte contre les organismes pathogènes (Cartieaux *et al.*, 2003).

Par exemple, les PGPR produisent des métabolites qui réduisent la population d'agents pathogènes et/ou produisent des sidérophores qui réduisent la disponibilité du fer pour certains agents pathogènes, entraînant ainsi une réduction de la croissance des plantes (Arora *et al.*, 2001; Bhattacharyya et Jha, 2012). Elle produisent des enzymes dégradant la paroi cellulaire (Kobayashi *et al.*, 2002), telles que la  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, cellulase, et protéase sécrétées par les souches de biocontrôle de PGPR exercent un effet inhibiteur directe sur la croissance hyphale des pathogènes fongiques en dégradant leur paroi cellulaire (Compant *et al.*, 2005). et le renforcement des mécanismes de résistance aux maladies (résistance systémique induite). (Figueiredo *et al.*, 2010). Malgré ces mécanismes, les PGPR peuvent également améliorer la croissance et le développement des plantes grâce à leurs enzymes clés (ACC-déaminase, chitinase) et à la production de substances telles que les exopolysaccharides, la rhizobitoxine, etc. qui aident les plantes à résister aux conditions de stress (Ashraf *et al.*, 2004; Glick *et al.*, 2007; Sandhya *et al.*, 2009)

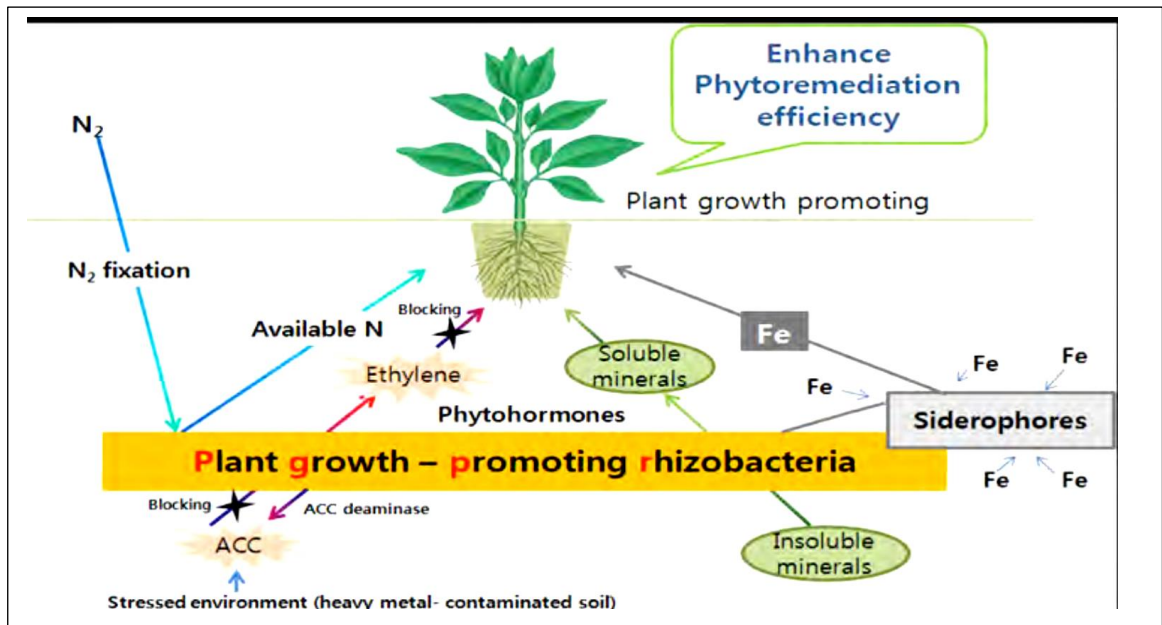


Figure 5 : Les différents mécanismes des PGPR (Mackin, 2007)

La rhizobitoxine est un inhibiteur de la synthèse de l'éthylène qui améliore la nodulation en diluant l'impact négatif d'une concentration élevée d'éthylène (Vijavan *et al.*, 2013). En outre, de nombreuses souches rhizobactériennes peuvent présenter plusieurs caractéristiques et affecter la croissance des plantes par un ou plusieurs de ces mécanismes. L'efficacité de ces souches dépend également de la plante hôte et des caractéristiques du sol. (Gamalero *et al.*, 2010).

#### 8.2.4. Rhizoremediation

L'application des PGPR dans les technologies de rhizoremediation est maintenant considérée comme efficace, car l'inoculation de souches de PGPR pourrait contribuer à une amélioration remarquable de la croissance et le développement des plantes dans des conditions agroclimatiques contaminées. Les rhizobactéries peuvent directement aider à la rhizoremediation par la production de l'IAA, la fixation biologique de l'azote, la solubilisation du phosphore et par la sécrétion des sidérophores (Denton, 2007). Esitken *et al.* (2006) ont rapporté que certaines souches de *Pseudomonas* et *Acinetobacter* améliorent l'absorption de Fe, Zn, Mg, Ca, K et P par les plantes. Les PGPR ainsi que les champignons AM sont maintenant utilisés dans les sols agricoles pauvres en nutriments pour augmenter la solubilité des métaux lourds et par conséquent augmenter les chances de succès de la rhizoremediation. En outre, des recherches sur l'application des souches de PGPR dans la diminution de la biodisponibilité de la toxicité résultant en une meilleure croissance et développement dans les sols contaminés par des métaux lourds par le recyclage des nutriments, le maintien de la structure du sol, détoxification des produits chimiques et contrôle des sont également bien étudiés (Denton, 2007). Des études sur certaines rhizobactéries dans

l'absorption de Ni par *Alyssum murale* ont indiqué que ce groupe de bactéries peut libérer le métal de sa phase non soluble en diminuant le pH de l'environnement (Zhuang *et al.*, 2007).



***II. PARTIE***  
***EXPRIMENTALE***

# ***CHAPITRE I***

## ***MATERIEL & METHODES***

## 1. Description de la zone d'étude :

La raffinerie d'Arzew est considérée comme un important complexe industriel, réalisé dans le cadre du premier plan dans les années 70. Elle occupe une superficie de 150 jusqu'à 170 hectares dans la zone industrielle d'Arzew, sur le plateau d'El Mahgoun, à environ 40 kilomètres d'Oran et 5 km de la mer méditerranée. La raffinerie a été construite dans le cadre du premier plan quinquennal 1970-1973 par un groupe japonais (Société Japonaise JAPAN GASOLINE CORPORATION). (Bouharis, 2005)

La capacité de production de cette raffinerie est de 3,7 millions de tonne par an de pétrole brut et de 120000 tonne de brut réduit importé. Le développement d'une telle industrie s'est fait au détriment de l'environnement (Bouharis, 2005)



**Figure 6:** Arrêt du port pétrolier et gazier d'Arzew (Arezki Benali 2020) <https://www.algerie-eco.com/2020/12/22/arret-du-port-petrolier-et-gazier-darzew-le-ministere-de-lenergie-sexplique/>

## 2. Echantillonnage du sol et des nodules de *Scorpiurus muricatus*

Au cours d'une prospection dans la raffinerie d'Arzew, *Scorpiurus muricatus* poussant d'une manière spontanée a été repérée. es nodules présents sur les racines sont collectés selon la méthode décrite par Vincent (1970) ; Beck *et al.* (1993) et Somasegaran et Hoben (1994). Il s'agit de creuser environ 15 cm autour de la plante et 20 cm de profondeur pour extraire la plante et son système racinaire. Les plantes entières récoltées et conservées dans leur propre sol, sont transportées au laboratoire.

Manuellement, on se débarrasse de la terre au niveau des racines sans toutefois endommager les nodules. Le sol rhizosphérique est conservé à 4°C afin de conserver sa flore microbienne.

Les racines avec leurs nodules sont lavées délicatement des restes de terre à l'eau de robinet et les nodules sont ensuite détachés de leurs points d'attaches.

Les nodules sont conservés par dessiccation en suivant le protocole décrit par Vincent (1970) ; Beck *et al.* (1993); Somasegaran et Hoben (1994). Des tubes à hémolyse sont remplis de CaCl<sub>2</sub> qui permet une absorption de l'humidité, suivi par une couche de coton sur laquelle sont déposés les nodules. Les tubes bien fermés sont conservés à 4 °C après avoir mentionné le nom de la plante, date et lieu de collecte et la date de mise en conservation.

Au cours de l'échantillonnage un homogénats de sol est préparé à partir d'échantillons récupérés à 30 cm de profondeur à 5 points sélectionnés au hasard. Le composite préparé fera l'objet d'une analyse physicochimique.

### **3. Analyse physico-chimique du sol.**

#### **3.1. Analyse physique**

##### *Analyse granulométrique*

L'analyse granulométrique à la pipette de Robinson permet de connaître sous forme pondérale, la répartition des particules minérales de moins de 2 mm de diamètre selon des classes de grosseur. C'est une opération qui nécessite la dissociation complète des particules de l'échantillon du sol. Elle est fondée sur la relation existante entre la taille des particules et les propriétés physiques de la suspension du sol. En effet, selon la loi de Stocke, plus une particule est grosse plus vite elle tombe dans l'eau. Pour les particules de diamètre inférieur à 50 µm, des prélèvements à différents intervalles de temps permettent de récupérer les particules restantes en solution (Pansu et Gautheyrou, 2003). Les fractions des particules de diamètre supérieur à 50 µm sont déterminées par tamisage, après lavage des fractions fines déterminées par sédimentation (Pansu et Gautheyrou, 2003). La texture du sol est définie à l'aide du triangle des textures (Annexe 1).

##### *Mesure du pH*

La mesure du pH est réalisée selon la méthode de Callot-Dupuis (1980). Vingt gramme de terre fine (séchés à l'air) sont ajoutés à 50 ml d'eau distillée, le contenu est agité pendant quelques minutes à l'aide d'un agitateur magnétique, puis laisser reposer pendant 24 h. Avant de procéder à la mesure du pH, le pH mètre est étalonné puis la terre est remise en suspension à l'aide d'un agitateur. Le classement de sol par rapport à son pH a été fait selon les normes internationales (Annexe 1).

