

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**UNIVESITE SAAD DAHLAB BLIDA 1**  
**Faculté de Technologie**  
**Département de Génie des Procédés**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER**  
**Spécialité : Génie de l'Environnement**



**Présenté par :**

**BENTEFTIFA Fadhila**  
**MESSAOUDI Nesrine**

**THEME**

**Production de Tensioactifs biologiques par des  
microorganismes isolés à partir de biotopes  
locaux : agents solubilisant de pétrole et  
hydrocarbures.**

**Soutenu publiquement le : 18 /07/2023**

**Devant les jurys :**

<b>EDDOUAOUDA Kamel</b>	<b>MCB, Université de Blida 1</b>	<b>Président</b>
<b>FERRADJI FATIMA ZOHRA</b>	<b>MCB, Université de Blida 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>BADIS Abdelmalek</b>	<b>Professeur, Université de Blida 1</b>	<b>Promoteur</b>
<b>HADJALA Soumia</b>	<b>Doctorante, Université de Blida 1</b>	<b>Co-promotrice</b>

**Année universitaire : 2022/2023**

## Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir aidé à réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions très chaleureusement notre promoteur Professeur **BADIS Abdelmalek** pour son expertise, son dévouement et sa patience tout au long de ce processus. Ses précieux conseils, ses suggestions avisées et sa disponibilité ont grandement enrichi notre travail et nous ont permis d'atteindre les objectifs qu'on était fixés.*

*Nous tenons à exprimer nos profondes gratitudee et nos reconnaissances envers notre Copromotrice : **Mme HADJALA Soumia** qui a joué un rôle essentiel dans ce mémoire. Nous tenons également à souligner sa disponibilité et son ouverture d'esprit, elle a toujours été là pour nous répondre à nos questions, discuter nos idées et nous orienter dans la bonne direction.*

*Nos sincères considérations et nos vifs remerciements vont également aux membres du jury **Mr EDDOUAOUA**, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury et **Mme FERRADJI**, pour avoir accepté d'examiner ce modeste mémoire de projet de fin d'études.*

*Nous tenons à remercier aussi tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué notre formation.*

*Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.*

## **Dédicaces**

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents,

Cette réalisation est aussi la vôtre, car vous avez été les architectes de ma réussite. Je suis honorée d'être votre enfant, et je dédie humblement ce mémoire à vous,

### **À mon très cher père,**

Mon épaule solide, mon pilier, mon guide et mon inspiration tout au long de ma vie. Ta présence constante et ton amour inconditionnel ont façonné la personne que je suis devenu aujourd'hui. Tu es mon héros, mon modèle et mon plus grand soutien.

### **À ma très chère mère,**

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

### **À mes chères sœurs Feyrouz, Ilham et Kenza,**

Chacune de vous a joué un rôle unique et spécial dans ma vie. Vous m'avez soutenu dans mes moments de doute, célébré mes succès et partagé mes joies et mes peines. Notre lien fraternel est précieux, et je suis reconnaissante de pouvoir compter sur vous à tout moment.

### **À mon cher beau-frère Housseem,**

Tu es bien plus qu'un mari pour ma sœur, tu es devenu un membre précieux de notre famille. Tes encouragements, ton soutien inconditionnel et ta bienveillance m'ont aidé à surmonter les obstacles et à persévérer dans mes études.

**À ma princesse Alaa,** ma source de joie et de bonheur.

### **À mon cher binôme et à toute sa famille,**

Pour leurs encouragements et pour tous les bons moments qu'on a vécus ensemble. J'espère que notre amitié durera éternellement.

### **À toute ma famille sans exception,**

**À tous mes ami(e)s.**

***NESRINE***

## **Dédicaces**

Je dédie ce modeste travail à mes parents :

**À mon très cher père,**

Tu as été un modèle d'inspiration pour moi, toujours prêt à me guider et à me soutenir dans tous mes projets. Ta sagesse, ta persévérance et ton amour inconditionnel ont été les fondements de ma réussite.

**À ma très chère mère,**

Chaque jour, tu as été là pour me soutenir, me guider et m'encourager. Tu as toujours cru en moi, même lorsque j'avais des doutes. Tes paroles d'encouragement et ton amour inconditionnel ont été ma bouée de sauvetage dans les moments difficiles.

**À mes chers frères Islem et Oussama,**

Vos encouragements, vos conseils avisés et votre soutien indéfectible ont été essentiels dans ma réussite. Nous avons parcouru ce chemin ensemble, et votre présence a été un moteur puissant qui m'a poussé à me surpasser. Cette réussite est également la vôtre, car vous avez toujours cru en moi et m'avez inspiré à donner le meilleur de moi-même.

**À mes belles-sœurs Linda et Nacéra,**

Je suis reconnaissante de vous avoir comme membres de ma famille et de pouvoir partager cette réussite avec vous.

**À mes chers neveux/nièces Lydia, Malak, Wassim et Abd errahmane**

Que cette dédicace vous rappelle combien vous êtes aimés et appréciés. Continuez à cultiver votre curiosité, Je suis impatiente de voir les merveilles que vous accomplirez dans la vie.

**A mon binôme et sœur non biologique,**

On a une complicité profonde et un soutien solide. Main dans la main, l'aventure se déclenche, ensemble, nous atteignons les sommets, que dieu nous garde l'une à l'autre pour toujours

**A tous mes ami(e)s**

**Et**

**A toute ma famille.**

*Fadhila*

## ملخص

قمنا في عملنا بإجراء دراسة لإنتاج مولد سطحي حيوي مع قوة محرك مرتفعة من النفط و الهيدروكربونات الملوثة للتربة، وهذا الجزيء الحيوي مستمد من سلالة بكتيرية معزولة من الرواسب البحرية الملوثة بالهيدروكربونات ( ميناء الصيدخيمستي، ولاية تيبازا). يستخدم زيت الزيتون و نترات الأمونيوم كمصدر وحيد للكربون والنيتروجين على التوالي في الأيروبيو سس وتحت الهياج في الوضع الدفعي عند درجة 30 مئوية. (ديسمبر 2018) بارامترات تقييم إنتاج المواد الكيميائية السطحية (E24%) ومؤشر الاستحلاب (TS) والتوتر السطحي، (PDD) هي: قطر إزاحة النفط BS7 الحيوية

75% E24 = و TS = 28.36 mN/m، سم 8 DDP = النتائج التي تم الحصول عليها بعد ثلاثة أيام من الحضانه هي أستعدنا عامل السطح الحيوي بطريقتين الأولى هي الترسيب الحمضي يليها إستخراج السائل بواسطة أسيتات الإيثيل، والثاني G.L- هي ترسيب الإيثانول البارد، حصلنا على عامل السطح الحيوي الخام الذي يتميز بمرودود إستخراج يعادل 1 G.L- و 1.2

BS7 على التوالي من طريقتين للإستخراج. لقد ميزنا عامل السطح الحيوي 1 والحزم المراقبة وقم تشير إلى طبيعة الجليكوليبيد ل (FTIR) لدينا بواسطة مطيافية تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء BS7.

BS7 الخطوة الأساسية في عملنا هي دمج مولد السطح الحيوي في تطبيق بيئي، وتحديدًا في إعادة تعبئة الزيت الملوثة للأرض، وقد تم العمل والنتائج واعدة من الدراسة الأولية مع إزالة 86 من زيت المحرك الملوثة للرمال مقارنة مع الماء المقطر الذي أزال 30.34% فقط من الملوثة. ووفقًا لهذه النتائج الملحوظة، تم تطبيق عامل السطح الحيوي الخام على تربة صحراوية في منطقة حاسي مسعود ملوثة فعلا بالهيدروكربونات، وتظهر نتائج إختبار ثلاثي فوسفات الأكسجين على التربة المعالجة إعادة بناء البترول الذي تم تحديده من خلال اهتزازات روابط C-

أكدت GC/GC لمجموعات الميثيلين والميثيلين، مع القياس الكمي بواسطة كروماتوغرافيا الغاز المصاحبة لطيف الكتلة H S7 النتائج السابقة وأن معامل السطح الحيوي للسلالة MS أظهر كفاءة إعادة تعبئة الهيدروكربونات 1.3 مرة أكبر من عامل السطح الكيميائي (بين 80). وفي هذا الصدد، فإن استخدام من مركبات السطح الحيوي في المجال البيئي يبشر بالخير بالتأكيد S7 المادة

الكلمات المفتاحية: خافضات التوتر السطحي الحيوية- الإنتاج- إعادة التعبئة- البترول- التوصيف

## Abstract

In our work, we conducted a study to produce a biosurfactant with a hyper power of solubilization of oil and hydrocarbons contaminating the soil, this biomolecule was derived from a bacterial strain isolated from a marine sediment contaminated by hydrocarbons (fishing port of Khemisti, wilaya of Tipaza). Olive oil and ammonium nitrate are used as the sole source of carbon and nitrogen respectively for production in aerobiosis and under agitation in batch mode at 30°C. The BS7 biosurfactant production evaluation parameters are : oil displacement diameter (PDD), surface tension (TS) and emulsification index (E24%). The results obtained after three days of incubation are : a DDP = 8 cm, a TS = 28.36 mN/m and an E24 = 75%. We recovered the biosurfactant by two methods one is acid precipitation followed by liquid-liquid extraction by ethyl acetate and the other is cold ethanol precipitation, we obtained crude biosurfactant characterized by an extraction yield equal to 1g.L-1 and 1.2g.L-1 respectively from two extraction methods. We characterized our biosurfactant BS7 by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, the observed bands and peaks suggested the glycolipid nature of BS7.

The essential step in our work is the incorporation of biosurfactant BS7 in an environmental application, precisely in the remobilization of oil contaminating the ground, the work has been done and the results are promising from the preliminary study with an elimination of 86% engine oil contaminating the sand compared to distilled water which only removed 30.34% of the contaminant. According to these remarkable results, the crude biosurfactant was applied to a Saharan soil in the Hassi Messaoud region actually contaminated by hydrocarbons, the results of FTIR on the treated soil show a remobilization of petroleum identified by the vibrations of the C-H bonds of the groups methylenes and methyls, quantification by gas chromatography coupled mass spectrometer GC/MS confirmed the previous results and that the biosurfactant of strain S7 showed a remobilization efficiency of hydrocarbons 1.3 times greater than the chemical surfactant (Tween 80). In this respect, the use of S7 biosurfactant in the environmental field is certainly promising.

Keywords: Biosurfactants – Production – Remobilization – petroleum – Characterization

## Résumé

Dans notre travail, nous avons mené une étude pour produire un biosurfactant avec un hyper pouvoir de solubilisation de pétrole et hydrocarbures contaminant les sols, cette biomolécule a été issue d'une souche bactérienne isolée à partir d'un sédiment marin contaminé par les hydrocarbures (port de pêche de Khemisti, wilaya de Tipaza). L'huile d'olive et le nitrate d'ammonium sont utilisés comme seule source de carbone et d'azote, respectivement pour la production en aérobiose et sous agitation en mode batch à 30 °C. Les paramètres d'évaluation de production de biosurfactant BS7 sont : le diamètre du déplacement de pétrole (DDP), la tension superficielle (TS) et l'indice d'émulsification (E24%). Les résultats obtenus après trois jours d'incubation sont : un DDP = 8 cm, un TS = 28.36 mN/m et un E24 = 75%. Nous avons récupéré le biosurfactant par deux méthodes, la première est la précipitation d'acide suivie d'une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et la deuxième est la précipitation par l'éthanol à froid, nous avons obtenu un biosurfactant brut caractérisé par un rendement d'extraction égale à 1 g.L<sup>-1</sup> et 1.2 g.L<sup>-1</sup>, respectivement, de deux méthodes d'extraction. Nous avons caractérisé notre biosurfactant BS7 par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR), les bandes et les pics observés ont suggéré la nature glycolipidique de BS7.

L'étape primordiale dans notre travail est l'incorporation de biosurfactant BS7 dans une application environnementale, précisément dans la remobilisation de pétrole contaminant le sol, le travail a été fait et les résultats sont prometteuses dès l'étude préliminaire avec une élimination de 86% d'huile de moteur contaminant le sable en comparaison avec l'eau distillée qui n'a éliminé que 30.34 % de contaminant. D'après ces remarquables résultats on a appliqué le biosurfactant brut sur un sol saharien de la région de Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures réellement, les résultats de FTIR sur le sol traité montrent une remobilisation de pétrole identifiés par les vibrations des liaisons C-H des groupements méthylènes et méthyles, la quantification par chromatographie gazeuse couplée spectromètre de masse GC/MS a confirmé les résultats précédents et que le biosurfactant de la souche S7 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 S7 dans le domaine environnemental est certainement prometteuse.

Mots clés : Biosurfactants – Production – Remobilisation – Pétrole – Caractérisation

## **Liste des figures**

### **CHAPITRE I :**

Figure I.1:	processus influençant le devenir des polluants dans le sol.....	07
Figure I.2:	Formation et migration du pétrole.....	10

### **CHAPITRE II :**

Figure II.1:	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.....	22
Figure II.2:	Structure de la surfactine lipopeptidique cyclique produite par <i>Bacillus subtilis</i> .....	23
Figure II.3:	Structure de Rhamnolipide, Sophorolipide .....	23
Figure II.4:	Structure de Tréhalolipide et Mannosylérythritol .....	25
Figure II.5:	Structure de la phosphatidyléthanolamine .....	25
Figure II.6:	Structure de l'émulsifiant.....	26
Figure II.7:	Principaux micro-organismes producteurs de biosurfactants.....	27

### **Matériel et méthodes :**

Figure I.1:	Méthode d'analyse microbiologique.....	46
Figure II.1:	Test de la dispersion du pétrole.....	49
Figure II.2:	Teste d'indice d'émulsification (E24%) .....	50

### **Résultats et Discussions**

Figure I.1:	Composition granulométrique du sol étudié.....	58
Figure I.2:	Triangle Textural.....	59
Figure II.1:	Dilution Micellaire Critique (CMD).....	66
Figure II.2:	Concentration Micellaire critique (CMC).....	66
Figure II.3:	Caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR.....	67
Figure II.5 :	Comparaison de la solubilité du pétrole brut en présence de surfactant biologique (issu de la souche S7) et chimique (Tween 80).....	70

## **Liste des tableaux**

### **Synthese bibliographique**

Tableau I.1:	Typologie simplifiée des principaux agents de contamination .....	09
Tableau I.2:	Synthèse de travaux sur la biostimulation de sols pollués par les hydrocarbures.....	17
Tableau I.3:	Synthèse de travaux sur la bioaugmentation de sols pollués aux hydrocarbures.....	18
Tableau II.1:	Biosurfactants produits par les micro-organismes.....	28
Tableau II.2:	Déchets valorisés et exploités pour la production des biosurfactants.....	32
Tableau II.3:	Les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants.....	35

### **Matériel et méthodes**

Tableau II.1:	Composition chimique des milieux de cultures.....	47
Tablea II.2:	Les méthodes d'extraction de biosurfactant utilisées.....	51
Tableau II.3:	Les étapes d'élimination d'huile de moteur du sable contaminé sur colonne par le BS7..	54
Tableau II.4:	Les différentes étapes de remobilisation des hydrocarbures du sol par le BS7.....	55

### **Resultats et discussions :**

Tableau I.1:	Les résultats des différents paramètres physico-chimiques.....	59
Tableau I.2:	Paramètres de pollution de sol contaminate étudiée.....	60
Tableau II.1:	TS, DDP et E24 de la production de biosurfactant .....	62

## **Liste des photos**

### **Matériels et méthodes**

Photo I.1:	Spectrophotomètre type sens ION+ pH31.....	43
Photo II.2.a:	Milieu de culture de Production de biosurfactant de la souche S7 avant incubation.....	48
Photo II.2.b:	Culture de production de biosurfactant de la souche S7 après la période d'incubation....	48
Photo II.3:	Mesure de la tension de surface à l'aide d'un tensiomètre.....	49
Photo II.4:	Centrifugation de culture de production de biosurfactant BS7.....	50
Photo II.5:	Filtration avec deux méthodes.....	50
Photo II.6:	Extraction avec l'acétate d'éthyle.....	52

### **Résultats et discussions**

Photo I.1:	Une nappe de microflore	61
Photo II.1:	Résultat de test E24 de la souche S7 avec le kérosène (62.5%).....	62
Photo II.2:	Résultat de test E24 de la souche S7 avec l'huile d'olive (75%).....	62
Photo II.3:	Déplacement de Pétrole de la souche S7 (80mm).....	62
Photo II.4:	Production de biosurfactant par la souche S7 après 72h d'incubation.....	64
Photo II.5:	Témoin chimique (MM et HO) après 72h d'incubation.....	64
Photo II.6:	Biosurfactant brute de la souche S7 .....	64
Photo II.7:	Avant /après extraction de BS7 avec l'éthanol à froid.....	64
Photo II.8:	Précipité de biosurfactant après 24H.....	65

## Liste des abréviations

<b>API :</b>	American Petroleum Institute
<b>BS :</b>	Biosurfactant
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur Couche Mince
<b>CE :</b>	Conductivité Electrique
<b>CET :</b>	Centre d'enfouissement technique
<b>CLP :</b>	Lipopeptides Cycliques
<b>CMC :</b>	Concentration Micellaire Critique
<b>DBO5 :</b>	Demande Biologique en Oxygène de 5 jours
<b>DCO :</b>	Demande Chimique en Oxygène
<b>DDP :</b>	Déplacement de pétrole
<b>E24% :</b>	Indice d'émulsification des 24 Heures
<b>GC/MS :</b>	Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse
<b>HAP :</b>	Hydrocarbures Aromatique Polycycliques
<b>HO :</b>	Huile d'Olive
<b>IRTF :</b>	Infrarouge a Transformée de Fourier
<b>LB :</b>	Luria Bertani
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharides
<b>LC-MS :</b>	Chromatographie en phase Liquide couplée Spectromètre de Masse
<b>MM :</b>	Milieu Minimum
<b>MO :</b>	Matière Organique
<b>TS :</b>	Tension superficielle

## Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>17</b>
<b>I.1 Les caractéristiques physiques du sol saharien : .....</b>	<b>19</b>
<b>I.2 Structure et nature du sol : .....</b>	<b>20</b>
<b>I.3 Pollution du sol : .....</b>	<b>20</b>
<b>I.3.1 Définition des sites pollués : .....</b>	<b>21</b>
<b>I.3.2 Polluants du sol : .....</b>	<b>21</b>
<b>I.4 Pollution du sol par les hydrocarbures : .....</b>	<b>21</b>
<b>I.4.1 Comportement des hydrocarbures dans le sol : .....</b>	<b>22</b>
<b>I.4.2. Sources de pollution des sols par les hydrocarbures : .....</b>	<b>23</b>
<b>I.5. Le pétrole brut : .....</b>	<b>25</b>
<b>I.5.1. Classification du pétrole brut : .....</b>	<b>25</b>
<b>I.5.2 Les propriétés physiques du pétrole : .....</b>	<b>27</b>
<b>I.5.3 Les propriétés chimiques du pétrole : .....</b>	<b>27</b>
<b>I.6 Impacts des hydrocarbures : .....</b>	<b>28</b>
<b>I.6.1. Impacts sur les propriétés physiques du sol : .....</b>	<b>28</b>
<b>I.6.2. Impacts sur les propriétés chimiques du sol : .....</b>	<b>28</b>
<b>I.7. Décontamination des sols pollués aux hydrocarbures : .....</b>	<b>29</b>
<b>I.7.1. Procédés physiques : .....</b>	<b>29</b>
<b>I.7.2. Procédés chimiques.....</b>	<b>30</b>
<b>I.7.3 Procèdes thermiques : .....</b>	<b>30</b>
<b>I.7.4 Procèdes biologiques : .....</b>	<b>30</b>
<b>I.7.5 Techniques de bioremédiation : .....</b>	<b>31</b>
<b>I.8. Remédiation des sols pollués par les HAP à l'aide de biosurfactants .....</b>	<b>34</b>
<b>II.1. Généralité sur les biosurfactants .....</b>	<b>35</b>
<b>II.2 Classification des biosurfactants : .....</b>	<b>36</b>
<b>II.2. 1 Les Lipopeptides : .....</b>	<b>36</b>
<b>II.2.2 Les Glycolipides : .....</b>	<b>36</b>
<b>II.2.3 Les Rhamnolipides : .....</b>	<b>37</b>
<b>II.2.4 Les Sophorolipides : .....</b>	<b>37</b>
<b>II.3 Les Trehalolipides : .....</b>	<b>37</b>
<b>II.4 Les Mannosylérythritolipides : .....</b>	<b>37</b>
<b>II.5 Les Phospholipides : .....</b>	<b>38</b>
<b>II.6 Les lipopolysaccharides ou polymériques : .....</b>	<b>38</b>

II.7 Les acides gras et lipides neutres :.....	39
<b>II.3 Origine Des Biosurfactants.....</b>	<b>39</b>
<b>II.4. Avantages des biosurfactants :.....</b>	<b>43</b>
<b>II.5 Production et récupération de biosurfactants :.....</b>	<b>44</b>
II.5.1 Production des biosurfactants :.....	44
II.5.2 Production de biosurfactants à partir des sous-produits :.....	44
<b>II.5.3 Facteurs influençant la production des biosurfactants : .....</b>	<b>46</b>
<b>II.6 Récupération des biosurfactants : .....</b>	<b>47</b>
<b>II.7 Rôle des biosurfactants :.....</b>	<b>48</b>
<b>II.8 Caractérisation des biosurfactants :.....</b>	<b>49</b>
II.8.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	49
II.8.2 Caractérisation par Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse (GC/MS) : .....	49
II.8.3 Caractérisation par (LC–MS/MS) :.....	50
II.8.4 Identification par spectrométrie de masse type MALDI/TOF :.....	50
II.8.5 Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) : .....	50
<b>II.9 Applications des biosurfactant : .....</b>	<b>50</b>
II.9.1. Environnemental .....	51
II.9.2 Industrie cosmétique .....	51
II.9.3 Agriculture.....	52
II.9.4 Industries alimentaires.....	52
II.9.5 Biomédical.....	53
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>54</b>
<b>Conditions du travail .....</b>	<b>55</b>
<b>I. Méthodologie de travail :.....</b>	<b>55</b>
I.1. Prélèvement des échantillons :.....	55
I.2. Analyses physico-chimiques du sol :.....	55
I.2.3 Analyses chimiques :.....	56
<b>I.3 Analyses microbiologiques du sol : .....</b>	<b>58</b>
<b>II. Production de biosurfactant : .....</b>	<b>60</b>
<b>II.1 Préparation de la préculture :.....</b>	<b>60</b>
<b>II.2 Production de biosurfactant : .....</b>	<b>61</b>
<b>II.3 Evaluation de la production de biosurfactant :.....</b>	<b>61</b>
<b>II.4 Récupération de biosurfactant : .....</b>	<b>63</b>

II.4.1 Centrifugation :.....	63
II.5.2 Filtration :.....	63
II.5.3 Acidification :.....	64
II.5.4 Extraction :.....	64
II.5.5 Rendement d'extraction .....	66
<b>II.6 Dilution Micellaire Critique (CMD).....</b>	<b>66</b>
<b>II.7 Concentration Micellaire critique (CMC) .....</b>	<b>66</b>
<b>II.8 Caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR.....</b>	<b>66</b>
<b>II.9 Essai de l'application de biosurfactant dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable (sol synthétique) sur colonne .....</b>	<b>66</b>
<b>II.10. Remobilisation des hydrocarbures contaminant le sol à l'aide de biosurfactant BS7 (sol réel) .....</b>	<b>69</b>
<b>I.2 Analyses physico-chimiques : .....</b>	<b>73</b>
I.3 Analyses chimiques :.....	74
I.4 Analyses microbiologiques du sol :.....	75
<b>II.1 Evaluation de la Production de Biosurfactant : .....</b>	<b>75</b>
<b>II.2 Production de Biosurfactant .....</b>	<b>77</b>
<b>II.3 Extraction de biosurfactant : .....</b>	<b>78</b>
II.3.1 Extraction par Acétate d'éthyle :.....	78
II.3.2 Extraction par éthanol .....	79
<b>II.7 Dilution Micellaire Critique (CMD).....</b>	<b>79</b>
<b>II.8 Concentration Micellaire critique (CMC) .....</b>	<b>80</b>
<b>II.9 Résultat de caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR : .....</b>	<b>81</b>
<b>II.10 Résultat de l'application de biosurfactants dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable (sol synthétique) sur colonne : .....</b>	<b>82</b>
<b>II.11 Remobilisation des hydrocarbures contaminant le sol à l'aide de biosurfactant BS7 :.....</b>	<b>83</b>
II.11.2 Quantification des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse : .....	85
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>86</b>

Référence

Annexes

## INTRODUCTION GENERALE

Au cours des dernières décennies, les chercheurs se sont fortement intéressés aux biosurfactants qui sont des agents tensioactifs produits par des microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures. Ces substances, également appelées tensioactifs biologiques, présentent des propriétés similaires à celles de leurs homologues chimiques, mais avec l'avantage d'être non toxiques, biodégradables et plus stable [1].

La production de biosurfactants se fait principalement à partir de bactéries isolées dans différents environnements comme le sol, l'eau, les sédiments marins et les champs pétroliers. Les microorganismes y compris les bactéries marines sont bien connus pour leurs propriétés métaboliques et fonctionnelles uniques ; cependant, plusieurs rapports scientifiques sont disponibles à ce jour concernant leurs potentiels de productions de biosurfactants [2].

Ces biomolécules peuvent être obtenues à partir de divers substrats, ce qui leur confère des structures chimiques variées, leurs propriétés essentielles résident dans leur capacité à s'adsorber aux interfaces, ce qui favorise la dispersion et le mouillage ; de plus, ils réduisent la tension superficielle et forment des micelles, ce qui les rend efficaces pour la solubilisation et la microémulsification.

