

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
Faculté de Technologie
Département de Chimie Industrielle

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Industrielle

**ETUDE DU POTENTIEL BIODEGRADATIF DE SOUCHES
ISOLEES DU SOL DE HASSI MESSAOUD CONTAMINE
PAR DU PETROLE : CRIBLAGE, BIODEGRADATION DE
HAP ET PRODUCTION DE BIOSURFACTANT**

Par

Kamel EDDOUAOUA

Devant le jury composé de :

A. KHELIFA	Professeur, Université Saad Dahlab de Blida	Président
N. MOULAI-MOSTAFA	Professeur, Université Yahia Farès de Médea	Examineur
A. ZITOUNI	Professeur, Ecole Normale Supérieure de Kouba	Examineur
O. BOURAS	Professeur, Université Saad Dahlab de Blida	Examineur
S. SAYADI	Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie	Co-Directeur de thèse
A. BADIS	Professeur, Université Saad Dahlab de Blida	Directeur de thèse

Blida, Décembre 2012

Ce projet de recherche a été réalisé :

au Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie



au Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie (LMB) de l'Université de Blida, Algérie



Support financier

Agence Universitaire de la Francophonie (AUF)



*A tous les membres de ma famille qui m'ont toujours aidé et encouragé
durant toutes ces années. Plus particulièrement, merci à mes parents pour
leur soutien absolu et inconditionnel et leurs encouragements illimités, merci
aussi à ma femme et mes enfants pour m'avoir supporté (dans tous les sens
du terme) pendant toutes ces années.*

A

Mes parents

Ma femme

Mes enfants, Aymen et Mohamed lamine

REMERCIEMENTS

Ce présent travail, initié en 2008, a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie et, le Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie, Département de Chimie Industrielle, Université Saad Dahlab de Blida, Algérie. Il s'est intégré dans le cadre des activités du Pôle d'Excellence Régional (PRE) financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) de Coopération Scientifique Interuniversitaire « **Bioprocédés Environnementaux et Industriels** » Contrat N° 6313PS652.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction de Monsieur **Abdelmalek BADIS**, professeur à l'USD-Blida, je tiens aujourd'hui à lui témoigner ma gratitude. Il a su se rendre disponible pour répondre à la moindre de mes incertitudes.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur **Sami SAYADI**, directeur général de CBS, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (LBPE) et d'avoir accepté de co-diriger mon travail de recherche, sans son enthousiasme et ses conseils, ce travail ne peut être mené à son terme.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Abdellah KHELIFA**, professeur à l'USD de Blida, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, merci à Monsieur **Nadji MOULAI-MOSTEFA**, professeur à l'Université Yahia Ferès de Médéa, Monsieur **Abdelghani ZITOUNI**, professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba et Monsieur **Omar BORAS**, professeur à l'USD de Blida qui ont bien voulu juger ce travail en étant examinateurs de cette thèse.

Le travail expérimental a nécessité la mobilisation de certaines personnes de l'équipe LBPE. Ainsi je souhaiterais remercier en particulier Dr. **Sami MNIF** pour ses conseils précieux et aide sans cesse.

Je remercie également le groupe du centre de la recherche et de développement (CRD) de SONATRACH, en particulier Dr. **Mohamed KHODJA** pour son aide à l'obtention des échantillons de sols.

Je tiens à remercier vivement mes collègues enseignants : Mme. **Belreka**, Mme **Farhat**, M. **Amzal**, M. **Bensafia**, M. **Messaoud Nacer**, M. **Alouaoui** et M. **Sahar**, pour leur aide et leurs conseils précieux qui n'ont jamais cessé pendant ce travail de recherche.

Je souhaite également remercier tous mes compagnons durant ces quatre dernières années, ceux qui rendent ce parcours inoubliable. Je pense en particulier à **Adel, Bessem, Gheith, Maher et Slim**.

Je terminerais en remerciant toutes les personnes qui ont participé d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

ملخص

استخدمت سلالات بكتيرية هوائية، عزلت من التربة الرملية الملوثة بالهيدروكربونات النفطية (منطقة حاسي مسعود، جنوب الجزائر) في تفكيك النفط الخام والنفثالين. تم دراسة تأثير عوامل عديدة على عملية التفكيك: [الركيزة]، الملوحة، الحرارة، العناصر المغذية، الخ. تم إنتاج ووصف مفاعل سطحي بواسطة سلالة بكتيرية عزلت أثناء هذه الدراسة وذلك قصد إيجاد بعض التطبيقات البيئية.

(1) أظهرت نتائج تفكيك النفط الخام ما يلي: (أ) يمكن أن تنمو السلالات المحبة للحرارة المتوسطة على النفط الخام إلى حد التركيز العالية (15 % ح/ح) ، (ب) تتحمل السلالة E1 (درجة تحضين 30 م°) نطاق واسع من الملوحة [من 0 - 80 غ/ل]، ينخفض هذا الأخير [من 0 - 40 غ/ل] للسلالة 7J (درجة تحضين 45 م°) و KS1 (درجة تحضين 55 م°)، (ج) تفكيك شبه كامل لـ 17 هيدروكربونات تمت دراستها (95 إلى 100%) باستعمال سلالات A7 و J7 (المتحملة للحرارة العالية)، (د) تبين من دراسة طريقة التأثير على المحروقات أثناء تفكيكها أن السلالات E1 و J7 تنتج مفاعلات سطحية لتحسين ذوبان المواد الهيدروكربونية وذلك بتغيير السطح الخلوي ومن ثم زيادة معدل الالتصاق بقطرات النفط.

(2) إن الشروط المثالية لتفكيك النفثالين بدون رج بواسطة السلالة K1C (درجة تحضين 45 م°) هي : التركيز الأمثل للنفثالين 500 مغ/ل ، $pH = 7,0$ والموحة 2% ، وأخيرا لا يتحسن تفكيك النفثالين بإضافة مفاعل سطحي كيميائي.

(3) تبين بعد إنتاج، دراسة الخصائص والتطبيق البيئي للمفاعل السطحي المستخرج من السلالة 1E المحبة للحرارة المتوسطة أن: (أ) كانت الكمية المنتجة تساوي 2,1 غ/ل ، (ب) يعتبر زيت الزيتون أفضل مصدر للكربون إنتاجا (25,8 mN/m)، (ج) استقرار جيد لتغيرات درجة الحرارة [0 - 55 م°] ، $pH [2 - 12]$ والموحة [0 - 300 غ/ل] واتضح أيضا أن له نشاط مضاد للبكتيريا الممرضة، (د) تم تحسين إذابة الفينانترين بوجود المفاعل السطحي المنتج من طرف السلالة 1E وأن لديه إمكانيات كبيرة في إزالة الهيدروكربونات من تربة ملوثة اصطناعيا فكان معدل الإزالة 1.3، أعلى من تلك التي تم الحصول عليها باستخدام المفاعلات السطحية الكيميائية (Tween 80).

الكلمات المفتاحية: النفط الخام - الهيدروكربونات - بكتيريا - المعالجة البيولوجية - التفكيك الحيوي - المفاعلات السطحية البيولوجية- النفثالين - الهيدروكربونات العطرية المتعددة الحلقات 'HAP'.

RESUME

Des souches bactériennes aérobies, isolées à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie), ont été utilisées pour la dégradation du pétrole brut et du naphtalène. Egalement, la production, la caractérisation et l'application de biosurfactant ont été envisagées.

1) Les résultats obtenus pour la dégradation du pétrole brut révèlent que : **(a)** Les souches mésophiles dans une site chargé pétrole brut (15%, v/v), **(b)** La souche 1E (mésophile) tolère une large gamme de salinité [0 à 80 g.l⁻¹ de NaCl], **(c)** Le taux de dégradation des *n*-alcanes (C₁₃ à C₂₉) est presque complète (95 à 100%) pour les souches 7J et 7A (thermotolérantes). **(d)** Les souches peuvent synthétiser des tensioactifs ou modifier leur surface cellulaire pour améliorer la biodisponibilité de contaminant.

2) Les conditions optimales de la dégradation du naphtalène en mode statique par une souche thermotolérante, K1C (incubation à 45 °C), sont: la concentration optimale du naphtalène est de 500 mg.l⁻¹, le pH = 7,0 et la salinité est de 2%. Ainsi, l'ajout du surfactant semble inhiber la dégradation du naphtalène.

3) Les résultats obtenus pour la production, la caractérisation et l'application du biosurfactant montrent que: **(a)** le rendement de production est de 2,1 g.l⁻¹. **(b)** L'huile d'olive présente une meilleure source de carbone (25,8 mN.m⁻¹), **(c)** une très bonne stabilité thermique et chimique, et un antibactérien efficace, **(d)** Il est un bon solubilisant des HAP. Finalement, le taux de remobilisation de pétrole brut est 1,3 fois plus élevé que celui obtenu avec le surfactant chimique «Tween 80».

Mots clés : Pétrole brut – Hydrocarbures – Bactéries – Bioremédiation – Biodégradation – Biosurfactants – Naphtalène – HAP.

ABSTRACT

Aerobic bacterial strains, isolated from a soil contaminated with petroleum hydrocarbons (region of Hassi-Messaoud, south of Algeria), were used for the degradation of crude oil and naphthalene. Also, the production, characterization and application of biosurfactants were also studied.

1) The results of the degradation of crude oil showed that: (a) Mesophilic strains could grow on crude oil at concentrations up to 15% (v/v), (b) The strain 1E (incubated at 30 °C) tolerated a wide range of salinity from 0 to 80 g.l⁻¹ NaCl. (c) We noticed a complete degradation of the 17 studied hydrocarbons (95 to 100%) with strains 7A and 7J (thermotolerant). (d) The strains 1E and 7J synthesized surfactants, and they changed their cell surface to increase the adhesion rate of the oil droplets.

2) Optimal conditions for naphthalene degradation under static conditions (without agitation) with thermotolerant strain, K1C (incubation at 45 °C) are: optimal concentration is 500 g.l⁻¹, pH=7 and salinity of 2%. The degradation rate exceeded 95% after 6 days of incubation. We noticed that surfactant addition did not improve the degradation of naphthalene.

3) The results obtained for the production, the characterization and the environmental application of biosurfactant produced by strain 1E showed that : **(a)** The produced quantity of 1E biosurfactant was 2.1 g.l⁻¹, **(b)** The olive oil presented the optimal carbon source for (25.8 mN.m⁻¹), **(c)** Good thermal and chemical stabilities. Also, 1E biosurfactant had an antibacterial activity against pathogenic strains, **(d)** It is a good solubiliser of PAH, finally, it had great potential for remobilization of hydrocarbons. Indeed, the rate of remobilization is 1.3 times higher than that obtained with the chemical surfactant Tween 80.

Keywords: Crude oil – Hydrocarbons – Bacteria – Bioremediation – Biodegradation – Biosurfactant – Naphthalene – PAH.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures et des tableaux	13
Liste des abréviations	17
Introduction générale	18

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le Pétrole	22
1.1.1. Formation de pétrole.....	22
1.1.2. Evolution des pétroles dans le système pétrolier	24
1.1.3. Pétrole, principale source d'énergie	25
1.1.4. Pétrole, principale source de pollution	27
1.1.4.1. Pollution de l'air	27
1.1.4.2. Pollution du sol	27
1.1.4.3. Pollution des eaux marines	28
1.1.5. Composition du pétrole brut.....	29
1.1.6. Classification des composés pétroliers	32
1.2. Les hydrocarbures	34
1.2.1. Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures	35
1.2.1.1. Les hydrocarbures saturés	35
1.2.1.2. Les hydrocarbures aromatiques	36
1.2.2. Toxicologie des hydrocarbures	37
1.2.2.1. Les hydrocarbures saturés	38
1.2.2.2. Les hydrocarbures aromatiques	38
1.2.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement	40
1.3. Remédiation des sites contaminés aux hydrocarbures	43
1.3.1. Milieu marin	44
1.3.2. Sol	45
1.4. Biodégradation des hydrocarbures	47
1.4.1. Généralité.....	47

1.4.2. Mode d'action des microorganismes	48
1.4.3. Mécanismes de biodégradation aérobie des hydrocarbures	49
1.4.3.1. Les hydrocarbures saturés	49
1.4.3.2. Les hydrocarbures aromatiques	54
1.4.4. Biodégradation du naphthalène, molécule modèle des HAP	55
1.4.5. Biodégradation des hydrocarbures en condition anaérobie	57
1.4.6. Dégredation des hydrocarbures par les champignons et les microalgues ..	58
1.4.7. Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures	58
1.4.7.1. Facteurs abiotiques	59
1.4.7.2. Facteurs biologiques	63
1.4.8. Conclusion	64
 1.5. Biosurfactants, un intérêt environnemental	65
1.5.1. Introduction	65
1.5.2. Classification des biosurfactants	67
1.5.3. Microorganismes producteurs de biosurfactants	67
1.5.4. Applications de biosurfactants	69
1.5.5. Biosynthèse des biosurfactants	70
1.5.6. Propriétés de biosurfactants	70
1.5.7. Méthodes de criblage des souches produisant des biosurfactants	74
1.5.8. Paramètres influençant la production du biosurfactant	76
1.5.9. Conclusion	78

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation du biotope	79
2.1.1. Champ pétrolier de Hassi-Messaoud	79
2.1.1.1. Caractéristiques géoclimatiques du champ.....	79
2.1.1.2. Type de rejets liquides à Hassi-Messaoud	80
2.1.2. Choix de site.....	81
2.2. Méthodologie	81
2.2.1 Appareillage	83
2.2.2. Echantillonnage et caractérisation physico-chimiques des échantillons de sols.....	84
2.2.2.1. Echantillonnage	84

2.2.2.2. Analyse physico-chimiques des échantillons de sol contaminé par le pétrole brut.....	84
2.2.3. Isolement des souches bactériennes aérobies.....	86
2.2.3.1. Milieu de culture	86
2.2.3.2. Isolement des bactéries.....	86
2.2.3.3. Criblage et purification des souches aptes à dégrader le pétrole	87
2.2.3.4. Conservation des souches pures	88
2.2.4. Biodégradation du pétrole brut	88
2.2.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien	88
2.2.4.2. Sélection des souches performantes	89
2.2.4.3. Paramètres affectant la dégradation	89
2.2.4.4. Croissance sur les aromatiques.....	89
2.2.4.5. Etude du mode d'action des souches sélectionnées sur les hydrocarbures.....	90
2.2.4.6. Dosage des hydrocarbures (<i>n</i> -alcanes : C13 à C29) par GC/MS	90
2.2.5. Biodégradation du naphthalène en condition statique	90
2.2.5.1. Sélection de la souche performante	91
2.2.5.2. Paramètres affectant la dégradation	91
2.2.5.3. Dosage du naphthalène résiduel	91
2.2.5.4. Analyse des intermédiaires métabolites de la dégradation du naphthalène par FTIR.....	92
2.2.6. Production de biosurfactant, caractérisation et application environnementale.....	92
2.2.6.1. Techniques de mesure de production de biosurfactants	92
2.2.6.2. Condition de culture	94
2.2.6.3. Criblage de la souche productrice de biosurfactant	95
2.2.6.4. Condition de production de biosurfactant	95
2.2.6.5. Extraction et purification de biosurfactant	95
2.2.6.6. Caractérisations biochimique et structurale du biosurfactant	96
2.2.6.6.1. Composition chimique	96
2.2.6.6.2. Caractérisation structurale	97
2.2.6.7. Propriétés du biosurfactant	98
2.2.6.7.1. Activité émulsifiante (E_{24})	98
2.2.6.7.2. Détermination concentration micellaire critique	99

2.2.6.7.3. Détermination de la stabilité du biosurfactant	99
2.2.6.7.4. Activité antimicrobienne	99
2.2.6.8. Applications environnementales	101
II.7. Identification phylogénétique des souches performantes	102

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Isolement et identification des souches à fort potentiel dégradatif du pétrole brut et d'hydrocarbures.....	103
3.1.1. Caractérisation physico-chimiques du biotope étudié	103
3.1.2. Isolement des souches bactériennes aérobies dégradantes le pétrole brut.....	104
3.1.3. Biodégradation du pétrole brut	107
3.1.3.1. Sélection des souches performantes à différentes températures.....	107
3.1.3.1.1. Sélection des souches mésophiles (température d'incubation 30°C). 107	
3.1.3.1.2. Sélection des souches thermophiles	109
3.1.3.2. Paramètres affectant la dégradation de pétrole brut	112
3.1.3.2.1. Effet de la concentration	113
3.1.3.2.2. Effet de la température	115
3.1.3.2.3. Effet de la salinité	116
3.1.3.3. Capacité de croissance sur les aromatiques et le décane	118
3.1.3.4. Dégradation des <i>n</i> -alcanes	119
3.1.3.5. Dénombrement des bactéries cultivées sur milieu MM à base de pétrole brut	122
3.1.3.6. Mode d'action des souches performantes sur les hydrocarbures	123
3.1.3.7. Caractéristiques phylogénétiques des trois souches	124
3.1.3.8. Conclusion	126
3.2. Biodégradation du naphtalène, molécule modèle des HAP.....	127
3.2.1. Sélection de la souche performante	127
3.2.2. Facteurs affectant la biodégradation du naphtalène	127
3.2.2.1. Concentration du naphtalène	128
3.2.2.2. Effet du pH	130
3.2.2.3. Effet de la salinité	131
3.2.2.4. Source d'azote	132
3.2.2.5. Effet de l'ajout d'un co-substrat	133

3.2.2.6. Effet de l'ajout d'un surfactant	134
3.2.3. Mise en évidence du changement structural du naphtalène	135
3.2.4. Caractérisation phénotypique de la souche K1C	138
3.2.5. Conclusion	139
 3.3. Production et caractérisation du biosurfactant : application environnementale	140
3.3.1. Criblage de la souche productrice de biosurfactant.....	140
3.3.2. Identification phylogénétique de la souche 1E	141
3.3.3. Etude de la capacité productrice de la souche 1E	142
3.3.4. Production de biosurfactant	144
3.3.4.1. Effets de la source de carbone sur la production de biosurfactant	144
3.3.5. Séparation et purification de biosurfactant	145
3.3.6 Caractérisation physico-chimique et antimicrobienne de biosurfactant...	146
3.3.6.1. Activité émulsifiante (E_{24})	146
3.3.6.2. Stabilité thermique	147
3.3.6.3. Stabilité chimique	148
3.3.6.4. Activité biologique	150
3.3.6.5. Détermination de la concentration micellaire critique	152
3.3.6.6. Spectre UV du biosurfactant de la souche 1E.....	153
3.3.7. Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant	154
3.3.7.1. Composition biochimique	154
3.3.7.2. Caractérisation structurale	154
3.3.8. Détermination HLB (Hydrophile - Lipophile Balance)	158
3.3.9. Application environnementale	159
3.3.9.1. Solubilisation des HAP	159
3.3.9.2. Remobilisation du pétrole brut	160
3.3.10. Conclusion	161
 CONCLUSION GENERALE	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
ANNEXES	194

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1 : Différentes phases de la transformation de la matière organique ..	24
Figure 1.2 : Evolution de la production mondiale du pétrole	26
Figure 1.3 : Consommation de produits pétroliers dans le monde en 2002	26
Figure 1.4 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts	31
Figure 1.5 : Fractionnement SARA	33
Figure 1.6 : Caractéristique structurale des HAP ayant un potentiel cancérogène	39
Figure 1.7 : Différents processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol	43
Figure 1.8 : Voies métaboliques de dégradation des <i>n</i> -alcanes par les bactéries	51
Figure 1.9 : Voies métaboliques de dégradation de <i>n</i> -alcanes par introduction de la molécule d'oxygène	52
Figure 1.10 : Voies métaboliques de dégradation pristane par les microorganismes.....	52
Figure 1.11 : Voie métabolique générale du cyclohexane	53
Figure 1.12 : Biodégradation des HAP ; dioxygénases intègrent les deux atomes d'O ₂ dans le substrat Monooxygénases incorporent un atome d'oxygène de l'O ₂ , le second atome est réduit à H ₂ O	54
Figure 1.13 : Voies métaboliques de dégradation aérobie du naphthalène	56
Figure 1.14 : Différentes voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons	57
Figure 1.15 : Structure d'un tensioactif	67
Figure 1.16 : Domaines d'application des biosurfactants	69
Figure 1.17 : Différents types de biosurfactants produits par les microorganismes en utilisant des substrats soluble et/ou insoluble dans l'eau	71
Figure 1.18 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant	72
Figure 2.1 : Situation du champ de Hassi-Messaoud	80
Figure 2.2 : Sols contaminés par les fluides de forage (Hassi-Messaoud)	81

Figure 2.3 : Plan expérimental	82
Figure 3.1 : Croissance des bactéries sur le pétrole brut	105
Figure 3.2 : Observation microscopique, différentes formes de souches bactériennes aérobies capables de croître sur le pétrole brut	106
Figure 3.3 : Croissance des souches mésophiles sur le pétrole brut (30 °C et 3%, v/v). a- Cinétique de croissance, b- DO (600 nm) maximale	108
Figure 3.4 : Croissance des souches thermotolérantes sur le pétrole brut (45 °C et 3%, v/v). a- Cinétique de croissance, b- DO (600 nm) maximale	110
Figure 3.5 : Croissance des souches thermophiles sur le pétrole brut (55 °C et 3%, v/v). a- Cinétique de croissance, b- DO (600 nm) maximale	111
Figure 3.6 : Biodégradation de pétrole brut par les souches KS1 et KS11 à 55 °C, après le 3^{ème} jour d'incubation	112
Figure 3.7 : Effet de la concentration du pétrole brut (% v/v) sur la croissance des souches sélectionnées. a- souches 1E et 1F incubées à 30 °C, b- souches 7A et 7J incubées à 45 °C, c-souches KS1 et KS11 incubées à 55 °C	114
Figure 3.8 : Effet de la concentration du pétrole brut sur la biomasse des trois souches performantes	115
Figure 3.9 : Effet de la température sur la croissance des trois souches sélectionnées (pétrole brut : 3%, v/v)	116
Figure 3.10 : Effet de la concentration en sel NaCl (pétrole brut : 3%, v/v) sur la croissance des trois souches sélectionnées	118
Figure 3.11 : Taux de dégradation (%) des <i>n</i>-alcanes : a- souches mésophiles (1E et 1F), b- souches thermotolérantes (7A et 7J), c- souches thermophiles (KS1 et KS11)	121
Figure 3.12 : Spectre CG/MS du pétrole brut	122
Figure 3.13 : Evolution de la biomasse en fonction du temps pour les trois souches	122
Figure 3.14 : Electrophorèses sur gels d'agarose (1%). a- ADN génomique des trois souches (KS, 7J et 1E), b- Produit de PCR du gène de l'ARNr 16S, c- Produit de PCR purifié	125
Figure 3.15: Arbre phylogénétique montrant la phylogénie des souches 1E, 7J et KS1 basé sur le séquençage de l'ARNr 16S	125
Figure 3.16 : Variation de la concentration du naphtalène en fonction du temps	129

Figure 3.17 : Effet de la variation du pH sur la dégradation du naphthalène	130
Figure 3.18 : Effet de la variation de la salinité sur l'efficacité de la dégradation du naphthalène	131
Figure 3.19 : Taux de dégradation du naphthalène en fonction du temps à différents rapports de C/N	132
Figure 3.20 : Effet de l'ajout d'un co-substrat. AS : acide salicylique (0,2g/l), AB : acide benzoïque (0,2g/l), N : naphthalène (0,5g/l)	133
Figure 3.21 : Effet de l'ajout du surfactant en fonction du temps (500mg/l de naphthalène, pH = 7, T = 45 °C)	135
Figure 3.22 : Spectre infrarouge de la biodégradation du naphthalène par la souche K1C : a- 1jour de dégradation, b- 10 jours de dégradation, c- 30 jours de dégradation.....	137
Figure 3.23 : Observation microscopique : a- microscope optique, b- microscope électronique	138
Figure 3.24 : Arbre phylogénétique basée sur le séquençage de l'ARNr 16S, construite par la méthode de 0020c neighbor-joining montrant la position de la souche 1E entre les membres du genre <i>Staphylococcus</i>	142
Figure 3.25 : Cinétique de croissance de la souche 1E sur l'huile d'olive comme source de carbone	143
Figure 3.26 : Test de déplacement de pétrole, diamètre de la surface halo clair (cm) en fonction du temps	143
Figure 3.27 : Optimisation de la source de carbone pour la production de biosurfactant par la souche 1E	144
Figure 3.28 : Purification du biosurfactant avec la colonne C ₁₈ en utilisant un gradient eau-méthanol	145
Figure 3.29 : Pouvoir émulsifiant de biosurfactant sur les hydrocarbures et les huiles	147
Figure 3.30 : Effet de la variation de température sur stabilité thermique de biosurfactant.....	148
Figure 3.31 : Effet de la variation de pH sur stabilité chimique de biosurfactant.....	149
Figure 3.32 : Effet de la variation de salinité sur stabilité chimique de biosurfactant.....	150
Figure 3.33 : Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche 1E	152

Figure 3.34 : Spectre UV de biosurfactant de la souche 1E	153
Figure 3.35 : Composition chimique de biosurfactant de la souche 1E	154
Figure 3.36 : Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche <i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i> 1E	156
Figure 3.37 : Analyse LC-MS de biosurfactant, fraction 3 : a- Spectre de masse ESI et la structure chimique du pic 2 (TR de 21,9min), b- MS2 du pic2, c- Structure proposée, basée sur la fragmentation de masse	157
Figure 3.38 : Solubilisation du phénanthrène en présence biosurfactant de 1E dans l'eau pure.....	160
Figure 3.39 : Comparaison de la solubilité du pétrole brut en présence de surfactant biologique (issu de la souche 1E) et chimique (Tween 80)	161
Tableau 1.1 : Production mondiale d'énergie primaire en 2008 en milliards de tep (Gtep).....	25
Tableau 1.2 : Composition élémentaire des pétroles bruts	30
Tableau 1.3 : Différents biosurfactants avec leur source microbienne	68
Tableau 2.1 : Différents appareils utilisés et leurs objectifs.....	83
Tableau 2.2 : Nature et origine des échantillons de sol utilisés pour l'isolement des microorganismes	84
Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques du biotope	103
Tableau 3.2 : Densité optique (DO _{600nm}) après 3 semaines de dégradation	119
Tableau 3.3 : (DO _{600nm}) max, Hydrophobicité maximale (% adhésion) et Tension de surface minimale (mN/m) pour les trois souches. Milieu minimum (MM), 2%v/v de pétrole	124
Tableau 3.4 : Caractérisation de la souche KC1	138
Tableau 3.5 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur la mesure de diamètre maximal de la surface halo clair (test de déplacement de pétrole)	141
Tableau 3.6 : Activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche 1E	151
Tableau 3.7 : Classification des tensioactifs en fonction de leur HLB	158

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
CMB : Concentration minimale bactéricide
CMC : Concentration micellaire critique
CMF : Concentration minimale fongicide
CMI : Concentration minimale inhibitrice
COT : Carbone organique total
CTAB : Bromure d'hexadécyltriméthylammonium
DO : Densité optique
HA : Hydrocarbures aliphatiques
HAM : Hydrocarbures aromatiques monocycliques
HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPT : Hydrocarbures pétroliers totaux
LB : Luria Bertani
MM : Milieu minimum
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
NPK : Azote-Phosphore-Potassium
 N_T : Azote total Kjeldhal
PCB : Polychlorobiphényles
SDS : Dodécylsulfate de sodium
TI : Tension interfaciale
TS : Tension de la surface
UFC : Unité Formant Colonie
 K_H : Constante de Henry
 K_{OW} : Coefficient de partage octanol-air
 P_L^0 : Pression de vapeur saturante

INTRODUCTION GENERALE

Le pétrole et ses dérivés sont, aujourd'hui encore, cités comme les plus grands responsables de la contamination de l'environnement pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois engendrer une destruction totale ou partielle des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. Le caractère lipophile des hydrocarbures est la principale source des effets toxiques en provoquant des altérations de la structure membranaire des cellules vivantes [1]. Les aliphatiques à courte chaîne et les aromatiques légers sont plus diffusibles et plus toxiques pour la faune et la flore que le pétrole lui-même [2].

On estime à 1,3 millions de tonnes la quantité de pétrole déversée annuellement dans le milieu marin par les diverses voies (marée noire, déballastage, dégazage, apports telluriques, etc.), sachant qu'une tonne de pétrole peut couvrir environ une surface de 12 km² [3]. Cependant les hydrocarbures déversés dans un environnement donné, marin ou continental, subissent une série de transformations physiques, chimiques et microbiologiques aboutissant à leur disparition totale ou partielle. Les transformations microbiologiques ou biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie d'un hydrocarbure donné déversé dans un environnement donné.

En effet, l'élimination des hydrocarbures pose de sérieux problèmes, les voies physiques et chimiques restent très limitées du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement [4]. La bioremédiation des sites contaminés est aujourd'hui reconnue comme une action complémentaire indispensable aux voies physico-chimiques pour la dégradation ultime des hydrocarbures. Elle reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse. Il s'agit d'une technique simple dont le principe repose sur la minéralisation complète des produits pétroliers, en présence des microorganismes, qui ne génère aucun sous produit toxique, par suite une meilleure protection de l'environnement [5].

La biodégradation est un processus dépendant essentiellement de la nature et de la quantité des hydrocarbures, les propriétés physico-chimiques de site contaminé et la capacité biodégradative des microorganismes.

Vu la grande variété dans la composition des hydrocarbures (alcane linéaires, cycloalcanes, polycycliques, polyaromatiques, ...), leur élimination de l'environnement n'est pas facile et nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques afin d'améliorer la biodépollution.

L'un des facteurs essentiels limitant l'action des microorganismes sur les hydrocarbures est leur faible solubilité dans l'eau, dans ce cas intervient un problème d'accessibilité. Les substrats hydrophobes ont tendance à former une phase distincte, et la faible vitesse de leur diffusion en milieu aqueux retarde leur biodégradation. Cet inconvénient est amoindri, par la dispersion en émulsion, en produisant des agents mouillants par certains microorganismes appelés biosurfactants [6]. En fait, les biosurfactants jouent un rôle important dans l'élimination des hydrocarbures en accélérant la vitesse du transfert en émulsionnant les hydrocarbures.

Ce travail de thèse s'est intégré dans le cadre des activités du Pôle d'Excellence Régional (PRE) financé par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) de Coopération Scientifique Interuniversitaire «Bioprocédés Environnementaux et Industriels». Il s'est intéressé plus spécifiquement d'une part à la biodégradation des hydrocarbures et leurs dérivés, et d'autre part à la production du biosurfactant par des souches spécifiques isolées à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie.

Les souches isolées seront d'intérêt majeur, tant sur le plan industriel que sur celui de la recherche fondamentale puisqu'elles présentent, d'une part, la microflore d'un milieu extrême et, d'autre part, qu'elles sont à l'origine de la production de très nombreuses molécules bioactives, notamment les biosurfactants.

La démarche scientifique entreprise au cours de cette étude est d'actualiser les données sur l'introduction, le transfert, le devenir et la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes telluriques présents dans nos niches

écologiques en particulier les sols anciennement contaminés par le pétrole brut. A cet effet, nous avons entrepris une étude complète sur la dégradation de pétrole brut et des composés pétroliers dont le naphtalène a été pris comme un modèle des HAP les plus toxiques. Parallèlement, une partie colossale de l'étude a été consacrée à la production, la caractérisation et l'application environnementale de biosurfactant.

Les principaux objectifs sont :

- ❖ L'isolement des souches bactériennes aérobies, à différentes températures, capables de dégrader le pétrole brut, les hydrocarbures et leurs dérivés ;
- ❖ Etude de la biodégradation de pétrole brut ;
- ❖ Etude de la dégradation du naphtalène par une souche thermotolérante ;
- ❖ Production, purification et caractérisation du biosurfactant produit par une souche mésophile.

Le présent manuscrit s'organise en trois grandes parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui présente de manière générale les HA et les HAP et dresse un état des connaissances sur :

- ✓ la formation, la composition et la production du pétrole brut,
- ✓ la pollution en hydrocarbures et leurs dérivés introduite dans le milieu : source de rejets, devenir dans le milieu et leur impact sur l'environnement et les êtres vivants,
- ✓ les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des hydrocarbures,
- ✓ les différentes méthodes d'élimination des hydrocarbures,
- ✓ la bioremédiation synthétisant l'ensemble des connaissances acquises pour l'élimination des hydrocarbures par voie biologique,

- ✓ la production des biosurfactants : propriétés physico-chimiques, classification, leur rôle dans le domaine de la protection de l'environnement et les facteurs affectant leur production.

La deuxième partie est s'intéressée au contexte expérimental : Elle incorpore toutes les informations nécessaires à la compréhension du biotope utilisé pour les prélèvements, les techniques d'isolement, analytiques et expérimentales. Cette partie comprend :

- la présentation du biotope utilisé pour l'isolement des microorganismes,
- la méthodologie du travail : Les techniques de prélèvement des échantillons de sols et d'isolement des souches bactériennes aérobies. Ainsi les méthodes d'analyses utilisées pour la caractérisation du biotope, la dégradation du pétrole brut et du naphtalène, et la production et la caractérisation de biosurfactant.

La troisième partie est consacrée aux résultats et discussion : on trouve ici les différents résultats obtenus sur :

- La caractérisation physico-chimique et microbiologique du biotope utilisé et l'isolement des souches bactériennes aérobies dégradant le pétrole brut ;
- La biodégradation du pétrole brut par trois souches performantes ;
- La dégradation du naphtalène par la souche K1C thermotolérante
- La production, la caractérisation physico-chimique et structurale et les applications environnementales du biosurfactant issus d'une souche mésophile ;
- L'identification génotypique des souches performantes, dégradant le pétrole brut, le naphtalène et productrice du biosurfactant.

Enfin, en guise de conclusion générale, nous synthétisons les principaux résultats obtenus, leur implication en termes de protection de l'environnement et nous ouvrirons les perspectives pour les recherches futures.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Le pétrole

Le pétrole brut (littéralement huile de pierre) est un liquide d'origine fossile qui est composé d'un mélange d'hydrocarbures présents dans certaines strates rocheuses. Il peut être extrait et raffiné pour produire des combustibles comme l'essence, le kérosène, le diesel, ... etc.

1.1.1. Formation de pétrole

Le pétrole est issu de la décomposition de matières organiques végétales et animales déposées dans les bassins sédimentaires (lac, lagunes, deltas ou lagons) sous forme de boue.

Deux fractions de la matière organique sédimentaire se distinguent du point de vue de sa composition :

- Le **kérogène** est la fraction insoluble dans les solvants alcalins ou organiques usuels comme l'alcool. Le kérogène est constitué de grosses molécules organiques très complexes de structure tridimensionnelle formée par des chaînes aliphatiques (*n*-alcane, méthylalcanes et isoprénoides), des alcanes polycycliques (stéranes et hopanes) et des noyaux monoaromatiques ou polyaromatiques. Il est stable et inerte chimiquement. Selon leur origine terrestre, marine et/ou lacustre, le kérogène présente des compositions chimiques très différentes. Il est à noter que le kérogène représente la plus grande partie de la matière organique sédimentaire, 95% en moyenne.
- Le **bitume** (fraction extractible ou lipidique) est la fraction soluble dans les solvants organiques. Elle est composée d'une très grande diversité de petites molécules libres.

Après son incorporation dans le sédiment, l'évolution physico-chimique de la matière organique sédimentaire est essentiellement contrôlée par la dégradation bactérienne puis par la température. Trois stades principaux sont distingués : la diagenèse, la catagenèse et la métagenèse [7, 8, 9].

- La **diagenèse** correspond au stade au cours duquel les transformations de la matière organique se produisent à basse température (inférieure à 60 °C) et à faible profondeur. Cette étape est caractérisée chimiquement par la disparition quasi-totale des acides fulviques et humiques, et par l'élimination des groupements fonctionnels oxygénés et azotés.
- La **catagenèse** correspond au stade au cours duquel les transformations physico-chimiques se produisent. Sous l'effet de la pression et de la température, le kérogène devient thermiquement instable. Au cours de ce craquage thermique, 50 à 90% de la masse du kérogène se transforme en bitume, eau, gaz carbonique et hydrocarbures liquides et gazeux. Ces processus se produisent à des profondeurs variant de 2000 à 4000 m et sous des températures de 60 à 120 °C.
- La **métagenèse**, phase ultime d'évolution du kérogène : cette dernière étape n'intervient que dans certains bassins caractérisés par des températures supérieures à 150 °C (ie: au-delà de 4000 m de profondeur). Le craquage du kérogène résiduel et surtout du pétrole et du gaz naturel aboutit à la formation de gaz secs (composés d'alcane possédant 1 à 4 atomes de carbone). Dans ce processus, le kérogène résiduel continue de s'appauvrir en hydrogène et sa composition tend progressivement vers celle du graphite. Par ailleurs, la composition des produits issus du craquage tend vers celle du méthane. La figure 1.1 représente les différentes phases de transformation de la matière organique.

Le pétrole étant plus léger que l'eau, qui occupe avec lui les pores des roches, s'en sépare par densité et tend à se mettre en mouvement (migration secondaire) pour occuper les régions hautes des réservoirs. Pour que le pétrole s'accumule il suffit donc que le réservoir soit scellé vers le haut par une roche imperméable. En tout état de cause, ces transformations sont très lentes et nécessitent plusieurs millions d'années.

Les preuves de l'origine organique du pétrole résident dans l'existence dans le brut, de molécules optiquement actives, qui ne peuvent avoir été synthétisées que par des êtres vivants.

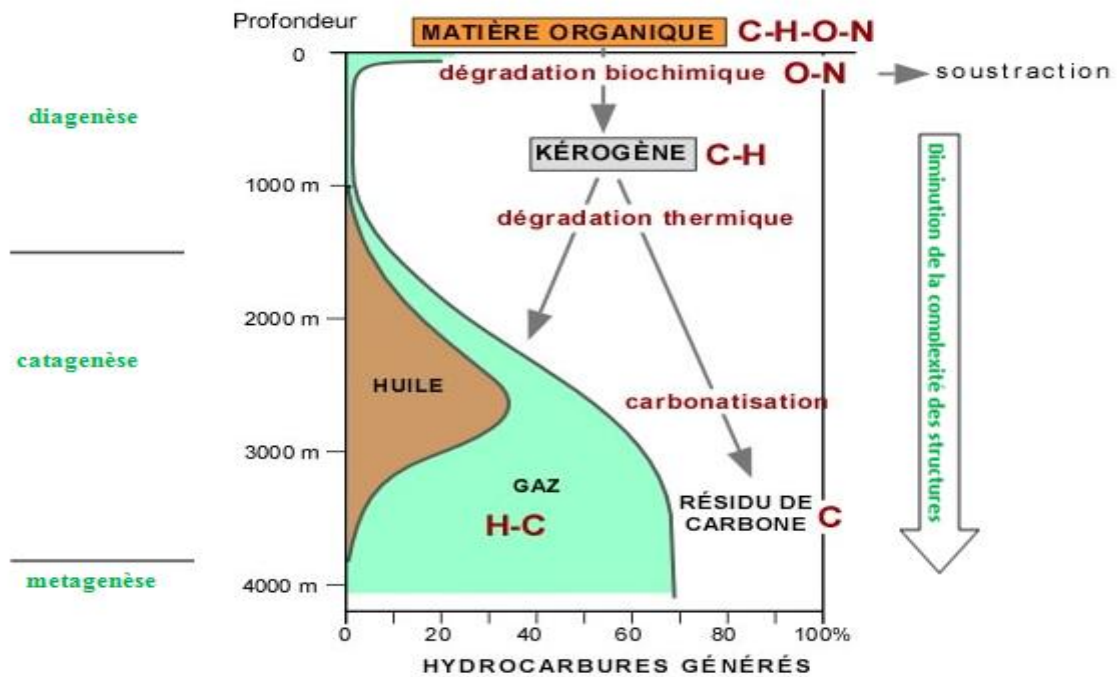


Figure 1.1 : Dégradation de la matière organique et de la formation de produits pétroliers [9]

1.1.2. Evolution des pétroles dans le système pétrolier

Le pétrole est un mélange thermodynamiquement instable dans les conditions de pression et de température de la surface du sol. Dans ces conditions, la vitesse de transformation est quasi nulle. Alors que sa composition dans les réservoirs varie en fonction du temps et de la température. Plusieurs facteurs influencent sur ses constituants : Il s'agit du craquage thermique, de la biodégradation, du lessivage à l'eau, de l'adsorption, du désasphaltage et de l'évaporation [8].

1.1.3. Pétrole, principale source d'énergie

Le pétrole, source principale d'énergie non renouvelable et base stratégique pour l'économie mondiale, a connu une évolution de son extraction et de son utilisation pendant plus d'un siècle. Suite au développement du transport et de l'industrie, la production mondiale de pétrole ne cesse de croître et se trouve en 2010 à 86,1 Mb/j. La situation en 2008 peut se résumer par le tableau 1.1, extrait des statistiques de l'IEA pour l'année 2010.

La mise au point des premiers moteurs à explosion a conduit au développement de l'automobile et de l'aviation, inventions qui ont révolutionné les modes de vie. La demande en pétrole est en effet devenue exponentielle, passant de 0,014 Mt/j en 1880 à 0,14 Mt/j en 1910, puis 1,4 Mt/j en 1950.

Tableau 1.1 Production mondiale d'énergie primaire en 2008 en milliards de tep (Gtep)
(Source : Key World Energy Statistics, IEA – 2010)

Source primaire	Gtep ¹	%
Pétrole	4,07	33,5
Charbon	3,31	27,2
Gaz naturel	2,6	21,4
Nucléaire	0,71	5,8
Hydraulique	0,27	2,2
Renouvelables	1,2	9,9
Total	12,16	100

En 1973, la demande mondiale de pétrole atteignait environ 8 Mb/j, puis en 1985, la consommation mondiale arrivait à 9,3 Mt/j. En 2000, on a enregistré 11,7 Mt/j, ce chiffre a sauté en 2010 à 12,3 Mt/j (soit 86,1 Mb/j). Le pétrole offshore poursuit

¹La tonne-équivalent-pétrole (tep) représente la quantité d'énergie contenue dans une tonne de pétrole brut, soit 41,868 Gj. Cette unité est utilisée pour exprimer dans une unité commune la valeur énergétique des diverses sources d'énergie.

sa progression et sa production a crû de 672 Mt en 1980 à 892 Mt en 1992 [3, 10]. L'évolution de la production mondiale de pétrole est donnée sur la figure 1.2.

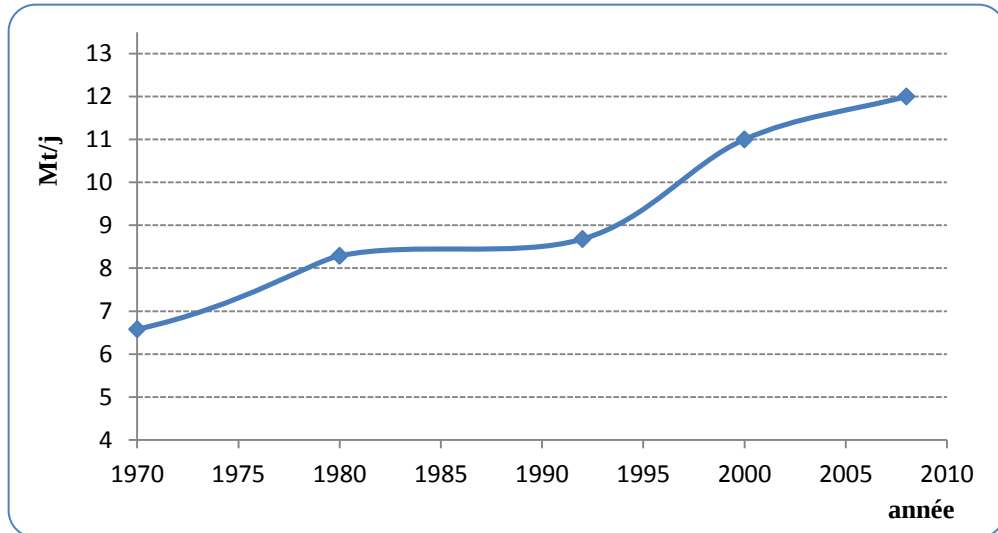


Figure 1.2 : Evolution de la production mondiale du pétrole [11]

Depuis 1973, la consommation en énergie de tous les secteurs n'a cessé d'augmenter. Parmi ceux-ci, le secteur des transports apparaît clairement comme l'utilisation principale de la ressource pétrolière, représentant 50% de la consommation de la demande mondiale de pétrole suivi par le secteur de l'industrie avec un pourcentage de 17% (figure 1.3).

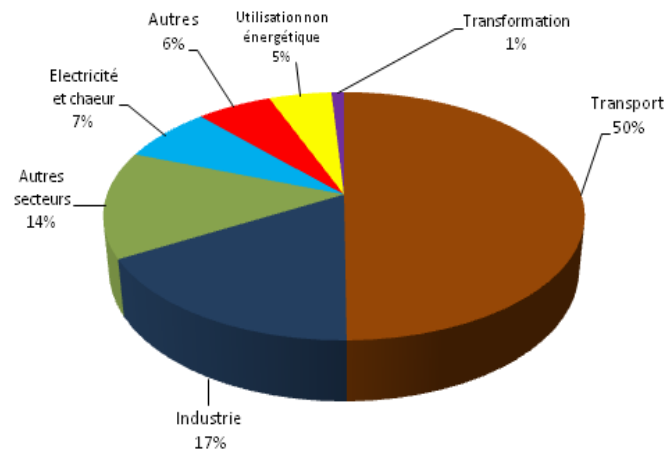


Figure 1.3 : Consommation de produits pétroliers dans le monde en 2002 [12]

En 2005, 58% de la demande de produits pétroliers avaient pour utilisation finale les transports, contre seulement 36% en 1973. Sachant que les transports dépendent à 96% des énergies fossiles, ce qui explique pourquoi ils sont responsables de plus d'un quart des émissions de gaz à effet de serre [13].

1.1.4. Pétrole, principale source de pollution

Cette source d'énergie a joué un rôle positif dans le développement industriel et le mode de vie moderne, mais le coût du progrès se montre actuellement plus élevé que prévu. Les conséquences désastreuses au niveau mondial de l'extraction, du transport et de la consommation de pétrole et leurs dérivés pour divers compartiments de l'environnement, les conditions sociales et la santé publique des populations, commence à faire l'objet d'une plus grande attention.

1.1.4.1. Pollution de l'air

L'utilisation de pétrole et leurs dérivés comme carburant, notamment l'essence et le diesel, a un impact négatif sur la qualité de l'air et par suite sur la santé humaine et l'environnement ; Les polluants issus du pétrole comprennent notamment des composés organiques volatils tels que le benzène, toluène, naphthalène, benzo(a)pyrène.

Les hydrocarbures sont à l'origine de réactions photochimiques dans l'atmosphère, amplificateur ou promoteurs du smog oxydant. Egalement, la présence d'autres polluants comme les oxydes de soufre ou les oxydes d'azote accélèrent la dégradation des hydrocarbures donnant lieu à la formation d'aldéhydes, de cétones, de nitrate de peroxyacétyl et d'ozone.

1.1.4.2. Pollution du sol

La pollution des sols résulte des conséquences des diverses activités humaines cumulées au cours du temps (industrielles, agricole, ...). Ces pollutions deviennent aujourd'hui une préoccupation majeure en raison de leurs conséquences sanitaires, environnementales et socio-économiques.

Le sol est principalement contaminé via les dépôts atmosphériques [14 ; 15], des retombées au sol d'émissions atmosphériques proches ou lointaines, notamment

des HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques), HAM (Hydrocarbures aromatiques monocycliques), PCB (polychlorobiphényles), dioxines, furannes, métaux lourds..., pouvant atteindre les nappes phréatiques. Ce risque dépend du type de pollution, de la localisation du site et de l'utilisation du sol et des eaux souterraines.

1.1.4.3. Pollution des eaux marines

Au niveau mondial, il est généralement admis que la pollution marine est principalement causée par des activités humaines basées sur terre et beaucoup moins par des activités humaines en mer. Les sources de pollutions chroniques et accidentelles par des hydrocarbures d'origine pétrolière sont multiples [16] :

- rejets industriels réglementés (raffineries, plates-formes marines, usines à gaz, industries chimiques et mécaniques, ...),
- ruissellement d'eaux urbaines et égouts non traités,
- fuites et déversements accidentels d'oléoducs et d'installations côtières et fluviales,
- exploitation des gisements de pétrole offshore,
- déversements accidentels de navires-citernes (cargaisons de pétrole brut ou de produits pétroliers, fiouls de soute) et d'autres navires (fiouls de soute),
- fuites de fioul de soute des épaves de navires coulés,
- suintements naturels de gisements de pétrole,
- retombées atmosphériques,
- rejets d'eau de nettoyage des cuves d'hydrocarbures.

Plusieurs évaluations des sources d'hydrocarbures entrant dans le milieu marin ont été effectuées depuis une trentaine d'années. Le chiffre de 1,3 Mt annuelles est considéré comme la meilleure estimation (1990 - 1999), à comparer à l'estimation du même NRC de 3,2 Mt en 1985 et à celle du GESAMP (Joint Group

of Experts on the Scientific Aspects of Marine Protection) sous l'égide de l'OMI (Organisation Maritime Internationale) de 2,3 Mt pour 1990 [17].

Selon le Programme des Nations Unies pour l'Environnement [18], le transport maritime est estimé en mer méditerranée à 30% du commerce maritime mondial et 20 à 25% du transport international d'hydrocarbures. En outre, des milliers de tonnes de déchets toxiques rejetés directement en mer par l'industrie avec plus de 60% des eaux usées urbaines rejetées sans traitement préalable en 2002.

Les conséquences de déversement des hydrocarbures dans le milieu marin sont désastreuses pour la santé et l'environnement. Cette gravité dépend, dans une large mesure mais pas exclusivement, de la quantité et le type d'hydrocarbures déversés. Le lieu du déversement est primordial pour son impact (déversement au large, à la côte, ... etc.).

Le déversement de pétrole dans le milieu marin se manifeste tout d'abord par la formation d'une nappe à la surface. La formation de ce film d'hydrocarbures empêche l'oxygénation du milieu conduisant à : asphyxie d'organismes aérobie, prolifération de flore anaérobie, production de mauvaises odeurs. En outre, la contamination des produits de la pêche qui deviennent impropres à la consommation.

1.1.5. Composition du pétrole brut

Le pétrole brut est un mélange très complexe de composés organiques dont la composition chimique varie énormément selon son origine géographique et géologique [9]. Les hydrocarbures qui constituent la fraction la plus importante représentent entre 65 et 95% de la plupart des pétroles bruts. Les métaux sont également présents mais à l'état de traces, comme le vanadium (75% de la teneur en métaux) suivi du nickel. La composition élémentaire des pétroles bruts est représentée dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Composition élémentaire des pétroles bruts [19]

Composants	% poids
Carbone	83 à 87
Hydrogène	10 à 14
Soufre	0,5 à 6
Azote	0,1 à 2
Oxygène	0,1 à 1,5
Métaux	< 0,1

Si la composition élémentaire globale des pétroles est relativement fixe, la structure chimique de leurs constituants varie plus largement, ce qui entraîne une grande diversité des propriétés physiques (densité, viscosité) ainsi que des teneurs très variables dans les différents types de produits obtenus par raffinage.

On peut admettre qu'un pétrole brut contient quelques centaines de milliers de molécules différentes ; c'est la raison pour laquelle l'isolement et l'identification de celles-ci n'ont pu être faits que pour quelques centaines d'entre elles, les fractions plus légères étant les mieux connues [20 ; 21]. La figure 1.4 représente les différentes structures existant dans le pétrole brut.

Il faut par ailleurs retenir qu'on trouve, dans les tissus des cellules de certaines plantes et certains animaux, des hydrocarbures naturels, dits d'origine biogénique récente, par opposition avec les hydrocarbures d'origine fossile.

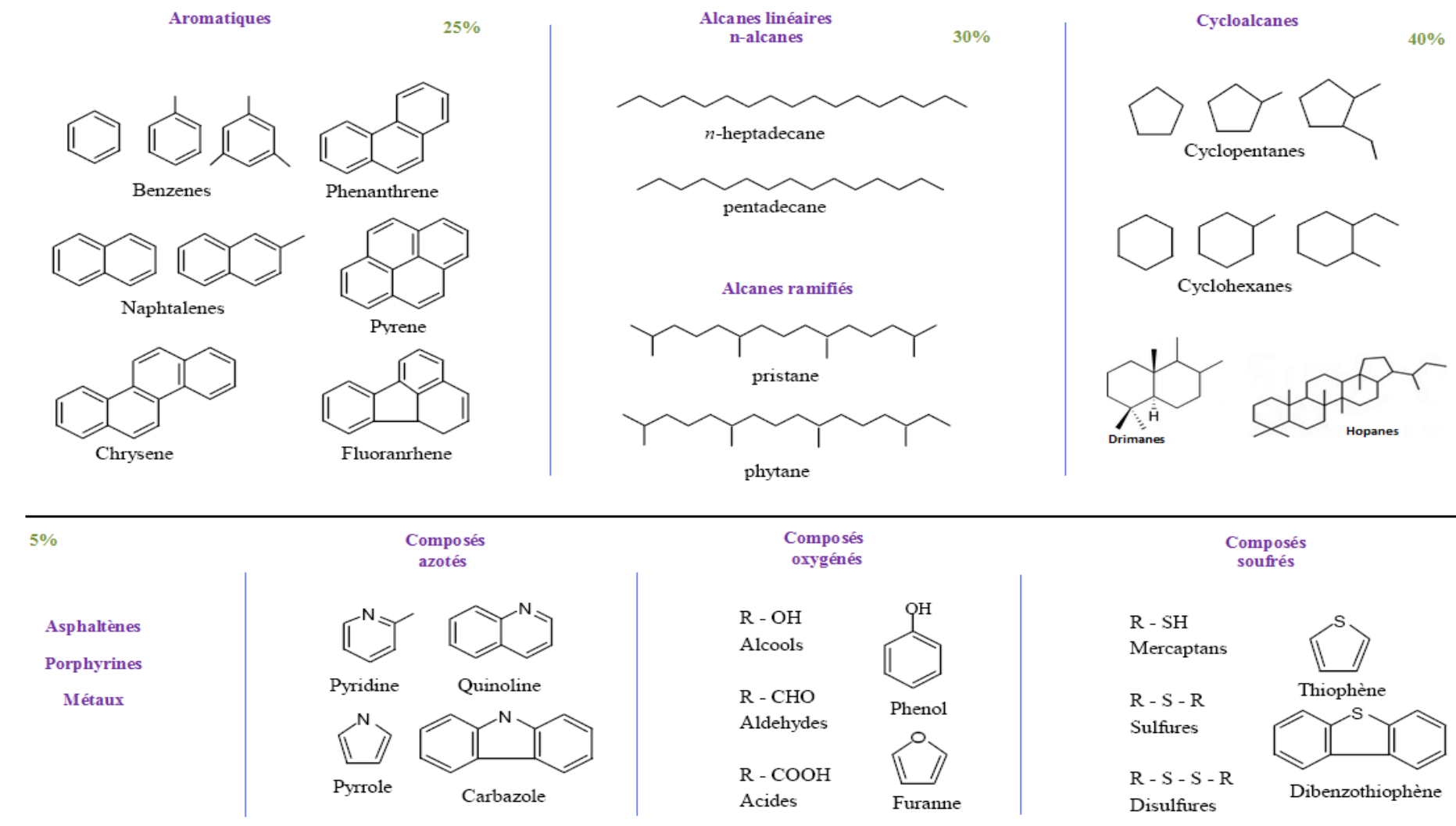


Figure 1.4 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts [9]

1.1.6. Classification des composés pétroliers

La composition des hydrocarbures n'est exprimée qu'à travers la définition de fractions regroupant un certain nombre de molécules qui présentent des similitudes. Il existe deux procédés principaux pour caractériser le pétrole : la distillation fractionnée et l'analyse SARA.