### 3.2. Analyse chimique

#### *La mesure de la conductivité électrique*

La conductivité électrique d'un sol renseigne sur sa salinité, elle est mesurée selon la méthode d'Aubert (1978). Le principe de cette méthode consiste à déterminer la conductivité électrique (CE) de l'eau pour déterminer la salinité de l'extrait du sol. Elle est effectuée en mélangeant 1/5 du sol avec 4/5 d'eau distillée. Après une agitation de quelques minutes, la solution est chauffée à une température **T** (25 °C). Une première lecture est réalisée à cette température, puis chauffée à une température **T'** (35 °C). Une deuxième lecture est réalisée avec le conductivimètre (**CT'**). Le coefficient de température **B** est calculé par l'équation suivante:

$$B = (CT' - CT) \times 100 / (T' - T) \times CT$$

Le conductivimètre (EC 215) est réglé à la valeur **B** et la mesure de la C.E est effectuée ; cette dernière s'exprime en milli Siemens (mS). Le degré de la salinité du sol est évalué en se référant aux normes internationales (annexe 1).

#### *Le dosage du calcaire total*

Le calcaire n'est pas un constituant toujours présent dans le sol, par contre pratiquement tous les sols contiennent du calcium si peu soit-il. Cet élément se trouve en particulier fixé sur l'argile sous forme d'ion calcique ou en solution sous forme de sels solubles de calcium. Le calcaire ou carbonate de calcium, CaCO<sub>3</sub>, est un sel insoluble. Mais l'eau chargée de gaz carbonique peut le dissoudre lentement le transformant en un sel soluble, le bicarbonate de calcium. C'est ainsi que peu à peu le calcaire disparaît d'un sol donné. Mais la solution du sol, et l'argile gardent très longtemps du calcium provenant de la dissolution du calcaire. Le principe de la méthode de détermination du calcaire total de Callot-Dupuis (1980) (Annexe 1) repose sur la capacité de l'acide chlorhydrique à détruire le calcaire en générant du CO<sub>2</sub> selon la réaction suivante:



Le volume du CO<sub>2</sub> mesuré sous conditions contrôlées de température et de pression est proportionnel à la quantité de calcaire total renfermée dans l'échantillon du sol.

#### *Le dosage du calcaire actif*

Dans le sol, une partie plus ou moins importante de calcaire total se trouve à l'état de fines particules actives pour les végétaux, cette fraction est facilement solubilisée par les eaux riches en gaz carbonique. On utilise la propriété du calcium se combinant aux oxalates d'ammonium pour

donner de l'oxalate de calcium insoluble, pour le dosage du calcaire actif. L'excès de solution d'oxalate d'ammonium est ensuite dosé par une solution de permanganate de potassium en milieu sulfurique (Drouineau, 1942).



La teneur en calcaire actif exprimée en % est obtenue à partir de la formule suivante :

$$\text{Calcaire actif \%} = (\text{N}-\text{n}) \times 1.25$$

**N-n**: correspond à la quantité d'oxalate de calcium précipitée, donc à la quantité d'oxalate d'ammonium qui a réagi avec le calcaire actif.

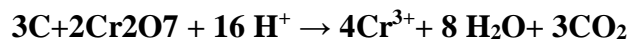
**N**: nombre de ml  $\text{KMnO}_4$  utilisés pour titrer la solution d'oxalate d'ammonium.

**n**: nombre de ml  $\text{KMnO}_4$  utilisés pour titrer l'extrait du sol

### *Le dosage du carbone et détermination du taux de la matière organique*

Le carbone est déterminé par la méthode d'Anne (1945). Cette méthode nécessite deux étapes principales : l'oxydation et la titration.

Lors de la première étape, le carbone organique est oxydé en présence d'un excès de bichromate et la réaction est réalisée dans un milieu fortement acidifié par l'utilisation de l'acide sulfurique.



On considère que la quantité de bichromate réduite est proportionnelle à la quantité de carbone contenue dans l'échantillon de sol.

L'excès de bichromate non réduit est titré par un agent réducteur, le sel de Mohr. La titration est réalisée en présence d'agent fixant, le fluorure de sodium, et d'un indicateur coloré du pH.

La teneur en matière organique totale du sol, s'obtient généralement en dosant la teneur en carbone.

On estime que le rapport matière organique / carbone est à peu près constant et égal à  $\text{MO/C} = 1,72$ .

### *Le dosage de l'azote*

La détermination de l'azote total des échantillons de sol prélevés a été effectuée par la méthode de Kjeldahl (1883), cette méthode se déroule en deux étapes, la minéralisation et la titration.

La minéralisation consiste en la transformation de l'azote organique en une forme minérale (des sulfates d'ammonium). La réaction est réalisée dans un milieu à forte concentration en acide sulfurique et en présence d'un catalyseur, le  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , qui permet l'augmentation et la stabilisation de la température de la réaction.

Pour la titration, le milieu réactionnel est alcalinisé par l'addition de l'hydroxyde de sodium, la solution obtenue est distillée et l'ammonium entraîné par la vapeur est condensé puis collecté dans une solution d'acide borique additionnée de quelques gouttes d'un indicateur coloré. La solution résultante est enfin titrée par une solution d'acide sulfurique.

#### ***Le dosage du phosphore***

La détermination du phosphore est réalisée par la méthode de Duchaufour (1970). Dans le sol, le phosphore assimilable se trouve essentiellement sous forme de phosphate de calcium. Les phosphates de calcium sont extraits par une solution d'acide à faible concentration. En milieu acide, les phosphates donnent de l'acide phosphorique. Ce dernier en présence de molybdate d'ammonium et en milieu acide forme des complexes phosphomolybdique. Ces complexes ont la particularité d'être réduits par une solution de chlorure stanneux ; ils sont alors transformés en bleu de molybdène. En mesurant l'intensité de la coloration et en se référant à une courbe étalon, on détermine la concentration en acide phosphorique.

#### ***Le rapport C : N : P***

Le rapport C : N : P est déterminé en considérant la concentration de CO<sub>tot</sub> obtenue comme 100 % est en déterminant le pourcentage de N<sub>tot</sub> et de P<sub>tot</sub> comme suite :

Rapport 100 : X : Y

X = Concentration N<sub>tot</sub> x 100 / concentration de CO<sub>tot</sub>

Y = Concentration P<sub>tot</sub> x 100 / concentration de CO<sub>tot</sub>

#### ***Dosage des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT)***

Le dosage des HPT est effectué par la méthode gravimétrique (Mishra *et al.*, 2004), qui est une méthode quantitative basée sur la détermination de la masse d'un composé. Une étape d'extraction est réalisée, les hydrocarbures pétroliers totaux sont extraits consécutivement avec de l'hexane, du chlorure de méthylène et du chloroforme. Les trois extraits sont rassemblés et séchés à température ambiante par évaporation de solvants sous un léger courant d'azote dans une hotte. Après évaporation du solvant, la quantité des HPT résiduel est pesée et la masse obtenue donne directement la teneur en hydrocarbures totaux.

#### **4. Isolement et sélection des isolats bactériens associés à *Scorpiurus muricatus***

##### **4.1. Isolement à partir des nodules :**

###### **4.1.1. Désinfection**

Les nodules conservés sont réhydratés dans de l'eau distillée stérile pendant 1h. Ensuite sont désinfectés en surface par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium Ca ClO à 3 % (m/v) pendant 3 minutes, puis abondamment rincés (10 fois) à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de désinfectant. L'eau de la dernière eau de rinçage est ensemencée sur milieu YMA, pour s'assurer de l'innocuité du protocole de désinfection.

###### **4.1.2. Ecrasement et purification**

L'isolement est effectué selon la méthode de Vincent (1970) chaque nodule est écrasé aseptiquement dans un eppendorf contenant deux gouttes d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile. Une goutte du broyat nodulaire est ensemencée sur boîte de Petri contenant du YMA (Yeast Mannitol Agar) (Annexe2). Les boîtes sont incubées à 28 °C et le temps de croissance des cultures est noté. Les colonies bien isolées sont repiquées sur milieu YMA et incubées à 28 °C pendant 4 à 7 jours. Cette opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

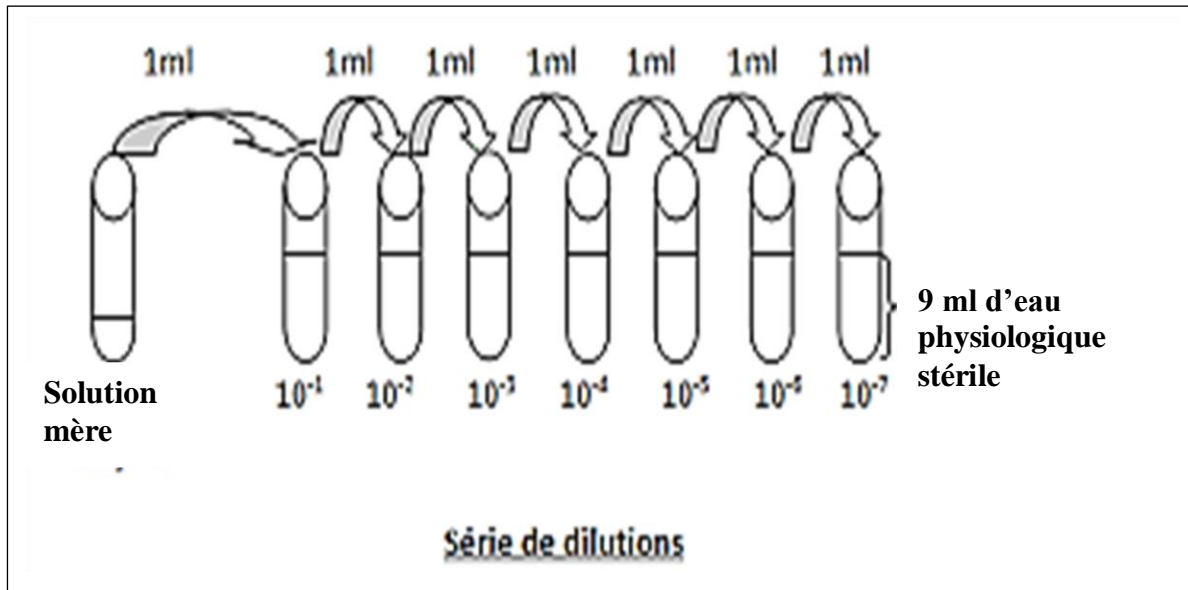
##### **4.2. Isolement à partir de rhizosphère :**

Dans l'objectif d'isoler les bactéries rhizosphérique capables de dégrader les hydrocarbures présente dans les échantillons de sol pollué par le pétrole, une série de dilutions décimales est réalisée (**figure 7**)

###### **4.2.1. Dilution et ensemencement**

Dix gramme de sol est mis en suspension dans 90 ml d'eau physiologique stérile. Puis agité pendant 1heure. à partir de cette solution mère, un volume de 1ml est prélevé et dilué au 1/10 dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 0,9%). De la même manière, à partir de cette dilution, une série de dilutions au 1/10 est effectuée jusque  $10^{-7}$ . 100 µl de chaque dilution est étalée sur boîtes contenant le milieu Gélose Nutritive (GN) (Annexe 5). Les boîtes ensemencées ont été incubées à 30°C pendant 6jour. Un comptage est réalisé sur chacune de ces boîtes et le résultat est exprimer en UFC/ml.