Les biosurfactants occupent une place importante au sein de la biotechnologie, ils ont un large éventail d'application dans diverses industries : pétrolière, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, de la détergence, du textile, de la peinture, des mines et de la nanotechnologie [3]. Actuellement, l'industrie pétrolière est le principal marché pour les biosurfactants, notamment pour la récupération des résidus pétroliers, le nettoyage des déversements de pétrole et la restauration des sols et des eaux contaminées par les hydrocarbures. Les biosurfactants jouent un rôle clé dans la dispersion des huiles et hydrocarbures en cas de pollution, ce qui facilite leur élimination et rendre leur biodégradation plus rapide et plus efficace.

L'objectif principal de notre travail est de produire un biosurfactant à fort potentiel de solubilisation en utilisant une souche bactérienne isolée localement, hyperproductrice de biosurfactant ; par la suite une application sera envisagée pour remobiliser les hydrocarbures présents dans un sol Saharien des zones pétrolières dans le sud Algérien. Cette approche vise à améliorer l'efficacité de l'élimination les hydrocarbures et à promouvoir la bioremédiation de manière durable, en particulier dans la région de Hassi Messaoud fortement polluée.

Ce mémoire de fin d'études est divisé en deux parties. La première est réservée pour une synthèse bibliographique sur la pollution des sols, les biosurfactants et leurs applications dans différents domaines. La deuxième partie présente le matériel, les méthodes utilisées et les résultats obtenus de production de biosurfactant et leur incorporation dans la remobilisation de pétrole, et nous avons finalisé le mémoire par une conclusion et des perspectives clôturant ce travail de la recherche appliquée.

# **Synthèse bibliographique**

## **Introduction**

La contamination des sols par les hydrocarbures cause d'importants problèmes écologiques et sociaux [4]. Elle est majoritairement localisée [5]. La connaissance de ces contaminants et de leur comportement dans le sol est essentielle à l'élaboration de stratégies d'assainissement et de dépollution.

### **I. Le sol : Système polyphasique :**

Le sol peut être défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre, qui est constituée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Du point de vue de la pédologie, le sol représente la partie des formations naturelles superficielles qui subit des processus pédologiques et des changements dans sa composition chimique et sa constitution minéralogique. Le sol est le résultat de l'évolution de la roche mère sous-jacente, transformée en surface par différents facteurs tels que le climat, la nature de la roche et l'activité biologique [6].

Le sol est un système complexe et hétérogène. Il se compose d'une phase solide, qui comprend les particules du sol, d'une phase liquide, représentée par l'eau du sol (pouvant contenir de nombreux composés et particules), et d'une phase gazeuse, constituée de l'air emprisonné dans le sol [6].

Les deux fractions qui jouent un rôle principal dans la sorption des HAP sont :

**La fraction minérale du sol :** est principalement constituée de minéraux primaires tels que le quartz, les feldspaths et les micas, ainsi que de minéraux secondaires, d'oxydes métalliques et d'argiles [7]. En général, cette fraction joue un rôle négligeable dans la sorption des HAP, sauf lorsque la teneur en carbone organique du sol est faible [8].

**La fraction organique du sol :** est principalement composée de cellulose, d'hémicellulose, de lignine et de tanins, qui proviennent principalement de la décomposition de la matière organique. Cette matière organique (MO) contient également de petites quantités de protéines, de fragments d'hydrates de carbone, ainsi que des composés aminés, phénoliques ou aromatiques produits par l'activité biologique [9]. D'autres types de molécules, comme les acides gras, peuvent également être présents dans la matière organique du sol, étant incorporés dans la matrice organique par estérification [10].

#### **I.1 Les caractéristiques physiques du sol saharien :**

Le sol saharien présente des caractéristiques physiques distinctives en raison de son environnement aride et désertique. Voici quelques caractéristiques physiques couramment observées :

- **Texture** : Les sols sahariens sont généralement caractérisés par une texture sableuse à très sableuse en raison de la prédominance de particules de sable. Cela est dû à l'érosion éolienne qui transporte et dépose les particules de sable sur de vastes étendues [11].
- **Drainage** : Les sols sahariens ont tendance à avoir un drainage rapide en raison de leur faible capacité de rétention d'eau. La faible pluviométrie et l'évaporation élevée dans les régions désertiques entraînent un drainage rapide de l'eau dans les profondeurs du sol [12]
- **Profondeur** : La profondeur des sols sahariens est souvent limitée en raison de l'accumulation de sable et de la présence de couches dures ou de roches sous-jacentes. Cela peut limiter la pénétration des racines des plantes et la disponibilité des nutriments [13]
- **pH** : Les sols sahariens ont souvent un pH élevé, généralement alcalin, en raison de la présence de sels minéraux tels que le carbonate de calcium. Cela peut influencer la disponibilité des nutriments et la croissance des plantes [14].

## I.2 Structure et nature du sol :

Il est crucial de comprendre la composition et les caractéristiques d'un sol donné afin d'appliquer des bioprocédés appropriés [15].

Chaque sol possède des facteurs spécifiques tels que la taille des pores, ainsi que les propriétés de l'eau et de l'air à l'intérieur de ces pores [16].

Les particules élémentaires du sol sont généralement liées les unes aux autres par des forces électrostatiques, formant des agrégats de différentes tailles qui sont regroupés en unités structurales du sol. Ces agrégats ont tendance à réduire indirectement l'activité microbienne dans le sol en ralentissant la diffusion de l'oxygène et des nutriments à l'intérieur de l'unité structurale, et en offrant une protection mécanique aux substrats qu'ils renferment [16].

## I.3 Pollution du sol :

La pollution du sol est un problème environnemental majeur causé par l'introduction de substances nocives dans le sol, provenant de diverses sources telles que l'industrie, l'agriculture intensive, les décharges de déchets et les déversements accidentels. [17].

Cela peut entraîner une contamination étendue et durable, compromettant la productivité des sols agricoles, la qualité de l'eau potable et la santé des écosystèmes terrestres et aquatiques. [18] [19].

La remédiation des sols pollués est complexe et nécessite des méthodes adaptées aux caractéristiques spécifiques du sol et des polluants présents. [20].

Des réglementations strictes et des pratiques de gestion durables sont essentielles pour prévenir la pollution du sol et réduire son impact. [21]. Les hydrocarbures sont l'une des formes de pollution les plus courantes dans les sols. Ils proviennent généralement de sources

telles que les déversements d'huiles et de carburants, les activités industrielles ou les accidents impliquant des produits pétroliers. Les hydrocarbures peuvent être présents sous forme de liquides, de gaz ou de solides, et ils peuvent avoir des impacts significatifs sur l'environnement et la santé humaine.[22].

### **I.3.1 Définition des sites pollués :**

Un site contaminé (pollués) est un lieu où on trouve l'accumulation de déchets anciens ou de l'infiltration de polluants, provoque une pollution susceptible d'entraîner des dommages ou un danger permanent pour les personnes ou l'environnement. Dans ces endroits, la pollution est concentrée, c'est-à-dire. Concentration souvent élevée sur une petite surface. Ceci est différent du chargement diffus, comme les pratiques agricoles ou les dépôts atmosphériques. [23].

On parle de zone contaminée si la contamination est localisée et de sol contaminé si la contamination s'étend sur plusieurs kilomètres [23]. Après Suter et al.(2000), Les paramètres utilisés dans l'évaluation des risques ne sont pas les mêmes dans ces deux situations [24].

### **I.3.2 Polluants du sol :**

La pollution des sols se produit lorsque des polluants provenant de sources détectables pénètrent dans le sol, entraînant une augmentation de leurs concentrations initiales [25]. Un sol est considéré comme contaminé lorsqu'une substance potentiellement dangereuse y est présente, indépendamment de sa concentration [26].

L'environnement contient une variété de polluants tels que les métaux lourds, les hydrocarbures, les HAP, les pesticides, et d'autres encore [27] [28].

L'introduction de ces substances dans le sol peut représenter un risque pour les micro-organismes, les plantes, les animaux et les êtres humains. Le comportement des polluants dans le sol est influencé par leurs propriétés, comme leur dégradabilité chimique ou biologique [29] [30].

Les hydrocarbures sont impliqués dans de nombreux cas de contamination des sols (80 cas), et ils ont tendance à s'accumuler en raison de leur faible solubilité [31].

En raison de leur classification en tant que produits chimiques dangereux, les hydrocarbures de type essence ou solvant peuvent provoquer des explosions ou des incendies s'ils s'accumulent [32].

### **I.4 Pollution du sol par les hydrocarbures :**

La contamination des sols par les hydrocarbures est répandue dans le monde en raison de l'utilisation intensive du pétrole comme principale source d'énergie [33].

Selon (Koller ,2004)[32], les hydrocarbures sont une source d'énergie cruciale pour l'économie depuis la révolution industrielle. Ce sont des ressources naturelles non renouvelables, ils sont considérés comme une source majeure de pollution organique des sols en raison de leur utilisation massive sur une longue période.

La pollution des sols par ces substances est causée par le rejet volontaire ou involontaire de produits pétroliers. Il désigne à la fois la pollution chimique et la pollution organique. Elle peut être sporadique, caractérisée par une forte teneur en hydrocarbures due à l'utilisation de ces produits (environ 70 ans dans certains cas) [34], ou diffuse, du fait de la dégradation et de l'accumulation d'hydrocarbures. Sur de grandes surfaces (cas des dépôts atmosphériques de HAP) [35].

### I.4.1 Comportement des hydrocarbures dans le sol :

Le comportement des polluants dans le sol est déterminé par des propriétés telles que la dégradabilité chimique ou biologique [36]. Selon Koller (2004) [32], La voie des hydrocarbures dans le sol dépend de plusieurs paramètres, notamment la teneur en eau du milieu, la végétation, la température, les propriétés du sol, ainsi que la viscosité et la complexité du mélange[37].

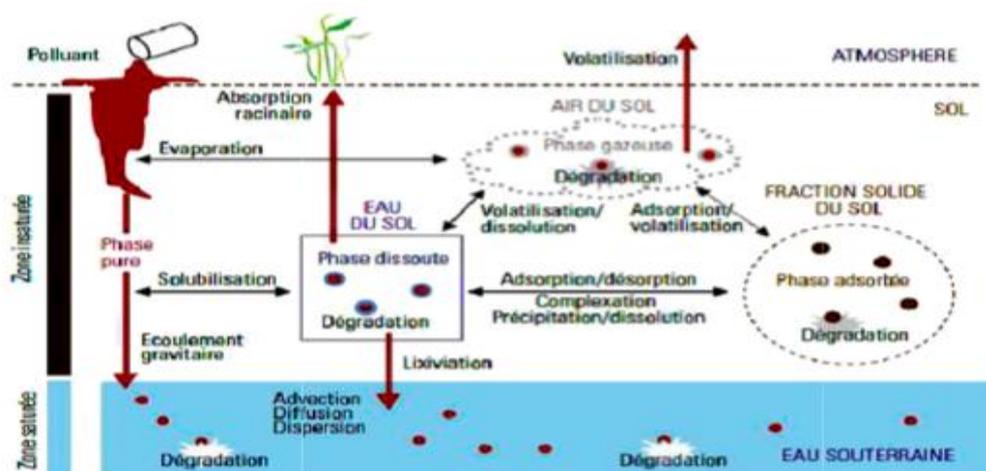


Figure I.1 : Processus influençant le devenir des polluants dans le sol.

- **Volatilisation**

La volatilisation est le processus par lequel les hydrocarbures se transforment en phase gazeuse et s'échappent dans l'atmosphère. Ce processus dépend de la pression de vapeur des hydrocarbures et des caractéristiques du sol, telles que la texture et l'humidité. Les sols sableux, avec de plus grands pores, peuvent favoriser une plus grande volatilisation des hydrocarbures que les sols argileux [38].

- **Solubilisation**

La solubilisation des hydrocarbures dans le sol dépend de leur nature chimique, des caractéristiques du sol et des conditions environnementales. [39].

Cela peut avoir des implications environnementales significatives, car les hydrocarbures solubles peuvent se propager et contaminer les eaux souterraines et les écosystèmes aquatiques [40].

Différents facteurs influencent ce processus, et des recherches sont menées pour mieux comprendre ces interactions dans différents contextes [41].

- **Adsorption**

L'adsorption est la propriété de certains corps solides de retenir les molécules d'autres corps à leur surface. La quantité d'hydrocarbures adsorbés est fortement liée aux propriétés du sol et à l'hydrophobicité du composé. Plus l'humidité est importante plus la quantité de pores occupés par la phase aqueuse est grande, et donc plus le volume de pores disponible pour retenir les hydrocarbures contenus dans le sol est faible.

Le degré d'adsorption est directement lié au contenu en carbone organique du sol ; plus le milieu est riche en matière organique, plus il est favorable aux mécanismes de l'adsorption) [42].

- **Dégradation**

La dégradation des hydrocarbures dans le sol est réalisée par des micro-organismes qui transforment les hydrocarbures en composés moins toxiques. Ce processus est influencé par divers facteurs environnementaux et peut prendre du temps. Comprendre et favoriser la dégradation des hydrocarbures dans le sol est essentiel pour minimiser l'impact environnemental des contaminations hydrocarbonées [43].

#### **I.4.2. Sources de pollution des sols par les hydrocarbures :**

La pollution des sols par les hydrocarbures est principalement causée par des déversements accidentels, des activités industrielles, des activités agricoles et des activités de construction et de développement urbain [44].

Ces sources de pollution entraînent la contamination directe des sols par les hydrocarbures, ce qui peut avoir des conséquences graves sur l'environnement et la santé humaine [45].

La prévention de la pollution des sols par les hydrocarbures nécessite la mise en place de mesures de contrôle et de bonnes pratiques dans divers secteurs, ainsi qu'une gestion appropriée des hydrocarbures pour réduire les risques de contamination. [46].

**Tableau I.1** : Typologie simplifiée des principaux agents de contamination [47]

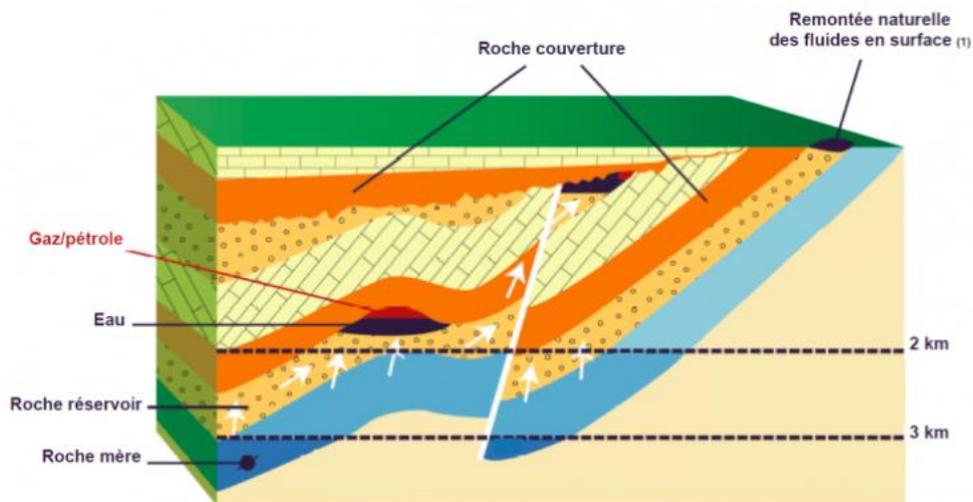
<b>Famille de polluants</b>	<b>Principales propriétés</b>	<b>Exemples</b>	<b>Activités généralisées</b>
Hydrocarbures	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Plus légers que l'eau</li> <li>-Biodégradables</li> <li>-Solubilité variable</li> <li>-Volatils</li> <li>-Viscosité variable</li> <li>-Adsorption variable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Essences</li> <li>-Gazole</li> <li>-Fioul domestique</li> <li>-Carburants aviation</li> <li>-Pétrole brut</li> <li>-Naphta</li> <li>-solvants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Stations-service</li> <li>-Dépôts de stockage</li> <li>-Installations de transport (Oléoducs, fer, route, voie maritime)</li> <li>-Raffineries</li> </ul>
Hydrocarbures lourds	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Densité variable (en général plus lourds que L'eau)</li> <li>-Peu biodégradables</li> <li>-Peu solubles</li> <li>-Peu volatils</li> <li>-Visqueux</li> <li>-Adsorption forte</li> <li>-Goudrons de houille</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fiouls lourds</li> <li>-Goudrons de pétrole</li> <li>- Créosotes</li> <li>-Certaines huiles de coupes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Chaudières industrielles</li> <li>-Centrales thermiques</li> <li>-Usines à gaz</li> <li>-Raffineries</li> <li>-Traitement du bois</li> <li>-Usinage des métaux</li> </ul>
Hydrocarbures halogènes aliphatiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Denses</li> <li>-Peu biodégradables</li> <li>- Relativement solubles</li> <li>-Volatils</li> <li>-Fluides</li> <li>-Adsorption faible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nombreuses formules dont les plus courantes Sont : TCE, TCA, PCE, Chloroforme.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Traitement de surface</li> <li>-Ateliers mécaniques</li> <li>-Industries</li> <li>-Nettoyage à sec</li> </ul>

## I.5. Le pétrole brut :

Le pétrole brut est une ressource d'origine fossile composée d'un mélange complexe d'hydrocarbures. [48]. Il est extrait du sous-sol et transformé en divers produits pétroliers par le biais du raffinage. [49]. Son utilisation peut avoir des impacts environnementaux, tels que la contamination des écosystèmes marins et la contribution aux gaz à effet de serre. (National Research Council. 2003)[50]. Des mesures de prévention, de contrôle et de gestion des risques sont nécessaires pour atténuer ces impacts [51].

Les méthodes et processus de raffinerie de pétrole donnent des produits comme l'essence, le diesel, le carburéacteur, l'asphalte, la cire, l'huile lubrifiante, le goudron, le kérosène et le gaz de pétrole liquéfié [52].

### *La formation et la migration du pétrole*



**Figure I.2:** Formation et migration du pétrole.

### I.5.1. Classification du pétrole brut :

Le pétrole brut est un mélange complexe d'hydrocarbures et de pétrole brut collecté dans différents réservoirs, qui est très différent dans sa composition et ses propriétés physiques [51]

Le pétrole et les hydrocarbures peuvent être divisés en quatre catégories : aliphatiques, aromatiques, asphaltènes et résines. Les hydrocarbures varient dans leur sensibilité aux attaques microbiennes et ont été auparavant généralement classés dans l'ordre suivant de sensibilité décroissante : n-alcanes, alcanes ramifiés, aromatiques. Par poids moléculaire, alcanes cycliques, composés aromatiques de haut poids moléculaire [52].

### **I.5.1.1. Hydrocarbures saturés :**

Les hydrocarbures saturés sont des composés constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène reliés uniquement par liaison simple, ils peuvent former des chaînes droites ou ramifiées environ 25 atomes de carbone ou moins. Facilement biodégradable, bien que leur biodégradabilité diminue avec la longueur de la chaîne [53]

**Les alcanes linéaires :** (*n*-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

**Les alcanes ramifiés :** les plus courants sont les isoalcanes (groupe méthyle en position 2), d'autres composés antibranchés (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés comme les isoprénoïdes (exemple : pristane, phytane) sont beaucoup moins abondants. Ces composés sont présents dans le pétrole à peu près dans la même proportion que les alcanes [53].

**Les Cycloalcanes :** contiennent des composés cycliques (5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Il existe également un certain nombre de dérivés polycycliques et certains d'entre eux, tels que les stéranes et les triterpènes, sont typiques du pétrole brut. Ce groupe peut représenter 30 à 40 % du total des hydrocarbures dans le pétrole brut [53].

### **I.5.1.2 Hydrocarbures aromatiques :**

Ce sont des composés formés de cycles de 6 atomes de carbone reliés par des doubles liaisons :

**Les mono-aromatiques :** Ce groupe d'hydrocarbures comprend le complexe BTEX : Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylène. Ces composants sont volatils et facilement biodégradables même avec des chaînes latérales attachées. Ils sont très toxiques pour les organismes aquatiques.

**Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :** peuvent représenter jusqu'à 60 % du pétrole brut. Les composés HAP de faible poids moléculaire (1 à 3 cycles) représentent 90% des hydrocarbures aromatiques présents dans le pétrole brut.

Ces composés ont plusieurs anneaux et ceux qui ont au moins 4 anneaux sont plus résistants à la biodégradation. Ils sont sensibles à la photooxydation et sont considérés comme des polluants prioritaires par l'USEPA (United States Environmental Protection Agency).

### **I.5.1.3 Composés polaires :**

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques telles que : les composés oxydés (phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes, etc.), les composés soufrés (mercaptans, sulfures, disulfures, etc.) et les composés azotés (pyridines, quinoléines, etc) [54].

**Résines** : Les résines sont des composés très polaires en raison de leurs propriétés adhésives du pétrole et ayant un caractère aromatique très distinct. Ils sont solubles dans les solvants organiques tels que le n-heptane.

**Asphaltènes** : Composés polaires responsables de la viscosité et de la haute densité de pétrole. Les asphaltènes et les résines peuvent également être complexés avec des métaux lourds, par exemple : le nickel et le vanadium, que l'on trouve généralement en petites quantités dans le pétrole [55].

### **I.5.2 Les propriétés physiques du pétrole :**

- **Densité**

La densité de l'huile dépend de la densité de ses particules et détermine la flottabilité. Presque tous les hydrocarbures liquides sont plus légers que l'eau. Le « grade API » (American Petroleum Institute) est une unité de mesure utilisée dans le système anglo-saxon pour mesurer la masse volumique d'un liquide, notamment du pétrole. En général, on parle de pétrole brut lourd avec un API inférieur à 20°, où l'API est en moyenne de 20 à 30° et la lumière est éteinte, mais ces limites varient d'un pays à l'autre [54].

- **Viscosité**

La viscosité mesure la résistance du liquide à l'écoulement [56] et donc sa vitesse de dégradation dans le milieu marin. Son unité de mesure est le centistoke (Cst). Elle diminue avec l'augmentation de la température [56] et augmente avec l'évaporation des composés volatils, l'oxydation photochimique et surtout la formation d'émulsions inverses qui modifient le comportement initial du produit [54].

- **Solubilité**

Donne une idée de la capacité d'une molécule organique à se dissoudre dans l'eau. Elle est de l'ordre de :  $\mu\text{g/l}$  (faible solubilité) ;  $\text{mg/l}$  (solubilité moyenne);  $\text{g/l}$  (haute solubilité).

En général, la solubilité des composés HAP est faible, 30  $\text{mg/l}$  pour les composés légers et  $10^{-4}$   $\text{mg/l}$  pour les composés plus lourds [57][58].

### **I.5.3 Les propriétés chimiques du pétrole :**

**Instabilité chimique** : Le pétrole est sujet à la dégradation chimique en raison de la présence de composés réactifs tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [59].

**Réactivité avec l'oxygène** : Le pétrole réagit avec l'oxygène de l'air, ce qui peut entraîner la formation de composés oxydés tels que les peroxydes, les aldéhydes, les cétones et les acides carboxyliques [60].

**Solubilité** : Le pétrole est insoluble dans l'eau, mais il est soluble dans les solvants organiques tels que l'hexane, le tétrachlorure de carbone et le benzène [61].

**Réactivité avec les métaux** : Les composés présents dans le pétrole, tels que les asphaltènes et les résines, peuvent former des complexes avec les métaux lourds tels que le nickel et le vanadium [55].

**Réactivité avec les micro-organismes** : Certains micro-organismes, tels que les bactéries et les champignons, peuvent dégrader certains composés du pétrole par des processus de biodégradation [62].

## **I.6 Impacts des hydrocarbures :**

Le sol joue un rôle essentiel en tant que support pour les animaux, les plantes terrestres et les êtres humains, et toute forme de pollution du sol aura des répercussions sur la flore, la faune et l'humanité elle-même [63].

Les hydrocarbures sont des substances chimiques organiques dangereuses, et certains de leurs effets toxiques, tels que leur potentiel cancérigène, génotoxique, mutagène ou tératogène, sont bien connus. Ils représentent donc une menace pour la santé publique [64].

L'impact de la pollution dépend du type d'hydrocarbures, de la durée de contact, de la quantité et surtout du niveau de toxicité. Les hydrocarbures légers sont plus toxiques que les hydrocarbures lourds, et ils sont généralement présents en plus grande quantité dans les déversements d'hydrocarbures [65].

### **I.6.1. Impacts sur les propriétés physiques du sol :**

Les hydrocarbures présents dans le sol peuvent avoir divers impacts sur ses propriétés physiques. Ils peuvent entraîner la compaction du sol, réduire sa perméabilité à l'eau et à l'air, altérer sa structure agrégée, réduire sa fertilité et modifier sa capacité à retenir l'eau [66].

Ces effets dépendent de la concentration des hydrocarbures, de la durée de la contamination, des caractéristiques du sol et des conditions environnementales [67].

### **I.6.2. Impacts sur les propriétés chimiques du sol :**

Les hydrocarbures présents dans le sol peuvent avoir plusieurs impacts sur ses propriétés chimiques. Ils peuvent modifier le pH du sol, contaminer les éléments nutritifs, réduire la capacité d'échange cationique, altérer la composition chimique du sol et être toxiques pour les micro-organismes du sol [68].

Les effets observés varient en fonction de la quantité d'hydrocarbures présente, de la durée de contamination, des propriétés spécifiques du sol et des conditions environnementales. [67].

### **I.6.3. Impacts sur les propriétés biologiques du sol :**

Les hydrocarbures présents dans le sol ont des effets significatifs sur ses propriétés biologiques. Ils entraînent une réduction de la biodiversité microbienne, perturbent les interactions entre les organismes du sol, inhibent la décomposition de la matière organique, affectent la croissance des plantes et perturbent la chaîne alimentaire [69].

Ces impacts dépendent de facteurs tels que la concentration des hydrocarbures, la durée de la contamination, les caractéristiques du sol et les conditions environnementales. [67].

### **I.7. Décontamination des sols pollués aux hydrocarbures :**

La décontamination est un ensemble de procédés qui nettoient un environnement qui a été exposé à des contaminations chroniques ou répétées qui l'ont rendu inutilisable. pour des activités domestiques, agricoles ou industrielles. Le travail du sol concerne des terres excavées ou encore debout [70].