1.1.6.1. Distillation fractionnée

Grâce à la distillation, on sépare le pétrole en différentes fractions suivant leurs températures d'ébullition croissantes. Par distillation à pression atmosphérique on obtient d'abord trois coupes principales :

- Les gaz et les essences en tête de la colonne de distillation dans laquelle la température d'ébullition est inférieure à 180 °C.
- Les distillats moyens comme le fuel-oil, le gasoil et le kérosène obtenus à une température comprise entre 180 °C et 350 - 370 °C.
- Le résidu de distillation en fond de colonne.

1.1.6.2. Analyse SARA

Le fractionnement SARA (**S**aturés, **A**romatiques, **R**ésines et **A**sphaltènes) consiste à séparer les constituants des composés pétroliers en quatre grandes familles de composés selon la différence de leur solubilité dans les solvants organiques [22 ; 23]. Cette méthode est schématisée dans la figure 1.5 :

- les hydrocarbures saturés.
 - les hydrocarbures aromatiques.
 - les résines.
 - les asphaltènes.
- ❖ Les hydrocarbures saturés sont constitués de paraffines normales (linéaires), d'iso-paraffines (ramifiés) et de cycloparaffines (naphtènes) qui peuvent être monocycliques ou polycycliques.

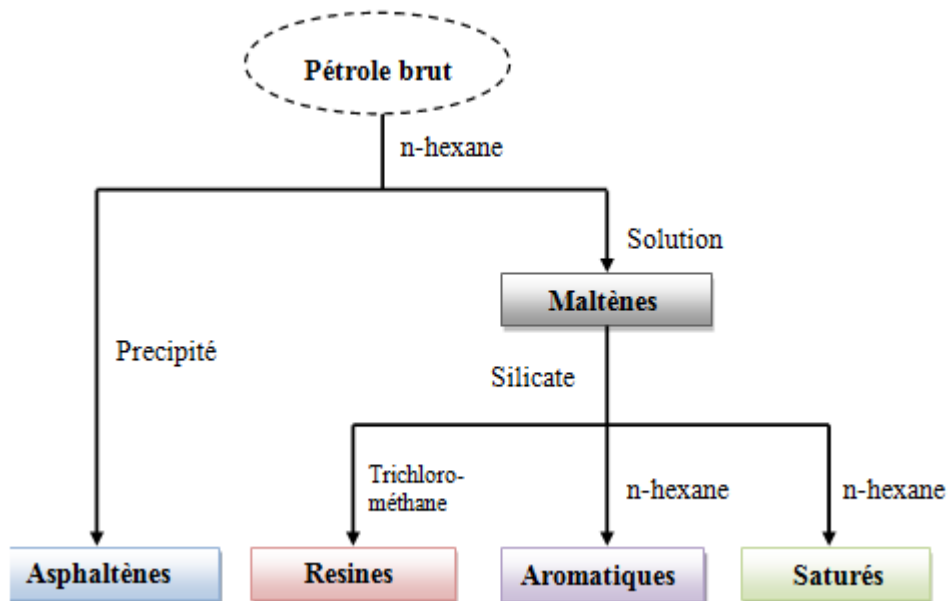


Figure 1.5 : Fractionnement SARA

- Les alcanes linéaires (*n*-alcanes) dont la formule générale chimique est C_nH_{2n+2} , le *n* variant de 7 à 70, formés de chaînes carbonées linéaires, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier). La quantité des *n*-alcanes dépend en grande partie de la nature de la matière organique originelle.
- Les alcanes ramifiés dérivent des systèmes linéaires en remplaçant un ou plusieurs atomes d'hydrogène par des groupes alkyles. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.

Il faut noter que les chaînes insaturées telles que les alcènes, les alcynes et leurs dérivés cycliques sont par contre rarement présents dans les pétroles en raison de leur faible stabilité [24].

- Les hydrocarbures alicycliques peuvent être monocycliques ou polycycliques (cycles à 5 ou 6 atomes de carbone) avec un ou plusieurs groupements paraffiniques linéaires ou ramifiés (groupes alkyles). Les monocycles et les bicycles représentent habituellement 50 à 55% de la totalité des cycloalcanes.

- ❖ La famille aromatique ne comprend que des hydrocarbures insaturés. Elle rassemble tous les composés renfermant un ou plusieurs noyaux aromatiques. Les composés monocycliques contenant un seul cycle benzénique comme le benzène, le toluène et le xylène. Les hydrocarbures aromatiques contenant plusieurs noyaux aromatiques accolés sont appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Certains cycles aromatiques peuvent être associés à des noyaux (cycle à 5 ou à 6 atomes de carbone) saturés (naphtéo-aromatiques) ou substitués (composés alkylés) [25].
- ❖ Les résines constituent la fraction polaire se retrouvant dans la fraction soluble dans les solvants de type *n*-alcanes. Ils regroupent essentiellement les composés contenant un ou plusieurs hétéroatomes (O, N et S) comme : Alcools, phénols, acides, pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes, mercaptans, ...
- ❖ Les asphaltènes représentent la fraction du pétrole insoluble dans les solvants de types *n*-alcanes (*n*-heptane), ils sont constitués principalement de noyaux aromatiques condensés avec des chaînes aliphatiques courtes contenant des atomes de N, S et O (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) [26] dont les masses moléculaires sont comprises entre 200 et 1500 Da [27]. D'une façon générale, les bruts lourds renferment beaucoup de composés asphaltiques (Boscan, 16 % en poids), certains bruts légers n'en renfermant pas ou très peu (Hassi-Messaoud, 1%).

1.2. Les hydrocarbures

La principale source actuelle d'hydrocarbures est le pétrole brut suivi par le charbon, les êtres vivants, animaux et plantes, constituent une dernière source pour certains hydrocarbures. Les sables et les schistes bitumineux actuellement peu exploités constituent des réserves d'hydrocarbures.

1.2.1. Propriétés physico-chimiques des hydrocarbures

La connaissance des propriétés physico-chimiques du polluant est indispensable pour évaluer l'impact potentiel des composés dans l'environnement. Elles nous permettent de mieux prévoir leur répartition, ainsi que leur comportement dans les différents compartiments de l'environnement. En effet, les hydrocarbures sont caractérisés par [28, 29] :

- ✓ La solubilité traduisant la mobilité et la biodisponibilité du polluant ;
- ✓ La pression de vapeur saturante (P_L^0), qui reflète la volatilité et donc la capacité d'un composé à rester en phase gazeuse ou à se volatiliser ;
- ✓ La constante de Henry (K_H), qui est caractéristique de l'équilibre entre les phases gazeuse et aqueuse ;
- ✓ Le coefficient de partage octanol-air (K_{OW}), qui reflète l'affinité d'un composé pour la matière organique. Cet indice permet notamment de prévoir leur bioaccumulation.

Généralement, les hydrocarbures sont des composés non polaires et très hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Les hydrocarbures ont des comportements différents dans l'environnement. De façon générale, plus le nombre d'atomes de carbone de la molécule hydrocarbonée est important, plus la solubilité, la volatilité et la biodégradabilité sont faibles ; au contraire, l'adsorption sera importante pour une molécule présentant un grand nombre d'atomes de carbone (les propriétés physico-chimiques des seize HAP prioritaires sont données à l'annexe 1).

1.2.1.1. Les hydrocarbures saturés

Les alcanes sont des hydrocarbures saturés, constitués seulement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils peuvent être linéaires (*n*-alcanes), cyclique (cycloalcanes) ou ramifiée (isoalcanes). Selon l'origine du pétrole brut, ils peuvent constituer jusqu'à 50% du pétrole. Ils sont également synthétisés par de nombreux organismes vivants (plantes, algues vertes, bactéries et animaux) [30].

Les alcanes sont sous l'état gazeux jusqu'à $n = 4$, liquide ($n < 16$) et solide au delà. Ils sont caractérisés par une faible polarité ($\text{Log}K_{OW} = 3,5 - 5$), donc une certaine hydrophobicité, une bonne volatilité pour les alcanes de C_5 à C_{12} (température d'ébullition comprise entre 40 et 200 °C) et une volatilité un peu plus modérée pour les alcanes de C_{12} à C_{26} (température d'ébullition comprise entre 200 et 300 °C). Il faut noter que les molécules ramifiées sont plus volatiles que les linéaires [21].

Par ailleurs, les alcanes présentent une très grande stabilité chimique et sont très peu réactifs. Ils ne sont réactifs que sous des conditions radicalaires, de haute température ou par photochimie. Les alcanes sont tous absolument insolubles dans l'eau.

La température d'ébullition des cycloalcanes (C_nH_{2n}) varie de 49,3 °C pour le cyclopentane à 84,7 °C pour le cyclohexane, et leur point de fusion n'excède pas les 100 °C. Toutefois, les cycles à sept atomes de carbone et plus, ne devraient pas exister ou être très instables en raison des tensions plus ou moins importantes imposés à la molécule [20].

1.2.1.2. Les hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques comprennent les monoaromatiques (benzène et dérivés monoalkylés, polyalkylés et cycloparaffiniques) et les polyaromatiques de 2 à 7 cycles benzéniques fusionnés [31, 32], dont les molécules constituent essentiellement les HAP. Cet agencement des cycles pouvant être linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou bien groupé (pyrène). Les HAP peuvent contenir en outre des cycles paraffiniques et des groupements alkyles branchés sur les noyaux. Dans l'environnement, les HAP composés de 2 à 7 noyaux aromatiques sont les plus présents et les plus mobiles [33].

Les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes) sont tous liquides, très volatils et sont très inflammables [34]. Ils sont faiblement solubles dans l'eau [35] et donc plus mobiles dans les eaux et dans les sols d'où, leur impact sur l'environnement. Par ailleurs, Ils sont facilement accessibles aux microorganismes sous forme solubilisée [36]. les valeurs du coefficient de partage octanol/eau

($\log K_{OW}$) sont comprises entre 2 et 4 traduisant une adsorption modérée par la phase organique [35].

A l'état pur, les HAP se trouvant sous forme solide, sont souvent colorés et cristallins à température ambiante. Leurs masses moléculaires variant de 128 à 300 g.mole⁻¹. Leurs persistances augmentent avec le nombre de cycles de la molécule. Par exemple, le naphthalène et les composés de faibles poids moléculaires, étant plus solubles dans l'eau et plus volatiles, donc les plus mobiles dans l'environnement. Ils sont peu persistants et donc peu bioaccumulables [37, 38, 39]. En revanche, les composés de poids moléculaires élevés sont très persistants et par conséquent bioaccumulables.

Les HAP ont un caractère fortement hydrophobe avec un $\log K_{OW}$ entre 3,37 et 7,64 [40], témoignant d'un important potentiel d'adsorption sur les matières organiques particulaires en suspension dans l'air ou dans l'eau, ainsi que d'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes. Le $\log K_{OW}$ augmente avec le poids moléculaire et également avec la présence de groupements alkyles [41, 42, 43, 44].

On conclut que leurs propriétés physico-chimiques les rendent récalcitrants à la dégradation naturelle, et donc persistants sur les sites contaminés. A titre d'exemple, la demi-vie du phénanthrène est de 16 à 124 jours, mais celle du benzo[a]pyrène peut atteindre jusqu'à 4 années [45].

1.2.2. Toxicologie des hydrocarbures

La toxicité des hydrocarbures pétroliers dépend de leur solubilité et biodisponibilité, on suppose que la fraction soluble dans l'eau est la plus nocive pour l'environnement car elle est directement disponible pour l'absorption par les organismes. La toxicité des hydrocarbures varie d'une famille à une autre, ainsi qu'au sein de la même famille la toxicité varie d'un composé à un autre. Les voies d'absorption des hydrocarbures par l'homme sont [46] :

- les voies respiratoires via l'inhalation de particules atmosphériques contaminées ou de fumées de cigarettes. Le taux d'absorption par les

poumons dépend du type d'hydrocarbure, de la taille et de la composition des particules sur lesquelles ils sont adsorbés,

- le système digestif via l'ingestion de produits alimentaires contaminés, les hydrocarbures sont absorbés au niveau intestinal et métabolisés au niveau du foie,
- les hydrocarbures absorbés par voie cutanée sont, en quelques minutes, distribués à l'ensemble de l'organisme.

1.2.2.1. Les hydrocarbures saturés

La toxicité des hydrocarbures aliphatiques est moindre que celle des HAP. Cependant, l'inhalation de *n*-alcane de C₅ à C₈ est susceptible de provoquer une dépression du système nerveux central et une exposition au *n*-hexane et cyclohexane peut provoquer une perte de myéline ou une dégénérescence des axones. Les alcanes liquides (C₅ - C₁₆) sont des solvants de graisses. Le contact cutané répété ou prolongé entraîne une irritation [47].

Les cycloparaffines peuvent produire des effets toxiques par inhalation et ingestion, et ils ont une action irritante et dégraissante sur la peau. Généralement, les cycloparaffines sont des anesthésiques et des dépresseurs du système nerveux central, mais leur toxicité aiguë est faible et, du fait qu'ils sont presque complètement éliminés de l'organisme, le risque d'intoxication chronique est relativement peu important.

1.2.2.2. Les hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures monoaromatiques (BTEX) sont toxiques pour l'organisme humain notamment le benzène qui est cancérogène. Généralement, ils provoquent des mutations, malformations congénitales, perturbations endocriniennes, des troubles nerveux et des maladies du foie et des effets sur le système nerveux central.

Les HAP présentent différentes propriétés toxiques suivant le composé considéré. Les principaux effets toxiques sont la cancérogénicité [48], la génotoxicité et la

tératogénécité [49, 50]. Les propriétés cancérogènes des HAP n'ont été prouvées que pour le benzo(a)pyrène [51], le chrysène (Horton et Christian, 1974), le dibenzo(a,h)anthracène [52], le naphthalène [53], le benzo(b)fluoranthène [54], le benzo(k)fluoranthène [55] et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène [56].

Plusieurs facteurs favorisent le caractère cancérogène : le nombre de cycles (ce sont les HAP à 4 noyaux aromatiques ou plus qui sont généralement cancérogènes), l'arrangement stérique de la molécule (les molécules planes sont moins toxiques). De plus, pour être cancérogène, le HAP doit posséder une région baie et une région fjord [57] comme le montre la figure 1.6.

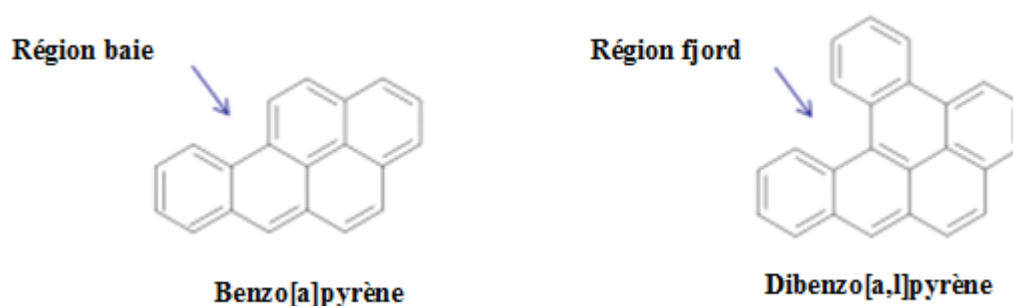


Figure 1.6 : Caractéristique structurale des HAP ayant un potentiel cancérogène

En raison de leur caractère lipophile, les HAP s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques. La plupart des organismes ont la capacité de métaboliser les HAP, par action de l'enzyme cytochrome P450, en époxydes-diols. Ces derniers sont considérés comme étant les principaux agents cancérogènes pour la plupart des HAP, bien que d'autres intermédiaires réactifs puissent également être importants [58]. En effet, les HAP deviennent toxiques notamment lorsque les métabolites hydrophiles se fixent sur les structures cellulaires (protéines, ADN) et génèrent donc la formation d'adduit. La

modification de l'ADN induit alors des effets cancérogènes et mutagènes. Tous ces modèles provenant d'études animales *in vitro* et *in vivo* indiquent que ces mécanismes sont vraisemblablement pertinents pour les humains [59].

Finalement, seize HAP ont été retenus par l'Agence pour la Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA, US) [41] comme polluants organiques prioritaires et suscitent donc un intérêt particulier dans la surveillance de l'environnement.

1.2.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

1.2.3.1. Milieu marin

Le comportement des hydrocarbures en milieu marin dépend du type et de la quantité de pétrole déversé, du lieu du déversement (zone côtière, estuaire, au large) des conditions météorologiques (marée, courants, direction du vent, ensoleillement) et de la dynamique de l'écosystème touché. Du fait de la très faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau et de leur densité qui est légèrement inférieure à l'unité, les hydrocarbures rejetés dans les océans s'étalent à la surface avant de subir une série de modifications suite à l'action de facteurs abiotiques et biologiques [60, 61].

- **Etalement** : Après le déversement du pétrole, il commence à s'étaler sur toute la surface de la mer formant une seule nappe (1m^3 de pétrole peut couvrir 1km^2) dont l'épaisseur varie entre 0,01 et 3,0 mm [62]. La vitesse de propagation dépend notamment de la viscosité du pétrole.
- **Evaporation** : Généralement, l'évaporation est limitée aux composés ayant moins de 15 atomes de carbone (température d'ébullition inférieure à $270\text{ }^\circ\text{C}$) [63, 64, 65]. Le taux et la vitesse d'évaporation sont fortement liés à la volatilité du pétrole, la vitesse des vents et la température de l'eau.

L'évaporation influe positivement sur la toxicité du pétrole déversé, la plupart des composés légers (inférieur à C_{10}) sont généralement considérés comme toxiques à cause de leur forte biodisponibilité. Ces composés subissent une

évaporation dans les premières heures de déversement entraînant une réduction de la toxicité du pétrole déversé.

- **Dissolution** : Les hydrocarbures solubles présentent un effet négatif pour l'environnement, ils sont absorbés par les organismes aquatiques. La solubilité est fonction de la structure et du poids moléculaire du composé. Aussi, Il a été démontré que la solubilité des hydrocarbures dans les eaux marines est plus faible qu'à celle de l'eau distillée [66].
- **Emulsification** (sous l'effet de l'agitation) : l'émulsification du pétrole est le processus par lequel les gouttelettes de l'eau de mer se retrouvent dans l'huile, l'émulsion ainsi formée est généralement très visqueuse et est persistante plus que le pétrole lui-même. Les huiles, dont la teneur en asphaltènes est élevée (supérieure à 0,5%), ont une tendance à former des émulsions stables pouvant persister pendant plusieurs mois après le déversement de pétrole.
- **Sédimentation** : elle concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. La sédimentation conduit à la formation d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.
- **Photo-oxydation** (sous l'effet de l'énergie solaire) : ce phénomène conduit à la formation de composés solubles dans l'eau (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxydes) qui sont toxiques pour les communautés microbiennes [67, 68]. L'efficacité de la photo-oxydation dépend de la nature des hydrocarbures [60].
- **Dispersion** : Par l'action des vagues et de la turbulence, la nappe se décompose en fragments et en gouttelettes. Les fines restent en suspension alors que les plus grandes ont tendance à monter à la surface de l'eau reformant une nappe d'épaisseur très mince. A ce stade, la nappe a une surface plus grande qu'avant la dispersion, ce qui favorise d'autres processus naturels tels que la dissolution et la biodégradation. La vitesse de dispersion

dépend, dans une large mesure, de la nature de pétrole déversé et de l'état de la mer.

- **Biodégradation** : la biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. L'eau de mer contient une large gamme de microorganismes pouvant dégrader partiellement ou complètement le pétrole en des composés solubles dans l'eau et finalement en dioxyde de carbone et en eau.

1.2.3.2. Sol

Le devenir des hydrocarbures dans les sols dépend d'un ensemble de processus responsables de la volatilisation, de l'immobilisation, de la mise en solution, du transport et des transformations chimiques et biochimiques des molécules. Ainsi, la mobilité des hydrocarbures dans les sols fait intervenir les phénomènes suivants : la solubilisation, la percolation, l'adsorption et la volatilisation. La figure 1.7 résume les différents mécanismes intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol.

Le degré de pénétration des hydrocarbures est fonction de la nature et de la structure du sol, comme de la quantité et de la nature du produit déversé. Un produit de faible viscosité pénètre rapidement dans un sol sec et poreux et s'étale donc peu à la surface. Inversement, sur un sol saturé d'eau de type argileux, le produit s'étale largement d'autant plus que sa viscosité est relativement élevée.

Les déversements de pétrole dans l'environnement terrestre se caractérisent essentiellement par un mouvement vertical du pétrole dans le sol, L'infiltration empêche les pertes par évaporation des hydrocarbures volatils pouvant être toxiques pour les microorganismes. Les matières particulaires peuvent réduire, par l'adsorption, la toxicité des produits pétroliers. Cependant, l'absorption et l'adsorption des hydrocarbures par des substances humiques conduisent probablement à la formation des résidus persistants [69].

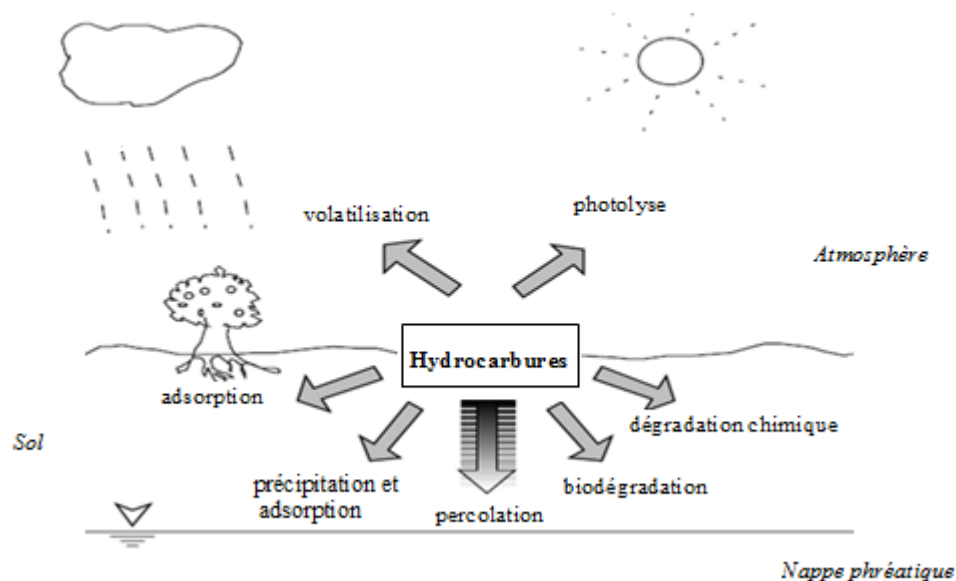


Figure 1.7: Différents processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol [70]

A la différence des écosystèmes aquatiques, les écosystèmes terrestres contiennent des concentrations élevées de matières organiques et inorganiques et un grand nombre de microorganismes. Habituellement, une fraction importante de la communauté microbienne utilise les hydrocarbures, ce qui augmente rapidement son nombre quand il y a une contamination aux hydrocarbures. Cependant, la présence de population microbienne autochtone, qui est très bien adaptée à un environnement de sol particulier, serait susceptible d'influer négativement sur la capacité des microorganismesensemencés.

1.3. Remédiation des sites Contaminés aux hydrocarbures

Les activités humaines ont contribué à dégrader les écosystèmes en rejetant des quantités croissantes d'hydrocarbures ayant un effet désastreux sur les êtres vivants. La prise de conscience de ces risques conduit à la nécessité d'éliminer ou de réduire cette pollution par des techniques adéquates. Plusieurs méthodes physico-chimiques et biologiques ont été appliquées.

1.3.1. Milieu marin

La remédiation physico-chimique du milieu marin contaminé par les hydrocarbures dépend de plusieurs facteurs ; la nature et quantité du produit déversé, le lieu de l'accident, les conditions météorologiques et les caractéristiques environnementales [71, 72] :

- Traitement physique : La récupération des hydrocarbures en mer consiste à confiner les hydrocarbures flottants à l'aide de barrages remorqués par des navires et à les récupérer sur la surface de la mer ou à les brûler. Lorsque la récupération par écrémage et pompage est devenue inefficace du fait de la viscosité importante du polluant, on utilise des chaluts de surface ; les chaluts permettent la récupération dynamique en mer de produits solides, extrêmement visqueux, fortement amalgamés ainsi que de macro déchets. Afin d'éliminer des traces d'hydrocarbures dans les dernières étapes du nettoyage, des matériaux absorbants ou adsorbants sont utilisés.
- Traitement chimiques (dispersants) : L'application de dispersants sur la nappe de pétrole est une méthode d'intervention couramment employée (pour 18% des catastrophes pétrolières mondiales, [73]). Cette méthode est complémentaire de la récupération mécanique.

Les dispersants sont des produits chimiques réduisant la tension superficielle eau pétrole. Ils facilitent ainsi la fragmentation du pétrole en microgouttelettes en augmentant leur stabilité en suspension dans la colonne d'eau limitant ainsi les processus de renaissance du pétrole en surface. En fait, cette dispersion, renforcée par l'agitation de la mer, accélère le processus de biodégradation des hydrocarbures [74, 75, 76]. Il est à signaler que la viscosité du pétrole est un des premiers facteurs à prendre en compte puisqu'elle régit le phénomène de dispersion. En effet, l'efficacité d'un dispersant va être inversement corrélée à la viscosité du pétrole.

1.3.2. Sol

Les méthodes utilisées dans la réhabilitation du sol sont diverses. Cependant, avant de faire le choix d'une technique particulière de dépollution, plusieurs paramètres sont à prendre en compte : type et comportement du polluant (volatilité, adsorbabilité, polarité, ...), diversité des conditions locales (nature du sol, de la nappe, accessibilité, disponibilité de surfaces utilisables à proximité, zone urbaine ou non), pollution récente ou ancienne, étendue ou non. On distingue quatre types de dépollution: physique, chimique, thermique et biologique.

➤ **Traitement physique**

- **Solidification et stabilisation** : Cette méthode s'applique principalement sur des sols excavés. L'ajout des réactifs (pouzzolanes, cimentants, etc.) au sol contenant le contaminant, forme ainsi un composite non réactif. La stabilisation peut être réalisée par l'utilisation de la chaux ou de l'argile.
- **Excavation** : Elle consiste à transporter les sols excavés vers des centres de traitement spécialisés. Le procédé consiste à ajouter de l'eau au sol, le mélange homogène est tamisé en plusieurs fractions. Les polluants se concentrent dans les fractions les plus fines que l'on sépare par un traitement approprié.

➤ **Traitement thermique**

Le procédé thermique est réalisé par **l'incinération** qui consiste à détruire les matières organiques. Ce procédé passe par deux étapes : une première à 400 °C, dite de volatilisation et une seconde dite de destruction à une température supérieure à 1000 °C.

➤ **Traitement chimique**

- **L'ozonation** : L'ozone est un oxydant puissant, instable en milieu aqueux et à forte réactivité. De ce fait, l'ozone a donc une grande capacité d'attaquer les

composés organiques et les métaux. Il agit selon deux voies, la première, qualifiée de directe, met en jeu la molécule d'ozone, l'autre, dite indirecte, met en jeu des radicaux hydroxyles issus de l'autodécomposition de l'ozone. Dans le but d'améliorer l'efficacité de l'oxydation par l'ozone, il est possible de lui associer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2/O_3).

➤ **Traitement biologique**

Les procédés de décontamination des sols par voie biologique sont de plus en plus utilisés, puisqu'ils n'engendrent que de faibles coûts, sont faciles à implanter et laissent la structure du sol intacte. Ainsi, les sols traités peuvent être réutilisés à des fins agricoles ou industrielles en fonction de l'importance de la contamination.

- **Bioslurry** : le principe consiste à réaliser et faciliter la biodégradation dans un contenant installé sur le site, en ajoutant au sol les nutriments et l'oxygène nécessaires aux microorganismes. Le sol est excavé et subit diverses opérations de broyage, tamisage et d'homogénéisation ; il est ensuite mélangé à de l'eau.
- **Landfarming** : le sol est étalé après excavation sur une grande surface imperméable, sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres et la terre est ensuite retournée avec d'éventuels ajouts favorisant la biodégradation.
- **Bioventing** : l'aération du sol (injection d'air) fournit aux microorganismes l'oxygène nécessaire à la biodégradation des polluants organiques. Il est également possible d'injecter de l'eau oxygénée (H_2O_2) qui est une source d'oxygène pour les bactéries. L'eau oxygénée et des nutriments sont injectés dans le sol.

L'amélioration de la biodégradation des hydrocarbures peut être réalisée par l'ajout d'agents tensio-actifs. A cause de leur faible toxicité, les biosurfactants synthétisés par les microorganismes semblent mieux adapter à cette méthode.

D'autres méthodes chimiques et plus récemment électrochimiques, ont été appliquées pour, soit transformer les polluants organiques en composés moins toxiques qui pourront par la suite subir un traitement biologique, soit minéraliser totalement ces polluants. Il s'agit, la plupart du temps, de procédés d'oxydation avancée. L'objectif est de générer, dans le milieu aqueux, des radicaux hydroxyles $\text{OH}^\bullet$. En effet, le radical $\text{OH}^\bullet$ est un oxydant plus puissant que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou l'ozone O_3 . On peut distinguer quatre types de procédé d'oxydation avancée : (a) les procédés d'oxydation chimique en phase homogène ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ et $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$), (b) les procédés photocatalytiques en phase homogène et/ou hétérogène ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV et $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$; TiO_2/UV), (c) les procédés d'oxydation sonochimique (d) les procédés d'oxydation électrochimique (électro-Fenton). L'efficacité de ces procédés dépend de nombreux paramètres tels que la concentration en oxydant, l'intensité de la lumière UV, le pH, la température, etc. [77, 78, 79, 80, 81].

1.4. Biodégradation des hydrocarbures

1.4.1. Généralités

L'élimination des hydrocarbures par voie biologique est le processus prépondérant dans les sites pollués. De ce fait, une très grande variété de microorganismes (bactéries, champignons, levures et algues unicellulaires) peut utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Une large gamme d'études a porté sur la biotransformation, la biodégradation et la biorestauration des hydrocarbures pétroliers [82, 83, 84, 85, 86].

Les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont très solubles dans l'eau et par conséquent très toxiques pour les microorganismes. Ils peuvent interagir avec leur membrane cellulaire. Ces interactions conduisent à des changements structuraux et fonctionnels de cette dernière, ce qui par conséquent, peut diminuer la croissance et l'activité cellulaire [87, 88, 89].

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont considérés comme des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes présentant des potentialités élevées de dégradation des hydrocarbures et leurs dérivés [90, 91, 92]. Les travaux de

recherche récents s'intéressent à l'isolement de microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures dans des conditions extrêmes (température, sel, concentration en hydrocarbures, nutriments et pH). Parmi ceux-ci :

Les bactéries : *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Sphingomonas sp.*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes* et *Flavobacterium sp.*

Les champignons : *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cephalosporium*.

Les levures : *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum sp.*, *Mucoides* et *Trichosporon*.

Les microalgues : *Prototheca zopfi*.

On distingue deux grandes voies métaboliques : aérobie et anaérobie. Dans le premier cas, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène alors que, dans le deuxième cas, ceux sont des composés autres que l'oxygène (nitrate (NO_3^-), manganèse (MnO_2), fer ferrique (Fe^{3+}), sulfate (SO_4^{2-}), dioxyde de carbone (CO_2) ou la molécule elle-même (fermentation)). Le rendement énergétique du catabolisme dépend de l'accepteur et du donneur d'électron utilisés. Cependant, la dégradation aérobie a été généralement considérée comme une approche prédominante et efficace pour la dépollution des sites contaminés [21, 93].

1.4.2. Mode d'action des microorganismes

A l'exception de certains genres de bactéries et champignons produisant des exoenzymes, les enzymes doivent accéder directement au contaminant pour le métaboliser, cet accès suppose le transport du substrat à travers la membrane cellulaire vers l'intérieur de la cellule microbienne. D'une façon générale, ce mode d'action peut être réparti en quatre étapes [94, 95, 96] :

- Les processus métaboliques optimisant le contact entre les cellules microbiennes et les hydrocarbures. Ces derniers doivent être accessibles aux microorganismes ayant des activités de biodégradation. Par exemple, les

hydrocarbures sont insolubles dans l'eau et leur dégradation nécessite la production de biosurfactants. Cependant, les microorganismes peuvent développer d'autres mécanismes en modifiant les propriétés de surface cellulaire (comme hydrophobicité) améliorant ainsi la biodisponibilité du contaminant [97, 98, 99] ;

- L'attaque intracellulaire initiale des hydrocarbures est un processus oxydatif nécessitant l'activation et l'incorporation d'oxygène : cette réaction clé enzymatique est catalysée par les oxygénases et les peroxydases ;
- Les voies de dégradation périphérique qui convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires, par exemple, le cycle d'acide tricarboxylique (TAC) ;
- La biosynthèse de la biomasse à partir des métabolites précurseurs centraux, par exemple, l'acétyl-CoA, succinate et pyruvate.

1.4.3. Mécanismes de biodégradation aérobie des hydrocarbures

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence différents processus utilisés par les microorganismes pour métaboliser les hydrocarbures [100, 101, 102, 103, 104, 105]. Dans les premières étapes du métabolisme, l'oxygène dissous est utilisé en tant que co-substrat, et en tant qu'accepteur d'électrons dans les dernières étapes qui servent à la production d'énergie.

1.4.3.1. Les hydrocarbures saturés

1.4.3.1.1. *n*-alcanes

Plusieurs études ont porté sur les différents aspects physiologiques et biochimiques, ainsi que sur les enzymes impliquées et les voies responsables de la dégradation des alcanes. Le mécanisme peut varier selon l'espèce bactérienne considérée, la nature du substrat et les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement [102, 106, 107, 108, 109, 110].

En comparaison aux autres composés hydrocarbures, les *n*-alcanes sont les plus facilement biodégradables. Néanmoins, les alcanes à courte chaîne (C₅ à C₁₀) sont reconnus toxiques pour de nombreux microorganismes ; ces molécules agissent comme solvants perturbant la structure membranaire, et par conséquent, sont difficilement biodégradables.

En revanche, les *n*-alcanes dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 10 et 20 sont les plus facilement dégradables par une très grande variété de microorganismes [111, 112].

L'oxydation des alcanes est classée comme étant monoterminale, diterminale ou subterminale, toutefois, l'oxydation monoterminale est la principale voie. Plusieurs modes d'attaque des *n*-alcanes ont été décrits, la dégradation initiale débute par l'addition directe d'oxygène à l'atome du carbone terminal nécessitant la présence d'oxygène moléculaire. L'addition d'oxygène au groupement méthyle terminal (carbone terminal) catalysée par une oxygénase produit un alcool primaire ou secondaire. On distingue deux voies : oxydation monoterminale et oxydation subterminale. Les voies métaboliques de dégradation des *n*-alcanes par les bactéries sont indiquées sur la figure 1.8.

Oxydation monoterminale: C'est la principale voie pour la majorité des microorganismes. L'alcool primaire, ainsi formé, est transformé en aldéhyde puis en acide gras correspondant. Ce métabolisme de dégradation s'effectue par une série d'étapes enzymatiques. L'acide carboxylique formé est ensuite assimilé par β -oxydation [102, 108, 110, 113]. Dans certains cas, après la formation de l'acide gras, une deuxième oxydation peut se produire au niveau du groupe méthyle, en donnant un diacide gras (oxydation diterminale) qui est ensuite converti en acide dicarboxylique et traité par β -oxydation [102, 106].

Oxydation subterminale: L'oxydation subterminale des *n*-alcanes a également été rapportée [114, 115, 116]. Le produit généré, un alcool secondaire, est converti en cétone correspondante, puis la cétone est oxydée par une monooxygénase pour former un ester qui est hydrolysé par une estérase, générant un alcool et un acide gras. Les deux oxydations (terminale et subterminale) peuvent coexister chez certains microorganismes.

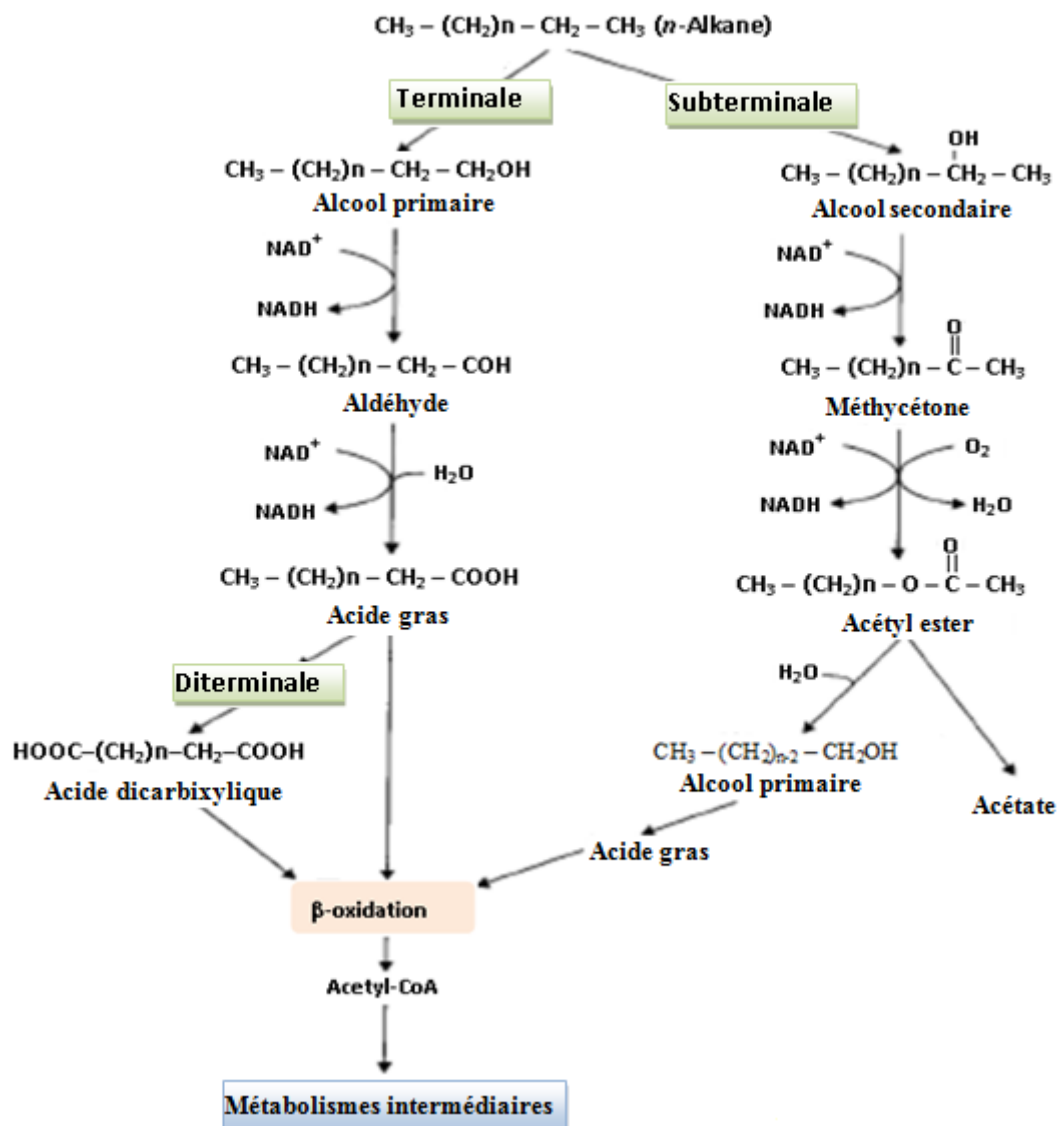


Figure 1.8 : Voies métaboliques de dégradation des *n*-alcanes par les bactéries [102, 110, 115]

L'oxydation des alcanes par une dioxygénase peut conduire à la formation d'un peroxyde, ce dernier est oxydé en aldéhyde puis en acide sans un alcool intermédiaire [117, 118]. Cependant, chez certaines souches, le passage par la forme alcool est nécessaire. La dioxygénase nécessite l'oxygène moléculaire pour catalyser l'oxydation des *n*-alcanes (C_{10} à C_{30}) et des alcènes (C_{12} à C_{20}), sans production d'oxygène [108]. La figure 1.9 montre ces deux voies métaboliques.

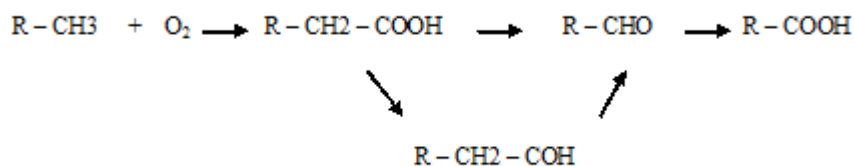


Figure 1.9 : Voies métaboliques de dégradation des *n*-alcanes par introduction de la molécule d'oxygène

1.4.3.1.2. Alcanes ramifiés (isoalcanes)

Jusqu'à présent, peu d'espèces de bactéries ont été décrites pour leur capacité à dégrader les alcanes ramifiés. Certains composés ramifiés sont récalcitrants à la dégradation bactérienne, ce qui peut provoquer leur accumulation dans l'environnement. A titre d'exemple, les alcanes *n*-C₁₇ et *n*-C₁₈ sont facilement dégradés par les microorganismes, alors que leurs homologues à chaîne ramifiée, pristane et phytane, sont moins biodégradables [119].

En raison de la présence du groupement méthyle qui va bloquer la β -oxydation [120], l'intervention d'un autre mécanisme, comme α -oxydation, ω -oxydation ou une oxydation à l'autre extrémité, est nécessaire [102]. L'augmentation du nombre de ramifications a pour effet de diminuer leur biodégradabilité [121, 122, 123]. La figure 1.10 représente la dégradation aérobie du pristane.

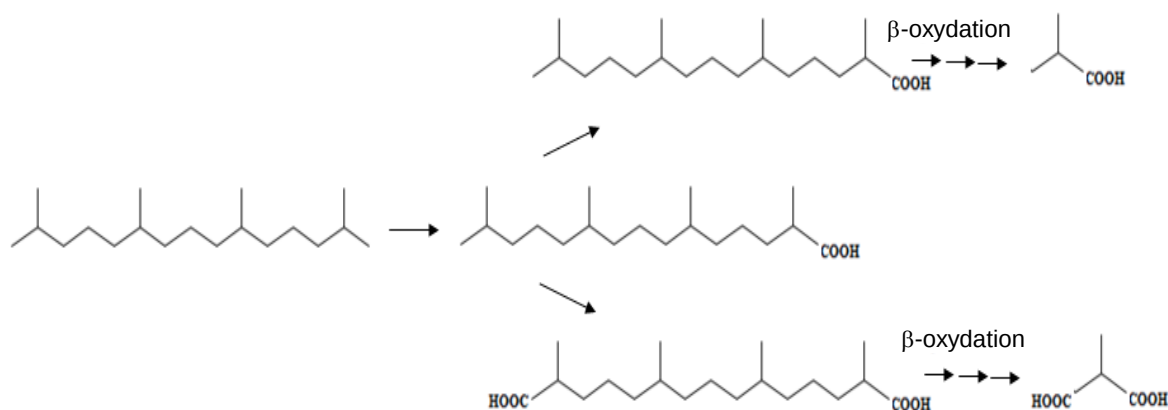


Figure 1.10 : Voies métaboliques de dégradation pristane par les microorganismes [124, 125, 126]

1.4.3.1.3. Cycloalcanes

Les cycloalcanes sont particulièrement résistants à la dégradation microbienne. Certains des composés monocycliques tels que le cyclopentane, le cyclohexane et le cycloheptane sont connus pour leur effet de solvation sur les membranes lipidiques de la cellule microbienne. Ils sont donc toxiques pour la plupart de bactéries dégradantes les hydrocarbures [127]. Les cycloalcanes complexes comme les hopanes (tricyclopentanes) sont les composés les plus résistants par rapport aux autres produits pétroliers déversés dans l'environnement [128].

Le mécanisme de dégradation du cyclohexane est présenté sur la figure 1.11. Il en résulte une multitude de dérivés cétoniques pour aboutir à la formation d'Acétyl-CoA [129]. Ce mécanisme a été reconstitué par la mise en évidence de trois enzymes : la cyclohexanol déhydrogénase, la cyclohexanone monooxygénase et ϵ -caprolactone hydrolase. La cyclohexanol déhydrogénase a été purifiée et correspond à un alcool secondaire déhydrogénase NAD dépendante [130].

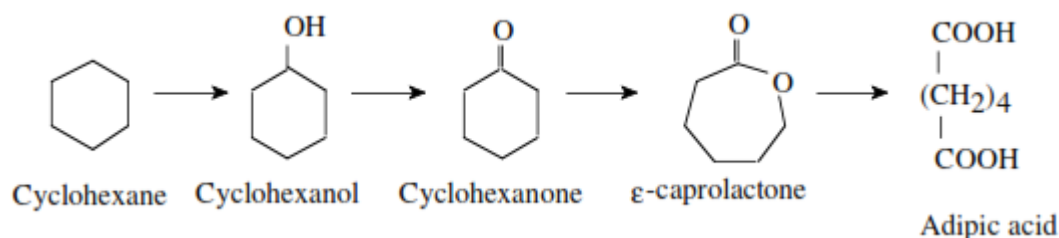


Figure 1.11 : Voie métabolique générale du cyclohexane [111]

Les dérivés substitués des cycloalcanes sont plus facilement dégradés que les molécules parentales homologues. La dégradation des cyclohexanes *n*-alkyl substitués a été largement étudiée du fait de leur présence dans le pétrole brut et leur accumulation dans l'environnement. L'attaque microbienne débute sur la partie *n*-alkyl menant à un produit intermédiaire d'acide cyclohexane-carboxylique.

1.4.3.2. Les hydrocarbures aromatiques

La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des écosystèmes aquatiques et terrestres. Une variété de microorganismes ont la capacité de métaboliser les composés aromatiques [131, 132]. Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former un dihydrodiol, ce dernier est converti en catéchol par une enzyme déshydrogénase. Dans le cas d'une implication d'une monooxygénase, le clivage est effectué par l'incorporation d'un atome d'oxygène en donnant une oxyde arène qui est oxydée en trans-dihydrodiol puis convertie en catéchol. Le clivage de ce dernier produit l'acide succinique, fumarique, acide pyruvique, acide acétique et aldéhydes, qui sont tous utilisés par les microorganismes pour la synthèse des constituants cellulaires et de l'énergie [133]. Les différentes voies métaboliques utilisées par les bactéries sont illustrées dans la figure 1.12.

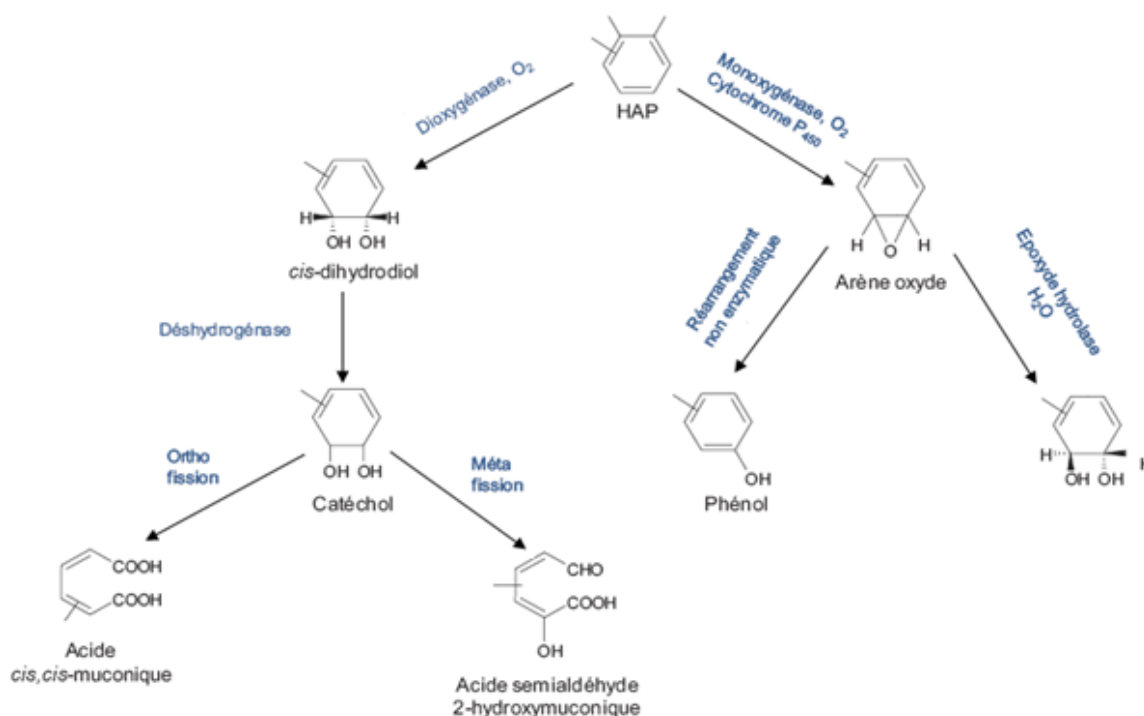


Figure 1.12 : Biodégradation des HAP ; dioxygénases intègrent les deux atomes d' O_2 dans le substrat. Monooxygénases incorporent un atome d' O_2 , le second atome est réduit à H_2O [131, 134]

Une substitution trop importante par des groupements méthyles peut inhiber l'oxydation initiale. Cependant, les groupements dont le nombre d'atomes de carbone supérieur à trois seront préférentiellement dégradés avant la rupture du cycle. Par ailleurs, la persistance sera augmentée si le composé ou ses sous-produits de dégradation s'avèrent toxiques pour les microorganismes, par exemple, le phénol et l'hydroquinone sont les principaux intermédiaires de l'oxydation du benzène, toutefois, l'accumulation de l'hydroquinone, produit final de l'oxydation, exerce un effet toxique inhibant la dégradation d'autres polluants [135].

La dégradation des HAP de 2 à 3 cycles est l'une des plus étudiée. De nombreuses souches bactériennes ont été identifiées pour leur capacité à croître sur naphthalène et le phénanthrène comme seule source de carbone. C'est ainsi que des souches de *Pseudomonas*, *Bacillus fusiformis*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium sp.* ont été isolées [136, 137, 138, 139, 140, 141, 142].

En revanche, peu de bactéries sont capables d'utiliser les HAP de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire se fait généralement par co-métabolisme. Les métabolites ainsi formés peuvent être des produits finaux de dégradation, en particulier dans le cas de culture pure (une seule souche bactérienne présente) mais dans le cas de culture mixte ou dans l'environnement, ces produits peuvent être dégradés par d'autres souches présentes (dégradation en chaîne).

1.4.4. Biodégradation aérobie du naphthalène, molécule modèle des HAP

Une grande variété d'espèces bactériennes ont la capacité d'utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie, par exemple *Burkholderia cepacia* [143], *Marinobacter* [144], *Polaromonas naphthalenivorans* [145], *Pseudomonas sp.* [146], *Pseudomonas putida* [147], *Ralstonia sp.* [148] et *Sphingomonas paucimobilis* [149]. La voie métabolique de dégradation du naphthalène a été beaucoup étudiée, notamment chez les espèces du genre *Pseudomonas* [150, 151, 152]. D'une façon générale, l'étape initiale d'oxydation du naphthalène est

similaire à celle des hydrocarbures aromatiques monocycliques (xylénol et crésol) [153]. Dans les cellules procaryotes, en présence d'oxygène et du coenzyme NADH, le naphthalène est oxydé par incorporation de deux atomes d'oxygène moléculaire, en dihydrodiol 1,2-dihydroxynaphtalène. L'oxydation des dihydrodiols entraîne la formation d'acide salicylique puis de catéchol ou en acide gentisique selon le type de bactéries (figure 1.13). Les catabolites du naphthalène interviennent dans le cycle de Krebs [151]. Le chemin encadré en bleu est proposé par Lin *et al.* [154] en utilisant la souche *Bacillus fusiformis* (FBN).

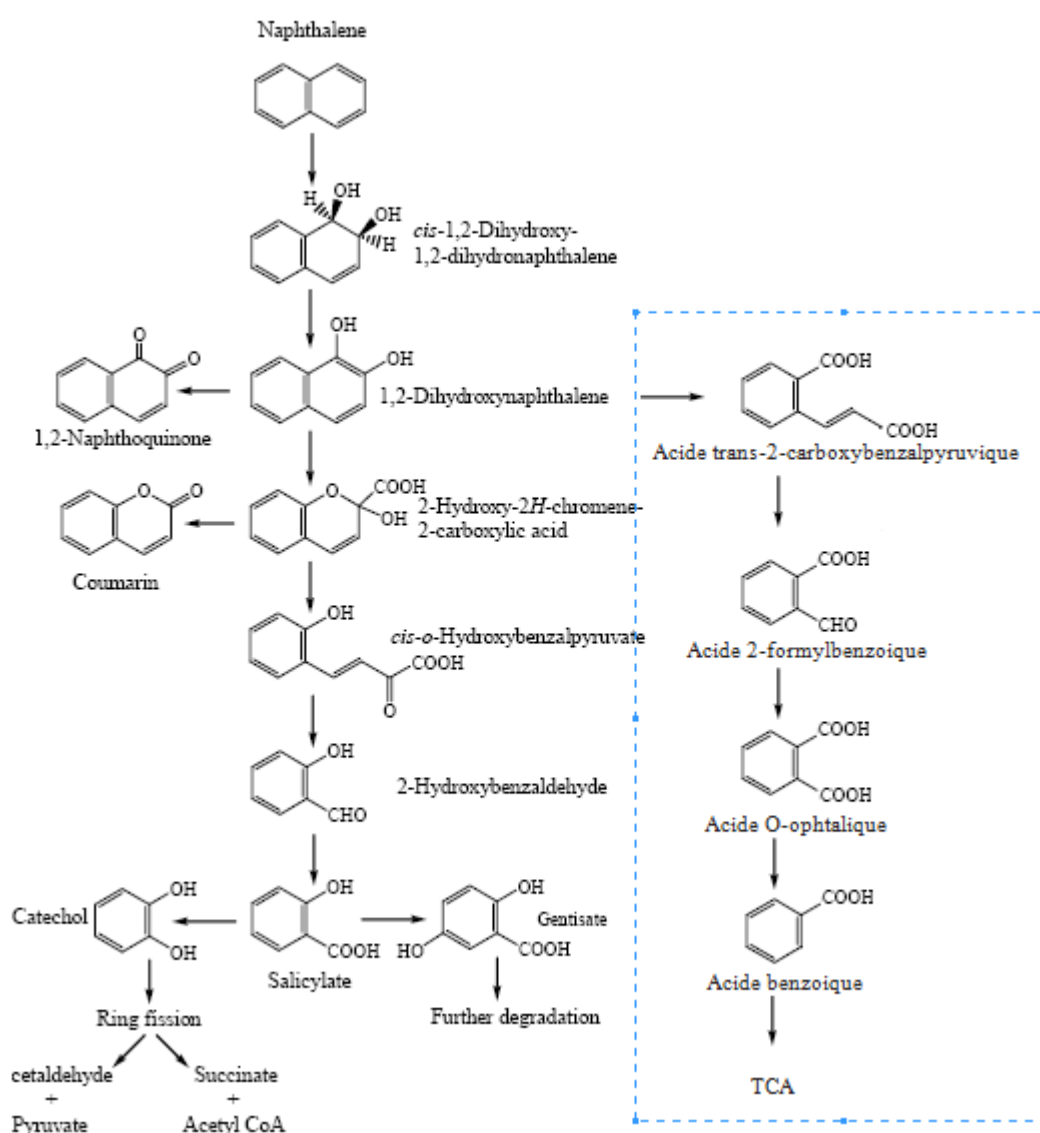


Figure 1.13 : Voies métaboliques de dégradation aérobie du naphthalène [151, 152, 154]

1.4.5. Biodégradation des hydrocarbures en conditions anaérobies

En absence d'oxygène moléculaire (par exemple dans les sédiments profonds, sols inondés, lagunes eutrophes, eaux douces stagnantes, océans et dans les gisements de pétrole), d'autres accepteurs d'électrons tels que les nitrates, le fer ferreux et les sulfates, sont nécessaires aux microorganismes pour oxyder les hydrocarbures.