**Figure7 :** Schématisation de la méthode de dilution de l'échantillon du sol dans l'eau physiologique stérile.

#### **4.2.2. Purification des isolats**

Après 6 jours d'incubation à 30 °C, les colonies ayant poussées sont purifiées sur gélose nutritive par technique d'épuisement. L'incubation est prolongée pour permettre la croissance des bactéries à croissance lente.

Les boîtes sont examinées à un intervalle de temps régulier et les éventuelles nouvelles colonies sont purifiées.

### **5. Etude morphologies des isolats**

#### **5.1. Etude macroscopique :**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les boîtes contenant des cultures bactériennes pures sont soigneusement observées à l'aide d'une loupe binoculaire pour permettre de révéler la couleur, la forme, la taille, le contour et la viscosité (Dommergues et Mangenot, 1970).

#### **5.2. Etude microscopique :**

La pureté des isolats est vérifiée sous microscope optique après coloration de Gram (annexe 3). C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

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

(Gram -), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram +). (Marchal et Bourdon, 1982).

## **6. Conservation des souches**

Les colonies pures sont repiquées sur le milieu incliné et incubées à 28°C pendant 48 à 72h. Les tubes sont placés à 4°C pour une conservation de courte durée.

Pour une conservation de longue durée, Les cultures jeunes sont conservées dans du glycérol 60% (V/V) à -20 °C.

## **7. Sélection des souches capables de dégrader les hydrocarbures :**

### **7.1.Détermination du potentiel de biodégradation bactérienne sur milieu solide (MSM agar)**

La capacité des souches à dégrader les hydrocarbures est testée sur milieu minimum à base de sels minéraux (MSM), (annexe 4) additionné de pétrole comme source de carbone. Selon le protocole suivant :

- ✓ Lancer une culture liquide des souches isolées et purifiées, dans du YEM liquide pour les souches nodulaire et dans du bouillon nutritif des souches rhizosphérique
- ✓ Incuber les cultures à 30°C pendant 24 h
- ✓ A partir de ces culture liquides, faire une centrifugation à 3000t/ min pendant 10minutes
- ✓ Récupérer les culots
- ✓ Laver les culots avec MSM (mineral salt medium) puis centrifuger la solution lavée et récupérer les culots (il faut refaire cette opération 4 à 5 fois pour s'assurer de l'élimination complète de toute source de carbone dans les cultures)
- ✓ préparer MSM solide, le couler dans des boites préalablement numérotées et les laisser solidifier
- ✓ Après solidification de la gélose, étaler 100 µl de pétrole filtré sur la surface des boites puis laisser sécher devant le bec benzène 3heures de temps
- ✓ Etaler 100µl de chaque suspension bactérienne sur les boites puis les incuber à l'abri de la lumière à 30°C pendent 7jours
- ✓ Faire la lecture des boites tous les jours

### **7.2.Détermination du potentiel de biodégradation bactérienne par turbidimétrie (milieu liquide)**

La turbidimétrie est utilisé pour déterminer la croissance bactérienne en présence hydrocarbures (Pétrole) utilisés comme sources de carbone à 1% (p/v) dans le milieu MSM à incubées à 30°C en agitation (200rpm) pendant 2 semaines. La consommation des hydrocarbures est indiquée par

la variation de la turbidité. En effet, la densité optique (DO) à 600 nm est mesurée à des intervalles réguliers de 2 jours pendant la période d'incubation.

## **8. Evaluation de la capacité des souches à améliorer la croissance de *Scorpiurus muricatus***

:

Une des caractéristiques des bactéries vivant dans les nodules et la rhizosphère est l'amélioration de la croissance de leur plante hôte. La capacité des souches isolées à améliorer la croissance de *Scorpiurus muricatus* cultivé est évaluée sur sol stérile contaminé par les hydrocarbures.

### **8.1. Germination des graines**

Les graines de *Scorpiurus muricatus* ont été scarifiées par la méthode chimique ; elles ont été immergées 40 minutes dans l'acide sulfurique concentré (95%), puis rincées avec de l'eau distillée stérile 10 à 15 fois pour éliminer toute trace d'acide. Les graines sont laissées s'imbiber dans la dernière eau de rinçage pendant 2h. Les graines ainsi prétraitées sont transférées en boîte de Pétri, sur eau gélosée à 1% (Tillard et Drevon, 1988) (annexe 2), et incubées à l'obscurité à 25°C pendant 36 heures.

### **8.2. Mise en pots des plantules et inoculation**

Les graines germées sont transférées dans des pots remplies de 200g de sable stérilisé deux fois à 120°C pendant 1heure avec un intervalle de 24 heures. Puis mélangé avec 40g de pétrole. Les jeunes plantules de *S. muricatus* (âgés de 3 jours) sont inoculés avec 1ml de culture bactérienne en phase exponentielle ( $1,5 \times 10^8$  cellules/ml) et les plantes sont arrosées avec l'eau distillée stérile en plus de la solution nutritive pour plante dépourvue d'azote (Bertrand, 1997). Trois répétitions sont effectuées pour chaque souche. Des témoins négatifs non inoculés sont aussi considérés.

Après deux mois de culture, les plantes sont déterrées puis séchées à 60°C pendant 3jours, ensuite pesés afin de comparer le poids sec des plantes inoculées avec les témoins non inoculés

## ***CHAPITRE II***

# ***ANALYSE DES TRAVAUX ANTERIEURS***

Dans cette partie nous allons comparer les résultats de travaux de plusieurs auteurs qui se sont intéressés à l'étude et la diversité des microorganismes capable de dégrader les hydrocarbures dans la raffinerie d'Arzew et d'autres zones contaminées par les hydrocarbures.

Le travail de Sekkour (2019) s'est porté sur l'analyse des caractéristiques physicochimique du sol nu et de la boue de la raffinerie d'Arzew, l'isolement, le dénombrement et l'identification des bactéries capables de dégrader les hydrocarbures à partir de cette zone en employant des méthodes classique ainsi que la métagénomique.

Dans le travail de Dilmi (2019), Quinze échantillons du sol contaminé par les hydrocarbures pétrolier sont prélevés de la raffinerie, et ont fait l'objet d'une analyse physico-chimique. Puis ont permis à effectuer un dénombrement de la flore bactérienne du site contaminé. La sélection et l'identification des bactéries capable de dégrader les hydrocarbures étaient parmi les objectifs de cette étude.

Benchouk (2017) s'est aussi intéressée à évaluer les capacités de biodégradation du pétrole et du diesel par les souches microbiennes isolées par la technique d'enrichissement à partir des sols contaminés provenant de la raffinerie d'Arzew (Algérie)

Contrairement aux études précédentes, Benkherfia (2020), a effectué une étude comparative des propriétés physicochimique du sol contaminé artificiellement par le pétrole à 5% avant et après la culture de légumineuses. Un sol non contaminé a servi de témoin pour cette étude.

## **1. Analyse physicochimique du sol**

En général, la contamination par les hydrocarbures peut affecter les propriétés physiques et chimiques du sol et peut perturber de ce fait la vie et l'activité microbienne du sol (Obire et Nwaubeta, 2002).

### **1.1.Granulométrie**

Les paramètres physico-chimiques de 15 échantillons du sol de la raffinerie d'Arzew montrent que le sable et le limon sont des fractions prédominantes.

Les propriétés physiques d'un sol influencent sa capacité à recycler les nutriments, à retenir l'eau et à agir comme un filtre environnemental (Shober, 2008). La texture du sol influence fortement la disponibilité en eau (Zaiad, 2010). Selon Boudershem *et al.* (2016) et Greer *et al.* (1998), la texture sableuse et limoneuse facilite la circulation des fluides ; qui contiennent des nutriments et de l'oxygène accessibles aux microorganismes si le milieu est perméable. Dans un autre travail réalisé par Kogbara *et al.* (2015) qui ont étudié les effets de différentes textures de sol sur la dégradation des hydrocarbures pétroliers, et ils ont constaté que le sol sableux avait la plus forte,

tandis que le sol argileux avait la plus faible réduction de la teneur totale en hydrocarbures (THC). Cependant, l'augmentation de la teneur en argile a diminué le taux de réduction du THC, alors qu'une meilleure aération des textures grossières du sol (sable et sable limoneux) augmenterait la survie microbienne par rapport aux textures fines du sol (argile limoneuse et argile) car l'oxygène est un nutriment limitant dans les sols contaminés par le pétrole (Kogbara *et al.*, 2015). Liu *et al.* (2017) ont rapporté que la dégradation totale des hydrocarbures pétroliers dans le sable présentait la plus grande minéralisation microbienne, tandis que la biodégradation des hydrocarbures pétroliers était négativement corrélée avec la teneur en argile.

### **1.2.pH**

Selon Sekkour *et al.* (2019), le pH des sols contaminés par le pétrole (A et B) tend vers la neutralité. Ce qui est en accord avec les résultats de Dilmi (2019) où il a noté que les 15 échantillons de sol étudiés ont un pH neutre à alcalin. Benchouk (2017) a reporté que le pH du sol de la raffinerie d'Arzew est alcalin (7,78). D'après benkherfia (2020), le pH des sols contaminés cultivés par les légumineuses est inférieur au pH du sol témoin non contaminé, Selon Morel (1990) in (Mekerri et Tazeboudjt ,2017) le pH du sol est modifié par la présence de racines vivantes et dépend de la plante et de son environnement physico-chimique.

Le pH du sol est important car la plupart des espèces microbiennes ne peuvent survivre que dans une certaine gamme de pH. En effet, la majorité des bactéries hétérotrophes préfèrent un pH presque neutre (Atlas, 1988). C'est le cas des constatations faites par Leahy et Colwell (1990) et Salleh *et al.* (2003), qui ont révélé que le taux de biodégradation est plus élevé lorsque le pH est proche de la neutralité, c'est ce qui a été démontré aussi par Wang et al. (2011), un pH de 7 est optimal pour une meilleure dégradation du pétrole brut par un consortium de souches de *Pseudomonas*. D'autre part, Dolon et Bauder (2011) ont signalé que la plage acceptable pour la biodégradation des hydrocarbures pétroliers est de pH 6 à 8 avec un optimum de pH 7. Cependant, Joutey *et al.* (2013) ont considéré que la biodégradation peut se produire dans une large gamme de pH allant jusqu'au pH 8,5 dans la plupart des systèmes aquatiques et terrestres. Toutefois, le pH optimum considéré pour la minéralisation des boues pétrolières est compris dans la marge de 5,0 à 7,8 (Dibble et Bartha, 1979).