Les techniques de décontamination ont pour but de traiter des produits ou résidus sources de contamination pour réduire voire supprimer leur caractère polluant et ainsi assainir le lieu [71].

Selon Girard et al. il existe trois méthodes de traitement [72] :

- **Traitement sur site** : Consiste à creuser le sol, mais il est traité sur place avec un appareil de décontamination.
- **Traitement in situ** : effectué sur site sans déplacer les sols contaminés ; pour cela on pratique l'extraction, la stabilisation ou la décomposition.
- **Traitement hors site** : Consiste à évacuer le sol, les déchets et l'eau contaminés vers une installation de décontamination. Si la contamination est trop difficile à gérer, la solution ultime est d'enlever une couche de sol contaminé et de l'enterrer dans du CET.

Un sol contaminé peut être traité chimiquement, physiquement, thermiquement ou biologiquement. Ces derniers sont considérés comme rentables et efficaces contre l'élimination des hydrocarbures [73].

#### **I.7.1. Procédés physiques :**

Les méthodes les plus couramment utilisées sont celles qui utilisent des fluides présents dans le sol ou injectés pour déplacer la pollution vers des zones de concentration et d'extraction.

Ces procédés visent à séparer et concentrer les polluants sans les altérer ou les éliminer. Les méthodes d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus fréquemment mises en œuvre pour atteindre cet objectif [74].

### **I.7.1.1 Méthodes physiques par évacuation :**

Les méthodes physiques par évacuation sont basées sur l'extraction des polluants du sol. Les sols contaminés extraits sont ensuite stockés de manière contrôlée, nettoyés, concentrés ou dépollués. Ces méthodes sont souvent utilisées comme étape préliminaire avant l'application d'une méthode de traitement complémentaire [72].

### **I.7.1.2 Méthodes physiques par piégeage :**

Ces méthodes servent uniquement à retenir les polluants en les enfermant ou en les rendant stables. Il s'agit d'une approche de stabilisation qui implique l'introduction d'une substance fixatrice dans le sol, sans altérer ses propriétés ni affecter sa fertilité [71][72].

## **I.7.2. Procédés chimiques**

Extraction par solvant : Utilisation des solvants organiques pour extraire les hydrocarbures du sol contaminé [75].

**Oxydation chimique** : Utilisation d'agents oxydants pour transformer les hydrocarbures en composés moins toxiques [78].

**Stabilisation et immobilisation** : Fixation ou transformation des hydrocarbures pour réduire leur mobilité [79].

### **I.7.3 Procèdes thermiques :**

Les procédés thermiques sont utilisés pour décontaminer les sols pollués par des hydrocarbures [80]. Les principales méthodes comprennent la vaporisation thermique, la désorption thermique, la pyrolyse et la combustion in situ [81].

La vaporisation thermique consiste à chauffer le sol pour volatiliser les hydrocarbures, tandis que la désorption thermique vise à désorber les contaminants adsorbés [82].

La pyrolyse permet la décomposition thermique des hydrocarbures, tandis que la combustion in situ brûle les contaminants. Chaque procédé présente des avantages et des limitations spécifiques [83].

### **I.7.4 Procèdes biologiques :**

Selon Colombano et ses collaborateurs [84], les techniques non biologiques utilisées pour la décontamination des sols présentent plusieurs inconvénients tels que leur mise en œuvre complexe, leur coût élevé et la transformation des terres en résidus stériles. Ces techniques physiques, chimiques et thermiques impliquent des coûts élevés liés à l'excavation et au transport, l'utilisation de solutions potentiellement toxiques pour l'environnement, une consommation énergétique considérable, le traitement de petites surfaces de sol à la fois, la

réduction de la fertilité du sol, ainsi que la destruction des populations de micro-organismes et d'organismes vivants présents dans le sol. Par conséquent, on privilégie l'utilisation de techniques biologiques curatives, déjà développées ou encore en développement, car elles permettent de préserver les propriétés du sol.

**La remédiation biologique des sols** est une méthode économiquement et écologiquement intéressante. La biodégradation permet la minéralisation des polluants, entraînant ainsi leur disparition. Ces techniques sont particulièrement adaptées pour le traitement des sols pollués par des hydrocarbures [85].

Les procédés biologiques exploitent les propriétés des organismes vivants pour réaliser l'opération de dépollution, en extrayant ou en dégradant le contaminant [72].

Les procédés biologiques permettent la dégradation des polluants grâce à l'action d'organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les plantes, etc. Ainsi, la décontamination par voie biologique consiste à stimuler un processus naturel pour augmenter l'efficacité, afin de détruire les polluants organiques qui servent de source de carbone [71].

On distingue deux principales catégories de traitements biologiques : **la bioremédiation** qui utilise principalement des microorganismes, en particulier des bactéries et des champignons, et **la phytoremédiation** qui exploite les propriétés des végétaux [72][86].

**Biodégradation** : Dégradation des hydrocarbures par des microorganismes. [76].

**Phytoremédiation** : Utilisation de plantes hyper accumulatrices pour absorber et éliminer les hydrocarbures [77].

### **I.7.5 Techniques de bioremédiation :**

La bioremédiation est une approche utilisée dans la décontamination des sols, qui se base sur des processus biologiques pour éliminer les contaminants. Elle exploite les capacités des microorganismes, tels que les bactéries et les champignons, pour dégrader les substances toxiques présentes dans le sol [87].

Les techniques de bioremédiation comprennent la bioaugmentation, qui consiste à introduire des microorganismes spécifiques pour dégrader les contaminants, et la biostimulation, qui crée des conditions favorables à la croissance des microorganismes indigènes [88].

D'autres techniques, comme la phytoremédiation et la rhizodégradation, utilisent les plantes et les interactions entre les racines et les microorganismes pour dégrader les contaminants.

La bioremédiation présente des avantages tels que sa praticité sur place et son respect de l'environnement. Elle est considérée comme une méthode économique et respectueuse du sol. [89].

**Tableau I.2 :** Synthèse des travaux sur la biostimulation de sols pollués par les hydrocarbures.

<b>Auteurs</b>	<b>Titres</b>	<b>Résultats</b>
Margesin et Schinner (2001).[200]	Bioremédiation (Atténuation naturelle et biostimulation) des sols contaminés par le diesel dans une zone alpine glaciaire.	Efficacité de la Biostimulation Réduction de 5% et 70% d'hydrocarbures dans le sol non fertilisé et fertilisé.
Seklemova et al. (2001).[201]	Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel : field démonstration	Nutriments ajoutés sans aucun effet sur la décontamination des sols pollués car la contamination initiale par le diesel était trop élevée (2000, 4000 et 6000 mg kg <sup>-1</sup> )
Coulon et Dellile (2003)[202]	Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons.	Efficacité de la biostimulation sur la croissance des bactéries indigènes d'un sol subantarctique contaminé  Forte augmentation du nombre de bactéries hétérotrophes et spécifiques.
Bento et al. (2005)[203]	Bioremédiation comparative des sols contaminés par le diesel par atténuation naturelle, biostimulation et bioaugmentation.	Une plus grande dégradation de la fraction légère (72,7%) et de la fraction lourde (75,2%) des hydrocarbures totaux dans les sols traités par bioaugmentation.
Tanee et Kinako (2008)[204]	Comparative studies of biostimulation and phytoremediation in the mitigation of crude oil toxicity in tropical soil	Efficacité de la Biostimulation et phytoremédiation dans l'atténuation de la toxicité du pétrole brut sur le sol
Martínez - Álvarez et al. (2015)[205]	Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica.	Efficacité de l'essai sur le terrain en Antarctique qui réduisait considérablement les niveaux de contamination par les carburants dans les sols

Al-Mailem et al. (2017)[206]	Biostimulation des microorganismes indigènes pour la bioremédiation des microcosmes hyper salins huileux du Golfe d'Arabie en région koweïtienne	Augmentation du nombre de microbes et de l'élimination du pétrole après traitement avec les cations et avec des vitamines. Efficacité des cations dans l'élimination du pétrole dans l'ordre : $Fe^{3+}$ (94%) > $Ca^{2+}$ (89%) > $Mg^{2+}$ (85%) > $K^{+}$ (82%) avec élimination de la majeure partie du pétrole. Elimination de 78% et 72% par traitement avec des levures commerciales et du sang animal sources de vitamines
Villalba Primitz et al. (2021)[207]	Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from Carlini Station,  Antarctica : effectiveness of different nutrient sources as biostimulation agents	Dégradation de 50% des hydrocarbures totaux en 50 jours dans les sols traités par biostimulation.  Amélioration de la croissance des communautés microbiennes et changement de leur structure

**Tableau I.3 :** Synthèse de quelques travaux sur la bioaugmentation de sols pollués aux hydrocarbures.

<b>Auteurs</b>	<b>Titres</b>	<b>Résultats</b>
<b>Straube et al. (1999)[208]</b>	Benche-scale optimisation of bioaugmentation strategies for treatment of soil contaminated with high molecular weight polyaromatic hydrocarbons	Augmentation des capacités métaboliques des communautés bactériennes autochtones du sol. Dégradation de composés insolubles (HAP) rendus
<b>Nasseri et al. (2010)[209]</b>	Influence of bioaugmentation in biodegradation of PAHs-contaminated soil in bio-slurry phase reactor	dégradation du phénanthrène de 87.8%, 85.5% et 92.8% par les souches <i>Pseudomonas</i> sp. et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et leur consortium respectivement
<b>Lebkowska et al. (2011)[210]</b>	Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native MO: field-scale processes in Poland	82%, 50% et 30% de diesel ont été dégradés par bioaugmentation en traitement répétée, unique sans traitement après 4 semaines

<b>Prakash et Irfan (2011)[211]</b>	Pseudomonas aeruginosa is present in crude oil contaminated sites of Barmer Region (India)	La souche P. aeruginosa possède la capacité de dégrader le pétrole présent dans le sol
<b>Nisha et al. (2013)[212]</b>	Degradation studies on diesel oil using bacterial consortium isolated from oil-polluted soil.	Conditions optimales pour la dégradation du diesel par Bacillus coagulans : pH =7, T=37°C et faible volume de diesel (3,125g)
<b>Sadoudi-Ali Ahmed et al. (2014)[213]</b>	Treatment of an oil polluted soil by injecting Pseudomonas aeruginosa and produced rhamnolipid.	Réduction du taux d'hydrocarbure après 4 semaines dans le sol traité par bioaugmentation. Augmentation de la quantité de CO <sub>2</sub> dégagé, et du taux de germination
<b>Szulc et al. (2014)[214]</b>	The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies	Les résultats suggèrent que l'amélioration du potentiel de biodégradation par l'introduction de microorganismes possédant des gènes cataboliques pertinents est une stratégie réalisable pour améliorer l'efficacité de la bioremédiation au cours du traitement à long terme.
<b>Villaverde et al. (2019)[215]</b>	Bioaugmentation of PAH-Contaminated soils with novel specific degrader strains isolated from a contaminated industrial Site. Effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as PAH bioavailability enhancer	Aptitude des souches Achromobacter xylooxidans 2BC8 et Stenotrophomonas maltophilia JR62 à dégrader le pyrène avec des taux allant jusqu'à 57.5%. Réduction de la durée d'adaptation de ces souches par l'ajout d'un tensioactif.

## I.8. Remédiation des sols pollués par les HAP à l'aide de biosurfactants

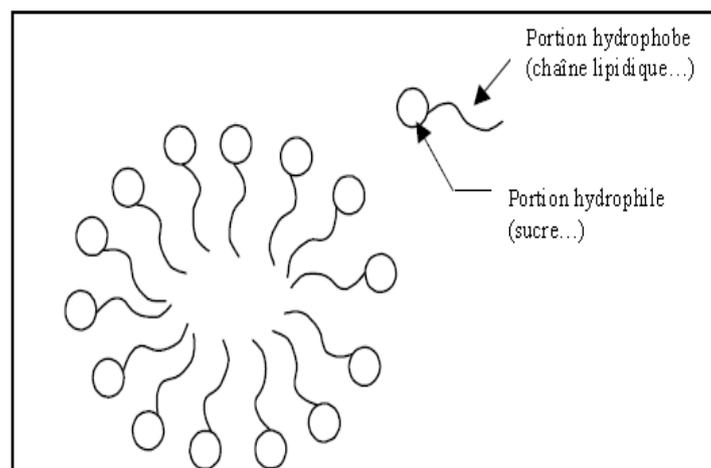
Dans le traitement des sols contaminés, il est souvent nécessaire de combiner différentes techniques, et l'ajout de biosurfactants pour faciliter la désorption des molécules contaminantes est couramment adopté. Les tensioactifs, également connus sous le nom de "surfactants" (agents de surface), sont des molécules qui ont la capacité de réduire les tensions superficielle et interfaciale entre des phases de polarités différentes, telles que l'huile et l'eau, l'air et l'eau, ou encore l'eau et un solide. Leur utilisation principale se situe dans le domaine de l'émulsification et de la dispersion [90].

La grande majorité des surfactants disponibles sur le marché sont d'origine chimique et dérivé du pétrole. Cependant, ces produits présentent un risque pour l'environnement car ils sont souvent toxiques et ne se dégradent pas naturellement) [91].

Les biosurfactants sont de plus en plus étudiés pour leur utilisation dans la décontamination des sols pollués. Ils sont produits par des micro-organismes vivants et possèdent des propriétés tensioactives similaires à celles des surfactants chimiques. Une étude récente menée par Smith et al[92] sur l'efficacité des biosurfactants dans la désorption des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés. Les résultats ont montré que l'ajout de biosurfactants augmentait significativement la désorption des HAP, permettant ainsi une meilleure extraction et dégradation des contaminants.

## II. Biosurfactants

Les surfactants, (agents de surface actifs), sont des substances chimiques qui modifient les propriétés de surface des liquides avec lesquels elles entrent en contact. Ils sont constitués de molécules amphiphiles, ce qui signifie qu'ils ont à la fois une partie hydrophile (qui a une affinité pour l'eau) et une partie lipophile (qui a une affinité pour les lipides ou les graisses) [93].



**Figure II.1** : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant [6].

### II.1. Généralité sur les biosurfactants

Les biosurfactants ont été largement étudiés en tant que composés biotechnologiques de premier plan au cours du siècle actuel [94].

Ces molécules amphipathiques sont produites par des processus de fermentation (fermentation : en absence d'oxygène) impliquant des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Elles se composent d'une partie hydrophile (polaire) et d'une partie hydrophobe (non polaire), ce qui leur confère la capacité de réduire la tension de surface et la tension interfaciale des liquides [95][96].

La partie polaire d'un biosurfactant peut être constituée d'un acide aminé, d'un hydrate de carbone, d'un peptide cationique ou d'un peptide anionique, tandis que la partie non polaire est formée de chaînes carbonées saturées ou insaturées, pouvant être composées de protéines, d'acides gras ou de peptides [97].

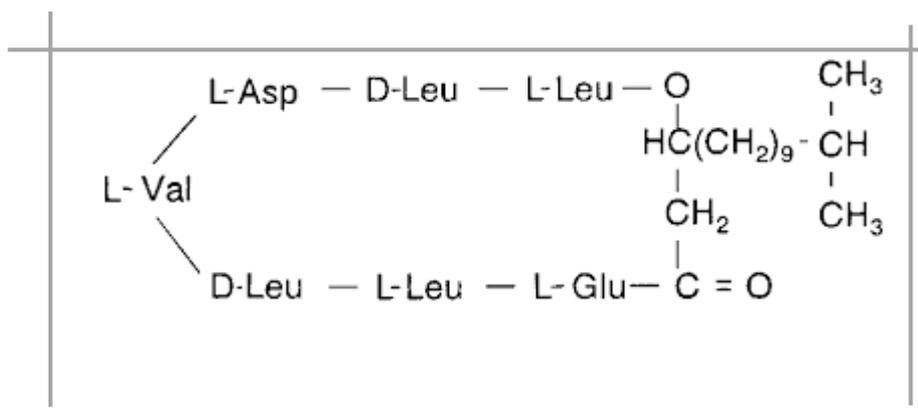
Les biosurfactants anioniques sont plus efficaces pour les processus de nettoyage et de déshuilage, tandis que les biosurfactants cationiques sont principalement utilisés pour l'émulsification des produits de soins de la peau. Les biosurfactants non ioniques sont plus adaptés aux détergents à basse température. Ainsi, chaque agent tensioactif naturel présente une spécificité significative [98].

La combinaison de biosurfactants biologiques avec des tensioactifs synthétiques à des concentrations optimisées peut fournir une activité interfaciale et de surface supérieure à celle des composants tensioactifs individuels. Récemment, l'utilisation de liquides ioniques dans les formulations de tensioactifs respectueux de l'environnement a suscité un intérêt croissant en raison de leur faible toxicité, de leur non-volatilité, de leur stabilité thermique et de leur forte activité de surface [99].

## II.2 Classification des biosurfactants :

### II.2. 1 Les Lipopeptides :

Sont des composés bioactifs produits par certaines bactéries, tels que le genre *Bacillus*. Ils sont caractérisés par une partie peptidique liée à une chaîne lipidique. Les lipopeptides possèdent diverses propriétés intéressantes, notamment une forte activité antimicrobienne, antifongique, anticancéreuse et anti-inflammatoire. Ils sont prometteurs dans divers domaines tels que la biotechnologie, la médecine et l'agriculture [100]...[103].



**Figure II.2 :** Structure de la surfactine lipopeptidique cyclique produite par *Bacillus subtilis*

### II.2.2 Les Glycolipides :

Sont des lipides complexes contenant un groupe glucidique lié à un groupe lipidique. Ils jouent un rôle crucial dans de nombreux processus biologiques, tels que la reconnaissance cellulaire et la signalisation. De plus, ils sont impliqués dans des interactions hôte-pathogène et possèdent des propriétés immunomodulatrices. Les glycolipides ont suscité un intérêt

croissant en raison de leur potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies inflammatoires, des cancers et des infections [104]...[107].

### II.2.3 Les Rhamnolipides :

Sont produits par certaines bactéries, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. Ils sont composés d'une partie lipidique hydrophobe liée à un rhamnose, un glucide. Ils sont connus pour leurs propriétés tensioactives et antimicrobiennes. Ils sont utilisés dans diverses applications industrielles, notamment comme agents moussants, émulsifiants et détergents.

### II.2.4 Les Sophorolipides :

Sont produits par des levures, principalement *Candida bombicola*. Ils sont composés d'une partie lipidique hydrophobe liée à un sophorose, un disaccharide constitué de glucose et de fructose. Les sophorolipides sont également des tensioactifs et ont des propriétés antimicrobiennes. Ils sont utilisés dans l'industrie des détergents, des cosmétiques et des produits pharmaceutiques.

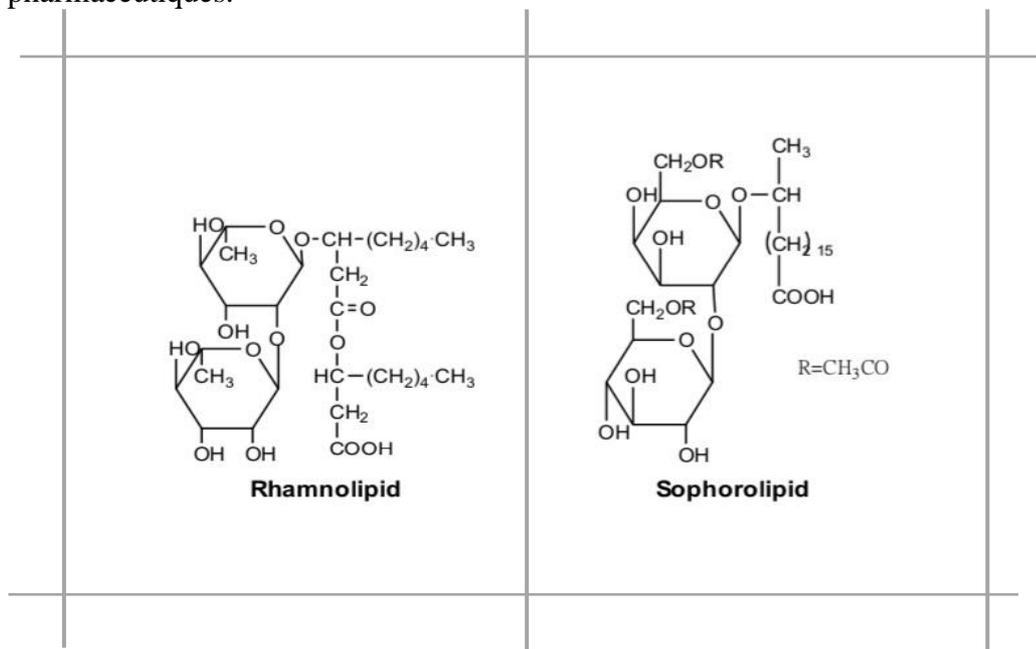


Figure II.3 : Structure de Rhamnolipide, Sophorolipide [108].

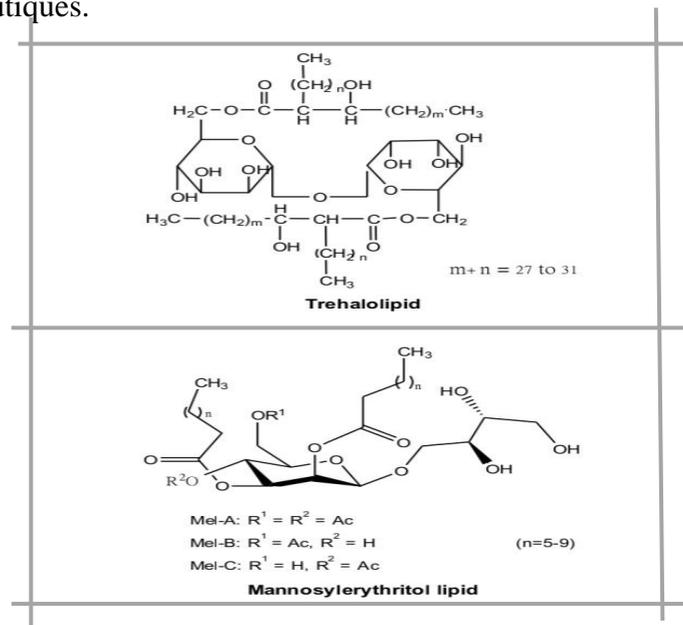
### II.3 Les Trehalolipides :

Sont produits par diverses bactéries, notamment des espèces du genre *Rhodococcus*. Ils sont composés d'une partie lipidique liée à un tréhalose, un disaccharide constitué de deux molécules de glucose. Les trehalolipides ont des propriétés tensioactives et sont étudiés pour leur utilisation potentielle dans l'industrie des détergents et des produits de nettoyage.

### II.4 Les Mannosylérythritolipides :

Sont produits par des actinobactéries, notamment des espèces du genre *Mycobacterium*. Ils sont composés d'une partie lipidique hydrophobe liée à un mannosylérythritol, un disaccharide composé de mannose et d'érythritol. Les mannosylérythritolipides ont des propriétés tensioactives et sont étudiés pour leurs

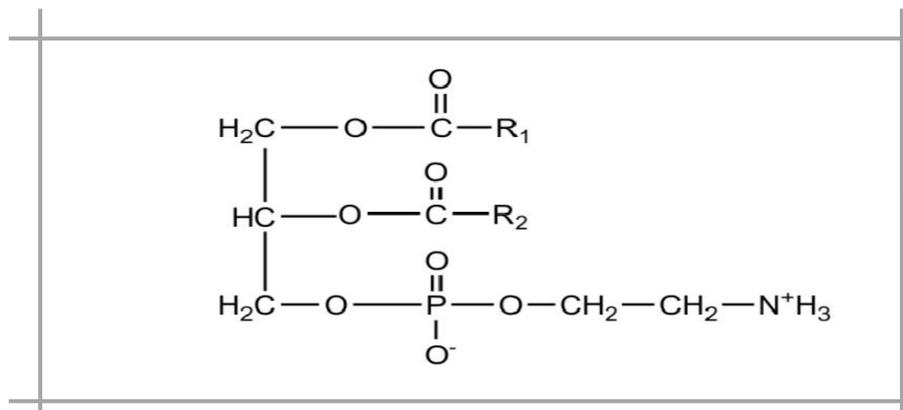
applications potentielles dans l'industrie des détergents, des produits cosmétiques et des produits pharmaceutiques.



**Figure II.4 :** Structure de Tréhalolipide et Mannosylérythritol [108].

## **II.5 Les Phospholipides :**

Les phospholipides sont des lipides présents dans les membranes biologiques, qui sont composés d'une tête hydrophile contenant un groupe phosphate et d'une queue hydrophobe constituée d'acides gras. Ils jouent un rôle crucial dans la structure et la fonction des membranes cellulaires, ainsi que dans divers processus biologiques tels que le transport lipidique et la signalisation cellulaire. Les phospholipides sont sujets à de nombreuses recherches en raison de leur importance biologique et de leur implication dans diverses maladies. [109]...[ 112].