Il a été démontré que les *n*-alcane supérieurs à C₆, alcanes ramifiés, cycloalcanes, les alkyl-benzènes, naphthalène, phénanthrène et certains alcènes peuvent être dégradés en conditions anaérobies. Par exemple, les non-substitués et méthyle, éthyle-substitués de cyclopentènes, cyclopentanes et de cyclohexanes sont dégradés sans un décalage important en présence de sulfate, mais plutôt moins efficace dans des conditions méthanogènes. La dégradation anaérobie est généralement plus lente que la dégradation aérobie pour le même composé.

D'autres accepteurs d'électrons terminaux peuvent être utilisés au cours du métabolisme anaérobie des hydrocarbures comprenant des oxydes de manganèse, des acides humiques de sol et le fumarate dans le processus d'oxydation fermentatif [155, 156, 157]. La figure 1.14 décrit les réactions initiales impliquées dans la biodégradation anaérobie des hydrocarbures.

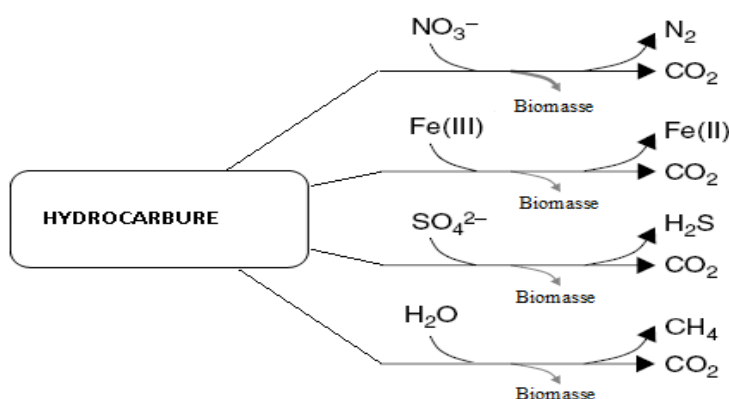


Figure 1.14 : Différentes voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons

Le naphthalène et le phénanthrène peuvent être utilisés comme seule source de carbone sous conditions sulfato-réductrices ou nitrate-réductrices. Le cas des autres HAP est moins clair, soit ils sont utilisés comme seule source de carbone, soit ils sont co-métabolisés [158].

1.4.6. Dégradation des hydrocarbures par les champignons et les microalgues

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de dégrader les hydrocarbures [159, 160, 161, 162, 163, 164].

Les champignons utilisent un mécanisme différent par rapport aux bactéries pour la dégradation des hydrocarbures. En effet, les champignons ne semblent pas dégrader ou minéraliser les hydrocarbures (HAP) aussi rapidement que les bactéries et une association avec les bactéries serait nécessaire pour une minéralisation totale [165]. Les champignons sont capables de dégrader les composés hydrocarbonés non utilisés par les bactéries, cela peut être utile dans le cas des HAP à cinq cycles, qui sont faiblement dégradés par les bactéries.

Il est à noter que certaines microalgues sont capables d'attaquer les hydrocarbures comme par exemple de *Prothotheca zopfii* qui dégrade 40% du pétrole brut [166]. Les algues photo-autotrophiques oxydent les HAP pour former des intermédiaires hydroxylés [167]. L'oxydation de HAP notamment du naphthalène et du phénanthrène [168, 169] par les cyanobactéries est catalysée par une monooxygénase. Les données concernant les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP par les algues, en particulier les cyanobactéries, restent cependant plutôt rares.

1.4.7. Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est influencée par :

- a) les caractéristiques de milieu: température, pH, oxygène, nutriments, ...
- b) les propriétés du polluant: concentration, structure, biodisponibilité, hydrophobicité, ...

- c) l'écologie microbienne: production des surfactants, diversité, voies, métaboliques, ...

1.4.7.1. Facteurs abiotiques

Afin de réussir le processus de la bioremédiation, il est donc indispensable de mieux connaître les caractéristiques physico-chimiques du site contaminé et les paramètres affectant la dégradation microbienne du pétrole brut. Les principaux facteurs abiotiques sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, la disponibilité des éléments nutritifs, l'ajout des surfactants et la nature du polluant qui détermine son niveau de solubilité et sa résistance à la dégradation.

1.4.7.1.1. Composition chimique des hydrocarbures

Dans un mélange complexe d'hydrocarbures, pétrole brut ou produits pétroliers, ce sont d'abord les paraffines linéaires et les aromatiques de faible poids moléculaire qui sont dégradés, puis les isoalcanes et les cyclaniques, la résistance à la biotransformation est d'autant plus importante que les molécules sont plus grosses, y compris pour les paraffines normales, plus branchés, plus polyaromatiques et que les molécules sont oxygénées, azotées ou soufrées [16].

Il est généralement admis que la biodégradabilité des hydrocarbures se classe dans l'ordre décroissant selon la nature du composé [127, 170] :

n-alcanes > alcanes ramifiés > alcènes ramifiés > *n*-alkyl aromatiques à faible poids moléculaire > monoaromatiques > cycloalcanes > HAP >> asphaltènes.

Mais ce classement n'est pas universel. Cependant, d'après les travaux réalisés par Cooney *et al.* [171] et Jones *et al.* [172], les résultats ont montré que, dans les sédiments d'eau, le naphthalène et les alkyl-aromatiques sont extensivement dégradés avant l'hexadécane et le *n*-alcane respectivement.

1.4.7.1.2. Quantité du polluant

La faible solubilité des hydrocarbures pose un problème réel car la surface de contact a un effet sur le processus de biodégradation. Des concentrations plus

élevées peuvent inhiber la croissance (faible rapport surface/volume) [173]. En utilisant un consortium bactérien mixte, *Rahman et al.* [174] ont montré qu'une augmentation de la concentration de pétrole brut de 1 à 10% (v/v) conduit à une diminution du taux de dégradation du pétrole de 78 à 52%.

1.4.7.1.3. Solubilité

Le pétrole brut est un mélange de plusieurs composés de solubilité très variable dépendant de leurs coefficients de partage (K_{OW}). La solubilité est une propriété importante pour évaluer leur biodégradation. En général, plus la solubilité d'un composé augmente, plus il est probable à se dégrader. Un hydrocarbure aromatique liquide ou dissous sera dégradé plus qu'un composé aromatique en phase solide [119]. Le contact entre le substrat et la cellule microbienne peut être favorisé par l'ajout d'un surfactant (augmente la solubilité des hydrocarbures) ou la production de celui-ci par les microorganismes eux-mêmes. En outre, la solubilité des hydrocarbures est fonction de la température, l'augmentation de celle-ci rend les hydrocarbures plus biodisponibles, ce qui favorise leur biodégradation.

1.4.7.1.4. Influence de la température

La température a un effet considérable sur la biodégradation des hydrocarbures en modifiant son état physique (solubilité, viscosité,...), sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes [120, 175]. La biodégradation des hydrocarbures peut se produire dans une large gamme de températures [0 - 70 °C], en fonction de la température de croissance, on distingue trois sortes de microorganismes : psychrotrophes, mésophiles et thermophiles.

Généralement, le taux de la biodégradation des hydrocarbures diminue avec la diminution de la température à cause de la réduction de l'activité enzymatique [176, 177]. Le taux de dégradation maximal des hydrocarbures a été observé pour des températures variant de 30 à 40 °C pour le sol, de 20 à 30 °C pour les eaux douces et de 15 à 20 °C pour les eaux marines [178, 179].

1.4.7.1.5. Influence de l'oxygène

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures dans les sols et les eaux souterraines par les bactéries aérobies. L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures (aliphatiques, cycliques et aromatiques) par les bactéries inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable [127, 153, 180]. Dans les niveaux supérieurs de la colonne d'eau en milieu marin et d'eau douce, le problème de l'oxygène ne pose pas. Néanmoins, dans les sédiments aquatiques qui sont généralement anoxique, à l'exception d'une couche fine de la partie supérieure [179, 181, 182].

La disponibilité de l'oxygène dans les sols dépend de plusieurs paramètres : le taux de consommation d'oxygène par les microorganismes, le type de sol et la présence de substrats [178].

1.4.7.1.6. Influence des éléments nutritifs

Les nutriments sont des ingrédients très importants pour la réussite de la biodégradation des hydrocarbures notamment l'azote, le phosphore et dans certain cas le fer [179]. Selon la nature du site touché, certains de ces nutriments peuvent devenir limitant affectant ainsi les processus de biodégradation.

Le rejet des hydrocarbures dans les milieux aquatiques, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne [120, 179]. L'azote sert à la synthèse des protéines et des acides aminés et le phosphore fait partie des acides nucléiques de nombreux coenzymes et de l'ATP.

Il a été établi que la dégradation des hydrocarbures, dans les milieux marins, estuaires, lacs, terrestres, sédiments et eaux souterraines, dépend de la disponibilité de l'azote et du phosphore. L'ajustement du rapport carbone/azote/phosphore par l'ajout de l'azote et du phosphore sous forme d'engrais, dans les milieux pauvres en nutriments, améliore la dégradation des hydrocarbures [183, 184].

Cependant, selon plusieurs auteurs, l'ajout excessif de NPK peut avoir un effet négatif sur la dégradation des hydrocarbures [185, 186] et plus particulièrement sur les aromatiques. Carmichael et Pfaender [187] et McMillen *et al.* [188] ont rapporté que le ratio C/N est optimal pour des valeurs comprises entre 2 et 200. Signalons enfin que d'autres nutriments sont nécessaires au métabolisme des bactéries : le potassium, magnésium, calcium, soufre, sodium, manganèse, fer et métaux de traces.

1.4.7.1.7. pH

A cause de la faible variation du pH du milieu marin ($\text{pH} \approx 8$), le pH ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur par rapport au sol. Ce dernier peut avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0 [178]. Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité biodégradative des microorganismes. L'acidité du milieu peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont toxiques pour les microorganismes. Lors de la biodégradation des hydrocarbures, des métabolites correspondant notamment à différents acides sont produits, ce qui entraîne une diminution du pH.

La croissance des microorganismes étant favorisée par un pH proche de la neutralité, Leahy et Colwell [69] ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. Aussi, en utilisant un consortium de souches de *Pseudomonas*, Sathishkumar *et al.* [189] ont obtenu un taux de dégradation maximal de pétrole brut pour un $\text{pH} = 7$ (incubation à 35 °C).

1.4.7.1.8. Salinité

La salinité peut provoquer des changements dans la physiologie d'un organisme pouvant également altérer la disponibilité d'un contaminant en affectant les changements sur le site de l'absorption ou dans ses capacités métaboliques [190]. La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5% et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3% et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes.

Diaz *et al.* [191] ont constaté que les faibles valeurs de salinité ont conduit à une meilleure dégradation du pétrole. En revanche, des concentrations en sel plus de deux fois de la salinité des eaux de mer diminuent le taux de dégradation.

Mille *et al.* [192] ont noté que la quantité du pétrole dégradé augmente avec la salinité jusqu'à une valeur de $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ de NaCl ($23,3 \text{ g.l}^{-1}$). Au delà de cette valeur, c'est l'inverse qui se produit. En général, des concentrations trop élevées en sel réduisent l'efficacité de l'élimination des hydrocarbures.

DeCarvalho et daFonseca [193] ont également examiné la dégradation des hydrocarbures, dont le nombre d'atomes de carbone varie de C_5 à C_{16} , en présence de 1,0 ; 2,0 et 2,5% (p/v) de NaCl en utilisant la souche *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration de NaCl a un effet négatif sur la phase de latence (augmentation) et sur les taux de croissance bactérienne (diminution).

1.4.7.2. Facteurs biologiques

1.4.7.2.1. Les microorganismes

Les microorganismes responsables de la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement sont principalement les bactéries et les champignons. Il est estimé que dans 1g de sol non pollué, il y a seulement entre 100 et 1000 cellules de microorganismes oxydant les hydrocarbures, tandis que ce nombre augmente de 10^5 à 5×10^7 cellules dans 1g de sol pollué par le pétrole, surtout si la pollution s'est produite à plusieurs reprises et à longue durée [194].

Des microorganismes individuels peuvent métaboliser une gamme limitée des hydrocarbures, des cultures bactériennes mixtes (ou champignons) utilisant des capacités enzymatiques variables et complètes, sont nécessaires pour dégrader des mélanges complexes d'hydrocarbures [101, 120, 178]. En milieu marin, les bactéries sont généralement considérées prédominantes dans une microflore microbienne dégradant les hydrocarbures. La dégradation du pétrole est souvent améliorée en présence de consortium bactérien par rapport à l'activité d'une seule espèce.

Dans un environnement extrême, des microorganismes sélectifs sont nécessaires pour une bioremédiation efficace. En fait, les extrêmophiles sont des microorganismes qui se développent dans des conditions extrêmes : températures de milieu élevées (thermophiles) ou faibles (psychrophiles), pressions élevées (barophiles), milieu très acide (acidophiles) ou alcalin (alcalophiles), milieu trop salin (halophiles).

Signalons enfin que l'association (co-culture) des microorganismes (bactéries et microalgues ou bactéries et champignons) peut être bénéfique pour la bioremédiation, les microalgues fournissent l'oxygène (photosynthèse) qui est utilisé par les bactéries pour l'oxydation des hydrocarbures. Ainsi les molécules de grosse taille deviennent incapables de traverser la membrane cellulaire, cependant l'excrétion des enzymes (extracellulaires) par les champignons peut aider les bactéries à utiliser les métabolites intermédiaires (les champignons ne minéralisent pas complètement le contaminant) solubles dans l'eau et devenant plus biodisponibles [162, 195].

1.4.7.2.2. Biosurfactant

La faible solubilité dans l'eau de la majorité des hydrocarbures pétroliers limite le potentiel biodégradatif des microorganismes. Afin de faciliter le contact entre le substrat et la cellule et par suite améliorer l'efficacité de la dégradation, de nombreux microorganismes, notamment les bactéries, dégradant des hydrocarbures produisent une variété de biosurfactants (cf. section 1.5).

1.4.8. Conclusion

Le comportement du pétrole déversé dans l'environnement est affecté par plusieurs paramètres, certains liés au pétrole lui-même comme, la composition, la viscosité et la quantité, d'autres liés à l'environnement ; milieu aqueux ou terrestre, la température, le vent, l'ensoleillement, ...etc. Afin d'obtenir une meilleure remédiation du site contaminé, l'association de plusieurs méthodes (physico-chimiques et biologiques) est souvent nécessaire.

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers est un processus complexe, différents types de microorganismes (bactéries, champignons et microalgues)

peuvent être utilisés dans la bioremédiation, cependant les bactéries jouent un rôle dominant dans l'élimination du contaminant. La biodégradation dépend de facteurs abiotiques, y compris ceux liés au contaminant (la solubilité, la viscosité, la toxicité, la volatilité et la biodisponibilité) et les conditions environnementales (pH, température, salinité, pression, présence de métaux lourds, présence d'oxygène et de la disponibilité des nutriments), ainsi que les facteurs biotiques liés aux microorganismes (population microbienne : la concentration et l'interaction). Les influences de ces différents paramètres peuvent interagir et avoir des effets contraires ou combinés sur la biodisponibilité et qui ne sont pas représentés lors de la biodégradation d'un seul hydrocarbure par une seule souche bactérienne ou une espèce fongique.

Tous les éléments constitutifs des hydrocarbures ne sont pas biodégradables dans les mêmes proportions, la biodégradation peut être réalisée aussi bien par voie aérobie que par voie anaérobie. Néanmoins, la dégradation aérobie reste la plus efficace. En général, les *n*-paraffines sont plus rapidement métabolisés que les représentants des autres classes d'hydrocarbures. Par contre la présence de fraction légère dans un produit pétrolier semble inhiber sa biodégradabilité. En outre, certains composés peuvent être plus toxiques, voire cancérigènes, quand ils sont partiellement métabolisés.

La transformation initiale des hydrocarbures de poids moléculaire élevé (comme les HAP de plus de quatre cycles) par des champignons suivie par une dégradation bactérienne pourrait conduire une bioremédiation très efficace. Aussi, l'utilisation des cultures mixtes semble plus efficace pour la biodégradation d'un mélange complexe d'hydrocarbures (pétrole).

1.5. Biosurfactants, un intérêt environnemental

1.5.1. Introduction

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement [196, 197, 198]. Ils sont principalement

utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants. Cependant, les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [199, 200, 201]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelés biosurfactants.

Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques, efficaces et peuvent être produits à partir de déchets industriels et des sous-produits. Cette dernière caractéristique a un double aspect : aspect économique par réduction leur coût de production et aspect environnemental permettant l'utilisation des déchets (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon, mélasse, effluent de la farine de manioc, etc.) comme substrats en diminuant leur effet polluant [198, 202].

Les biosurfactants sont constitués d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe apolaire (figure 1.15). Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature de substrat et des conditions de production. Généralement, le groupement hydrophile (soluble dans l'eau) est constitué par une variété de groupements fonctionnels d'acides aminés, protéines, peptides cycliques, acides carboxyliques, polysaccharides et (mono ou di) alcool gras ; et le groupement hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) est une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée (C_8 à C_{22} : linéaire ou ramifié), un acide gras à longue chaîne, hydroxy-acide gras ou α -alkyl- β -hydroxy-acide gras [199, 200, 203, 204]. La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques [198, 200] : les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles. La partie hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par l'aromaticité, le nombre d'atomes de carbone et le degré de ramification [198].

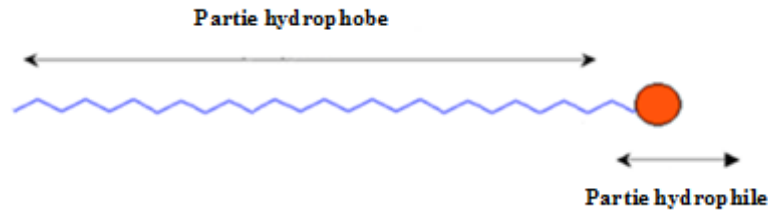


Figure 1.15 : Structure d'un tensioactif

1.5.2. Classification des biosurfactants

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, nonionique et amphotères), les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

Selon leur poids moléculaire, les biosurfactants sont divisés en [205] :

- Faible masse moléculaire y compris les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides.
- Haute masse moléculaire contenant des polysaccharides amphiphiles, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères.

Les biosurfactants de faible poids moléculaire (glycolipides et lipopeptides) sont plus efficaces pour diminuer les tensions interfaciale et de surface, alors que les biosurfactants de haut poids moléculaire (polysaccharides amphiphiles, protéines, lipopolysaccharides et lipoprotéines) sont des stabilisants efficaces (émulsion huile dans l'eau).

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : glycolipides, lipopeptides, phospholipides, lipopolysaccharides et lipides neutres [199, 206, 207, 208].

1.5.3. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Afin de faciliter l'assimilation des hydrocarbures à travers la membrane externe hydrophile, une grande variété de microorganismes procaryotes et eucaryotes

produisent des biosurfactants : les biosurfactants de type rhamnolipides sont synthétisés par différentes souches de *Pseudomonas* sp. [209, 210, 211], les sophorolipides sont produits par plusieurs *Torulopsis* sp. [212], des lipopolysaccharides tels que l'emulsan synthétisés par *Acinetobacter* sp. [213], et les lipoprotéines ou lipopeptides comme la surfactine et la subtilisine, produites par *Bacillus subtilis* [214, 215]. Le tableau 1.3 rassemble quelques biosurfactants et leurs microorganismes producteurs.

Tableau 1.3 : Différents biosurfactants avec leur source microbienne [203, 216, 217]

Biosurfactants	Source
Trehalose dimycolates	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Trehalose dicorynemycolates	<i>Nocardia</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Arthrobacterium</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Sophorolipides	<i>Torulopsis</i> sp., <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida batistae</i> , <i>Pichia anomala</i>
Glycolipides	<i>Alcanovorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp, <i>Corynebacterium</i> sp, <i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i>
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipopeptides	<i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.
Ornithine-lipides	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Thiobacillus</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Gluconobacter</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.
Phospholipides	<i>Candida</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Thiobacillus</i> sp.
Acides gras et lipides naturels	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
Streptofactine	<i>Streptomyces tendae</i>

1.5.4. Applications de biosurfactants

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, antitumeur et antimycoplasique (figure 1.16). Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines [203, 218, 219, 220, 221] :

- Biotechnologie industrielle : cosmétiques, peintures, pharmaceutique, médecine, pétrochimie, transformation alimentaire, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, nettoyeurs ménagers, produits de l'agriculture et récupération assistée de pétrole.
- Biotechnologie environnementale : la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures et la dispersion des nappes de pétrole.

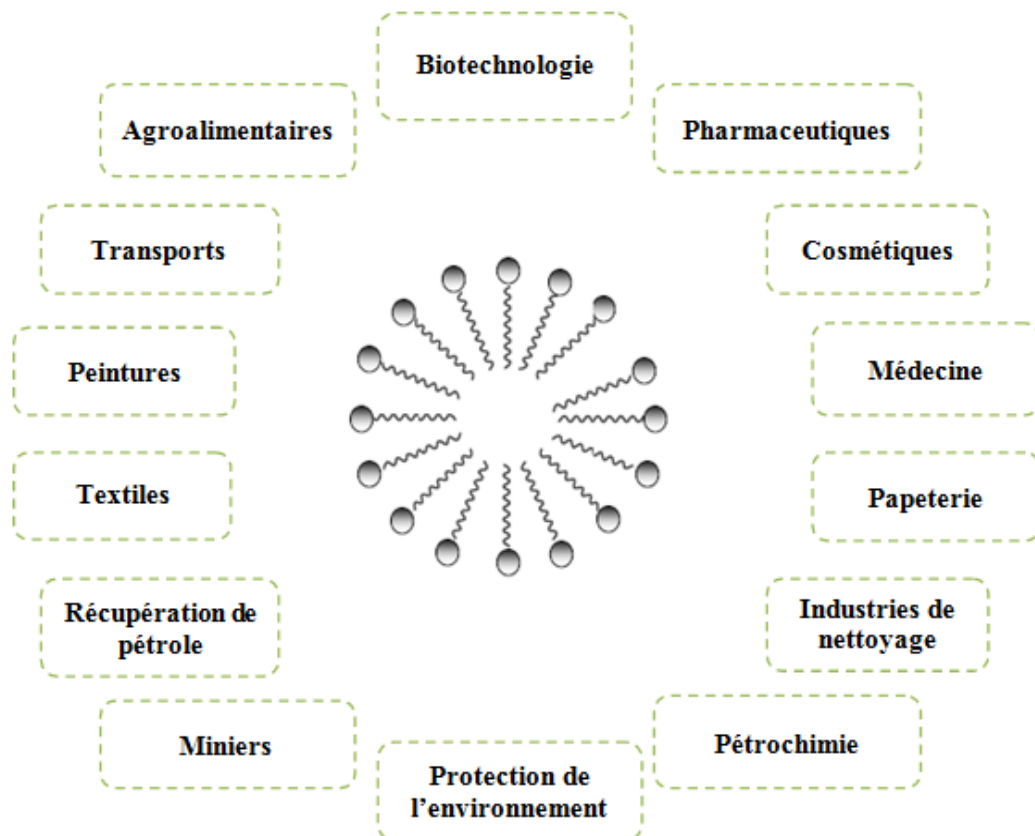


Figure 1.16 : Domaines d'application des biosurfactants

1.5.5. Biosynthèse des biosurfactants

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme. Les voies de biosynthèse détaillées pour les majeures fractions hydrophobes et hydrophiles ont été largement étudiées [222, 223].

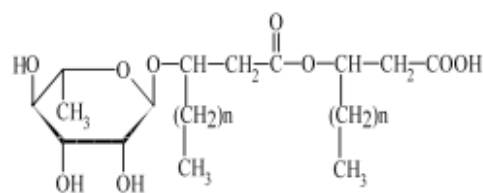
Dans leur structure amphiphile, la partie hydrophobe est constituée d'acide gras à longue chaîne, d'hydroxy-acide gras ou d'alkyl- β -hydroxy-acides gras, et la partie hydrophile peut être un glucide, acide carboxylique, phosphate, acide aminé, cyclopeptide ou un alcool. Deux voies métaboliques primaires, à savoir hydrocarbures et glucides, sont impliquées dans la synthèse des deux parties hydrophobes et hydrophiles respectivement. Les voies de la synthèse de ces deux groupes sont diverses par l'utilisation d'un ensemble d'enzymes spécifiques. Dans de nombreux cas, les premières enzymes responsables de la synthèse de ces deux parties sont des enzymes de régulation. Les différentes structures des biosurfactants sont portées dans la figure 1.17.

1.5.6. Propriétés de biosurfactants

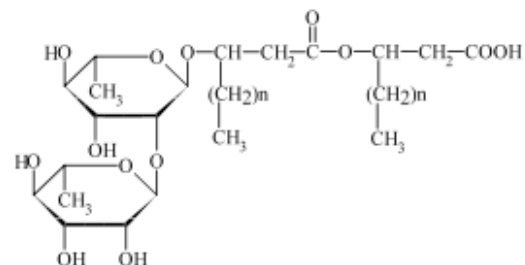
Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes comme la température, le pH et la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes.

1.5.6.1. Activité à l'interface (et à la surface)

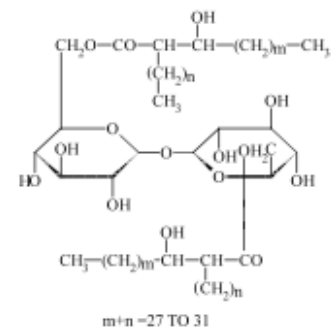
L'efficacité d'un biosurfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension de surface ; un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS) de l'eau de 72 à 35 mN.m⁻¹ et la tension interfaciale (TI) eau/hexadécane de 40 à 1 mN.m⁻¹ [217]. Le biosurfactant produit par *B. subtilis*, la TS de l'eau à 25 mN.m⁻¹ et la TI (eau/hexadécane) inférieur à 1 mN.m⁻¹ [215], aussi le biosurfactant rhamnolipide de *P. aeruginosa* réduit la TS et TI à 26 mN.m⁻¹ et inférieur à 1 mN.m⁻¹, respectivement [224]



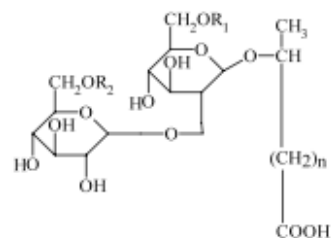
Monorhamnolipide



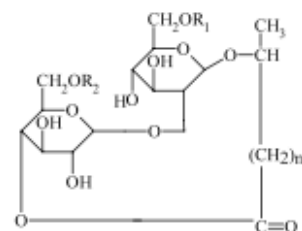
Dirhamnolipide



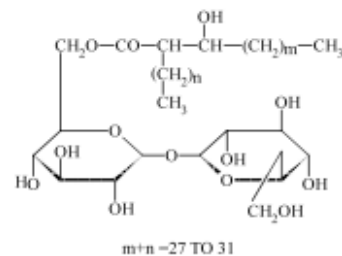
Trehalose dimycolates



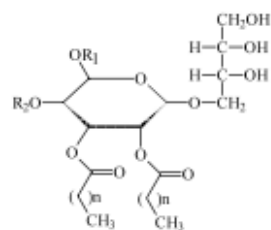
Acide Sophorolipide



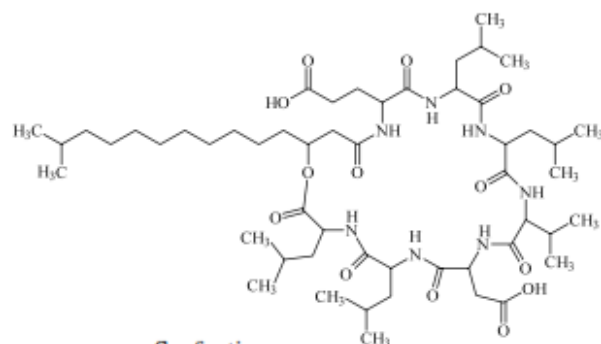
Lactonic Sophorolipide



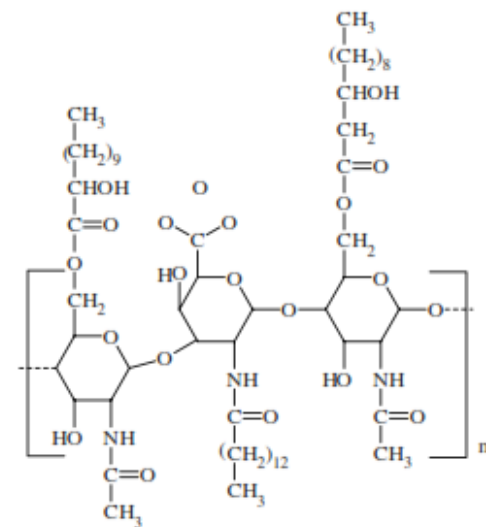
Trehalose monomycolates



Mannosylerythritol lipid



Surfactine



Emulsan

Figure 1.17 : différents types de biosurfactants produits par les microorganismes en utilisant des substrats solubles et/ou insolubles dans l'eau [196]

1.5.6.2. Concentration micellaire critique

La solubilisation d'un contaminant organique par un agent tensioactif dépend d'un processus appelé formation de micelles. En raison de sa nature amphiphile, une molécule de surfactant peut se dissoudre dans l'eau sous forme de monomère. Il s'adsorbe à l'interface ou est incorporé avec d'autres molécules de surfactant dans le cadre de la formation d'une micelle. Lorsque la concentration en biosurfactant est inférieure à une concentration spécifique, les molécules de surfactant existent principalement sous forme de monomères. La concentration à partir de laquelle les monomères commencent à former ces agrégats est définie comme la concentration micellaire critique (CMC).

Les agrégats de molécules de surfactant micellaire créent un noyau hydrophobe moins polaire dans lequel sont logés des contaminants. Par conséquent, la solubilisation de contaminants est nettement augmentée [225].

La tension de surface est inversement proportionnelle à la quantité de biosurfactant, des concentrations élevées de ce dernier abaissent la tension de surface jusqu'à une valeur minimale et stable, appelée concentration micellaire critique (CMC). Au-delà de la CMC, les molécules de biosurfactant s'associent en solutions aqueuses pour former des micelles à l'intérieur desquelles vont pouvoir se solubiliser une grande variété de composés insolubles dans l'eau (figure 1.18).

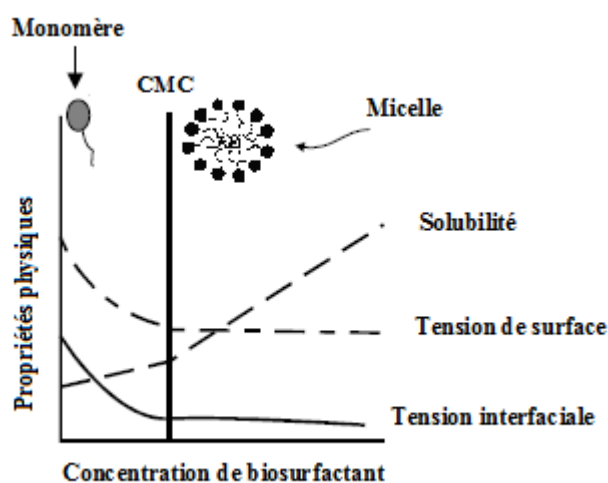


Figure 1.18 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant

En général, les biosurfactants sont plus efficaces et leur CMC est environ 10 - 40 fois inférieur à celle des tensioactifs chimiques, donc moins de surface nécessaire pour obtenir une très faible valeur de TS [203].

1.5.6.3. Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables et particulièrement adaptés pour des applications environnementales telles que la bioremédiation des sites contaminés [217, 226].

1.5.6.4. Faible toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux. Une étude comparative sur la toxicité des surfactants chimiques et biologiques. [Poremba et al.](#) [227, 228] ont constaté que la plupart des biosurfactants ont été dégradés plus vite sauf pour le saccharose-stéarate synthétique qui, similaire aux structures glycolipides, a été dégradé plus rapidement que les glycolipides biogéniques (rhamnolipides, lipides tréhalose et lipides sophorose).

Il est à noter que la toxicité dépend de la structure des surfactants et non pas de leur origine. En générale, la toxicité est corrélée avec la chaîne grasse hydrophobe de surfactant ; plus la chaîne grasse est longue, plus l'hydrophobicité est élevée et par suite le tensioactif est plus toxique.

1.5.6.5. Pouvoir émulsifiant

L'émulsion est un système hétérogène composé d'au moins un liquide non miscible intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse en général 0,1 mm. La phase dispersée est aussi appelée phase interne ou discontinue, et la phase dispersante peut être appelée phase externe ou continue. Donc, il y a généralement deux types d'émulsions: huile-dans-eau ou eau-dans-huile, ces systèmes possèdent une stabilité minimale

pouvant être accrue par des additifs tels que les agents actifs. Ainsi, des émulsions stables peuvent être produites durant des mois et même des années [229]. Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants). Les biosurfactants à haut poids moléculaire sont en général mieux que ceux à faible poids moléculaire. A titre d'exemple, les Sophorolipides de *Torulopsis bombicola* ont montré leur capacité à réduire les tensions de surface et interfaciale, mais ils ne sont pas de bons émulsifiants [212]. Par contre, le liposane a montré une mauvaise réduction de la tension de surface, mais il est utilisé avec succès pour émulsionner les huiles comestibles [230].

1.5.6.6. Activité biologique

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les bactéries, champignons, algues et virus. Le lipopeptide iturin de *B. subtilis* a montré une activité puissante antichampignon [231]. Les rhamnolipides inhibent la croissance des espèces nuisibles de bloom algale (*Heterosigma akashivo* et *Protocentrum dentatum*) pour des concentrations variant de 0,4 à 10 mg.l⁻¹ [232]. Selon les travaux réalisés par Abalos *et al.* [233], le rhamnolipide synthétisé par *P. aeruginosa* a montré une activité inhibitrice contre les bactéries : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Alcaligenes faecali* (32 mg.ml⁻¹), *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* (16 mg.ml⁻¹) et *Staphylococcus epidermidis* (8 mg.ml⁻¹) et aussi une excellente propriété antifongique : *Aspergillus niger* (16 mg.ml⁻¹), *Chaetomium globosum*, *Penicillium crysogenum* et *Rhizoctonia solani* (18 mg.ml⁻¹).

1.5.7. Méthode de criblage des souches produisant des biosurfactants

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactéries productrices des biosurfactants. Les techniques utilisées pour mesurer la production du biosurfactant sont : test d'hydrophobicité de la surface cellulaire, test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et la tension de surface.

1.5.7.1. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

L'hydrophobicité cellulaire est un facteur important pour prédire l'adhésion des microorganismes aux surfaces. Le caractère hydrophobe de la surface externe des cellules microbiennes pourrait être utilisé pour mesurer le potentiel de l'affinité des cellules pour les substrats hydrophobes. Si l'hydrophobicité cellulaire est élevée, les microorganismes ont plus de chance d'adhérer aux gouttelettes d'huile. Les cellules montrant une hydrophobicité élevée peuvent avoir un meilleur potentiel biodégradatif des hydrocarbures.

En plus de son rôle dans l'assimilation des hydrocarbures, l'hydrophobicité de surface des cellules joue un rôle important dans l'invasion bactérienne et l'infection, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilm, etc. [234, 235].

Pruthi et Cameotra [236] ont trouvé une corrélation directe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la production de biosurfactant. Neu et Poralla [237] ont utilisé cette propriété pour la production de biosurfactant basée sur le fait que les surfaces hydrophobes sont généralement associées à des molécules à faible énergie de surface.

1.5.7.2. Test de déplacement de pétrole (oil displacement test)

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants. Les solutions contenant plus de biosurfactant sont incapables de former des gouttes stables et par suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactant vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [238].

1.5.7.3. Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices de biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheimer et Avigad [239], elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine

[240] et les rhamnolipides [241]. Actuellement, de nombreux chercheurs utilisent cette technique pour la sélection de nouveaux isolats producteurs de biosurfactants [242, 243].

1.5.7.4. Tension de surface

Le phénomène de tension de surface peut être expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coûte de l'énergie, pour minimiser cette dernière, la plupart des liquides prennent la forme de la plus petite de surface. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation $\gamma = \frac{W}{\Delta A}$; W: travail ou l'énergie qu'il faut fournir (à température et pression constantes) pour accroître la surface du liquide d'une quantité ΔA . La tension de surface s'exprime en J.m^{-2} ou N.m^{-1} .

Le criblage des microorganismes producteurs de biosurfactants repose sur la mesure de tension superficielle du milieu de croissance, un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle.

1.5.8. Paramètres influençant la production du biosurfactant

Le type, la qualité et la quantité de biosurfactant sont influencés par la nature de la source de carbone (substrat), la source de l'azote et les éléments minéraux du milieu comme le phosphore, le magnésium, le fer et le manganèse et les conditions de culture telles que le pH, la température, l'agitation, la salinité et l'oxygène [174, 210, 244, 245].

1.5.8.1. Source de carbone

De nombreux travaux ont montré que le type, la qualité et la nature du biosurfactant dépendent fortement de la source de carbone. Généralement, cette source de carbone à trois origines : hydrocarbures, glucides et huiles végétales. Certains microorganismes utilisent seulement les substrats hydrophobes

(hydrocarbures et huiles végétales), d'autres n'utilisent que les glucides, et d'autre encore, utilisent plusieurs sources (combinées ou individuelles). Le gasoil et le pétrole ont été trouvés comme une bonne source de carbone [244]. Il a été signalé que les composés solubles dans l'eau comme le glucose et le glycérol conviennent aussi pour la production de biosurfactants [192, 203].

On note que les substrats hydrophobiques maximisent la production du biosurfactant (100 - 165 mg.g⁻¹ de substrat) [246]. Les alcanes de C₁₁ et C₁₂, succinate, pyruvate, citrate, fructose, glycérol, huile d'olive, glucose et mannitol peuvent être aussi une source de carbone pour la production du biosurfactant [247].

Pour des substrats d'hydrocarbures, le nombre de carbone peut affecter la production de biosurfactant. Ainsi, Desai *et al.* [248] montrent qu'une production optimale est obtenue en utilisant des *n*-alcanes de longueur de chaînes variant de C₁₂ à C₁₄.

1.5.8.2. Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactant, certaines souches préfèrent les sels d'ammonium et l'urée comme source inorganique d'azote, alors d'autres produisent un maximum de biosurfactant en présence de nitrate [210, 249, 250]. La carence en azote affecte non seulement sur la production, mais aussi change la composition du biosurfactant produit [224]. Ainsi, Guerra-Santos *et al.* [210] ont montré qu'une meilleure production (rhamnolipide) a été obtenue pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1.

1.5.8.3. Cations

L'ajout de cations multivalents dans le milieu de culture joue un rôle positif pour la production de biosurfactants [215].

1.5.8.4. pH

Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipide [251], une production maximale de rhamnolipide est obtenue dans une gamme de pH

de 6 à 6,5, un pH supérieur à 7 diminue la production [210]. En revanche, la production de penta et disaccharide lipidique par la souche *Nocardia corynbacteroides* n'est pas affectée par un pH allant de 6,5 à 8 [252].

1.5.8.5. Température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants, produits par *Bacillus sp.* à des températures supérieures à 40 °C, si bien que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification reste stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [253].

1.5.8.6. Salinité

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques [253].

1.5.9. Conclusion

L'utilisation des biosurfactants, dans tous les domaines et notamment leurs applications environnementales, s'avère indispensable à cause des avantages cités précédemment. En effet, plusieurs facteurs influencent la nature et la quantité de la production des biosurfactants entre autres, le type de microorganisme et la source du carbone, cette dernière peut diminuer considérablement le coût de production qui est le seul inconvénient. Il est estimé que les matières premières représentent 10 à 30% du coût total de production dans la plupart des procédés biotechnologiques. Ainsi pour réduire ce coût, il est préférable d'utiliser les résidus (sous-produits) notamment de l'agroalimentaire en tant que substrat pour la production de biosurfactants. Finalement, une application efficace de biosurfactants, dans la bioremédiation des sites contaminés par les composés pétroliers, nécessitera un ciblage précis de la nature physico-chimique des polluants et des zones touchées.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation du site

2.1.1. Champ pétrolier de Hassi-Messaoud

Le gisement de Hassi Messaoud, dont les caractéristiques sont indiquées ci-dessous, est l'un des plus grands champs pétroliers au monde. Sa superficie est de 2500 km² avec une surface imprégnée d'huile d'environ 1600 km². La découverte du champ remonte à 1956 et sa mise en production a démarré en 1958. Depuis cette date, les forages se développent et se multiplient sans cesse, jusqu'à l'atteinte à plus de 1200 puits en 2007. Il couvre presque la moitié de la production algérienne en pétrole.

2.1.1.1. Caractéristiques géoclimatiques du champ (figure 2.1)

- Position : 870 km au Sud - Est d'Alger, et 80 km à l'Est de Ouargla.
- Climat : Désertique.
- Température : 0 - 47 °C.
- Vents dominants : Nord - Nord – Est.

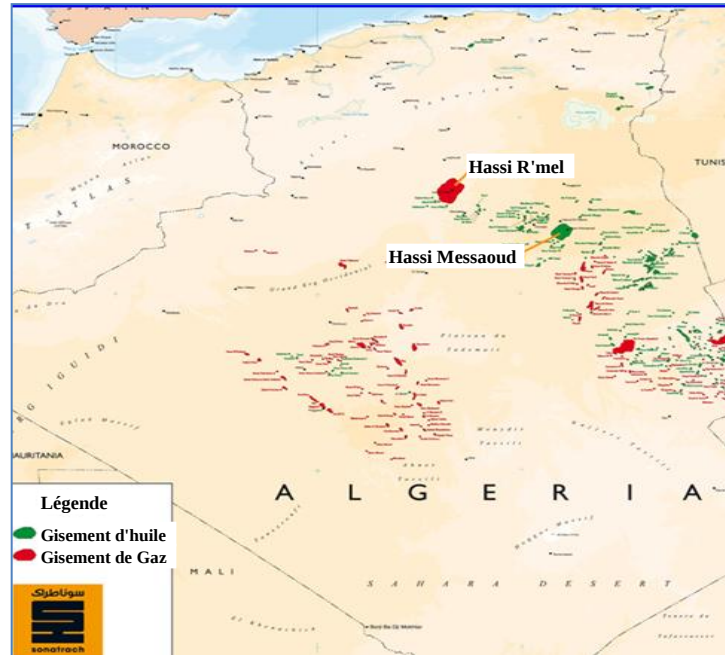


Figure 2.1 : Situation du champ de Hassi-Messaoud [254]

2.1.1.2. Types de rejets liquides à Hassi Messaoud

Ils sont constitués par les eaux résiduelles des centres de traitement ou de forage, Ce type de rejets engendre de manière directe la pollution du sol. Les rejets liquides proviennent des centres de production ou de réalisation de forage (eau de purge, eau de nettoyage et eau de refroidissement). Ces eaux sont caractérisées par des teneurs élevées d'hydrocarbures et de métaux lourds.

D'après le bilan établi par la SONATRACH en 1998 [254], le site d'un puits vertical à Hassi- Messaoud reçoit en surface plusieurs formes de rejets liquides sous formes de :

- Quantités de boues associées par enrobage aux déblais de forage (le volume des déblais est estimé à 600 m^3 /puits, soit un volume de 250 m^3 de déblais forés à base d'huile et 350 m^3 de solides forés à base d'eau).
- Quantités de boues éjectées intentionnellement parce que jugées sans intérêt.
- Déversements accidentels d'huiles de vidange.
- Quantités de boues éjectées lorsque ces dernières deviennent contaminées par l'eau de formation.

Les hydrocarbures insolubles flottent à la surface de l'étendue d'eau, alors que les hydrocarbures solubles dans l'eau peuvent s'infiltrer dans le sol.

2.1.2. Choix du site

Le biotope utilisé pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par des rejets de forage au niveau des puits du champ de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie. Le choix de ce biotope (figure 2.2) est justifié par sa contamination en pétrole brut afin d'isoler des microorganismes adaptés à la dégradation des hydrocarbures. Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à partir de sol de surface (5 - 20 cm de profondeur).



Figure 2.2 : Photos de sols contaminés par les fluides de forage (Hassi-Messaoud)

2.2. Méthodologie

Cette partie explique la méthodologie du travail expérimental. Elle comprend trois chapitres (Figure 2.3): Après l'échantillonnage et l'isolement des souches bactériennes aérobies, le premier chapitre traite la dégradation du pétrole brut et d'hydrocarbures. Le second s'intéresse à la biodégradation du naphthalène par une souche thermotélaente (45 °C), et le dernier s'occupe de la production, la caractérisation et l'application environnementale de biosurfactant issu d'une souche mésophile. Egalement les souches performantes ont été identifiées par la biologie moléculaire.

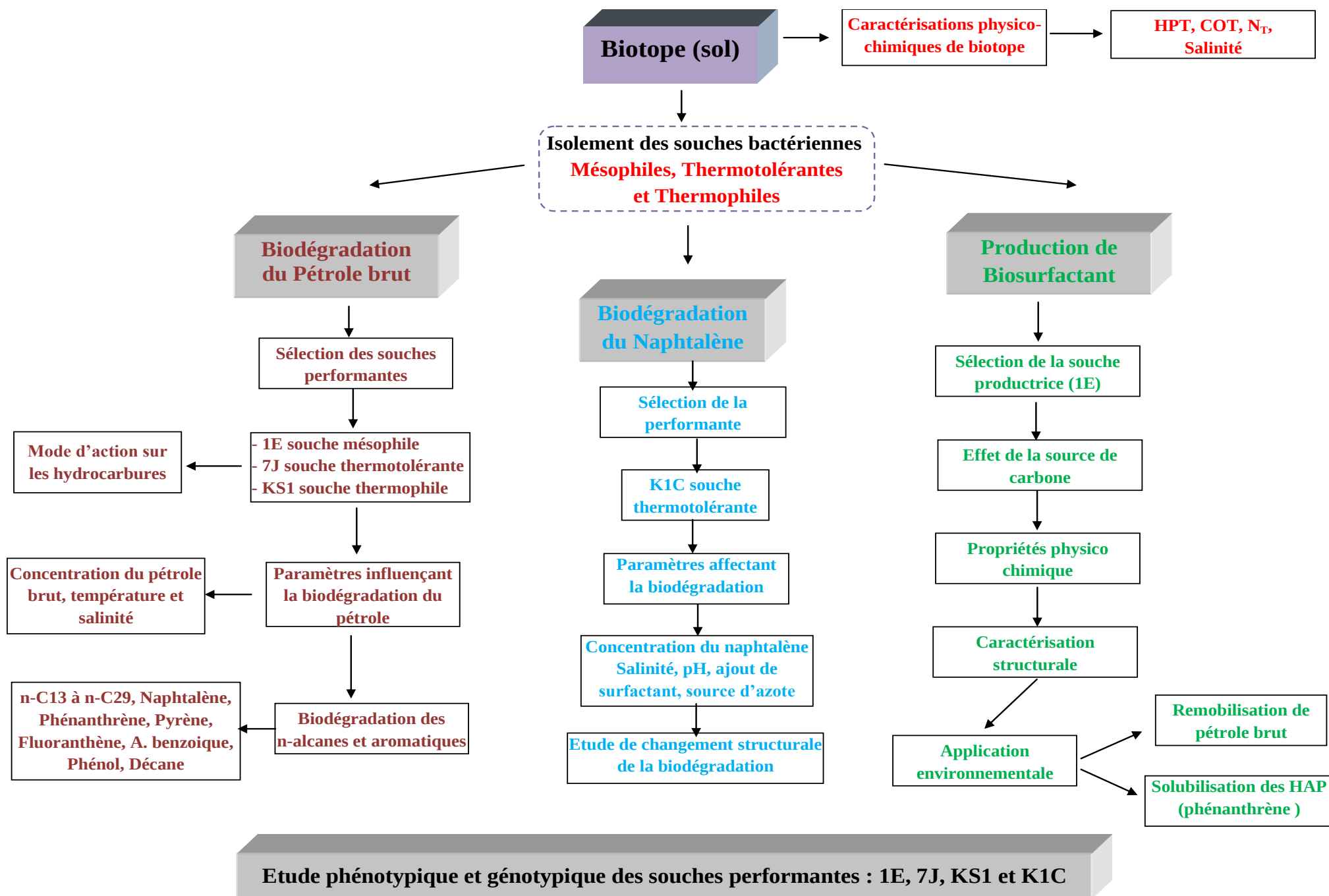


Figure 2.3 : Plan expérimental

Le tableau 2.1 regroupe l'ensemble de l'appareillage utilisé ainsi que les manipulations adéquates.

Tableau 2.1 : Différents appareils utilisés et leurs objectifs

Type	Objectif
Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) , Agilent Technologies 6980N	- Dosage du naphtalène résiduel
Chromatographie en Phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) , Agilent Technologie 6890N/5975.	- Quantification le pétrole brut résiduel (<i>n</i> -alcanes : C ₁₃ à C ₂₉) - Caractérisation le biosurfactant biosynthétisé
Chromatographie liquide liée à la spectrométrie de masse (LC-MS) , Agilent Technologies, USA.	- Caractérisation structurale du biosurfactant
Microscope optique à contraste de phase , (Primo-star, Zeis 415500-1800-000).	- Suivi la croissance (densité) et la formes des bactéries
Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) , Thermo scientific Nicolet 380 apparatus.	- Caractérisation : a) les métabolites de la dégradation du naphtalène. b) le biosurfactant biosynthétisé par une souche mésophile isolée dans ce travail de recherche - Quantification des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) des échantillons de sols destinés à l'isolement.
Spectrophotomètre UV-vis , Shimadzu UV prob 2.0 -1650 PC.	- Mesure de la biomasse (DO à 600 nm) - Quantification du naphtalène à 266 nm et du phénanthrène à 254 nm
PCR , GeneAmp PCR System 9700. Automated. Séquenceur , 3100 Genetic Analyser	- Identification phylogénétique des souches performantes
Tensiomètre , TSD132389 (Gibertini, Milano, Italy)	- Criblage et production de biosurfactant

NB. La description de chaque appareil (principe et conditions opératoires) est détaillée au niveau de l'annexe 3.

2.2.2.Echantillonnage et caractérisation physico-chimique des échantillons de sol

2.2.2.1.Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué en mars 2007 par le groupe du CRD (Centre de Recherche et Développement de SONATRACH, Algérie). Un (01) kg de chaque échantillon a été prélevé, introduit dans un sachet en plastique et conservé au réfrigérateur (+4 °C). Les borbiers sélectionnés sont relatifs aux puits forés à différentes dates et les échantillons ont été prélevés à des profondeurs et en des points différents en prenant le soin d'éliminer la pellicule de sable superficielle. Les prélèvements ont été réalisés au niveau de trois sites contaminés dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Nature et origine des échantillons utilisés pour l'isolement des bactéries

Echantillon N°	01	02	03
Localisation	Puits OMOZ #472	Puits OMKZ #32	Puits OMKZ #502
Profondeur	20 cm	Surface (1 – 5cm)	Surface (1 – 5cm)
Type de sol	sableux	sableux	sableux

2.2.2.2.Analyses physico-chimiques des échantillons de sol contaminé par le pétrole brut

Plusieurs paramètres physico-chimiques caractérisant le sol contaminé par des hydrocarbures ont été déterminés : Hydrocarbures pétroliers totaux (HPT), Carbone organique total (COT), Azote total (N_T), Conductivité, Salinité et le pH. L'échantillon du sol sableux est séché à l'air (ou à l'étuve à 37 °C) avant l'analyse.

- Dosage des hydrocarbures pétroliers totaux (Laboratoire CRD, SONATRACH)

L'échantillon est pesé et débité en fractions de 2 g chacune. Les étapes à suivre sont les suivantes :

- L'extraction au tétrachlorure de carbone (CCl_4) ;
- L'extrait est purifié (élimination des composés polaires) sur colonne de Florisil ;
- L'extrait organique, concentré et purifié, est ensuite analysé par spectrophotométrie IR.

L'appareil est préalablement étalonné par une solution étalon. Le logiciel traitant les analyses donne directement la concentration de l'hydrocarbure recherchée en mg/kg de sol.

➤ Mesure du carbone organique total (COT)

Le CT (carbone total) est obtenu par oxydation et combustion d'une quantité connue d'échantillon de sol finement broyée sous flux d'oxygène à 900 °C. La quantité de CO_2 ainsi dégagé est mesurée par absorption infrarouge (IR). La teneur en CI (carbone inorganique) est approchée par une attaque acide (H_3PO_4 , 10%) suivie d'une combustion (à 200 °C sous flux d'oxygène) d'une quantité connue d'échantillon. La quantité de CO_2 ainsi dégagé par décomposition des carbonates est également mesurée par absorption IR.

La teneur en carbone organique totale (COT) est obtenue par différence entre les mesures du carbone total (CT) et du carbone inorganique (CI). Le COT exprimé en g/100 g de sol sec (%).

➤ Mesure de l'Azote total Kjeldhal (N_T)

L'azote total Kjeldahl est déterminé par minéralisation d'une masse connue de l'échantillon par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur (sélénium) à 400 °C pendant 2 h. Une alcalinisation des produits de la réaction s'effectue ensuite par une solution de NaOH. Une distillation et un titrage de l'ammoniac libéré se fait en dernière étape à l'aide d'une solution d'acide sulfurique de concentration égale à 0,05 M.

➤ Détermination de la salinité

La détermination de la salinité d'un sol est basée sur le principe de l'extraction d'un électrolyte dont on mesure la concentration en éléments dissous par la

mesure de la conductivité. La relation approximative entre les teneurs en sels et la conductivité est : $1 \text{ mS/cm} = 640 \text{ mg de sel/l}$.

La conductivité électrique a été mesurée sur un extrait aqueux de sol (1/5 p/v) moyennant un conductimètre à électrode de type Consort C831. Elle est effectuée après une demi-heure d'agitation et 5 min de repos.

➤ Mesure du pH

Le pH a été mesuré sur une suspension de sol dans de l'eau distillée (1 : 2,5 (p/v)) [255]. La mesure a été effectuée après 2 h de stabilisation à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre.

2.2.3. Isolement des souches bactériennes aérobies

2.2.3.1. Milieu de culture

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (**MM**), sa composition (g.l^{-1}) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de la solution d'oligoéléments dont la composition [256] est donnée en annexe 2. Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5.

Après la stérilisation du milieu à 120°C pendant 20 min, 2 % (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut a été ajouté au milieu de culture. Différentes températures d'incubation ont été utilisées pour l'isolement des souches : 30, 45 et 55°C .

Source de carbone: Le pétrole brut (1%, v/v) a été ajouté après stérilisation par autoclavage. Il représente l'unique source de carbone et d'énergie pour isoler les souches bactériennes aérobies.

2.2.3.2. Isolement des bactéries

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut. En effet, la dégradation a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant : 100 ml du milieu MM, 1% (p/v) de sol contaminé du pétrole brut et 1% (v/v) de

pétrole (source de carbone). Le milieu est incubé pendant une semaine, sous une agitation de 180 tr/min. Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

- L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).
- La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

Trois types de souches ont été ciblés :

- Souches mésophiles (incubation à 30 °C).
- Souches thermotolérantes ou thermophiles moyennes (incubation à 45 °C).
- Souches thermophiles (isolées à 55 °C).