### **1.3.Humidité, salinité et taux du calcaire**

Les analyses du sol nu de la raffinerie d'Arzew faites par sekkour (2019) ont montré qu'il y a un faible taux d'humidité (2,58)%. Cependant, D'après Benkherfia (2020) le sol contaminé cultivé avec des légumineuses présente un taux d'humidité meilleurs que le sol non cultivé. Susarla et al. (2002) confirment que les plantes jouent un rôle important dans la régulation de l'eau contenu dans le sol.

La présence d'eau dans le sol est essentielle à la biodégradation puisqu'elle permet aux microorganismes de se mouvoir à travers la macro agrégat des sols et d'activer les processus métaboliques de ceux-ci. L'eau permet également à l'hydrocarbure aromatique polycyclique de se solubiliser relativement, leur permettant de passer de la phase liquide de sol pour ainsi devenir accessible aux microorganismes (Benyahia et Mahdaoui, 2012).

La salinité globale du sol peut être exprimée par la conductivité électrique (CE) déterminée sur l'extrait de pâte saturée, les résultats des travaux de Benchouk (2017) montrent que le sol prélevé est non salé (CE =0.095 ds/m) d'après l'échelle de la salinité (Richard *et al.*, 1954 ), ce résultat est aussi confirmé par Dilmi (2019).

Benchouk (2017) a rapporté que le sol de la raffinerie est faiblement calcaire (calcaire total 5.94 %), contrairement aux résultats de Dilmi (2019) où il a signalé que la majorité des échantillons de sol sont fortement calcaires

#### **1.4.Les concentrations en HPT**

Tous les travaux analysés ont indiqué que les sols de la raffinerie d'Arzew sont contaminés par les hydrocarbures. En effet, Les résultats obtenus par Sekkour (2019) et dilmi (2019) montrent les concentrations en HPT de sol, varient de 0,3 à 86 g/kg et sont supérieurs à la valeur citée par la norme **utch** (0,1 g d'hydrocarbures/kg de sol) (Akmoussi-Toumi, 2009). Ces résultats confirment que ces échantillons de sols sont fortement pollués par des composés hydrocarbonés. Cette pollution, qui peut être attribuée aux déversements d'hydrocarbures, se produit lors du raffinage, du transport et du stockage du pétrole. Les facteurs environnementaux du sol étaient les facteurs les plus dominants de la distribution et de l'abondance des communautés bactériennes (Zhang *et al.*, 2018).

#### **1.5.Les éléments minéraux (P, N, C) et matière Organique**

Le sol doit contenir une concentration adéquate de tous les éléments minéraux nécessaires à l'activité microbienne ; ceux-ci comprennent le phosphore, le sulfate, l'azote, le potassium, le calcium et l'oxygène dans des conditions de dégradation aérobie. Pour le taux optimal de dégradation microbienne, la concentration du carbone biodégradable et du phosphore et de l'azote assimilables doit donner le rapport (C:P:N) de 100:1:5. (Cabridenc, 1985). Le phosphore est l'un des macronutriments essentiels au métabolisme et à la croissance des plantes (Wagh *et al.*, 2013). Les concentrations en phosphore et en azote des échantillons de sol analysés par Dilmi (2019) sont élevées. Ceci est confirmé par es travaux de Benchouk (2017) et Sekkour (2019). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Akpoveta *et al.* (2011) qui ont aussi noté une augmentation de la teneur en azote total et en phosphore total des sols lorsque ces derniers sont

soumis à une contamination au pétrole. Ils justifient leurs résultats par le fait que le pétrole brut contenait une teneur élevée en azote et en phosphore

Benkherfia (2020) a constaté que le sol contaminé nu ou cultivé est riche en matière organique contrairement à Dilmi (2019) qui a indiqué que les sols sont limités dans leur matière organique.

La plus part des travaux antérieurs ont déjà signalé la richesse des sols contaminés par les hydrocarbures en matière organique. Cela est dû à la présence des hydrocarbures ce qui a été confirmé par Solano et *al.* (2001) ; notent un enrichissement en matière organique des sols contaminés en hydrocarbures. Ils Rapportent que les produits pétroliers et leurs dérivés constituent les principaux polluants organiques des sols. Ces résultats concordent avec ceux de Mekerri et tzeboudjt (2017) et Dali et Iddir (2018), qui ont constaté une teneur en matière organique très importante à la source de la pollution. Ekundayo et Obuekwe (2000) et Wang *et al.* (2010) ont rapporté dans leurs travaux que la contamination par les hydrocarbures augmente considérablement le carbone organique total

## **2. Dénombrement des bactéries vivant dans la rhizosphère de *Scorpiurus muricatus* poussant dans le sol contaminé de la raffinerie d'Arzew :**

Bien que le dénombrement microbien ne reflète pas directement l'activité des microorganismes dans les sols, il fournit néanmoins une indication sur la vitalité microbienne et/ou le potentiel de biodégradation dans un sol contaminé par le pétrole en mesurant la capacité de croissance microbienne du sol (Bossert et Compeau, 1995).

Les dilutions des échantillons du sol ensemencés sur gélose nutritive permettent de quantifier la microflore bactérienne vivant dans le sol contaminée de la raffinerie d'Arzew. Les résultats de Dilmi (2019) montrent que le dénombrement bactérien variait de  $1.6 \times 10^5$  à  $1.4 \times 10^8$  UFC/g de sol. Sekkour a rapporté que le dénombrement bactérien variait de  $2 \times 10^5$  à  $6 \times 10^5$  UFC/g de sol. Indiquant un nombre élevé de bactéries dans les sols contaminés par les hydrocarbures par rapport aux sols non contaminés. Toute fois ces valeurs correspondent seulement à la microflore du sol nu contaminé et non de ceux de la rhizosphère de *Scorpiurus muricatus*. A notre connaissance aucune étude n'a été effectuée jusqu'à ce jour sur ce sujet.

## **3. Isolement et sélection des isolats bactériens associés à *Scorpiurus muricatus* à partir des nodules :**

Peu de travaux ont mis en évidence les bactéries nodulaires de *Scorpiurus muricatus*. Bouchiba (2018) a signalé que les bactéries isolées à partir des nodules de *Scorpiurus muricatus* forment sur YMA des colonies blanchâtre à crème, opaque ou d'aspect marbré, n'absorbe pas le rouge Cogo et dont la mucosité varie selon les souches. L'observation microscopique des souches a montré



qu'elles possèdent des parois à Gram-négatif, en forme de coccobacilles. Ces caractéristiques sont en accord avec celles des rhizobia, décrites par Mangenot (1970).

L'étude moléculaire a révélé que les nodules de *Scorpiurus muricatus* peuvent loger des espèces appartenant à 4 genres différents : *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Starkeya* et *Pseudomonas*.

**à partir de la rhizosphère :**

Comme il a été indiqué précédemment aucune étude ne s'est intéressée aux bactéries rhizosphériques de *Scorpiurus muricatus*. Mais ici on va évoquer la diversité des bactéries présentes dans le sol de la raffinerie d'Arzew contaminé par les hydrocarbures, en se basant des travaux antérieurs sur ce sujet.

Sekkour (2019), indique que les colonies formées par ces isolats sur les différents milieux étudiés présentent une grande diversité macroscopique (petite colonie ou des colonies de taille moyenne, à contour régulier ou irrégulier, non pigmentée ou avec différents pigments rose, jaune ou orange, opaque ou translucide, visqueuses...)

**4. Sélection des Bactéries déprédatrice de pétrole :**

La sélection est effectuée sur boîte et par turbidité sur milieu minimum additionné de pétrole. Plusieurs genres bactériens ont présenté leur capacité à dégrader le pétrole.

Guermouche m'rassi (2014) ; Benchouk (2017) ; Dilmi (2019) ; Sekkour (2019) ont démontré que les espèces *Sinorhizobium americanum*, *Sinorhizobium saheli*, *Promicromonospora kroppenstedtii*, *Starkeya novella*, *Ancylobacter sp.*, *Methylosinus trichosporium*, *Methylopila sp.*, *Ancylobacter rudongensis*, *Roseomonas stagnii*, *R. gilardi*, *R. aerilata* possèdent les gènes de dégradation des hydrocarbures

Benchouk (2017) Les souches isolées ont été identifiées comme *Candida sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*

Dilmi (2019), Les isolats ont été par la suite identifiés comme appartenant aux genres et /ou espèces suivants : *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. subtilis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Lysinibacillus macroides*, *P. fluorescens*, *Staphylococcus hominis* et *Lysinibacillus sphaericus*

Toutes ces études montrent la grande diversité des bactéries capable de dégrader les hydrocarbures présents dans le sol de la raffinerie d'Arzew.

**5. Evaluation de la capacité des souches à améliorer la croissance de *Scorpiurus muricatus* :**

De nombreuses expériences en pot et essais sur le terrain ont rapporté le succès de l'élimination totale des hydrocarbures pétroliers en utilisant des inoculum de PGPR en association avec des plantes tolérantes (Agarry *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2013). L'inoculation est une approche commune utilisée pour la remédiation des environnements contaminés, ce qui a donné lieu à des conclusions variables et contradictoires (Thompson *et al.*, 2005). La survie des PGPR introduits et les modifications ultérieures de la structure de la communauté microbienne associée à la rhizosphère sont considérées comme des facteurs clés pour une phytoremédiation réussie (Agarry *et al.*, 2013). Peu de travaux sont effectués sur l'inoculation de *Scorpiurus muricatus* ; Bouchiba (2018) a rapporté que l'inoculation *in vitro* de cette plante avec les bactéries nodulaire, améliore sa croissance malgré l'absence du phénomène de nodulation

La co-inoculation des légumineuses avec les rhizobia et les bactéries rhizosphérique peut favoriser la croissance des plantes ; par l'amélioration de la nodulation et le rendement de la culture et la résistance comme c'est le cas de la co-inoculation du haricot avec *Rhizobium* sp. et *Pseudomonas* sp. isolées des nodules de cette plantes (Colás Sánchez *et al.*, 2014).

