

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA
FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Industrielle

PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS
PAR DES SOUCHES DE *Brevibacterium* et *Ochrobactrum*
ISOLEES DU SOL DE HASSI-MESSAOUD CONTAMINES PAR
LE PETROLE BRUT

Par

Samira FERHAT

Jury :

D; GUETARNI	Professeur, USD-Blida	Président
B; BADJI	Professeur, ENS-Kouba	Examineur
H; BOUJELLA	Maître de conférences «A», ENS-Kouba	Examineur
M; BOUGHEDAOU	Maître de conférences «A», USD-Blida	Examineur
N; MOULAI-MOSTEFA	Professeur, UYF-Médéa	Co-rapporteur
A; BADIS	Professeur, USD-Blida	Rapporteur
S; SAYADI	Professeur, CBS-Sfax (Tunisie)	Invité

Blida, Novembre 2012

Ce travail est dédié

A mes parents

A mon mari et mes enfants (malek, redhouane, khalil et au prochain bébé)

ملخص

يعتبر هذا العمل مساهمة لانتقاء سلالات بكتيرية قادرة على إنتاج المفاعلات السطحية والتي عزلت من تربة ملوثة (قديمًا) بالنفط الخام، تم جلبها من منطقة حاسي مسعود (جنوب الجزائر). انصب اهتمامنا بشكل خاص على الحصول على مفاعلات سطحية جديدة يمكن إنتاجها من طرف سلالات بكتيرية متواجدة في بيئات إيكولوجية خاصة والتي بإمكانها تلبية احتياجات محددة في التطبيقات الصناعية والبيئية.

تنقسم النتائج التي تحصلنا عليها إلى أربعة أجزاء رئيسية. (أ) تم انتقاء 14 معزولة بكتيرية قادرة على إنتاج المفاعلات السطحية معتمدين على استخدامها لمصادر كربون مختلفة (سكر الغلوكوز؛ زيت الزيتون؛ الهيكساديكان والنفط الخام). باستخدام الهيكساديكان تم اختيار السلالتين 1C و 7G لقدرتهما الإنتاجية العالية (بناءً على خفضهما للتوتر السطحي) و اللاتي تم تعريفهما (باستعمال تقنية ARNr 16S) كالتالي: *Ochrobactrum intermedium* (1C) و *Brevibacterium lutescens* (7G). (ب) مكنت دراسة تأثير مختلف العوامل (مصدر الكربون، درجة الحرارة، درجة الحموضة وتركيز الملح) على فعالية المواد المنتجة لاستحلاب الهيكساديكان وخفض التوتر السطحي حيث بلغ هذا الأخير 31.2 و 31 ميلي ن/م لـ 1C و 7G على التوالي، مما يدل على أهمية هذه المفاعلات السطحية. قدر مردود الإنتاج (كمية المفاعل السطحي/غ هيكساديكان بعد 48 ساعة تحضين) بـ 1.292 للسلالة 1C و 1.616 للسلالة 7G مما يؤكد الطاقة الإنتاجية العالية التي تمتاز بها هذه السلالات المحلية. (ج) من أهم خصائص المواد المنتجة، أن لها قوة رغو بـ كبيرة ونشاط جيد لاستحلاب الزيوت حيث قدر مؤشر الاستحلاب على زيت المحرك بـ 92.31% (7G) و 95.23% (1C). كما أظهرت المفاعلات السطحية نشاطاً ضد أنواع من البكتيريا الممرضة *S. aureus* ATCC9144 و *P. aeruginosa* ATCC1544. تمتاز المفاعلات السطحية المنتجة بالمحافظة على استقرارها مع تغير درجة الحرارة، درجة الحموضة و ملوحة الوسط مع فارق في فعالية مؤشر الاستحلاب. قدرت التركيزات الحرجة (CMC) بـ 2 غ/ل (7G) و 1.5 غ/ل (1C). وبالإضافة إلى ذلك فإن المفاعلات السطحية المنتجة عبارة عن مواد دهنية سكرية. وفي الأخير، بينت تحاليل الكروماتوغرافيا الغازية المقارنة بالتحليل الطيفي الكتلي، قدرة المفاعلات السطحية المنتجة بتذويب الهيدروكربونات (الأليفاتية والحلقية)، كما أظهرت النتائج المحصل عليها خلال هذه المرحلة إمكانية هذه المركبات من معالجة التربة الملوثة بالنفط وذلك بمقارنتها بقرباناتها الكيميائية (SDS).

الكلمات المفتاحية: المفاعلات السطحية، التوتر السطحي، مؤشر الاستحلاب، *Ochrobactrum intermedium* و *Brevibacterium lutescens*، إزالة التلوث، النفط الخام.

RESUME

Le présent travail est une contribution à la sélection des souches bactériennes, à fort potentiel de production de biosurfactants, isolées à partir des sols anciennement contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud, sud de l'Algérie. Nous nous sommes intéressés très particulièrement à la recherche de nouveaux biosurfactants produits par des souches provenant des niches écologiques extrêmes et répondant à des besoins spécifiques en applications industrielles et environnementales.