2.2.3.3. Criblage et purification des souches aptes à dégrader le pétrole

Le milieu solide MM est écoulé dans des boîtes de Pétri disposées sous une hotte à flux laminaire (FluFrance, France). Des dilutions jusqu'à 10^{-9} ont été faites à partir de milieu culture MM. 0,2 ml de chaque dilution et 0,2 ml de pétrole brut sont bien étalés successivement sur le milieu solide. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à la température adéquate pendant 1 à 2 jours jusqu'à l'apparition des colonies bactériennes.

La sélection est basée sur l'halo clair formé autour d'une colonie bactérienne qui implique une consommation de pétrole.

La colonie prélevée est purifiée par repiquage successif selon la méthode de stries afin d'obtenir des souches pures.

2.2.3.4. Conservation des souches pures obtenues

- Conservation à courte durée : Les souches pures ont été repiquées sur milieu Luria Bertani (LB) solide et conservées à +4 °C. La composition de milieu LB (g.l^{-1}) est : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl.
- Conservation à longue durée : A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, les souches sont conservées dans du bouillon LB en présence de 25% de glycérol à - 80 °C.

2.2.4. Biodégradation du pétrole brut

2.2.4.1. Préparation de l'inoculum bactérien

Les souches conservées à - 80 °C ont été mises en culture dans un milieu nutritif LB pendant 24 h. Après croissance, la culture bactérienne a été inoculée dans le milieu minimum (MM) contenant le pétrole brut (3%, v/v).

- Suivi de la croissance bactérienne

La croissance des souches sélectionnées a été suivie par deux méthodes:

- Mesure de la densité optique (DO) à 600 nm

Un volume de 1 ml de milieu de culture a été centrifugé à 13000 tr/min pendant 15min, le culot cellulaire a été ensuite repris dans un volume de 1 ml d'eau distillée, puis soumis à une agitation. La mesure de la densité optique a été prise à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- Dénombrement sur milieu solide (**LB**)

A partir d'une culture en milieu liquide contenant le pétrole comme source de carbone, nous pratiquons le dénombrement à différents temps de la croissance. On prélève 1 ml de la culture qu'on dilue au 1/10, puis une série de dilution de 10^{-2} à 10^{-9} est réalisée dans des tubes à essais. Un volume de 200 μl de chaque dilution est ainsi étalé sur des boîtes de Pétri. Le dénombrement est effectué par comptage des colonies après 24 h d'incubation à la température adéquate (selon

la nature des souches isolées), on décompte les boîtes contenant 15 à 300 colonies. L'UFC/ml est obtenu par la moyenne du nombre de colonies multipliée par le facteur de dilution et les résultats sont exprimés en Log (UFC/ml).

2.2.4.2. Sélection des souches performantes

Nous nous sommes intéressés à la sélection des souches à fort potentiel de dégradation de pétrole brut. Les conditions opératoires sont :

- Milieu de culture : 100 ml de milieu MM.
- Substrat : pétrole brut, 3% (v/v).
- Température : selon la nature de souches, l'incubation des mésophiles thermophiles modérées et thermophiles, est réalisée à 30, 45 et 55 °C respectivement.
- Agitation de 180 tr/min pendant deux semaines de dégradation.

2.2.4.3. Paramètres affectant la dégradation de pétrole

Afin d'étudier la capacité biodégradative des souches performantes, les principaux paramètres (quantité du pétrole, température et concentration en sel) ont été déterminés. La dégradation est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture, le pH est fixé à 7,0 sous une agitation de 180 tr/min. Les séries d'expériences ont été réalisées pour les trois types de souches sélectionnées. Le potentiel biodégradatif est suivi par la mesure de la biomasse (DO_{600nm} et Log(UFC)/ml).

2.2.4.4. Croissance sur les aromatiques

L'étude de la capacité de croissance de trois types de souches sélectionnées a été réalisée sur les composés suivants : Acide benzoïque ($5mM.l^{-1}$), phénol ($5mM.l^{-1}$), naphthalène ($100 mg.l^{-1}$), phénanthrène ($100 mg.l^{-1}$), fluoranthène ($100 mg.l^{-1}$), pyrène ($100 mg.l^{-1}$) et décane (1%, v/v). La dégradation durant trois semaines a été suivie par la mesure de la densité optique à 600 nm. Les conditions opératoires sont : 100 ml de milieu MM, pH = 7,0 , la température dépend de la nature de la souche (30 , 45 et 55 °C) et l'agitation est de 180 tr/min.

2.2.4.5. Etude du mode d'action des souches performantes sur les hydrocarbures

En raison de leur faible solubilité dans l'eau, les hydrocarbures ne sont pas facilement accessibles aux microorganismes. Ces derniers, utilisent une nouvelle stratégie en modifiant les propriétés de la surface cellulaire et/ou en produisant des agents mouillants afin d'améliorer la biodégradation des hydrocarbures. Dans ce contexte, la tension de surface et l'hydrophobicité de la surface cellulaire ont été étudiées. Les conditions opératoires sont : 100 ml de milieu de culture contenant 3% (v/v) de pétrole brut, le pH est fixé à 7,0 sous une agitation de 180 tr/min.

2.2.4.6. Dosage des hydrocarbures (*n*-alcanes : C₁₃ à C₂₉)

Le milieu de culture contenant le pétrole résiduel et son témoin chimique sont soumis à l'extraction liquide-liquide du pétrole par un solvant (dichlorométhane), la phase organique (le pétrole résiduel + dichloroforme) est séchée par le rotavapeur, le pétrole résiduel est dissout dans le dichlorométhane. L'extrait est ensuite purifié par passage sur une colonne de Florisil, puis analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC/MS) de type Agilent Technologie 6890N/5975. Dix sept (17) hydrocarbures (de *n*-C13 à *n*-C29) ont été analysés pour vérifier leur dégradation par les trois types de souches.

2.2.5. Biodégradation du naphtalène en mode statique

➤ Préparation de la solution mère

La solution mère (20 g.l⁻¹) a été préparée en dissolvant du naphtalène dans l'hexane. Lors de son utilisation, un volume de la solution mère est mélangé avec le milieu de culture pour obtenir la concentration désirée en naphtalène. Avant d'ajouter l'inoculum, le milieu de culture est laissé sous la hotte pendant 3 à 4 h afin d'évaporer le solvant.

2.2.5.1. Sélection de la souche performante

Huit souches thermotolérantes (isolées à 45 °C) ont été choisies pour sélectionner la souche la plus performante. La biodégradation du naphthalène a été réalisée sans agitation dans des erlenmeyers contenant 100 ml de milieu de culture (MM). Le naphthalène est la seule source du carbone et d'énergie. Sa concentration est fixée à 500 mg.l⁻¹, l'incubation est réalisée à 45 °C et le pH est fixé à 7,0.

2.2.5.2. Paramètres affectant la dégradation du naphthalène

Les principaux paramètres affectant la dégradation du naphthalène par la souche performante ont été examinés : la concentration du naphthalène, la salinité du milieu, le pH, la source d'azote, l'ajout du co-substrat et l'ajout du surfactant. La dégradation est réalisée, en conditions statiques, dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu MM, la température est fixée à 45 °C. L'analyse quantitative du naphthalène résiduel est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par spectrophotométrie UV-vis.

2.2.5.3. Dosage du naphthalène résiduel

Le suivi du taux de dégradation du naphthalène est réalisé par les méthodes suivantes :

- La quantification du naphthalène est effectuée par un spectrophotomètre UV-vis (Shimadzu UV-1800A) à une longueur d'onde de 266 nm. La longueur d'onde est fixée après un balayage de la solution de naphthalène (dans le *n*-hexane).
- L'analyse par CPG : le milieu de culture est mélangé avec le *n*-hexane (v : v). Le mélange obtenu est soumis à une agitation pendant 5 min, puis centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 min. La phase organique contenant le naphthalène est récupérée et analysée par CPG.

2.2.5.4. Analyse des intermédiaires métabolites de la dégradation du naphthalène par FTIR

Cette méthode spectrale permet de suivre les modifications qui se produisent dans le milieu durant le processus de dégradation du naphthalène en détectant l'apparition ou l'absence des groupements fonctionnels.

Préparation des pastilles :

- Pastille KBr : réduction en poudre fine du bromure de potassium KBr que l'on dépose en couche mince entre deux mâchoires polies. Puis, sous l'action d'une pression de 20 bars pendant deux minutes, on obtient une pastille qui servira à la mesure du bruit de fond de l'appareillage.
- Pastille à analyser : les échantillons sont préparés par micropastillage KBr de 1 ou 2 mm et à une concentration d'environ 0,004% (1mg d'échantillon/250 mg de KBr) en masse et soumis à une pression de 20 bar/cm². La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm⁻¹ et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8 cm⁻¹. Le spectre obtenu représente $A = f(\gamma)$ avec A : Absorbance, γ : nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimé en cm⁻¹.

2.2.6. Production de biosurfactant : caractérisation et application

2.2.6.1. Techniques de mesure de production de biosurfactant

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour la sélection de bactéries produisant des biosurfactants. La production de biosurfactants est toujours détectée par la mesure de : l'hydrophobicité de la surface cellulaire [236], test de déplacement d'huile, l'indice d'émulsification (E_{24}) et la tension de surface [257].

➤ Tension de surface

Dans le but de suivre l'évolution de la production de biosurfactant synthétisé par la souche performante et de déterminer de façon indirecte la concentration de

biosurfactant produit dans le milieu, des mesures de tension de surface ont été effectuées à l'aide d'un tensiomètre.

Pratiquement, un volume de 15 ml de culture a été prélevé et centrifugé (8000 tr/min pendant 20 min). Le surnageant est récupéré pour la mesure de la tension de surface, entre chaque mesure, la plaque de platine a été rincé avec de l'acétone. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon. L'unité de la tension de surface est le mN.m^{-1} .

➤ Test de déplacement de pétrole

Dans une boîte de Pétri contenant 10 ml d'eau distillée, un volume de 100 μl de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau distillée. Ensuite, 10 μl du surnageant de culture ont été légèrement placés au centre du film de pétrole. Le diamètre (cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes [258]. Plus le diamètre est large, plus la production en biosurfactant est importante.

➤ Activité émulsifiante (E_{24})

L'activité émulsifiante a été mesurée selon la méthode décrite par [Cooper et Goldenberg](#) [259]. Un volume de 4 ml de la culture a été additionné à un volume égal d'un hydrocarbure (pétrole brut). Le mélange est agité au vortex pendant 2 min et laissé au repos pendant 24 h avant la mesure. L'activité émulsifiante est définie comme étant le rapport de la hauteur de l'émulsion (H_e) formé sur la hauteur totale (H_T) du mélange. Elle est exprimée en pourcentage :

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_T} \times 100$$

➤ Hydrophobicité de la surface cellulaire

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelée MATS, pour « Microbial Adhesion To Solvents », est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures (MATH pour Microbial Adhesion To Hydrocarbon) [260], et couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes.

Le principe de la mesure repose sur le partage des cellules bactériennes entre une phase aqueuse correspondant à la suspension bactérienne et un solvant organique dont les caractéristiques physico-chimiques sont connues (polarité et tension de surface).

Pratiquement, les cellules bactériennes (cultivées dans un milieu nutritif) sont récupérées par centrifugation à 12000 tr/min pendant 10 min, et lavées deux fois avec la solution tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline). Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans le même tampon. 1,2 ml d'une suspension bactérienne de densité optique mesurée à 550 nm ($A_0 = 0,5 - 0,6$) sont mélangés à 0,2 ml de solvant organique (toluène) et vortexés pendant 1,5 min. Le mélange est laissé au repos pendant 15 min pour avoir une séparation complète entre les phases organique et aqueuse. La densité optique (A) de la phase aqueuse est mesurée à 550 nm.

L'hydrophobicité est exprimée par le pourcentage de cellules ayant adhéré au solvant (% d'adhérence), sa valeur est donnée par la formule suivante :

$$\text{Hydrophobicité} = \left[1 - \frac{A}{A_0} \right] \times 100$$

2.2.6.2. Conditions de culture

Inoculum : Des tubes à essai contenant 10 ml de milieu LB ont été inoculés par 0,5 ml d'une suspension bactérienne conservée à - 80 °C. Une incubation à 37 °C a été ensuite réalisée pendant une nuit sous une agitation de 180 tr/min.

Milieu de culture : le milieu LB est le milieu utilisé pour la production de biosurfactant. Sa composition est: 10 g.l⁻¹ de peptone soja, 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure et 5 g.l⁻¹ de NaCl. Après l'ajustement du pH à 7,0, le milieu est stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 20 min [261]. L'huile d'olive (1%, v/v) était la source de carbone et d'énergie.

2.2.6.3 Criblage de la souche productrice du biosurfactant

L'origine des souches : Les souches bactériennes testées pour la production de biosurfactant sont celles isolées dans notre cas à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut. La sélection de la souche productrice de biosurfactant est basée sur le test de déplacement de pétrole [262].

Les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers de 200 ml contenant 50 ml de milieu LB. L'incubation a été effectuée à 37 °C sous une agitation de 200 tr/min.

2.2.6.4. Conditions de production de biosurfactant

La meilleure souche productrice est cultivée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu LB, après 6 h d'incubation à 37 °C sous une agitation de 200 tr/min. Un volume de 1ml (1%, v/v) d'huile d'olive (substrat hydrophobe induisant la production de biosurfactant) a été ajouté au milieu de culture. Ce dernier a été incubé à 37 °C pendant 48 h sous une agitation 200 tr/min. Le surnageant exempt de cellules a été utilisé pour l'extraction de biosurfactant.

➤ Sélection de la source de carbone optimale

Quatre sources de carbone de concentration 1% (v/v) ont été utilisées : pétrole brut, hexadécane, huile d'olive et huile végétale. Les substrats ont été stérilisés sur un filtre 0,22 µm. La sélection de la source optimale est basée sur la mesure de la tension de surface au moyen d'un tensiomètre et la mesure du diamètre de la surface halo claire (test de déplacement de pétrole).

2.2.6.5. Extraction et purification de biosurfactant

Deux étapes successives sont appliquées avant la purification : la précipitation et l'extraction.

- La précipitation est réalisée par l'acidification du surnageant (dépourvu de cellules) à pH final compris entre 2 et 3. Le surnageant est laissé au repos pendant plusieurs heures à 4 °C. Enfin, le précipité est récupéré par centrifugation et remis en solution dans un tampon approprié.

- L'extraction du biosurfactant est généralement utilisée pour enlever les composés hydrophiles. Les solvants individuels ou mixtes employés sont : Acétate d'éthyle, chloroforme/méthanol (2/1), butanol, hexane et acide acétique [263].

La procédure de récupération est la suivante : lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le surnageant (mesure de la tension de surface et du test de déplacement de pétrole), le bouillon de culture a été centrifugé à 7000 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer la biomasse. Le surnageant correspond au biosurfactant brut. En fait, la récupération de biosurfactant est passée par plusieurs étapes : (a) le surnageant est acidifié par HCl (2N) à pH = 2, (b) le liquide acidifié est conservé à +4 °C pendant une nuit, (c) le précipité est récupéré par centrifugation à 7000 tr/min pendant 20 min à +4 °C, (d) il est ensuite remis en solution dans un tampon de Tris-HCl à pH = 8. L'extraction a été effectuée deux fois (v : v) à l'aide d'acétate d'éthyle. Le solvant a été ensuite enlevé à l'aide d'un rotavapeur.

Pour la purification, le biosurfactant brut a été soumis à la séparation chromatographique sur colonne C18 (DI : 2,5 cm, longueur : 30 cm), en utilisant comme éluant un mélange méthanol/eau avec un gradient de 65% / 35% (méthanol/eau) à 100 % de méthanol. Les fractions ont été soumises à des mesures de test de déplacement de pétrole et de la densité optique (DO) à 280 nm. Un collecteur de fraction automatique a été utilisé (Pharmacia LKB-FRAC100) de telle façon que chaque tube (fraction) contient 4 ml de volume.

2.2.6.6. Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant

2.2.6.6.1. Composition biochimique

Les compositions du biosurfactant purifié et brut ont été déterminées en utilisant des méthodes standards :

- Protéine : la détermination est basée sur la méthode de [Bradfor](#) [264], l'albumine sérique bovine (ASB) a été utilisée comme protéine standard.

- Les glucides ont été déterminées en utilisant la méthode de [Duboi et al. \[265\]](#).
- Les lipides selon la méthode standard [APHA \[266\]](#).

2.2.6.6.2. Caractérisation structurale

➤ Analyse par FTIR

Suivant la nature de l'échantillon, solide ou liquide, les techniques diffèrent. Un solide est broyé en présence de bromure de potassium (qui est transparent jusqu'à 400 cm^{-1}) puis comprimé sous pression réduite pour former une fine pastille.

Une autre technique, valable aussi bien pour les liquides que pour les solides, consiste à préparer une solution diluée du produit dans un solvant. Les solvants utilisés pour les solutions sont choisis dépourvus de bandes d'absorption dans les zones particulièrement intéressantes du spectre. Les plus couramment employés sont le tétrachlorure de carbone, le chloroforme et le sulfure de carbone.

Dans notre étude, les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, série 8400, Shimadzu, Japon). Le biosurfactant a été dissous dans le méthanol (CH_3OH) de 1 mg.ml^{-1} (1%, p/v), puis 20 μl de la solution est disposée sur la plaque en inox de l'appareil FTIR. Cette dernière a été laissée au repos pendant 10 min à l'air ambiant afin d'évaporer le solvant. Les mesures d'absorption optique ont été effectuées dans les domaines moyen-IR dont les longueurs d'onde sont comprises entre 2×10^{-3} et $25 \times 10^{-4}\text{ cm}$ (500 et 4000 cm^{-1}).

➤ Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie liquide à haute performance (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) combine les avantages de ces deux techniques, à savoir :

- HPLC: hautes sélectivité et efficacité de séparation.
- MS: informations structurales et sélectivité encore augmentée.

Cette méthode a été utilisée pour analyser la composition chimique du biosurfactant. A cet effet, l'échantillon a été préparé comme suit : le biosurfactant pur est solubilisé dans une solution à 50% d'acétonitrile (ACN) (acétonitrile/eau), puis la solution est centrifugée et filtrée. La séparation chromatographique est réalisée sur colonne C18 (150 mm × 2,1 mm, taille de particules 5µm) reliée au système HPLC (Agilent Technologies, USA). Le débit est de 250 ml/min et le volume d'échantillon injecté dans la colonne est de 5µl. Une étape isocratique à 25% (v/v) d'ACN, puis une élution par gradient linéaire à 50% d'ACN est appliquée pendant 30 min et à 90% d'ACN pendant 15 min. La colonne a été lavée pendant 0,1 min, finalement, elle est rééquilibrée à 25% d'ACN pendant 30 min. Les fractions collectées sont directement lyophilisées. Les lyophilisats sont conservés à - 20° C.

Les conditions d'ionisation de la source ESI, fonctionnant en mode positif, sont les suivantes :

- La tension de collision 70 eV.
- La tension d'ionisation 4,5 kV.
- Gaz d'atomisation et de solvatation (nébuliseur) N₂ pur.
- Température de désolvatation 400 °C.

L'intervalle de balayage du spectre de masse est de 200 - 1000 m/z.

2.2.6.7. Propriétés du biosurfactant

2.2.6.7.1. Activité émulsifiante (E₂₄)

Une quantité du biosurfactant a été dissoute dans de l'eau distillée dans un tube à essai. La solution est agitée manuellement pendant 30 secondes, et laissée au repos pendant 5 min. Afin d'évaluer le pouvoir d'émulsifiant de biosurfactant de la souche performante, ce dernier a été testé contre 5 types de liquides hydrophobes (4 ml de la solution de biosurfactant + 4 ml de liquide hydrophobe), à savoir le pétrole brut, le gasoil, l'huile moteur, l'huile d'olive et l'huile végétale. Le mélange est bien agité au vortex pendant 2 min (obtention d'un mélange homogène), puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre les mesures.

2.2.6.7.2. Détermination de la concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) est un paramètre important lors de l'évaluation de l'activité des biosurfactants. La CMC est déterminée par la variation de la concentration de biosurfactant (mg.l^{-1}) en fonction de la tension de surface (mN.m^{-1}). La plus faible valeur de la tension de surface correspond à la CMC, au-delà, aucun effet n'est observé sur l'activité de surface.

2.2.6.7.3. Détermination de la stabilité du biosurfactant

L'étude de la stabilité du biosurfactant est réalisée sur un surnageant exempt de cellules bactériennes et ceci après centrifugation à 7000 tr/min pendant 20 min. Les paramètres affectant la stabilité de biosurfactant ont été étudiés : la température, le pH et la salinité. L'évaluation de la stabilité de biosurfactant de la souche performante a été déterminée par la mesure de la tension de surface (TS).

- Stabilité thermique

Le biosurfactant est incubé à différentes températures : 4, 25, 37, 45, 55, 75 et 100 °C pendant 24 h. Après cette durée, les mesures de TS ont été prises.

- Stabilité chimique

Afin d'évaluer l'effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant, le surnageant de culture a été soumis à différentes concentrations en chlorure de sodium de 0 à 300 g.l^{-1} (pureté supérieure à 99,5%). Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24 h avant de mesurer la tension de surface. L'influence du pH a été également étudiée. Le pH de surnageant a été modifié de 2 à 12 en utilisant des solutions de HCl ou NaOH pour l'ajustement, les mesures de TS ont été effectuées après 24 h de repos.

2.2.6.7.4. Activité antimicrobienne

C'est une méthode microbiologique qui permet de détecter le pouvoir d'une substance chimique à inhiber la croissance de certains microorganismes. Ainsi, les biosurfactants peuvent affecter la membrane lipidique de certaines souches

cibles telles que utilisées dans notre cas [267]. Les bactéries testées ont été cultivées dans le bouillon de trypticase (TSB) ou agar (TSA), les champignons et les levures ont été cultivées dans le bouillon d'extrait de malt (MEB) ou agar (MEA) à 28 °C. La turbidité de la suspension était ajustée à l'échelle 0,5 de l'étalon standard de McFarland correspondant à un nombre de cellules environ $1-5 \times 10^8$ UFC/ml. La concentration des spores en suspension a été déterminée à l'aide d'un hématocytomètre (cellule de Thomas) et ajustée à $1-5 \times 10^8$ spores/ml. Les souches microbiennes testées dans cette étude sont des souches de référence fournies par des laboratoires de Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide ou fongicide (CMB ou CMF) de biosurfactant ont été déterminées, selon la méthode du Comité National pour Clinical Laboratory Standard (NCCLS) [268], contre un groupe-témoin de microorganismes représentant les différentes espèces des écosystèmes (bactéries, champignons et levures). L'expérience a été réalisée en microplaque à 96 puits, appelée micro-méthode.

- Détermination des CMI

100 µl de la solution de biosurfactant (préparés dans le méthanol) sont ajoutés dans le premier puits de la microplaque stérile. Des dilutions successives (au 1/2) sont effectuées de la colonne 1 à la colonne 10. Ensuite, 100 µl de milieu de culture contenant environ 10^8 UFC/ml de microorganismes testés et 30 µl de résazurine à 0,02% (indicateur coloré) sont déposés dans tous les puits. La plaque est ensuite soumise à une légère agitation afin d'homogénéiser les milieux.

Deux témoins sont réalisés, les colonnes 11 et 12 : un témoin négatif, le méthanol et un témoin positif contenant un antibiotique (chloramphénicol) et le microorganisme.

Après 16 à 20 h d'incubation aérobie à 30 °C, la lecture de la CMI est faite par simple regard au travers de la microplaque. La lecture repose sur le changement de la coloration initiale (du bleu au rose) dans la microplaque. La CMI est la plus

petite concentration avec absence de croissance visible ; elle correspond au premier puits dont la couleur ne vire pas au rose (il reste bleu).

- Détermination de CMB ou CMF

La plaque ayant servi à la mesure de la CMI est repiquée (10 μ l) vers une boîte de TSB ou MEB. Cela permet, après incubation aérobiose (environ 20 h), de repérer l'absence de germes dans certains puits de la microplaque précédente et de déduire les concentrations minimales en principe actif pouvant totalement détruire le germe. La CMB et la CMF sont les plus petites concentrations avec absence de croissance visible ; elles correspondent aux premiers dépôts sur TSB ou MEB qui ne se sont pas développés.

2.2.6.8. Applications environnementales

2.2.6.8.1. Solubilisation des HAP (phénanthrène)

L'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes est rendue difficile en raison de leur faible solubilité. Ce problème peut être résolu en présence d'un agent solubilisant. Pour cela, une étude a été réalisée sur la solubilité du phénanthrène, représentatif des HAP, (trois cycles aromatiques, sa solubilité dans l'eau est de 1,29 mg.l^{-1}) en présence de biosurfactant de la souche performante : des solutions de volume 10 ml à différentes concentrations en biosurfactant ont été préparées (62,5 ; 125 ; 250 ; 500 et 1000 mg.l^{-1}), des quantités égales de phénanthrène (pureté 98%, Aldrich-Germany) ont été ensuite ajoutées à chaque solution (0,6 g.l^{-1}). Ces tubes ont été incubés à 30 °C sous une agitation de 200 tr/min et à l'abri de la lumière pendant 24 h, puis centrifugés à 12500 tr/min à 4 °C pendant 30 min. Un volume de 5 ml de surnageant a été recueilli et ajusté à un pH = 2 à l'aide de HCl (6M). L'extraction du phénanthrène, dissous dans la solution de biosurfactant, a été réalisée par l'ajout d'un volume égal de dichlorométhane (DCM), l'opération est répétée deux fois, les fractions organiques ont été combinées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis concentré à 1 ml. Ce dernier est filtré à travers un filtre micropore (0,2 μm) avant d'être analysé par le spectrophotomètre UV-Vis. à 254 nm (Shimadzu-1100, Japon) [269].

2.2.6.8.2. Remobilisation du pétrole brut

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence le rôle de biosurfactant issu de la souche performante dans la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. En effet, 10 g de sol, contaminé par le pétrole brut préalablement stérilisés par autoclavage, ont été ajoutés à une solution de biosurfactant de volume de 100 ml et de concentration égale à celle de CMC. Par suite, le mélange a été mis sous agitation de 200 tr/min à température ambiante pendant 2 h, le surnageant (contenant les hydrocarbures) a été récupéré par centrifugation. Les hydrocarbures ont été ensuite extraits deux fois par le dichlorométhane, puis l'extrait a été concentré au rotavapeur. La quantification des hydrocarbures est réalisée par GC/SM. Le Tween 80 (surfactant chimique) et l'eau distillée sont utilisés comme témoins.

2.2.7. Identification génotypiques des souches performantes

L'identification génotypique des souches performantes a été réalisée par les techniques de la biologie moléculaire, trois souches isolées à des températures différentes ont été identifiées.

Le séquençage du gène d'ARN ribosomal 16S et l'analyse phylogénétique ont été déterminés selon la méthode décrite par [Mnif et al. \[262\]](#) (plus de détail voir l'annexe 5).

Nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems). Les résultats de la séquence ont été importés dans le Bio Edit v5.0.9 [\[270\]](#) et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blast, non redondant) [\[271\]](#) avec la séquence complète, par l'intermédiaire de Gen Bank [\[272\]](#), a permis d'identifier la souche vis-à-vis des pourcentages de similitude entre souches apparentées.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Isolement et identification des souches à fort potentiel dégradatif du pétrole brut et d'hydrocarbures

3.1.1. Caractérisation physico-chimique et microbiologique du biotope étudié

Plusieurs paramètres physico-chimiques des échantillons de sol ont été déterminés comme le montre le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques du biotope

N° Paramètres \ Echantillon	01 Puits OMOZ #472	02 Puits OMKZ #32	03 Puits OMKZ#502
COT (%)	2,30	7,1	3,5
N_T (‰)	0,42	1,18	0,51
COT/N_T	54,7	60,1	68,6
HPT (g/kg du sol)	27,83	59,07	36,05
Conductivité (mS/cm)	17,32	13,06	13,95
pH (1 : 2,5) H₂O	7,50	7,57	7,25

COT : Carbone Organique Total ; N_T : Azote total Kjeldahl

HPT : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.1, on remarque que l'échantillon du bournier OMKZ #32 est le plus chargé en hydrocarbures totaux (59,07 g.kg⁻¹ de sol) et en carbone organique total (COT). La valeur du rapport C/N pour les échantillons montre la carence en azote ce qui ralentit la croissance des microorganismes.

La différence observée dans les valeurs de HPT des échantillons semble due aux différents points de prélèvements, date de forage, composition des fluides de forage, profondeur, infiltration, ... etc.

Pour évaluer la salinité du sol, nous utiliserons l'échelle de la conductivité électrique (CE : mS/cm) suivante [273] :

- Sol non salin	$CE < 2$
- Sol légèrement salin	$2 < CE < 3$
- Sol salin	$3 < CE < 5$
- Sol très salin	$9 < CE < 16$
- Sol extrêmement salé	$CE > 16$

Le biotope utilisé pour la sélection des hydrocarbonoclastes peut être classé comme sol très salin. Cela est justifié par la composition chimique des fluides de forage contenant une quantité importante de sels notamment le KCl.

3.1.2. Isolement des souches bactériennes aérobies dégradantes le pétrole brut

La bioremédiation des sols et des eaux contaminés par les hydrocarbures est une méthode moins coûteuse et souvent nécessaire. Cependant, dans un environnement extrême (contaminant toxique/hydrophobe/insoluble, température, pH, concentration en sel, ...etc), peu de bactéries sont capables de dégrader les hydrocarbures. En effet, les travaux de recherches récents reposent sur l'isolement et la sélection des souches bactériennes capables de dégrader les hydrocarbures dans des conditions extrêmes. Les sols contaminés par le pétrole brut sont considérés comme sources potentielles pouvant contenir ce type de bactéries.

L'isolement a été réalisé à différentes températures d'incubation :

- A 30 °C : isolement des souches mésophiles.
- A 45 °C : isolement des souches thermotolérantes.
- A 55 °C : isolement des souches thermophiles.

Plus de 100 souches bactériennes aérobies ont été isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut provenant de la région de Hassi-Messaoud (Algérie). En utilisant un milieu non sélectif, cet isolement nous permettra d'observer les différentes colonies et de déterminer les caractéristiques telles que : la forme, l'opacité, la taille, la couleur et l'aspect de surface.

La figure 3.1 montre une richesse en colonies obtenues après plusieurs étapes d'adaptation. Notons aussi l'apparition d'un halo clair autour de la colonie signifiant la dégradation du pétrole.

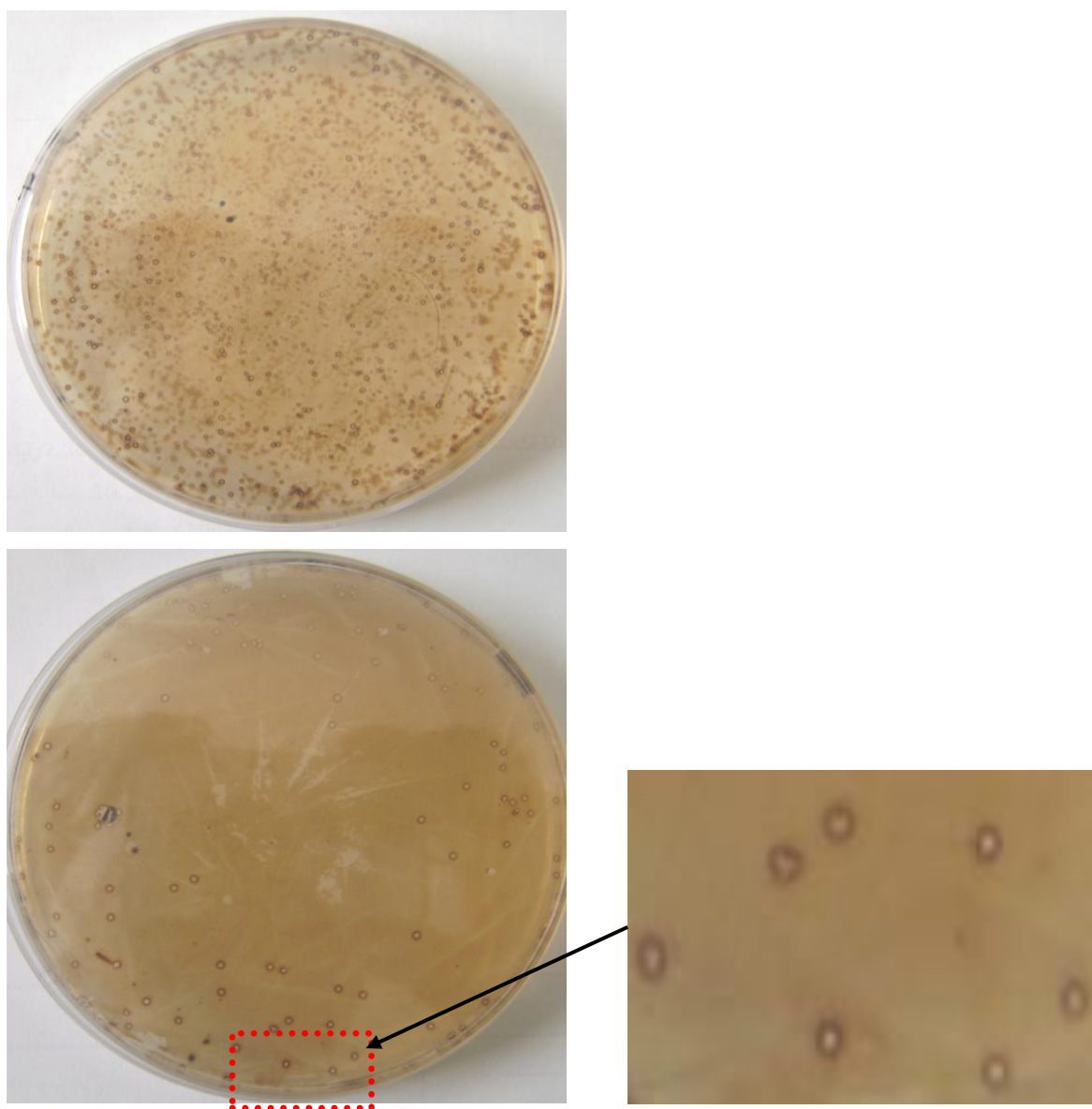


Figure 3.1 : Photos montrant la croissance des bactéries sur le pétrole brut

L'observation microscopique a donné plusieurs formes de bactéries (figure 3.2) : bacilles et coques qui se présentent sous différentes formes (simple, double, chaînettes, agrégats mobiles et immobiles).

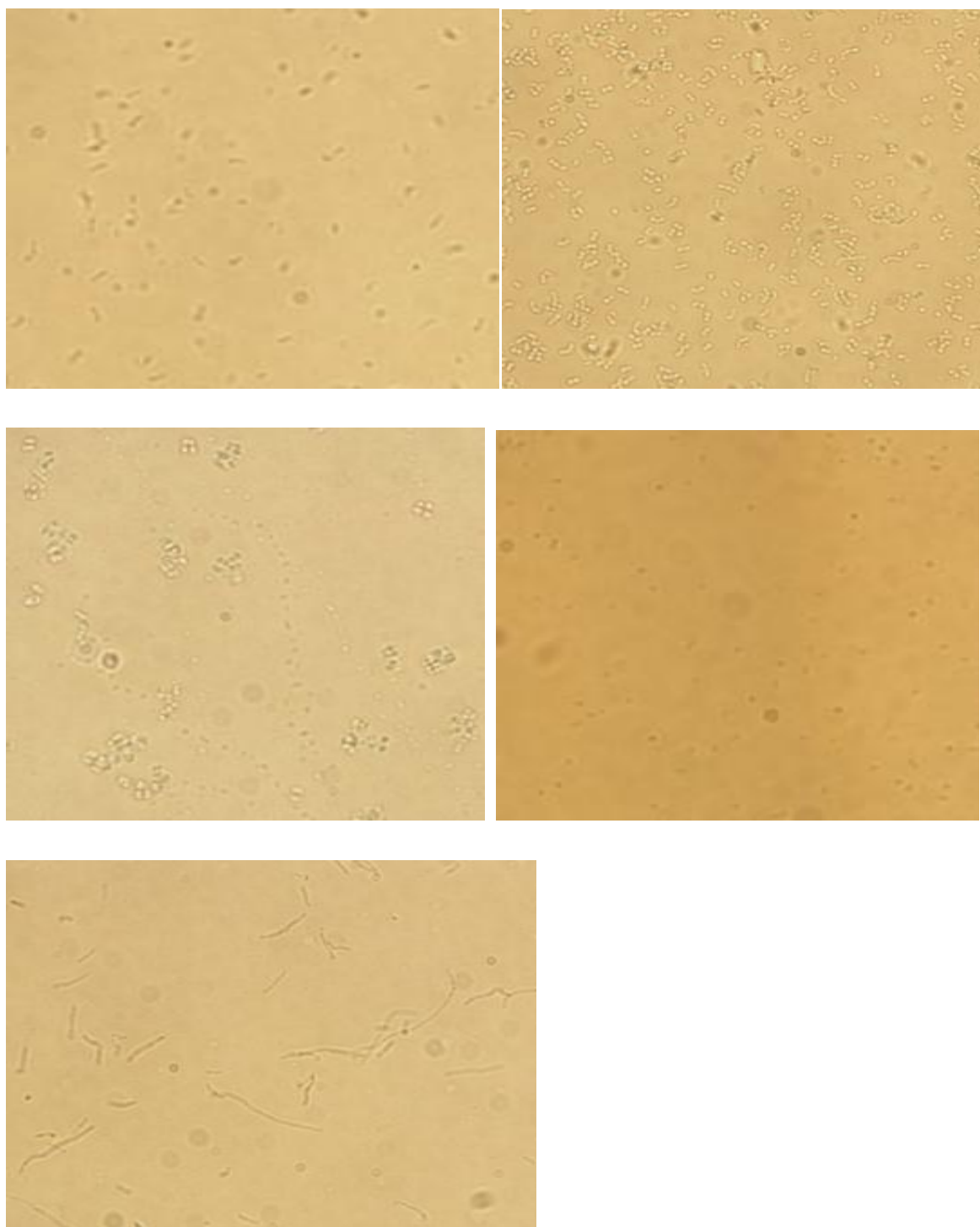


Figure 3.2 : Observation microscopique (×40) montrant les différentes formes de souches bactériennes aérobies capables de croître sur le pétrole

3.1.3. Biodégradation du pétrole brut

La biodégradation est un processus dépendant essentiellement de la nature et de la quantité des hydrocarbures, des propriétés physico-chimiques du site contaminé et de la capacité biodégradative des microorganismes.

3.1.3.1. Sélection des souches performantes à différentes températures

La dégradation des hydrocarbures par les souches bactériennes mésophiles a été largement étudiée [142, 158, 163, 180]. En revanche, il y a peu d'études réalisées sur la dégradation des hydrocarbures par des souches thermophiles, notamment celles concernant l'identification des voies métaboliques impliquées dans la biodégradation. Un autre avantage de l'utilisation des thermophiles est le taux de croissance plus rapide. On note que les enzymes des thermophiles sont plus résistants à la dénaturation physique et chimique.

3.1.3.1.1. Sélection des souches mésophiles (température d'incubation 30 °C)

Six (06) souches ont été choisies pour cette étude, la figure 3.3 montre les cinétiques de croissance des souches sur le pétrole brut. Après la consommation de l'extrait de levure, substrat facilement assimilable (après le deuxième jour), on observe une phase de ralentissement de croissance bactérienne, cette phase qui dure trois jours est due à l'adaptation des souches au nouveau substrat (pétrole brut), puis il y a une accélération de la croissance des souches performantes.

Les résultats obtenus montrent que les souches produisant les agents de solubilisation des hydrocarbures ne traduisent pas certainement une bonne dégradation ; la souche 1H prouve une solubilisation du pétrole brut, en revanche, sa croissance est plus faible par rapport aux autres souches. Les résultats obtenus indiquent que les deux souches performantes sont : **1E** et **1F**.

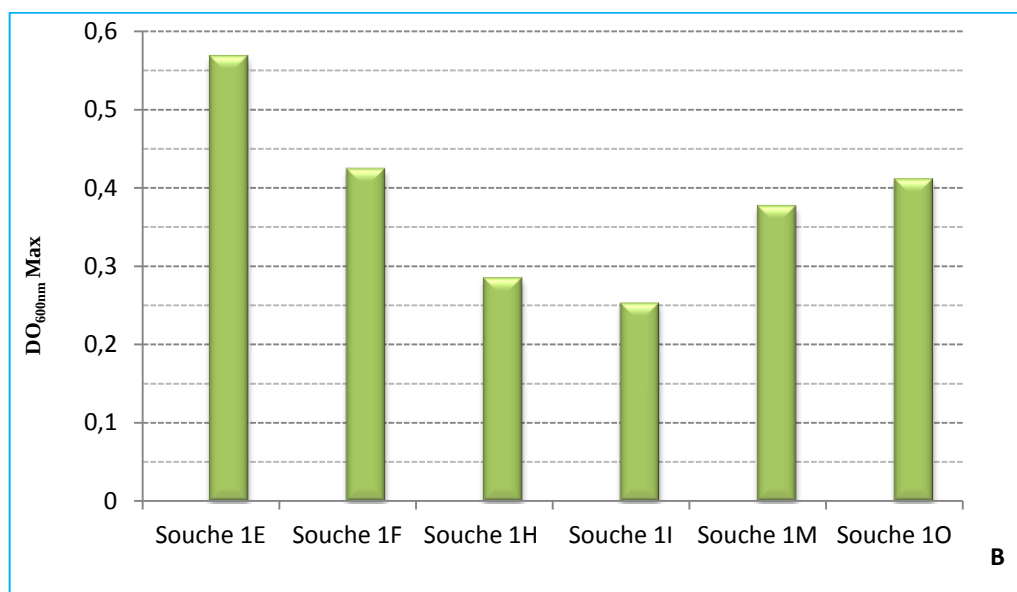
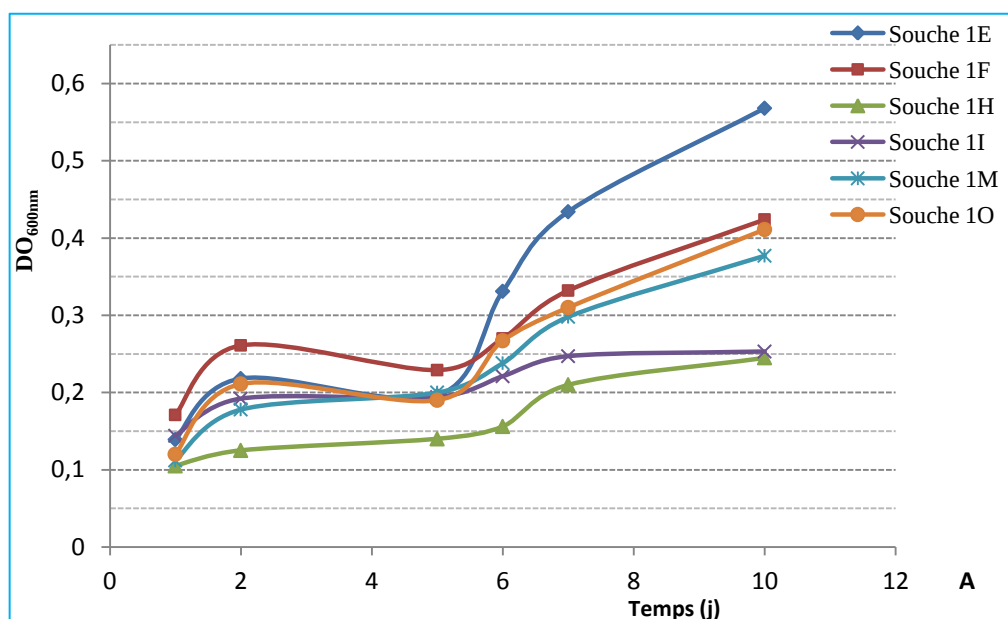


Figure 3.3 : Croissance des souches mésophiles sur le pétrole brut (30 °C et 3%, v/v). (A): Cinétique de croissance, (B): DO (600 nm) maximale

3.1.3.1.2. Sélection des souches thermophiles

Les microorganismes qui se développent de façon optimale au-dessus de 40 °C sont appelés thermophiles. La plupart des thermophiles connues sont modérées et leur température optimale de croissance est comprise entre 50 et 70 °C. La croissance optimale des thermophiles extrêmes et hyperthermophiles se produit respectivement entre 70 - 80 °C et supérieure à 80 °C [274]. Il a été noté que les thermophiles, principalement les Bacilles, possèdent un potentiel considérable pour la conversion des polluants environnementaux, y compris pour toutes les principales catégories [275].

- Température d'incubation de 45 °C

Pour cette série d'expériences, nous avons choisi sept souches afin de sélectionner les deux meilleures. La figure 3.4 montre qu'il y a une phase d'adaptation pour toutes les souches, c'est la phase de transition entre deux sources de carbone différentes ; de l'extrait de levure (substrat biodégradable) aux hydrocarbures (substrat difficilement biodégradable). Les deux souches les plus performantes sont **7A** et **7J**.

- Température d'incubation de 55 °C

Sept souches bactériennes ont été choisies pour sélectionner les deux meilleures. Les résultats obtenus (figure 3.5) montrent que la densité optique des 7 souches est plus faible par rapport aux autres types de bactéries (souches isolées à 30 °C et 45 °C). Cependant, on note que la concentration initiale en bactéries était faible (inoculum, 1%), d'après ces résultats, les souches les plus performantes sont **KS1** et **KS11**.

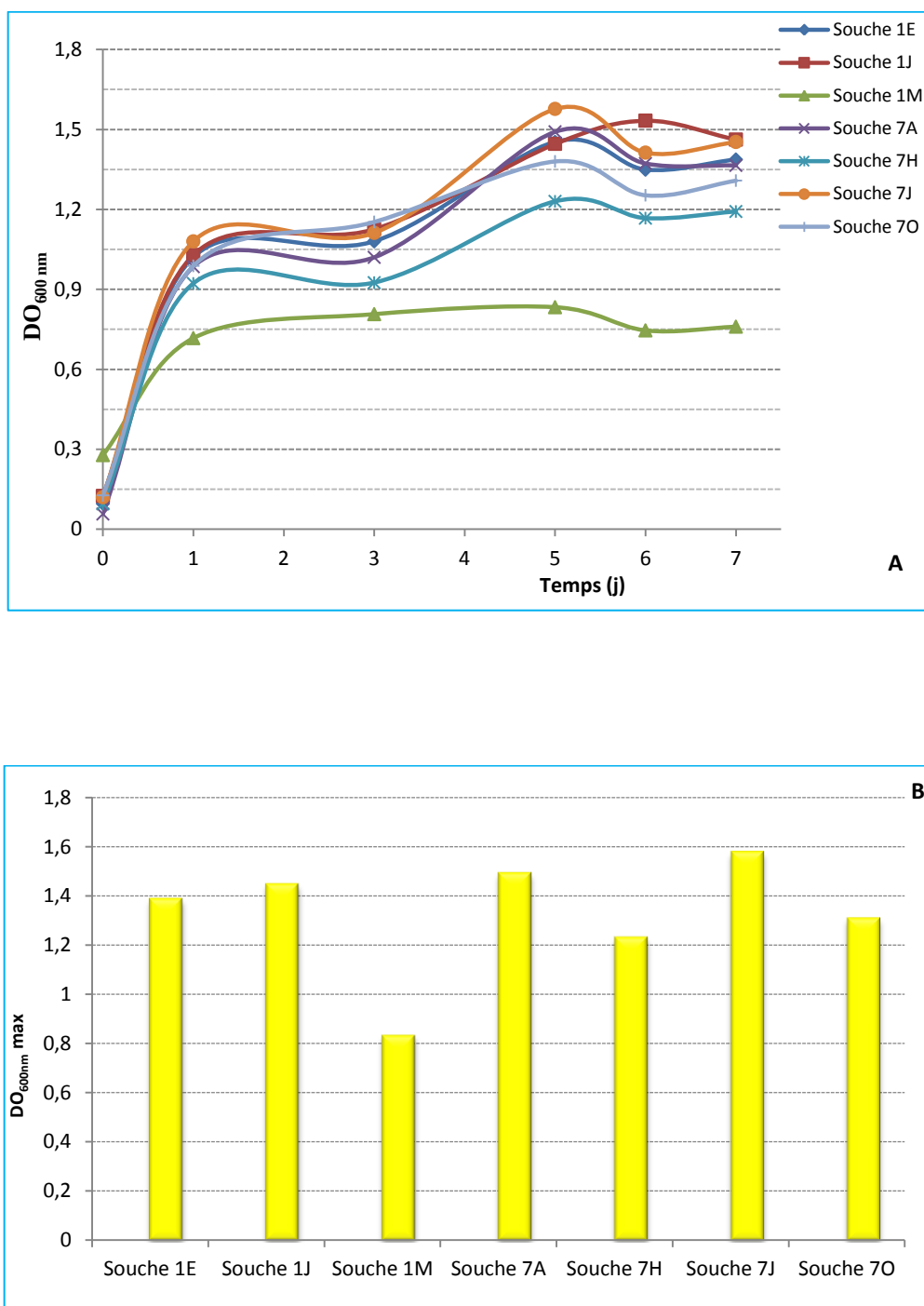


Figure 3.4 : Croissance des souches thermotolérantes sur le pétrole brut (45 °C et 3%, v/v).
 (A): Cinétique de croissance, (B): DO (600 nm) maximale

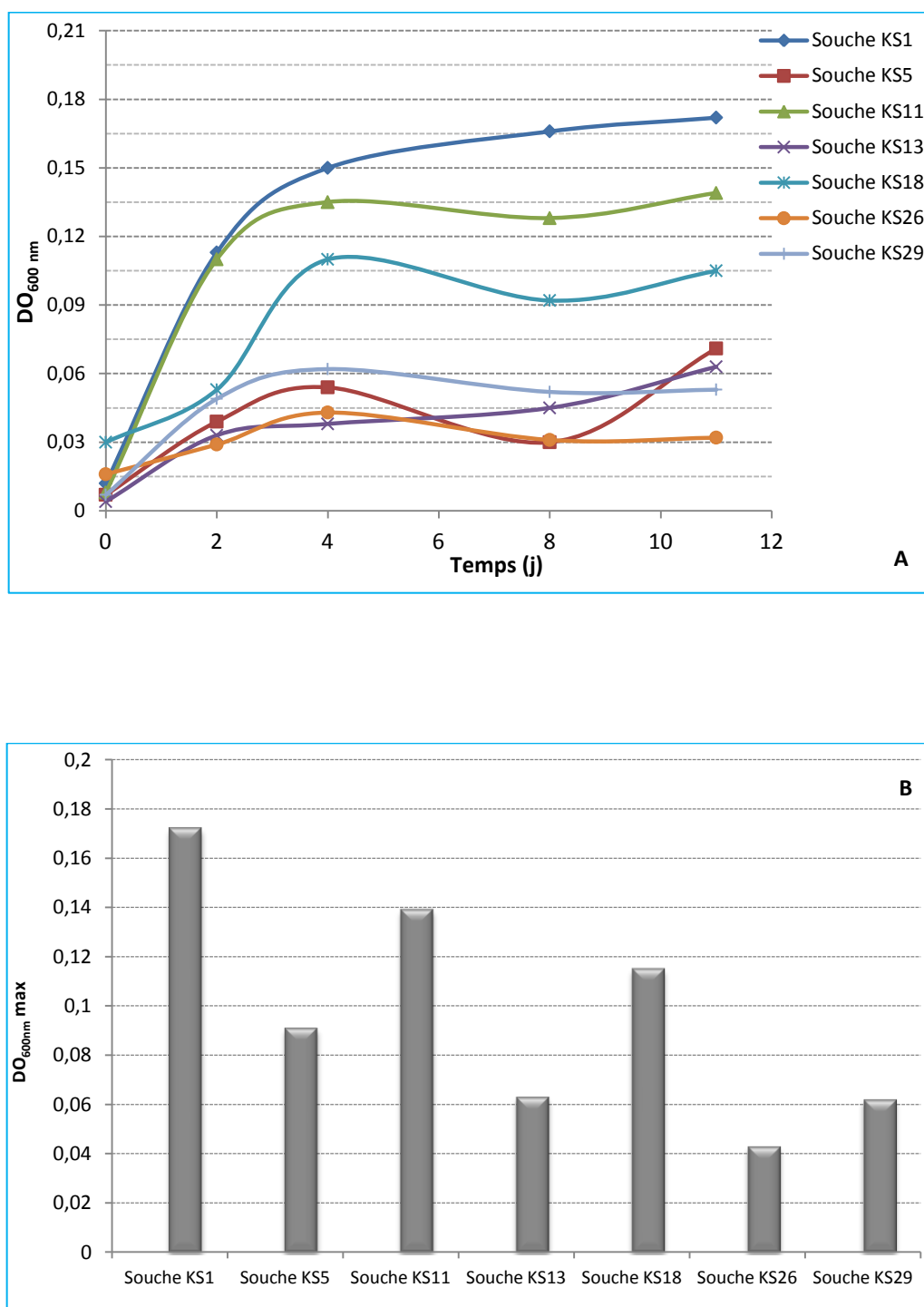


Figure 3.5 : Croissance des souches thermophiles sur le pétrole brut (55 °C et 3%, v/v).
(A): Cinétique de croissance, (B): $DO_{600\text{ nm}}$ maximale

Malgré la faible biomasse dans le milieu de dégradation (densité optique faible), on observe qu'il y a une bonne dégradation du pétrole brut (figure 3.6).

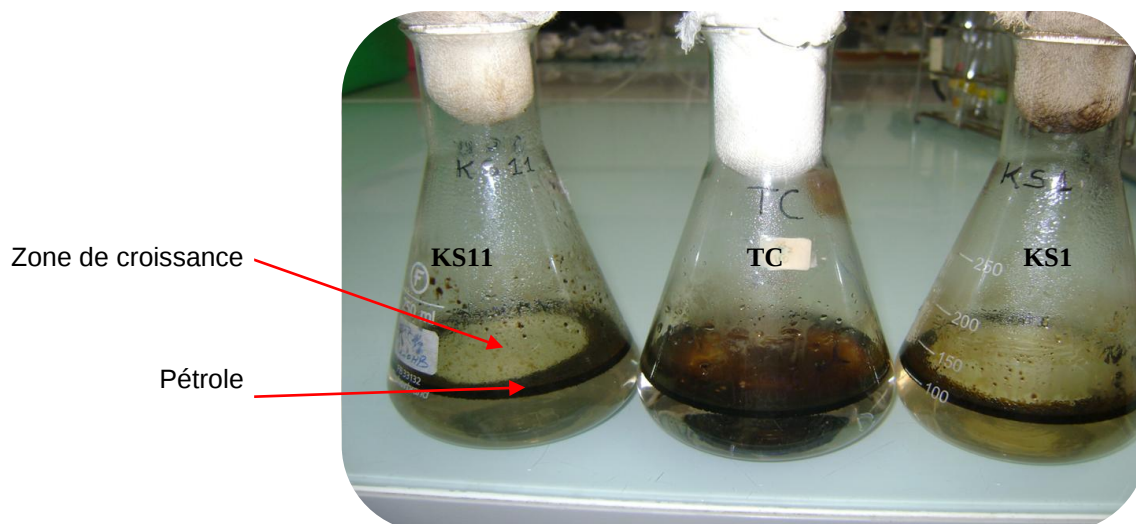


Figure 3.6 : Biodégradation de pétrole brut par les souches KS1 et KS11 à 55 °C, après le 3^{ème} jour d'incubation

Les six souches sélectionnées et retenues pour la poursuite du travail sont :

- Souches mésophiles: **1E** et **1F** (isolées à 30 °C).
- Souches thermotolérantes ou thermophiles moyennes: **7A** et **7J** (isolées à 45 °C).
- Souches thermophiles: **KS1** et **KS11** (isolées à 55 °C).