**Figure II.5 :** Structure de la phosphatidyléthanolamine [113].

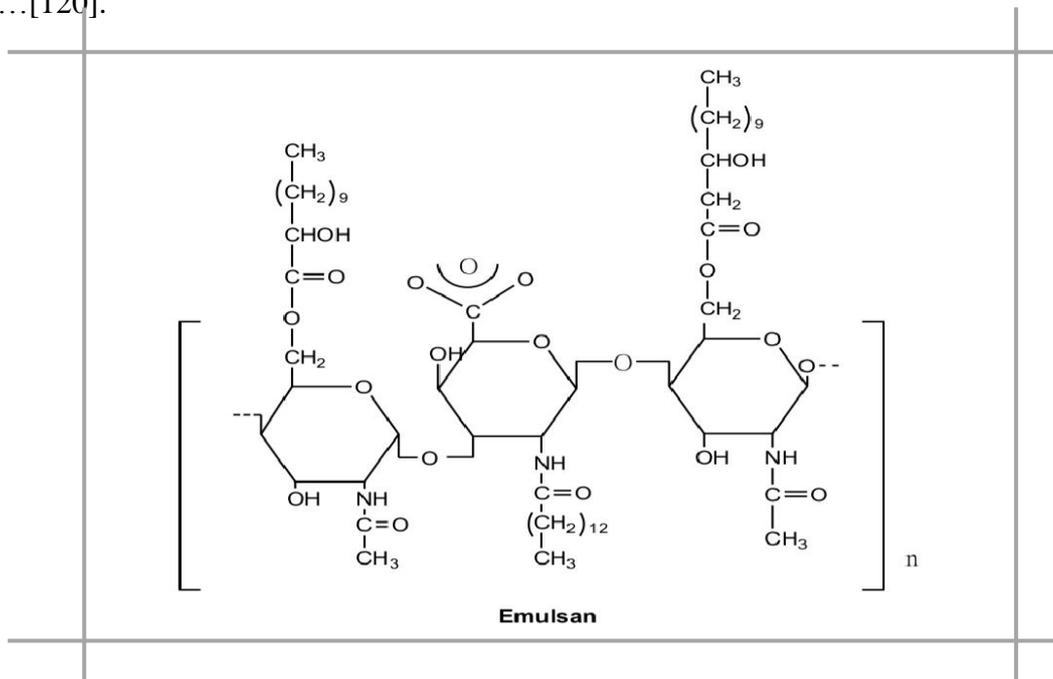
## **II.6 Les lipopolysaccharides ou polymériques :**

Sont des composants essentiels des membranes externes des bactéries à Gram négatif. Ce sont des macromolécules complexes composées de lipides et de polysaccharides. Les LPS jouent un rôle crucial dans la protection de la bactérie contre les agents extérieurs, ainsi que dans l'interaction avec l'hôte et la modulation de la réponse immunitaire. Leur structure variée

et leur diversité antigénique en font des cibles d'étude importantes dans la recherche sur les interactions bactéries-hôtes, la pathogénèse et le développement de vaccins. [114]...[117].

## **II.7 Les acides gras et lipides neutres :**

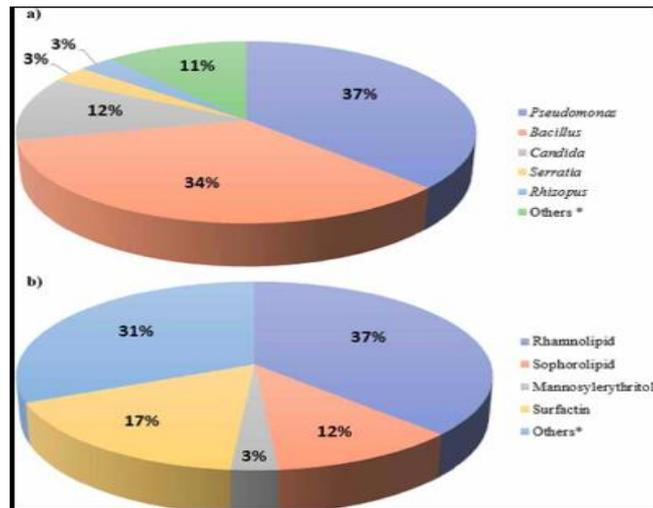
Les acides gras et les lipides neutres sont des biosurfactants naturels étudiés pour leurs propriétés tensioactives. Ils sont produits par divers microorganismes et peuvent être extraits à partir de sources végétales et animales. Ces composés ont la capacité de réduire la tension interfaciale entre les phases aqueuses et huileuses. Ils présentent des avantages tels que leur biodégradabilité, leur non-toxicité et leur disponibilité à partir de ressources renouvelables. Les acides gras et les lipides neutres sont utilisés dans différentes applications industrielles, notamment dans la récupération du pétrole, le nettoyage des sols contaminés et la dégradation des hydrocarbures. Des recherches récentes explorent les possibilités de modification et de production à grande échelle de ces biosurfactants grâce à des techniques de biotechnologie. [118]...[120].



**Figure II.6 :** Structure de l'émulsifiant [121].

## **II.3 Origine Des Biosurfactants**

La majorité des biosurfactants sont produits par des micro-organismes qui se développent en aérobiose tout en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, telles que des hydrates de dioxyde de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces micro-organismes sont généralement des levures, des champignons ou des bactéries ; les rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactine de *Bacillus subtilis* et l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* sont des exemples de microbes tensioactifs [122][123].



**Figure II.7 :** Principaux micro-organismes producteurs biosurfactants.

a) genres de micro-organismes producteurs de biosurfactants,

b) principaux biosurfactants produits selon la littérature,

\*autres groupes impliquent également une combinaison de biosurfactants ou des cas inconnus.

**Tableau II.1** : Biosurfactants produits par les micro-organismes [124]

<b>Biosurfactant</b>	<b>Micro-organismes</b>
<b><u>Faible poids moléculaire</u></b>	
-Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i> , <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-(Hydroxyalkanoyloxy)-acides alcaniques (HAAs) Précurseur des Rhamnolipides	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
-Lipides de tréhalose	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Corynebacterium</i>
-Lipides de sophorose	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Torulopsis</i>
-Lipides de cellobiose	<i>bombicola</i>
-Viscosine	<i>Ustilago maydis</i>
-Surfactine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Polymixines	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
-Gramicidines	<i>Bacillus polymyxa</i>
-phospholipides	<i>Bacillus brevis</i>
-flavolipides	<i>Acinetobacter</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
-Lipopeptides	<i>Flavobacterium sp.</i>
-Ornithine, peptides de lysine	<i>Bacillus subtilis</i> (Iturin A), <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> ,
-Lipides polyoliques	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Streptomyces tendae</i>

-Serrawettine	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula graminis</i>
-Acides gras	<i>Serretia marcescens</i>
-Sulfonolipides	<i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Arthrobacter parafineus</i> , <i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Penicillium</i>
-Diglycosyl diglycérides	<i>spiculisporum</i> , <i>Talaromyces trachyspermus</i>
<b><u>Poids moléculaire élevé</u></b>	
-Alasan	<i>Capnocytophaga</i> , <i>Corynebacterium</i>
-Emulsan	<i>Rhizobium trifolii</i>
-Biodispersane	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-Liposane	
-Émulsifiant alimentaire (bioémulsifiants utilisent)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
-Émulsifiant d'insecticide (production par alpha Hexachlorocyclohexane (HCH) à l'aide de <i>P. tralucida</i> )	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Polysaccharide sulfaté	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-Hétéropolysaccharide acétylique N-acétyle et O-pyruvile	<i>Candida lipolytica</i>
-Hétéropolysaccharide	<i>Candida utilis</i>
	<i>Pseudomonas tralucida</i>
	<i>Halomonas eurihalina</i>
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescen</i>

## II.4. Avantages des biosurfactants :

Les biosurfactants offrent de nombreux avantages par rapport aux surfactants chimiques traditionnels, les principaux avantages des biosurfactants dérivés des microorganismes sont discutés ci-dessous [125].

- **Faible toxicité** : Les biosurfactants sont généralement considérés comme des produits non ou faiblement toxiques. Contrairement aux surfactants chimiques traditionnels, ils ont une meilleure compatibilité environnementale et peuvent être utilisés en toute sécurité dans des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [126].
- **Utilisation de matières premières renouvelables** : Les biosurfactants peuvent être produits à partir de sources de carbone renouvelables, telles que des déchets agricoles ou industriels. Cette caractéristique permet une production économique, réduit la dépendance aux matières premières fossiles et contribue à la valorisation des déchets, offrant ainsi des avantages économiques et environnementaux [127].
- **Tolérance aux conditions extrêmes** : Certains biosurfactants ont la capacité de maintenir leur activité dans des conditions extrêmes, telles que des températures élevées, des pH acides ou basiques, ainsi que des niveaux de salinité élevés. Cela les rend adaptés à une large gamme d'applications dans des environnements variés, y compris les secteurs pétroliers, miniers et environnementaux [127].
- **Activité de surface et d'interface** : Les biosurfactants ont la capacité de réduire la tension superficielle et la tension interfaciale entre différents composants. Cela favorise la dispersion homogène de substances non miscibles, l'émulsion de mélanges liquides et la stabilisation des interfaces, ce qui peut être utile dans de nombreuses applications industrielles, telles que la production de détergents, les processus de récupération pétrolière et la formulation de produits pharmaceutiques [128].
- **Biodégradabilité** : Les biosurfactants sont facilement dégradés par des microorganismes présents dans l'environnement, ce qui les rend biodégradables et moins persistants dans les écosystèmes. Contrairement aux surfactants chimiques, ils ne contribuent pas à l'accumulation de substances nocives dans l'environnement, réduisant ainsi leur impact environnemental global [129].
- **Polyvalence d'activité** : Les biosurfactants présentent une large gamme d'activités biologiques, telles que des propriétés antimicrobiennes, antivirales, anti-tumorales, antiadhésives et antibiofilm. Certains biosurfactants peuvent également agir comme agents moussants, émulsifiants et dispersants, ce qui les rend polyvalents dans de nombreuses applications industrielles et médicales [130].

## **II.5 Production et récupération de biosurfactants :**

### **II.5.1 Production des biosurfactants :**

La production de biosurfactants est un processus complexe qui nécessite la sélection de microorganismes appropriés, l'utilisation de substrats carbonés spécifiques, des conditions de culture optimales et une utilisation efficace des déchets agricoles et industriels[131].

Les microorganismes producteurs de biosurfactants se développent généralement de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, telles que des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [132][133].

La structure et les caractéristiques des biosurfactants produits dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme.

Les microorganismes producteurs de biosurfactants comprennent des levures, des champignons et des bactéries. Il convient de noter que les plantes, les animaux et les humains sont également capables de produire des biosurfactants [134]. Parmi les bactéries, le genre *Pseudomonas* est largement connu pour sa capacité à produire de grandes quantités de glycolipides, qui sont classés en tant que rhamnolipides.

*Bacillus subtilis* est un autre microorganisme largement étudié en raison de sa capacité à produire un lipopeptide à activité de surface appelé surfactine ou subtilisine. Les levures *Candida bombicola* et *Candida lipolytica* font partie des levures les plus étudiées en ce qui concerne la production de biosurfactants. Il convient de noter que de nombreuses espèces de microorganismes sont capables de produire des biosurfactants, mais la régulation de leur synthèse est encore mal comprise, à l'exception des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui ont été largement étudiées. Ces microorganismes ont été identifiés comme des producteurs de biosurfactants et font l'objet de recherches approfondies pour comprendre les mécanismes impliqués dans la production de ces composés [135].

### **II.5.2 Production de biosurfactants à partir des sous-produits :**

La source de carbone est un paramètre crucial qui influence considérablement la production de biosurfactants. En effet, le choix du substrat carboné peut représenter jusqu'à 50% des coûts totaux de production, ce qui souligne l'importance de sélectionner des sources de carbone alternatives peu coûteuses [136].

Afin de réduire les coûts de production et de promouvoir une gestion efficace des déchets, de nombreux déchets renouvelables et bon marché ont été étudiés comme substrats potentiels pour la production de biosurfactants. Cette approche permet non seulement de réduire les coûts associés à la production, mais également de valoriser des déchets qui seraient autrement destinés à être éliminés [137][138].

Des études ont exploré diverses sources de carbone alternatives, telles que des sous-produits de l'industrie agroalimentaire, des résidus de biomasse, des huiles usagées et des déchets organiques. Ces substrats présentent l'avantage d'être abondants, facilement disponibles et peu coûteux. De plus, leur utilisation contribue à réduire la dépendance aux ressources fossiles et à promouvoir une approche plus durable et respectueuse de

l'environnement dans la production de biosurfactants. La sélection judicieuse des sources de carbone alternatives permet non seulement d'optimiser la production de biosurfactants, mais également de réduire l'impact environnemental associé à la gestion des déchets. En exploitant ces sources de carbone peu coûteuses, il est possible de développer des stratégies efficaces de réduction des coûts tout en favorisant une économie circulaire et une utilisation plus durable des ressources [137][138].

Dans le tableau 3, nous pouvons observer un résumé des matériaux peu coûteux qui ont été exploités avec succès en tant que substrats pour la production de biosurfactants. Lors de la sélection de ces déchets, il est essentiel de garantir un bon équilibre en nutriments afin de favoriser la croissance microbienne et la production efficace de biosurfactants. Les déchets industriels riches en glucides ou en lipides sont particulièrement adaptés en tant que sources de carbone [139].

**Tableau II.2 :** Déchets valorisés et exploités pour la production des biosurfactants.

<b>Type d'industrie/ déchets</b>	<b>Type d'espèce microbienne</b>	<b>Références</b>
<b><u>Résidus industriels et agroalimentaires :</u></b> Mélasse de dattes, bagasses de canne à sucre, écorces d'orange, farine d'écorce de sésame, résidus de thon, écorces de bananes, écorces de pommes de terre, liqueurs de maïs, gâteaux de cacahuètes, résidus de moringa.	<i>Halobacteriaceae archaeon,</i> <i>Bacillus pumilis,</i> <i>Bacillus licheniformis,</i> <i>Cunninghamella phaeospora,</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chooklin et al. 2014 ; Sharma et al. 2015 ; Kumar et al. 2016 ; Lins et al. 2016 ; Rubio-Ribeaux et al. 2017 ; Magalhaes et al. 2018
<b><u>Déchets animaux :</u></b> déchets d'abattoir, graisses animales, déchets de transformation du poisson.	<i>Pseudomonas gessardii,</i> <i>Nocardia higoensis</i> <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	Ramani et al. 2012 ; Patil et al. 2016 ; Sellami et al. 2016
<b><u>Déchets agro-industriels et des usines</u></b> (y compris les déchets de raffinerie) : déchets d'oliviers, effluents traités à la tannerie, déchets de l'industrie de l'huile de palme, déchets de l'industrie de l'huile de soja.	<i>Brachybacterium Paraconglomeratum,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Bacillus pseudomycoïdes,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Kiran et al. 2014 ; Gudiña et al. 2016 ; Li et al. 2016 ; Moya-Ramírez et al. 2016 ; Radzuan et al. 2017

<p><b><u>Huile de cuisson usagée</u></b> : déchets de friture d'huile de noix de coco, huile de cuisson usée, huile de friture résiduelle.</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Candida lipolytica</i></p>	<p>Haba et al. 2000 ; George et Jayachandran 2013 ; Lan et al. 2015 ; Souza et al. 2016</p>
--	---	---

## II.5.3 Facteurs influençant la production des biosurfactants :

### II.5.3.1 Facteurs abiotiques :

- Source de carbone :

Les sources de carbone sont essentielles dans la production de biosurfactants. Différents substrats, tels que le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose et le glycérol, ont été étudiés avec succès. Ils stimulent la production de biosurfactants par divers microorganismes, offrant des avantages en termes de disponibilité, de coût et de capacité. Le choix de la source de carbone dépend du microorganisme utilisé et des propriétés souhaitées des biosurfactants produits. [140].

- Sources d'azote :

L'azote est crucial dans la production de biosurfactants car il est essentiel à la croissance microbienne et à la synthèse des protéines et des enzymes nécessaires. Différents composés azotés tels que la peptone d'urée, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, l'extrait de viande et les extraits de malt ont été utilisés avec succès. L'extrait de levure est la source d'azote la plus couramment utilisée. La concentration optimale dépend de l'organisme et des conditions de culture. Les sels d'ammonium et l'urée sont considérés comme les sources d'azote préférées des bactéries. Chaque organisme et objectif de production de biosurfactants nécessite un choix approprié de source d'azote. L'évaluation minutieuse de la disponibilité et de la concentration optimale des composés azotés est essentielle pour maximiser la production de biosurfactants de haute qualité. [140].

### II.5.3.2 Facteurs biotiques :

- Les facteurs environnementaux :

Plusieurs facteurs ont été signalés comme influençant la production de biosurfactants, tels que le pH, la salinité, la température, l'agitation et la disponibilité en oxygène. Comprendre et contrôler ces facteurs est essentiel pour optimiser la production de biosurfactants et obtenir des rendements élevés et des produits de qualité [141].

- **Le pH** : le pH du milieu de culture a été identifié comme un facteur déterminant dans la production de sophorolipides par la levure *Candida bombicola*. La production de ces biosurfactants dépend fortement du pH, avec des valeurs optimales spécifiques. Par exemple, les *Pseudomonas sp* ont montré une forte production de rhamnolipides dans une plage de pH allant de 6 à 6,5, qui diminue rapidement au-dessus de pH 7 [142].

- **La température** : l'activité d'émulsification et la tension superficielle du biosurfactant qui produit par les souches thermophiles tout au long de la plage de température supérieure à 40° C est restées constantes après autoclavage à 120° C pendant 20 min [143].
- **L'agitation** : pour les souches bactérienne, l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induite une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. Par contre chez les levures l'effet inverse est observé) [144].
- **L'oxygène** : La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production de biosurfactant à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance, l'étude des effets synergiques sur *Lactobacillus pentosus* a reflété l'interdépendance de ces facteurs. Dans le cas de *B. subtilis* C9, un rendement trois fois plus élevé en lipopeptides a été observé dans des conditions limitées en oxygène par rapport à des conditions suffisantes en oxygène [145].
- **la concentration en sel** : la concentration en sels influence la production de certaines BS, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectant pas certaine BS, bien qu'il soit observé une légère diminution sur la concentration micellaire critique. Par exemple, chez les bactéries halophiles telles que les *Halomonas sp. BS4*, *B. subtilis BBK-1* à la concentration 8% de NaCl et le pH 6– 8 sont produit fonctionnaient mieux trois types de lipopeptides représentés au bacillomycine L, plipastatine et surfactine [146].

## II.6 Récupération des biosurfactants :

Il est important de choisir la méthode de récupération en fonction des propriétés spécifiques du biosurfactant, telles que sa charge ionique et sa solubilité dans l'eau, ainsi que de sa localisation (lié à la cellule ou extracellulaire). La plupart des biosurfactants sont sécrétés dans le milieu de culture et peuvent être isolés après filtration ou centrifugation pour éliminer les cellules bactériennes.

**Tableau II.3** : les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants

<b>Méthode de récupération</b>	<b>Description</b>
Extraction aux solvants organiques	Les biosurfactants sont extraits à l'aide de solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle, l'éther de pétrole, le chloroforme ou l'éthanol.
Adsorption suivie d'extraction aux solvants	Les biosurfactants sont adsorbés sur une surface solide, puis extraits à l'aide de solvants organiques.
Précipitation	Les biosurfactants sont précipités à l'aide d'un réactif approprié, puis récupérés par centrifugation ou filtration.
Cristallisation	Les biosurfactants sont cristallisés à partir de la solution, généralement en contrôlant la température et la concentration.
Centrifugation	Les biosurfactants sont séparés des cellules bactériennes par centrifugation à haute vitesse.
Fractionnement de mousse	Les biosurfactants sont récupérés à partir de la mousse formée à la surface du milieu de culture.

## **II.7 Rôle des biosurfactants :**

Le principal rôle physiologique des biosurfactants est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat. Cela facilite l'accès des micro-organismes aux nutriments présents dans le substrat [147].

Cependant, les biosurfactants jouent également d'autres rôles importants, tels que :

- **Émulsification** : Les biosurfactants ont la capacité de former des émulsions en dispersant des substances insolubles dans l'eau, ce qui favorise la dégradation et la solubilisation de composés hydrophobes.
- **Adhésion aux surfaces solides et formation de biofilms** : Certains biosurfactants facilitent l'adhésion des micro-organismes aux surfaces solides, favorisant ainsi la formation de biofilms. Les biofilms sont des communautés microbiennes qui se développent sur des surfaces et jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques.

- **Régulation du niveau énergétique** cellulaire : Les biosurfactants peuvent être utilisés comme source d'énergie par les micro-organismes, contribuant ainsi à maintenir leur niveau énergétique cellulaire.
- **Activité bactéricide** : Certains biosurfactants ont des propriétés antimicrobiennes et peuvent agir comme agents bactéricides en perturbant les membranes cellulaires des bactéries cibles.
- **Pathogénicité** : Chez certaines bactéries pathogènes, les biosurfactants peuvent jouer un rôle dans leur virulence et leur capacité à infecter les hôtes.
- **Piégeage des métaux lourds** : Certains biosurfactants ont la capacité de former des complexes avec les métaux lourds, contribuant ainsi à leur immobilisation et à leur élimination de l'environnement.

Ces différentes fonctions des biosurfactants soulignent leur importance dans de nombreux processus biologiques et leurs applications potentielles dans des domaines tels que l'industrie, l'agriculture, la médecine et la protection de l'environnement.

## **II.8 Caractérisation des biosurfactants :**

La purification et la caractérisation des biosurfactants doivent être réalisées en tenant compte de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou liée aux cellules). Différentes techniques sont utilisées à cet effet, notamment : CCM, GC-MS, LC-MS/MS, MALDI-TOF, FTIR.

### **II.8.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation et d'identification des composés d'un mélange [148]. Elle repose sur la migration différenciée des composés sur une plaque revêtue d'une fine couche de support. Les composés se séparent en fonction de leur affinité avec la couche mince et le solvant de développement. Après le développement, les composés apparaissent sous forme de taches ou de bandes sur la plaque [149].

La CCM est une méthode rapide et économique largement utilisée dans différents domaines scientifiques.

### **II.8.2 Caractérisation par Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse (GC/MS) :**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est une méthode sensible utilisée pour identifier et quantifier les lipopeptides et les biosurfactants à poids moléculaire élevé. Elle permet d'analyser la fraction lipidique des biosurfactants et d'identifier les structures d'acides gras. L'analyse par GC/MS facilite la

conversion des acides gras en esters méthyliques d'acides gras (FAME) et en dérivés de triméthylsilyle (TMS)

[150]. Différentes colonnes et conditions analytiques peuvent être utilisées, et le temps de rétention des FAME dépend de la longueur de la chaîne et du degré de séparation [151]. Pour préparer les dérivés d'éther TMS, on utilise du N-triméthylsilylimidazole (TMSI) et on chauffe la solution à une température spécifique [152].

### **II.8.3 Caractérisation par (LC-MS/MS) :**

La caractérisation par LC-MS/MS est une méthode combinant la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem. Elle permet d'identifier et de quantifier précisément les composants d'un mélange dans une fraction chromatographique obtenue avec une colonne chloroforme-méthanol [153]. Les échantillons sont préparés en les ionisant sous vide dans la région source après les avoir dissous dans une solution à base d'acétonitrile. La technique utilise une colonne C18 intégrée dans un système UPLC couplé à un spectromètre de masse. Les conditions expérimentales comprennent un temps de balayage, des tensions, des températures et des débits spécifiques. L'échantillon est injecté dans la colonne et soumis à une étape isocratique suivie d'une élution par gradient linéaire. Les fractions collectées sont lyophilisées et conservées à basse température. Selon les travaux, l'analyse par LC-MS/MS permet d'identifier des tensioactifs lipopeptidiques contenant un ensemble d'acides aminés associés à une fraction d'acide gras [154].

### **II.8.4 Identification par spectrométrie de masse type MALDI/TOF :**

La spectrométrie de masse MALDI/TOF est une technique d'identification rapide et précise des protéines et des peptides. Elle utilise un laser pour ioniser les échantillons et mesure leur temps de vol pour déterminer leur masse [148]. C'est une méthode largement utilisée en recherche biomédicale et en diagnostic clinique [155].

### **II.8.5 Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) :**

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique utilisée pour caractériser les substances en analysant les vibrations moléculaires dans la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle permet d'identifier les liaisons chimiques présentes dans un échantillon et d'obtenir des informations sur sa structure et sa composition. Cette méthode est couramment utilisée dans de nombreux domaines notamment en biologie [156].

## **II.9 Applications des biosurfactant :**

Effectivement, les biosurfactants, ou biotensioactifs, sont largement reconnus pour leurs propriétés non toxiques, biodégradables et leur capacité à rester fonctionnels dans des conditions extrêmes telles que le pH, la température et la salinité [157]. Ces caractéristiques en font des alternatives attractives aux tensioactifs chimiques dans de nombreux domaines d'application, tels que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique et la cosmétique.

### **II.9.1. Environnemental**

1. Bioremédiation des sites contaminés : Les biosurfactants sont utilisés pour la dégradation et la décontamination des sols et des eaux contaminés par des composés polluants tels que les hydrocarbures. Leur capacité à solubiliser ces polluants et à augmenter leur biodisponibilité facilite leur dégradation par des microorganismes décomposeurs [158].
2. Dispersion des nappes de pétrole : Les biosurfactants sont utilisés pour disperser les nappes de pétrole en petites gouttelettes, augmentant ainsi la surface de contact entre le pétrole et les microorganismes dégradateurs. Cela favorise la biodégradation naturelle du pétrole dans l'environnement marin [159].
3. Récupération assistée du pétrole : Les biosurfactants sont utilisés pour améliorer l'extraction du pétrole des réservoirs pétroliers. Ils réduisent la tension interfaciale entre l'eau et le pétrole, facilitant ainsi son déplacement et augmentant l'efficacité de récupération du pétrole [160].
4. Chélation des métaux lourds : Les biosurfactants peuvent chélater les métaux lourds, tels que le plomb, le zinc, le cadmium et le cuivre, en formant des complexes solubles. Cela permet de réduire la toxicité des métaux lourds et de faciliter leur élimination des sites contaminés [161].
5. Applications dans le traitement des eaux : Les biosurfactants sont utilisés dans le traitement des eaux usées pour améliorer la dégradation des contaminants organiques, faciliter la séparation des phases liquides et solides, et réduire les tensions superficielles pour une meilleure filtration [159].

Ces applications environnementales des biosurfactants contribuent à des processus de dégradation plus efficaces, à la réduction des impacts environnementaux et à la gestion des sites contaminés de manière plus durable. Les biosurfactants offrent ainsi des alternatives plus respectueuses de l'environnement par rapport aux surfactants traditionnels d'origine pétrochimique.

### **II.9.2 Industrie cosmétique**

Les biosurfactants présentent des propriétés uniques qui les rendent potentiellement utiles dans l'industrie cosmétique. Leur activité anti-rides et hydratante sur la peau humaine

en fait des candidats intéressants pour les produits de soins de la peau. De plus, ces biomolécules sont caractérisées par leur activité antioxydante et antimicrobienne, ce qui peut apporter des avantages supplémentaires [162].