Les principaux résultats obtenus sont répartis en quatre grandes parties. (i) Un criblage basé sur l'utilisation de différentes sources de carbone (glucose, huile d'olive, hexadécane et pétrole brut) a permis de retenir quatorze isolats capables de produire des biosurfactants. Sur l'hexadécane, les deux isolats 1C et 7G ont été sélectionnées pour leur fort potentiel de production en se basant sur leurs capacités à réduire la tension superficielle. Ils sont rattachés aux espèces *Ochrobactrum intermedium* (1C) et *Brevibacterium lutescens* (7G) par identification génotypique en utilisant la technique de l'ARNr 16S. (ii) L'étude de l'effet de divers paramètres (source de carbone, température, pH et sel) sur l'efficacité des produits à émulsifier un hydrocarbure (hexadécane) et la réduction de la tension superficielle a révélé des valeurs très basses de 31.2 et 31 mN/m par 7G et 1C, respectivement, montrant ainsi l'importance des biosurfactants produits. Le rendement (quantité de biosurfactant/g d'hexadécane après 48h d'incubation) était de 1,292 pour 1C et 1,616 pour 7G signifie une grande capacité de production par ces souches locales. (iii) La caractérisation de biosurfactants produits a révélé un pouvoir moussant et une activité émulsifiante remarquable sur les huiles, en particulier l'huile moteur avec un indice d'émulsification atteint 92,31 % (7G) et 95,23 % (1C). Ces biosurfactants ont exercé une activité antimicrobienne contre les espèces *S. aureus* ATCC9144 et *P. aeruginosa* ATCC1544. Les tensions superficielles sont stables thermiquement, avec la variation de pH et de la salinité. Les concentrations micellaires critiques étaient de 2 g.l⁻¹ (7G) et 1,5 g.l⁻¹ (1C). En outre, les deux biosurfactants produits sont des glycolipides (iv) et finalement, des analyses par GC-MS ont montré la capacité des biosurfactants produits à solubiliser des hydrocarbures (aliphatiques et quelques HAP). En terme d'application, ces deux biosurfactants ont des potentialités de dépolluer des sols contaminés par les hydrocarbures en comparaison avec leurs similaires chimiques, plus particulièrement le SDS.

Mots clés: Biosurfactants - Tension superficielle – Emulsification - *Ochrobactrum intermedium* et *Brevibacterium lutescens* – Dépollution - Pétrole brut.

ABSTRACT

In the present work, we were interested on the exploitation of the local ecological niches (soil previously contaminated with crude oil and hydrocarbons in the region of Hassi-Messaoud, south of Algeria) to select bacterial strains presented high potential for the production of biosurfactants to meet environmental and industrial needs.

The main results are divided into four main parts. (i) screening based on the use of different carbon sources (glucose, olive oil, hexadecane and crude oil) resulted in the selection of fourteen isolates capable of producing biosurfactants. Strains 1C and 7G were selected for their high production potential (based on their ability to reduce surface tension) used hexadecane as the carbon and energy source and identified (by using the technique of the 16S RNA) as *Ochrobactrum intermedium* and *Brevibacterium lutescens*, respectively. (ii) The study of the effect of various parameters (carbon source, temperature, pH and salt) on the production of biosurfactant and emulsification of hydrocarbon (hexadecane) showed a reduction in the surface tension which reached 31.2 mN/m and 31 mN/m. A yield of production equals to 1,292 g and 1,616 g of biosurfactant/g of hexadecane for strains 7G and 1C respectively after 48 h of incubation indicates a high production capacity by the local strains. (iii) The characterization of the two produced biosurfactants revealed that they have very good foaming power, a very good oil emulsifying activity with an index on the engine oil up to 92.31% (7G) and 95.23% (1C). Biosurfactants showed antimicrobial activities against species *S. aureus* ATCC 9144 and *P. aeruginosa* ATCC 1544. The products were stable against temperature, pH and salinity variations. The critical micelle concentration was 2 g / l (7G) and 1.5 g / l (1C). In addition, both produced biosurfactants are glycolipids. Finally, analysis by GC-MS were conducted to verify the ability of the produced biosurfactants, to solubilise hydrocarbons (aliphatic and some PAHs). The results obtained during this last step have demonstrated the potential of biosurfactants in the remediation of soils contaminated by oil, compared to their similar chemical products (SDS).

Keywords: Biosurfactants - surface tension - emulsification- *Ochrobactrum intermedium* and *Brevibacterium lutescens* - remediation- crude oil.

REMERCIEMENTS

Ce présent travail, initié en 2008, a été réalisé en collaboration avec le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie, le Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie, Département de Chimie Industrielle, Université Saad Dahlab de Blida, et le laboratoire de chimie physique, Université Yahia Farès de Médéa, Algérie. Il s'est intégré dans le cadre des activités du Pôle d'Excellence Régional AUF de Coopération Scientifique Interuniversitaire «**Bioprocédés Environnementaux et Industriels**» Contrat N° 6313PS652.

Au cours de ces années de thèse j'étais encadré par Mr. **Abdelmalek BADIS**, Professeur à l'USD-Blida, merci de m'avoir accordé votre confiance. Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces années, « sans vous cette thèse n'aurait évidemment jamais vu le jour ».

Je remercie profondément Mr Nadji MOULAI-MOSTEFA, Professeur de l'Université de Médéa d'avoir accepter de co-diriger ce travail pour sa disponibilité et ses orientations. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Mr **Sami SAYADI**, directeur de CBS, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (LBPE).

J'adresse également mes remerciements à Mr Djamel GUETARNI, Professeur à l'USD de Blida, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : merci à M. Boubkeur BADJI, Professeur à l'ENS-Kouba, Mme. Hadjira BOUJELLA, maître de conférences (A) à l'ENS-Kouba et à Mr. Menouar BOUGHADAoui Maître de conférences (A) à l'USD de Blida qui ont bien voulu juger ce travail en étant que examinateurs de cette thèse.

Un très grand merci à sami Mnif, chercheur au laboratoire LBPE et docteur spécialisé dans le domaine de biodegradation des hydrocarbures.

Un amical remerciement à tous les membres du laboratoire LBPE du CBS de Sfax, en particulier Najla, Sonia, thabet, Slim et Bassem.