3.1.3.2. Paramètres affectant la dégradation de pétrole brut

L'adaptation des microorganismes à leur environnement repose, à la fois, sur la diversité génétique et sur la sélection naturelle. Les bactéries ont également élaboré des réseaux de régulation complexes qui leur permettent de s'adapter à différents environnements [276].

Afin d'étudier la capacité biodégradative des souches performantes, les principaux paramètres ont été déterminés ; la quantité du pétrole, la température et la concentration en sel. La dégradation est réalisée dans des flacons de 250 ml

contenant 100 ml de milieu de culture, le pH est fixé à 7,0 sous agitation de 180 tr/min. Les séries d'expériences ont été réalisées pour les trois types de souches précédemment sélectionnées. Le potentiel biodégradatif est suivi par la mesure de la biomasse (DO_{600nm} et $\log(UFC)/ml$).

3.1.3.2.1. Effet de la concentration

Dans le but de déterminer la concentration optimale du substrat, différentes concentrations du pétrole brut (v/v) ont été utilisées : 0,5 ; 1 ; 3 ; 5 ; 8 ; 15 et 30%. Les résultats obtenus (figure 3.7) montrent qu'il y a une concentration optimale pour chaque type de bactérie : les souches mésophiles pouvaient croître sur le pétrole brut jusqu'à une concentration de 15% (v/v), cependant, une concentration de 8% s'avère convenable pour les souches thermotolérantes (incubées à 45 °C), par contre, une bonne croissance est observée à 3% (v/v) pour les souches thermophiles (incubées à 55 °C).

On constate aussi que la concentration optimale de pétrole est corrélée avec la nature de microorganisme ; seules les mésophiles peuvent tolérer des quantités élevée de pétrole (déversement accidentel).

[Sathishkumar et al. \[189\]](#) ont étudié l'effet de la concentration du pétrole brut (1, 3, 6, 9, 12%, v/v) sur la capacité biodégradative de la souche *Pseudomonas sp.* BPS1-8 (incubée à 35 °C pendant 25 jours), les résultats obtenus montrent que le taux de dégradation est inversement proportionnel à la concentration du pétrole. Par exemple, en augmentant la concentration de pétrole brut de 1 à 12%, le taux de dégradation a diminué de 67 à 34%. En revanche, la biomasse (qui s'exprime en UFC/g) est proportionnelle à la concentration du pétrole.

Contrairement à d'autres auteurs, les résultats obtenus dans notre travail montrent que les faibles concentrations en pétrole brut ont un effet négatif sur la croissance bactérienne. Ceci est observé pour les trois souches (mésophiles, thermotolérantes et thermophiles). Ce phénomène peut être expliqué par le mauvais contact entre la souche et le substrat. Donc selon les résultats illustrés dans la figure 3.7, les souches **1E**, **7J** et **KS1** sont sélectionnées comme souches performantes.

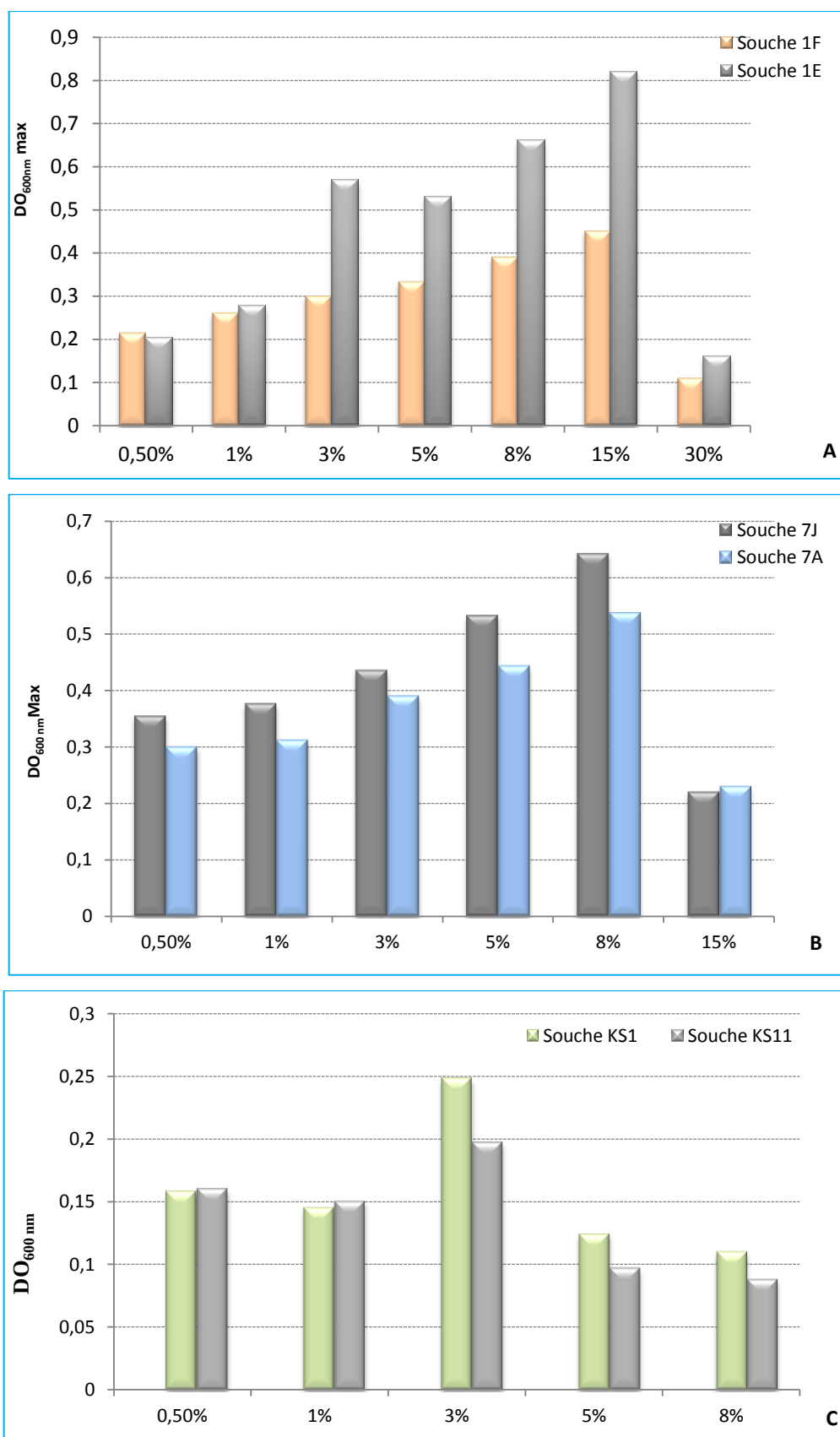


Figure 3.7 : Effet de la concentration du pétrole brut (% v/v) sur la croissance des souches sélectionnées : (A) Souches 1E et 1F incubées à 30 °C, (B) Souches 7A et 7J incubées à 45 °C, (C) Souches KS1 et KS11 incubées à 55 °C.

Ainsi, les résultats présentés dans la figure 3.8 révèlent que la biomasse bactérienne est fonction de la nature de la souche, la faible biomasse est observée pour les thermophiles et ceci quelque soit la concentration du pétrole.

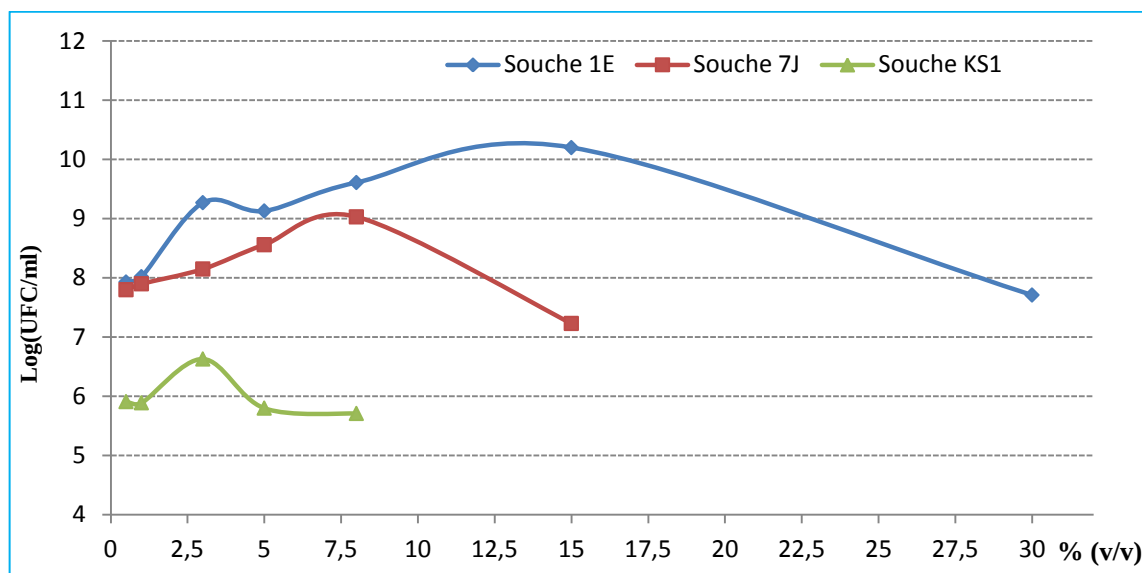


Figure 3.8 : Effet de la concentration du pétrole brut sur la biomasse des trois souches performantes

3.1.3.2.2. Effet de la température

La température est un paramètre important pouvant influencer la biodégradation du pétrole. En effet, les souches performantes ont été soumises à différentes valeurs de températures allant de 25 à 55 °C. Les résultats obtenus (figure 3.9) révèlent que le taux de dégradation est fonction de la température ; chaque nature de souche a une gamme optimale de température.

[Hasanuzzaman et al. \[277\]](#) ont trouvé, en utilisant une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, que le taux de dégradation du pétrole brut a augmenté de 75 à 85% quand la température passe de 20 à 30 °C.

Selon [Leahy et Colwell \[69\]](#), des températures supérieures à 40 °C conduisent à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures sur la membrane cellulaire.

Nos résultats indiquent que la souche mésophile 1E possède une gamme optimale réduite (inférieure à 37 °C). Par contre la souche thermotolérante 7J détient une gamme optimale de croissance plus large. La même chose est observée pour la souche thermophile KS1 ; des températures élevées ne sont pas favorables pour les mésophiles, par contre, les thermophiles ne semblent pas être affectées par des températures moyennes (supérieures à 30 °C).

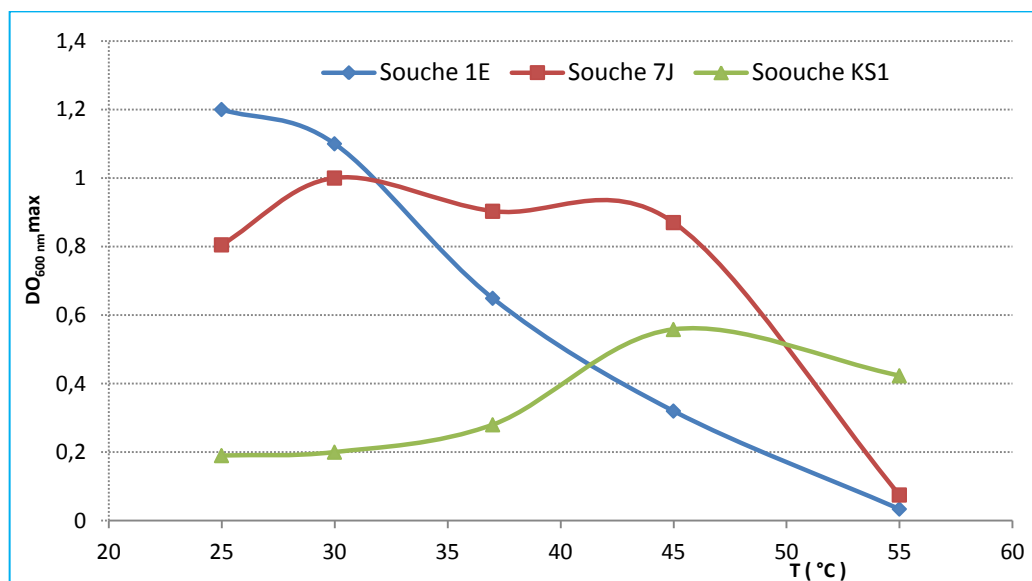


Figure 3.9 : Effet de la température (pétrole brut : 3%, v/v) sur la croissance des trois souches sélectionnées

3.1.3.2.3. Effet de la salinité

L'effet de la salinité sur la dégradation des hydrocarbures semble complexe. Une forte concentration de sel ralentit la biodégradation du pétrole, elle perturbe la membrane cellulaire, dénature certaines protéines comme les enzymes ou change la force osmotique, l'un de ces facteurs peut être mortel pour les microorganismes [278].

Les microorganismes nécessitant du sel pour leur croissance sont appelés halophiles, tandis que ceux qui sont capables de croître aussi bien en présence qu'en l'absence de sel sont désignés halotolérants. Les halophiles extrêmes nécessitent généralement au moins 1M de NaCl (environ 6%, p/v) pour leur

croissance, des concentrations de NaCl supérieures à 3M (175 g.l^{-1}) entraînent une croissance optimale pour les halophiles [279, 280, 281].

Mille *et al.* [192] ont étudié l'effet de la concentration de NaCl (0 à 2 mol.l^{-1}) sur la biodégradation du pétrole brut par une communauté bactérienne mixte isolée à partir d'un sédiment marin, la quantité de pétrole dégradée était proportionnelle à la concentration de sel jusqu'à une valeur de $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$ de NaCl (taux de dégradation maximal). Au-delà, son effet devient négatif sur le taux de dégradation.

A cet effet, une série d'expériences a été réalisée pour différentes concentrations en sel (NaCl) : 0 ; 10 ; 20 ; 50 ; 80 ; 100 et 150 g.l^{-1} . Les résultats de l'influence de la salinité (NaCl) sur la croissance microbienne sont donnés dans la figure 3.10. On constate que l'ajout du sel améliore la dégradation du pétrole brut pour les trois souches ; la souche mésophile 1E tolère une large gamme de salinité (0 à 10%, p/v de NaCl), une croissance optimale est observée pour une concentration en sel de 2% (p/v), au-delà, l'augmentation de la concentration de NaCl a pour un effet négatif sur l'efficacité de la biodégradation. La souche 1E (incubée à 30°C) peut être classée comme une souche mésophile halotolérante. A titre d'exemple, l'augmentation de la concentration en sel de 0 à 2% conduit à une augmentation en biomasse Log(UFC/ml) de 22%.

Au contraire, les deux souches thermophiles, 7J incubée à 45°C et KS1 incubée 55°C , tolèrent une gamme étroite de salinité (0 à 2%), la meilleure croissance est obtenue à 1% (p/v) de NaCl. Une salinité de 2% de NaCl a un effet positif (par rapport à 0% de NaCl) pour la souche KS1 incubée à 55°C , l'inverse est observée pour la souche 7J incubée à 45°C . Par exemple, une augmentation de la salinité de 0 à 1% de NaCl a conduit à une augmentation en biomasse de 9% et 21% pour les souches 7J et KS1, respectivement.

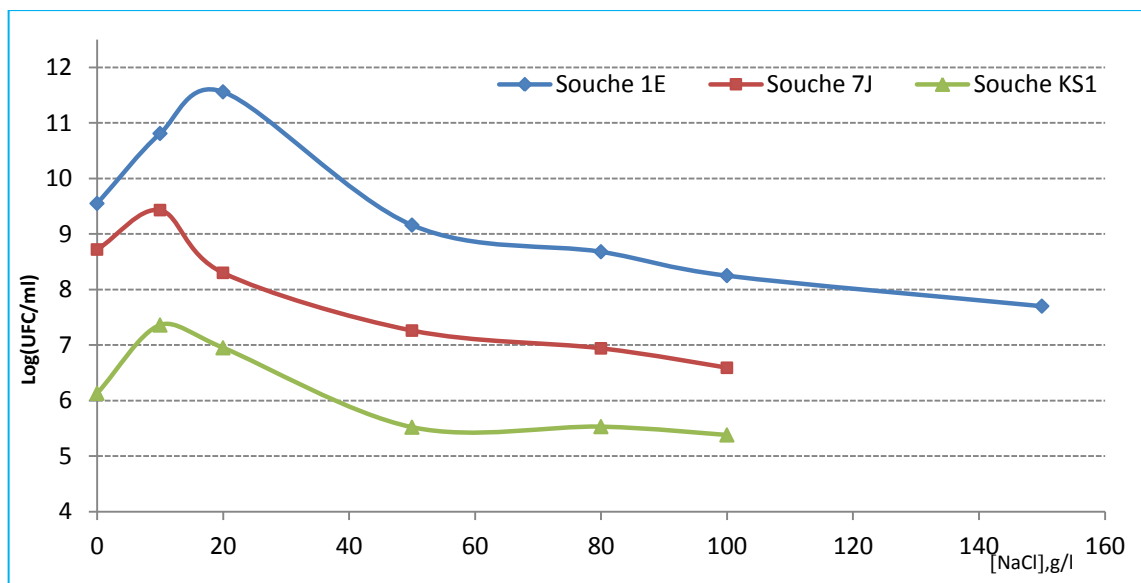


Figure 3.10 : Effet de la concentration en sel NaCl (pétrole brut : 3%, v/v) sur la croissance des trois souches sélectionnées

Dans un milieu salin (plus de 2%, p/v), l'utilisation des souches bactériennes mésophiles semblent être efficaces dans la bioremédiation des sites contaminés par le pétrole brut.

La biodégradation du pétrole brut est influencée par la salinité du milieu, cependant cette influence dépend du microorganisme utilisé, en fait, dans un environnement extrême, l'utilisation des souches sélectives s'avère indispensable pour la protection de l'environnement.

3.1.3.3. Capacité de croissance sur les aromatiques et le décane

Les résultats obtenus montrent que les deux souches **1E** et **7J**, incubées à 30 et 45 °C respectivement, peuvent croître sur une variété d'hydrocarbures, cependant ces deux souches ne peuvent pas tolérer les aliphatiques à chaînes courtes (décane), en raison de leur toxicité pour la majorité des microorganismes. En revanche, la souche thermophile KS1 incubée à 55 °C peut croître sur le décane ($DO_{600nm} = 0,24$). Le tableau 3.2 montre la capacité de croissance des trois souches sur différents d'hydrocarbures et leurs dérivés.

Tableau 3.2 : Densité optique (DO_{600nm}) après 3 semaines de dégradation (180 tr/min, pH = 7, Milieu de culture : MM)

Substrat	1E	7J	KS1
Température d'incubation	30 °C	45 °C	55 °C
Acide benzoïque	0,56	0,59	0,25
Phénol	0,48	0,56	0,12
Décane	0,07	0,03	0,24
Naphtalène	0,79	0,45	0,16
Phénanthrène	0,51	0,45	0,17
Fluoranthène	0,48	0,43	0,12
Pyrène	0,54	0,66	0,16

3.1.3.4. Dégradation des *n*-alcanes

Dans un mélange d'hydrocarbures (pétrole brut), les *n*-alcanes sont les premiers à se biodégrader. Cependant, leur dégradation dépend de la longueur de chaîne ; les composés dont le nombre d'atome de carbone est inférieur à 10 sont les plus difficilement biodégradables, au-delà, ils sont considérés comme facilement biodégradables. La difficulté de dégradation des *n*-alcanes dépend du nombre d'atome de carbone, à titre d'exemple, la dégradation des composés de *n*-C₃₀ à *n*-C₄₀ peut durer quelques mois, par contre la dégradation des composés dont le nombre d'atomes supérieur à C₄₀ dure plusieurs années [102, 282].

Une étude a été portée sur la dégradation des *n*-alcanes (C₁₅ à C₄₄) par Plohl *et al.* [282]. Les résultats obtenus ont montré que les taux de dégradation étaient de 70, 45 et 20% pour *n*-C₁₅ à *n*-C₂₂ ; *n*-C₂₂ à *n*-C₃₀ et *n*-C₃₀ à *n*-C₄₄, respectivement (incubation à 22 °C).

Knezevich *et al.* [283] ont trouvé que le taux de dégradation des *n*-C₁₀, *n*-C₁₂ et *n*-C₁₄ était de plus de 95%, tandis que, le taux d'élimination des *n*-alcanes à longue chaîne (*n*-C₁₆ à *n*-C₃₆) était de 63 à 87%. Les travaux de Rahman *et al.* [5] ont montré que le taux de dégradation était de 100%, 83 - 98%, 80 - 85% et 57 -

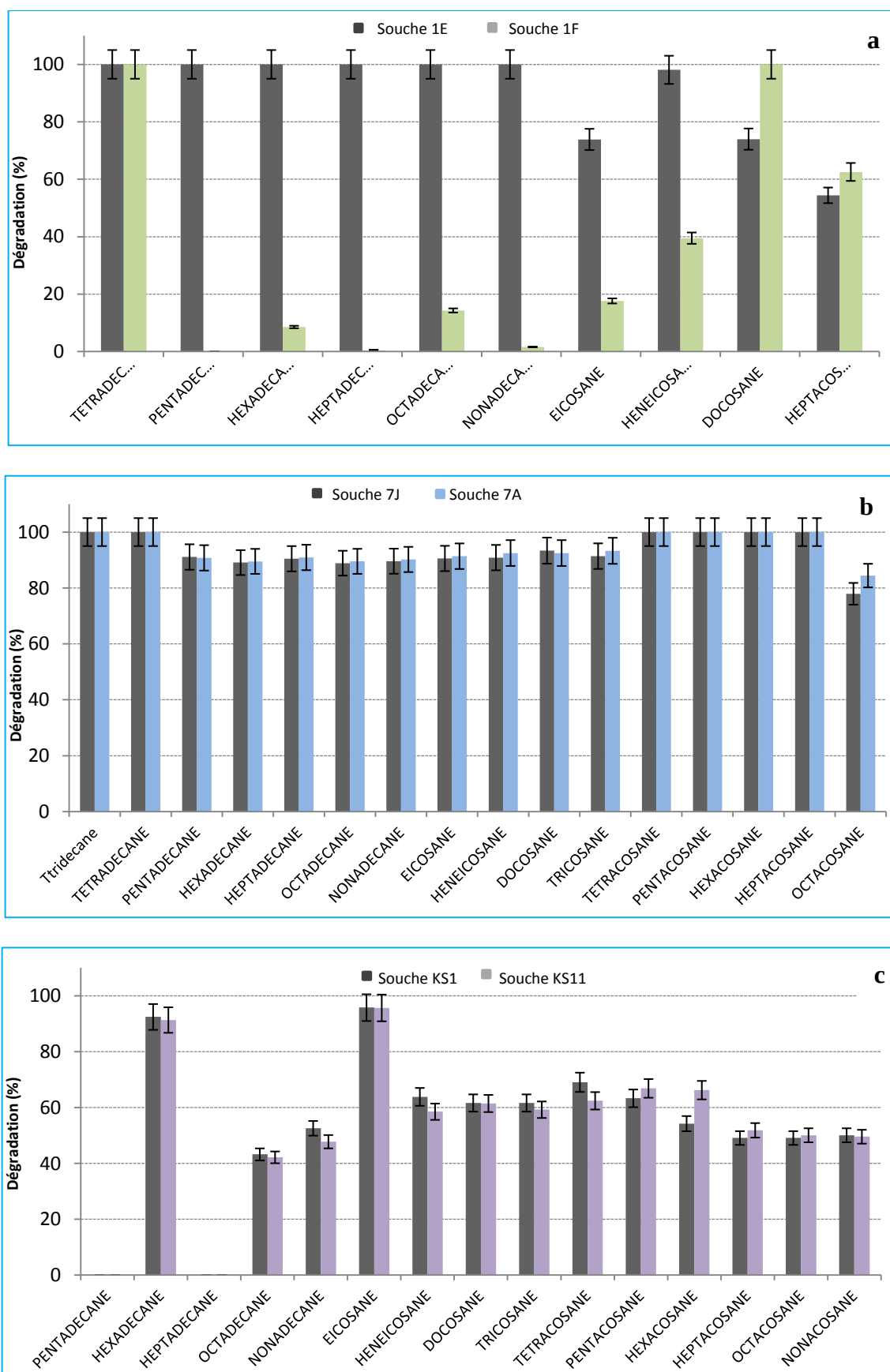
73% pour les composés $n\text{-C}_8$ à $n\text{-C}_{11}$; $n\text{-C}_{12}$ à $n\text{-C}_{21}$; $n\text{-C}_{22}$ à $n\text{-C}_{31}$ et $n\text{-C}_{32}$ à $n\text{-C}_{40}$, respectivement (incubation à 30 °C).

D'après la littérature, on constate que les n -alcanes à longue chaîne sont moins biodégradables. Toutefois, l'ajout des éléments nutritifs (engrais), des biosurfactants et des co-substrats peuvent améliorer considérablement leur élimination [284].

Dans notre étude, le taux de dégradation des n -alcanes a été déterminé par analyse chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Les résultats obtenus montrent que (figure 3.11) :

- La souche mésophile **1E** possède un pouvoir biodégradatif élevé, sept types d'hydrocarbures ont été complètement dégradés ($n\text{-C}_{13}$ à $n\text{-C}_{19}$ et $n\text{-C}_{21}$). Un taux de dégradation de 74% a été observé pour deux autres hydrocarbures ($n\text{-C}_{20}$ et $n\text{-C}_{22}$).
- Excepté l'octacosane ($n\text{-C}_{29}$), où on a enregistré un taux de dégradation aux alentours de 80%, les souches thermotolérantes **7J** et **7A** montrent une capacité biodégradative très marquée pour les n -alcanes analysés (C_{13} à C_{28}), avec un taux de dégradation variant de 90 à 100% : 6 hydrocarbures (C_{13} , C_{14} , C_{24} à C_{27}) sont dégradés complètement (100 %).
- En revanche, les souches thermophiles **KS1** et **KS11** ont une activité de dégradation modérée, un meilleur taux de dégradation a été observé pour deux types d'hydrocarbures seulement ; n -hexadécane (92%) et n -eicosane (95%). Les autres ($n\text{-C}_{19}$ à $n\text{-C}_{29}$) sont assez dégradés (50 à 60%).

Il semble qu'une température assez élevée (45 °C) a un effet positif sur l'activité enzymatique conduisant à une dégradation élevée des hydrocarbures, par contre l'effet inverse est observé pour des températures élevées (55 °C), cela peut être expliqué, soit par l'augmentation de la solubilité des hydrocarbures notamment de courte chaîne (inférieure à $n\text{-C}_{12}$) qui sont plus toxiques pour les microorganismes, soit par une diminution de l'activité des enzymes responsables de la dégradation des hydrocarbures en retardant leur élimination. Le spectre CG/SM du pétrole brut est donné dans la figure 3.12.



Figures 3.11 : Taux de dégradation (%) des *n*-alcane (pétrole, 3%, v/v ; deux semaines d'incubation): a- souches mésophile (1E et 1F), b- souches thermotolérantes (7A et 7J), c- souches thermophiles (KS1 et KS11)

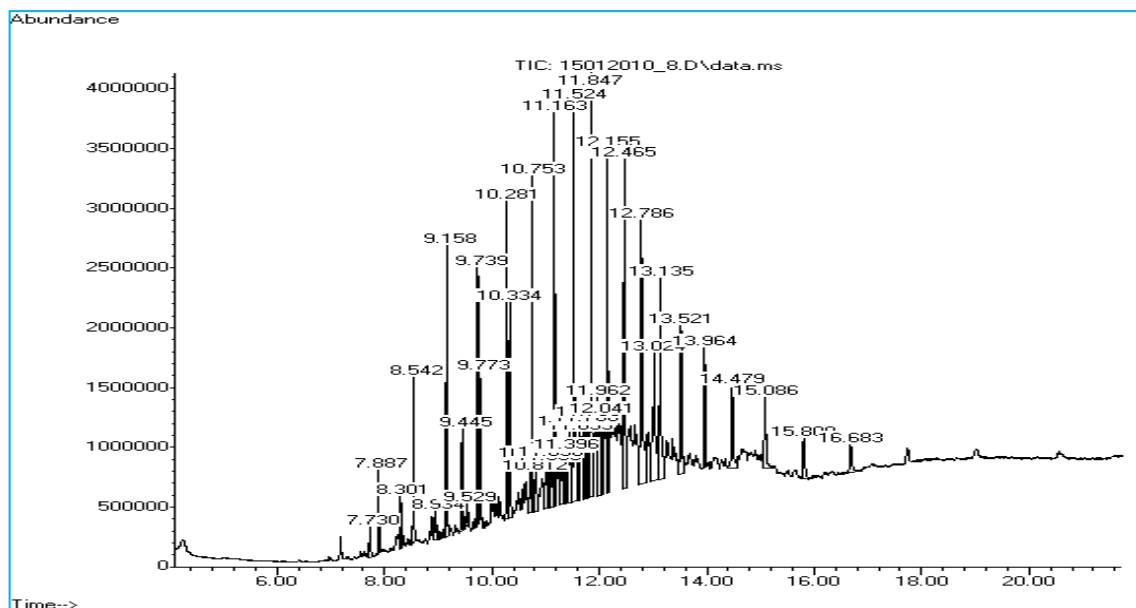


Figure 3.12: Spectre CG/SM du pétrole brut

3.1.3.5. Dénombrement des bactéries cultivées sur milieu MM à base de pétrole brut

L'activité des souches performantes (1E, 7J et KS1) sur le pétrole brut a été vérifiée par le dénombrement en milieu solide (figure 3.13). Les trois souches sélectionnées montrent une croissance remarquable et donc une capacité élevée de dégradation du pétrole brut.

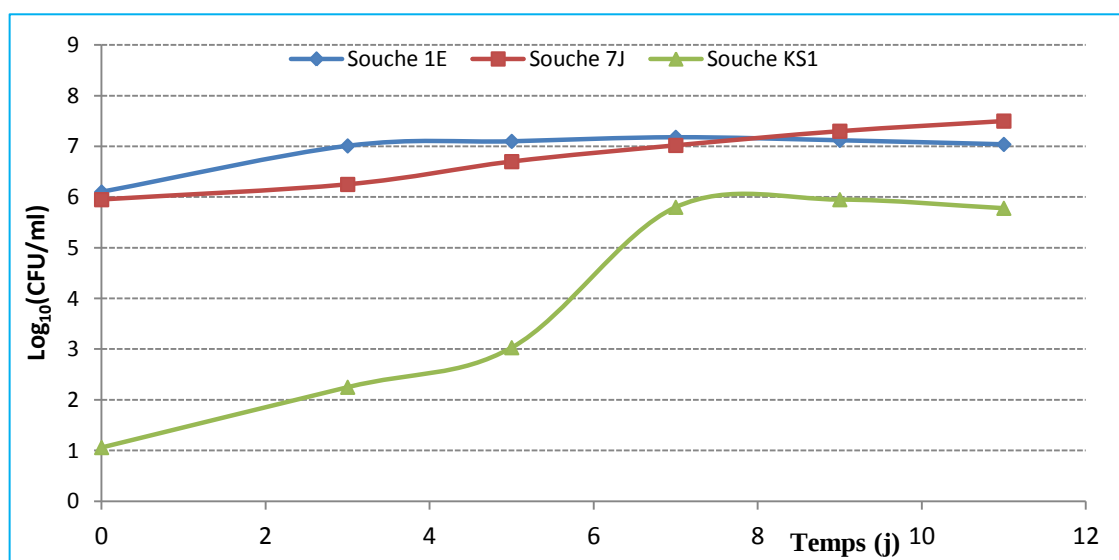


Figure 3.13 : Evolution de la biomasse en fonction du temps pour les trois souches sur milieu MM (pétrole brut : 3%, v/v)

3.1.3.6. Mode d'action des souches performantes sur les hydrocarbures

L'hydrophobicité est un facteur important dans l'adhésion initiale des microorganismes à l'interface entre la phase liquide non-aqueuse (NAPL) formée par les hydrocarbures et la phase aqueuse. Un certain nombre d'espèces de bactéries sont capables de dégrader les hydrocarbures liquides après avoir adhéré à la surface des gouttelettes [285]. Ce contact direct entre une cellule bactérienne et un hydrocarbure peut augmenter de manière significative le taux de diffusion dans la cellule, ce qui améliore la croissance et l'augmentation du taux apparent de la dissolution de l'hydrocarbure.

D'après les études de Lee et Yii [286], il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophobe quand le pourcentage d'adhésion est supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe quand le pourcentage est entre ces deux valeurs.

Ainsi, une souche est dite productrice de biosurfactant, si la valeur de la tension de surface est inférieure à 40 mN.m^{-1} [257].

Les résultats recueillis dans le tableau 3.3 montrent que les souches 1E et 7J sont très hydrophobes et productrices de biosurfactants. Leurs taux d'adhésion sont respectivement 74,05 et 68,2%. En revanche, la souche KS est hydrophile mais aussi productrice de biosurfactant. Une corrélation entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la croissance microbienne sur les hydrocarbures a été observée ; une bonne croissance des cellules correspond à une hydrophobicité élevée.

Cependant, des concentrations en biosurfactants inférieures à la CMC inhibent l'adhésion des bactéries sur les gouttelettes d'hydrocarbures [285].

Le caractère hydrophile de la souche KS1 permet de penser que les bactéries peuvent adhérer de façon plus importante à des surfaces hydrophiles.

Finalement, les résultats obtenus montrent que les microorganismes peuvent modifier ou développer de nouvelles stratégies métaboliques (production de biosurfactant, changement des propriétés de la surface cellulaire) afin de s'adapter aux milieux contaminés par les composés toxiques.

Tableau 3.3 : (DO_{600nm}) max, Hydrophobicité maximale (% adhésion) et Tension de surface minimale (mN/m) pour les trois souches (MM, 2%, v/v de pétrole)

Souches	Densité optique (DO_{600nm}) max	Hydrophobicité maximale (%)	Tension de surface minimale (mN/m)
1E	0,474	74,05	32,5
7J	0,733	68,2	33,1
KS1	0,34	23,5	37,6

3.1.3.7. Caractéristiques phylogénétiques des trois souches

Après avoir procédé à l'extraction de l'ADN génomique des souches, le gène codant pour l'ARNr16S a été amplifié par PCR. La figure 3.14 représente les électrophorèses sur gels d'agarose de l'ADN génomique des trois souches, du produit PCR de l'ADNr 16S et du produit de PCR purifié qui sera utilisé ensuite pour le séquençage.

Le séquençage (1490 nucléotides) du gène codant pour l'ARNr 16S des trois souches a été comparée avec les séquences disponibles dans la banque de données GenBank. L'arbre phylogénétique, obtenu à l'issue de cette comparaison avec des séquences d'ARNr 16S et après analyse des distances par la méthode de Neighbor-joining (corrections de Jukes et Cantor), montre le positionnement des trois souches **KS1**, **7J** et **1E**: la souche **1E** est phylogénétiquement liée au genre *Staphylococcus* affiliée à l'espèce *Staphylococcus haemolyticus* (mésophile), qui est l'espèce la plus proche, avec un pourcentage de 99% , bien que la souche **7J** soit identifiée comme *Bacillus licheniformis* (thermotolérante) avec un pourcentage d'homologie 97%, alors que pour la souche **KS1** incubée à 55 °C, l'espèce *Geobacillus pallidus* (thermophile) est la plus proche avec un pourcentage d'homologie 98% comme le montre la figure 3.15.

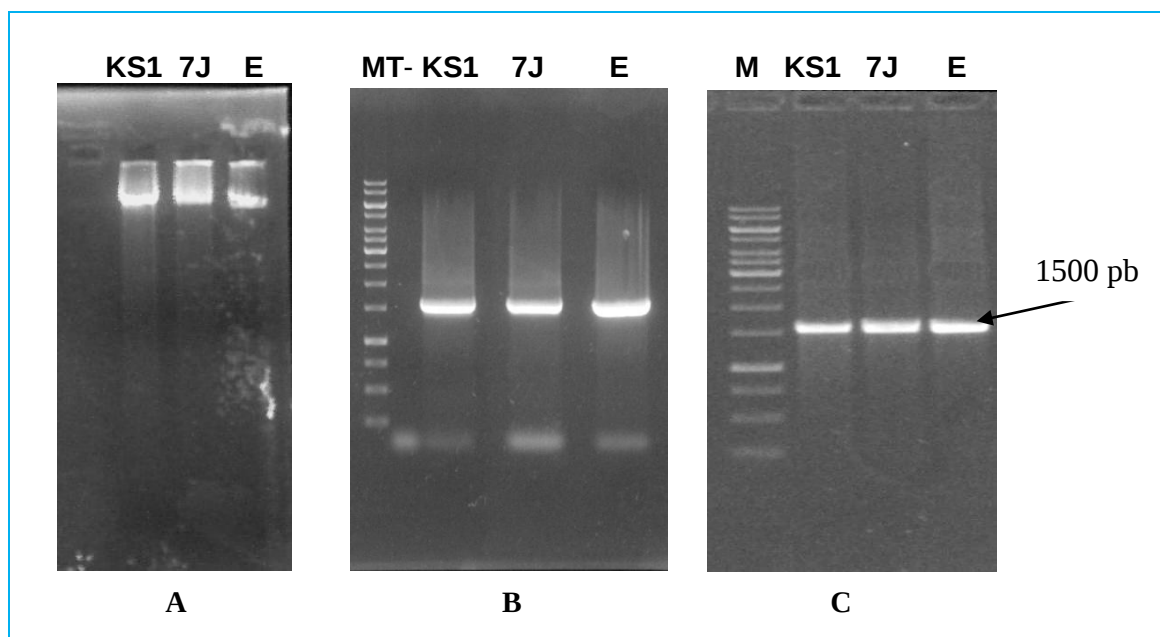


Figure 3.14 : Electrophorèses sur gels d'agarose (1 %). (A) : ADN génomique des trois souches (KS1, 7J et 1E), (B) : Produit de PCR du gène de l'ARNr 16S, (C) : Produit de PCR purifié.

M : Marqueur de taille Gene Ruler 1Kb DNA Leader (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 et 10000 pb)

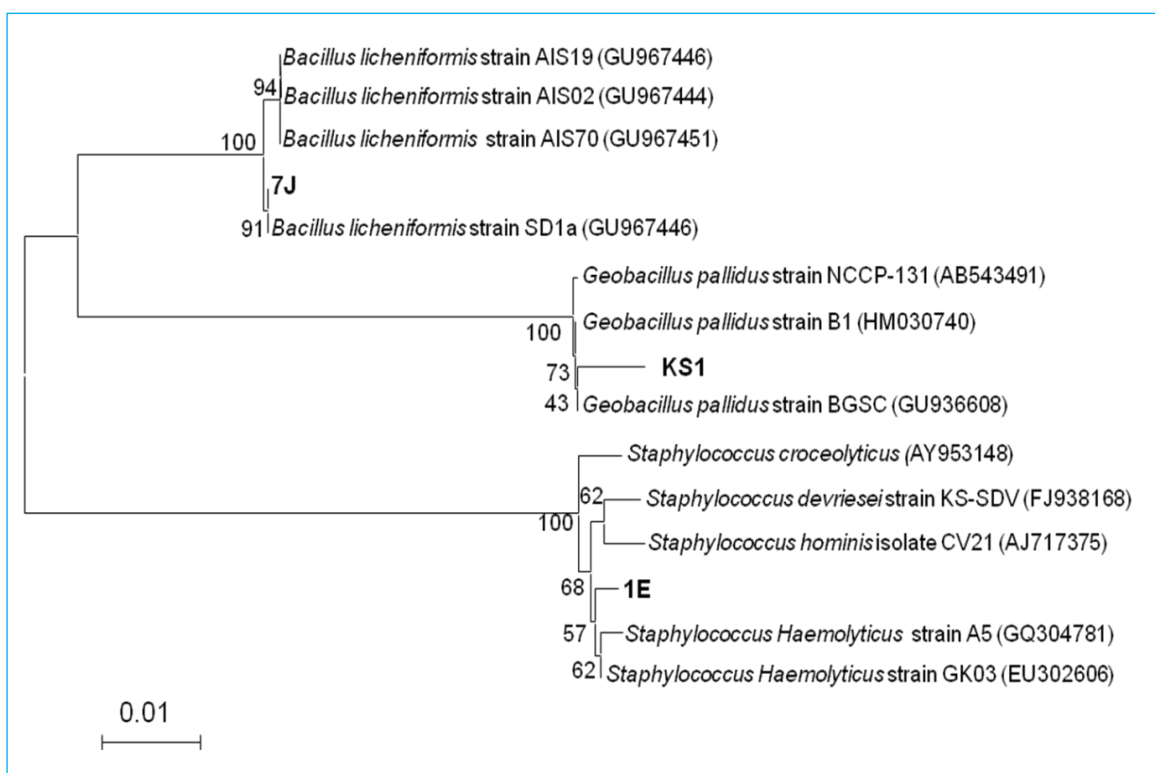


Figure 3.15 : Arbre phylogénétique montrant la phylogénie des souches 1E, 7J et KS1 basé sur le séquençage de l'ARNr 16S

3.1.3.8. Conclusion

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes, notamment les bactéries, ayant un pouvoir biodégradatif élevé envers des substances organiques. Dans ce travail, nous avons pu isoler et sélectionner des souches bactériennes aérobies de nature différente (mésophiles, thermotolérantes et thermophiles). Les souches sélectionnées ont montré une capacité biodégradative élevée de dégradation des hydrocarbures. Les résultats obtenus ont montré que la souche mésophile 1E pouvait croître sur le pétrole brut jusqu'à une concentration de 15% (v/v). Cette dernière est réduite à 8% et 3% respectivement pour les souches 7J (thermotolérante) et KS1 (thermophile). Par ailleurs, la dégradation est améliorée en présence de sel. La souche 1E tolère une large gamme de salinité [0 à 80 g.l⁻¹ de NaCl] avec l'optimale de 20 g.l⁻¹, cette gamme est réduite pour les souches 7J et KS1 et l'optimale située à 10 g.l⁻¹. L'influence de la température de dégradation du pétrole dépend de type de bactérie.

Les analyses GC/SM de la dégradation des *n*-alcanes (C₁₃ à C₂₉) révèlent que les souches 7A et 7J (incubées à 45 °C) dégradent presque complètement les *n*-alcanes étudiés (taux de dégradation variant de 90 à 100%), également la souche mésophile 1E possède un pouvoir biodégradatif élevé, sept types d'hydrocarbures ont été complètement dégradés (*n*-C₁₃ à *n*-C₁₉ et *n*-C₂₁). Il semble que l'augmentation de la température a un effet positif sur l'activité enzymatique, cependant des températures plus élevées ont un l'effet inverse pour la souche KS1 où on a enregistré une dégradation modérée.

L'étude de l'hydrophobicité de la surface cellulaire montre que les souches 1E et 7J sont fortement hydrophobes. Par contre la souche KS1 est fortement hydrophile, ce caractère permet de penser que la bactérie peut adhérer de façon plus importante à des surfaces hydrophiles et par conséquent offre à la souche des avantages pour son utilisation dans la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures.

L'identification génotypique de trois souches bactérienne performantes a révélé une diversité des espèces différentes. Dans ce cas, les souches 1E, 7J et KS1 sont affiliées aux espèces *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus licheniformis* et *Geobacillus pallidus*, respectivement.

3.2. Biodégradation du naphtalène: molécule modèle des HAP

La dégradation du naphtalène par des souches bactériennes mésophiles, en conditions aérobies, a été largement étudiée chez les bactéries Gram négative notamment les espèces de genre *Pseudomonas*. Des informations détaillées ont été présentées sur le taux de dégradation, les différentes voies métaboliques et les enzymes impliquées [143, 145, 147, 149]. En revanche, peu de travaux ont été portés sur la biodégradation du naphtalène ou d'autres HAP par des bactéries thermophiles.

La dégradation des xénobiotiques par les microorganismes thermophiles fournit des avantages multiples par rapport aux mésophiles ou psychrophiles, notamment leur application dans les procédés biotechnologiques et la bioremédiation *ex-situ*. La biodisponibilité limitée, en raison de la faible solubilité des contaminants hydrophobes (hydrocarbures), peut être résolue en augmentant la température. A titre d'exemple, la solubilité du naphtalène dans l'eau augmente de 30 à 80 mg.l⁻¹ pour une augmentation de température de 20 à 45 °C, respectivement [287]. Par ailleurs, le taux de diffusion augmente à des températures plus élevées avec un impact positif supplémentaire sur la biodisponibilité du polluant.

3.2.1. Sélection de la souche performante

Dans cette deuxième partie expérimentale, les souches bactériennes aérobies testées ont été isolées à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud. La température d'isolement était de 45 °C.

Parmi les huit souches utilisées, une souche thermotolérante, codée K1C, a été sélectionnée comme souche performante dégradant le naphtalène. Les conditions opératoires étaient : 500 mg.l⁻¹ de naphtalène, milieu MM et pH = 7,0.

3.2.2. Facteurs affectant la biodégradation du naphtalène

L'efficacité de la biodégradation dépend de facteurs environnementaux, qui sont variables d'un site à un autre, tels que le pH, la disponibilité de nutriments et la biodisponibilité du contaminant. Ces facteurs peuvent inhiber la croissance des

microorganismes dégradant le polluant. Dans ce contexte, plusieurs facteurs biotiques influençant la biodégradation ont été étudiés : concentration du naphthalène, pH, salinité, source d'azote, co-substrat et l'ajout du surfactant chimique. Toutes les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers contenant 50 ml de milieu de culture, la température a été fixée à 45 °C.

3.2.2.1. Concentration du naphthalène

La solubilité du naphthalène dans l'eau à 20 °C est de 30 mg.l⁻¹. Cependant à 45 °C (température d'incubation), la solubilité est autour de 80 mg.l⁻¹ (dans l'eau distillée) ce qui augmente sa biodisponibilité améliorant ainsi l'efficacité de dégradation.

Afin d'étudier le comportement de la souche K1C en face de la quantité du polluant, différentes concentrations du substrat ont été testées : 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 3 g.l⁻¹. Les résultats sont représentés dans la figure 3.16.

En utilisant une souche *Bacillus fusiformis* (BFN), [Lin et al. \[154\]](#) ont trouvé que la dégradation du naphthalène est inversement proportionnelle à sa concentration, l'augmentation de la concentration de 100 à 450 mg.l⁻¹ a conduit à une réduction du taux de dégradation de 98,08 à 62,64%. Cette diminution en efficacité est expliquée par l'accumulation des intermédiaires toxiques de dégradation dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus montrent que les faibles concentrations (inférieures à 100 mg.l⁻¹) du contaminant ralentissent sa biodégradation à cause de la faible chance de contact entre la souche et le substrat. Durant les deux premiers jours de la biodégradation, l'efficacité de l'élimination du naphthalène est proportionnelle à la quantité du substrat dans le domaine d'étude (figure 3.16a). On déduit que la souche K1C tolère des concentrations élevées en naphthalène (500 mg.l⁻¹).

Cependant, on remarque que la concentration limite est de 500 mg.l⁻¹. Au-delà, l'efficacité diminue. Cela est confirmé par une série d'expérience dont les résultats sont portés dans la figure 3.16b. A titre d'exemple, pour une concentration du naphthalène de 1g.l⁻¹, efficacité d'élimination était de 90% après 20 jours de dégradation, celle-ci a diminué à 50,8% et 40,2 % pour des concentrations en naphthalène de 2 g.l⁻¹ et 3 g.l⁻¹ respectivement. Il semble que dans le cas du

déversement accidentel, la biodégradation est retardée. Le processus d'élimination est accéléré par d'autres processus physico-chimiques.

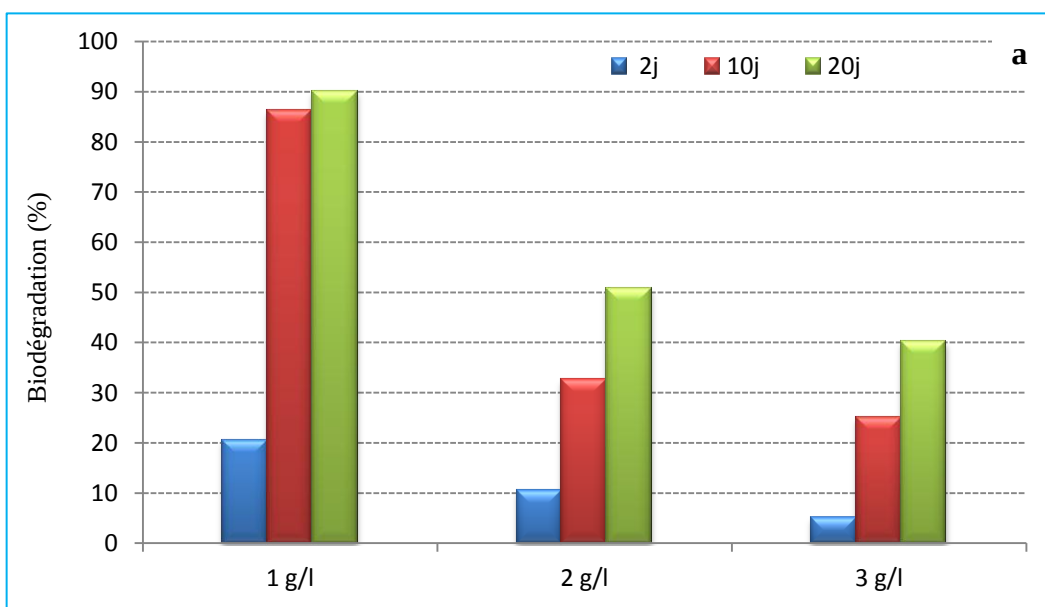
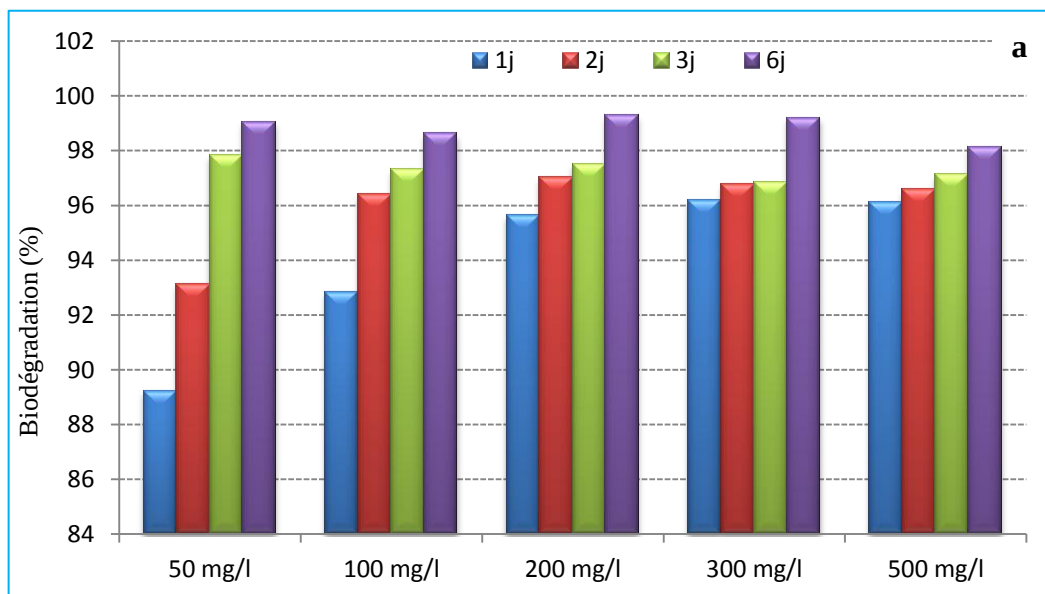


Figure 3.16 : Effet de la variation de la concentration du naphthalène en fonction du temps ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, milieu MM, $\text{pH} = 7$, en mode statique)

3.2.2.2. Effet du pH

Une bonne croissance des microorganismes est observée pour un pH neutre, généralement les écosystèmes aquatiques ont un pH aux alentours de 8, en revanche, le sol peut avoir des valeurs de pH allant de 2,5 à 11,0 selon le type de sol et la nature du contaminant, dans ce cas peu de microorganismes peuvent tolérer ces valeurs de pH. A cet effet, des valeurs de pH du milieu de culture allant de 5 à 10 ont été testées, la concentration du naphthalène est fixée à 500 mg.l⁻¹. Les résultats expérimentaux obtenus sont illustrés dans la figure 3.17.

La souche K1C dégrade le naphthalène dans une large gamme du pH, la gamme optimale de pH varie de 6,5 à 8,5. Dans cette gamme, la dégradation est accélérée et durant les deux premiers jours, un taux de dégradation est environ de 95%. Néanmoins, dans un milieu acide ($\text{pH} \leq 5$) ou alcalin ($\text{pH} \geq 10$), la biodégradation est retardée.

En comparant ces résultats avec ceux trouvés par [Lin et al. \[154\]](#), la gamme optimale du pH était de 6 à 7,5. A titre d'exemple, en augmentant le pH de 7 à 8, le taux de dégradation a diminué de 99,6 à 70%, respectivement (température d'incubation était de 30 °C).

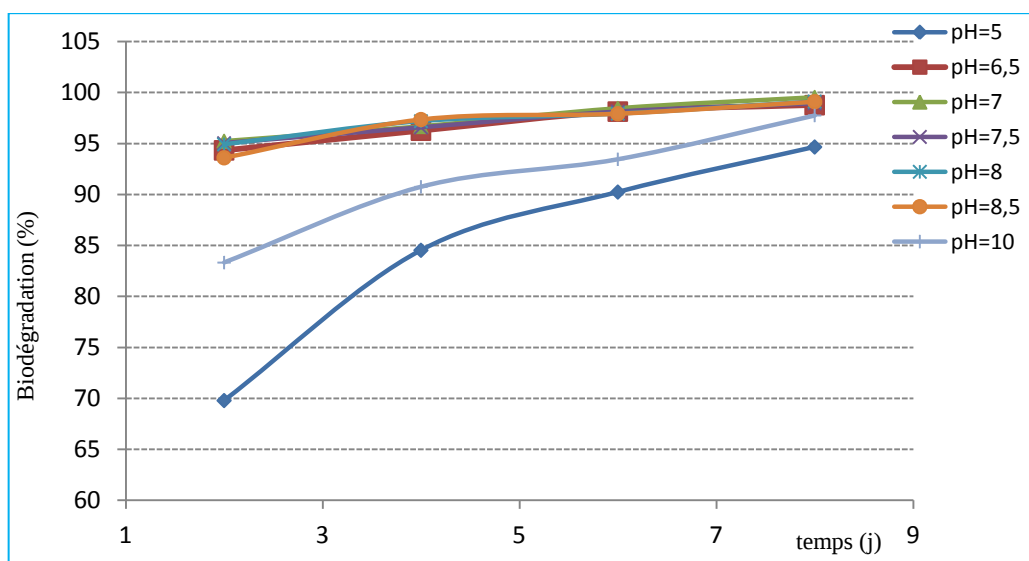


Figure 3.17 : Effet de la variation du pH sur la dégradation du naphthalène (T = 45 °C, milieu MM, pH = 7, en mode statique)

Il est à signaler que les pH acides du milieu favorisent la formation des métabolites acides comme l'acide benzoïque et le phtalate pendant la dégradation du naphthalène.

3.2.2.3. Effet de la salinité

Vu les grandes variétés en sel dans les sites contaminés (mers, lacs, différents types de sols) et l'effet de ce paramètre sur la physiologie du microorganisme en affectant l'efficacité de la biodégradation, différentes concentrations en sel (NaCl) ont été étudiées : 0, 1, 2, 3, 4% (p/v). La concentration du naphthalène est fixée à 500 mg.l⁻¹.