En tant qu'agents nettoyants et anti-rides, les biosurfactants stimulent la production de collagène et d'élastine dans la peau. Leurs propriétés anti-radicalaires et hydratantes les rendent attractifs pour la formulation de produits de soins de la peau. En remplaçant les surfactants chimiques par des biosurfactants, il est possible de favoriser la guérison de lésions cutanées mineures [163].

Parmi les biosurfactants, les rhamnolipides se sont révélés efficaces dans divers traitements de la peau, tels que la cicatrisation des plaies, la guérison des brûlures et le traitement des rides. Des entreprises cosmétiques aux États-Unis ont déjà développé et commercialisé des produits formulés à base de lipopeptides, qui sont des biosurfactants, en tant qu'agents anti-âge [164]. L'utilisation des biosurfactants en industrie cosmétique offre la possibilité d'incorporer des ingrédients naturels et durables dans les produits de soins de la peau. Leurs propriétés uniques et leurs avantages potentiels en termes d'hydratation, de stimulation du collagène et d'activité antimicrobienne en font des alternatives prometteuses aux surfactants chimiques traditionnels.

### **II.9.3 Agriculture**

Les biosurfactants trouvent également des applications dans l'agriculture en contribuant à l'élimination des agents pathogènes des plantes et à l'amélioration de la biodisponibilité des nutriments pour les microorganismes bénéfiques associés aux plantes. En tant qu'antagonistes, les biosurfactants empêchent la propagation des zoospores, qui sont des formes de spores mobiles des pathogènes, dans les systèmes de culture sans sol, tels que l'hydroponie. Cela aide à contrôler les infections fongiques et à réduire les dommages causés aux plantes par ces agents pathogènes [165].

De plus, les biosurfactants peuvent être largement utilisés pour améliorer la qualité des sols agricoles en assainissant les sols contaminés. Ils aident à dégrader les composés toxiques, tels que les pesticides et les hydrocarbures, présents dans les sols contaminés, contribuant ainsi à restaurer leur fertilité et leur santé [166].

Ces applications des biosurfactants en agriculture offrent des avantages potentiels tels que la protection des plantes contre les pathogènes, l'amélioration de la santé des sols et la promotion de la croissance des microorganismes bénéfiques pour les cultures.

### **II.9.4 Industries alimentaires**

Les biosurfactants sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour différentes applications. Ils sont utilisés comme émulsifiants dans le traitement des matières premières, y compris dans l'industrie de la viande et dans la fabrication de vinaigrettes. Leur capacité à stabiliser les émulsions est particulièrement bénéfique pour améliorer la texture et la stabilité des produits alimentaires.

En tant qu'additifs alimentaires, les biosurfactants sont utilisés pour améliorer la stabilité de la pâte, le volume et la texture des produits de boulangerie. L'ajout de surfactants rhamnolipides,

par exemple, peut contribuer à améliorer la conservation des produits de boulangerie, ce qui est essentiel pour assurer leur fraîcheur et leur durée de vie [167].

Ces applications des biosurfactants dans l'industrie alimentaire offrent des avantages tels que l'amélioration des propriétés fonctionnelles des aliments, la stabilisation des émulsions et l'amélioration de la conservation des produits.

## II.9.5 Biomédical

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des biosurfactants dans le domaine médical a connu une augmentation significative. Ces molécules se révèlent être des agents thérapeutiques pertinents, présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales. Ils trouvent des applications dans la lutte contre de nombreuses maladies infectieuses, les soins de santé publique, sans nécessiter l'utilisation de drogues synthétiques et de produits chimiques [168].

Les biosurfactants ont également trouvé des applications avantageuses dans d'autres domaines.

- **Dans le secteur de haute technologie**, tels que l'impression électronique, l'enregistrement magnétique et la micro-électronique, ils sont utilisés pour améliorer les performances des dispositifs électroniques [169]. De plus, dans le domaine des nanotechnologies, les biosurfactants sont utilisés dans la fabrication de nanoparticules d'argent, de tiges de NiO, et d'autres applications [170].
- **Dans le secteur de la détergence** : les biosurfactants sont des composants essentiels de la formulation des détergents. Ils représentent en moyenne 20% de la composition des détergents [171]. Les lipopeptides cycliques (CLP), par exemple, se sont avérés stables dans une large gamme de pH et conservent leurs propriétés tensioactives même à des températures élevées. Ils ont également montré une capacité d'émulsion avec des huiles végétales et une excellente compatibilité et stabilité avec les détergents à lessive commerciaux, ce qui les rend adaptés à être inclus dans les formulations de détergents [172].

Ces diverses applications des biosurfactants, tant dans le domaine médical que dans d'autres secteurs, démontrent leur polyvalence et leur potentiel pour remplacer les produits chimiques synthétiques par des alternatives plus durables et respectueuses de l'environnement.

# **Matériel et méthodes**

## **Conditions du travail**

Toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans le travail microbiologique, en utilisant un matériel stérilisé à proximité de la flamme d'un bec benzène, en passant à la flamme les orifices des tubes et des flacons ; et une stérilisation de tous ce qu'est liquide par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

### **I. Méthodologie de travail :**

#### **I.1. Prélèvement des échantillons :**

Sur terrain, les échantillons du sol sont prélevés à partir de 40 cm de profondeur selon la norme NF ISO 11464-1998 pour les analyses physicochimiques et à une profondeur de 20 cm selon la norme ISO 10381-1994 pour les analyses microbiologiques.

Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques sont conservés dans des flacons à 4 °C, par contre ceux destinés aux analyses physicochimiques sont d'abord séchés à l'air libre et tamisés pour éliminer les débris puis conservés dans des flacons à l'abri de la lumière à 4 °C.

#### **I.2. Analyses physico-chimiques du sol :**

##### **I.2.1 Analyse physique :**

###### **○ Granulométrie :**

La composition granulométrique caractérise la texture du sol, elle détermine les proportions relatives du gravier, sables, limon et argiles, obtenue après ruptures des agrégats et dispersion de l'argile.

Pour réaliser l'analyse granulométrique du sol, on utilise des tamis qui contiennent des ouvertures carrées de dimensions normalisées. La dimension des tamis est donnée par l'ouverture de la maille, c'est-à-dire par la grandeur de l'ouverture carrée.

On se reporte aux recommandations de la norme française NF X 11.507 pour effectuer les analyses granulométriques dans les meilleures conditions à savoir :

- Tamiser le sol successivement sur les tamis normalisés AFNOR n° X 11.507 et noter la masse retenue sur chaque tamis.

- Calculer, à partir de ces résultats, la masse du sol qui a traversé chaque tamis et l'exprimer en pourcentage.

###### **○ Préparation de lixiviation de sol :**

###### **• Mode opératoire :**

Selon la norme (Normes NFX 31 160), l'extraction est réalisée selon le protocole suivant :

- Introduire 100g d'échantillon de sol dans un bêcher contenant 1000 ml d'eau distillée ;

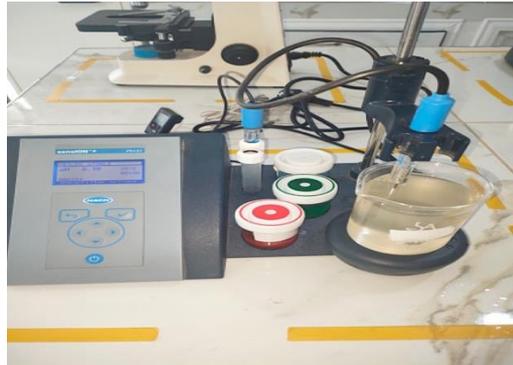
- Agiter pendant 2 heure (15tr/min) et laisser décanter

## I.2.2 Analyse physico-chimique :

### ○ **Mesure de pH par électrométrie :**

Le pH est déterminé par la différence du potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence plongeant dans la solution du sol. Cette différence du potentiel est une fonction linéaire du pH de cette solution.

La valeur du pH est celle affichée par le pH mètre de type sens ION+pH31 après sa stabilisation.



**Photo I.1 : Spectrophotomètre type sens ION+pH 31**

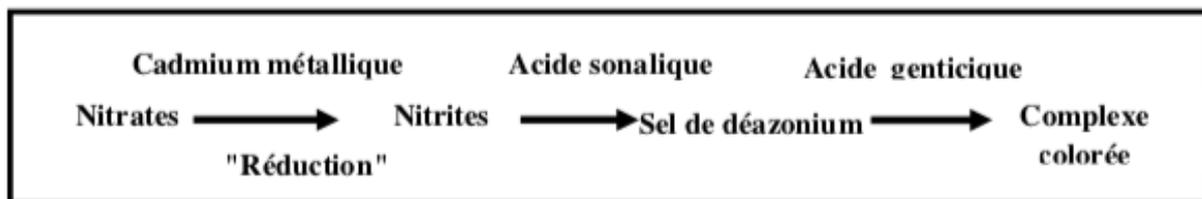
### ○ **Conductivité électrique (CE) :**

La conductivité électrique est mesurée sur l'extrait filtré de sol. Elle doit être exprimée en décisiemens par mètre (ds/m) (BAIZE, 2000) [173]. Elle a été déterminée par un conductimètre de type HQ430d flexi.

## I.2.3 Analyses chimiques :

### ○ **Dosage des nitrates :**

Le dosage des nitrates nécessite une mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifiques de l'élément recherché selon la réaction suivante (Normes NFX 31 160) :



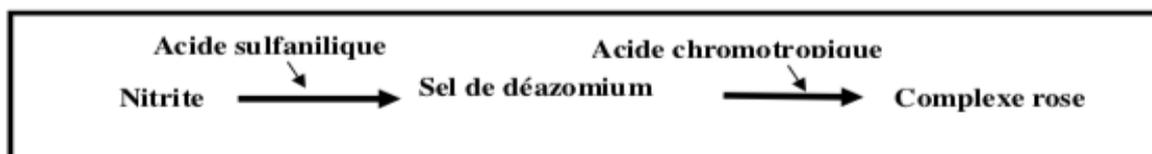
Ce dosage par spectrophotomètre est effectué à une longueur d'onde de 400 nm pour les faibles concentrations et de 500nm pour les fortes concentrations.

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre (DR3900) à une longueur d'onde de 500 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrate.

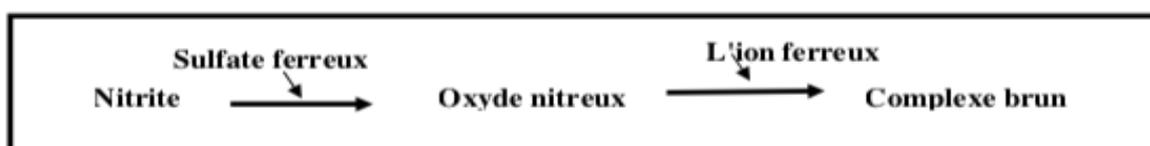
- **Dosage des nitrites :**

Le dosage des nitrites nécessite une mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché. Dans ce cas, la réaction dépend de la teneur en nitrites.

Pour les faibles concentrations, la réaction est la suivante (Norme NFT 90-013) :



Pour les fortes concentrations, la réaction est :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrites.

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre (DR3900) à une longueur d'onde de 580 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en nitrite.

- **Evaluation du taux de la biodégradabilité des hydrocarbures (B%) :**

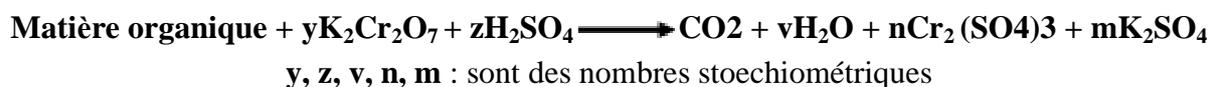
Evaluation du taux de la biodégradabilité des hydrocarbures est une méthode normalisée (Norme ISO 9 408, 1991) qui consiste à évaluer ou estimer la biodégradation ultime des composés organiques par voie biologique en aérobiose.

Selon la norme ISO 9 408, le taux de biodégradabilité est calculé selon la formule suivante :

$$B (\%) = DBO / DCO$$

- **Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO)**

Le test de la DCO selon la norme NFT 90-101 consiste la mesure de l'oxygène équivalent à la quantité des matières organiques oxydables par le dichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ). Dans une solution d'acide sulfurique à 50%, un composé à base d'argent est ajouté comme catalyseur et un autre mercurique est ajouté pour réduire les interférences dues à l'oxydation des ions chlorures par le dichromate, d'après la réaction :



L'oxydation effectuée à une température de 150°C pendant deux heures, le lecteur se fait à l'aide du spectromètre DR3900 à une longueur d'onde de 600nm.

- **Détermination de la demande biologique en oxygène (DBO5)**

Selon la norme NFT 90-103, la mesure de la DBO repose sur la quantification de l'oxygène consommé après 5 jours d'incubation de l'échantillon.

Au cours de l'incubation de l'échantillon à l'obscurité et à 20°C, se produisent des réactions physico-chimiques et biologiques qui se traduisent par un métabolisme de la matière organique et une consommation d'oxygène. Si l'eau contient des concentrations importantes en substances réductrices celle-ci absorbent rapidement l'oxygène dissout dans l'eau. Deux réactions d'oxydation se produisent

- Une oxydation lente par voie chimique des composés organiques et minéraux.
- Une métabolisation des matières organiques assimilables.

- **Matières en suspension (Norme NF T 90 105) :**

Le lixiviat est filtré et le poids des matières retenues sur le filtre est déterminé par différence de pesée. Le taux de matières en suspension exprimé en mg/l est donné par la formule :

$$\text{MES (mg/l)} = (\text{m}_2 - \text{m}_1) / \text{PE} \times 10^6$$

**m<sub>1</sub>** = la masse du filtre vide (en g)

**m<sub>2</sub>** = la masse du filtre plein (en g)

**PE** = le volume de la prise d'essai d'eau à analyser (en ml)

### **I.3 Analyses microbiologiques du sol :**

- **Dénombrement de la microflore totale en aérobiose :**

Afin de dénombrer la microflore existante dans les échantillons de sol contaminés par les hydrocarbures, nous avons procédé à une culture sur gélose nutritive, une série de dilution variant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> a été préparée selon les étapes suivantes :

**Préparation de la solution mère :**

Une quantité de 1 g de sol est introduite dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique préalablement autoclavée . Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes, le contenu du tube représente la solution mère.

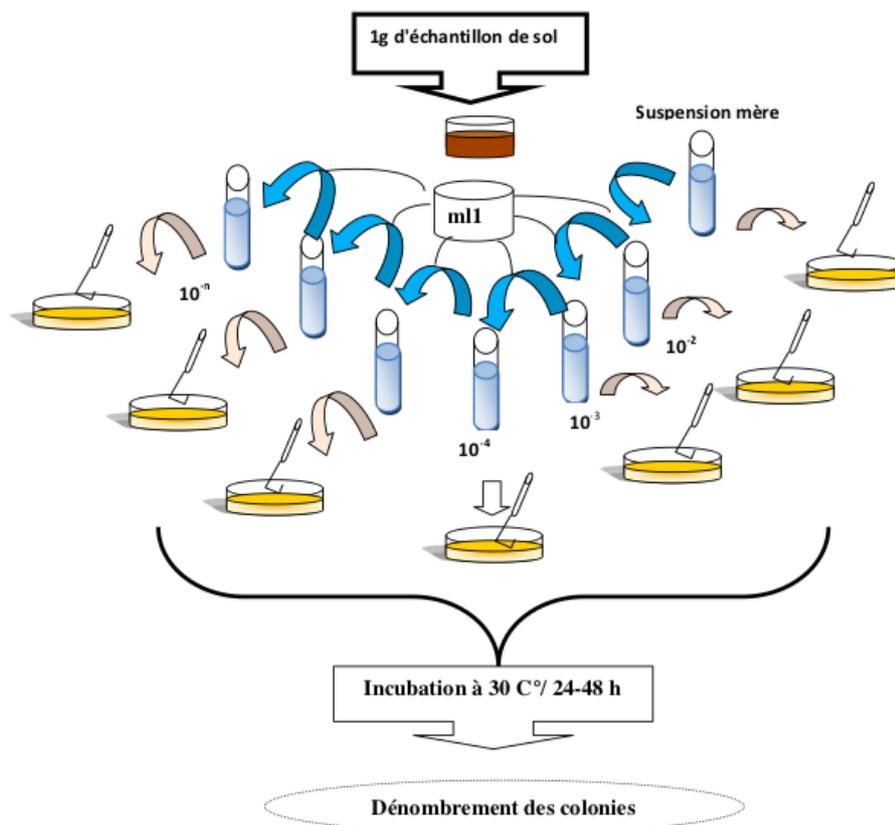
**Préparation des dilutions :**

1 ml de la solution mère est ajouté dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, le mélange représente la dilution  $10^{-1}$ , 1 ml de cette dilution est mélangé avec 9 ml d'eau physiologique, correspondra à la dilution  $10^{-2}$ . On continue ainsi jusqu'à la dilution  $10^{-9}$ .

**Ensemencement par étalement sur gélose nutritive :**

Le milieu gélosé préalablement fondu est réparti dans des boites de pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm qu'on laisse ensuite refroidir. 0,1ml de chaque dilution est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur puis déposé sur la gélose, ensuite étalé sur toute la surface du milieu.

La figure ci-dessous représente les différentes étapes de dénombrement des colonies microbiennes



**Figure I.1 :** Méthode d'analyse microbiologique.

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies. Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule

$$N = n/d.v$$

D'où :

**N** : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

**n** : nombre des colonies dénombrées.

**V** : Volume prélevé (0.1ml).

**d** : Dilution (MARCHAL et BOURDON, 1982).

## II. Production de biosurfactant :

### ➤ Milieux de cultures utilisés :

Dans ce travail nous avons utilisé deux milieux de culture, l'un pour la croissance de bactérie productrice (milieu Luria Bertani) et l'autre pour la production de biosurfactant (milieu Minimum).

Le tableau ci-dessous représente la composition chimique des milieux de cultures utilisés.

**Tableau II.1** : composition chimique des milieux de cultures

Milieu de culture	Milieu Luria Bertani (LB)	Milieu Minimum (MM)
Composition chimique	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 g peptone,</li><li>• 5 g extrait de levure,</li><li>• 10 g NaCl,</li><li>• 1L d'eau distillée</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></li><li>• 0.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li><li>• 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li><li>• 10 g NaCl</li><li>• 0.2 g MgSO<sub>4</sub></li><li>• 0.02 g CaCl<sub>2</sub></li><li>• 1 L d'eau distillée</li></ul>
pH de milieu	7,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2

Les milieux de culture, remplis dans des erlenmeyers fermés hermétiquement ont été stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

### ➤ Sources de carbone utilisée :

Nous avons utilisé une seule source de carbone hydrophobe pour la production de biosurfactant : l'huile d'olive. Elle est ajoutée au milieu après sa stérilisation sur des filtres à seringue de 0,22 µm stérile.

## II.1 Préparation de la préculture :

La préculture est effectuée dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu Luria Bertani (LB).

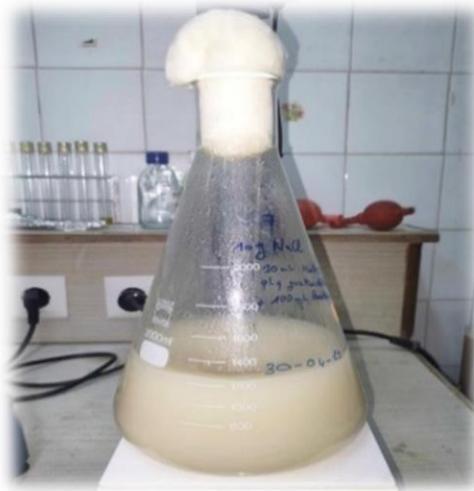
Après avoir stérilisé le milieu LB par autoclavage, on prélève une colonie de la souche bactérienne à l'aide d'une anse en platine stérile, et on la met dans l'erlenmeyer. Ensuite la préculture est mise dans un incubateur (shaker) à 30 °C sous agitation (200 rpm) pendant 24h.

## II.2 Production de biosurfactant :

La production de biosurfactant est faite dans des erlenmeyers de 2L contenant 1 L de MM, ajouté d'une préculture bactérienne de la souche productrice (déjà préparé au paravent), un volume de 10mL d'huile d'olive et 3 à 4 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  sont ajoutés aussi. Les erlenmeyers sont incubés à 30 °C sous une agitation de 200 tr/min pendant 72h.



**Photo II.2.a :** Milieu de culture de production de biosurfactant de la souche S7 avant incubation



**Photo II.2.b :** Culture de production de biosurfactant de la souche S7 après la période d'incubation.

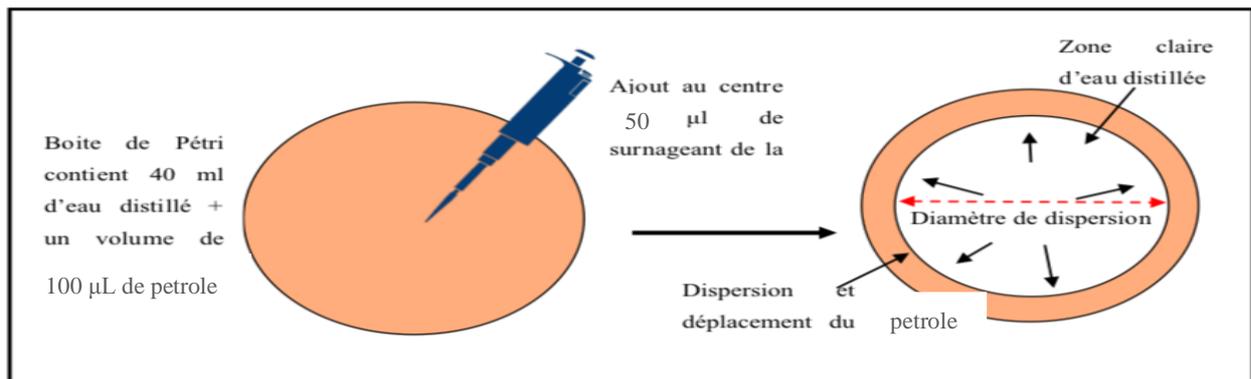
## II.3 Evaluation de la production de biosurfactant :

La production de biosurfactant a été détectée par la mesure de trois grandeurs qui sont le déplacement de pétrole (DDP), la tension superficielle (TS) et l'indice d'émulsification (E24). Pratiquement, un volume bien déterminé de la culture bactérienne a été centrifugé à 4500

tr/min pendant 30 mn à 4°C, le surnageant récupéré est utilisé pour les techniques de mesure ci-dessous.

✓ **Déplacement de pétrole DDP :**

Dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, on dépose 40 mL d'eau distillée, puis on rajoute une quantité de 100 µL de pétrole à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau on dépose 50 µL de surnageant de culture au centre délicatement. Après 30 secondes, on mesure le diamètre de déplacement de pétrole halo (zones claires). Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante [174].



**Figure II.1:** Test de la dispersion du pétrole.

✓ **Tension superficielle (TS) :**

La Tension de superficielle du biosurfactant présent dans le surnageant de culture est mesurée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389) [175].



**Photo II.5 :** Mesure de la tension de surface à l'aide d'un tensiomètre.

✓ **L'indice d'émulsification (E24) :**

Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe dans une phase hydrophile (le surnageant de culture) [176]; Le protocole consiste à mélanger 4 mL de surnageant avec 4 mL d'une source hydrophobe dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 2 min puis laissés se reposer pendant 24 h à

l'obscurité, la comparaison est faite avec le témoin qui est constitué du 4 mL d'une source hydrophobe incorporés dans 4 mL d'eau distillé.

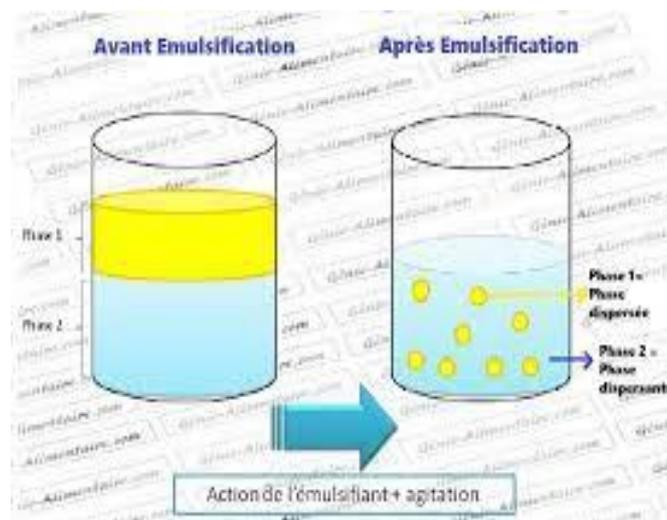
Nous avons calculé l'indice d'émulsion (E24) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante :

$$E24(\%) = He/Ht \times 100$$

**E24** : Activité d'émulsification des 24h.

**He** : Hauteur de l'émulsion formée.

**Ht** : Hauteur totale du mélange.



**Figure II.2** : Teste d'indice d'émulsification.

## **II.4 Récupération de biosurfactant :**

La récupération de biosurfactant produit par la souche S7 a été faite selon les étapes suivantes :

### **II.4.1 Centrifugation :**

Après avoir une production maximale de biosurfactant en 72h, nous repositionnons le contenu de l'erlenmeyer dans des flacons spéciaux et mettons dans la centrifugeuse à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C afin de récupérer le surnageant de culture contenant le biosurfactant.

### **II.5.2 Filtration :**

La filtration permet de séparer efficacement la biomasse restante en suspension après la centrifugation, ce qui permet d'obtenir un surnageant plus pur.



**Photo 7a** : filtration avec papier filtre



**Photo 7b** : filtration sous vide

**Photo II.7**: Filtration avec deux méthodes.

### **II.5.3 Acidification :**

Nous avons abaissé le pH de surnageant à 2, en ajoutant une solution de HCl (6M), puis on les laisse au réfrigérateur pendant 24 h. On centrifuge en deuxième fois le surnageant à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C pour confirmer l'existence de biosurfactant (soit dans le culot ou dans le surnageant). Après avoir testé les deux parties (culot + surnageant) nous avons confirmé que le biosurfactant existe dans le surnageant.