Je tiens ici à remercier toutes les personnes qui ont participé d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE	9
1. PETROLE ET MICROBIOLOGIE PETROLIERE	13
1.1 Introduction	13
1.2 Hydrocarbures et pétrole	13
1.2.1 Formation du pétrole	13
1.2.2 Les composés pétroliers	15
1.2.2.1 Les hydrocarbures saturés	17
1.2.2.2 Les hydrocarbures aromatiques	17
1.2.2.3 Les composés polaires	19
1.2.2.4 Les asphaltènes	19
1.2.3 La toxicité du pétrole	20
1.3 Microbiologie des gisements pétroliers	21
1.3.1 Nature indigène ou exogène des micro-organismes des gisements pétroliers	21
1.3.2 Diversité microbienne des puits de pétrole	23
1.3.2.1 Les Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR)	23
1.3.2.2 Les bactéries thiosulfato-réductrices (BTR)	24
1.3.2.3 Les bactéries méthanogènes	25
1.3.2.4 Les bactéries fermentaires	25
1.3.2.5 Les bactéries réductrices des métaux	25
1.3.2.6 Les Bactéries Nitrato-Réductrices (BNR)	26
1.3.2.7 Les bactéries aérobies	26
1.3.3 Etude des micro-organismes	27
1.3.3.1 Approche culturelle	27
1.3.3.2 Approche non-culturelle	28
2. LES BIOSURFACTANTS	31
2.1 Introduction	31
2.2 Définition	32
2.3 Classification des biosurfactants	32
2.3.1 Les glycolipides	34
2.3.2 Les Lipopeptides et lipoprotéines	36
2.3.3 Acides gras, phospholipides et les lipides neutres	37
2.3.4 Les biosurfactants polymériques	37

2.3.5 Les biosurfactants particuliers	37
2.4 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants	38
2.4.1 Concentration Micellaire Critique (CMC)	38
2.4.2 Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants	38
2.5 Caractérisation des biosurfactants	39
2.5.1 Activité superficielle et interfaciale	39
2.5.2 La biodégradabilité	39
2.5.3 Faible toxicité	40
2.6 Utilisation des biosurfactants	41
2.7 La production des surfactants biologiques	42
2.7.1 Paramètres influençant la production	43
2.7.1.1 Source de carbone	44
2.7.1.2 Source d'azote	45
2.7.1.3 Cations	45
2.7.1.4 Agitation et taux d'oxygène	45
2.7.1.5 pH	45
2.7.1.6 Température	46
2.7.1.7 Salinité	46
2.7.2 Séparation des biosurfactants du milieu de croissance	46
3. DEGRADATION DES HYDROCARBURES	48
3.1 Introduction	48
3.2 Définition des HAP et origines	49
3.3 Propriétés chimiques des HAP	50
3.4 Méthodes de dégradation des hydrocarbures	52
3.4.1 Traitements physico-chimiques	53
3.4.1.1 Méthode de Fenton	53
3.4.1.2 Ultrasons	54
3.4.1.3 L'ozonation	54
3.4.1.4 Charbon actif	54
3.4.2 Traitement biologique	55
3.4.2.1 La biodégradation des hydrocarbures	56
3.4.2.2 Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures	57
3.4.3 Critères de choix d'une méthode de dépollution	65
4. MATERIEL ET METHODES	67
4.1 Présentation du biotope	67
4.1.1 Champ de production de Hassi Messaoud	67
4.1.2 Biotope	69
4.1.2.1 Prélèvement des échantillons	71
4.1.2.2 Prétraitement du sol	71
4.1.2.3 Caractérisations physico-chimiques du sol	71
4.2 Isolement et criblage des bactéries productrices de biosurfactants	73
4.2.1 Isolement et purification des bactéries	73
4.2.2 Criblage des souches productrices de biosurfactant	75

4.3 Production des biosurfactants	77
4.3.1 Conditions de production	77
4.3.2 Séparation et purification du biosurfactant	78
4.3.3 Caractérisation des biosurfactants	79
4.3.3.1 Caractérisation fonctionnelle	79
4.3.3.2 Caractérisation Physico-chimique	80
4.3.3.3 Caractérisation Structurale	81
4.4 Identification génotypique des souches retenues	82
4.5 Remobilisation des hydrocarbures	86
4.5.1 Dépollution d'un sol contaminé par le pétrole brut	86
4.5.2 Solubilisation des HAP	87
 5. RESULTATS ET DISCUSSIONS	 89
5.1. Biotope et échantillonnage	89
5.1.1 Caractéristiques du sol	89
5.2. Isolement et criblage des souches productrices de biosurfactants	90
5.2.1 Caractérisation phénotypique des isolats	90
5.2.2 Criblage des souches à fort potentiel de production	93
5.2.3 Choix de la source de carbone	94
5.3. Production des biosurfactants	95
5.3.1 Séparation des biosurfactants et purification	95
5.3.2 Caractérisation des biosurfactants	95
5.3.2.1 Caractérisation fonctionnelle	95
5.3.2.2 Caractérisation physico-chimique	98
5.3.2.3 Caractérisation structurale	103
5.4. Identification génotypique des souches performantes	108
5.5. Applications environnementale	109
5.5.1 Solubilisation des HAP	109
5.5.2 Remobilisation du pétrole	111
 CONCLUSION GENERALE	 119
 APPENDICES	
A. LISTE DES ABREVIATIONS	122
B. QUELQUES METHODES ET RESULTATS	124
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 143