De Souza *et al.* (2015) ont rapporté que Les PGPB sont de bons candidats à l'inoculation car ils colonisent les racines et créent un environnement favorable au développement végétal et permettent la stimulation de la croissance des plantes en condition de stress

Les résultats de Dagher (2022) montrés que les plantes ont considérablement influencé la structure des communautés microbiennes dans les sédiments contaminés par les hydrocarbures pétroliers. De plus, l'identité des espèces végétales a eu un impact significatif sur la structure du microbiome de la rhizosphère, soulignant l'importance de la sélection des plantes dans les stratégies de phytoremédiation par la création de nouvelles niches permettant aux organismes introduits de se développer.

## *Conclusion & perspectives*

La pollution due aux hydrocarbures pétroliers est un problème environnemental crucial. Les micro-organismes indigènes jouent un rôle important dans la biodégradation du pétrole et des produits dérivés du pétrole.

La présente étude avait pour but d'isoler et d'évaluer la capacité des bactéries associées à *Scorpiurus muricatus* à dégrader les hydrocarbures de la raffinerie d'Arzew.

Les travaux précédents sur les caractéristiques physicochimiques du sol permettent de conclure que le sol de la raffinerie d'Arzew est d'une texture sablo-lieuse, à pH légèrement alcalin ; non salin ; peu humide ; faiblement calcaire ; riche en matière organique, en Azote et en phosphore.

Le dénombrement effectué par plusieurs auteurs sur la raffinerie d'Arzew, démontre que le sol rhizosphérique est riche en flore microbienne. Les études macroscopique et microscopique des isolats nodulaires et la rhizosphérique associés à *Scorpiurus muricatus* a mis en évidence la grande diversité et l'hétérogénéité des isolats

La culture des isolats sur milieu minimum additionné de pétrole permet la sélection de souches capables de dégrader les hydrocarbures. Plusieurs études ont signalé la grande diversité des bactéries responsables de la biodégradation. Cependant il est important de définir la voie et les gènes responsables de cette dégradation

L'inoculation de *Scorpiurus muricatus* cultivé sur sol contaminé avec les bactéries donne des résultats meilleurs par rapport au témoin non inoculé. Plusieurs études ont rapporté que la plantes sélectionne le consortium bactérien adéquat à son développement. De ce fait, il serait intéressant de procéder à l'identification de ce consortium.

# *Références bibliographiques*

**Abbate V, Maugeri G, Cristaudo A et Gresta F (2010).** Scorpiurus muricatus L. sub sp. subvillosus (L.) Thell, a potential forage legume species for a Mediterranean environment: a review. *Grass and Forage Science*, 65, 2–10.

**ABDELGUERFI BDELGUERFI A ; ABDELGUERFI BDELGUERFI-BERREKIA ERREKIA R. (1989).** Reflections on the value of some forage species adapted To the arid and semi-arid zones. *Annales de l'Institut National Agronomique, El Harrach, Algeria*, 11, 10.

**Abdelguerfi, A., et Laouar M. (1999) .**Auto écologie et variabilité de quelques Légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région.

**Agarry. S, Ogunleye. O. (2012).** Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy.2012.

**Anne P (1945).** Le dosage rapide du carbone organique dans les sols *Ann Agron* Avril, Mai, Juin, 1945, 5 ème année, no 2 : 161-172.

**Antoun, H and D. Prevost, (2006).** Ecology of plant growth Promoting rhizobacteria. In ed. Siddiqui, Z.A.) *PGPR : Biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, 1–38.

**Arora NK, Kang SC, Maheshwari DK. (2001)** Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* That causes charcoal rot of groundnut. *Curr Sci* 2001 ; 81 :673–7.

**Ashraf M, Berge SH, Mahmood OT. (2004).** Inoculating wheat seedling with exopolysaccharideproducing Bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt Stress. *Biol Fertil Soils* 2004 ;40 :157–62.

**Atlas, R. M. (1988).** Biodegradation of hydrocarbons in the environment. In *Environmental biotechnology* (pp. 211-222). Springer, Boston, MA.

**Aubert G (1978).** Méthode d'analyse des sols, CRDP Marseille, 189 p.

**Bandara, U. C., Yapa, P. D., & Xie, H. (2011).** Fate and transport of oil in sediment laden marine waters. *Journal of Hydro-environment Research*, 5(3), 145-156.

**BEALE LE P.E., LAHLOU LOU A ;BOUNEJMATE OUNE ATE M. (1991)** Distribution of wild annual legume species in Morocco and relationship with soil and climatic factor. *Australian Journal of Agricultural Research*, 42, 1217–1230.

**Beck DP, Materon LA, Afandi F (1993).** Paractical *Rhizobium-* Légume. *Technology Manual*. P.290.ICARDA. Syria.

**Beijerinck M (1888).** Die Bacterien der papilionaceenknollchen. *Botanische Zeitung*: 46:797-804.

**Bekki, A., Merabet, C., Ameziane, H., Rezki, M. A., Baba-Hamed, M. B., de Lajudie, P., Ounane SM., et Dreyfus, B. (2006)** Diversité des bactéries nodulantes les légumineuses (BNL) des régions salées et arides d'Algérie. *Biotechnologies végétales*. N°00.INAA Alger Algérie.

**Belimov AA, Safronova VI, Sergeyeva TA, Egorova TN, Matveyeva VA, Tsyganov VE, et al(2001)**. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can J Microbiol* 2001 ;47 :642–52.

**BENCHOUK, A. (2017)**. *Bioremediation des sols pollués de pétrole par les micro- organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir* (Doctoral dissertation, *Advances in Environmental Biology*, 10 (7) July 2016, Pages: 208-215 AENSI Journals. Biodegradation of diesel and isomerate by pseudomonas aeruginosa and Brevibacillus laterosporus isolated from hydrocarbons contaminated soil-BENCHOUK Amina and CHIBANI Abdelwaheb.).

**Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., et Squartini, A. (2004)** Gamma Proteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum. *Syst.Appl. Microbiol.*, 27: 462-468.

**BENJAMIN. D.(2021)**. Application des tensioactifs biosourcés à la remédiation des sols pollués aux hydrocarbures. Génie chimique. Université de Technologie de Compiègne, 2021. Français. ffnNT :2021COMP2605ff. fftel-03284704f

**BENSALEM ENSALEM K., ABDELGUERFI BDELGUERFI A. and ABDELGUERFI-BERREKIA R. (1990)** Relations du genre Scorpiurus L. avec certains facteurs du milieu en Algérie (Distribution of spontaneous Scorpiurus spp. In Algeria according to certain environmental factors). *Fourrages*, 124, 407–419.

**Benselama A. (2015)**. Réhabilitation de la culture du *Lablab purpureus* L. ex sweet et Etudes de son partenaire symbiotique. Thèse de Doctorat en biotechnologie, Université D'Oran ES-Senia, Algérie.133 p.

**Benyahia. N , Mahdaoui.K.( 2012)**. La pollution des sols par les hydrocarbures/ Mémoire d'ingénieur d'état en écologie .2012.

**Bertrand H (1997)**. Stimulation de l'absorption minérale et de la croissance du Colza inoculé Avec des bactéries isolées de son rhizoplan. Université Claude Bernard Lyon. Lyon I : 99.

**Beškoski, V. P., Gojgić-Cvijović, G., Milić, J., Ilić, M., Miletić, S., Šolević, T., & Vrvic,**

**Bhattacharya PN, Jha DK (2012)** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in Agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 28 :1327–1350.

**Bhattacharyya PN, Jha DK. (2012)**. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in Agriculture. *World J Microbiol Biotechnol* 2012 ;28 :1327–50.

**Bock B.,( 2004).**- Index synonymique de la Flore de France sur le site de Tela Botanica, <http://www.tela-botanica.org> [Entrer - Données - Index des plantes].

**Bouchez, M., Blanchet, D., & Vandecasteele, J. P. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 156-164.

**Bouchiba, Z., Boukhatem, Z.F., Ighilhariz, Z., Derkaoui, N., Kerdouh, B., Abdelmoumen, H., Abbas, Y., Missbah El Idrissi, M. & Bekki, A. (2017)** Diversity of nodular bacteria of *Scorpiurus Muricatus* in western Algeria and their impact on plant growth. *Canadian Journal of Microbiology* 63 : 450-463.

**Bouderhem A, Ould EL Hadj KHelil A, DJrarbaoui AN, Aroussi A. 2016.** The Use of Terrestrial Indigenous Bacterial Strains In the Bioremediation of Oil Contaminated Soils. *Advances in Environmental Biology* 10, 259-265.

**BOUDERHEM. A. (2011).** Utilisation des souches bactérienne telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols polluer par les hydrocarbures. Université Kasdi Merbah de Ouargla.

**Boulila, F., Depret, G., Boulila, A., Belhadi, D., Benallaoua, S., Laguerre, G. (2009).** Retama species growing in different ecological-climatic areas of north eastern Algeria Have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the *Bradyrhizobium* genus. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 245–255.

**BURTON. J.C. (1985).** Rhizobium relationships. In : NL Taylor ed, *Clover Science And Technology*. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 161-184.

**Callo G et Dupuis M (1980).** Le calcaire actif des sols et sa signification Dull Afes, 17-26.

**CARPINO, S., MALLIA, S., LA TERRA, S., MELILLI, C., LICITRA, G., ACREE, T. E., BARBANO, D. M. & VAN SOEST, P. J.(2004).** Composition and aroma compounds of Ragusano Cheese : native pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science* 87, 816–830.

**Cartieux FP, Nussaume L, Robaglia C.(2003).** Tales from the underground : molecular plant–Rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ* 2003 ;26 :189–99.

**COLOMBANO, S., V. GUERIN, A. SAADA, D. HIEZ ET H. BOMER. (2008).** Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques - Objectifs, enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. [En ligne]. [http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude\\_de\\_cas\\_TAUW.pdf](http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf) (page consultée le 4 août 2015).



- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A., 2005.** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1685–1693.
- Concha, C., and Doerner, P. (2020)** The impact of the rhizobia–legume symbiosis on host root system architecture. *J Exp Bot* 71(13), 3902–3921.
- Council, N.R.(2003),** *Oil in the sea: inputs, fates and effects*, 2003, National Academies Press, Washington, DC.
- Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W. A., Mejanelle, L., Eisenreich, S. J., & Jones, K.C. (2002).** Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environmental science & technology*, 36(20), 4229-4237.
- Dandie, S.M. Thomas, R.H. Bentham, N.C. McClure. (2004).** Physiological characterization of *Mycobacterium* sp. strain 1B isolated from a bacterial culture able to degrade high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02087.x>.
- Das, S, Chandra.R. (2011).**[intomotoxic effect of silica nanoparticles against \*Sitophilus oryzae\* \(L.\)](#)
- Das.N , Chandran.P. (2010).** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview/ Environmental Biotechnology Division, School of Biosciences and Technology, VIT University, Vellore, Tamil Nadu 632014, India.
- Derylo, M. & A. Skorupska. (1992).** Rhizobial siderophore as an iron source for clover. *Physiol. Plant.* 85 : 549- 553.
- Di Giorgio G, Granzano D, Ruisi P, Amato G et Giambalvo D (2009).** Pheno-Morphological and agronomic diversity among *Scorpiurus muricatus* natural populations Collected in Sicily. *J. Agric. Sci* : 147 :411-422. Doi :10.1017/S0021859609008661.
- DILMI, F. (2019).** Isolation and characterization of oil degrading microorganisms from arzew oil refinery (doctoral dissertation, mekhaldi abdelkader).
- Dolon, D. L., & Bauder, J. (2011).** A general essay on bioremediation of contaminated soil. Montana State University, Bozeman, Mont, USA.
- Dominguez E et Galiano E. F (1974 b).** Revision del genero *Scorpiurus* L. 2. Parte urus L. Systematic part). *Lagasalia*: 4:259-280.
- Dominguez E et Galiano E. F (1974 b).** Revision del genero *Scorpiurus* L. 2. Parte Sistemática (Revision of the genus *Scorpiurus* L. Systematic part). *Lagasalia* : 4 :259-280.

**DOMINGUEZ OMINGUEZ E. and GALIANO E.F. (1974a)** Revisión del género Scorpiurus L. I. Parte experimental (Revision of the genus Scorpiurus L. Experimental part). Lagascalia, 4, 61–84

**Dommergues Y et Mangenot F (1970).** Ecologie Microbienne du Sol. Masson & Cie, Paris.

**Dormer KJ (1945).** On the absence of a plumule in some leguminous seedlings. New Phytologist: 44:25-28.

**Doyle JJ, Luckow MA (2003)** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiol 131 : 900–910.

**Drouineau G (1942).** Dosage rapide du calcaire actif des sols Nouvelles données sur la Répartition et la nature des fractions calcaires Annales Agron, (Nouvelle série). 12 : 44 1- 450.

**Duchaufour P (1970).** Précis de Pédologie Masson, Paris, p 291.

**Durand. A, (2018).** Diversité et caractérisation fonctionnelle des communautés microbiennes inféodées au peuplier et issues d'une friche industrielle enrichie en mercure/ <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01824587>.

**Eddine, A. (n.d.).** Études écologiques et fonctionnelles de symbioses entre rhizobia et Études écologiques et fonctionnelles de symbioses entre rhizobia et légumineuses.

**Ehrman, T. & Cocks, P.S. (1990)** Ecogeography of Annual Legumes in Syria – Distribution Patterns. Journal of Applied Ecology 27 : 578-591.

**EL SHAER, H. M. (1995).** Potential use of cultivated range Plants as animal feed in the Mediterranean coastal zone of Egypt. Cahiers Options Me'diterrane'ennes 12, 151–154.

**Erikson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W. (2003).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. Appl. Environ. Microbiol. 69(1) : 275-284.

**Figueiredo MVB, Seldin L, de Araujo FF, Mariano RLR (2010)** Plant growth promoting Rhizobacteria : fundamentals and applications. In : Maheshwari DK (ed) Plant growth and health Promoting bacteria. Doi :10.1007/978-3-642-13612-2\_2.

**FINGAS, M. (2015).** Handbook of Oil Spill Science and Technology. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781118989982>

**Fingas, M., & Brown, C. (2013).** Oil spill remote sensing. In *Earth system monitoring* (pp.337-388). Springer, New York, NY.

**Fitzpatrick, F. A., Boufadel, M. C., Johnson, R., Lee, K. W., Graan, T. P., Bejarano, A.C., ... & Hamilton, S. K. (2015).** *Oil-particle interactions and submergence from crude oil spills*

*in marine and freshwater environments: review of the science and future research needs* (No. 2015-1076). US Geological Survey.

**Frank B (1889).** Über die Pilzsymbiose der Leguminosen, Ber. Dtsch. Bot. Ges : 7 :332-346.

**Gamalero E, Berta G, Massa N, Glick BR.(2010).**, Lingua G. Interactions between *Pseudomonas Putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences on the growth of cucumber Under salt stress conditions. J Appl Microbiol 2010 ;108 :236–45.

**Gao.S, Zhu. J. (2003)** Dendrite-Assisted Growth of Silicon Nanowires in Electroless Metal Deposition. <https://doi.org/10.1002/adfm.200390018>.

**Geurts, R., and Bisseling, T. (2002).** Rhizobium nod factor perception and signalling. Plant Cell 14, s239–s249. doi:10.1105/tpc.002451.doi:10.1105/tpc.19.00279.

**Glick BR(2010).** Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnol Adv 2010 ;28 : 367–74.

**Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Cheng Z, Duan J. (2007).** Promotion of plant growth by ACC Deaminase-producing soil bacteria. Eur J Plant Pathol 2007 ;119 :329–39.

**Gordana Gojgić-Cvijović ,Vladimir P Beškoski, Jelena Milić, Mila Ilić, Srdjan Miletić, Tatjana Šolević, Miroslav M Vrvić. (2011).** *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment.2011.

**Gothwal, R. K., Nigam, V. K., Mohan, M. K., Sasmal, D., & Ghosh, P. (2008).** Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. Applied Ecology and Environmental Research, 6(2), 101–109. [https://doi.org/10.15666/aeer/0602\\_101109](https://doi.org/10.15666/aeer/0602_101109).

**Greer, F., McLean, C., and Graham, T.E. (1998).** The effect of caffeine on repeated Wingate exercise tests. J. Appl. Physiol. **85**: 1502–1508.

**Guermouche m'rassi, Amel. (2014).** *Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures* (Doctoral dissertation, These de Doctorat. Université d'Oran. 153p).

**Haag AF, Arnold MF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, Zanda M, Mergaert P, Ferguson GP.( 2013).** Molecular insights into bacteroid development during Rhizobium–legume symbiosis. FEMS Microbiology Reviews 37 : 364–383.

**Hamdani, Fatima-Z., (2001).** Sciences Régénération via l'organogénèse ou l'embryogénèse somatique chez le Scorpiurus. [Mémoire de magister]. Chelef: Université Hassiba ben Bouali.17-25pp.

**Hamilton, R. S., Hughes, S. J., et Maxted, N. (2001)** Ex Situ conservation of forage Legumes. In *The Genetic Diversity of Legumes species in the Mediterranean host plant*, Maxted and Bennett. Kluwer Academic Press, 263-291.

**Harayama, S., et al. (1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1999. 1(1): p. 63-70

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-010-0332-3>.

**Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., & Saraf, M. (2010).** Combinatorial assessment on dominance and informative Diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 211–217. Doi :10.1002/Jobm.200900272

**Jin, T.Z., Guo, M., Yang, R. (2014).** Combination of pulsed electric field processing and antimicrobial bottle for extending microbiological shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26, 153–158.

**Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013).** Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-life of science*, 289-320.

**Jurelevicius, D., Korenblum, E., Casella, R., Vital, R. L., & Seldin, L. (2010).** Polyphasic analysis of the bacterial community in the rhizosphere and roots of *Cyperus rotundus* L. grown in a petroleum-contaminated soil. *J Microbiol Biotechnol*, 20(5), 862-870.

**Jurelevicius, D. (2013).** The Use of a Combination of *alkB* Primers to Better Characterize the Distribution of Alkane-Degrading Bacteria/ [10.1371/journal.pone.0066565](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066565).

**Jury, D. (2018).** Thèse Doctorat en Sciences systèmes fourragers des régions semi-arides . 121p.

**Kennish M.J. (2001).** Practical handbook of marine science, Third Edition. CRC Press. Boca Raton, London New York Washington, D.C

**Khosro, M., & Yousef, S. (2012).** Bacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production : a Review. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 7(5), 307–316.

**Kjeldahl J (1883).** Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körnern *Zanl Chem*, 22 : 366-382.

**Kloepper JW, Schroth MN (1978).** Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. Gilbert-Clarey, Tours, pp 879–882.

**Kobayashi D Y, Reedy R, Bick M J, Oudemans P V. 2002.** Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1047–1054.

[Kogbara.B. Reginald](#); [M. Avotamuno, Josiah](#); [C. Worlu, Daniel](#); [Fubara-Manuel, Isoteim](#)(2015). A Case Study of Petroleum Degradation in Different Soil Textural Classes

**Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017).** Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS microbiology*, 3(1), 25.

**Kumar Baduru Lakshman et Gopal Sai D. V. R. (2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech.* 5:867–876. DOI 10.1007/s13205-015-0293-6.

**Lampi M.A. (2005).** Environmental photoinduced toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Occurrence and toxicity of photomodified PAHs and predictive modeling of photoinduced toxicity. *PhD thesis, Waterloo, Ontario, Canada*, 146 p.

**Laranjo, M., Alexandre, A., and Oliveira, S. (2014).** Legume growth-promoting Rhizobia : an overview on the Mesorhizobium genus. *Microbiol. Res.* 169, 2–17. Doi:10.1016/j.micres.2013.09.012.

[Laurence Morel](#), [Robert K. Vander Meer](#), [Clifford S. Lofgren](#). (1990). Comparison of Nestmate Recognition Between Monogyne and Polygyne Populations of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), <https://doi.org/10.1093/aesa/83.3.642>.

**LE HOUE´ROU, H. N. (2001).** Unconventional forage legumes For rehabilitation of arid and semiarid lands in world Isoclimatic Mediterranean zones. *Arid Land Research and Management* 15, 185–202.

**Lewis, G., Schrire B., Mackinder, B. & Lock, M. (eds.) (2005).** Le-gumes of the World. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.

**Licitra G, Carppino S, Schadt I, Avondo M et Barresi S (1997).** Forage quality of native Pastures in a Mediterranean area. *Animal Feed Science and Technology* : 69 :315-328. Doi : 10.1016/S0377-8401(97)00060-6.

**LPWG, Legume Phylogeny Working Group (2013a).** Legume phylog-Eny and classification in the 21st century : Progress, prospects and Lessons for other species-rich clades. *Taxon* 62 : 217–248.

**M. H. (2011).** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban surface dust of Guangzhou, China: Status, sources and human health risk assessment. *Science of the total environment*, 409(21), 4519-4527.

**M. M. (2011).** Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil)– A field experiment. *Chemosphere*, 83(1), 34-40.