Les résultats obtenus montrent que la salinité améliore la dégradation du naphthalène, la souche bactérienne K1C pouvait croître dans un milieu salin de concentration en sel égale 40 g.l⁻¹. La figure 3.18 montre la variation du taux d'élimination en fonction de la concentration de sel (NaCl).

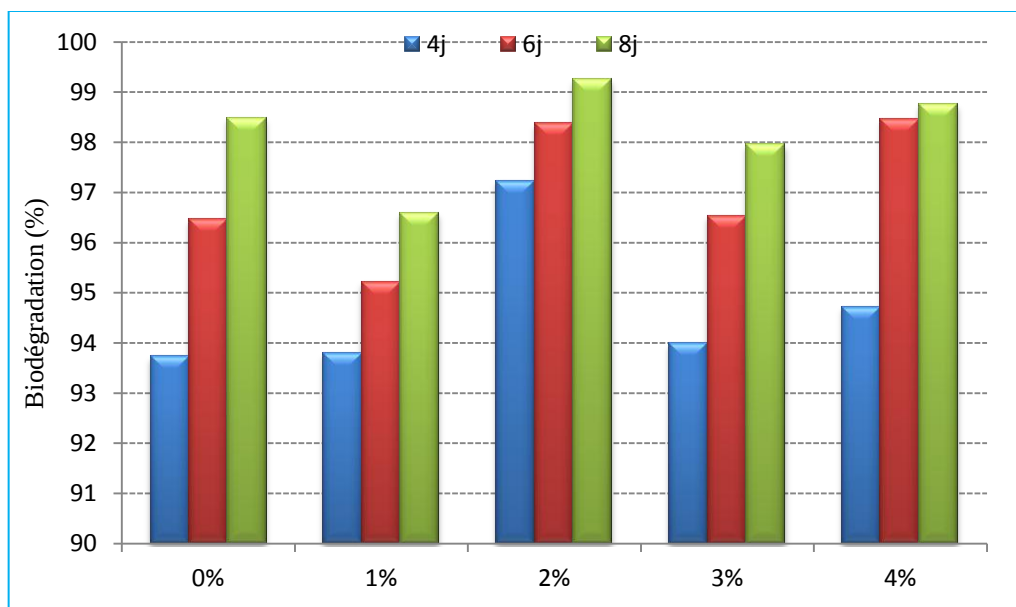


Figure 3.18 : Effet de la variation de la salinité sur l'efficacité de dégradation du naphthalène (T = 45 °C, milieu MM, pH = 7, en mode statique)

3.2.2.4. Source d'azote

L'azote (N) est un élément nutritif indispensable, toutefois, la biodégradation des hydrocarbures dépend du rapport C/N. Certains sites qui sont pauvres en N (les mers), l'ajout de cette source est nécessaire. Afin d'évaluer l'effet de N sur l'efficacité de la biodégradation, différentes valeurs du rapport C/N ont été examinées (0,5 ; 1,25 ; 5). La source d'azote utilisée est sous forme de NH_4Cl et la concentration du naphthalène est fixée à 500 mg.l^{-1} . La figure 3.19 présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de l'ajout de la source d'azote.

Ces résultats montrent bien que la présence d'azote dans le milieu joue un rôle très important dans le processus de la biodégradation. Seulement 33,12% du naphthalène a été dégradé après 08 jours en absence d'azote, le taux d'élimination maximal correspond au rapport C/N= 1,25 (98,20%).

Ces résultats concordent avec ceux de [Lin et al. \[154\]](#), le rapport C/N optimal trouvé était de 1,0 en utilisant $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comme source d'azote ($T = 30^\circ\text{C}$, 50 mg/l de naphthalène et $\text{pH} = 6,7$).

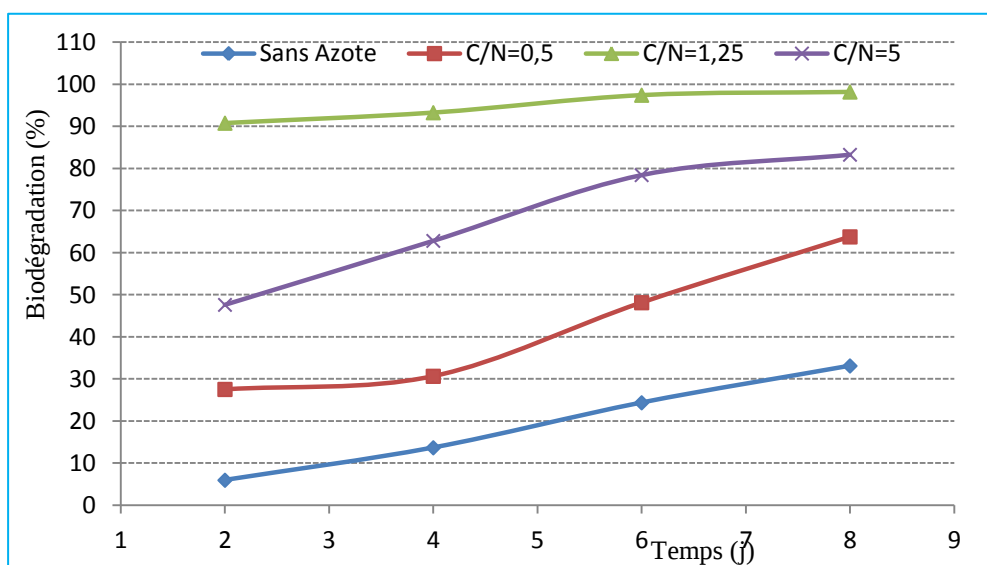


Figure 3.19 : Taux de dégradation du naphthalène en fonction du temps à différents rapport de C/N (500 mg.l^{-1} de naphthalène, $T = 45^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$)

Afin d'avoir une meilleure biodégradation, l'addition de l'azote dans les sites pauvres comme les eaux de mer et les sédiments est indispensable.

3.2.2.5. Effet de l'ajout d'un co-substrat

Le but de l'addition d'un co-substrat est d'accélérer la dégradation des polluants par les microorganismes, en effet deux co-substrats ont été testés à savoir l'acide salicylique ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) et l'acide benzoïque ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$).

Les résultats obtenus montrent qu'en présence d'une deuxième source de carbone, la dégradation n'a pas été améliorée comme le montre la figure 3.20. Les deux co-substrats testés ralentissent la dégradation du naphthalène. On outre, [Pathak et al. \[132\]](#) ont trouvé que l'ajout d'un co-substrat n'améliore pas la biodégradation du naphthalène, les composés utilisés sont : le glucose, l'acide salicylique, l'acide succinique et l'acide gentisique.

En revanche, en utilisant le pyruvate comme co-substrat, [Lee et al. \[288\]](#) ont observé que la biodégradation du naphthalène en présence du pyruvate était avantageuse.

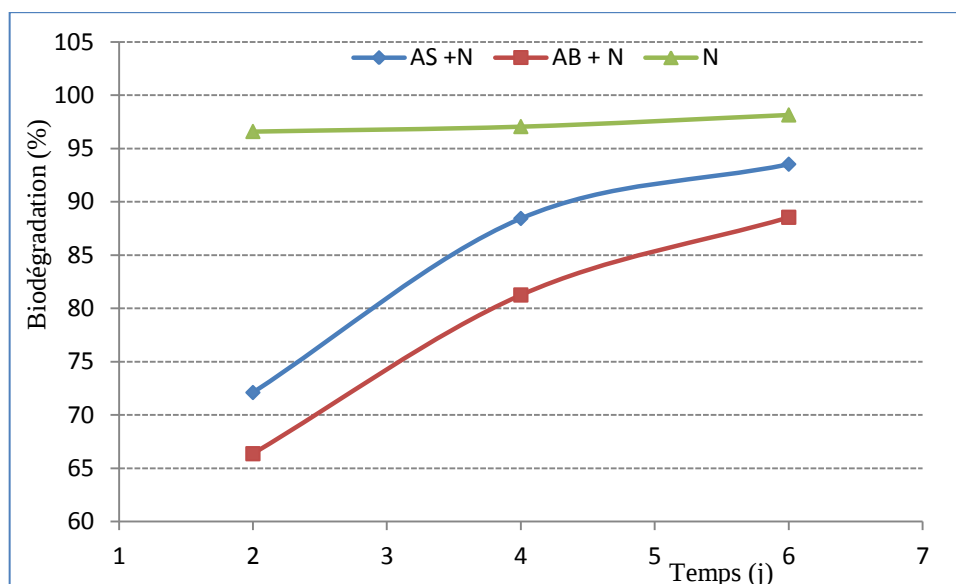


Figure 3.20 : Effet de l'ajout du co-substrat. AS: acide salicylique ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$), AB : acide benzoïque ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$), N : naphthalène ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$)

3.2.2.6. Effet de l'ajout d'un surfactant

La biodisponibilité de l'hydrocarbure est un facteur très important lors de sa biodégradation, l'ajout des surfactants est l'une des solutions possibles pour solubiliser le naphthalène. A fin d'étudier l'effet de l'ajout de surfactant sur la biodégradation, trois types de surfactants chimiques ont été testés : CTAB à 0,02% (p/v), SDS à 0,02% (p/v) et Tween 80 (2%, v/v). La concentration du naphthalène est de 500 mg.l⁻¹, les cultures sont incubées à température égale à 45 °C en mode statique. La figure 3.21 regroupe les résultats concernant l'effet de l'ajout de trois surfactants.

On observe que l'ajout de surfactant n'améliore pas la dégradation du naphthalène, cependant, l'ajout de Tween 80 a un effet négatif sur la dégradation du naphthalène d'une façon remarquable où le taux de dégradation était de 69,34% après 8 jours par rapport aux surfactants SDS et CTAB où les taux atteignent à 97,41 et à 91,59%, respectivement.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de [San Miguel et al. \[149\]](#) portant sur l'effet de l'ajout du surfactant chimique (SDS), leurs résultats ont montré que le taux de dégradation a légèrement diminué en présence de SDS en utilisant une souche bactérienne de *Sphingomonas paucimobilis* incubée à 37 °C.

Egalement, en étudiant quatre types de surfactants chimiques sur la dégradation du naphthalène par la souche *Pseudomonas* sp. HOB1, [Pathak et al. \[132\]](#) ont trouvé que l'ajout du surfactant a réduit de façon significative le taux de dégradation du naphthalène.

De nombreuses études traitant l'effet de surfactant sur la biodégradation des HAP montrent que le taux de dégradation est fonction du type de surfactant ajouté et de l'hydrocarbure utilisé comme substrat.

La diminution du taux de dégradation peut être due à l'utilisation de surfactant comme une source de carbone et d'énergie par la souche K1C, cette hypothèse est rapportée par des études qui ont montré que les bactéries peuvent utiliser le tensioactif comme source de carbone [[132](#), [289](#)].

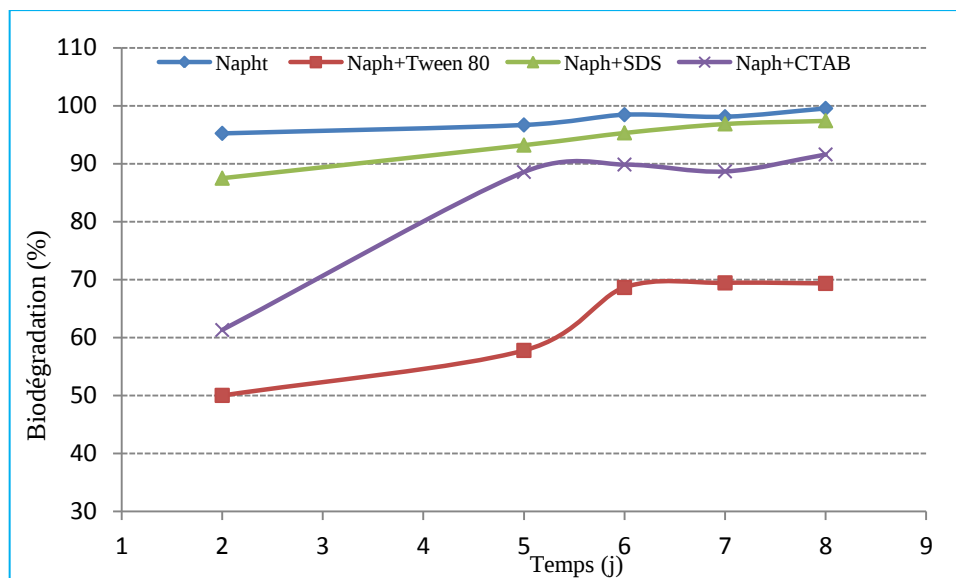


Figure 3.21 : Effet de l'ajout du surfactant (500 mg.l⁻¹ de naphthalène, pH = 7, T = 45 °C)

Généralement, les bactéries dégradant les hydrocarbures produisent des biosurfactants et l'addition d'un autre surfactant pourrait avoir des effets négatifs sur la croissance microbienne.

3.2.3. Mise en évidence du changement structural du naphthalène

La technique d'analyse infrarouge a été utilisée pour mettre en évidence les groupements fonctionnels présents dans les extraits des intermédiaires de dégradation du naphthalène par la souche K1C. Le spectre apparition/disparition des métabolites de biodégradation du naphthalène est représenté sur la figure 3.22.

La bande de forte absorbance située à 3400 cm⁻¹ est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons O-H liées, cette bande est persistante durant l'incubation (30j). La bande située vers 1650 cm⁻¹ est attribuable aux vibrations du noyau benzénique (C=C), ce pic reste constant durant l'incubation. La vibration calculée à 1743,71 cm⁻¹ est identifiée comme étant les élongations des liaisons C=O indiquant un groupement carbonyle. Ce pic disparaît après 10 jours de dégradation impliquant la transformation des composés carboxyliques (-COOH). D'après la littérature de la biodégradation du naphthalène, ce groupement carboxyle se trouve dans plusieurs composés intermédiaires.

Les bandes situées entre 1300 et 1550 cm^{-1} correspondent aux vibrations de plusieurs groupements : d'élongation des liaisons O–H dans l'acide carboxylique, d'élongation des liaisons C–O dans l'acide carboxylique. Après 10 jours de dégradation, ces pics sont remplacés par un seul pic situé à 1400 cm^{-1} , il est attribué aux vibrations des liaisons O–H signifiant la transformation des composés aromatiques acides et la formation des composés ne contenant que des groupements O–H.

Les deux pics situés à 2854 et 2924 cm^{-1} sont attribués aux vibrations d'élongation des liaisons C–H dans les aldéhydes (CHO), d'après la littérature ce groupement se trouve seulement dans deux composés intermédiaires de la dégradation du naphthalène, c'est le 2-hydroxybenzaldéhyde et l'acide 2-formylbenzoïque. Ces deux pics ont également disparus après 30 jours de dégradation indiquant de leur biotransformation.

L'identification des intermédiaires nécessite l'utilisation d'autres techniques d'analyses comme le GC/MS et le RMN. Il est à noter que les métabolites de dégradation par les souches thermophiles sont différents de ceux générés par les mésophiles.

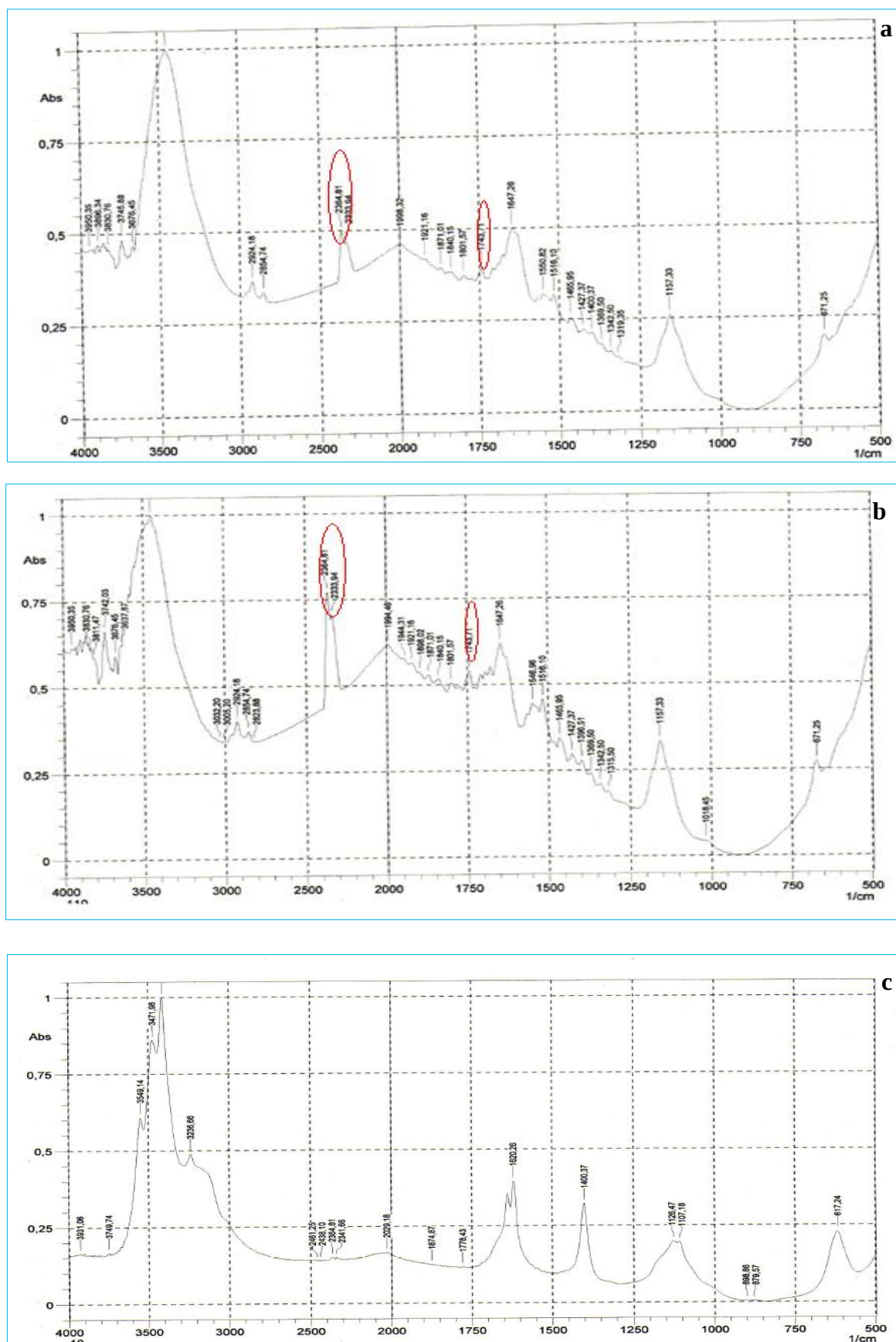


Figure 3.22 : Spectre infrarouge de la biodégradation du naphthalène par la souche K1C :
a- 1jour de dégradation ; b- 10 jours de dégradation ; c- 30 jours de dégradation

3.2.4. Caractérisation phénotypique de la souche performante K1C

Les observations microscopiques (optique et électronique) sont visualisées sur la figure 3.23.

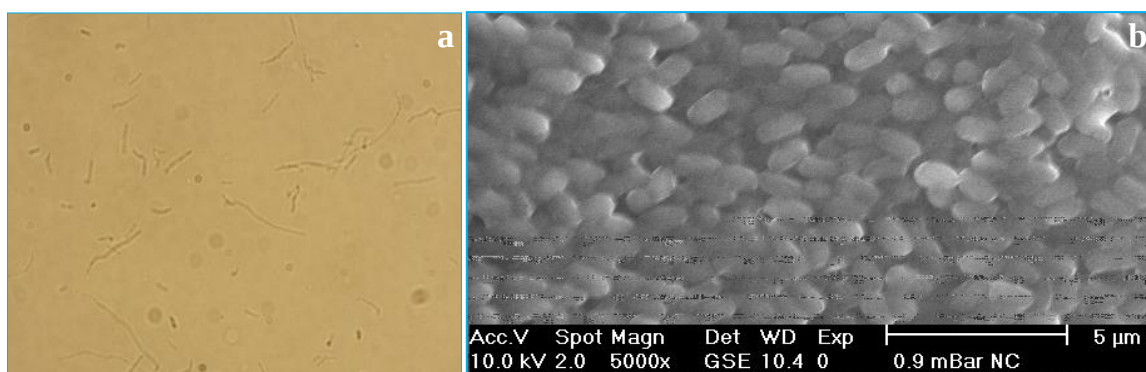


Figure 3.23 : Observation microscopique: a- microscope optique ($\times 40$) ;
b- microscope électronique ($\times 5000$) MEB

La souche K1C a une forme de bacille, Gram+, aérobic stricte et sporulante.

Les résultats de quelques tests de caractérisation de la souche K1C sont donnés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Caractérisation de la souche K1C

Souche K1C	ONP G	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL
	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	
	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	

Le traitement de l'ensemble des caractères a permis de rattacher cette souche au genre *Bacillus* tandis que l'identification au stade de l'espèce nécessitera une caractérisation plus approfondie et demandera un séquençage du gène de l'ADN correspondant à l'ARNr 16S (travail en cours).

3.2.5. Conclusion

La dégradation du naphthalène par des souches mésophiles a été largement étudiée. De nombreuses souches bactériennes ont été identifiées pour leur capacité à croître sur le naphthalène comme seule source de carbone. En revanche, peu de travaux ont porté sur la dégradation du naphthalène par des souches thermophiles (supérieur à 40 °C), l'augmentation de la température a un double intérêt ; l'amélioration de la biodisponibilité du naphthalène en augmentant sa solubilité et l'accélération de sa dégradation.

La souche thermophile (modérée), K1C isolée à 45 °C, possède un pouvoir biodégradatif très marqué. Dans les conditions optimales de dégradation, le taux de dégradation dépasse 98% (500 mg.l⁻¹ de naphthalène) après 6 jours d'incubation. En générale, les résultats obtenus montrent que :

- ✓ Les quantités élevées du naphthalène ne semblent pas favorables pour son élimination par voie biologique, la concentration limite est de 500 mg.l⁻¹, au-delà, l'efficacité diminue ;
- ✓ L'influence des paramètres physico-chimiques sur la biodégradation du naphthalène a été étudiée, les conditions opératoires optimales sont : un pH neutre, une salinité au voisinage de 2% et un rapport de C/N = 1,25 ;
- ✓ La présence d'une deuxième source de carbone (acide salicylique et acide benzoïque) n'améliore pas le taux de dégradation du naphthalène ce qui traduit par un temps de dégradation plus long ;
- ✓ L'ajout de surfactant au milieu affecte négativement la dégradation : la souche K1C est productrice de biosurfactant, par suite il est possible que le surfactant chimique ajouté inhibe la production de biosurfactant. Aussi, des études montrent que ces surfactants peuvent être utilisés comme une deuxième source de carbone ;
- ✓ L'analyse de la dégradation du naphthalène par FTIR a montré que la souche K1C est capable de transformer d'autres composés tels que les acides carboxyliques aromatiques et aldéhydes aromatiques (un seul cycle de benzène).

3.3. Production du biosurfactant, caractérisation et application environnementale

La faible solubilité dans l'eau de la majorité des hydrocarbures limite le potentiel biodégradatif des microorganismes. Afin de faciliter le contact entre le substrat et la cellule microbienne et par conséquent d'améliorer l'efficacité de la biodégradation, de nombreux hydrocarbonoclastes, notamment les bactéries, produisent une variété de biosurfactants. En comparant l'effet de l'ajout du biosurfactant sur le nombre de bactéries existant dans le sol et le taux de dégradation du pétrole brut, [Diab et Sandouka \[290\]](#) ont montré qu'en présence de biosurfactant, le nombre de bactérie a augmenté environ 8 fois, ainsi le taux de dégradation du pétrole a été amélioré plus de 6 fois par l'ajout de biosurfactant.

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat insoluble. Il est à noter que les biosurfactants ont probablement d'autres rôles, comme par exemple faciliter la mobilité des cellules sur des surfaces solides ou leur adhésion/détachement.

Les hydrocarbonoclastes, très recherchées pour être appliquées en bioremédiation, sont aussi considérées comme des candidates potentielles à la production de biosurfactants. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la production et à la caractérisation de biosurfactant synthétisé par une souche bactérienne mésophile. Cette dernière a montré non seulement un pouvoir élevé de la dégradation du pétrole brut, mais aussi une bonne croissance sur quelques composés aromatiques comme l'acide benzoïque, naphthalène, pyrène et phénanthrène. Finalement une application préliminaire a été réalisée dans le domaine environnemental par ce biosurfactant.

3.3.1. Criblage de la souche productrice de biosurfactant

La sélection des souches bactériennes productrices de biosurfactants est basée sur le test de déplacement d'huile [\[262\]](#). Le milieu de culture utilisé est composé (dans un litre) de 10 ml d'huile d'olive, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl et 10 g de peptone. La production est réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu LB, l'incubation est effectuée à 37 °C sous une

agitation de 200 tr/min. Les souches mésophiles utilisées dans cette étude sont celles isolées à partir de sol contaminé, région Hassi-Messaoud. Les résultats obtenus (tableau 3.5) montrent que la souche 1E possède un potentiel producteur de biosurfactant très intéressant.

Tableau 3.5 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur la mesure de diamètre maximal de la surface du halo clair (1%, v/v huile d'olive, 37 °C, 200 tr/min)

Souche	1E	1F	1H	1I	1M	1O	2J	2K	2M
Diamètre de la surface halo clair(cm)	7,3	4,5	5,6	2,1	2,0	1,2	4,1	3,5	1,5
									

Cette souche bactérienne (**1E**) a une activité hydrocarbonoclastes très marquée. En effet, elle est capable d'utiliser plusieurs hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie :

- $n\text{-C}_{14}$, $n\text{-C}_{15}$, $n\text{-C}_{17}$, $n\text{-C}_{18}$, $n\text{-C}_{19}$, $n\text{-C}_{21}$: dégradation 100%.
- $n\text{-C}_{20}$ et $n\text{-C}_{22}$: un taux de dégradation qui dépasse 75%.
- $n\text{-C}_{27}$: plus de 55% de la quantité a été dégradée.
- Une bonne croissance de cette souche sur l'acide benzoïque, naphthalène, pyrène et phénanthrène.

La souche *Staphylococcus* sp.1E est capable de croître pour des températures comprises entre 20 et 37 °C avec un optimum de croissance à 30 °C, et elle peut tolérer des variations de salinité importantes de 0 à 80 g.l⁻¹ de NaCl, et s'adapte donc bien à l'eau saumâtre.

3.3.2. Identification phylogénétique de la souche 1E

La souche 1E, déjà isolée et identifiée, peut croître sur le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie. Elle montre une capacité biodégradative élevée de la biodégradation des hydrocarbures. Cette souche appartient à

l'espèce *Staphylococcus haemolyticus*. L'arbre phylogénétique suivant détaille la phylogénie de cette souche (figure 3.24).

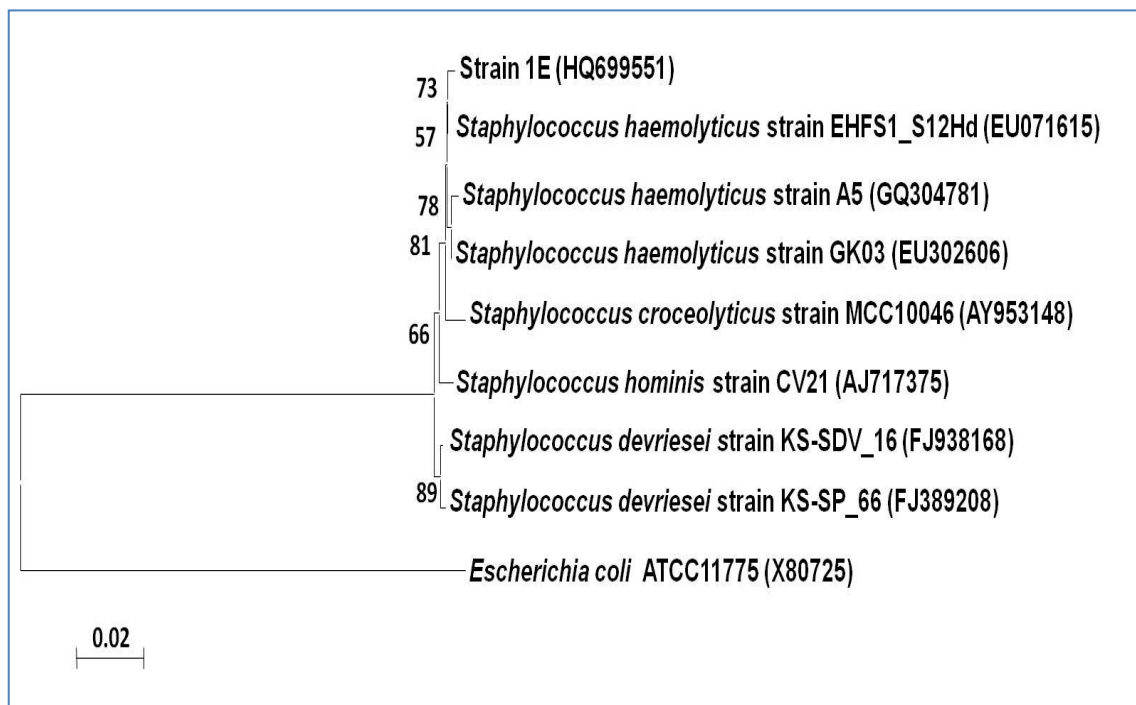


Figure 3.24: Arbre phylogénétique basée sur le séquençage de l'ARNr 16S, construite par la méthode de 0020c neighbor-joining montrant la position de la souche 1E entre les membres du genre *Staphylococcus*.

3.3.3. Etude de la capacité productrice de la souche 1E

L'étude de la capacité productrice de biosurfactant par la souche 1E est basée sur : **a)** la mesure de la tension de surface, **b)** la mesure du diamètre de la surface halo claire (test de déplacement de pétrole), **c)** la croissance bactérienne ($DO_{600\text{ nm}}$). Les résultats expérimentaux montrent clairement que la plus grande réduction de la tension de surface ($25,8\text{ mN.m}^{-1}$) est obtenue après deux jours d'incubation, à cette valeur de TS, le diamètre de la surface halo clair et la $DO_{600\text{ nm}}$ étaient de 8 cm et 6,5 respectivement (figure 3.25). Il est probable qu'il y a une corrélation entre la biomasse et la production de biosurfactant. La figure 3.26 représente le test de déplacement de pétrole (variation du diamètre de la surface halo claire en fonction de temps).

Notons qu'un biosurfactant plus actif peut réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 30 mN.m^{-1} et la tension interfaciale eau/hexadécane de 40 à 1 mN.m^{-1} [203, 291].

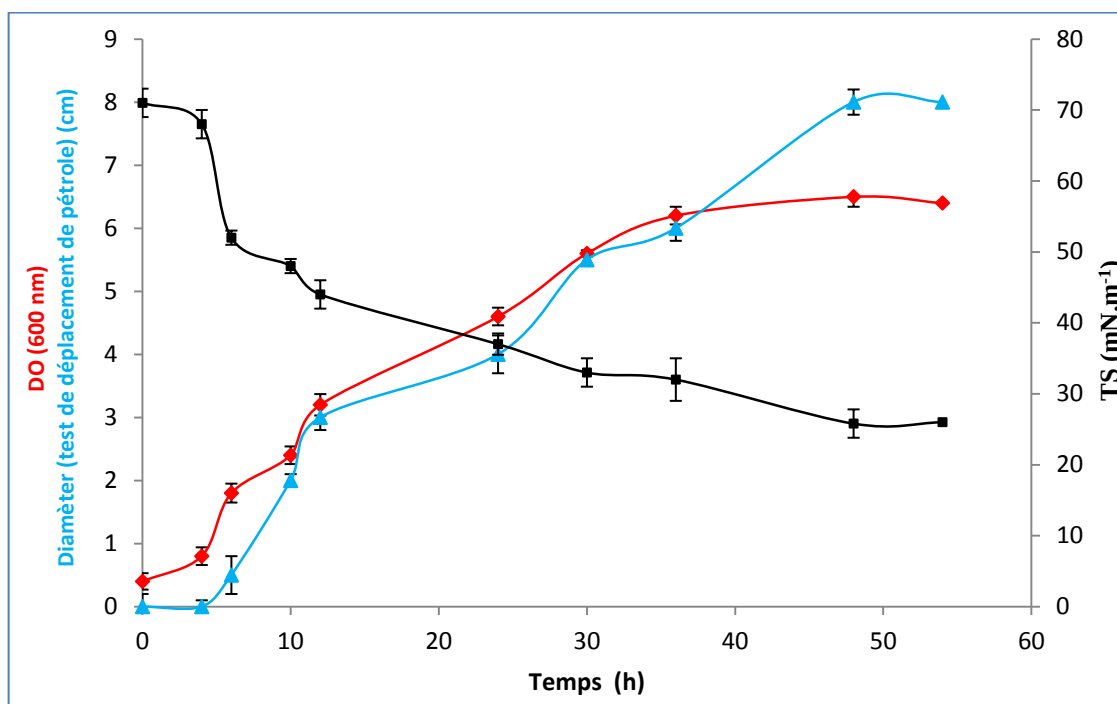


Figure 3.25 : Cinétique de croissance de la souche 1E sur l'huile d'olive comme source de carbone. (♦) DO à 600 nm, (■) Tension de surface (mN.m^{-1}), (▲) Diamètre de test déplacement de pétrole (cm)

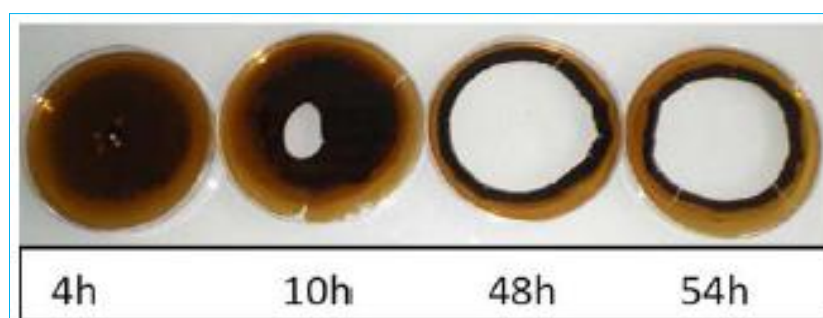


Figure 3.26: Test de déplacement d'huile, diamètre de la surface halo clair (cm) en fonction du temps

3.3.4. Production du biosurfactant

3.3.4.1. Effets de la source de carbone sur la production de biosurfactant

Toutes les études portant sur la production des biosurfactants montrent, après la sélection de microorganisme producteur, l'importance du choix de la source du carbone, que ce soit un hydrocarbure, un glucide, une huile, etc. Cette source joue un rôle déterminant dans le taux de production ainsi que sur la nature du biosurfactant synthétisé. A cet effet, 4 sources de carbone de concentration 1% (v/v) ont été utilisées: pétrole brut, hexadécane, huile d'olive et huile végétale. Les substrats ont été stérilisés sur un filtre 0,22 μm , la sélection de la source optimale est réalisée par la mesure de la tension de surface. La figure 3.27 présente les résultats concernant l'effet de la source de carbone sur la production du biosurfactant.

Ils montrent que l'huile d'olive présente une bonne production de biosurfactant qui se traduit par la réduction de la tension de surface ($25,8 \text{ mN.m}^{-1}$) avec un grand diamètre de déplacement de pétrole (8 cm). L'huile végétale peut être également utilisée comme une source de carbone à cause de la faible tension de surface ($26,4 \text{ mN.m}^{-1}$).

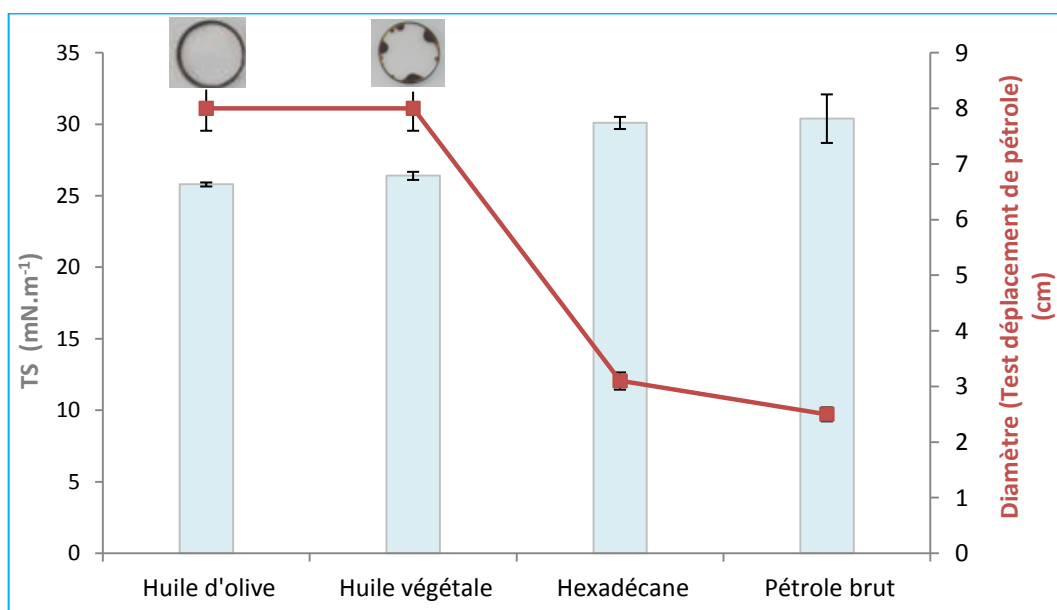


Figure 3.27 : Optimisation de la source de carbone (1%, v/v) pour la production de biosurfactant par la souche 1E ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$)

3.3.5. Séparation et purification du biosurfactant

La récupération du biosurfactant dépend principalement de : la charge ionique, la solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques et de la localisation (extracellulaire, intracellulaire ou lié à la cellule). La majorité des biosurfactants sont sécrétés dans le milieu.

En effet, la séparation par l'extraction à l'acétate d'éthyle donne un rendement en biosurfactant de $2,1 \text{ g.l}^{-1}$. Le précipité obtenu est une poudre cristalline soluble dans l'eau et/ou le méthanol, de couleur transparente. L'activité tensioactive a été suivie par la mesure du diamètre de la surface halo clair. Les fractions présentant le maximum d'activité sont regroupées pour former le biosurfactant partiellement purifié (figure 3.28).

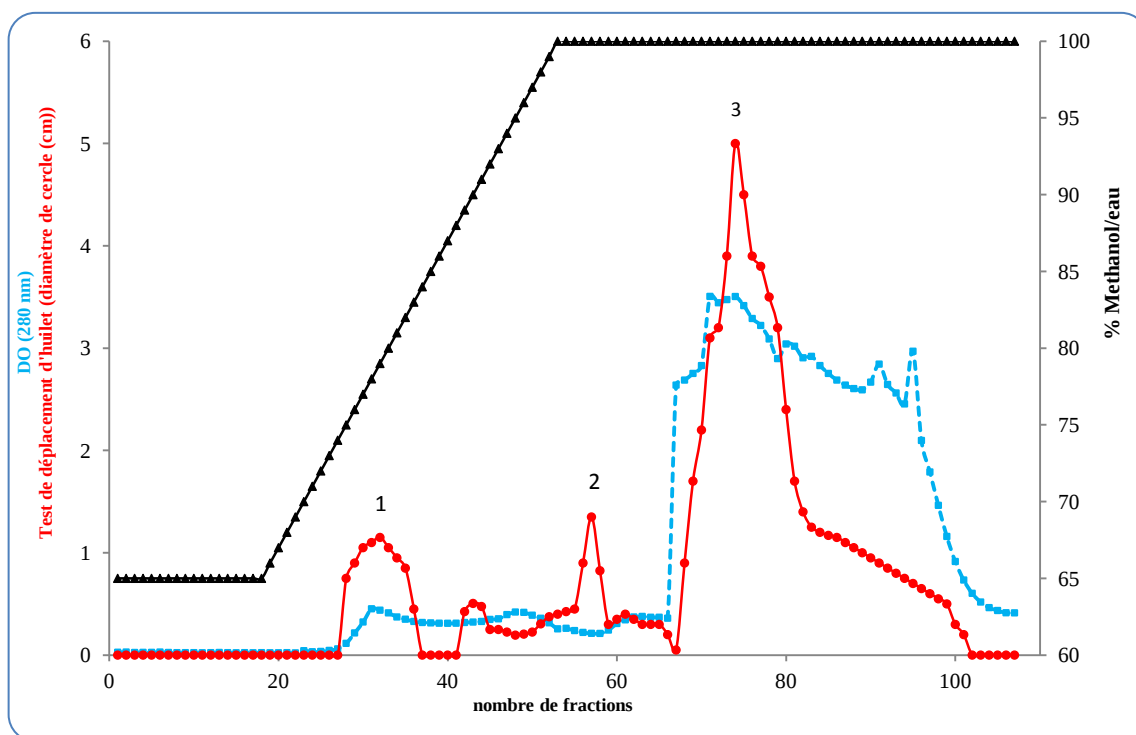


Figure 3.28 : Purification du biosurfactant en chromatographie sur colonne C18 :
 (■) DO à 280 nm, (▲) gradient méthanol/eau, (●) diamètre de déplacement de pétrole

3.3.6. Caractérisation physico-chimique et antimicrobienne du biosurfactant

3.3.6.1. Activité émulsifiante (E_{24})

Une émulsion est un système comprenant au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, sous une forme plus ou moins stable. Elle est souvent décrite comme une dispersion de gouttelettes de l'une des phases dans l'autre. On distingue donc une phase dispersée et une phase continue, souvent aqueuse (ex. eau) et huileuse (ex. huile). Pour assurer la stabilité de l'émulsion, il est nécessaire d'utiliser un agent émulsifiant. Les tensioactifs les plus utilisés sont les surfactants chimiques et biologiques.

Il existe plusieurs types d'émulsions, les émulsions simples appelées eau-dans-huile (E/H) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) pour l'inverse.

Le biosurfactant produit par la souche 1E possède un bon pouvoir émulsifiant. Les valeurs de l'activité émulsifiante, traduit par l'indice E_{24} de biosurfactant contre une variété d'hydrocarbures et huiles, montrent qu'un maximum d'émulsification est obtenu avec le pétrole brut ($E_{24} = 98,9\%$). Ceci, met clairement en évidence l'intérêt d'utiliser ce biosurfactant dans le domaine environnemental comme la dispersion des nappes de pétrole déversé dans le milieu marin, et dans le domaine industriel, par exemple, la récupération assistée de pétrole (EOR, Enhanced Oil Recovery). En outre, l'huile moteur constitue un bon substrat pour l'activité émulsifiante ($E_{24} = 78,57\%$), bien que, le diesel, l'huile d'olive et l'huile végétale présentent une activité émulsifiante modérée comme le montre la figure 3.29.

Ce qui nous emmène à conclure que le biosurfactant de la souche *Staphylococcus sp.*1E est capable de former des émulsions très stables avec le pétrole et l'huile moteur.

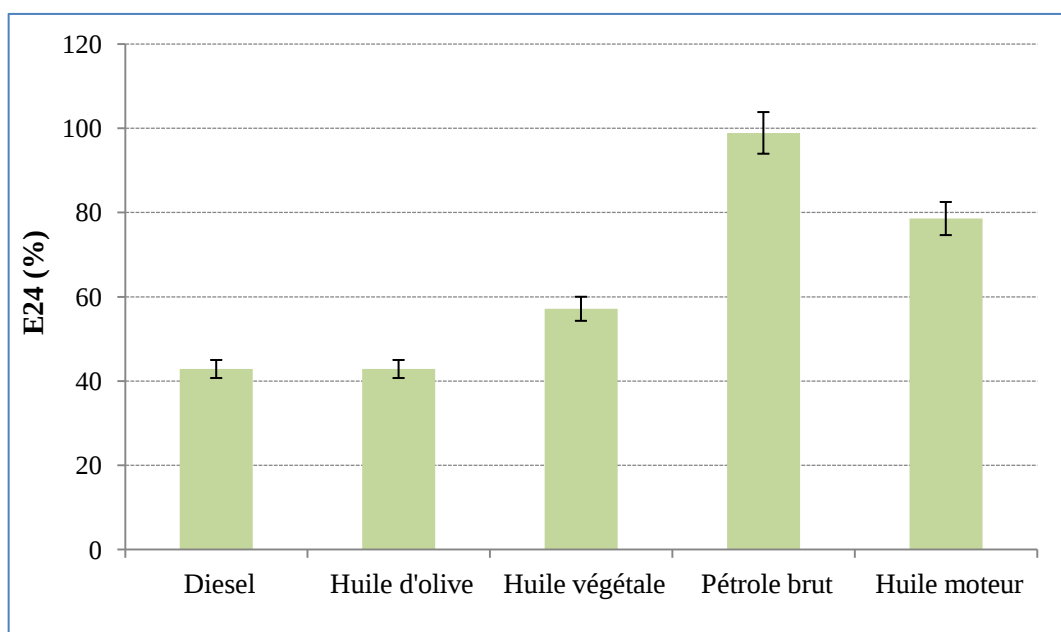


Figure 3.29 : Pouvoir émulsifiant de biosurfactant sur les hydrocarbures et les huiles

3.3.6.2. Stabilité thermique

Les résultats obtenus par [Brown et al. \[292\]](#) indiquent que l'exposition de biosurfactant produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affectent pas la stabilité thermique de biosurfactant. D'autre part, [Makkar et Cameotra \[293\]](#) ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C.

Les résultats obtenus (figure 3.30) montrent que le biosurfactant n'est pas affecté par des températures inférieures à 55 °C. Le produit est stable durant l'augmentation de la température. La stabilité thermique du biosurfactant a été vérifiée pour le surnageant, la même tension de surface a été noté dans l'intervalle de température de 4 à 55 °C (aux alentours de 31 mN.m⁻¹). A 75 °C et 100 °C, la tension de surface est augmentée (plus de 35 mN.m⁻¹) indiquant une instabilité du produit à des températures plus élevées.

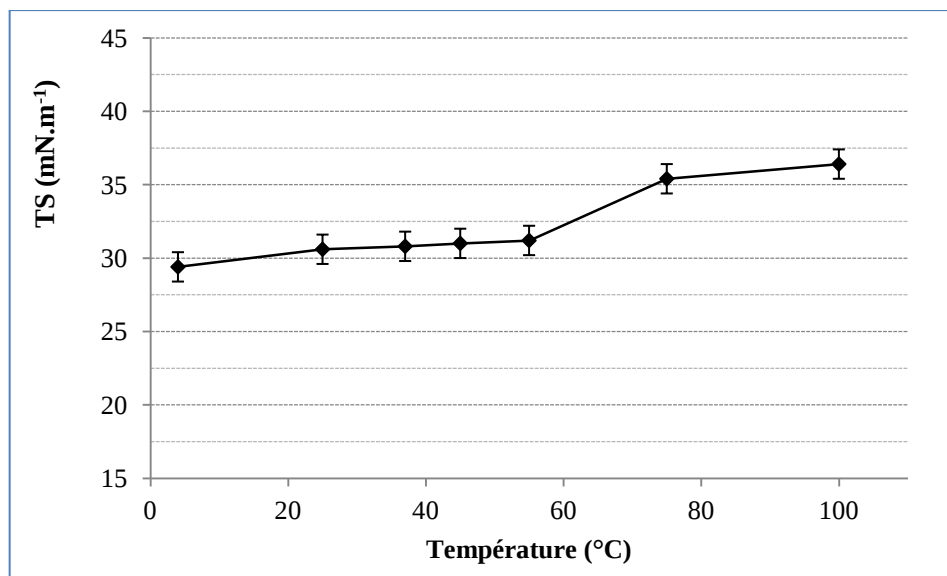


Figure 3.30 : Effet de la variation de température sur la stabilité thermique de biosurfactant de la souche 1E (temps d'incubation 24 h)

3.3.6.3. Stabilité chimique

3.3.6.3.1. Effet du pH

L'activité de biosurfactant produit par la souche **1E** a été soumise à différentes valeurs de pH [2 - 12]. Les résultats obtenus montrent qu'une perte négligeable de l'activité est observée (elle est de l'ordre de 1,5). A titre d'exemple les valeurs de la tension de surfaces aux pH : 2, 7 et 12, sont 31,60, 30,05 et 31,45 mN.m⁻¹, respectivement. Par conséquent, la variation du pH n'affecte pas la stabilité du biosurfactant produit par la souche **1E** (Figure 3.31).

Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux antérieurs. En étudiant l'effet du pH sur l'activité de biosurfactant produit par la souche *Candida glabrata* UCP 1002, [Luna et al. \[294\]](#) ont montré que la variation du pH [0 - 12] n'affecte pas la stabilité de biosurfactant.

En revanche, en étudiant l'effet du pH sur l'activité du biosurfactant produit par *Bacillus subtilis* HOB2, [Haddad et al. \[295\]](#) ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN.m⁻¹. A un pH = 3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN.m⁻¹) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide.

Le biosurfactant de notre souche *Staphylococcus sp.* 1E montre une très bonne résistance dans les milieux acides et basiques dans une gamme très large de pH variant de 2 à 12.

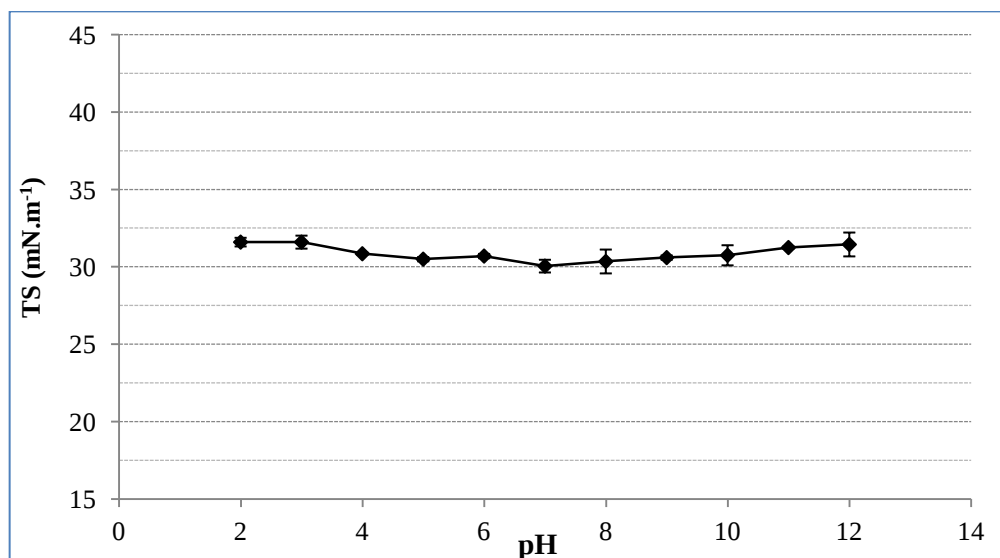


Figure 3.31 : Effet de la variation de pH sur la stabilité chimique de biosurfactant de la souche 1E (temps d'incubation 24 h)

3.3.6.3.2. Effet de la salinité

Selon [Desai et Banat \[203\]](#), des concentrations en sel supérieures à 2% sont suffisantes pour inactiver les tensio-actifs synthétiques. Des réductions ont été également observées sur l'activité émulsifiante de biosurfactant produit par la souche *Candida lipolytica* en utilisant le *n*-hexadécane comme source de carbone [\[296\]](#).

Cependant, le biosurfactant produit par la souche **1E** est efficace en présence d'ion monovalent comme le Na^+ qui se traduit par la stabilité de la tension de surface dans une gamme de salinité très large [0 à 300 g.l⁻¹ de NaCl]. A titre d'exemple, la différence entre les valeurs de tension de surface ne dépasse pas les 3,5 mN.m⁻¹ dans la gamme de salinité étudiée avec une tension de surface minimale observée à 250 g.l⁻¹ (26,55 mN.m⁻¹), à 300 g.l⁻¹ on a enregistré 27,3 mN.m⁻¹ comme le montre la figure 3.32. Nous pouvons dire que la stabilité de biosurfactant de la souche 1E est indépendante de la salinité.

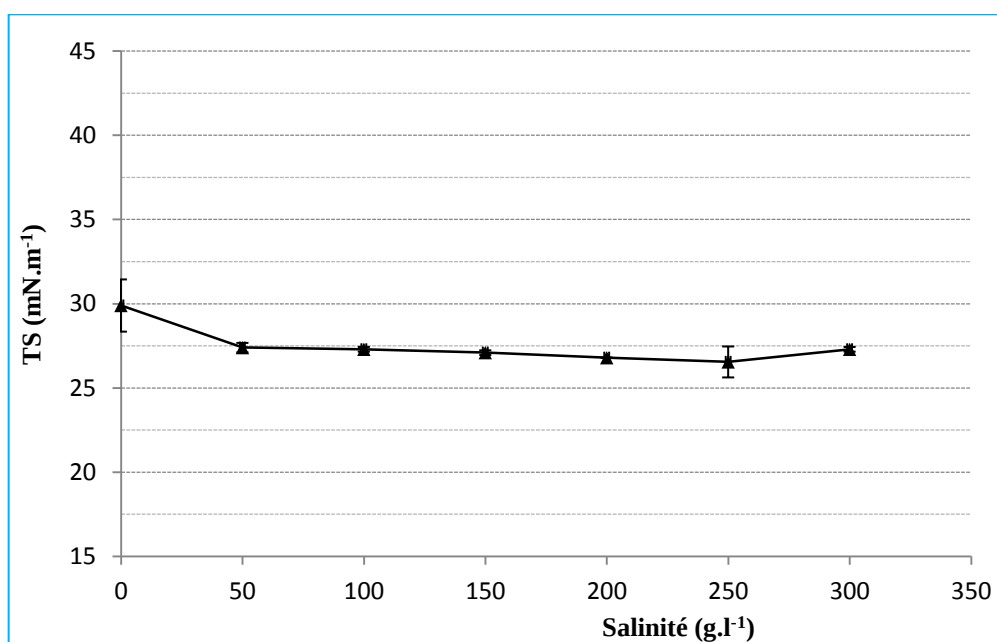


Figure 3.32 : Effet de la variation de salinité sur stabilité chimique de biosurfactant de la souche 1E (temps d'incubation 24 h)

Ces résultats expérimentaux qualifient l'utilisation potentielle de biosurfactant de la souche *Staphylococcus sp.* 1E dans les domaines environnemental et industriel.

3.3.6.4. Activité biologique

Le rôle et les multiples applications des biosurfactants (principalement les lipopeptides et glycolipides) ont fait l'objet d'intenses recherches dans les domaines médical et thérapeutique. Certains lipopeptides et glycolipides sont d'excellents agents anti-bactériens, anti-fongiques et anti-viraux et font aussi l'objet de recherches approfondies dans le domaine de la thérapie génique.

Le rapport **CMB/CMI** permet de déterminer les pouvoirs bactéricides et bactériostatiques des biosurfactants. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'extrait a un pouvoir bactériostatique et un pouvoir bactéricide quand ce rapport est inférieur ou égal à 4 [297, 298].

Peu d'études ont porté sur l'évaluation des activités antimicrobiennes des lipopeptides. [Bechard et al.](#) [299] ont isolé un antibiotique de nature lipopeptidique à

partir de l'espèce *Bacillus subtilis*, ce biosurfactant a montré une activité sur les champignons et les bactéries, spécialement les bactéries Gram -. [Yakimov et al. \[300\]](#) ont comparé l'activité antimicrobienne d'un lipopeptide surfactin avec celle du lipopeptide lichenysin A issu de la souche *Bacillus licheniformis* BAS50, la surfactine a montré une activité plus importante sur les bactéries gram positives et négatives.