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Formation du pétrole	15
Figure 1.2	Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut	16
Figure 1.3	Structure et nomenclature des HAP	18
Figure 1.4	Dérivé substitué du naphtalène	19
Figure 1.5	Voie de dégradation du phénanthrène par les bactéries sulfato-réductrices	24
Figure 2.1	Schéma représentatif d'une molécule de tensioactif	32
Figure 2.2	Classification des biosurfactants selon la nature des groupements	34
Figure 2.3	Structure de rhamnolipide	35
Figure 2.4	Structure du tréhalose lipide	35
Figure 2.5	Structure des formes lactonisées et d'acide des sophorolipides	36
Figure 2.6	Structure du surfactin	36
Figure 2.7	Schéma d'une micelle sphérique	38
Figure 2.8	Représentation schématique du partage des hydrocarbures dans un système sol/eau	39
Figure 3.1	Dégradation aérobie et anaérobie d'un noyau benzénique	57
Figure 4.1	Situation du champ de Hassi-Messaoud	68
Figure 4.2	Sols contaminés par les fluides de forage (Hassi- Messaoud)	69
Figure 4.3	Mesure de l'indice d'émulsification	78
Figure 4.4	Séparation du biosurfactant par acétone	79
Figure 5.1	La mesure de la tension superficielle pour différents isolats	93

Figure 5.2	Influence de la source de carbone sur la production des Biosurfactants	94
Figure 5.3	Pouvoir émulsifiant des biosurfactants sur les hydrocarbures et les huiles	96
Figure 5.4	Le bon pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants sur l'huile Moteur Produit par la souche 7G	97
Figure 5.5a	Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 7G	98
Figure 5.5b	Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 1C	98
Figure 5.6a	Influence du pH sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 7G	100
Figure 5.6b	Influence du pH sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche 1C	101
Figure 5.7a	Influence de la salinité sur l'efficacité de biosurfactant produit par la souche 7G	102
Figure 5.7b	Influence de la salinité sur l'efficacité de biosurfactant produits par la souche 1C	102
Figure 5.8a	La CMC du biosurfactant produits par la souche 1C	103
Figure 5.8b	La CMC du biosurfactant produits par la souche 7G	103
Figure 5.9	Test Rhamnose sur les deux biosurfactants	104
Figure 5.10a	Analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche 1C	105
Figure 5.10b	Analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche 7G	105
Figure 5.11a	Chromatogramme du biosurfactant 7G	106
Figure 5.11b	Chromatogramme du biosurfactant 1C	106
Figure 5.12a	Analyse par LC-MS du biosurfactant 1C	107
Figure 5.12b	Analyse par LC-MS du biosurfactant 7G	107
Figure 5.13	Structure proposée du biosurfactant 1C	108
Figure 5.14	Positions phylogénétiques des microorganismes	109

isolés à partir du sol contaminé par les
hydrocarbures

Figure 5.15a	Solubilisation du phénanthrène	110
Figure 5.15b	Solubilisation du Naphtalène	110
Figure 5.16a	Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le biosurfactant 1C	112
Figure 5.16b	Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le biosurfactant 7G	112
Figure 5.16c	Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le surfactant SDS	113
Figure 5.17	Solubilisation des n-alcanes	114
Figure 5.18	dégradation globale du pétrole brut	114
Figure 5.19	Taux de dégradation de l'hexadécane par les (a, b) biosurfactants	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques d'après Christofi et Ivshina, 2002	40
Tableau 2.2	Applications industrielles des biosurfactants (Singh et <i>al.</i> , 2007)	41
Tableau 2.3	Majeurs classes de biosurfactants et les microorganismes producteurs (Karanth et <i>al.</i> , 1999)	43
Tableau 3.1	Toxicité de quelques HAP (SAX'S, 1996)	51
Tableau 3.2	Proportions des différentes familles de composés dans divers bruts pétroliers (d'après Bertrand et Mille, 1989)	59
Tableau 4.1	Sites et origine des échantillons utilisés pour l'isolement des microorganismes	71
Tableau 4.2	Programme des cycles de PCR	85
Tableau 5.1	Composition du sol contaminé	89
Tableau 5.2	Résultats de la coloration de Gram, mobilité, oxydase, catalase	90
Tableau 5.3	Identification phénotypique des souches retenues	91
Tableau 5.4	Pouvoir antimicrobien des biosurfactants produits par les souches 7G et 1C	98
Tableau 5.5a	La solubilité du Naphtalène en fonction de la concentration des biosurfactants	111
Tableau 5.5b	La solubilité du Phénanthrène en fonction de la concentration des biosurfactants	111

INTRODUCTION GENERALE

En Algérie, la pollution des sols par les hydrocarbures est inquiétante suite au développement de l'industrie pétrochimique et l'installation de nombreuses stations de service et de pipes souterraines. Bien que des progrès substantiels soient accomplis ces dernières années pour réduire les rejets industriels à l'origine de pollutions chroniques et des accidents de pollution (déversements accidentels ou rejets non contrôlés dus à des pratiques inadéquates d'entreposage de résidus industriels, des fuites de réservoirs souterrains, des ruptures d'oléoducs,...) qui se produisent toujours d'où le nombre de sites contaminés est devenu considérable [1]. Par conséquent, la prise de conscience de danger que constituent les sols contaminés pour l'environnement a permis d'élaborer une série de réglementations préventives, regroupées dans la loi 03-10 du 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable. Cette loi définit les obligations pour la protection des sols et des eaux souterraines incluant la décontamination des sites pollués.