**M’hammedi Bouzina M, Abdelguerfi-Laouar M, Abdelguerfi A et Guittonneau GG (2005).** Autoécologie et distribution du complexe d’espèces *Scorpiurus muricatus* (*S. sulcatus* –*S. subvillosus*) en Algérie. *Acta Bot. Gallica* : 152(1) :11-23 p.

**Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H.(2011).** Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes Accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* 2011 ;29 :248–58.

**Ma, Y., & Chen, R. (2021).** Nitrogen and Phosphorus Signaling and Transport During Legume–Rhizobium Symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 12(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683601>.

**Macking H., (2007).** -Phytoremediation of contaminated soil on plant efficiency, rhizosphere Bacteria and the physical effects of chemical agents. *Korea society for Applied Microbiology And Biotechnology*. 35 : 26-271.

**Mary. K. V. (2011).** BIOREMEDIATION - AN OVERVIEW/ [Journal of Industrial Pollution Control](#).

**Mayak S, Tirosch T, Glick BR(2004b).** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to Water stress in tomato and pepper. *Plant Sci* 2004b ;166 :525–30.

**Maymone B, Dattilo M et Mazziotti Di Celso P (1953).** Ricerche sulla produttività della Leguminosa *Scorpiurus muricata* L. var. *subvillosa* L., pregevole foraggera dei prati naturali dei pascoli meridionali (Research on the productivity of *Scorpiurus muricata* L. var. *subvillosa* L). *Annali della sperimentazione agraria*: 7:1289-1329.

[Medina-Bellver, J.I., Patricia Marín, Antonio Delgado, Alicia Rodríguez-Sánchez, Emilio Reyes, Juan L. Ramos, Silvia Marqués.](#)(2005). Evidence for *in situ* crude oil biodegradation after the *Prestige* oil spill/ <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00742.x>.

**Mekerri. K , Tazeboudjt. A (2017).** [Effets de deux espèces de légumineuses \(Fève et Haricot\) sur les propriétés physico-chimiques et biologiques de sols contaminés par le pétrole brut.](#)2017.

**Merabet, C., Bekki ; A., Benrabah, N., Baba-Hamed Bey, M. Bouchentouf, L., Ameziane, H., Rezki, M. A., Domergue, O., Cleyet-Marel, J. -C., Avarre, J. C., Bnab, G., Bailly, X., et de Lajudie, P. (2006)** Distribution of *Medicago* Species and Their Microsymbionts in a Saline Region of Algeria. *Arid Land Research and Management*,20(3) :219 – 231.

**Molina *et al.*,( 2009) .** àScreening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer/ DOI: 10.1056/NEJMoa0904554.

**Nadeem SM, Zahir ZA, Naveed M, Arshad M.(2007)** Preliminary investigations on inducing salt Tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase Activity. *Can J Microbiol* 2007 ;53 :1141–9.

**Niranjan RS, Shetty HS, Reddy MS (2006).** Plant growth promoting rhizobacteria : potential green Alternative for plant productivity. In : Siddiqui ZA (ed) *PGPR : biocontrol and biofertilization*. Springer, The Netherlands, pp 197–216.

**NOUH L. KAOUD. (2019).** Généralités sur le pétrole brut, Petrol Fr, 2019.  
<https://www.academia.edu/>

**NOUH L. KAOUD.(2020).** [Calcul de l'unité Gas-Plant de la Raffinerie de Skikda, Hassiba Benbouali University of Chlef.](https://www.researchgate.net/publication/341325552)<https://www.researchgate.net/publication/341325552>  
[Raffinerie de Skikda Chap1 Presentation.](https://www.researchgate.net/publication/341325552)

**Noureddine N-E., Amrani, S., et Aïd, F. (2010).** Statut symbiotique et souches de rhizobia associées à l'Acacia tortilis subsp. raddiana, mimosoïdée des régions désertiques de l'Algérie. Botany. 88(1) : 39-53(15).

**Obire et Nwaubeta,( 2002).**Effects of Refined Petroleum Hydrocarbon on Soil Physicochemical and Bacteriological Characteristics/DOI: 10.4314/jasem.v6i1.17193.

**Ohba, H., Amirouche, R. (2003).** Observation of the Flora of Tadmait and Tidikelt, Central Sahara, Algeria. Journal of Japanese Botany, 78 : 104-11.

**Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. (2011).** The rules of Engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annu. Rev. Genet. 45, 119–144.Doi : 10.1146/annurev-genet-110410-132549.

**Pansu M et Gautheyrou J (2003).** Handbook of Soil Analysis : Mineralogical, Organic and Inorganic Methods (Ed). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 993.

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

**Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015).** Bacterial Associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(July), 17–42.  
<https://doi.org/10.1080/0735-2689.2014.897899>.

**Penmetsa, R. V., Frugoli, J. A., Smith, L. S., Long, S. R., and Cook, D. R. (2003).** Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131, 998–1008. Doi :10.1104/pp.015677.

**Penmetsa, R. V., Frugoli, J. A., Smith, L. S., Long, S. R., and Cook, D. R. (2003).** Dual Genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131, 998–1008. Doi : 10.1104/pp.015677.

**Perry J.J., Staley J. T. -et Lory S. (2004).** *Microbiologie*, Ecl. Dun-OO, Paris.

**Philip, J. C. (2005).** Bioremediation of contaminated soil and Aquifer in Atlas RM and Philp, JC Bioremediation; Applied microbial solution for real world Environmental solution. *American Society of Microbiology*.

**[Pizarro-Tobías,P,](#) [José L. Niqui,](#) [Amalia Roca,](#) [Jennifer Solano,](#) [Matilde Fernández,](#) [Felipe Bastida,](#) [Carlos García,](#) [Juan L. Ramos.](#) (2015). Field trial on removal of petroleum-**

hydrocarbon pollutants using a microbial consortium for bioremediation and rhizoremediation/<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12174>.

**Pulschen " Lschen L. (1992)** Effects of two underseeded species, *Medicago polymorpha* L. and *Scorpiurus muricatus* L., on the yield of main crop (Durum wheat) and subsequent crop (Teff) under humid moisture regimes in Ethiopia. *Agronomy and Crop Science*, 168, 249–254.

**Quézel, P., Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Tomes 1 et 2. Paris : CNRS., 1962-1963.

**Riskuwa-Shehu. M. L. (2017).** Evaluation of the use of legumes for biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil/ [International journal of Environmental Science and Technology](#) 14(11)-DOI:[10.1007/s13762-017-1303-5](https://doi.org/10.1007/s13762-017-1303-5).

**Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., et al. (2020).** Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic Nitrogen fixation. *Plant Cell* 132, 15–41. Doi : 10.1105/tpc.19.00279.

**Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., & Basri, M. (2003).** Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution.

**Sandhya V, Ali SKZ, GroverM, Reddy G, Venkateswarlu B (2009).** Alleviation of drought stress effects In sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas Putida* strain GAP-P45. *Biol Fertil Soils* 2009 ;46 :17–26.

**Schrire, B.D., Lavin, M. & Lewis, G.P. (2005a).** Global distribution Patterns of the Leguminosae : Insights from recent phylogenies. *Biol. Skr.* 55 : 375–422.

**Schulze E-D, Lloyd J, Kelliher FM, Wirth C, Rebmann C, LuÈhker B, Mund M, Knohl A, Milyukova I, Schulze W, Ziegler W, Varlagin A, Sogachov A, Valentini R, Dore S, Grigoriev S, Kolle O, Tchebakova N, Vygodskaya N (1999)** Productivity of Forests in the Eurosiberian boreal region and their potential to Act as a carbon sink ± a synthesis. *Global Change Biol* 5(6) :703±722.

**Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

**Sebbane, N., Sahnoune, M., Zakhia, F., Willems, A., Benallaoua, S., et de Lajudie, P. (2006)** Phenotypical and genotypical characteristics of root nodulating bacteria isolated From annual *Medicago* spp. In Soummam Valley (Algeria) ; *Let. Appl. Microbiol.*, 42 : 235-241.

**SEKKOUR. S. (2020).** Etude de la structure des communautés bactériennes selon une échelle spatiotemporelle dans des écosystèmes anthropisés (thèse de doctorat/ université blida Ahmed Ben Bella.

**Simon, Z., Mtei, K., Gessesse, A., & Ndakidemi, P. A. (2014).** Isolation and Characterization of Nitrogen Fixing Rhizobia from Cultivated and Uncultivated Soils of Northern Tanzania.



American Journal of Plant Sciences, 05(26), 4050–4067.  
<https://doi.org/10.4236/ajps.2014.526423>.

**Soltani M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. *Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique*, p. 284.

**Somasegaran P et Hoben HJ (1994).** Handbook for Rhizobia. Springer verlage New York. Inc . p.450.

**SPEIGHT, J.G.(2014).** The chemistry and technology of petroleum. CRC press.

**Sprent JI, Ardley JK, James EK. (2013).** From north to south : a latitudinal look at Legume nodulation processes. South African Journal of Botany 89 : 31–41.

**Susarla.S.Victor F .Medina [Steven C.M Cutcheon](#). (2002).** Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination.

**Tillard P et Drevon JJ (1988).** Nodulation and nitrogénase activity of chickpea cultivar INRA 199 inoculated with different strains of Rhizobium ciceri Agronomie, 8 : 387-392.

**Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM et Webb DA (1968).** Flora europeae, Vol. II. Cambridge : Cambridge University Press.

**Van Loon LC (2007).** Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria. Eur J Plant Pathol 119:243–254.

**Vance, C. P. (1998).** Nodule carbon metabolism: Organic acids for N<sub>2</sub> fixation. In Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. (Elmerich, C. et al., eds.), Paris: Kluwer Academic Publishers, pp.443-448.

**Varjani, S.J. (2017).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology, 2017. 223 : p. 277-286.

**Varjani, S.J., Microbial .(2017) .degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology, 2017. 223 : p. 277-286.**

**Varshney, R. K. (2015).** Legume Crops Phylogeny and Genetic Diversity for Science and Breeding. Critical Reviews in Plant Sciences, 34, 43–104.  
<https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897904>.

**Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.-H., & Peix, A. (2019).** Bacteria-Inducing Legume Nodules Involved in the Improvement of Plant Growth, Health and Nutrition. Microbiome in Plant Health and Disease, 79–104.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8495-0_4).

**Vijavan R, Palaniappan P, Tongmin SA, Elavarasi P, Manoharan N. (2013).** Rhizobitoxine enhances Nodulation by inhibiting ethylene synthesis of Bradyrhizobium elkanii from Lespedeza Species : validation by homology modeling and molecular docking study. *World J Pharm Pharm Sci* 2013 ;2 :4079–94.