Pratiquement, l'activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche 1E a été testée sur des souches bactériennes Gram+ et Gram- de forme bâtonnets et coques, et des souches de champignons représentant de différentes familles. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide ou fongicide (CMB ou CMF) de biosurfactant sont de 1,68 à 27 mg.ml⁻¹. Les valeurs de CMI variant de 1,68 à 13,5 mg.ml⁻¹ indiquent que le biosurfactant brut est un antimicrobien très efficace, les valeurs de rapport CMB/CMI sont très proches de 1 (excepté la souche de *Candida albicans*) confirmant l'activité bactéricide contre les souches testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*). Toutefois, le biosurfactant de la souche 1E n'a aucune activité fongicide contre la souche *Aspergillus niger* (tableau 3.6). Finalement, il reste à montrer son activité anti-tumorale.

Tableau 3.6 : Activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche 1E

Microorganismes	CMI (mg.ml ⁻¹)	CMB ou CMF (mg.ml ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 9144)	3,375 – 6,75	3,375 – 6,75
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	6,75 – 13,5	6,75 – 13,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	6,75 – 13,5	6,75 – 13,5
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	3,375 – 6,75	3,375 – 6,75
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404)	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	1,6875 – 3,375	13,5 – 27

3.3.6.5. Détermination de la concentration micellaire critique

La valeur de la concentration micellaire critique dépend de plusieurs paramètres : la longueur de chaîne (partie hydrophobe), la nature de la tête hydrophile, la température, la salinité et le pH.

Les tensions superficielles ont été déterminées pour différentes concentrations de biosurfactant (50 mg.l^{-1} à $2,5 \text{ g.l}^{-1}$). A partir d'une certaine concentration, la tension superficielle demeure constante: la solution est saturée en biosurfactant et des micelles se forment. Cette concentration seuil est appelée Concentration Micellaire Critique (CMC).

Les résultats expérimentaux montrent que l'activité de surface est inversement proportionnelle à la concentration de biosurfactant pour des valeurs inférieures à 750 mg.l^{-1} , au-delà, la tension de surface garde une valeur presque constante ($25,9 - 27,3 \text{ mN.m}^{-1}$). Par conséquent, la CMC de biosurfactant de la souche *Staphylococcus sp.* 1E est de 750 mg.l^{-1} . L'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration de biosurfactant est illustrée par la figure 3.33.

Cependant, il est important pour plusieurs applications de biosurfactants d'établir leur CMC, en effet, au dessus de cette concentration, les biosurfactants n'ont pas un effet supplémentaire prévue sur l'activité de surface.

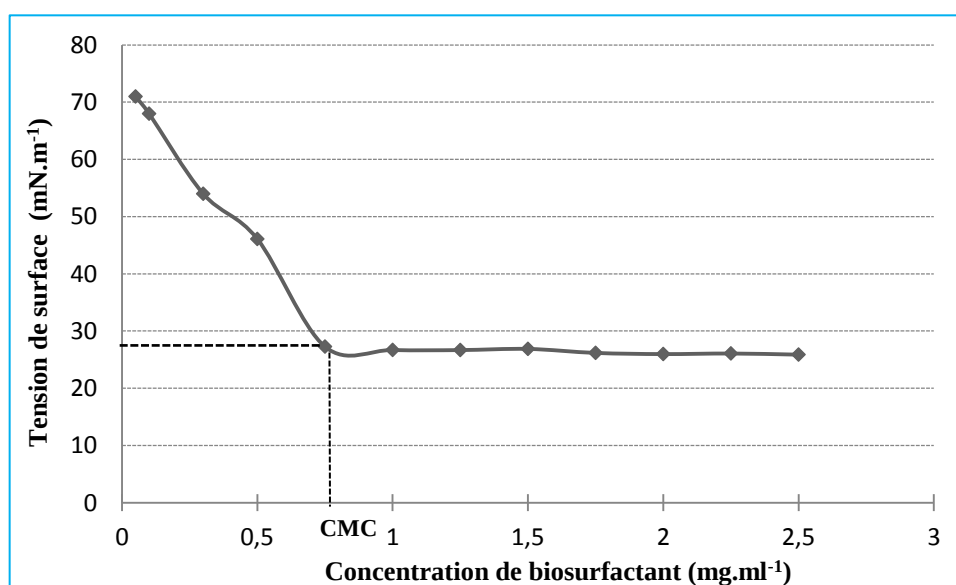


Figure 3.33: Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche 1E

Il est intéressant de noter que les valeurs de CMC dans l'eau pure sont en général assez faibles. Lorsque le tensioactif est mis en contact avec des sols, une partie s'adsorbe sur cette matrice, et le tensioactif devient moins efficace. C'est pourquoi on définit une CMC dite effective, qui est supérieure à celle obtenue dans l'eau pure. En fin, la CMC pourrait être améliorée par l'optimisation des conditions environnementales comme le pH, la température et la concentration en sel.

3.3.6.6. Spectre UV du biosurfactant de la souche 1E

Le spectre UV-vis montre que le biosurfactant absorbe aux alentours de 280 nm, assimilée à la longueur d'onde maximale (figure 3.34). En fait le balayage spectral s'est effectué avec le biosurfactant dissout dans le méthanol (faible absorption jusqu'à une longueur d'onde très courte, 210 nm) et le blanc était le méthanol.

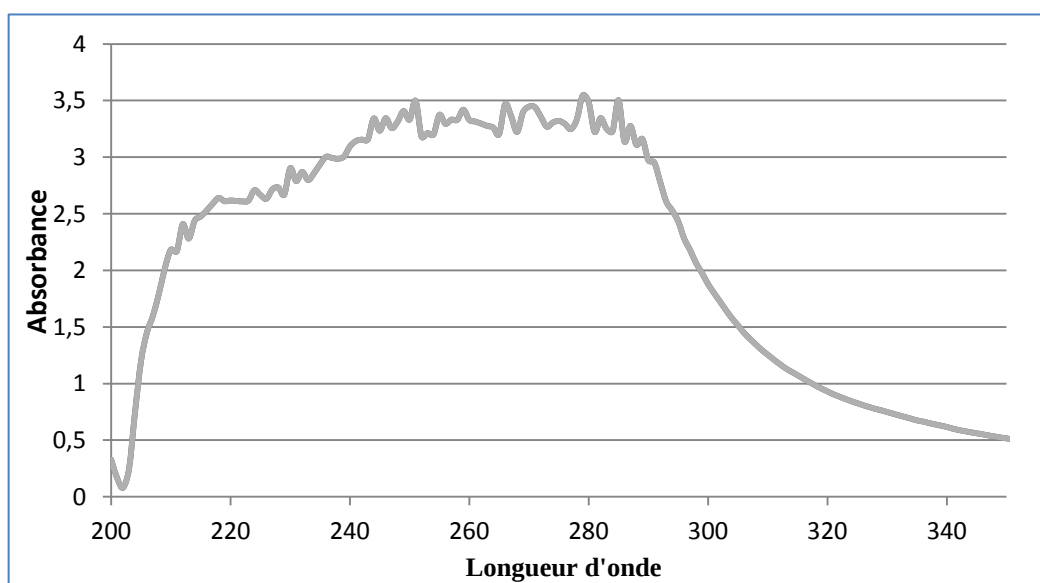


Figure 3.34 : Spectre UV de biosurfactant de la souche 1E

3.3.7. Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant

3.3.7.1. Composition biochimique

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant brut est constitué d'environ 5% de glucides, 70,58% de lipides et 7,21% de protéines (figure 3.35). Cependant, les glucides n'ont pas été détectés dans la fraction 3, la fraction la plus active de biosurfactant est obtenue après purification sur colonne C18. La nature lipopeptidique de biosurfactant de la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E (fraction 3) a été confirmée par les spectres IR du composé.

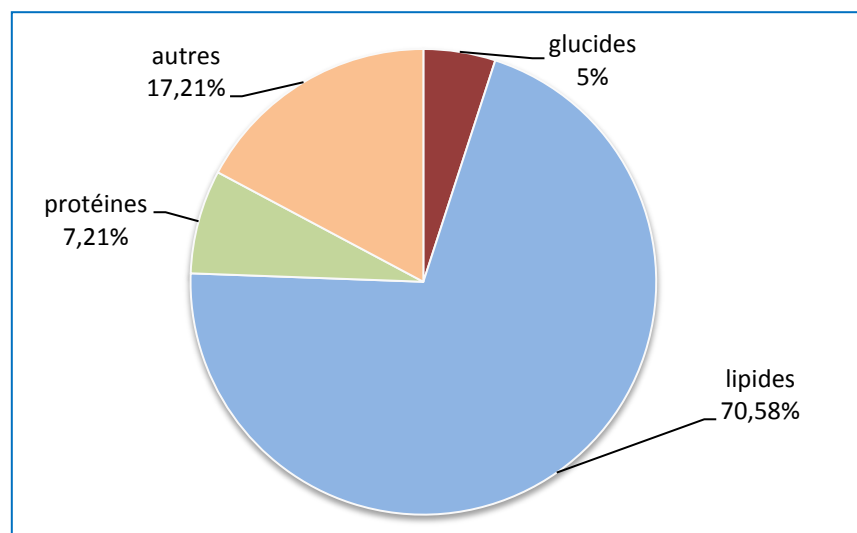


Figure 3.35 : Composition biochimique de biosurfactant de la souche 1E

3.3.7.2. Caractérisation structurale

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans le biosurfactant de la souche *Staphylococcus sp* 1E et donc de prédire sa structure. L'analyse des spectres d'absorption FTIR (enregistrés en transmittance) a permis d'identifier la totalité des bandes d'absorption présentes dans un spectre d'infrarouge et de prédire les constituants concernés comme le montre la figure 3.36 :

- Une bande de faible absorbance située à 3300 cm^{-1} résulte des vibrations d'élongation des liaisons N–H dans les amides.
- Une bande intense et fine située à 2984 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C–H dans C–CH₃.
- La bande de haute absorbance située à 1737 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=O dans les esters, les aldéhydes ou l'acide carboxylique. L'absorbance dans cette région signifie la présence de groupement carbonyle dans la partie peptidique de la molécule.
- La bande significative située à 1446 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des liaisons de C–H dans les alcanes et des liaisons de C–N dans la proline.
- La bande située à 1372 cm^{-1} est due aux vibrations de déformations du groupe –CH₂ dans les esters carboxyliques : (–(CH₂)–COO–).
- La bande de forte intensité située à 1097 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons dans O–C dans les esters (O=C–O–R).
- Le pic de forte absorbance situé à 1097 cm^{-1} est probablement dû aux vibrations d'élongation des liaisons C–O–C dans les esters.
- Le pic de forte absorbance situé à 1232 cm^{-1} est affecté aux vibrations de déformations des liaisons C–N dans les amides secondaires (C–NHR).
- Finalement, les bandes situées entre 607 et 980 cm^{-1} sont affectées aux vibrations des liaisons : –CH₂– de longue chaîne dans les alcanes, RHC=CHR' dans les alcènes et N–H dans les amides.

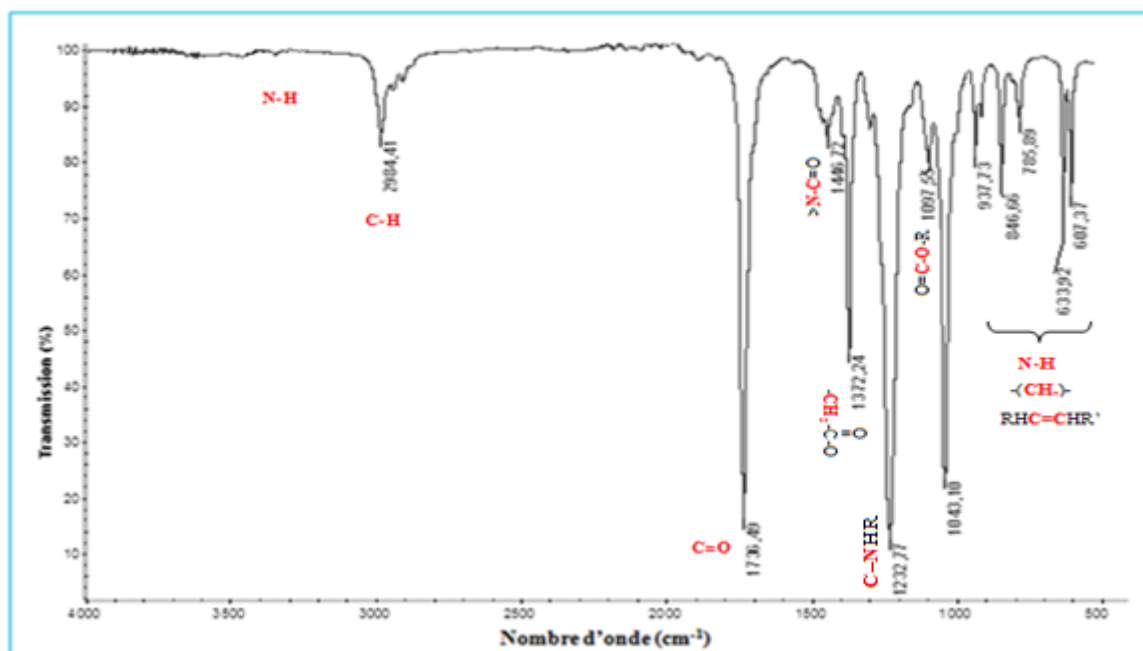


Figure 3.36 : Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche *Staphylococcus* sp. 1E

La fraction 3, la plus active, a été soumise à l'analyse LC-MS. Les résultats obtenus ont montré la présence de deux pics, pic1 et pic 2, avec des spectres de masse de $M + H$ à $m/z = 334,6$ et $352,7$ respectivement. En se basant sur la composition en lipides, protéines et glucides et l'analyse FTIR, la fraction 3 s'avère de nature lipopeptidique. Donc, les fragmentations de masse et la structure de base de la fraction 3 nous ont permis de conclure que la structure du biosurfactant de la souche 1E est composée de trois aminoacides qui sont probablement Proline-Glycine-Glycine selon leur masse moléculaire ($m/z = 226$) et une longue chaîne hydrocarbonée de 9 atomes de carbone (figure 3.37c). Toutefois, une purification supplémentaire doit être réalisée à l'avenir pour permettre à l'analyse structurale par RMN et la détermination exacte de la structure de ce nouveau produit issu d'une souche locale *Staphylococcus* sp. 1E.

D'après les résultats obtenus, la molécule de biosurfactant est fragmentée en trois ions (figure 3.37b). Le signal de masse (à m/z) le plus intense du spectre (celui de la masse la plus élevée) et correspondant à la masse moléculaire du composé est obtenu à : $m/z = 352,7$, on déduit la masse $M + H = 352,7$ et donc la masse moléculaire du biosurfactant qui est de $351,7$ uma. Par conséquent, il peut être considéré comme un biosurfactant de faible masse moléculaire.

Ce classement a été confirmé par une très bonne réduction de la tension de surface ($25,8 \text{ mN.m}^{-1}$).

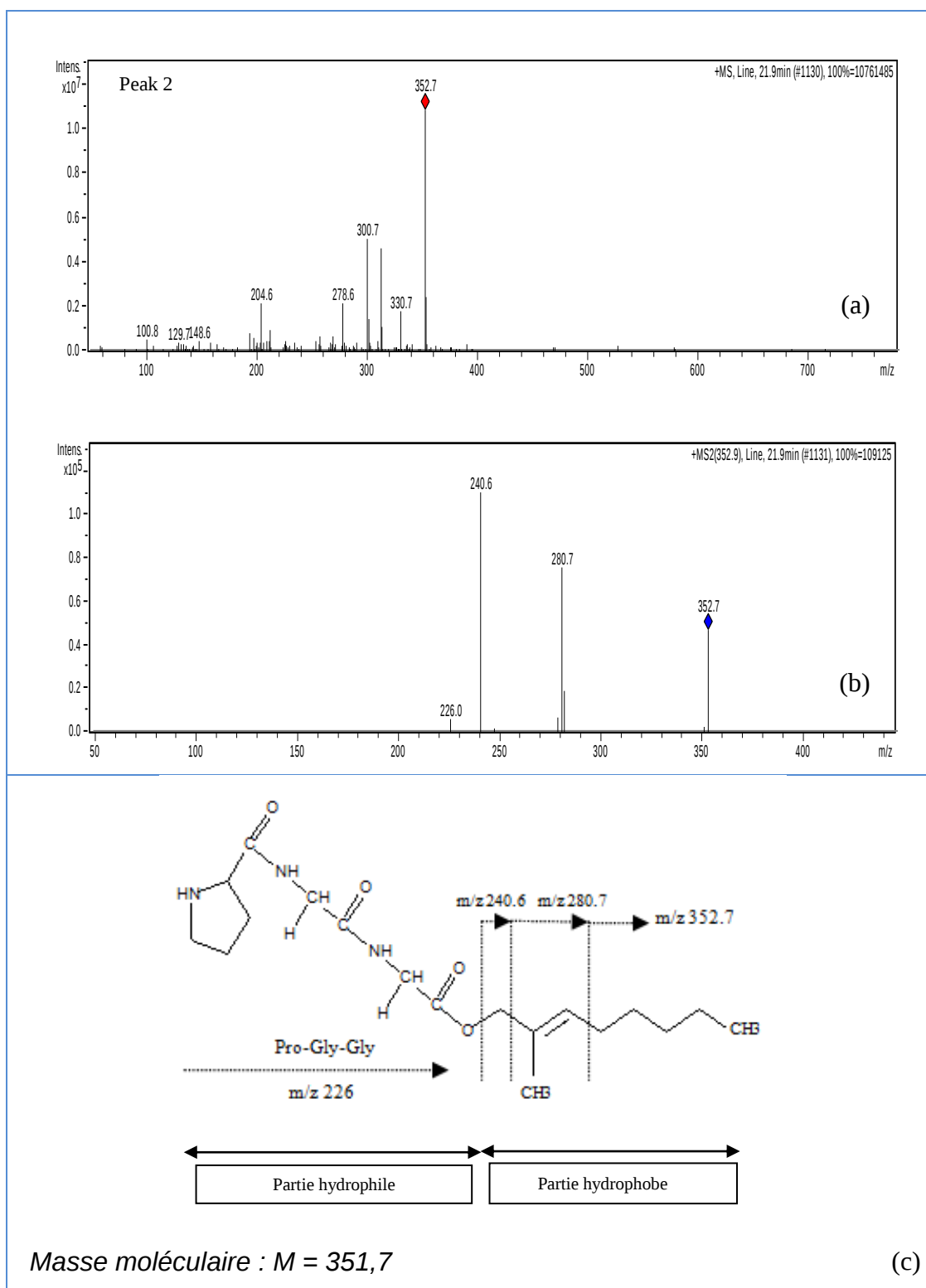


Figure 3.37 : Analyse LC-MS de biosurfactant, fraction 3. a) Spectre de masse ESI et la structure chimique du pic 2 (TR de 21,9min), b) MS2 du pic2, c) Structure proposée, basée sur la fragmentation de masse

3.3.8. Détermination HLB (Balance Hydrophile/Lipophile)

C'est une méthode numérique pour quantifier l'affinité du tensioactif pour les phases aqueuses et huileuses. La valeur de HLB dépend notamment du tensioactif et elle ne prend pas en compte les autres variables de formulation physico-chimique (température, pression, nature des principaux constituants et des additifs) susceptibles d'influer sur le système. La valeur de HLB varie de 0 à 20, sa valeur est donnée par la formule suivante [301] :

$$\text{Valeur de HLB} = \frac{\text{Masse moléculaire partie hydrophile}}{\text{Masse moléculaire de la molécule}} \times 20$$

Cette échelle repose sur l'équilibre existant entre les parties lipophile et hydrophile. Elle permet de choisir les surfactants en fonction de leurs caractéristiques. Le tableau 3.7 donne les propriétés d'un tensioactif en fonction de sa valeur HLB.

Tableau 3.7 : Classification des tensioactifs en fonction de leur HLB

Propriétés	Valeur de HLB
Antimoussant	0 - 3
Emulsifiant E/H ²	4 - 6
Mouillant	7 - 9
Emulsifiant H/E ³	8 - 18 (8 - 20)
Détergent	13 - 15
Solubilisant	15 - 18 (10 - 20)

² E/H : eau dans huile. Solubilisation d'une phase hydrophile dans une phase lipophile

³ H/E : huile dans eau. Solubilisation d'une phase lipophile dans une phase hydrophile

Le type de l'émulsion dépend de la valeur de HLB : si la valeur est comprise entre 3 et 6, les biosurfactants sont lipophiles et favorisent l'émulsion eau dans huile. Par contre, ils sont très hydrophiles et favorisent l'émulsion huile dans l'eau pour des valeurs en HLB variant de 10 à 18 [203].

Selon la formule précédente, le HLB de biosurfactant de la souche 1E est :

$$\text{HLB} = \frac{225}{352} \times 20 = 12,8$$

Selon cette valeur, nous pouvons classer le biosurfactant de 1E comme :

- Emulsifiant très hydrophile favorisant l'émulsion huile-dans-eau : il peut être utilisé comme un dispersant lors de déversement de pétrole (marées noires).
- Détergent.
- Solubilisant.

3.3.9. Application environnementale

Il est intéressant d'expliquer le mécanisme d'action de biosurfactant 1E (faible poids moléculaire) sur les hydrocarbures : au dessous de la concentration micellaire critique (CMC), appelé mécanisme de mobilisation, le biosurfactant réduit la tension superficielle et interfaciale entre les systèmes air/eau et sol/eau. En raison de cette réduction, le contact entre le biosurfactant et le système sol/hydrocarbure augmente l'angle de contact et diminue la force capillaire à la fois de l'hydrocarbure et du sol. Au dessus de la CMC, c'est le mécanisme de solubilisation qui se produit [205, 302].

3.3.9.1. Solubilisation des HAP

La faible solubilité des substances hydrophobes pose de sérieux problèmes pour leur élimination par voie biologique en raison de leur mauvaise accessibilité aux microorganismes (biodisponibilité faible). Cet inconvénient est pallié par l'utilisation des biosurfactants. Dans ce contexte, le biosurfactant 1E a été testé

pour la solubilisation du phénanthrène (HAP). Le taux de solubilité, provoqué par le biosurfactant, peut être exprimé en terme de rapport de S_w/S_w^* où S_w et S_w^* qui représentent les solubilités respectives du phénanthrène dans une solution de tensioactif et dans l'eau pure. Les résultats obtenus (figure 3.38) montrent clairement l'effet de biosurfactant 1E sur la solubilité du phénanthrène. Cette dernière a augmenté de 20 fois par rapport au contrôle et ce quand la concentration du biosurfactant est maximale (dépassé la concentration CMC). Toutefois, ce taux de solubilité n'est pas universel et dépend des conditions opératoires (composition du milieu, salinité, pH, température, ... etc.).

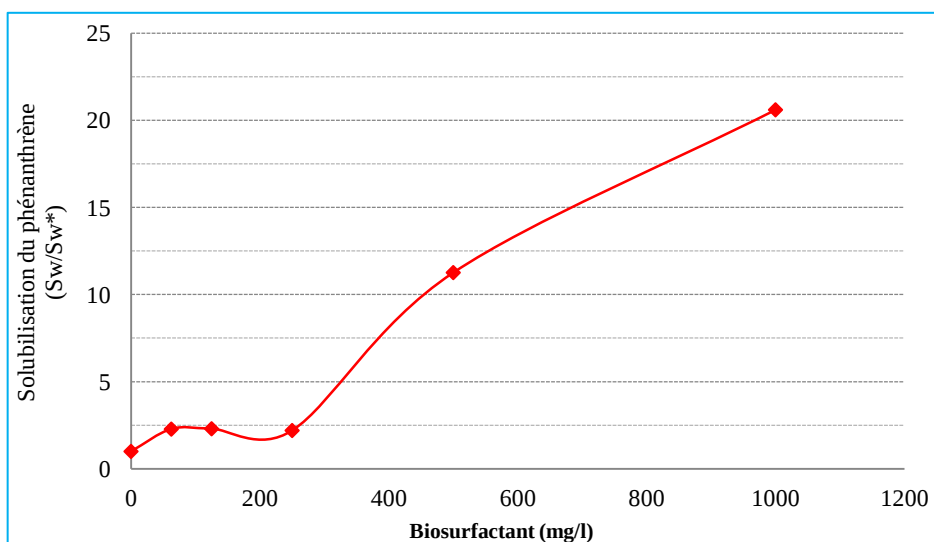


Figure 3.38 : Solubilisation du phénanthrène par le biosurfactant de la souche 1E dans l'eau pure (0,6 g/l de phénanthrène)

3.3.9.2. Remobilisation du pétrole brut

Afin de valider l'efficacité des tensioactifs d'origine biologique dans la bioremédiation des sites contaminés aux hydrocarbures, il est nécessaire de comparer les rendements obtenus avec ceux de leurs homologues chimiques [303]. Les résultats obtenus par l'analyse GC-MS montrent l'intérêt d'utiliser les surfactants (chimiques ou biologiques) dans la remobilisation de pétrole brut. Le biosurfactant de la souche 1E a montré une efficacité de remobilisation des hydrocarbures de 1,3 fois supérieure au surfactant chimique (Tween 80). A cet

égard, l'utilisation de biosurfactant de 1E dans le domaine environnemental est certainement prometteuse. Les résultats sont exprimés par rapport à la solubilité du témoin (eau) (figure 3.39).

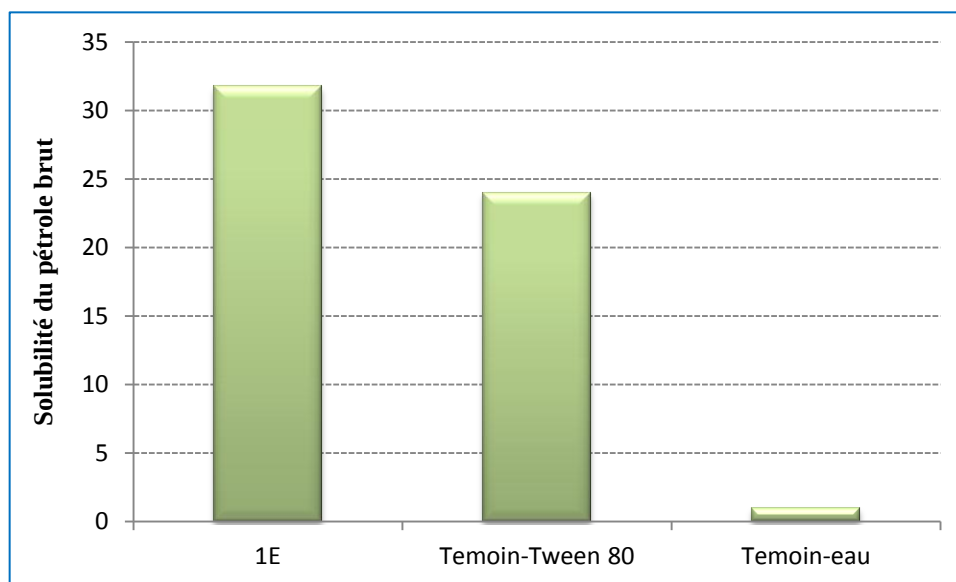


Figure 3.39 : Comparaison de la solubilité du pétrole brut en présence de surfactant biologique (issu de la souche 1E) et chimique (Tween 80)

3.3.10. Conclusion

La production des biosurfactants dépend de plusieurs paramètres entre autres la nature de substrat et le type de microorganisme. Un bon rendement est obtenu avec un substrat hydrophobe (hydrocarbures), les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sites contaminés par des substances hydrophobes. Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible.

La souche utilisée pour la production de biosurfactant a été isolée à partir d'un sol sableux contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud, la quantité produite en biosurfactant est de $2,1 \text{ g.l}^{-1}$ de culture. L'étude des propriétés

physico-chimiques et antimicrobienne montre que le biosurfactant peut être utilisé dans des milieux très salins (300 g.l^{-1}), acides ou basiques ($\text{pH} = 2$ à 12), son activité antimicrobienne est également intéressante pour des applications médicales. Par ailleurs, le pouvoir moussant, la solubilisation des HAP (phénanthrène) et la remobilisation des hydrocarbures (sols contaminés par le pétrole brut) sont des facteurs qui font du biosurfactant un produit très intéressant dans le domaine environnemental.

Les analyses biochimiques, FTIR et GC/MS montrent que le biosurfactant est de nature lipopeptidique à base d'acides aminés. En effet, l'association d'un acide aminé ou d'un peptide polaire avec un composé à longue chaîne non polaire, pour construire des structures amphiphiles, permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée [304, 305]. Cette propriété a été démontrée pour le biosurfactant produit par la souche 1E ($25,8 \text{ mN.m}^{-1}$). Une structure chimique de ce biosurfactant a été proposée.

Il est intéressant de noter que les caractéristiques des biosurfactants à base d'acides amines permettent d'envisager leur utilisation dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, ménagers et alimentaires. En outre, la valeur de HLB permet de considérer le biosurfactant de 1E comme un émulsifiant très hydrophile favorise l'émulsion huile dans eau (application dans la dispersion du pétrole déversé ou dans la récupération de pétrole), un détergent et un solubilisant.

Finalement, à notre connaissance, aucune étude n'avait été faite à ce jour pour la caractérisation des biosurfactants produits à partir de souches bactériennes de genre *Staphylococcus*. L'objectif de cette partie d'étude était de produire et caractériser pour la première fois un biosurfactant efficace produit par une souche *Staphylococcus sp.* 1E récemment isolée.

CONCLUSION GENERALE

Les milieux contaminés par des substances xénobiotiques représentent un vrai réservoir contenant une variété de microorganismes ayant un potentiel biodégradatif très élevé. Ces microorganismes, notamment les bactéries, peuvent être exploités dans plusieurs domaines industriels et environnementaux ; l'application environnementale semble efficace en raison de son faible coût, de la simplicité de son application et n'affecte pas l'environnement comparativement aux méthodes physico-chimiques.

Les résultats obtenus montrent que la dégradation du pétrole brut est possible en utilisant des souches sélectives. Plusieurs paramètres affectent la biodégradation tels que la quantité du pétrole, la température et la salinité: des quantités élevées en pétrole (déversement) ralentissent sa dégradation, les faibles quantités de pétrole ne représentent pas la concentration optimale, dans ce cas, il s'agit d'un problème d'accessibilité (faible probabilité de contact entre le microorganisme et le substrat), les souches mésophiles peuvent tolérer de fortes concentrations en pétrole (dans notre étude, la souche 1E est capable de croître jusqu'à une concentration de 15%, v/v de pétrole). Les milieux de faible salinité (inférieur à 2%) n'influent pas sur la dégradation du pétrole brut pour les trois types de souches bactériennes utilisées, toutefois, les milieux salins inhibent la dégradation et dans ce cas les souches mésophiles sont efficaces par rapport aux thermophiles.

Les analyses chimiques GC/MS des *n*-alcanes (C_{13} à C_{29}) montrent que les deux souches thermotolérantes (incubées à 45 °C) sélectionnées dans ce présent travail (7J et 7A) possèdent un pouvoir biodégradatif très élevé, un taux d'élimination de 100% est observé pour 6 hydrocarbures (C_{13} , C_{14} et C_{24} à C_{27}), et un taux supérieur à 90% pour les autres hydrocarbures.

Il existe une relation entre les mécanismes d'accessibilité (solubilisation ou interfacial), les microorganismes et les hydrocarbures impliqués. En effet, dans notre étude, les souches 1E et 7J présentent une hydrophobicité de la surface cellulaire élevée, ce qui permet aux bactéries à d'adhérer aux gouttelettes de

pétrole en suspension dans le milieu de culture. Ainsi, le caractère hydrophile de la souche KS1 lui permet d'adhérer de façon plus importante à des surfaces hydrophiles en formant un biofilm. Cet avantage offre un intérêt particulier dans la bioremédiation des sites contaminés aux hydrocarbures. La production des biosurfactants par les trois souches (1E, 7J et KS1) a été démontrée, il s'agit d'un autre processus métabolique utilisé par les souches pour améliorer la biodisponibilité des hydrocarbures.

La biodégradation du naphthalène (HAP) a été réalisée en mode statique par une souche thermotolérante K1C à 45 °C. Cette souche sélectionnée s'est montrée très efficace et très compétitive pour sa capacité à dégrader le naphthalène. Plusieurs paramètres affectant la dégradation ont été envisagés, les résultats obtenus indiquent que le taux de dégradation dépasse 98% pour une concentration en naphthalène de 500 mg.l⁻¹. La biotransformation du naphthalène est possible dans un milieu salin (4%, p/v), la souche K1C tolère une gamme assez large de pH [5,5 à 8,5], les milieux acido-basiques retardent la dégradation. L'effet de la source d'azote a été également démontré, un rapport de C/N égale de 1,25 est favorable pour la croissance et la dégradation du naphthalène. Cependant, l'ajout de surfactant chimique a un effet négatif sur l'élimination du naphthalène ; la souche K1C est une productrice de biosurfactant (travail en cours), il semble que l'ajout d'un tensioactif inhibe la sécrétion du biosurfactant et la souche dégrade le surfactant chimique avant la dégradation du naphthalène. Finalement, l'analyse des intermédiaires métabolites de dégradation du naphthalène a été réalisée par l'analyse FTIR.

Parmi les neuf souches mésophiles utilisées dans le criblage de la production de biosurfactant, une seule souche, *Staphylococcus* sp. 1E, a montré une production en biosurfactant très intéressante. En effet, la production, la caractérisation physico-chimique, et l'application environnementale de biosurfactant de 1E ont été étudiées. Les résultats obtenus ont révélé que l'huile d'olive (1%, v/v) était la source de carbone optimale conduisant à une réduction de la tension de surface jusqu'à une valeur de 25,8 mN.m⁻¹ avec une production en biosurfactant de 2,1 g.l⁻¹, sa structure appartient au groupe des lipopeptides. Ainsi, l'étude des

propriétés physico-chimiques montre que le biosurfactant peut être utilisé dans des milieux trop salins (300 g.l^{-1}), acides ou basiques ($\text{pH} = 2 \text{ à } 12$), de plus, il présente une activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes telles que : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*.

Les analyses biochimiques, FTIR et LC-MS ont révélé que le biosurfactant 1E est de nature lipopeptidique, sa masse moléculaire est de 351,7 uma, une structure chimique a été proposée.

Finalement, une application environnementale a été réalisée, la solubilisation du phénanthrène dans l'eau est améliorée en présence de biosurfactant. Un fort potentiel de remobilisation d'hydrocarbures est noté, en effet, le taux de remobilisation est 1,3 fois plus élevé par rapport au surfactant chimique Tween 80.

Le biosurfactant de la souche 1E a montré des propriétés très intéressantes (stabilité, activité antimicrobienne et remobilisation des hydrocarbures), ce qui rend son application très avantageuse pour la bioremédiation des sites contaminés aux hydrocarbures et permet son utilisation dans des environnements extrêmes et dans le domaine de la récupération assistée des hydrocarbures (EOR, Enhanced Oil Recovery).

Finalement, à notre connaissance, aucune étude n'avait décrit la caractérisation des biosurfactants produits à partir de souches bactériennes de genre *Staphylococcus*. L'objectif de cette étude était de caractériser pour la première fois un biosurfactant efficace produit par une souche *Staphylococcus sp.* 1E récemment isolée.

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a permis d'identifier les trois souches bactériennes les plus performantes : la souche 1E incubée à 30°C est phylogénétiquement liée au genre *Staphylococcus* affiliée à l'espèce *Staphylococcus haemolyticus* (mésophile) avec un pourcentage de 99%, la deuxième souche 7J incubée à 45°C est identifiée comme *Bacillus licheniformis* (thermotolérante) avec un pourcentage d'homologie 97%, alors que pour la

troisième souche KS1 incubée à 55°C, l'espèce *Geobacillus pallidus* (thermophile) est la plus proche avec un pourcentage d'homologie 99%.

Nous nous sommes intéressés ici à l'étude du potentiel biodégradatif des souches bactériennes isolées à partir d'un sol sableux contaminé par le pétrole brut de la région Hassi-Messaoud, Algérie. La dégradation du pétrole brut et du naphtalène a été démontrée. La production, la caractérisation (physico-chimique et antimicrobienne) et l'application de biosurfactant ont été également étudiées.

Afin de compléter la présente étude, il serait intéressant d'étudier :

- L'utilisation d'un consortium bactérien dans la dégradation de mélange complexe d'hydrocarbures (pétrole brut, gaz oil, essence, kérosène, ...).
- L'élargissement de l'étude sur la biodégradabilité à d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- Les mécanismes réactionnels de la biodégradation et les enzymes responsables de la dégradation du naphtalène par la souche K1C.
- L'application à grande échelle par l'utilisation des enzymes purifiées en mode immobilisé.
- L'identification complète de la souche K1C par les outils de la biologie moléculaire.
- Utilisation d'autres techniques d'analyse (RMN,...) pour confirmer la structure de biosurfactant issu de la souche 1E.
- L'application de biosurfactant dans la bioremédiation à l'échelle industrielle.
- La production des biosurfactants par des souches thermophiles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sikkema J., de Bont J.A.M. and Poolman B., "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons", *Microbiol. Rev.* 59, (1995), 201 - 222.
2. Okoh A. I., "Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants", *Biotechnol. Mol. Biol. Rev* 1, (2006), 38 - 50.
3. NRC, National Research Council (U.S.). Oil in the sea : inputs, fates and effects. *National Academy of Science*, Washington DC. (2002).
4. Vasudevan N. and Rajaram P., "Bioremediation of oil sludge contaminated soil", *Environ. Int.* 26, (2001), 409 - 411.
5. Rahman K.S., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R. and Banat I.M., "Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients", *Bioresour Technol.* 90(2), (2003), 159 - 168.
6. Iqbal S., Khalid Z.M. and Malik K.A., "Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactants by a gamma ray induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*", *Letters in Applied Microbiol.* 21, (1995), 176 - 179.
7. Huc A.Y., "Origin and formation of organic matter in recent sediments and its relation to kerogen". In *Kerogen*, Ed Durand B, Technip, Paris, (1980), 445 - 474.
8. Hunt J.M., "Petroleum Geochemistry and Geology", 2nd Edition. Freeman, New York, (1996).
9. Tissot B.P. and Welte D.H., "Petroleum formation and occurrence", Springer, Berlin, (1984).
10. NRC, National Research Council (U.S.). Oil in the sea III: Inputs, fates and effects. The National Academies Press: Washington, D.C., (2003), 280 p.
11. www.ufip.fr/?rubrique=1&ss_rubrique=...er=484&id=d_8
12. IEA, International Energy Agency, (2004)
13. [www.goodplanet.info/Energie-climat/Transports/\(theme\)/275](http://www.goodplanet.info/Energie-climat/Transports/(theme)/275)
14. Shabad L.M., "Circulation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the human environment and cancer prevention", *JNCI.* 64, (1980), 405 - 409.

- 15.** Wilcke W., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil", a review. *J Plant Nutr. Soil Sci.* 163, (2000), 229 - 248.
- 16.** Bocard C., "Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures", Enjeux environnementaux et traitement des pollutions. IFP publication, Edition Technip. (2006).
- 17.** GESAMP, Joint Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution, "Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment", GESAMP Reports and studies, vol. 50. *International Maritime Organization*, London, (1993). .
- 18.** PNUE, Programme des Nations Unies pour l'Environnement, "Les perspectives du Plan Bleu sur le développement durable en Méditerranée". Plan d'Action pour la Méditerranée Centre d'Activités Régionales du Plan Bleu. (2008).
- 19.** Speight J.G. "The Chemistry and Technology of Petro-leum". Marcel Dekker, New York. (1999).
- 20.** Lefebvre G., "Chimie des hydrocarbures". Edition Technip. Publication de l'Institut Français de Pétrole, (1979), 53 - 63.
- 21.** Saada A., Nowak C. and Coquerea N., "Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures". Rapport intermédiaire, Résultat de la phase 1. (2005). Site internet : <http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/RP-53739-FR2.pdf>
- 22.** Colwell R.R., Walker J.D. and Cooney J.J., (1977). "Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment", *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 5, no. 4, (1977), 423 - 445.
- 23.** Wrenn B.A. and Venosa A.D., "Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*. 24, (1996), 252 - 258.
- 24.** Tissot B.P. and Welte D.H., "Petroleum Formation and Occurrence: A New Approach to Oil and Gas Exploration". Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (1978).
- 25.** Soltani M., "Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone". Thèse de Doctorat de l'UNIVERSITE PARIS 6, (2004)
- 26.** Liao Y., Geng A. and Huang H., "The influence of biodegradation on resins and asphaltenes in the Liaohe Basin". *Organic Geochemistry*, 40(3), (2009), 312 - 320.

- 27.** Pomerantz A.E., Hammond M.R. Morrow A.L., Mullins O.C. and Zare R.N. "Asphaltene Molecular-Mass Distribution Determined by Two-Step Laser Mass Spectrometry", *Energy & Fuels* 23 (3), (2009), 1162 - 1168.
- 28.** Wild S.R. and Jones K.C., "Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget", *Environmental Pollution*, 88, (1995), 91 - 108.
- 29.** Jones K.C. and de Voogt P., "Persistent organic pollutants (POPs): state of the science", *Environmental Pollution*, 100, (1999), 209 - 221.
- 30.** Rojo F., "Degradation of alkanes by bacteria", Minireview. *Environmental Microbiology*, 11(10), (2009), 2477 – 2490.
- 31.** Menzie C.A., Potocki B.B. and Santodonato J., "Exposure to carcinogenic PAHs in the environment", *Environmental Science and Technology*, 26, (1992), 1278 – 128.
- 32.** Li J. and Chen B.H., "Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants", *Chemical Engineering Science* 57, (2002), 2827 - 2835.
- 33.** Neff J.M., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : sources, fates and biological effects" London, Applied Sciences Publishers, (1979).
- 34.** Environnement Canada , "Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health : Toluene, Ethylbenzene and Xylenes (TEX)", Scientific Supporting Documents, Ecosystem Health : Science-based Solutions, National Guidelines and Standards Office, Water Policy and Coordination Directorate, Environment Canada, Ottawa, Report No. 1 – 9 : (2005), 84p.
- 35.** Walker C.H., Hopkin S. P., Sibly R. M. and Peakall D. B., "Principles of Ecotoxicology". Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. (2006), 315p.
- 36.** Vandecasteele J P., "Microbiologie pétrolière – concepts, implications eNvironnementales, applications industrielles". Volume 1. Publications de l'institut français du pétrole, Paris, (2005), 412p.
- 37.** Edwards N.T., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Terrestrial Environment" - A Review, *J. Environ. Qual.*, 12, (1983), 427 - 441.
- 38.** Palayer J., "Le point sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques", *Agence de l'eau Seine Normandie*, (1997), 63 p.

- 39.** Kanaly R. A. and Harayama S., "Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria", *J. Bacteriol.* 182(8), (2000), 2059 - 2067.
- 40.** Lullen D.R. and Shea D., "Calibration and field verification of semipermeable membrane devices for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in water", *Environ. Sci. Technol.* 36, (2002), 1791 - 1797.
- 41.** Keith L.H. and Teilliard W.A., Priority pollutants. I. A perspective view", *Environmental Science and Technology*, 13, (1979), 416 - 423.
- 42.** Shuttleworth K. and Cerniglia C.E., "Environmental aspects of PAH biodegradation", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54, (1995), 291 - 302.
- 43.** Feix I. and Wiart J., "Les micropolluants organiques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines". ADEME, (1995).
- 44.** Allen J.O., "Atmospheric Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and Oxygenated PAH". *Thèse, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA*, (1997).
- 45.** Doyle E., Muckian L., Hickey A.M. and Clipson N., "Microbial PAH degradation". *Adv. Appl. Microbiol.* 65, (2008), 27 - 66.
- 46.** Nielsen T., Jorgensen H.E., Larsen J.C. and Poulsen M., "City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens : occurrence, source and health effects". *Science of Total Environment.* 189/190, (1996), 41 - 49.
- 47.** www.covaltech.com
- 48.** IARC, "Polynuclear Aromatic Compounds. Bitumens, Coal-tars and Derived Products, Shale-Oils and Soots. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans", 35, part 4. Ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. (1985), 39-236.
- 49.** Barbieri O., Ognio E., Rossi O., Astigiano S. and Rossi L., "Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice". *Cancer Res.*, 46, (1986), 94 - 98.
- 50.** De Flora S., Bagnasco M. and Znacchi P., "Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea". *Mutat. Res.*, 258, (1991), 285 - 320.

- 51.** Albert R.E., Miller M.L., Cody T., Andringa A., Shukla R. and Baxter C.S., "Benzo(a)pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse", *Carcinogenesis*, 12, (1991), 1273 - 1280.
- 52.** Platt K. L., Pfeiffer E. H., Petrovic P., Friesel H., Beermann D., Hecker E. and Oesch F., "Comparative tumorigenicity of picene and dibenzo(a,h)anthracene in the mouse". *Carcinogenesis*, 11, (1990), 1721 - 1726.
- 53.** Ajoa O.G., Adenuga M.O and Lapido J.K., "Colorectal carcinoma in patients under the age of 30 years": A review of 11 cases. *Journal of the Royal College of Surgeons of Edinburgh*, 33, (1988), 277-279.
- 54.** Weyand E.H., Patel S. and LaVoie E.J., "Relative tumor initiating activity of benzo(a)fluoranthene, benzo(b)fluoranthene, naphthol(1,2-b)fluoranthene and naphthol(1,2-a) fluoranthene on mouse skin", *Cancer Letters*. 52, (1990), 229 - 234.
- 55.** LaVoie E.J., Amin S., Hecht S.S., Furuya K. and Hoffmann D., "Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene". *Cancer Research*. 40, (1980), 4528 - 4532.
- 56.** Deutsch-Wenzel R., Brune H., Grimmer G., Dettbarn G. and Misfeld J. (1983). "Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose-response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons". *Journal of the National Cancer Institute*. 71, (1983), 539 - 544.
- 57.** Dabestani R. and Ivanov N., "Invited review. A compilation of physical, spectroscopic, and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Photochemistry and photobiology*, 70, (1999), 10-34.
- 58.** Varanasi U. and Gmur D. J., "Hydrocarbons and metabolites in english sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [3H]benzo(a)pyrene and [14C]naphthalene in oil-contaminated sediment". *Aquat. Toxicol.* 1, (1989), 49 - 67.
- 59.** Wislocki P.G. and Lu A.Y.H., "Carcinogenicity and Mutagenicity of proximate and ultimate carcinogens of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". CRC Press Inc. (1988).
- 60.** Bertrand J. C. and Mille G., "Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures". In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre 13, (1989), pp. 343 - 385.

- 61.** U.S. Congress, Office of Technology Assessment, "Bioremediation of Oil Spills" – Background Paper, OTA-BP-70 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office), (1991).
- 62.** Lichtenthaler, R.G., Haag W.R. and Mill T., "Photooxidation of probe compounds sensitized by crude oils in toluene and as an oil film on water", *Environmental Science and Technology*, 23(1), (1989), 39 - 45.
- 63.** Payne J.R., Clayton J.R., McNabb G.D. and Kirstein B.E., "Exxon Valdez oil weathering and behavior, model predictions and field observations". In: Proceedings of the 1991 international oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, (1991), 641 - 654.
- 64.** Fingas M.F., "The evaporation of oil spills: Development and implementation of new prediction methodology. In: Proceedings of the 1999 international oil spill conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, (1999), 185 - 194.
- 65.** Sharma V.K., Hicks S.D., Rivera, W. and Vazquez F.G., "Characterization and degradation of petroleum hydrocarbons following an oil spill into a coastal environment of south Texas", USA. *Water, Air and Soil Pollution*, 134, (2002), 111 - 127.
- 66.** Sutton, C. et Calder J.A., "Solubility of higher-molecular-weight n-paraffins in distilled water and seawater", *Environ. Science Tech.* 8, (1974), 320 - 322.
- 67.** Larson R.A., Bott T.L., Hunt L.L. and Rogenmuser K., "Photooxidation products of a fuel oil and their antimicrobial activity", *Environmental Science and Technology*, 13, (1979), 965 - 969.
- 68.** Payne J.R. and Philipps C.R., "Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products". *Environmental Science and Technology*, 19, (1985), 569 - 579.
- 69.** Leahy J.G. and Colwell R.R., "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment", *Microbiol. Rev.* 54, (1990), 305 - 315.
- 70.** Rémy B., "Étude de l'adsorption/désorption de polluants organiques dans les sols. Approche méthodologique et application au pentachlorophénol et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques". Thèse de Doctorat de L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON, (1997).
- 71.** Ferek R.A. and Kucklick J.H., "Air Quality Considerations Involving In-Situ Burning", *Marine Preservation Association*, Scottsdale, Arizona. (1997), 29 pp.

- 72.** OMI, Organisation Maritime Internationale: "Manuel sur la pollution par les hydrocarbures", Section IV, Lutte contre les déversements d'hydrocarbures, (2005).
- 73.** Chapman H., Purnell, K., Law R.J. and Kirby M.F., "The use of chemical dispersants to combat oil spills at sea": A review of practice and research needs in Europe. *Marine Pollution Bulletin*, 54, (2007), 827-838.
- 74.** Thiem A., "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants", *Applied and Environment Microbiology*, 60, (1994), 258 - 263.
- 75.** Churchill P.F., Dudley R.J. and Churchill S.A., "Surfactant-enhanced bioremediation". *Waste Management*, 15, (1995), 371 - 377.
- 76.** Swannell R.P. J. and Daniel F., "Effect of dispersants on oil biodegradation under simulated marine conditions", *Proceedings of the 1999 International Oil Spill Conference*, Seattle, Washington, USA, (1999), pp. 169 -176.
- 77.** Oturan M.A., Pinson J., Bizot J., Deprez D., Terlain B., "Reaction of inflammation inhibitors with chemically and electrochemically generated hydroxyl radicals", *J. Electroanal. Chem.* 334, (1992), 103 - 109.
- 78.** Oturan M.A., Oturan N., Lahitte C., Trevin S., "Production of hydroxyl radicals by electrochemically assisted Fenton's reagent: Application to the mineralization of an organic micropollutant, pentachlorophenol", *J. Electroanal. Chem.* 507, (2001), 96 - 102.
- 79.** Choi K., Ghosh S., Lim J., Lee C.M., "Removal efficiency of organic contaminants on Si wafer by dry cleaning using UV/O₃ and ECR plasma", *Appl. Surf. Sci.* 206, (2003), 355 - 364.
- 80.** Flotron V., Delteil C., Bermond A. and Camel V., "Remediation of matrices contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Use of Fenton's Reagent". *Polycyclic Aromatic Compounds*. Vol. 23, N°. 4, (2003), 353 - 376.
- 81.** Kesraoui Abdessalem A., Bellakhal N., Oturan N., Dachraoui M. and Oturan M.A., "Treatment of a mixture of three pesticides by photo- and electro-Fenton processes", *Desalination*, 250, (2010), 450-455.
- 82.** Rosenberg E., "Exploiting microbial growth on hydrocarbons – new markets", *Trends Biotechnol.* 11, (1993), 419 - 424.

- 83.** Atlas, R.M., and Cerniglia C.E., "Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation". *BioScience* 45, (1995), 332 - 338.
- 84.** Becker J.R., "Crude oil waxes, emulsions, and asphaltenes". PennWell, Tulsa, Oklahoma, (1997).
- 85.** Prince R.C., " Bioremediation of marine oil spills", *Trends Biotechnol*, 15, (1997), 158 - 160.
- 86.** McClay Fox K. B.G. and R.J. Steffan., "Toluene monooxygenase catalyzed epoxidation of alkenes", *Appl. Environ. Microbiol.* 66, (2000), 1877 - 1882.
- 87.** Sikkema J., Poolman B., Koning W.N. and de Bont J.A.M., "Effect of the membrane on tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes", *Journal of Bacteriology* 174, (1992), 2986 – 2992.
- 88.** Sikkema J., de Bont J.A.M. and Poolman B., "Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes", *Journal of Bacteriology* 269, (1994), 8022 - 8028.
- 89.** De Semet M.J., Kingma J. and Witholt B., "The effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Echerichia coli*". *Biochimica et Biophysica Acta*, 506, (1978), 64 - 80.
- 90.** Olsen J., "*Pseudomonas* Degradation of Hydrocarbons", United States Patent # 4508824, United States Patent Of-fice. (1985).
- 91.** Harvey S., Elashvilli, I., Valdes J. J., Kamely D. and Chakrabarty A. M. "Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant". *Nature Biotechnology*, Vol. 8, No. 3, (1990), 228 - 230.
- 92.** Binder R.G., Numata K., Lowe D.A., Murakami T. and Brown J.L., "Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* Strain Producing Glutaryl-7-Aminocephalosporanic Acid Acylase", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 10, (1993), 3321 - 3326.
- 93.** Wang Q., Zhang S., Li Y. and Klassen W., "Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution". *Journal of Environmental Protection*, 2, (2011), 47 - 55.
- 94.** Miura y., Okazaki M., Hamada S.I., Murakawa, S.I. and Yugen R., "Assimilation of liquid hydrocarbon by microorganisms. I. Mechanism of hydrocarbon uptake". *Biotechnology and Bioengineering* Volume 19, Issue 5, (1977), 701 - 714.

- 95.** Fritsche W. and Hofrichter M., "Aerobic degradation by microorganisms, *Biotechnology*" : Environmental Processes II, Volume 11B, 2nd edition. (2008), 144–167.
- 96.** Das N. and Chandran P., "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", *Biotechnology Research International* Volume 2011: (2011), 13 pages.
- 97.** Prabhu Y. and Phale P.S., "Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2 : novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation", *Appl. Microbiol. Biotech.*, 61, (2003), 342 - 351.
- 98.** Adams R. H., Guzman-Osorio F. J. and Zavala Cruz J., "Water repellency in oil contaminated sandy and clayey soils". *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 5 (4), (2008), 445 - 454.
- 99.** Kosamu I.B.M. and Obst M., "The influence of picocyanobacterial photosynthesis on calcite precipitation", *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 6 (4), (2009), 557 - 562.
- 100.** Winters J.C. and Williams J.A., "Microbiological alteration of crude oil in the reservoir. American Chemical Society, Division of Petroleum Chemistry", New York Meeting Preprints, 14(4), (1969), E22 - E31.
- 101.** Britton L.N., "Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons", (1984), 89 - 129.
- 102.** Watkinson R.J. and Morgan P., "Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms". *Biodegradation*. 1, (1990), 79 - 92.
- 103.** Erikson M., Dalhammar G. and Borg-Karlson A.K. , "Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, (2000), 619 - 626.
- 104.** Peters K.E., Walters C.C. and Moldowan J.M., "The Biomarker Guide". Second Edition. Cambridge University Press. (2005).
- 105.** Pelmont J., "Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement", EDP Sciences, (2005).
- 106.** Coon M.J., "Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes", *Biochem Biophys Res Commun*. 338, (2005), 378 - 385.