Depuis les années 80, un grand intérêt est accordé pour des microorganismes appartenant à divers genres (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, etc.) utilisant des hydrocarbures, des huiles végétales ou minérales comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance [2]. Il a été démontré que ces microorganismes libèrent leurs propres agents surfactants dans le milieu, facilitant ainsi la désorption des nutriments dans la matrice du sol ou leur dispersion dans l'eau [2]. Ces surfactants biologiques appelés "biosurfactants" améliorent l'accès et confèrent ainsi grâce à leur structure amphiphile un avantage compétitif aux souches microbiennes qui les sécrètent. Parmi d'autres, nous pouvons citer les

glycolipides produits par des souches des genres *Halomonas* [3] et *Pseudomonas* [3], des polysaccharides produits par des souches de *Pseudoalteromonas* [5] et des lipopeptides produits par des souches appartenant au genre *Bacillus* [6]. En termes d'abaissement de la tension interfaciale ou superficielle, de stabilité thermique et chimique, beaucoup de biosurfactants sont comparables aux surfactants synthétiques. D'autre part, les biosurfactants présentent l'avantage d'être biodégradables et non toxiques d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques, agroalimentaires et pour la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures [7].

Pour le même type de pollution, les solutions envisagées peuvent être variées et la stratégie adoptée dépend du site, de son contexte géographique, du degré et de la nature de pollution. D'autre part, l'importance des coûts de traitement a conduit à la recherche de nouvelles techniques de dépollution plus performantes et plus économiques et un intérêt particulier est porté sur le développement des techniques de remédiation qui offrent de bonnes perspectives tant du point de vue performance que du point de vue respect environnemental. Les techniques de remédiation des sols reposent sur des processus physico-chimiques et/ou biologiques [8].

L'industrie pétrolière utilise en particulier les biosurfactants pour l'extraction de pétrole adsorbé sur la roche. Ces agents ont le pouvoir de disperser les huiles (hydrocarbures) dans le cas de pollution marine qui nécessitera une élimination et une solubilisation de la nappe d'huile le plus efficacement et le plus rapidement possible et permettant ainsi une biodégradation plus rapide des contaminants avec un coût généralement plus faible comparé aux procédés physiques et chimiques. Ils sont par ailleurs, utilisés dans la bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures [9].

A cet effet, la dépollution des sols en utilisant les biosurfactants consiste à extraire le, ou les polluants, à l'aide d'un réactif approprié dans le but de laver le sol en mobilisant le contaminant, la plupart du temps sans le détruire. Dans certains cas, ces agents ont également un rôle de solubilisant.

Ce travail de recherche s'est intégré dans le cadre des activités du Pôle d'Excellence Régional (PER) de Bioprocédés Environnementaux et Industriels monté par l'AUF au sein du centre de biotechnologie de Sfax (Tunisie). Il s'est intéressé plus spécifiquement à la biodégradation des hydrocarbures et leurs dérivés ainsi que la production de biosurfactants par des souches spécifiques isolées à partir de sols contaminés par les fluides de forage (bourbiers) de la région de Hassi-Messaoud (Algérie).

Dans le but d'exploiter nos niches écologiques extrêmes pour obtenir des souches bactériennes capables de produire de molécules à fort potentiel décontaminatif telles que les biosurfactants en vue d'une application environnementale et industrielle, nous nous sommes intéressés dans ce présent travail d'atteindre les principaux objectifs suivants :

- 1) Isolement et identification des souches bactériennes capables de produire des biosurfactants.
- 2) Etude des principaux paramètres pouvant influencer cette production.
- 3) Caractérisation chimique, physicochimique et antimicrobien de biosurfactants produits.
- 4) Application environnementale dans la dépollution d'un sol contaminé par les hydrocarbures.

CHAPITRE 1

PETROLE ET MICROBIOLOGIE PETROLIERE

1.1 Introduction

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale. Énergie fossile, son exploitation est l'un des piliers de l'économie industrielle contemporaine, car il fournit la quasi totalité des carburants liquides. Le pétrole est aussi souvent appelé or noir en référence à sa couleur et à son coût élevé. Cependant, les gisements pétroliers hébergent de nombreuses populations bactériennes [10].

L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. L'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie entraîne des risques de pollution pour l'environnement pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème. L'élimination du pétrole de l'environnement nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs la biodégradation, par les microorganismes et en particulier par les bactéries, est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement.

1.2 Hydrocarbures et pétrole

1.2.1 Formation du pétrole

Le pétrole est issu de la décomposition de matières organiques végétales et animales qui va former ce que l'on appelle une roche mère. Le pétrole prend naissance dans des bassins sédimentaires, des zones où s'accumulent des résidus minéraux et organiques au fil de millions d'années, c'est la première étape

de la formation du pétrole. La nature de ces sédiments varie selon le climat, le niveau des océans et le relief. Une matière organique exclusivement animale produira beaucoup d'hydrocarbures liquides, alors qu'une matière organique riche en matière végétale donnera principalement du gaz. Ces particules se déposent en même temps qu'une sorte de boue. Le milieu d'accumulation est confiné : lac, lagunes, deltas ou lagons [11].

La deuxième étape de formation est celle de la transformation en hydrocarbures. Ce milieu étant peu oxygéné, des réactions réductrices transforment la matière organique en kérogène. Au fur et à mesure du recouvrement de cet ensemble boue kérogène, la transformation en hydrocarbures commence. Elle débute vers des températures de 60 °C, ce qui correspond à un enfouissement d'environ 1500 à 2000 m. La vitesse de transformation augmente jusqu' à 100 °C (3000 m) puis, au-delà de cette limite, elle diminue lorsque la température augmente [12]. Si l'enfouissement est supérieur à 4000 m (soit plus de 150 °C), il ne se forme plus que du méthane. La matière organique en décomposition est en quelque sorte coincée dans la roche qui s'est formée au moment de son enfouissement. Le pétrole en formation est moins dense que la roche qui l'entoure, il peut donc migrer vers la surface à condition qu'il ne soit pas arrêté au cours de sa progression par des roches imperméables.