### **II.5.4 Extraction :**

Le tableau ci-dessous montre les méthodes d'extraction de biosurfactant utilisées :

**Le tableau II.2** : les méthodes d'extraction de biosurfactant utilisées

Solvant d'extraction	Méthodes utilisées
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Acétate d'éthyle</b></li> </ul>	<p>On récupère le surnageant contenant le biosurfactant en le mélangeant avec de l'un des solvants (v/v). Ce mélange est ensuite agité vigoureusement dans une ampoule à décanter, puis laissé au repos pendant 24h</p> <p>Une fois que les phases se sont séparées, on procède à la décantation de la première phase. La phase organique (le solvant contenant le biosurfactant) se trouve en haut, tandis que la phase aqueuse (le milieu de culture) se trouve en bas, sauf pour le chloroforme-méthanol la phase aqueuse se trouve en haut et la phase organique se trouve en bas de l'ampoule.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Éthanol</b></li> </ul>	<p>Nous mettons le volume de surnageant dans un erlenmeyer et nous l'ajoutons de l'éthanol (remplie dans une burette graduée) à la fois. Le surnageant est précipité avec 3 volumes d'éthanol contre un volume de celui-ci. La précipitation est favorisée par le froid en mettant de la glace autour de l'erlenmeyer qui contient le surnageant. La solution obtenue est laissée au réfrigérateur à 4°C pendant une nuit. Elle est ensuite centrifugée au froid (à une température de 4°C) pour récupérer le produit. Enfin , le produit est solubilisé dans un volume d'eau distillée puis pesé.</p>



**Photo II.8** : Extraction avec l'acétate d'éthyle.

Après avoir obtenu la phase organique contenant le Biosurfactant, on utilise l'évaporateur rotatif pour distiller le solvant et concentrer le Biosurfactant.

## II.5.5 Rendement d'extraction

$$R = (m_{\text{Biosurfactant récupéré}} / V_{\text{culture de production}})$$

**Avec :**

$m_{\text{Biosurfactant récupéré}}$  : masse de biosurfactant récupéré en grammes.

$V_{\text{culture de production}}$  : volume de la culture de production en litre.

## II.6 Dilution Micellaire Critique (CMD)

La dilution micellaire critique (CMD) est définie comme la solubilité d'un tensioactif dans une phase aqueuse, elle est couramment utilisée pour mesurer l'efficacité d'un tensioactif [177] Pour déterminer la CMD, on a mesuré la tension superficielle et le diamètre de déplacement de pétrole de surnageant de culture d'une série de dilutions de 1 à 1000 [178]

## II.7 Concentration Micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique (CMC) s'agit d'une mesure directe de la concentration en tensioactif correspondant à la concentration d'un composant amphiphile au niveau duquel la formation de micelles est initiée dans la solution [179].

La CMC du biosurfactant produit a été déterminée par les méthodes standard [180][181] sur une gamme de concentration de 0 à 1800 mg/L.

## II.8 Caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR

La caractérisation de biosurfactant par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode couramment utilisée pour analyser la structure et identifier les bandes d'absorption caractéristiques des groupes fonctionnels présents dans le biosurfactant.

l'analyse a été faite dans une plage appropriée de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , avec un appareil de type **Thermo Scientific Nicolet iS10**.

l'interprétation a été faite en comparant les positions des bandes d'absorption obtenue avec les bases de données spectrales ou avec les spectres de la littérature [182].

## II.9 Essai de l'application de biosurfactant dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable (sol synthétique) sur colonne

Une colonne en verre mesurant 60 cm de hauteur x 4 cm de diamètre a été initialement remplie avec 200 g d'un mélange contenant le sable et 10 % d'huile moteur. La surface a ensuite été inondée de 200 mL de surnageant de culture de production de biosurfactant BS7.

La percolation de la solution de biosurfactant a été surveillée pendant 24 h, jusqu'à aucune autre percolation de la solution n'a été observée. Après le lavage de la colonne par le surnageant de culture, les échantillons de sol ont été lavés avec 20 ml d'hexane pour éliminer l'huile résiduelle. Le solvant a été évaporé à 50°C et la quantité d'huile retirée a été déterminée par gravimétrie comme décrit ci-dessous :

$$\text{Huile récupérer} = (h_i - h_r) / h_i * 100$$

D'ou :

**hi** : est la masse d'huile initial dans le sable avant le lavage en g.

**hr** : est la masse d'huile restant dans le sol après le lavage en g.

L'eau distillée est utilisée comme un témoin en suivant le même mode d'opérateur.

Les différentes étapes d'application de surnageant de culture sur le sable contaminé par l'huile de moteur sont illustrés dans le tableau ci-dessous [183].

**Tableau II.3 :** Les étapes d'élimination d'huile de moteur du sable contaminé sur colonne.



## **II.10. Remobilisation des hydrocarbures contaminant le sol à l'aide de biosurfactant BS7 (sol réel)**

La grande capacité des biosurfactants à former des émulsions stables avec les hydrocarbures, indique leur tendance à améliorer la remobilisation des hydrocarbures à partir des sols contaminés [184] Le lavage des sols pollués par les hydrocarbures, à l'aide des solutions de biosurfactant peut donc réduire leur degré de contamination.

Afin de remobiliser les hydrocarbures contaminants le sol, 10 g de sol contaminé réellement ont été ajoutés à 100 ml d'une solution de biosurfactant de concentration égale à celle de la CMC. Ensuite, le mélange a été mis sous agitation de 200 tr/min à la température ambiante pendant 2 h, et le surnageant (contenant les hydrocarbures) a été récupéré par centrifugation. Les hydrocarbures ont ensuite été extraits deux fois par le dichlorométhane et concentré par évaporateur rotatif. [175].

Le Tween 80 (surfactant chimique) et l'eau distillée sont utilisés comme témoins.

Le sol avant et après traitement est analysé avec la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR afin de déterminer les fractions remobilisées durant l'expérience.

La quantification des hydrocarbures est réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, de marque SHIMADZU ; type GCMS-QP2020NX. Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 24 ml/min, la température de l'injecteur a été fixée à 300°C.

Le programme du gradient de température est comme suit : 2 min à 40°C, puis la température augmente jusqu'à 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 [185].

Les différentes étapes de remobilisation des hydrocarbures sont illustrées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau II.4 :** Les différentes étapes de remobilisation des hydrocarbures du sol par le BS7

	<p><b>Mélange de sol contaminé par les hydrocarbures et les solutions de biosurfactant</b></p> <p>↓</p>
	<p><b>Extraction de hydrocarbures récupérés par extraction liquide-liquide</b></p> <p>↓</p>
	<p><b>Phase organique après décantation (hydrocarbure et dichlorométhane)</b></p> <p>↓</p>
	<p><b>Les hydrocarbures récupérés après le traitement</b></p> <p>↓</p>
	<p><b>Quantification des hydrocarbures par GC-MS</b></p>

# **Résultats et discussions**

## I. Analyses physicochimiques du sol :

### I.1 Analyse physique :

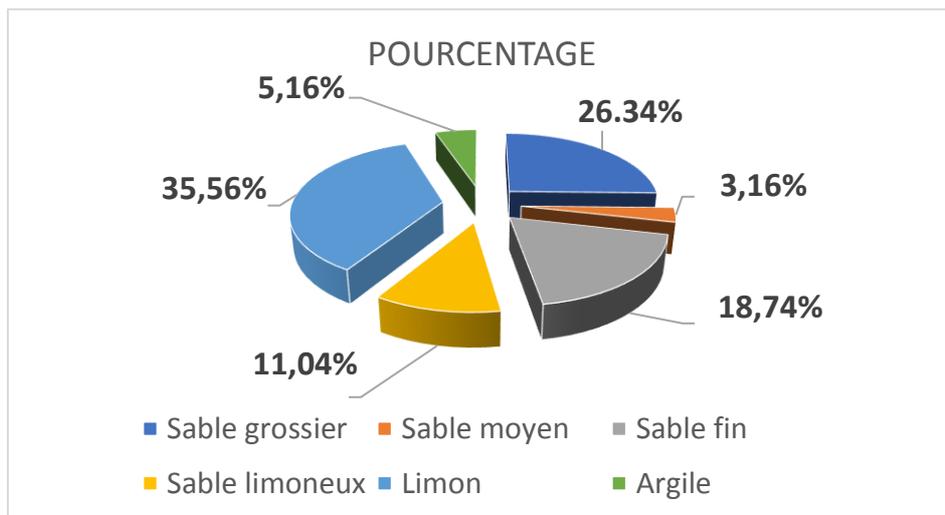
#### a. Granulométrie

Les résultats des analyses granulométriques de notre échantillon de sol sont représentés par la **Figure I.1** qui fait ressortir une prédominance de la fraction sableuse dans notre échantillon de sol avec 26,34% de sable grossier, 3,16% de sable moyen, 18,74% de sable fin et 11,04% de sable limoneux, les autres fractions sont représentées par 35,56% de limon et 5,16% d'argiles.

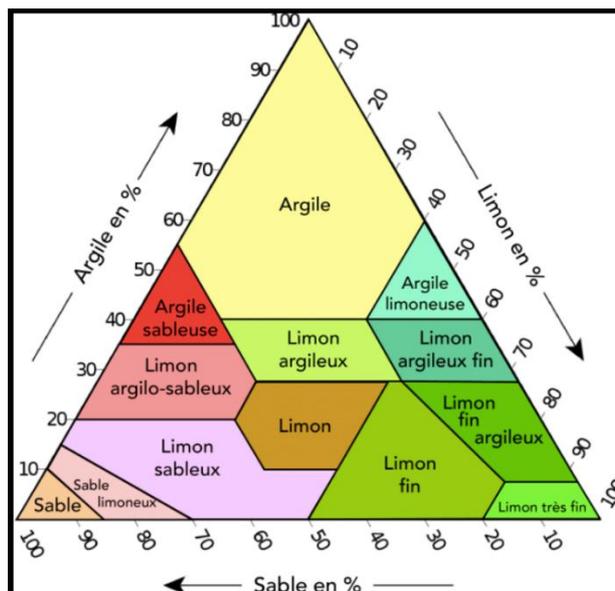
Le sol étudié est donc classé comme très sableux selon le triangle textural du Groupement d'Etudes des Problèmes de Pédologie Appliquée : GEPPA, **Figure I.2**.

L'importance de la fraction sableuse dans le sol étudié suggère une bonne perméabilité facilitant ainsi la circulation des fluides contenant les nutriments et l'oxygène qui seront d'autant plus accessibles aux microorganismes que le milieu est perméable, sa diminution va limiter leur extension, aboutissant à la fin à une mauvaise biodégradation [15]. En effet, une faible perméabilité limite le passage d'air nécessaire pour promouvoir la croissance bactérienne[6].

Cependant, la faible proportion en argile de notre sol affecte négativement l'activité microbienne puisqu'on peut considérer que la fraction d'argile se comporte comme une sorte d'entrepôt dans lequel serait mise en réserve une partie de ressources nutritives, assurant de cette façon aux microorganismes un plus grand étalement dans l'espace et la disponibilité des nutriments et de l'eau [186].



**Figure I.1:** Composition granulométrique du sol étudié.



**Figure I.2 :** Triangle Textural.(Denis et al.1995)

## I.2 Analyses physico-chimiques :

Les résultats des différents paramètres physico-chimiques sont représentés dans le Tableau I.1

**Tableau I.1 :** Paramètres physicochimiques de sol étudiée

PARAMETRES	RESULTATS
Conductivité	0.1915 dS/m
pH	6,64±0,04
Oxygène dissous	5.95 mg/l
Température	24.8°C

La valeur du pH est de l'ordre de 6,64 indique une légère acidité, comparativement à un sol neutre aurait un pH égal à 7. La légère acidité du sol peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que la présence de matière organique décomposée ou la composition minérale spécifique du sol.

Par ailleurs, la conductivité électrique est de l'ordre de 0,1915 dS/m elle est suggérée comme une faible conductivité, pour notre échantillon, la conductivité faible peut indiquer une faible concentration d'ions dissous, ce qui peut être associé à une faible salinité du sol.

D'autre part l'oxygène dissous de 5,95 mg/l indique la quantité d'oxygène présent dans lixiviation du sol, elle est élevée, une teneur en oxygène dissous relativement élevée est généralement considérée comme bénéfique pour le développement des racines des plantes et pour les processus de décomposition des matières organiques.

La température de 24,8 °C fournit des informations sur les conditions environnementales locales, cela peut avoir un impact sur les processus biologiques et chimiques se produisant dans le sol.

### I.3 Analyses chimiques :

Les résultats des différents paramètres de pollution sont représentés dans le Tableau I.2

**Tableau I.2 :** Paramètres de pollution de sol contaminé étudié

PARAMETRES	RESULTATS
Azote total	17.5mg/L
Nitrates (mg/l)	0.53mg/L
Nitrites (mg/l)	1.596mg/L
DCO	65 mgO <sub>2</sub> /L
DBO <sub>5</sub>	35mgO <sub>2</sub> /L
MES	113 g/l
DBO/DCO	0.54

La concentration d'azote total dans le sol étudié est de l'ordre de 17.5 mg/L. Il est important de surveiller les concentrations de nitrates, en particulier dans les zones où l'agriculture intensive est pratiquée. Par conséquent la concentration de nitrates dans le sol étudié est de 0.53 mg/L.

Nous avons trouvé que la concentration de nitrites dans le sol est de l'ordre de 1.596 mg/L. La présence de nitrites peut indiquer une dégradation de la matière organique dans le sol.

La demande chimique en oxygène totale (DCO) est de 65 mgO<sub>2</sub>/L ; Une demande chimique en oxygène élevée peut indiquer une contamination organique du sol.

Et encore la demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO<sub>5</sub>) est de 35 mgO<sub>2</sub>/L, une DBO<sub>5</sub> élevée peut indiquer une pollution organique récente.

La concentration de MES dans le sol est de 113 g/L ; Des niveaux élevés de MES peuvent indiquer une érosion du sol ou une activité humaine perturbant l'environnement.

Dans le contexte général, une DBO/DCO de 58,3% pourrait indiquer un niveau de contamination organique relativement élevé dans le sol Saharien étudié. Cela suggère la présence d'une quantité significative de matières organiques qui nécessitent une demande en oxygène importante pour leur dégradation biologique et chimique.

## **I.4 Analyses microbiologiques du sol :**

### **a. Dénombrement de la microflore totale :**



**Photo I.1 :** Une nappe de microflore

Il ressort de cette photo qu'il y a une présence d'une microflore dans notre échantillon, mais l'échantillon de l'avant traitement est très riche en concentrations bactériennes, il se trouve qu'après  $10^{-9}$  de dilution la microflore est indénombrable.

Contrairement à l'échantillon qui contient le sol traité par le surnageant 07 qui contient le biosurfactant à une dilution  $10^{-6}$ , il présente une faible microflore avec une valeur de  $1,1 \cdot 10^3$  UFC/g de sol sec.

L'importance de la microflore autochtone du borbier suggère la possibilité de cette dernière à assurer la biodégradation des hydrocarbures, sachant que selon Margesin et Schinner, une teneur  $\geq 10^6$  germes/g de sol sec est suffisante pour procéder à la biodégradation de ces composés.

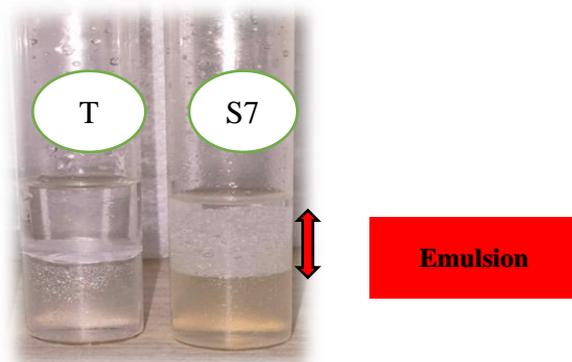
### **II.1 Evaluation de la Production de Biosurfactant :**

D'après le travail réalisé, un isolat bactérien marin (S7) a été choisi d'une collection de 16 isolats des bactéries marines du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (Université Blida 1). La souche bactérienne semble la plus performante vu la production maximale de biosurfactant, en tenant compte l'abaissement de tensions superficielle, le grand diamètre de déplacement de pétrole, et la formation des émulsions, les résultats sont mentionnés dans le Tableau II.1.

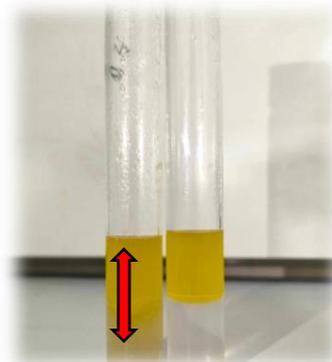
**Tableau II.1:** TS, DDP et E24 de la production de biosurfactant par la souche S7.

Souche Bactérienne	TS (mN/m)	DDP (mm)	E24 (%)	
			HO	Kérosène
S7	28.36	80	75%	62.5%

D'après les résultats obtenus, la souche S7 a été considérée comme une souche performante productrice de biosurfactant avec un diamètre élevé de déplacement de pétrole, une tension superficielle très basse de 28,36 mN/m, indiquant de bonnes propriétés tensioactives. Ainsi, le biosurfactant a une activité émulsifiante intéressantes vis-à-vis l'huile d'olive et le kérosène supérieur à 50%. Les résultats de la souche S7 sont donnés dans les figures II.1 et II.2.



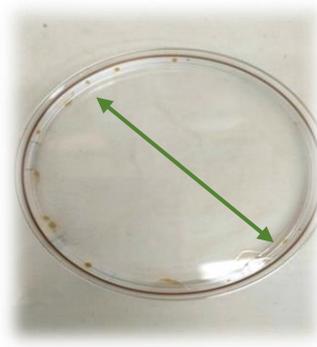
**Figure II.1 :** Résultat de test E24 de la avec Kérosène (62.5%)



**Figure II.2 :** Résultat de test E24 de la S7 avec l'huile d'olive (75%).



Avant



Après

**Figure II.3 :** Déplacement de Pétrole de la souche S7 (80mm)

Noha et al. [187] ont rapporté que la technique de « Déplacement du pétrole » est une méthode fiable pour mise en évidence de la production de biosurfactants. Čipinytė, et al. [188] ont montré la présence d'une relation proportionnelle entre la concentration des biosurfactants et la surface de la zone claire de déplacement du pétrole.

Mulligan et al. [161] ont indiqué qu'un bon biosurfactant peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72mN/cm à 35mN/cm, et la tension interfaciale (entre un liquide polaire et apolaire) de l'eau contre le n-hexadécane de 40 mN/cm à 1 mN/cm.

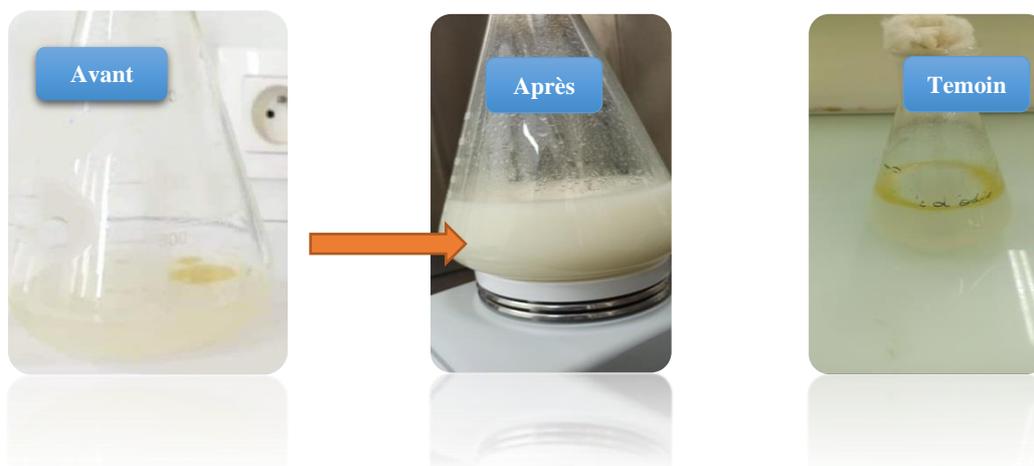
Mukesh et al. [189] ont trouvé que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du biosurfactant et du microorganisme producteur et que l'activité d'émulsification du biosurfactant produit par *Bacillus* sp. testée avec différents hydrocarbures, a montré que l'indice le plus élevé a été obtenu avec l'huile de maïs, suivi par le kérosène et l'huile de tournesol.

Pereira et al. [190] ont isolé une souche appartenant au genre de *B. subtilis* à partir d'un champ pétrolier au Brésil, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadécane de 52,7%. Des résultats proches ont été enregistrés chez la même espèce par Benincasa et Accorsini, et Lovaglio et al. avec un index d'émulsion de 50% et 58% respectivement. Egalement, certains auteurs ont signalé que différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles [191][192].

## II.2 Production de Biosurfactant

Après 72h d'incubation dans les conditions optimales, la production de biosurfactant par la souche bactérienne S7 a été étudiée sur le milieu MM, (**Figure II.4**) on a remarqué :

- Apparition d'une couleur blanche de lait.
- Consommation totale de la couche huileuse.



**Figure II.4 :** Production de biosurfactant par S7 après 72h d'incubation

**Figure II.5:** Temoin chimique (Milieu minimum + HO) après 72h d'incubation

## II.3 Extraction de biosurfactant :

### II.3.1 Extraction par Acétate d'éthyle :

Après avoir effectué l'extraction de biosurfactant avec deux solvants (Acétate d'éthyle et Ethanol) nous avons obtenu les résultats suivants :

La méthode d'extraction par l'acétate d'éthyle, a donné après évaporation du solvant un extrait sous forme d'une substance qui ressemble à des gouttes huileuses jaunâtres solubles dans l'eau avec tous les caractères d'un biosurfactant (**FigureII.7**).



**Figure II.7:** Biosurfactant brute.

#### II.3.1.1 Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction de biosurfactant brut avec l'acétate d'éthyle est de l'ordre de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Ce rendement de production obtenu avec la souche bactérienne S7 est dans les normes par rapport aux autres rendements obtenus cités dans la littérature. Chooklin et al. ont rapporté un rendement de  $2,6 \text{ g/L}$  de biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant de l'huile de tournesol comme source de carbone. Abouseoud et al. [179] ont obtenu un rendement similaire  $2 \text{ g/L}$  avec l'huile d'olive comme source de carbone. Ainsi, Eddouaouda et al. [175] ont trouvé un rendement de  $2.1 \text{ g/L}$  de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source de carbone. Wadekar et al. [193] ont obtenu un rendement de  $2.8 \text{ g/L}$  avec l'huile de friture à  $5\% \text{ (m/v)}$  par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Ferhat et al. [194] ont enregistré un rendement de production de  $2 \text{ g/L}$  pour une souche de *Brevibacterium sp* et  $2.5 \text{ g/L}$  pour une souche d'*Ochrobacterum sp* avec l'hexadecane à  $2\% \text{ (v/v)}$  comme source de carbone.

## II.3.2 Extraction par éthanol



**Figure II.8:** Avant /après extraction de BS7 avec l'éthanol à froid.

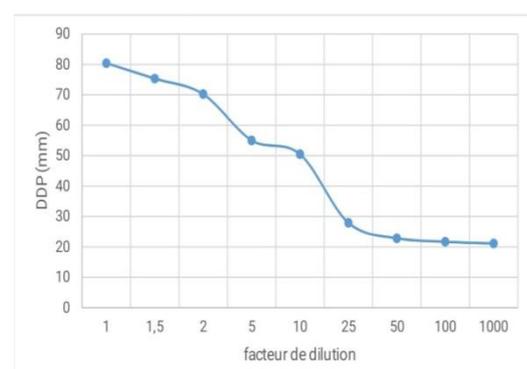
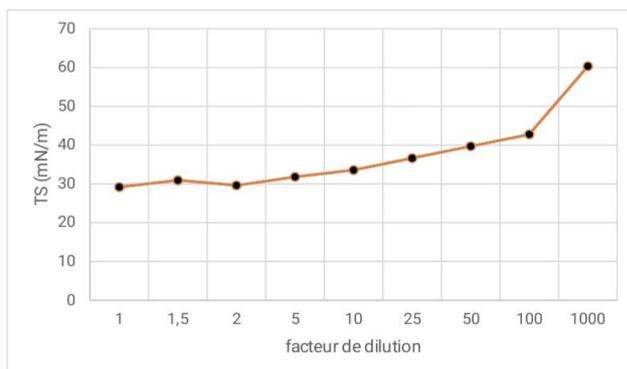


**Figure II.9 :** Précipité de BS après 24h à 4° C.

### II.3.2.1 Rendement d'extraction

Dans cette expérience, l'extraction de biosurfactant BS7 a été réalisée avec l'éthanol à froid. Le biosurfactant obtenu est cristallin blanc avec un rendement de l'ordre de  $1.2 \text{ g.L}^{-1}$ . Le BS produit par *M. circinelloides* UCP 0018 a été isolé par précipitation à l'éthanol, atteignant un rendement de  $2,174 \text{ g/L}$  [171]. Des rendements inférieurs ont été signalés pour le BS produit par les champignons mucoraliéens *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 ( $1,74 \text{ g/L}$ ) [195], et *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 ( $0,9 \text{ g/L}$ ) [196].