- 107.** Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits, T.H.M. and Witholt B., "Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment", *Oil Gas Sci Technology*, 58, (2003), 427 – 440.
- 108.** Van Hamme J.D., Singh, A. and Ward O.P., "Recent advances in petroleum microbiology", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4), (2003), 503 - 549.
- 109.** Van Beilen J.B., and Funhoff E.G., "Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation", *Appl Microbiol Biotechnol* 74, (2007), 13 - 21.
- 110.** Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B., and Throne-Holst M., "Bacterial metabolism of longchain *n*-alkanes", *Appl Microbiol Biotechnol* 76, (2007), 1209 - 1221.
- 111.** Bartha R., "Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation", *Microbial Ecology*. 12, (1986), 155-172.
- 112.** Ratledge C., "Degradation of aliphatic hydrocarbons", In: Watkinson, R.J. (Ed.), Development in biodegradation of hydrocarbons. *Applied Sciences Publishers*. Vol. 1, (1978), pp 1 - 46. London.
- 113.** Ashraf W., Mihdhir A. and Murrell J.C., "Bacterial oxidation of propane", *FEMS Microbiol. Lett.*, 122, (1994), 1 - 6.
- 114.** Kotani T., Kawashima Y., Yurimoto H., Kato N. and Sakai Y., "Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7", *J Biosci Bioeng* 102, (2006), 184 - 192.
- 115.** Kotani T., Yurimoto H., Kato N. and Sakai Y., "Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium, *Gordonia* sp. strain TY-5", *J Bacteriol* 189, (2007), 886 - 893.
- 116.** Whyte L. G., Hawari J., Zhou E., Bourbonniere L., Inniss W. E., and Greer C. W., "Biodegradation of variable chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp.", *Appl Environ Microbiol*, 64, (1998), 2578 - 2584
- 117.** Finnerty W.R., "The biochemistry of microbial alkane oxidation: new insights and perspectives", *Trends in Biochemical Sciences*, 2, (1977), 73 - 75.
- 118.** Finnerty W.R., "Lipids of *Acinetobacter*. In: Proceeding of the Word Conference on Biotechnology for Fats and Oil Ondustry", Champaign, Il., (1988), 184 - 189.
- 119.** Foght, J.M. and Westlake, D.W.S., "Biodegradation of hydrocarbons in freshwater". Proceedings of the symposium on oil pollution in freshwater. Edmonton, Alberta, Canada, (1984), 217-230

- 120.** Atlas R.M., "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective", *Microbiol. Rev.* 45, (1981), 180 - 209.
- 121.** Davis J B., "Petroleum Microbiology". Elseiver Publishing Co., New York. (1967).
- 122.** Foster J.W., "Hydrocarbons as substrates for microorganisms", *Journal of Microbiology Serology* 28, (1962), 241 - 274.
- 123.** McKenna E.J., "Microbial metabolism of normal and branched chain alkanes". In : Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere. National Academy of Sciences. Washington, D.C., (1972), 73 - 97.
- 124.** Beguin P., Chauvaux S., Miras I., Francois A., Fayolle F. and Monot F., "Genes involved in the degradation of ether fuels by bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* group", *Oil & Gas Science and Technology - Rev, IFP.* 58, (2003), 489 - 495.
- 125.** McKenna E.J. and Kallio R.E., "Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane". *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, (1971), 1552 - 1554.
- 126.** Pirnik M. P., Atlas R. M. and Bartha R., "Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes", *J. Bacteriol.* 119, (1974), 868 - 878.
- 127.** Perry J.J., "Microbial metabolism of cyclic alkanes", In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. (1984). 61-98.
- 128.** Atlas R.M., Boehm P.D. and Calder J.A., "Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cadiz oil spillage within the littoral zone", *Estuarine, Coastal and Marine Science.* 12, (1981), 589 - 608.
- 129.** Perry J.J., "Microbial cooxidations involving hydrocarbons". *Microbiol Rev.* 43(1), (1979), 59 - 72.
- 130.** Stirling L.A. and Perry J.J. "Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide-linked cyclohexanol dehydrogenase from a *Nocardia* species", *Curr. Microbiol.* 4, (1980), 37 - 40.
- 131.** Cerniglia C.E., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Biodegradation*, 3, (1992), 351-368.
- 132.** Pathak H., Kantharia D., Malpani A. and Madamwar D., "Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1, In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms", *Journal of Hazardous Materials* 166(2-3), (2009), 1466 - 1473.

- 133.** Wilson S.C. and Jones K.C., "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)": a review. *Environ. Pollut.* 81, (1993). 229 - 249.
- 134.** Rochkind-Dubinsky M.L., Sayler G.S. and Blackburn J.W., "Microbial decomposition Chlorinated Aromatic hydrocarbons", Marcel Dekker, New York, pp. (1987), 48 - 65.
- 135.** Burback B.L. and Perry J.J., "Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*", *Appl. Environ. Microbiol.* 59, (1993), 1025 - 1029.
- 136.** Fredrickson J. K., Balkwill D. L., Drake G. R., Romine M. F., Ringelberg D. B and White D.C., "Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface", *Appl Environ Microbiol*, 61(5), (1995), 1917 - 1922.
- 137.** Goyal, A.K. and Zylstra G.J., "Molecular cloning of novel genes for vpolycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39", *Appl Environ Microbiol* 62(1), (1996), 230 - 236.
- 138.** Grund E., Denecke B. and Eichenlaub R., "Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4", *Appl Environ Microbiol* 58(6), (1992), 1874 - 1877.
- 139.** Simon M.J., Osslund T.D., Saunders R., Ensley B.D., Suggs S., Harcourt A., Suen W.C., Cruden D.L., Gibson D.T. and Zylstra G.J. "Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB" 9816-4. *Gene*. 127(1), (1993), 31 - 37.
- 140.** Kang H., Hwang S.Y., Kim Y. M., Kim E., Kim Y. S. and Kim S. K., "Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain", *Can. J. Microbiol.* 49, (2003), 139 - 144.
- 141.** Xue-Qin Tao, Gui-Ning Lu, Jie-Ping Liu, Ting Li and Li-Ni Yang, "Rapid Degradation of Phenanthrene by Using *Sphingomonas* sp. GY2B Immobilized in Calcium Alginate Gel Beads", *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 6(9), (2009), 2470 – 2480.
- 142.** Chen lin, Li Gan and Zu Liang Chen, "Biodegradation on naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BNF)", *Journal of Hazardous Materials*, 182, (2010), 771 - 777.

- 143.** Kim T.J., Lee E.Y., Kim Y.J., Cho K.S. and Ryu H.W., "Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12", *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19, (2003), 411- 417.
- 144.** Hedlund B.P., Geiselbrecht A.D. and Staley J.T., "*Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase", *FEMS Microbiol. Lett.* 201, (2001), 47 - 51.
- 145.** Pumphrey G. M. and Madsen, E.L., "Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2", *Microbiology*, 153, (2007), 3730 - 3738.
- 146.** Denome S.A., Stanley D.C., Olson E.S. and Young K.D., "Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* Strains: Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway". *J. Bacteriol.* 175, (1993), 6890 - 6901.
- 147.** Kiyohara H., Torigoe S., Kaida N., Asaki T., Iida T., Hayashi H. and Takizawa N. "Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.*, 176, (1994), 2439 - 2443.
- 148.** Zhou N.Y., Al-Dulayymi J., Baird M.S. and Williams P.A., " Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: a monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase", *J. Bacteriol.*, 184, (2002), 1547-1555.
- 149.** San Miguel V., Peinado C., Catalina F. and Abrusci C., "Bioremediation of naphthalene in water by *Sphingomonas paucimobilis* using new biodegradable surfactants based on poly (3-caprolactone)", *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, (2009), 217 - 223.
- 150.** Manohar S. and Karegoudar T.B., "Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide", *Applied Microbiology and Biotechnology.* V. 49, N° 6, (1998), 785 - 792.
- 151.** Yen K.M. and Serdar C.M., "Genetics of naphthalene catabolism in *Pseudomonads*", *Crit. Rev. Microbiol.* 15(3), (1988), 247 - 268.
- 152.** Zeinali M., Vossoughi M., and Ardestani S.K., "Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism". *Chemosphere.* 72, (2008), 905-09.

- 153.** Cerniglia C.E., "Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Adv. Appl. Microbiol.* 30, (1984), 31 - 71.
- 154.** Lin C., Gan L. and Zu-lian C., "Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN)", *Journal of Hazardous Materials*. 182, (2010), 771 - 777.
- 155.** Langenhoff A. A. M., Zehnder A. J. B. and Schraa G., "Behavior of toluene, benzene and naphthalene under anaerobic conditions in sediment columns", *Biodegradation*, 7, (1996), 267 - 274.
- 156** Meckenstock R.U., "Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures". *FEMS Microbiol. Lett.* 177, (1999), 67-73.
- 157.** Cervantes F. J., Dijksma W., Duong-Dac T., Ivanova A., Lettinga G. and J. A. Field J. A., "Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors", *Appl. Environ. Microbiol.* 67, (2001), 4471 - 4478.
- 158.** Meckenstock R.U., Safinowski M. and Griebler C., "Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil", *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, (2004), 27 - 36.
- 159.** Blasig R., Schunck W.H., Jockisch W., Franke P. and Müller H.G., "Degradation of long chain *n*-alkanes by the yeast *Ledderomyces elongisporus*. I. Products of alkane oxidation in whole cells", *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, (1984), 241 - 246.
- 160.** Davies J.S. and Westlake D. W. S., "Crude oil utilization by fungi". *Canadian Journal of Microbiology* 25, (1979), 146 - 156.
- 161.** Fedorack P.M., Semple, K.M. and Westlake D.W.S., "Oil degradation capacities of yeast and fungi isolated from coastal marine environments", *Canadian Journal of Microbiology*. 30, (1984), 565 - 571.
- 162.** Meulenbergh R., Rijnaarts H.H.M., Doddema H.J. and Field J.A., "Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability". *FEMS Microbiol. Lett.* 152(1), (1997), 45 - 49.
- 163.** Klug M.J. and Markovetz A.J., "Utilization of aliphatic hydrocarbons by Microorganisms", *Advances in Microbiology Physiology* 5, (1971), 1 - 43.
- 164.** Yamada-Onodera K., Mukumoto H., Katsuyama Y. and Tani Y., "Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK". *Enzyme and Microbial Technology*. 30, (2002), 828 - 831.
- 165.** Kotterman M.J.J., Vis E.H. and Field, J.A., Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain

BOS55 and indigenous microflora", *Appl. Environ. Microbiol.* 64, (1998), 2853 - 2858.

166. Walker J.D., Cowell R.R. and Petrakis K., "Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*". *Applied Microbiology*. 30, (1975), 79 - 81.

167. Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D. and Jain, R.K., "Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental bioremediation technologies". S.N. Singh and R.D. Tripathi. Berlin, Springer, (2007), 409 - 443.

168. Narro M.L., Cerniglia C.E., Van Baalen C. and Gibson D.T., "Evidence of NIH shift in naphthalene oxidation by the marine cyanobacterium, *Oscillatoria* species strain JCM". *Appl. Environ. Microbiol.* 58, (1992a), 1360 - 1363.

169. Narro M.L., Cerniglia C.E., Van Baalen C. and Gibson D.T., "Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6", *Appl. Environ. Microbiol.* 58, (1992b), 1351 - 1359.

170. Huesemann M.H., "Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils", *Environ. Sci. Technol.* 29, (1995), 7 - 18.

171. Cooney J.J., Silver S.A. and Beck E.A., "Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes", *Microb. Ecol.* 11, (1985), 127 - 137.

172. Jones D.M., Douglas A.G., Parkes R.J., Taylor J., Giger W. and Schuffner C., "The recognition of biodegraded petroleum-derived aromatic hydrocarbons in recent marine sediments". *Mar. Pollut. Bull.* 14, (1983), 103-108.

173. Fusey P. and Oudot J., "Relative influence of physical removal and biodegradation in the depuration of petroleum-contaminated seashore sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 15, (1984), 136 - 141.

174. Rahman K.S.M., Banat I.M., Rahman T.J., Thayumanavan T. and Lakshmanaperumalsamy, "Bioremediation of gasoline contaminated soil by bacteria consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant", *Bioresour. Technol.* 81(1), (2002), 25 - 32.

175. Iqbal J., Metosh-Dickey C. and Portier R.J., "Temperature effects on bioremediation of PAH and PCB contaminated south louisiana soils: a laboratory mesocosm study", *Journal of Soils and Sediments* 7(3), (2007), 153 - 158.

176. Atlas R.M. and Bartha R., "Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures". *Can. J. Microbial.* 18, (1972), 1851 - 1855.

- 177.** Gibbs C.F., Pugh K.B. and Andrews A.R., "Quantitative studies on marine biodegradation of oil. II. Effect of temperature". *Proc. R. Soc. London Ser. B* 188: (1975), 83 - 94.
- 178.** Bossert I. and Bartha R., "The fate of petroleum in soil ecosystems", In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. (1984), 434 - 476.
- 179.** Cooney J.J., "The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems", In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. (1984), 399 - 434.
- 180.** Singer M.E. and Finnerty W.R., "Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes", In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. (1984), 1-60.
- 181.** Hambrick G.A., III, R. DeLaune R. D. and Patrick Jr. W.H., "Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation". *Appl. Environ. Microbiol.* 40, (1980), 365 - 369.
- 182.** Floodgate G., "The fate of petroleum in marine ecosystems", In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York, (1984), 355 - 398
- 183.** Dibble J. T. and R. Bartha R., "Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater". *Appl. Environ. Microbiol.* 31, (1976), 544 - 550.
- 184.** Olivieri R., Bacchin P., Robertiello A., Oddo N., Degen L. and Tonolo A. (1976). Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 629 - 634.
- 185.** Oudot J, Merlin FX, Pinvidic P., "Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments". *Mar. Environ. Res.* 45, (1998), 113-125.
- 186.** Chayneau C.H., Rougeux G., Yepremian C. and Oudot J., "Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil", *Soil. Biol. Biochem.*, 37, (2005), 1490 – 1497.
- 187.** Carmichael L.M. and Pfaender F.K., "The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils", *Biodegradation*, 8, (1997), 1 - 13.
- 188.** McMillen S. J., Gray N.R., Kerr J. M., Requejo A. G., McDonald T.J. and Douglas G. S., "Assessing Bioremediation of Crude Oil in Soils and Sludges". In:

Monitoring and Verification of Bioremediation, Hinchee, R.E., G.S. Douglas and S.K. Ong (Eds.). Battelle Press, Columbus, Ohio, (1995), 1 - 9.

189. Sathishkumar M., Binupriya A.R., Baik S.H and Yun S.E., "Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas". *Clean*, Vol. 36, No. 1, (2008), 92 - 96.

190. Knezovich J.P., "Chemical and biological factors affecting bioavailability of contaminants in seawater". In: Hamelink JL (ed) *Bioavailability: physical, chemical, and biological interactions*. CRC. (1994).

191. Diaz M.P., Grigson S.J.W., Peppiatt C., and Burgess J.G., "Isolation and characterization of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments". *Mar. Biotechnol.* 2, (2000), 522 - 532.

192. Mille G., Almallah M., Bianchi M., Van Wambeke F. and Bertrand J.C., "Effect of salinity on petroleum biodegradation". *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, (1991), 788 - 791.

193. De Carvalho CCCR and da Fonseca MMR ., "Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14", *FEMS Microbiol Ecol*, 51, (2005), 389 – 399.

194. Yemashova N.A., Murygina V.P., Zhukov D.V., Zakharyantz A.A., Gladchenko M.A., Appanna V. and Kalyuzhnyi S.V., "Biodeterioration of crude oil and oil derived products" : a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 6, (2007), 315 - 337.

195. Li X., Li P., Lin X., Zhang C., Li Q. and Gong Z., "Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases", *Journal of Hazardous Materials* 150, (2008), 21 - 26.

196. Banat I.M., Makkar R.S. and Cameotra S.S., "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, (2000), 495-508.

197. Fiechter A., "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Tibtech*, 10, (1992), 3 - 12.

198. West C.C. and Harwell J.H., "Surfactants and subsurface remediation", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (12), (1992), 2324 - 2330.

- 199.** Healy M. G., Devine C. M. and Murphy R., "Microbial production of biosurfactants", *Resources, Conservation and Recycling*, 18, (1996), 41 - 57.
- 200.** Parra J. L., Guinea J., Manresa M. A., Robert M., Mercadé M. E., Comelles F. and Bosch M. P., "Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants", *J.A.O.C.S.*, 66 (1), (1989), 141 - 145.
- 201.** Vipulanandan C. and Ren X., "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant", *Journal of Environmental Engineering*, 126, (7): (2000), 629 - 634.
- 202.** Sullivan E. R., "Molecular genetics of biosurfactant production". *Curr. Opin. Biotech.* 9, (1998), 263 - 269.
- 203.** Desai J.D. and Banat I.M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, (1997), 47 - 64.
- 204.** Pacwa Plociniczak M., Plazo G.A., Piotrowska Z. and Cameotra S.S., "Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances". *Int. J. Mol. Sci.* 12, (2011), 633 - 654.
- 205.** Rosenberg E. and Ron E.Z., "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, (1999), 2154 - 162,
- 206.** Kosaric N., Gray N. C.C. and Cairns W.L., "Microbial emulsifiers and de emulsifiers", *In* H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, vol. 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla. (1983), 575 - 592
- 207.** Parkinson M., "Bio-surfactant" *Biotechol. Adv.*, 3, (1985), 65 - 83.
- 208.** Zajic J.E. and Seffens W., "Biosurfactants" *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1(2), (1984), 87 - 102.
- 209.** Guerra-Santos L.H., Kappeli, O. and Fiechter A., "*Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources", *Applied and Environmental Microbiology*. 48, (1984), 301-305.
- 210.** Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechter A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors", *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, (1986), 443 – 448,
- 211.** Hitsatsuka K., Nakahara T., Sano N. and Yamada K., "Formation of a rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation", *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, (1971), 696 - 692.

- 212.** Cooper D.G. and Paddock D.A., "*Torulopsis petrophilum* and surface activity", *Applied and Environmental Microbiology*, 46, (1983), 1426 – 1429.
- 213.** Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C. and Gutnick D.L., "Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties", *Applied and Environmental Microbiology*, 37, (1979), 402 - 408
- 214.** Arima K., Kakinuma and Tamura G., "Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin", *Agricultural & Biological Chemistry*, 33, (1969), 973-976.
- 215.** Cooper D.G., Macdonald C.R., Duff J.P. and Kosaric N., "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions", *Applied and Environmental Microbiology*. 42, (1981), 408 - 411.
- 216.** Karanth N.G.K., Deo P.G. and Veenanadig N.K., "Microbial biosurfactant and their importance", *Current Science*, 77, (1999), 116 - 126
- 217.** Mulligan C.N., "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133, (2005), 183 - 198.
- 218.** Banat I. M., "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation": a review. *Bioresource Technol.* 51, (1995), 1 - 12
- 219.** Lin, S., "Biosurfactants" : Recent Reviews, *J. Chem.Tech. Biotechnol.*, 66, (1996), 109 - 120.
- 220.** Christofi N. and Ivshina I.B., "A review : microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation", *Journal of Applied Microbiology*, 93, (2002), 915 - 929.
- 221.** Singh P. and Cameotra S.S., "Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences". *Trends in Biotechnology*. 22, (2004), 142 - 146.
- 222.** Hommel R.K. and Ratledge C., "Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules", In N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., (1993), 3 - 63.
- 223.** Syldatk C. and Wagner F., "Production of biosurfactants", In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York. (1987). 89–120.

- 224.** Sylđatk C.S., Lang S., Matulovic U. and Wagner F., "Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp. DSM2874". *Zeitschrift für Naturforschung C*, 40,(1985b), 61-67.
- 225.** Rouse J., Sabatini D., Suflita J. and Harwell J., "Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds", *Criti. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24, (1994), 325 - 370.
- 226.** Mohan P.K., Nakhla G. and Yunful E.K., "Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions", *Water Research*, 40, (2006), 533 - 540.
- 227.** Poremba K., Gunkel W., Lang S. and Wagner F., "Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganismes and comparison with synthetic surfactants", *Zeitschrift für Naturforschung*, 46, (1991a), 210 - 216.
- 228.** Poremba K., Gunkel W., Lang S. and Wagner F., "Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganismes", *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), (1991b), 157 - 163.
- 229.** Velikonja J. and Kosaric N., "Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York: Marcel Dekkar. *Biosurfactant: Production, properties and applications*, (1993). 419 - 449.
- 230.** Cirigliano M.C. and Carman G.M., "Purification and characterization of liposan a bioemulsifier from *Candida lipolytica*", *Applied and Environmental Microbiology*, 50, (1985), 846 - 850.
- 231.** Besson F., Peypoux F., Michel G. and Delcambe L., "Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*", *Journal of Antibiotics* 29 (10), (1976), 1043 - 1049.
- 232.** Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y., "Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *Harmful Algae*. 4, (2005), 433 - 443.
- 233.** Abalos A., Pinazo A., Infante M. R., Casals M., Garcia F. and Manresa A., "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes". *Langmuir*, 17 (5), (2001), 1367 - 1371.
- 234.** Panagoda G.J., Ellepola A.N. and Samaranayake L.P., "Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity", *Mycoses*, 44, (2001), 29 -35.

- 235.** Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L. and Whitman W.B., "Quantitative comparisons of 16Sr RNA genesequence libraries from environmental samples", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, (2001), 4374 - 4376.
- 236.** Pruthi V. and Cameotra S.S., "Rapid Identification of Biosurfactantproducing Bacterial Strains Using a Cell Surface Hydrophobicity Technique", *Biotechnology Techniques*, 11, (1997), 671 - 674.
- 237.** Neu T.R. and Poralla K., "Emulsifying Agent from Bacteria Isolated During Screening for Cells with Hydrophobic Surfaces", *Applied Microbiol Biotechnology*. 32, (1990), 521 - 525.
- 238.** Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. and McInerney M.J., "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms", *Journal Microbiological Methods*. 56, (2004), 339 - 347.
- 239.** Bernheimer A. W. and Avigad L. S., "Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*", *Journal of General Microbiology*. 61, (1970), 361 - 369.
- 240.** Moran A.C., Martinez M.A. and Sineriz F., "Quantification of Surfactin in Culture Supernatant by Hemolytic Activity", *Biotechnol Lett.* 24, (2002), 177 - 180.
- 241.** Johnson M.K. and Boese-Marrazzo D., "Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*", *Infect. Immun.* 29 (3), (1980), 1028 - 1033
- 242.** Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S.J. and Giulietti A.M., "Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria". *J. World Microbiol. Biotechnol.* 12, (1996), 82 - 84.
- 243.** Yonebayashi H., Yoshida S., Ono K. and Enomoto, H., "Screening of Microorganisms for Microbial Enhanced Oil Recovery Process", *Sekiyu Gakkaishi*. 43 (1), (2000), 59 - 69.
- 244.** Ilori O.M., Amobi C.J. and Odocha A.C., "Factors affecting the production of oil degrading *Aeromonas sp.* Isolated from a typical environment", *Chemosphere*, 61(7), (2005), 985 - 992.
- 245.** Raza Z. A., Rehman A. Khan M. S. and Khalid Z. M., "Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas Aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery waste", *Biodegradation*, 18 (1), (2007), 115 - 121.

- 246.** Mata-Sandoval J.C., Karns J. and Torrents A., "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipides by *Pseudomonas aeruginosa* UG2", *Microbiol. Res.*, 155, (2000), 1 - 8.
- 247.** Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M. A. and Guinea J., "Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T", *Biotechnology Letters* 11, (1989), 871 - 874.
- 248.** Desai, A.J., Patel R.M. and Desai J.D., "Advances in production of biosurfactants and their commercial applications", *J. Sci. Indus. Res.*, 53, (1994), 619 - 629.
- 249.** Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto and Khamis A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* Bacterium", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7, (1991a), 53 - 61.
- 250.** Lang S. and Wullbrandt D., "Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, (1999), 22 - 32.
- 251.** Gobbert U., Lang S. and Wagner F., "Sophorose lipid formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*", *Biotechnol. Lett.*, Vol. 6, (1984), 225 - 230.
- 252.** Powalla M., Lang S. and Wray V., "Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on *n*-alkanes", *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, (1989), 473 - 479.
- 253.** Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Salem A. and Kadri, M., "Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation", *Acta Biotechnologica* 11, (1991b), 315 - 324.
- 254.** www.sonatrach-dz.com/nos-activitees.html
- 255.** Hamdi H., Benzarti S., LManusadzianas L., Aoyama I. and Jedidi N., "Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions", *Soil Biology & Biochemistry* 39, (2007), 1926 - 1935.
- 256.** Imhoff-Stuckle D. and Pfenning N., "Isolation and characterisation of nicotinic aciddegrading sulfate reducing bacterium, *Desulfococcus niacini* sp. Nov", *Archives of Microbiology*. 136, (1983), 194 - 198.
- 257.** Bodour A. A. and Miller-Maier R. M., "Application of a Modified dropcollapsing Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-producing Microorganisms", *Journal of Microbiological Methods*. 32, (1998), 273 - 280.

- 258.** Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi Y. and Imanaka T., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38", *J. Bacteriol.*, 175, (1993), 6459-6466.
- 259.** Cooper D. G. and Goldenberg, B. G., "Surfaceactive agents from two *Bacillus* species", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, (1987), 224 - 229.
- 260.** Rosenberg M. and Gutnick D., "Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity", *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, (1980), 29 - 33.
- 261.** Sambrook J.E., Fritsh E.F. and Maniatis T., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual". Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory. (1989).
- 262.** Mnif S., Chamkha M. and Sayadi S., "Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100 a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline conditions". *J. Appl. Microbiol.*, 107, (2009), 785 - 794.
- 263.** Mata-Sandoval J. C., Karns J. and Torrents A., "High-performance liquid chromatography methods for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil", *Journal of Chromatography A*, 864, (1999), 211 – 220.
- 264.** Bradford M.M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 248 - 254.
- 265.** Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, 28, (1956), 350 - 356.
- 266.** APHA, "Standard methods for the examination of water and wastewater, eighteenth", ed. American Public Health Association, Washington, D C. (1992).
- 267.** Vollenbroich D., Pauli G., Zel M., and Vateri J., Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*", *Applied and environmental microbiology*, 63(1), (1997), 44 - 49.
- 268.** NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing", Twelfth International Supplement, Wayne, PA, M100 (S12), (2002).
- 269.** Zhu L.Z. and Feng S.L., "Water solubility enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed surfactant solutions", *Acta Sci. Circ.*, 22, (2002), 774 – 778.

- 270.** Hall, T.A., "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41: (1999), 95 - 98.
- 271.** Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, 25, (1997), 3389 - 3402.
- 272.** Benson D.A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Rapp B.A. and Wheeler D.L., "GenBank", *Nucleic Acids Res.*, 28, (2000), 15 - 18.
- 273.** Guet Gabriel, Mémento d'agriculture biologique : guide pratique à usage professionnel. Editions Agridécisions, Groupe France Agricole (2003).
- 274.** Stetter K.O., "Hyperthermophiles: Isolation, classification, and properties", In: K. Horikoshi and W.D. Grant (eds.) *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. (1998).
- 275.** Muller R., Antranikian G., Maloney S. and Sharp R., "Thermophilic degradation of environmental pollutants. In Biotechnology of Extremophiles" (Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology) Vol. 61, ed. Antranikian, G. (1998), 155 - 169.
- 276.** Bjedov I., Tenaillon O., Gerard B., Souza V., Denamur E., Radman M., Taddei F., and Matic, I., " Stress-induced mutagenesis in bacteria", *Science*, 300, (2003), 1404 – 1409.
- 277.** Hasanuzzaman M., Ueno A., Ito H., Ito Y., Yamamoto Y., and Yumoto I. and Okuyama H., "Degradation of Long-Chain n-Alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* Strain WatG", *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, (2007), 40 – 43.
- 278.** Kargi F. and Dincer A.R., "Use of Halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation". *Water Environ.*, 72, (2000), 170 - 174.
- 279.** Kushner D.J., "Life in high salt and solute concentrations". In: Kushner DJ (ed) *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London, (1978), 317 - 368.
- 280.** Grant W.D., Gemmell R.T., McGenity T.J., "Halophiles", In: Horikoshi K, Grant WD (eds) *Extremophiles: microbial life in extreme environments*. Wiley-Liss, New York, (1998), 93 – 132.

- 281.** Margesin R. and Schinner F., "Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, (2001), 650 - 663.
- 282.** Plohl K., Bricelj M. and Leskovšek H., "Biological degradation of motor oil in water", *Acta Chim. Slov.* 49, (2002), 279 - 289.
- 283.** Knezevich, V., O., Koren, E., Ron, Z. and Rosenberg, E., "Petroleum bioremediation in seawater using guano as the fertilizer", *Bioremediation J.*, 10, (2006), 83 - 91.
- 284.** Nikolopoulou M. and Kalogerakis N., "Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses", *Mar. Pollut. Bull.*, 56, (2008), 1855 - 1861.
- 285.** Stelmack P.L., Gray M.R., and Pickard M.A., "Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants", *Appl. Environ. Microbiol.* 65, (1999), 163 - 168.
- 286.** Lee K.K. and Yui K.C., "A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios", *Lett Appl Microbiol* 23, (1996), 343 - 346.
- 287.** Miller D.J. and Hawthorne S.B., "Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water", *Anal. Chem.* 70, (1998), 1618 - 1621.
- 288.** Lee K., Park J.W. and Ahn I. S., "Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7", *Journal of Hazardous Materials*, B105 (2003), 157-167.
- 289.** Morzik A., Piotrowska-Seget Z. and Labuzek S., "Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Pol. J. Environ. Stud.* 12 (2003) 15–25.
- 290.** Diab A. and Sandouka M., "Effect of Phytogenic Biosurfactant on the Microbial Community and on the Bioremediation of Highly Oil Polluted Desert Soil", *Journal of American Science*, 8(1), (2012), 544-550.
- 291.** Soberón-Chávez, G. and Maier, R.M., "Biosurfactants": a General Overview. In *Biosurfactants*; Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, (2011), 1 - 11.
- 292.** Brown M.J., "Biosurfactants for cosmetic applications", *International Journal of Cosmetic Science*, 13, (1991), 61 - 64.

- 293.** Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications", *Applied and Microbiological Biotechnology*, 58, (2002), 428 - 434.
- 294.** Luna J.M., Sarubbo L. and Campos-Takaki G.M., "A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery", *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol.52, n. 4, (2009), 785 - 793.
- 295.** Haddad N. I. A., Ji Wang and Bozhong Mu, "Identification of a Biosurfactant Producing Strain": *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein & Peptide Letters*, 16: (2009), 7 - 13.
- 296.** Cirigliano M.C. and Carman G.M., "Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*", *Applied and Environmental Microbiology*. 48, (1984), 747 - 750.
- 297.** Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennnd K.N., Kanko C., Ahibo C. and Casanova J., "Etude Chimique et Activite Antidiarrheique des Huiles Essentielles de Deux Plantes Aromatiques de la Pharmacopee Ivoirienne", *European Journal of Scientific Research*, Vol. 24 No.1, (2008), 94 -103
- 298.** Pankey G.A. and Sabath L.D., "Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections". *Clin Infect Dis*, 38, (2004), 864-870.
- 299.** Bechard J., Eastwell K.C., Sholberg P.L., Mazza G. and Skura B., "Isolation and par-tial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), 5355 - 5361.
- 300.** Yakimov M., Timmis K., Wray V. and Fredrickson, H., "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50", *Appl. Env. Microbiol.* 61, (1995), 1706 - 1713.
- 301.** Oberbremer A., Muller-Hurtig R. and Wagner F., "Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in soil population in a stirred reactor". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, (1990), 485 - 489.
- 302.** Urum K. and Pekdemir T., "Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing", *Chemosphere*. 57, (2004), 1139 - 1150.
- 303.** Lafrance P. and Lapointe M., "Mobilization and co-transport of pyrene in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants in sandy soil columns", *Ground Water Monitoring and Remediation*, 18, (4), (1998), 139 - 147.

- 304.** Infante M.R., Molinero J. and Erra P., "Lipopeptidic surfactants. II. Acidic and basic Na-lauroyl-L-arginine dipeptides from pure amino acids", *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 69(7), (1992), 647-652
- 305.** Infante M. R., Perez L., Pinazo A., Clapes P., Moran M. C., Angelet M., Garcia M. T. and Vinardell M.P., "Amino acid-based surfactants". *Comptes Rendus Chimie*. 7(6-7), (2004), 583 - 592.
- 306.** Offenberg J. H. and J. E. Baker, "Aerosol size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and over-water atmospheres. *Environmental Science & Technology* 33: (1999), 3324-3331.
- 307.** Williams J.D. and Burinsky D.J., "Mass spectrometric analysis of complex mixtures then and now: the impact of linking liquid chromatography and mass spectrometry", *International Journal of Mass Spectrometry*, 212, (2001), 111-133.
- 308.** Winker S. and Woese C.R., "A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics". *Syst Appl Microbiol*. 14, (1991), 305 - 310.
- 309.** Benson D. A., Mizrachi I. K., Lipman D. J., Ostell, J., Rapp B. A. and Wheeler D. L., "GenBank.Nucleic Acids Research", Vol 28, N°1, (2000), 15 - 18.
- 310.** Jukes, T.H. and Cantor, C.R., "Evolution of proteins molecules". In *Mammalian Protein Metabolism*, Vol. 3. ed. Munro, H.N., Academic Press, New York. (1969), 21 - 132

Annexe 1 : Propriétés physico-chimiques des HAP (Pf = point fusion, Pe = point d'ébullition) [44, 306]

HAP	Formule Chimique	Structure Chimique	Nbre de cycles	PM (g/mole)	Pf (°C)	Pe (°C)	Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/l)	P _L à 25°C (Pa)	Volatilité Constante de Henry	Log Koc	Hydrophobie Log Kow
Naphtalène	C ₁₀ H ₈		2	128,2	80	218	31,7	33	10 ⁻²	3,288	3,37
Acénaphtylène	C ₁₂ H ₈		2	152,2	96	279	3,93	4,14	2,1.10 ⁻³	4,008	4,07
Acénaphène	C ₁₂ H ₁₀		2	154,2	92	279	3,4	1,35	2,5.10 ⁻³	4,276	4,33
Fluorène	C ₁₃ H ₁₀		3	166,2	114	298	1,91	4,5.10 ⁻¹	4.10 ⁻⁴	5,305	4,18
Phénanthrène	C ₁₄ H ₁₀		3	178,2	101	338	1 – 1,3	9,8.10 ⁻²	4,5.10 ⁻³	4,409	4,46
Anthracène	C ₁₄ H ₁₀		3	178,2	215	340	0,05 – 0,07	5,2.10 ⁻²	4,3.10 ⁻³	4,399	4,5
Fluoranthène	C ₁₆ H ₁₀		4	202,3	107	384	0,2 - 0,26	8,0.10 ⁻³	4.10 ⁻⁴	5,305	4,9
Pyrène	C ₁₆ H ₁₀		4	202,3	151	396	0,077	4,9.10 ⁻³	5.10 ⁻⁴	5,294	4,88
Ben[a]anthracène	C ₁₈ H ₁₂		4	228,3	435	438	0,0094	3,2.10 ⁻⁴	0	5,593	5,63
Chrysène	C ₁₈ H ₁₂		4	228,3	258	441	0,0018	2,9.10 ⁻⁵	6.10 ⁻⁶	5,593	5,63
Benzo[b]fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂		5	252,3	167	487	0,0015	2,6.10 ⁻⁵	Nd	6,581	6,04
Benzo[k]fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂		5	252,3	217	481	0,00081	2,4.10 ⁻⁵	Nd	6,858	6,21
Benzo[a]pyrène	C ₂₀ H ₁₂		5	252,3	178	496	0,0038	1,3.10 ⁻⁵	0	6,035	6,06
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	C ₂₂ H ₁₂		6	276,3	164	505	0,00026	1,2.10 ⁻⁶	Nd	7,702	6,58
Benzo[g,h,i]pérylène	C ₂₂ H ₁₂		6	276,3	278	500	0,00026	7,9 10 ⁻⁷	0	7,260	6,78
Dibenzo[ah]anthracène	C ₂₂ H ₁₄		5	278,4	263	498	0,0006	1,1. 10 ⁻⁶	0	5,963	6,86

Annexe 2

1. Composition de la solution d'oligoéléments

Solution d'oligo-éléments

HCl, 35 %	6,7 ml
FeCl ₂ . 4H ₂ O	1500 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ . 4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ . 6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ . 2H ₂ O	2 mg
H ₂ O q.s.p	1000 ml

2. Phosphate-Buffered Saline (PBS)

Concentration et réactifs	Quantité
137 mM NaCl	8,0 g/l
2,7 mM KCl	0,2 g/l
10 mM Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,44 g/l
1,76 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g/l

3. Tryptic Soy Broth (TSB) , bouillon de soja tryptique

Dans un litre d'eau purifiée :

Bacto Tryptone (digestion pancréatique de caséine	17,0 g
Bacto Soytone (digestion peptique de semoule de soja)	3,0 g
Glucose (dextrose)	2,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate bipotassique d'hydrogène	2,5 g
pH = 7,3 ± 0,2	

4. Trypticase soy agar (TSA), Agar trypticase soja

Dans un litre d'eau :

Peptone de caséine	15,0 g
--------------------	--------

Peptone de soya	5,0 g
-----------------	-------

Chlorure de sodium	5,0 g
--------------------	-------

Gélose	15,0 g
--------	--------

pH 7,3 $\pm$ 0,2 à 25° C

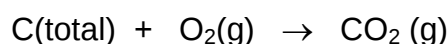
Annexe 3

APPAREILLAGE

1. COT-mètre : dosage du carbone

La matière organique dissous et particulaire, est composée notamment de carbone que l'on peut doser par l'emploi d'un **COT-mètre**. On distingue le carbone organique total (COT) et le carbone inorganique (CI) qui correspond aux carbonates. Le carbone total CT est la somme des deux.

L'analyse du carbone dans un échantillon solide s'effectue par combustion dans un four à 680°C à 900°C contenant un catalyseur (Pt). Le four est traversé par le flux d'oxygène qui permet la combustion de la totalité du carbone (CT) présent dans l'échantillon selon la réaction :



Le CO₂ gazeux obtenu est entraîné par le flux d'oxygène et amené jusqu'à une cellule infrarouge qui permet la mesure du taux de CO₂ directement proportionnel à la quantité de carbone total initial.

Pour la mesure du COT, l'échantillon est acidifié avec de l'acide chlorhydrique pour atteindre un pH inférieur à 2 et purgé avec du O₂ afin de transformer le carbone minéral (CIT) en CO₂ gazeux (décomposition des carbonates).

L'échantillon exempt de carbone minéral est ensuite analysé, la mesure de COT est réalisée. Le CIT = CT – COT

2. Spectrophotomètre UV/visible

La spectrophotométrie UV-visible permet de détecter des molécules qui absorbent dans l'UV et le visible. Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible concernent les molécules en solution; elles peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'intensité I traverse une solution de molécule absorbante, le faisceau transmis présente une

intensité I inférieure à I_0 , la relation entre les deux intensités est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 e^{-KCL}$$

I : intensité transmise

I_0 : intensité incidente

K : constante de proportionnalité

C : constante de la solution en soluté absorbable

L : épaisseur de la solution traversée par le flux lumineux

L'absorbance (A) ou densité optique se définit par : **$A = \text{Log}_{10} (I/I_0)$**

Le spectre UV-visible d'une molécule en solution se définit comme la variation de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (λ) de la lumière incidente. Un spectre est enregistré à partir d'une solution de concentration connue dans un solvant déterminé, disposé dans une cuve d'épaisseur calibrée. Une molécule pourra être caractérisée en spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible par la description de son spectre $A=f(\lambda)$.

Courbe d'étalonnage : elle consiste à préparer une série de dilutions d'une solution étalon (mère), à mesurer l'absorbance de chacune de ces solutions étalons (filles), puis à tracer la courbe d'étalonnage $A = f(c)$. L'absorbance de la solution à doser est mesurée dans les mêmes conditions, puis reportée sur la courbe d'étalonnage; on fait ainsi une détermination graphique de la concentration de la solution à doser.

3. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) :

Principe

Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement, c'est une méthode de séparation, des différents composés présents dans chaque fraction, basée sur le fait que le coefficient de partage d'un soluté entre deux phases dépend de la nature du soluté, la phase mobile est un gaz (le plus souvent H_2 ou He).

Appareillage

Un chromatographe est constitué de trois organes essentiels :

Injecteur : Le mélange à analyser est introduit dans le circuit gazeux par vaporisation dans une chambre d'injection. Sa température doit être supérieure à la température du produit le moins volatil.

Détecteur : Il permet de mettre en évidence le passage des différents gaz séparés par la colonne. Son principe est de brûler, dans une flamme d'hydrogène, l'effluent apporté par de l'azote (gaz vecteur). Sous l'effet d'un champ électrostatique, il se forme des ions de carbone de charge positive qui sont précipités sur une électrode où ils créent un courant d'ionisation que l'on amplifie grâce à un électromètre amplificateur.

Colonne : la colonne, placée dans un four à température programmable, est chauffée progressivement. Le gaz vecteur entraîne progressivement les molécules à séparer en fonction de leur taille et de leur polarité.

4. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Principe

La spectrométrie infrarouge (IR) s'utilise principalement pour l'analyse qualitative d'une molécule. Ainsi, Sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge, les liaisons moléculaires (C—H, C—OH, C=O, C=C, etc...) absorbent une partie de cette énergie et vibrent selon des mouvements de différents types (vibrations d'élongation ou de déformation). Au cours de l'analyse, un faisceau infrarouge passe à travers l'échantillon et a pour but d'exciter les molécules. Ces dernières vont vibrer en absorbant une partie de l'énergie de rayonnement, ce qui va se traduire par une augmentation de l'amplitude des vibrations. Cette amplitude va rapidement diminuer lorsque la molécule excitée va entrer en collision avec les molécules voisines qui sont elles beaucoup moins actives.

Pour une molécule donnée, les énergies de liaisons sont toutes quantifiées, c'est-à-dire que la molécule ne peut présenter que certains états de vibrations, de

rotations, ou électroniques. On obtient donc des bandes d'absorption caractéristiques des vibrations, et, en faisant défiler les longueurs d'onde, on obtient ainsi le spectre complet de toutes les vibrations du produit analysé. L'interprétation du spectre obtenu permet ainsi de reconstituer la molécule et donc d'identifier le produit.

Le domaine infrarouge, dans lequel se trouvent les énergies de vibration des liaisons moléculaires, est divisé en trois zones :

- proche infrarouge : $\lambda = 0,8 \text{ à } 2,5 \text{ mm}$ (ou $\nu = 4000 \text{ à } 12500 \text{ cm}^{-1}$)
- moyen infrarouge : $\lambda = 2,5 \text{ à } 25 \text{ mm}$ (ou $\nu = 400 \text{ à } 4000 \text{ cm}^{-1}$)
- lointain infrarouge : $\lambda = 25 \text{ à } 1000 \text{ mm}$ (ou $\nu = 10 \text{ à } 400 \text{ cm}^{-1}$).

La radiation pénètre à l'intérieur de l'échantillon, subit des effets de réflexion, réfraction, diffusion et absorption puis est réémise dans toutes les directions d'un espace hémisphérique. Les spectres d'absorption ont été réalisés dans le domaine du moyen infrarouge. Le spectre IR représente graphiquement, en fonction de la longueur d'onde, le rapport en chaque point des intensités transmises, avec et sans échantillon. Ce rapport, appelé transmittance T (%), peut être remplacé par l'absorbance, $A = \log(1/T)$,

5. Chromatographie en Phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS)

Principe : Le chromatographe est relié à un spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée (320°C). La phase mobile est un gaz (H_2 , He ou N_2) est éliminé par pompage. Les molécules, alors partiellement ou entièrement résolues par l'analyse chromatographique, sont amenées dans la source d'ionisation du spectromètre de masse grâce à la ligne de transfert.

Le spectromètre de masse est constitué d'une chambre d'ionisation dans laquelle des filaments génèrent un faisceau d'électrons de 70 eV. Ce faisceau va bombarder les molécules permettant en proportion variable soit uniquement leur ionisation ou bien leur fragmentation et ionisation. Les ions sont focalisés,

accélérés et passent dans l'analyseur du spectromètre de masse qui est un quadripôle.

Le quadripôle est formé de quatre barreaux sous tension. En y entrant, les ions ont un cheminement parallèle aux barreaux et une vitesse constante. Les ions sont soumis à des oscillations complexes, perpendiculaires à leurs trajets. Ils sont sélectionnés en fonction de leur rapport m/z . Pour chaque fragment ionique, il existe une oscillation stable qui permettra au fragment de passer au travers du quadripôle et être détecté par le multiplicateur d'électrons. Toutes les fréquences d'oscillation vont être balayées, permettant d'obtenir la répartition de tous les fragments formant appelée fragmentogramme qui est caractéristique d'une molécule donnée.

Appareillage

- Chromatographe : Agilent Technologie 6890N/5975
- Colonne HP-5 (5 % phenyl methyl siloxane) (longueur, 30 m ; diamètre interne, 0,25 cm ; épaisseur du film, 0,25 μm).
- Ordinateur Hewlett Packard.

Conditions opératoires

- Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml/min.
- La température de l'injecteur a été fixée à 250°C.
- Le programme du gradient de température est comme suit : 2 min à 70°C, puis la température augmente jusqu'atteindre 230°C à raison de 20°C/min. La température passe par la suite de 230 à 300°C pendant 2 min pour enfin se stabiliser à 300°C pendant 10 min.

6. Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS)

Parmi les méthodes plus récemment développées, l'HPLC couplée à un spectromètre de masse paraît intéressante pour l'identification et la quantification des composés organiques (protéines, enzymes, hydrocarbures, biosurfactants, etc.). Cette méthode combine les avantages de la séparation par chromatographie liquide (hautes sélectivité et efficacité de séparation) permettant l'analyse des

composés non volatiles et thermolabiles et ceux de la détection par spectrométrie de masse (informations structurales et sélectivité encore augmentée). LC-MS est une technique encore peu répandue, mais représente un outil très prometteur pour l'identification de composés organiques de masse molaire élevée dans une matrice environnementale très complexe [307].

La partie chromatographique est composée d'une pompe quaternaire basse pression, d'un four de colonne thermostaté et d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes. La colonne utilisée est de type C18. La phase mobile était un mélange eau-méthanol ou acétonitrile/eau. La détection par spectrométrie de masse est constituée d'un analyseur quadripolaire précédé d'une interface electrospray (ESI) fonctionnant en mode positif ou négatif. Le rôle d'ESI est donc la formation d'ions en phase gazeuse à partir de molécules en solutions en provenance de la LC.

Les mécanismes conduisant à la formation d'ions en phase gazeuse par electrospray peuvent être résumés comme suit: (a) la formation de gouttelettes chargées à partir de l'extrémité d'un capillaire métallisé, (b) l'évaporation du solvant et les explosions coulombiennes, (c) formation d'agrégats chargés, (d) et finalement obtention d'ions désolvatés en phase gazeuse (positifs, négatifs et adduits, en fonction du mode d'ionisation).

Le spectre de masse est représenté sous forme d'un diagramme bidimensionnel : le rapport masse/charge (m/z) est porté en abscisse et l'abondance des ions est portée en ordonnée. Notons ici que l'abondance indiquée est souvent relative, la hauteur des pics étant exprimée en pourcentage de celle du pic le plus intense (pic de base) trouvé dans le spectre de masse. Le signal de masse (à m/z) le plus intense du spectre (celui de la masse la plus élevée) et correspond à la masse moléculaire du composé. Par ailleurs, certains signaux d'ions filles pourraient être visibles.

Annexe 4

DOSAGE DES GLUCIDES TOTAUX [265]

Les glucides en milieu acide sulfurique et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combine facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 490 nm. La coloration est permanente. L'utilisation de cette méthode permet de détecter des quantités de glucides pouvant atteindre 1 µg.

Réactifs

- Solution aqueuse de phénol 5% (m/v)
- H₂SO₄ concentré
- Gamme étalon : solutions de monosaccharides : 200, 150, 100, 50 µg/ml.
- Solution de référence : eau distillée
- Solutions à doser 200, 250 µg/ml

Mode opératoire

Dans chaque tube à essai, introduire :

- 200µl d'eau distillée, ou de solution étalon ou de solution à doser (à l'aide d'une micropipette)
- 200µl de la solution phénolique 5%
- 1ml de H₂SO₄ concentré (à additionner brutalement)
- Homogénéiser le mélange en le portant au bain-marie à 100°C pendant 5mn
- Refroidir 30 mn à l'obscurité.

Mesure des DO : lire les densités optiques à la longueur d'onde = 490 nm

Calculer la quantité de glucides totaux dans la solution échantillon à l'aide du graphique standard.

Absorbance correspond à 0,1 ml de l'essai = X mg de glucose

100 ml de la solution échantillon contient : $\frac{X}{0,1} \cdot 100$ mg de glucose = % de glucides totaux

Annexe 5

IDENTIFICATION PHYLOGENETIQUE

Extraction de l'ADN génomique

La centrifugation d'une culture de volume de 10 ml est réalisée dans un tube flacon pendant 5 min à 12000 rpm. Le culot est dissous dans 487 µl du tampon Tris-EDTA (TE) et 40 µl de lysozyme à une concentration de 20 mg/ml (pour détruire les parois cellulaires). Après incubation pendant 1 heure à 37°C, on ajoute 30 µl de sodium dodecylsulfate (SDS) à une concentration de 10 % et 5 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Le mélange est incubé 1 h à 50°C. Par la suite, 100 µl NaCl (5 M) sont ajoutés avec 800 µl CTAB/NaCl (10 % de Cetyl Triméthyl Ammonium Bromide (CTAB) dans une solution NaCl 0,7 M). L'ensemble est mélangé en retournant le tube et incubé 10 min à 65°C.

Afin de séparer l'ADN des protéines, on ajoute 750 µl chloroforme/alcool isoamylique dans les proportions (24:1 (v/v)), on mélange vigoureusement et on centrifuge 5 min à 14000 rpm. Le surnageant obtenu est transféré dans un tube eppendoff propre et stérile en faisant attention de ne pas prendre l'interface blanche. L'ajout de 300 µl de phénol et de 300 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 (v/v)) est suivi d'une centrifugation 5 min à 14000 rpm et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Pour précipiter l'ADN, on ajoute 600 µl d'isopropanol froid et on incube les tubes dans de la glace pendant 30 min. Le culot obtenu après centrifugation 10 min à 14000 rpm, est rincé avec 500 µl d'éthanol à 70 %. Après avoir recentrifugé 10 min à 14000 rpm, le culot est séché sous vide pour enlever toute trace d'alcool.

Pour dégrader les ARNs, le culot obtenu est redissous dans 200 µl de tampon TE (Tris-EDTA) contenant 1 µl RNase (20 mg/ml) et le tube est incubé pendant 1 h à 37°C. Ensuite on rajoute 300 µl phénol + 300 µl chloroforme/alcool isoamylique, la solution est centrifugée pendant 5 min à 14000 rpm. Le surnageant obtenu est

précipité avec 600 µl d'isopropanol. Après incubation dans la glace pendant 30 min, une centrifugation pendant 10 min à 14000 rpm est réalisée. Le culot obtenu est dissous dans 20 µl d'eau stérile et l'ADN génomique extrait est conservé à -20°C.

Electrophorèse et quantification de l'ADN

Afin de visualiser l'ADN génomique extrait, on réalise l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (m/v) dans le tampon TAE 1X (4,84 g de Tris base, 1,14 ml d'acide acétique glacial et 0,74 g d'EDTA-Na₂ par litre d'eau) contenant 4 µl/25 ml de bromure d'ethidium (BET).

Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) du gène de l'ARN ribosomal 16 S

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant un grand nombre de fois grâce à une polymérase.

Les amorces nucléotidiques universelles Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ont été utilisées afin d'amplifier le gène de l'ARNr 16S et obtenir un produit PCR de taille approximative de 1,5 kb [308].

➤ **Appareillage** : Robocycler 96 Accessoires (Stratagene)

➤ **Mélange réactionnel**

ADN génomique: 2 µl, Tampon *Taq* DNA polymérase (10x): 5 µl, *Taq* DNA polymérase de type Fermentas : 0,5 µl (5 U / µl), MgCl₂.6 H₂O (25 mM): 3.5 µl, Amorce Fd1 (50 µM): 1 µl, Amorce Rd1 (50 µM): 1 µl, dNTPs: 0,5 µl (10 mM), H₂O distillée stérile, q.s.p 50 µl.

➤ **Cycles de PCR**

La réaction d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN génomique suivie par une succession d'étapes de dénaturation,

appariement et élongation, au cours desquelles le fragment d'intérêt est multiplié en un très grand nombre de fois sous l'action de la polymérase. Au cours de l'appariement, les amorces oligonucléotidiques Fd1 et Rd1 viennent se fixer spécifiquement au niveau des extrémités du gène codant pour l'ARNr 16S. La *Taq* DNA polymérase, en présence des quatre dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) va permettre une élongation des amorces fixées. La réaction est terminée par une dernière étape dont le but est de terminer toutes les élongations en cours. Le programme de la PCR est détaillé dans le tableau ci-dessous :

Tableau : Programme des cycles de PCR

Nombre de cycles	Etape	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	95	2 min
35	Dénaturation	95	30 s
	Hybridation	55	45 s
	Elongation	72	1 min 45 s
1	Etape finale d'élongation	72	5 min

Electrophorèse du produit de PCR

Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% afin d'estimer leurs tailles et leurs concentrations en comparant les bandes obtenues avec celles du marqueur de taille (Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder Bandes : 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 3500 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb et 10000 pb). A pH neutre, les fragments d'ADN sont chargés négativement et migrent vers l'anode. Le produit PCR est déposé sur le gel, puis soumis à l'action d'un champ électrique de 100 mV pendant 30 minutes. Grâce à la présence du Bromure d'Ethidium (BET), ce dernier s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence orange de

254 à 365 nm, les bandes de migration sont visualisées sous un rayonnement UV à l'aide d'un transilluminateur (Bioblock Scientific).

Séquençage

Pour déterminer la séquence du gène de l'ADN ribosomal 16S, nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS).

Les séquences obtenus dans cette étude et d'autres disponibles au GenBank [309] sont comparées pour une recherche de similarités, à l'aide du programme *BLASTN* [252]. Les séquences ayant une similarité supérieure à 97% à une séquence de souche type présent au GenBank sont considérées de même genre.

Les séquences obtenues sont importées dans un éditeur de séquence (BioEdit version 5.0.9). Les recherches de similitude entre la séquence d'ADNr 16S et une banque d'ADN (Gen Bank) se font par l'intermédiaire du programme BLAST disponible sur le site NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Une analyse de distance est effectuée en utilisant la méthode du Neighbor Joining, avec correction de Jukes et Cantor [310] et l'arbre phylogénétique est généré en utilisant le logiciel Mega.

Publications Internationales

- 1- **Kamel Eddouaouda**, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkha¹ and Sami Sayadi. (2011). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites. *Journal of Basic Microbiology*. 51, pp. 1 – 11.
- 2- Samira Ferhat, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, **Kamel Eddouaouda**, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, pp.1182 – 88.
- 3- **Eddouaouda K.**, Mnif S., Badis A., Ferhat S. and Sayadi S. (2012). Selection of powerful bacteria for hydrocarbons biodegradation from Algeria hydrocarbons contaminated soils (en preparation).

Communications Internationales

- 1- Eddouaouda K., Mnif S., Ferhat S., Badis A. et Sayadi S. (2009). Isolement et caractérisation de souches bactériennes capables de dégrader le pétrole brut isolées à partir de sols Algériens. *Poster. Les 8^{èmes} Journées Biotechnologiques de l'Association Tunisienne de Biotechnologie*. Sousse 20-23 Décembre 2009.Tunisie.
- 2- Eddouaouda K., Mnif S., Ferhat S., Badis A. et Sayadi S. (2010). Caractérisation d'une souche bactérienne thermophile isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut : Capacité de Biodégradation des Hydrocarbures et leurs dérivés. *Poster. Les Journées Internationales de Biotechnologie 2010* ; 19-22 Décembre 2010, Hammamet, Tunisie.

- 3- Ferhat S, Mnif S, Eddouaouda K, Alouaoui R, Badis A et Sayadi S. (2009). Synthèse et caractérisation de biosurfactants produits par *Pseudomonas* isolée localement. Les cinquièmes journées scientifiques de microbiologie (STM). 30,31 Octobre et 1^{er} Novembre, Hammamet. Tunisie.
- 4- Ferhat S, Mnif S, Eddouaouda K, Alouaoui R, Badis A et Sayadi S. (2010). Synthèse et caractérisation de biosurfactants produits par *Brevibacterium sp* isolée d'un sol anciennement contaminé. Journées internationales de biotechnologie. 19-22 Déc. 2010. Hammamet. Tunisie.