Une fois arrivé à la surface, les hydrocarbures se dispersent (pour le gaz) ou s'oxydent (pétrole liquide), ne laissant sur le sol que des résidus solides (bitumes) inexploitable. Enfin, pour conserver le précieux liquide, il faut donc un piège sur sa route, des roches poreuses, où le pétrole va se nicher dans les interstices. Ils sont à l'origine des réservoirs actuels de pétrole [13]. Ces roches se comportent comme des éponges, absorbant le précieux liquide. Quelques milliers d'années plus tard, on trouvera alors à cet endroit un champ pétrolier exploitable (Figure 1.1).

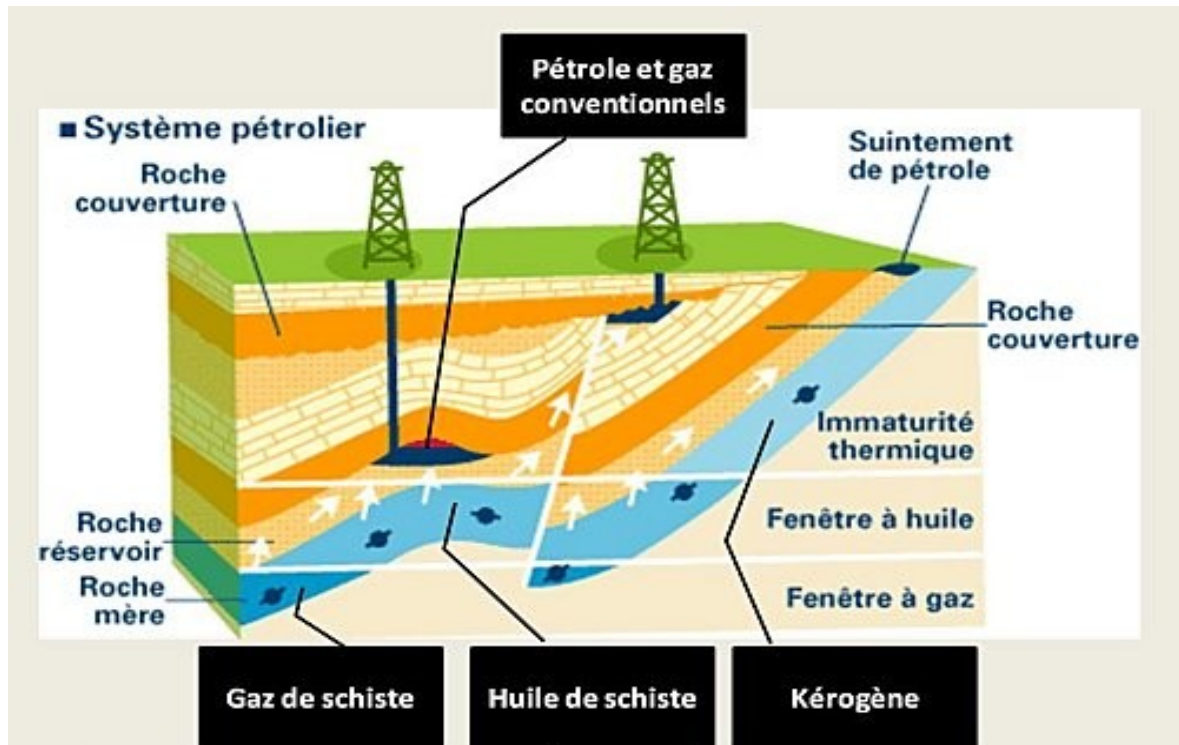


Figure 1.1 : Formation du pétrole [14]

1.2.2 Les composés pétroliers

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles (Figure 1.2) dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique [15]. Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95% de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70%), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40%), les composés polaires (5 à 25%) et les asphaltènes (0 à 10%) [16].