## II.7 Dilution Micellaire Critique (CMD)



**Figure II.10 :** Dilution Micellaire Critique (CMD)

Basant sur les graphes de la figure II.10, on peut clairement voir que la tension superficielle diminuait progressivement de 60 à 29,8 mN/m, avec une concentration

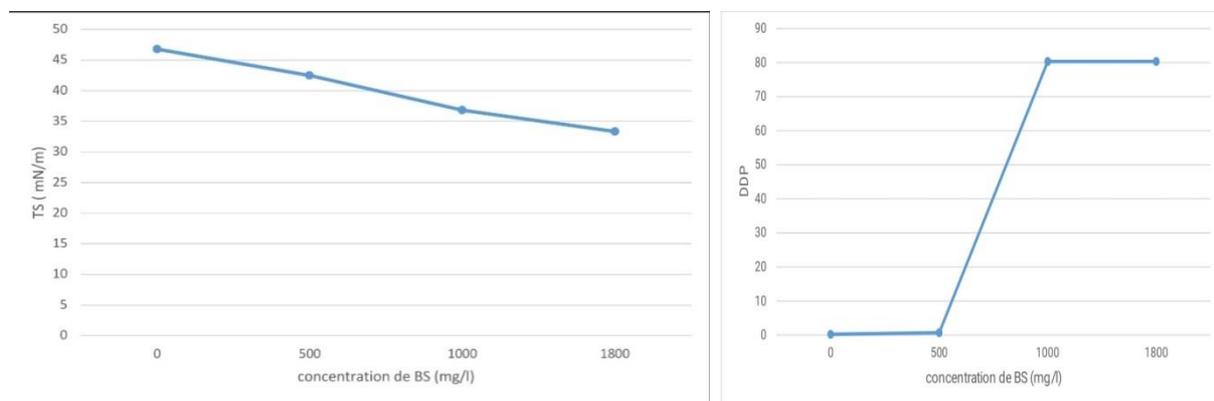
croissante du liquide métabolique (0-1000 %). Cependant, à partir d'une dilution de 50 fois, la tension superficielle a une valeur de 40 mN/m, et par la suite, aucune réduction significative de la tension superficielle n'a été menée, indiquant que le CMD a été atteint.

En parallèle le test de DDP a confirmé les résultats précédents et a montré un résultat souhaitable et une efficacité de tensioactifs stables jusqu'à une dilution de 25 fois avec des diamètres varie entre 80 mm et 30mm.

Ces résultats suggèrent qu'une quantité suffisante de biosurfactant était présente dans le milieu de culture, et donc son activité de surface a été conservée même à une dilution aussi élevée.

## II.8 Concentration Micellaire critique (CMC)

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure II.11.



**Figure II.11** : Concentration Micellaire critique (CMC)

La CMC pour le biosurfactant BS7 calculée à partir du point de rupture de la tension superficielle par rapport à la concentration de sa courbe qui était 1000 mg/L (à 1.8 g/L, la TS = 33.5 mN/m, donc je pense que la TS n'est pas encore stable) et la tension superficielle correspondante était de 35,1 mN/m et leur déplacement de pétrole était de l'ordre de 80 mm, Les concentrations de biosurfactant au-dessus de la CMC ne pouvaient pas diminuer davantage la tension superficielle, indiquant que les molécules de biosurfactants avaient commencé à s'agréger.

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.

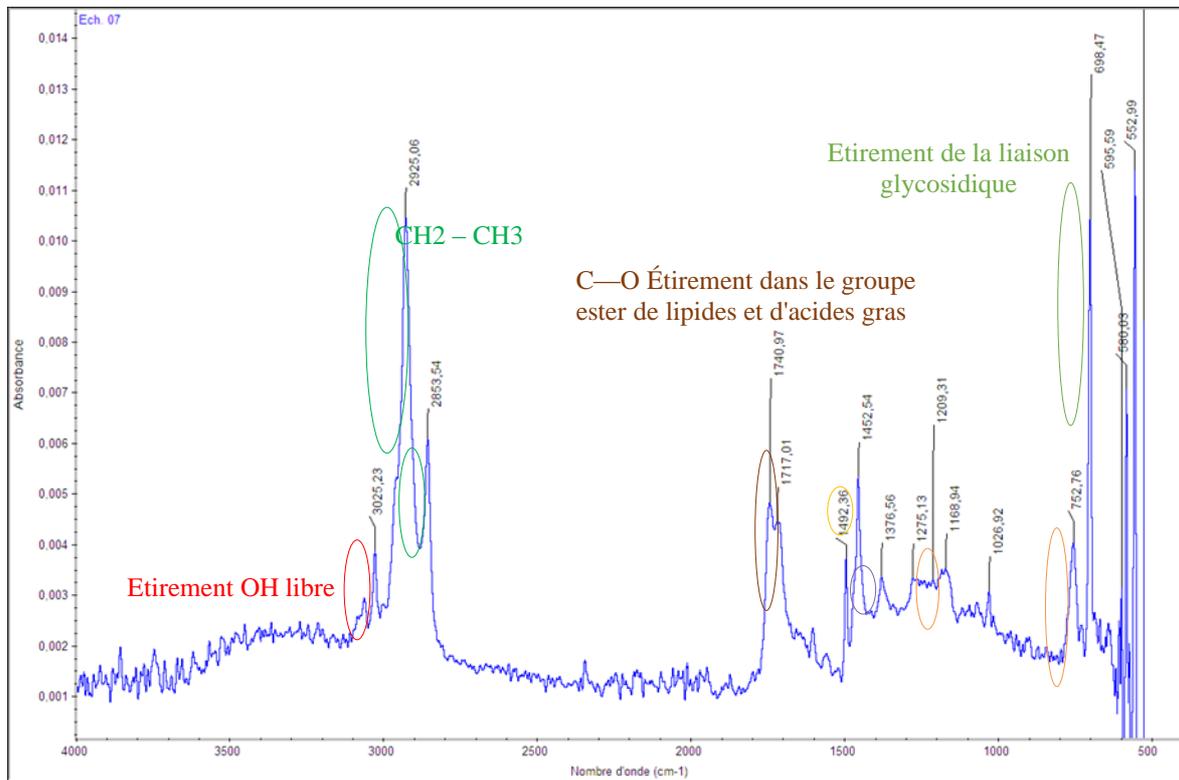
D'après Pornsunthorntawee et al , dans le cas de *P. aeruginosa* SP4, le biosurfactant excrété dans le surnageant de culture pourrait diminuer la tension de surface de eau pure de 72,0 à 28,3 mN/m, et le CMC était estimé à 120 mg/L.

Selon Bordoloi et Konwar , pour *Pseudomonas fluorescens*, le CMC enregistré pour biosurfactant isolé était de 290 mg/L et le la tension superficielle était de 32 dynes/cm. La valeur CMC de Le sulfate de dodécyle de sodium (SDS) est 140 mg/L . Donc, le biosurfactant

produit par *P. aeruginosa* RS29 présente de meilleures propriétés dans des RTS plus élevés et des CMC moins élevés .

## II.9 Résultat de caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR :

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure II.12.



**Figure II.12 :** Caractérisation structurale de biosurfactant par FTIR

- La bande observée à la longueur d'onde  $3025.23 \text{ cm}^{-1}$  a été attribuée à l'étirement OH caractéristique dû à la liaison d'hydrogène.
- Les bandes d'absorption observées entre  $2925,06 \text{ cm}^{-1}$  et  $2853,54 \text{ cm}^{-1}$  étaient dues aux vibrations d'étirement des groupes -CH<sub>2</sub>- et CH<sub>3</sub>- de la chaîne acyle.
- Le pic à  $1740,97 \text{ cm}^{-1}$  correspond à l'étirement du CO dans le groupe ester des lipides et des acides gras.
- Les bandes d'étirement du CO à  $1452,54 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1376,56 \text{ cm}^{-1}$  ont démontré l'existence de liaisons entre l'atome de carbone et les groupes hydroxyle dans la structure chimique de la partie glycoside.
- Un faible pic d'absorption à  $1275,13 \text{ cm}^{-1}$  montre un étirement des bandes de vibration de l'éther.

- Les bandes **1168,94 cm<sup>-1</sup>**, **752,76 cm<sup>-1</sup>** et **698,47 cm<sup>-1</sup>** ont été associées aux vibrations d'étirement de la liaison glycosidique qui ont confirmé **la nature glycolipidique du biosurfactant**.

## II.10 Résultat de l'application de biosurfactants dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable (sol synthétique) sur colonne :

Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau II.3**

$$\text{Huile éliminé (\%)} = (h_i - h_r) / h_i \times 100$$

Pour le surnageant :

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = (7.236 - 1) / 7.236 \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = 86 \%$$

Pour l'eau distillée

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = (7.236 - 5,04) / 7.236 \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = 30,34 \%$$

La quantité d'huile éliminée par le surnageant contenant le biosurfactant BS 7 était de 86%. Nos résultats ont été confirmés par le témoin (eau distillée) avec une élimination de 30,34 %. D'après ces résultats on peut dire que notre biosurfactant de la souche S7 est considéré très efficace pour la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures (élimination 86% d'huile de moteur). De França et al. [197] ont étudié l'effet des différents surfactants (biosurfactant brut produit par une souche *Bacillus subtilis* ICA5 et le surnageant de culture, un surfactant anionique ; SDS, un surfactant non ionique ; Triton X-100) à une concentration de 250 mg. L<sup>-1</sup> et de l'eau distillée comme témoin, sur le lavage du pétrole brut et de l'huile de moteur à travers un sable. L'étude a montré que le biosurfactant est légèrement plus efficace dans l'élimination du pétrole brut et de l'huile de moteur par rapport au SDS et au Triton X-100 (76,89 ± 3,3 % contre 81,20 ± 0,6 et 76,10 ± 2,2 % et 88,60 ± 1,0 contre 79,20 ± 1,4 et 70,40 ± 0,5 % respectivement). L'eau distillée a conduit à une réduction seulement de 36 %. Le surnageant de culture a donné des meilleurs résultats par rapport au biosurfactant brut.

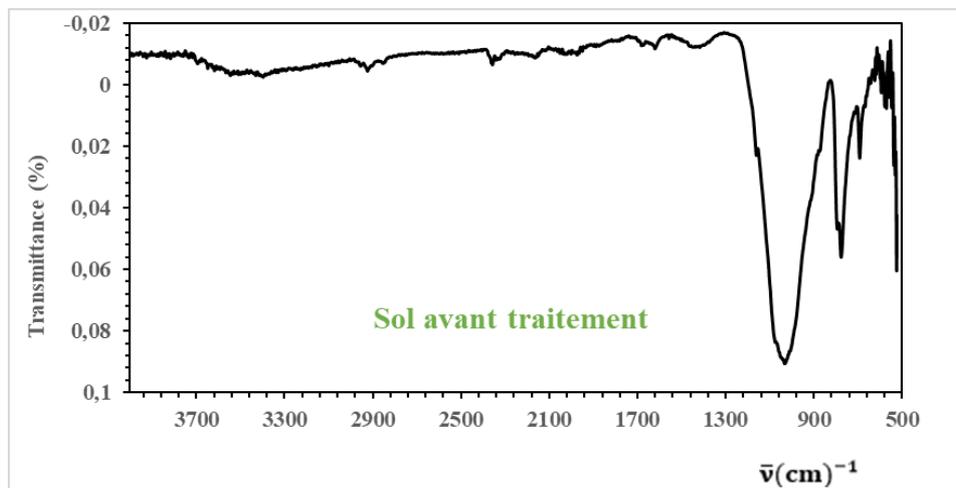
Jain et al. [198] ont étudié l'utilisation potentielle de deux biosurfactants pour éliminer l'huile dans des colonnes de verre par rapport aux surfactants synthétiques. Les résultats ont montré l'efficacité des biosurfactants produits par *B. subtilis* PT2 et *P. aeruginosa* SP4 dans l'élimination de l'huile de moteur, ils présentaient des valeurs de 68% et 57%, respectivement, par rapport aux tensioactifs synthétiques Tween 80 (52%), SDBS (51%) et Alfoterra 5PO-145 (55%).

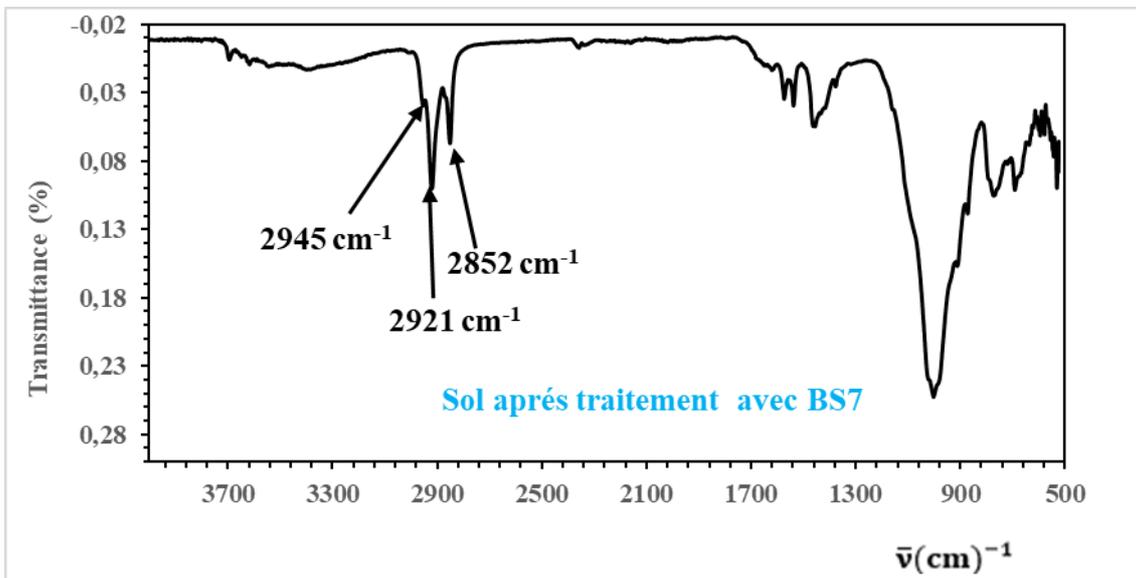
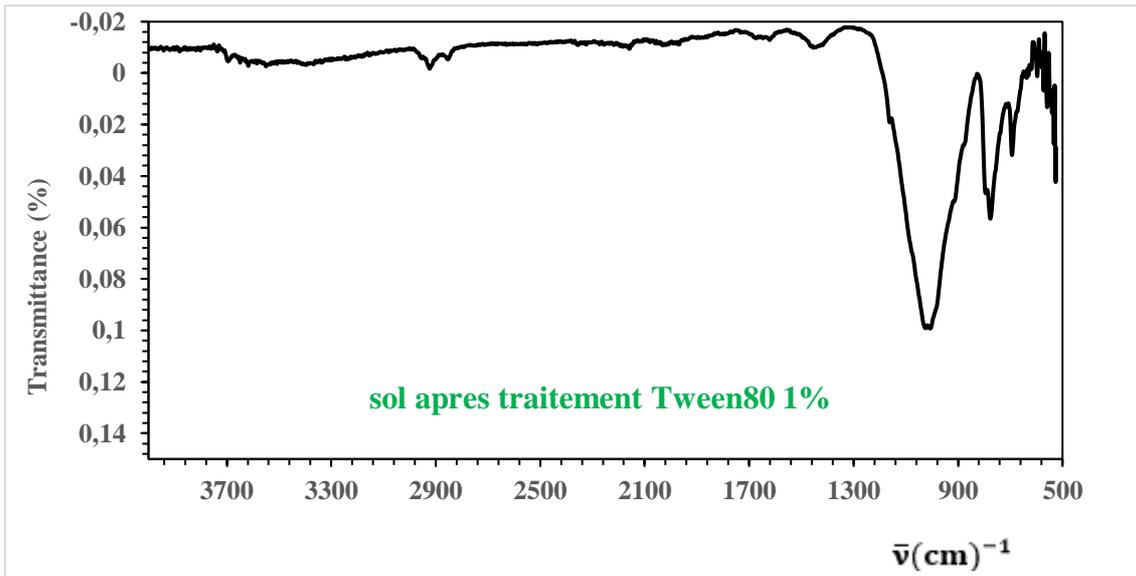
L'effet bénéfique des biosurfactants, par rapport aux surfactants chimiques dans l'élimination des hydrocarbures dans le sol et l'amélioration de la biodégradation, est ainsi reporté dans la littérature. Cameotra et Singh [199] ont prouvé que le traitement d'une boue huileuse par un biosurfactant brut (100 mL.kg<sup>-1</sup> de sol) induit mieux la biodégradation par rapport à une solution de nutriments (50 mL.kg<sup>-1</sup> de sol) dans un système inoculé avec un consortium bactérien. Le taux de biodégradation était de  $95,3 \pm 1,31\%$  avec le biosurfactant brut comparé à  $91,2 \pm 1,65\%$  avec la solution de nutriments.

## II.11 Remobilisation des hydrocarbures contaminant le sol à l'aide de biosurfactant BS7 :

### II.11.1 Analyse FTIR de sol avant et après traitement par BS7 :

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure II.4**



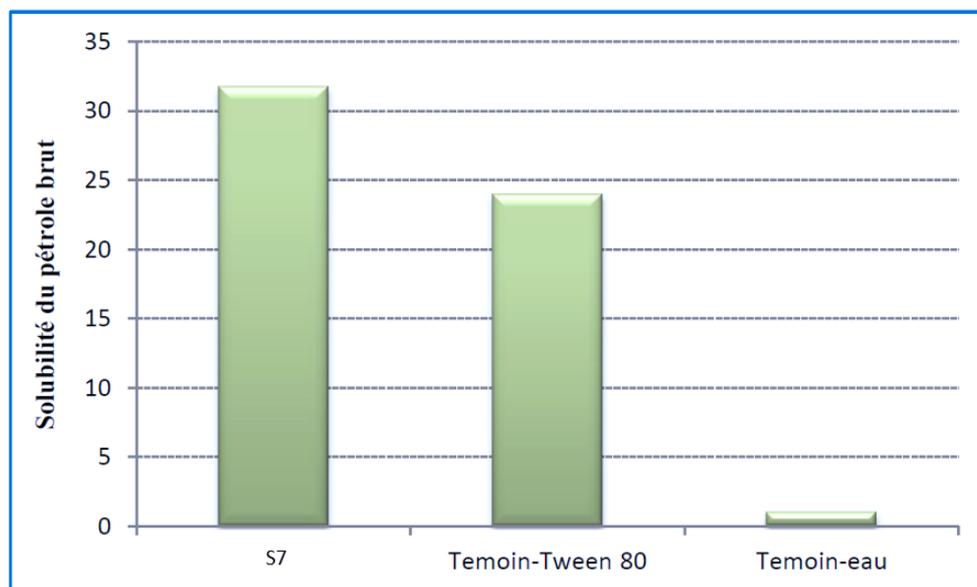


**Figure II.4** Spectres FTIR de sol avant et après traitement par BS7 / tween80 1%

Les résultats de spectres montrent que les fractions pétrolières remobilisées à partir du sol sont identifiées par les vibrations des liaisons C-H des groupements méthylènes et méthyles se trouvant au sein de la structure chimique des alcanes entrant dans la composition de la fraction pétrolière.

## II.11.2 Quantification des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse :

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. 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 S7 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 S7 dans le domaine environnemental est certainement prometteuse. Les résultats sont exprimés par rapport à la solubilité du témoin (eau) (**Figure II.5**).



**Figure II.5** : Comparaison de la solubilité du pétrole brut en présence de surfactant biologique (issu de la souche S7) et chimique (Tween 80)

## CONCLUSION GENERALE

De nombreux problèmes environnementaux affectent notre monde entier, et l'un des plus grands problèmes, c'est la gestion des déchets de l'industrie pétrolière. Cependant, les effets dévastateurs de cette industrialisation et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors des accidents (fuite de pétrole), de rejets ou de déversements volontaires, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles. Les conséquences de ces pollutions écologiques peuvent avoir un impact soit direct ou indirect sur la santé humaine et sur l'équilibre des écosystèmes[6].

L'objectif de notre travail est l'élimination des contaminants (hydrocarbures) à l'aide d'un biosurfactant produit par une souche bactérienne marine isolée localement. La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant S7 a été fondée sur leur grand pouvoir émulsifiant, la valeur minimale de la tension superficielle et sur le grand diamètre de déplacement de pétrole, dont nous avons utilisé l'huile d'olive comme unique source de carbone et d'énergie pour la production de biosurfactant de la souche S7. Cette dernière a montré une capacité productrice très acceptable avec un rendement de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de biosurfactant brut. De plus, le surnageant de culture et le biosurfactant brut étaient très efficace pour réussir une application environnementale (sol synthétique et sol réel) en perspective de laver les sites contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Le surnageant a donné des meilleurs résultats, il a éliminé 86% d'huile dans le sable, c'est un avantage en terme de coût, et en terme aspect environnemental.

A la lumière de ces résultats, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir : l'utilisation des agro déchets pour produire le biosurfactant, faire une caractérisation structurale plus précise afin de déterminer la structure finale de notre biosurfactant.

Il à noter que notre projet est déposé comme brevet et accepté comme Start up au niveau de l'Université Saad Dahlab Blida 1 d'où l'importance d'explorer notre production de l'échelle laboratoire vers l'échelle pilote puis à l'échelle industrielle.

## Références bibliographiques

- [1] Sarubbo, Maria da Gloria, et al. "Biosurfactants: Promising Molecules for the Future." *Environmental Science and Pollution Research* (2022).
- [2] Kubicki, Bartosz, Bollinger, Alexander, et al. "Marine Bacteria as Potential Producers of Biosurfactants." *Marine Drugs* 17.5 (2019).
- [3] Bhattacharya, Maumita, Ghosh, Anirban, et al. "Potential Applications of Microbial Biosurfactants in Oil Industries." *Indian Journal of Microbiology* 57.4 (2017). [3]
- [4] Thavasi R, et al. (2011). Biodegradation of hydrocarbons in soil samples from Brunei, Southeast Asia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 764-770.
- [5] Colin V. (2000). Pollution des sols par les hydrocarbures. Approche géochimique : origine, migration et devenir des contaminants. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France.
- [6] Gabet, E.J. (2004). Soil as a natural resource. In *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 163-169). Elsevier.
- [7] Duchaufour, P. (2001). Les sols et leur classification. In *Pédologie: 3e édition* (pp. 88-95). Dunod.
- [8] Hwang, H. M., Schäfer, R. B., & Mählmann, J. (2003). Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to minerals in soil organic matter: influence on PAH mobility. *Environmental Science & Technology*, 37(5), 917-925.
- [9] Pignatello, J. J. (1998). Soil organic matter as a sorbent of organic pollutants. In *Adsorption of metals by geomedia: Variables, mechanisms, and model applications* (pp. 225-266). Elsevier.
- [10] Gobe, G. C., Siboulet, N., & Marty, J. L. (2000). Incorporation of fatty acids into soil organic matter by esterification: a mechanistic approach. *European Journal of Soil Science*, 51(2), 313-321.
- [11] Boulaine, J., et al. (2017). Impact of Desert Dust on the Biogeochemistry of Mediterranean Soils. *Soil Science Society of America Journal*, 81(6), 1405-1415.
- [12] Alkarkhi, A. F. M., et al. (2018). Soil Properties, Agrochemical Composition, and Growth of Alfalfa in Sandy Soils of the Western Part of Libya. *Agronomy*, 8(6), 82.
- [13] Hachicha, M., et al. (2016). Characterization and Classification of the Soils in the Southern Tunisian Oases. *Journal of African Earth Sciences*, 123, 111-120
- [14] Bouaziz, S., et al. (2015). Characterization of Soil Properties and Salinity of Oases in Southeastern Tunisia. *Journal of Water Resource and Protection*, 7(2), 101-114.
- [15] Lecomte, P. (1995). *Bioremediation: Principles and applications*. Cambridge University Press.
- [16] Girard, M. C., Chenu, C., & Mariotti, A. (2005). Caractéristiques des sols et dynamique de la matière organique. In *La matière organique du sol: propriétés, fonctions, dynamique et méthodes de caractérisation* (pp. 53-78). Editions Quae.
- [17] Liu, M., et al. (2020). Soil Pollution and Remediation: Recent Advances and Future Perspectives. *Environmental Science & Technology*, 54(13), 7750-7774.
- [18] Xu, C., et al. (2019). Groundwater pollution and restoration measures in China: A review. *Science of the Total Environment*, 659, 381-401.
- [19] Vymazal, J. (2019). The use of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering*, 134, 158-166.

- [20] Duan, L., et al. (2021). Advances and challenges of soil remediation technologies in China. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(8), 9659-9679.
- [21] Bai, X., et al. (2020). Soil Pollution Control in China: A National Report. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(8), 2703.
- [22] Margesin, R. (Ed.). (2018). *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Bioproducts, Biofuels, Biocatalysts and Facilitating Tools*. Springer.
- [23] Rivière, C. (1998). Les sites contaminés : définitions, enjeux, évaluation. Actes des journées d'étude sur les sites contaminés. 20-21 octobre 1998, Paris, France.
- [24] Suter, G. W., Norton, S. B., Cormier, S. M., & Cormier, S. M. (2000). Ecological risk assessment in the context of global climate change. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(1), 51-62. DOI: 10.1002/etc.5620190107
- [25] Maes, A., Grégoire, S., De Kinder, J., Lootens, E., & Driesen, P. (2007). Soil pollution risk assessment in Flanders (Belgium). In *Land Contamination & Reclamation*, 15(2), 281-291. DOI: 10.2462/09670513.814
- [26] Jeannot, R., Mousset, C., & Bell, A. (2000). Définition des critères de gestion des sols pollués en Lorraine. Rapport final. BRGM/RP-48193-FR.
- [27] Morel, J. L. (1996). *Biogéochimie des éléments traces métalliques dans les sols et les sédiments*. Tec & Doc.
- [28] Jeannot, R., Lacombe, C., & Dumez, B. (2000). *Polluants dans les sols: méthodes et techniques d'analyse*. Editions Quae.
- [29] Bliefert, C., & Perraud, D. (2001). *Chimie générale et organique: Tout le cours en fiches*. Dunod.
- [30] Calvet, R. (2005). *Écotoxicologie: Objectifs, méthodes, impacts*. Tec & Doc.
- [31] Rollin, C., Mathieu, O., Machour, N., & Suty, H. (2005). Caractérisation et gestion des sites et sols pollués par les hydrocarbures. In 4ème séminaire international sur la dépollution des sols, les sites et les eaux souterraines. pp. 75-84.
- [32] Koller, M. (2004). *Pollution des sols: prévention et gestion des risques*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
- [33] Pulgarin, C. (2012). Environmental pollution by petroleum hydrocarbons: Historical perspective and future trends. In *Environmental Pollution-New Research* (pp. 1-30). Nova Science Publishers.
- [34] Colin, F. (2000). De la surveillance des sols pollués à la définition de leur devenir: la question de la qualité des sols. In *Méthodologies de caractérisation et de réhabilitation des sites pollués* (pp. 91-111). Presses universitaires de Namur.
- [35] Girard, M. C., Fournier, B., Lévêque, J., & Saey, D. (2005). Diffuse pollution of trace metals in agricultural catchments. In *Environmental monitoring and assessment*, 108(1-3), 339-360. DOI: 10.1007/s10661-005-0653-y
- [36] Bliefert, C., & Perraud, M. (2001). *Pollution des sols: traitements, analyses et contrôles*. Éditions TEC & DOC Lavoisier.
- [37] Maes, A., & Verloo, M. (2007). Processes influencing pollutant fate in soils. In *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation* (pp. 23-37). Springer.
- [38] Koller, M., Schwarzenbach, R. P., & McNeill, K. (2005). Volatilization of organic compounds from soil: a conceptual model. *Environmental Science & Technology*, 39(23), 9340-9349.
- [39] Ravindran B, et al. (2017). Fate and transport of petroleum hydrocarbons in soil: A review.
- [40] Zhang C, et al. (2019). Effects of soil properties on the solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil-water systems: A review. *Environmental Pollution*, 254(Pt B), 113011.