**Vincent JM (1970).** A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In : *International Biological Programme Handbook n°15*. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford, 73-97 p.

**Vogel T., Ballerini D. (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, 16(3) : 204- 209.

**Wang, W., Huang, M. J., Kang, Y., Wang, H. S., Leung, A. O., Cheung, K. C., & Wong,**

**Whipps JM (2001)** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52:487–511

**Wilcke W. (2000).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163:p. 229-248.

Yahia, N., et Fyad-Lameche, F. Z. (2003). Évaluation de la variabilité de jeunes plants De Medicago soumis à un régime de basse température. *Acta. Bot. Gallica.*, 150 (1) : 3- 17.

**Yateem.k, (2013).** [Rhizoremediation of oil-contaminated sites: a perspective on the Gulf War environmental catastrophe on the State of Kuwait/ https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-012-1182-8.](https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-012-1182-8)

**Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger Jr WT.(2004).** Plant growth promoting rhizobacteria application And perspectives in agriculture. *Adv Agron* 2004 ;81 :96–168.

**Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, Shahroona B, ArshadM.(2008).** Effectiveness of rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of peas (Pisumsativum) under drought Conditions. *J Microbiol Biotechnol* 2008 ;18 :958–63.

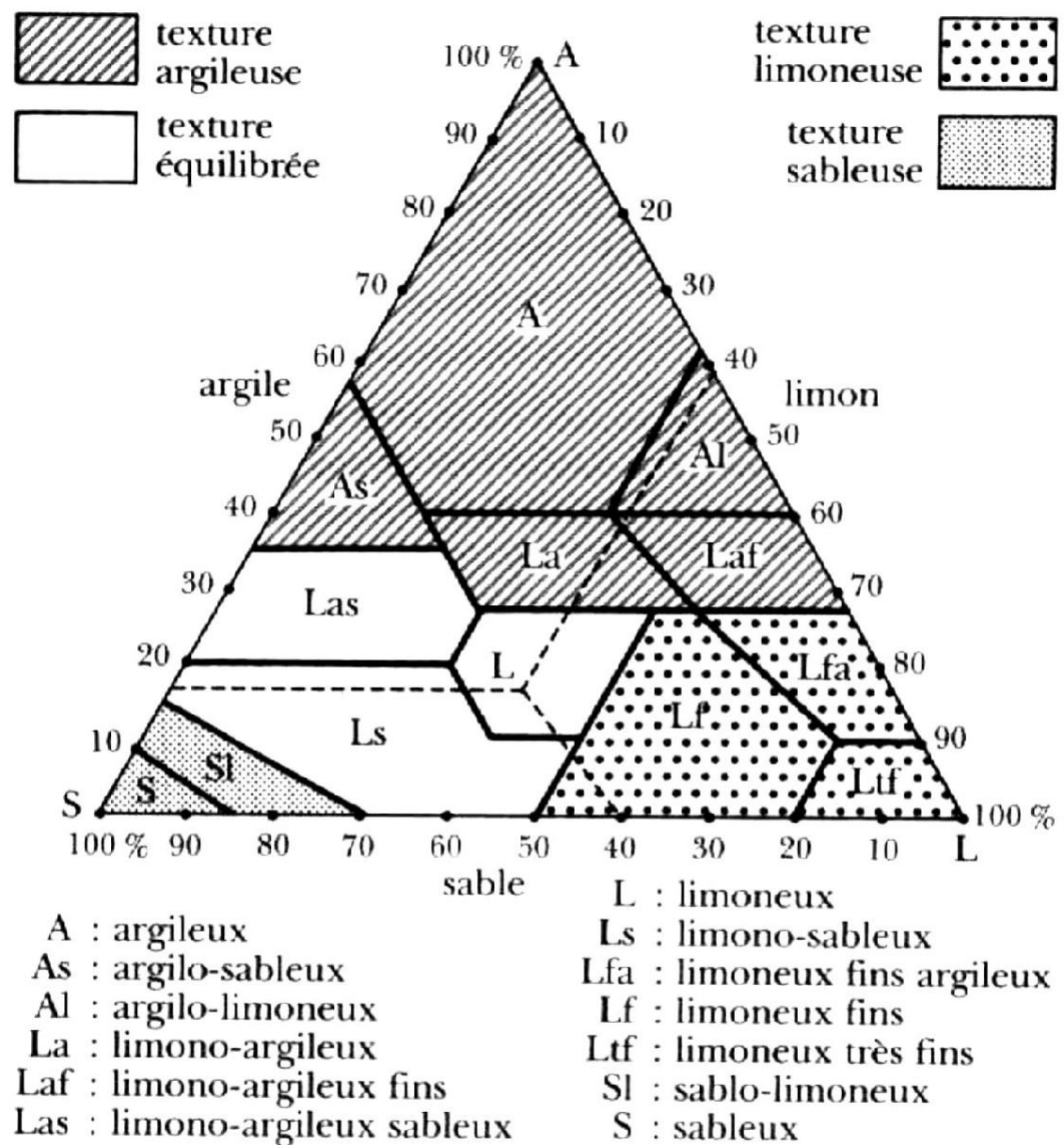
**ZENATI. Z. (2018).** etude de la biodegradation des hydrocarbures pétroliere par des bactéries marins : application en traitement des eaux de mer contaminée par le pétrole/ thèse de doctorat- université saad dahlab blida 1.

**Zheng, J., Feng, J. Q., Zhou, L., Mbadinga, S. M., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2018).** Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 34

# *Annexe*

## Annexe 1 : Analyse physicochimique de Sol

## a. Granulométrie

**TRIANGLE DES TEXTURES**

*(d'après U.S. département of agriculture)*

Le triangle de texture permet de classer les sols d'après leur composition

## b. Normes internationales du pH du sol :( INRA, 1995)

pH	Type de sol
< 3.5	Hyper-acide
3.5 - 5	Très acide
5.0 - 6.5	Acide
6.5 - 7.5	Neutre
7.5 - 8.7	Basique
> 8.7	> 8.7 Très basique

**c. Normes internationales de la salinité (Wetz, 2001)**

Profondeur de sol	Sols non salins	Légèrement salins	Modérément salins	Sols salins	Sols très salins
0 – 60 cm	< 2 ds/m*	2 – 4 ds/m	4 – 8 ds/m	8 – 16 ds/m	> 16 ds/m
60 – 120 cm	< 4 ds/m	4 – 8 ds/m	8 – 16 ds/m	16 – 24 ds/m	> 24 ds/m

**d. Normes internationales de l'azote total (kjeldahl, 1882) et du phosphore assimilable (Olsen, 1954).**

Éléments	Normes					Référence
	< 0.5 Très pauvre	0.5-1 Pauvre	1-1.5 Moyen	1.5-2.5 Riche	>2.5 Très riche	
N total (%) Kjeldhal	< 0.5 Très pauvre	0.5-1 Pauvre	1-1.5 Moyen	1.5-2.5 Riche	>2.5 Très riche	Calvet et Vellemin (1986)
P Assimilable (ppm)	/	< 50 Sol pauvre	50-80 Teneur satisfaisante	> 80 Sol riche	/	Lebreton J.C (2004)

**e. Normes internationales de la matière organique**

Classe du sol	Très pauvre	Pauvre	Moyennement pauvre	Riche	Très riche
Matière organique %	< 0,7	0,7-1,5	1,5-3	3-6	> 6

## f. Les normes des taux de calcaire

Taux de CaCO <sub>3</sub>	Qualification du sol
CaCO <sub>3</sub> T ≤ 5 %	Sol non calcaire
5 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 12.5 %	Sol faiblement calcaire
12.5 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 25 %	Sol modérément calcaire
25 % < CaCO <sub>3</sub> T ≤ 50 %	Sol fortement calcaire
CaCO <sub>3</sub> T >50 %	Sol très fortement calcaire

Source : programme d'interprétation LANO/CA de

Basse Normandie

(<http://www.lano.asso.fr/web/calcaire actif.html>)

## Annexe 2\_: Composition des Milieux de cultures

## a. Milieu de culture YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970)

Extrait de levure.....1g

Agar-Agar..... 18g

Mannitol .....10g

Solution minérale de Bergersen 10 M.....100ml :

Bergersen (1961)

{ KCl 1g  
 FeCl<sub>3</sub> 0.02g  
 CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O 0.53g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O 4.5g  
 MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 1g  
 H<sub>2</sub>O distillée 1000ml

H<sub>2</sub>O distillée .....qsp 1000ml

pH (6.9 –7)

## b. Eau gélosé (0,8 %) (Tillard et Drevon, 1988)

Agar-agar..... 0,8 g

Eau distillée ..... 100 ml

---

Autoclaver pendant 20 min à 120°C.

## c. Solution nutritive de culture des plantes (Bertrand, 1997)

Eléments	Poids moléculaire	Solution finale	Solution mère g/l	Ml de solution mère/l de sol.finale
Macro-éléments	mM			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	0,1	13,609	
KCl	74,55	3	223,65	
CaCl <sub>2</sub> , 2(H <sub>2</sub> O)	147,02	2	249,04	
MgSO <sub>4</sub> , 7(H <sub>2</sub> O)	246,48	1	246,48	
Micro-éléments	µM			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,8	4	6,25	0,04
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	169	6	25	
ZnSO <sub>4</sub> , 7(H <sub>2</sub> O)	287,54	0,9	6,25	
CuSO <sub>4</sub> , 5(H <sub>2</sub> O)	249,68	1	6,25	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2(H <sub>2</sub> O)	241,95	0,1	0,625	
Sequestrène de fer	16,6			
KNO <sub>3</sub>	101,1	0,5	100	0,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	164,09	0,5	82	1

**Annexe 3 : Coloration de Gram**

- 1- Déposer une goutte d'eau sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie à l'aide d'un pique en bois et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du violet de gentiane pendant 60 secondes



- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
  - 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
  - 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
  - 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone ou avec de l'éthanol en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
  - 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
  - 9- Couvrir avec de la fuschine (ou safranine) pendant 60 secondes
  - 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes et mettre la lame inclinée sur du papier absorbant
  - 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement.
- Les cellules Gram+ absorbent la couleur du violet de gentiane et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

**Annexe 4 : Mineral salt medium : MSM pH=6.5**

-NH <sub>4</sub> CL	4g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,8g
- MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
-NaCl	0.1g
-Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01 g
- Agar	20 g
- eau distillée	1000ml

Annexe 5 : Composition de la gélose nutritive

<b>Constituants</b>	<b>g/l d'eau distillée</b>
Peptone	5
Extraits de viande	1
Extraits de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH 7,4 (± 0,2)	