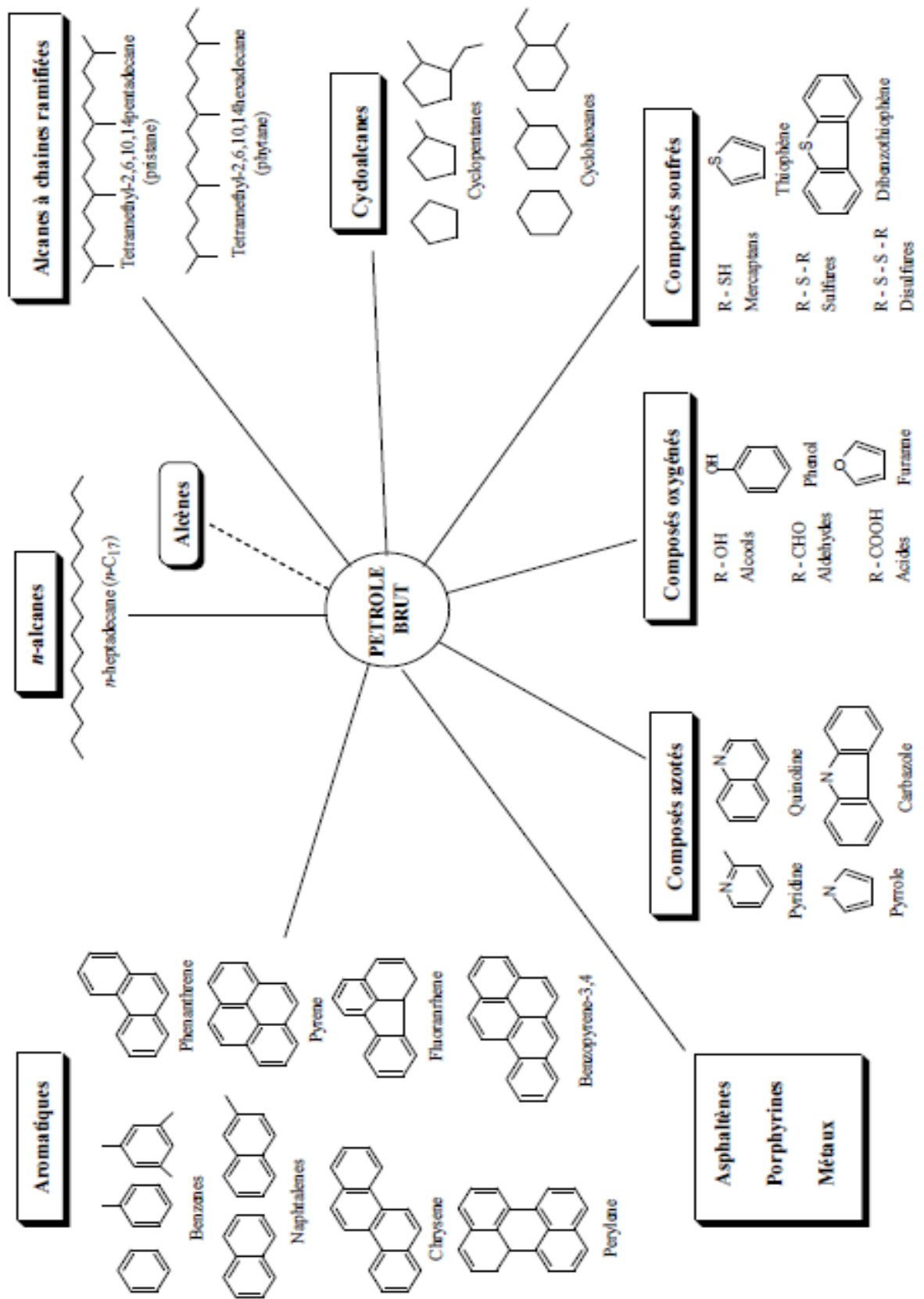


Figure 1.2 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut [16]

1.2.2.1 Les hydrocarbures saturés

- 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 abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.

Par contre le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes.

- Les cycloalcanes: renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

1.2.2.2 Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques [17]. Les composés aromatiques sont abondants dans le pétrole, dans les dépôts de charbon, dans la tourbe, dans le sol et dans les sédiments [18].

✓ Les hydrocarbures monoaromatiques

Les HAM sont des polluants ubiquistes dans l'environnement, tels que les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et *o*, *m* et *p* Xylène). Ils se trouvent surtout dans l'essence et les carburants des avions et sont largement répandus dans les synthèses industrielles [19]. Les BTEX entrent fréquemment dans le sol, les sédiments et les eaux souterraines en raison de la fuite des réservoirs et les canalisations de stockage souterraines. Les BTEX sont cancérigènes et neurotoxiques et sont classés comme polluants prioritaires réglés par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement [20].

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des molécules principalement formées par la condensation de cycles benzéniques. Cette condensation peut être linéaire comme l'anthracène ou bien angulaire tels que le phénanthrène (Figure 1.3). Certains auteurs ont même subdivisé ce groupe d'HAP en deux catégories en fonction de la disposition relative à des cycles condensés. Ils ont ainsi défini les systèmes kata-annelés et péricondensés qui correspondent respectivement aux molécules dont le carbone tertiaire est engagé dans une liaison entre deux cycles (ex : anthracène) et dans une liaison entre trois cycles (ex : pyrène) [21]. Cependant, bien que la plupart des molécules soient formées par condensation, certains HAP ont leurs cycles liés par les sommets ou même grâce à des chaînes aliphatiques [22]. La majorité des HAP est constituée de 2 à 6 cycles et les poids moléculaires varient approximativement entre 130 et 280 g. mol⁻¹. Les HAP peuvent être subdivisés en deux sous-groupes : les HAP de faible masse moléculaire et les HAP de masse moléculaire élevée. Il est communément admis que les HAP légers ont un nombre de cycles compris entre 2 et 3, alors que les HAP lourds sont composés de 4 à 6 cycles [22]. Cependant, certains auteurs n'utilisent pas cette classification. Par exemple, YANG et *al.* en 1998 [23] considère trois classes : les HAP de petit, moyen et haut poids moléculaires correspondant aux composés ayant respectivement de 2 à 3, 4 et de 5 à 7 cycles.

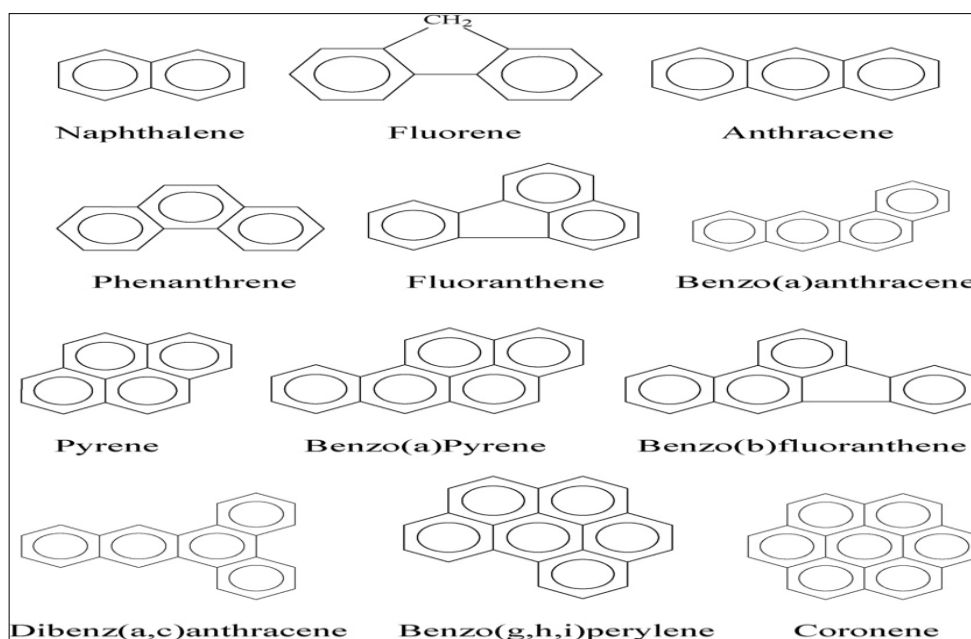


Figure 1.3 : Structure et nomenclature des HAP [24].