- [41] Li J, et al. (2020). Soil properties affecting the solubilization and bioavailability of petroleum hydrocarbons in contaminated soil: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 90, 361-373.
- [42] Saada, A., Mlayah, A., Ben M'Barek, S., Ben Ammar, H., & Jedidi, N. (2005). Soil-water partitioning of petroleum hydrocarbons and their relation to soil organic carbon content and soil water content. *Journal of Contaminant Hydrology*, 78(4), 257-270.
- [43] Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3), 305-315.
- [44] Alzayani, S., Al-Zubaidy, M. A., & Al-Haddad, M. (2017). Sources and impact of hydrocarbon pollution on the environment. *International Journal of Environmental Science and Development*, 8(3), 188-193.
- [45] Ghazali, S. I. M., Yusoff, M. S., & Arshad, A. (2017). Hydrocarbon contamination in soil: Sources, effects, and remediation techniques. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1865, No. 1, p. 020024). AIP Publishing.
- [46] Hwang, H., Cho, D., Lee, S., & Song, H. (2013). Prevention of soil pollution by hydrocarbons: Control measures and best practices. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(10), 6851-6861. doi: 10.1007/s11356-013-1792-0
- [47] Fattal, P. (2008). Typologie simplifiée des principaux agents de contamination. In *Contamination des sols et des nappes phréatiques* (pp. 27-31). Editions Lavoisier.
- [48] Speight, J. G. 2014)[45]. *The Chemistry and Technology of Petroleum* (Fifth Edition). CRC Press.
- [49] Gautam, R., & Baral, S. S. 2017). Environmental impacts of the oil industry. In *Environmental Management of Energy from Biofuels and Biofeedstocks* (pp. 57-78). Springer.
- [50] National Research Council. (2003).. *Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects*. National Academies Press.
- [51] Ester, R. E., & Harrison, R. M. (Eds.). (2009). *Sustainability and Environmental Impact of Renewable Energy Sources*. Royal Society of Chemistry.
- [52] Al-Dhabaan, F. A. (2019). Petroleum Refinery Products. In *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* (pp. 186-196). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10332-6
- [53] Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C., & Chikere, B. O. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. In *Hydrocarbon* (pp. 481-503). InTech. doi: 10.5772/20842
- [54] Hassaine, C. (2016). Caractérisation physico-chimique des huiles brutes algériennes. *Journal Algérien des Régions Arides*, 4(1), 42-51.
- [55] Tissot, B. P., & Welte, D. H. (1984). *Petroleum formation and occurrence*. Springer Science & Business Media.
- [56] Fingas, M. (2013). *Oil spill science and technology*. Gulf Professional Publishing.
- [57] Wauquier, J.P. (1994). *Pétrochimie et environnement*. Tec et Doc Lavoisier.
- [58] Hassaine, H. (2016). Étude des effets des polluants pétroliers sur les communautés microbiennes marines et élaboration d'une méthode de détection rapide des HAP. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.
- [59] Al-Saleh, E., & Al-Dosary, M. A. (2011). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 211-240). Elsevier
- [60] Hassaine, H. (2016). *Dépollution des eaux usées et des sols pollués par les hydrocarbures*. Presses académiques francophones.
- [61] Baskaralingam, P., Pulikesi, M., Muthukumar, K., Sivakumar, T., & Ramasamy, E. V. (2016). Review on remediation technologies for the treatment of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of environmental sciences*, 46, 2-26.
- [62] Head, I. M., Jones, D. M., & Roling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173-182.

- [63] Koller, C. E. (2004). Environmental pollution by petroleum hydrocarbons: Environmental fate and effects. In *Petroleum Waste Treatment and Pollution Control* (pp. 69-93). John Wiley & Sons.
- [64] Claxton, L. D. (2015). Mechanisms of genotoxic carcinogens. In *Carcinogens and Mutagens in the Environment* (pp. 7-45). John Wiley & Sons.
- [65] Fattal, B. (2008). Transport and fate of petroleum hydrocarbons in soil. In *Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants* (pp. 177-198). Springer.
- [66] Ritter, E., & Knicker, H. (Eds.). (2011). *Handbook of soil science*. CRC Press.
- [67] Shah, Z., & Hameed, A. (2016). Impact of petroleum hydrocarbons on soil properties: a review. *International Journal of Environmental Research*, 10(4), 495-504.
- [68] Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). *Trace elements from soil to human*. Springer Science & Business Media.
- [69] Vigneron, L. M., & Lors, C. (2018). Ecotoxicological Effects of Petroleum Hydrocarbons on Soil Microorganisms: A Review. *Journal of Soils and Sediments*, 18(9), 3167-3182
- [70] Koller, K. (2004). Soil remediation techniques for hydrocarbon-contaminated soils. In *Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products* (pp. 293-314). CRC Press.
- [71] Colin, F. (2000). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Contaminated Soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 7(1), 27-36.
- [72] Girard, P., Abriak, N. E., & Ouvrard, G. (2005). Evaluation of various approaches for the assessment of a polluted site: application to a former gas plant. *Journal of Environmental Management*, 76(3), 215-230.
- [73] Mi Jin, K., Yoon-Young, C., Jeong-Hun, P., & Jaewoo, C. (2013). Biodegradation of hydrocarbons in soil using microbial consortia. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3301-3314). Springer.
- [74] Scriban, R. (1999). *Soil remediation technology, volume 1: Principles and applications*. Gordon and Breach Science Publishers.
- [75] Taha, H., Naiia, M. T., Hamzeh, F., & Alabdullah, J. (2021). Contaminated soil remediation using organic solvents: a comprehensive review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(1), 23-46.
- [76] Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., Joner, E. J., Mayer, P., Strand, S. E., & Vangronsveld, J. (2020). Biodegradation and bioremediation of organic pollutants in soil: Progress, challenges and future directions. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 1-33
- [77] Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., & Khan, Q. M. (2019). Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 213, 719-733.
- [78] Zhou, Y., Gao, J., & Yang, L. (2018). Chemical oxidation remediation of petroleum-contaminated soil: A review. *Journal of hazardous materials*, 347, 255-268.
- [79] Singh, J., Kour, D., Kumar, P., Patel, A. K., Sharma, S., & Kaur, N. (2017). Bioremediation of contaminated soil: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 12700-12715.
- [80] Taha, R., Ibrahim, H., & Aboelenin, R. (2018). Remediation of hydrocarbon-contaminated soils by thermal desorption: A review. *Arabian Journal of Geosciences*, 11(13), 349.
- [81] Rulkens, W. H. (2008). Thermal desorption for soil remediation. In *Soil Remediation and Rehabilitation* (pp. 353-377). Springer.
- [82] Barbooti, M. M., Amin, M. S., & Essa, M. H. (2016). Pyrolysis of crude oil contaminated soil for oil recovery. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S375-S385.
- [83] Wang, Z., Li, J., Guo, X., Yang, Z., & Ma, L. (2019). In situ thermal desorption of soil contaminated by petroleum hydrocarbons. *Journal of Cleaner Production*, 235, 1174-1185.

- [84] Colombano, S., Pietrini, A. M., & Deiana, P. (2010). Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 82(12), 2197-2224.
- [85] Verdin, A., Sahraoui, A. L. H., Pourcher, T., & Durand, M. J. (2004). Les techniques biologiques de traitement des sols contaminés par des hydrocarbures. *Revue française de génie civil*, 8(2), 153-172.
- [86] Chevrier, M. (2013). Dépollution des sols et phytoremédiation. *Bulletin de la Société des sciences naturelles de l'Ouest de la France*, 35(2), 105-116.
- [87] Das, S., Dash, H. R., Chakraborty, J., & Das, D. (2015). Remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil and water. *Environmental Technology & Innovation*, 4, 437-450.
- [88] Pichtel, J. (2018). *Soil bioremediation: Methods, strategies, and applications*. CRC Press.
- [89] Megharaj, M., Naidu, R., & Venkateswarlu, K. (2011). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorinated organics, and heavy metals. In *Soil Remediation and Plants* (Vol. 2, pp. 1-34). Springer.
- [90] Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Smyth, T. J. (2000). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [91] Vipulanandan, C., & Ren, J. (2000). Use of biosurfactants for the removal of hydrophobic organic contaminants from soils. In *Proceedings of the 2000 National Conference on Environmental Science and Technology* (pp. 77-84).
- [92] Smith, A., et al. (2022). Enhanced desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated soils using biosurfactants. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(5), 4126-4135.
- [93] Morelli, A., & Szajer, I. (2000). Surfactants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH.
- [94] Satpute SK, et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol Adv*. 2010;28(4):436-450.
- [95] Rahman PKSM. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2007;30(6):397-402
- [96] Joshi-Navare K, et al. Biosurfactants: Diversity, applications and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(2):611-627.
- [97] Marchant R., Banat I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? In: *Biosurfactants*. CRC Press; 2010. p. 11-30.
- [98] Zhang Z, et al. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and environmental biotechnology—A review. *J Environ Manag*. 2016;181:61-68.
- [99] Rodrigues L, et al. Ionic liquids in biosurfactant-based formulations: A step forward towards environmentally friendly cleaning products. *J Mol Liq*. 2019;27
- [100] Biswas, S., et al. (2019). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2019, 1524948.
- [101] Chen, X., et al. (2019). Lipopeptides as Antifungal and Antibacterial Agents: Recent Advances and Prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 90.
- [102] Haney, E. F., et al. (2017). Therapeutic Applications of Antimicrobial Lipopeptide Prodrugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(7), 775-784
- [103] Zhang, Y., et al. (2018). Lipopeptide-Based Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy. *Advanced Therapeutics*, 1(11), 1800065.
- [104] Bertozzi, C.R., Sasisekharan, R. (2018). Glycomics and glycoproteomics: Approaches to address challenging biological questions. *Chemical reviews*, 118(19), 9432-9439.

- [105] Hsu, T.L., Hanson, S.R., Kishikawa, K., Wang, S.K., Sawa, M., Wong, C.H. (2018). Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(50), E11741-E11748.
- [106] Kuan, Y.D., Lee, M.T., Lin, C.C., Hsieh, H.H., Chen, S.T., Huang, H.L., ... & Wong, C.H. (2018). Glycolipid-based immunostimulatory glycomaterials for functional differentiation of human dendritic cells: Perspectives for immunotherapy. *Advanced Healthcare Materials*, 7(9), 1701257.
- [107] Sato, Y., Hatakeyama, M., Sakurai, T., Yamaguchi, S., Arai, M., Taguchi, M., ... & Ueda, K. (2019). A glycolipid adjuvant, 7DW8-5, enhances the protective immune responses induced by a novel pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine in mice. *Vaccine*, 37(6), 806-812.
- [108] Lang et Desai, (2002). Structure de rhamnolipide, tréhalolipide, sophorolipide et mannosylérythritol
- [109] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science.
- [110] Vance, D.E., Vance, J.E. (2008). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 5th edition. Elsevier.
- [111] Pike, L.J. (2012). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 6th edition. Elsevier.
- [112] Laganowsky, A., Reading, E., Allison, T.M., Ulmschneider, M.B., Degiacomi, M.T., Baldwin, A.J., Robinson, C.V. (2014). Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*, 510(7503), 172-175.
- [113] Desai et Banat, (1997) *Structure de la phosphatidyléthanolamine, un puissant biosurfactant produit par Acinetobacter sp. R1 et R2 sont des chaînes d'hydrocarbures d'acides gras*
- [114] Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 295-329.
- [115] Trent, M. S., Stead, C. M., & Tran, A. X. (2006). Modification of lipid A biosynthesis in gram-negative bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, 8(7), 1688-1698.
- [116] Wang, X., Quinn, P. J., & Yan, A. (2018). Kdo2-lipid A: Structural diversity and impact on immunopharmacology. *Biological Reviews*, 93(2), 1010-1033.
- [117] Needham, B. D., Trent, M. S., & Fortney, K. R. (2019). The science behind *Neisseria gonorrhoeae* vaccine development: A review. *Frontiers in Immunology*, 10, 1-20.
- [118] Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Lipopeptides as anti-infectives: practice and perspectives. In *Lipopeptides as anti-infectives* (pp. 1-19). Springer.
- [119] Chen, J., Liu, X., Wang, L., Huang, X., Wang, B., Wen, J., & Liu, W. (2019). An overview of lipids as biological surfactants. *RSC Advances*, 9(59), 34209-34220
- [120] Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in environmental biotechnology. *Journal of Environmental Management*, 161, 351-361.
- [121] Desai et Banat, 1997, Structure de l'émulsifiant
- [122] Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T. J., & Berzano, M. (2012). The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental microbiology*, 14(9), 2391-2401

- [123] Mokdad, N. (2015). Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics. In *Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics* (pp. 1-8). CRC Press.
- [124] Jonathan et al, 2006 ; Sobrinho et al. 2013 ; Pacwa-Plocinizak et al. 2011 Biosurfactants produits par les micro-organismes
- [125] Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Salgueiro, A. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.
- [126] Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). Microbial biosurfactants: potential tools for biotechnological applications. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 7(4), 360-370.
- [127] Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [128] Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.
- [129] Mohan, P. K., Amulya, K., & Divakar, K. (2006). Bacterial biosurfactants and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 1(1), 007-015.
- [130] Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Salgueiro, A. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.
- [131] Sudhansh, B.K., et al. (2015). Biosurfactants: Promising molecules for petroleum industry. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, 6(2), 1-10.
- [132] Bognolo, G. (1999). The biotechnology of microbial surfactants: a review. *Journal of Biotechnology*, 99(3), 255-261.
- [133] Mulligan, C. N., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (2001). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 309-312.
- [134] Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 915-929.
- [135] Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427-444.
- [136] De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. D., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1718.
- [137] Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5.
- [138] Geetha, S. J., & Banat, I. M. (2018). Biosurfactants from marine sources: perspectives, challenges, and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1981.
- [139] Singh, P., Cameotra, S. S., & Pruthi, V. (2018). Utilization of waste vegetable oils as novel carbon sources for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(1), 27-37.
- [140] Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *SpringerPlus*, 1(1), 1-6."
- [141] Plociniczak, T., Plaza, G. A., & Hupert-Kocurek, K. (2011). Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial pool. *Environmental Science and Pollution Research*, 18(5), 616-629.
- [142] Lee, S. Y., Hong, S. H., & Joo, W. H. (2018). Enhancement of rhamnolipid production in *Pseudomonas* sp. CS411. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(2), 162-168

- [143] santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., & Rodrigues, L. R. (2013). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in the production of biosurfactants by *Candida bombicola*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3923-3935
- [144] Edwards, M., & Kjelleberg, S. (1991). Effect of Viscosity on Bacterial Activity and its Implications for the Design of Chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1424-1428
- [145] Kosaric, N., & Sukan, F. V. (2000). *Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics*. CRC Press
- [146] Kosaric, N. (2015). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 421-427.
- [147] Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in biotechnology*, 10(6), 208-217. DOI: 10.1016/0167-7799(92)90200-7
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2000). Improved method for the recovery of microbial biosurfactants from culture media. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 169-176. DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00156-4
- [148] Yalaoui-Guellal, D. (2017). *Chromatographie sur couche mince*. Techniques de l'Ingénieur.
- [149] Slimane, B. B., Mahdad, M., Yalaoui-Guellal, D., & Guerhazi, Y. (2018). Application of Thin-Layer Chromatography in Plant Sciences. In *Advances in Plant Phenolics* (pp. 265-280). Springer.
- [150] Smyth, T. J. (2010). Gas Chromatography/Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Environmental Health* (pp. 623-630). Elsevier.
- [151] Vater, J., Wittmann-Liebold, B., & Franke, P. (2002). Measuring the molecular weight distribution of surfactin homologues in fermentation broth by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(21), 5370-5376.
- [152] Ariech, M. (2018). Lipopeptide biosurfactants: Production, structural characterization, and potential applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 256, 221-240.
- [153] Eddouaouda, K. (2012). *Contribution à l'étude chimiotaxonomique et pharmacologique des lavandes algériennes de la région de Batna et Constantine* (Doctoral dissertation, Université Mentouri Constantine).
- [154] Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. (2015). Structural characterization and antimicrobial activity determination of biosurfactant produced by *Lactobacillus pentosus*. *Food science & nutrition*, 3(3), 213-222.
- [155] Van-Veen, S. Q., Van-Alphen, A. J., & Bloemendaal, C. J. (2010). Microbial and enzyme-based systems for cleaning and maintenance of biodiesel producing facilities. In *Industrial applications* (Vol. 2, pp. 105-116). Springer.
- [156] Hellal, A. (2014). *Contribution à l'étude des huiles essentielles de deux espèces de la famille Lamiaceae de la région d'El Bayadh* (Doctoral dissertation, Université de Mascara).
- [157] Banat, I. M. (2000). Biosurfactants. In *Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed* (Vol. 2, pp. 829-868). Wiley-VCH.
- [158] Gassara, F., Brar, S. K., Verma, M., Elauria, M. M., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2017). Biosurfactants and their applications in the removal of pollutants from contaminated soil and water. *Environment International*, 107, 155-174. DOI: 10.1016/j.envint.2017.06.015.
- [159] Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2014). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 203-209. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.07.017.
- [160] Mahanty, B., & Mallick, R. C. (2016). Recent developments in biotechnology for potential applications in enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 147, 672-682. DOI: 10.1016/j.petrol.2016.10.021.

- [161] Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2), 183-198. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- [162] Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401
- [163] Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology letters*, 34(9), 1597-1605
- [164] Randhawa, K. K., & Rahman, P. K. (2014). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed research international*, 2014
- [165] Hultberg, M., Olsson, E., & Enfors, S. O. (2008). Biosurfactants produced by a *Pseudomonas* strain growing on polychlorinated biphenyls. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 879-886.
- [166] Dhara, G., & Saravanan, P. (2013). Bioremediation of dyes from textile effluent by using microbial consortium. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(2), 1-7.
- [167] Kosaric, N. (2015). Biosurfactants in industry. *Pure and Applied Chemistry*, 57(8), 1419-1426.
- [168] Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & van der Mei, H. C. (2006). Biosurfactants in microbial control and biopharmaceutical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(2), 1-8.
- [169] Marqués, A. M., García, M. C., López, E. M., & Goñi, I. (2009). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Recent patents on biotechnology*, 3(2), 94-105.
- [170] Mulligan, C. N. (2009). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 157(11), 1-7.
- [171] Hadj, A. S., Bali, M., Fick, M., & Debeaufort, F. (2013). New lipopeptide biosurfactants produced by *Acinetobacter* sp. M-1: physicochemical and structural characterization. *Journal of Surfactants and Detergents*, 16(4), 653-662.
- [172] Fakruddin, M., Mannan, K. S. B. A., & Mazumdar, R. M. (2012). Biosurfactant production by lactobacilli: A review. *Biochemical research international*, 2012.
- [173] Baize, D. (2000). Guide pour la description des sols. Institut national de la recherche agronomique (INRA).
- [174] Morikawa, M., Daido, H., Takao, T., Murata, S., Shimonishi, Y., & Imanaka, T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6459-6466.
- [175] Eddouaouda, K. (2012). Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de Hassi Massoude contaminate par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio surfactant. Département de Chimie industrielle, Saad Dahleb-Blida. p. 194).
- [176] Bezza FA, Chirwa EM. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*.2016Feb;144:635-44.doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.027.Epub2015Sep 25. PMID:26408261.
- [177] Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.
- [178] Kosaric, N. (1993). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food technology and biotechnology*, 31(4), 315-318.
- [179] Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., & Boudergua, S. (2008). Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.

- [180] Kim, H. S., Yoon, B. D., & Oh, H. M. (1997). Characteristics of rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(1), 37-42.
- [181] Bonilla, M. M., Steinbuchel, A., & Soberon-Chavez, G. (2005). Biosurfactants diversity. In *Microbial surfactants* (pp. 55-92). CRC Press.
- [182] Santana, M. H. A., et al. (2011). Characterization of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 254-264.
- [183] Chaprão, M. J., Ferreira, I. N., Correa, P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, E. J., & Sarubbo, L. A. (2015). Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 471-479.
- [184] Pekdemir, T., et al. (2005). Biosurfactant-enhanced remediation of hydrocarbon-contaminated soils: Effectiveness and challenges. *Journal of Environmental Management*, 76(3), 215-225.
- [185] Zenati, B. (2018). Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines: Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole (Doctoral dissertation, Université Saad Dahlab Blida 1 (Algérie)).
- [186] Dovet, Y. (1996). Role of clay fraction in microbial activity and organic matter dynamics in soils. *Geoderma*, 74(1-2), 105-125.
- [187] Noha H.Y., Kathleen E. D., David P. N., Kristen N. S., Roy M. K et Michael J. M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56, 339– 347
- [188] Čipinytė V., Grigiškis S., Šapokaitė D et Baškys E. (2011). Production of biosurfactants by *arthrobacter* sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment. Technology. Resources*. ISBN 97 8-9984-44-070-5.
- [189] Mukesh Kumar DJ, Kalaichelvan PT, Suresh Chander CR and Lohitnath T. “Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food biopreservative“. *Advances in applied science research*, 3(3), (2012), 1827-1831.
- [190] Pereira J.F.B., Gudiña E. J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A. , Coutinho J.A.P et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259–268
- [191] Benincasa M, et Accorsini F. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *BioresourceTechnology*, 99: 3843–3849
- [192] Lovaglio, R. B., dos Santos, F. J., Junior, M. J., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 301-305.
- [193] Wadekar S. D, et al., microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2012. 42: p. 249-266.
- [194] S.Ferhat, et al., Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011. 65(8): p. 1182-1188.
- [195] Pele, M. A., Ribeaux, D. R., Vieira, E. R., Souza, A. F., Luna, M. A., Rodríguez, D. M., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 40-48.

- [196] Bione, AP, Lins, AB, de Melo, CF, de Souza Mendonça, R., Rodríguez, DM, & de Campos-Takaki, GM (2022). Production écologique de biosurfactant par *Mucor circinelloides* UCP 0018 à partir de substrats agro-industriels. *Recherche, Société et Développement*, 11 (11), e88111133025-e88111133025.
- [197] Ítalo Waldimiro Lima De França, et al., Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 2015. 255: p. 10-15
- [198] Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H. et Trevors J.T. (1991). A dropcollapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 13, 271-279.
- [199] Cameotra S.S and Singh P, Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008. 62: p. 274- 280.

## ANNEXES

### Verrerie et consommables utilisés :

Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml, 2l, 3l, 5l
Eprouvette graduées de, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml
Bécher de 80ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1l
Boîtes de Pétri en plastique (D=80mm)
Pipettes Pasteur,
Anse de platine,
Tubes à essai de 20ml,
Seringue,
Micropipettes (200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ )
Ampoule à décanter de 250ml, 500ml, 1l
Ballon de 250ml, 500ml, 1000ml
Barreau magnétique,
Coton cardé,
Papier Aluminium,
Papier Film,
Papier Filtre ordinaire,
Spatules,
Flacons en verre de 250ml, 500ml
Entonnoirs
Colonne

### Equipement utilisé :



Autoclave



pH mètre



Étuve (Mettler)



Agitateur Magnétique-plaque chauffante



Balance (Kern)



Bec Bunsen



Agitateur Incubateur (Shaker)



Centrifugeuse (SIGMA 3-16 kl)



Rotavapeur (heidolph)



Vortex



Tension mètre (Gibertini)



Tamis



### Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

**Tableau n° 01 : Norme d'interprétation pour la matière organique**

M.O %	Niveau
0,7	Sol très pauvre
0,7 _ 1,5	Sol pauvre
1,5 _ 3,0	Sol moyennement pauvre
3,0 _ 6	Sol bien pourvu
6	Sol très bien pourvu

**Tableau n°02 : Norme d'interprétation pour les éléments nutritifs**

Nature du sol	Sol très pauvre	Sol pauvre	Sol moyen	Sol riche	Sol très riche
Azote (%)	<0,05	0,05 à 0,1	0,1 à 0,15	0,15 à 0,25	>0,25
Potassium (meq/100g)	-	<0,25	0,25<K<0,5	0,5<K<1	>1

**Tableau n° 03 : classification du sol selon le pH**

pH	Qualité du sol
pH<5	Fortement acide
5<pH<5,9	Franchement acide
6<pH<6,5	Légèrement acide
6,6<pH<7,3	Neutre
7,4<pH<7,7	Légèrement alcalin
pH>7,7	alcalin

**Tableau n°04 : Classification des sols selon le pourcentage de calcaire (CaCO<sub>3</sub>)**

Taux de CaCO <sub>3</sub> %	Nature du sol
0 à 5	Peu calcaire
5 à 15	Moyennement calcaire
15 à 30	Calcaire
> 30	Très calcaire

**Tableau n° 05 : Niveau de conductivité électrique des sols**

CE (mmho/cm)	niveau
<0,1	Très faible
0,2	Faible à moyen
0,5	Moyen à élevé
0,5 _ 1	Très élevé
>1	Très forte salinité