A chaque HAP est associé un certain nombre de molécules dérivées qui se différencient par la présence de radicaux alkylés (méthyl, éthyl, etc.) (Figure 1.4).

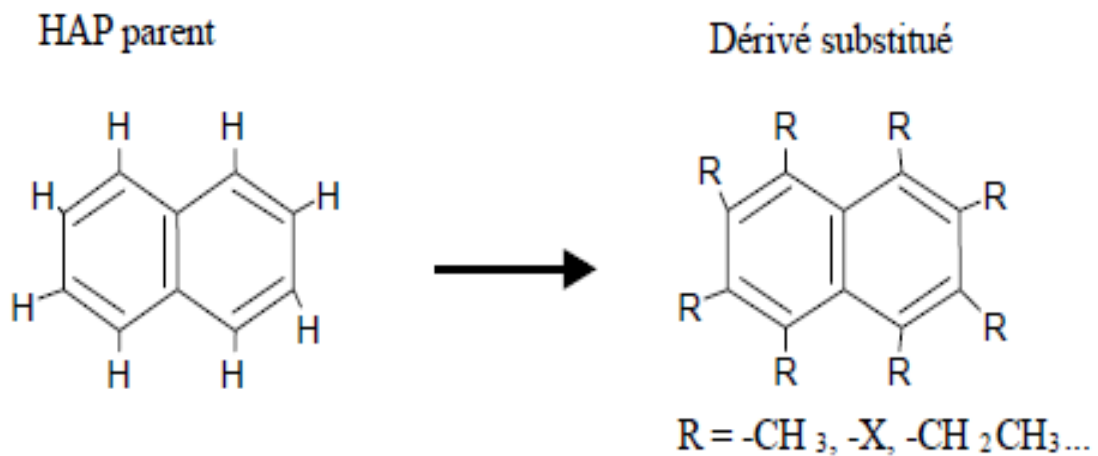


Figure 1.4: Dérivé substitué du naphthalène

Les HAP ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.

1.2.2.3 Les composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que :

- des composés oxygénés: phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...
- des composés soufrés: mercaptans, sulfures, disulfures,...
- des composés azotés: pyridines, quinoléines,...

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés [16].

1.2.2.4 Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O, N, S), d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables. Les métaux sont également présents mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés [16].

1.2.3 La toxicité du pétrole

Le pétrole est constitué d'hydrocarbures dont quelques uns sont cancérigènes comme le benzène ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [20, 24]. Ces molécules présentent des propriétés toxiques : l'exposition à forte dose agit sur le système nerveux central entraînant des états de somnolence, des sensations d'ébriété et des maux de tête. Des expositions plus faibles mais prolongées peuvent altérer la mémoire et certaines capacités psychiques [25]. Leur contact prolongé avec la peau ou les muqueuses aura une action dégraissante et desséchante se traduisant par des irritations ou des dermatoses. L'homme est aussi exposé aux dangers des hydrocarbures par l'ingestion des aliments contaminés mais, il ne faut pas oublier que la source majoritaire d'exposition aux hydrocarbures polycycliques (HPC) est les denrées alimentaires (légumes et viandes grillées) [26]. Les hydrocarbures aromatiques, comme tout solvant pétrolier sont tous des composés organiques volatils (COV). Leur vaporisation dans l'atmosphère contribue à la production d'ozone dans la troposphère par réaction photochimique, augmentant ainsi les risques pour les personnes souffrant d'insuffisance respiratoire. En plus, lors de la combustion du pétrole il y aurait rejet de dioxyde de carbone ce qui augmente l'effet de serre [27].

En cas de rejet du pétrole dans le milieu aquatique, une partie se dissout lentement dans l'eau et a pour conséquence de polluer gravement les nappes de la nappe phréatique. Ces molécules dissoutes à ce stade sont extrêmement toxiques pour la vie sous-marine [28]. Le reste, presque du goudron tant c'est dense, est ballotté, brassé jusqu'à former une émulsion que les spécialistes appellent "mousse au chocolat".

La pollution du milieu marin se fait en trois étapes [16]:

- Ecoulement du pétrole, extension de la nappe, forte mortalité de la faune aquatique en deux semaines.
- Stabilisation de la nappe, évaporation, oxydation, dilution, biodégradation en quelques mois à un an.
- Retour à l'équilibre qui peut durer une dizaine d'années.

1.3 Microbiologie des gisements pétroliers

Les réservoirs pétroliers se trouvent généralement dans des couches sédimentaires poreuses et perméables de grès ou de calcaire jusqu'à des profondeurs de plusieurs kilomètres au dessous de la croûte terrestre. Ces environnements sont considérés comme strictement anaérobies. Ils présentent une large gamme de température (de 30 à 180 °C, la température sous la surface terrestre augmentant en moyenne de 3 °C tous les cent mètres), des salinités variables (jusqu'à la saturation) et des pressions importantes (jusqu'à plusieurs centaines de bars) et des pH qui sont neutres ou légèrement acides [29].

1.3.1 Nature indigène ou exogène des microorganismes des gisements pétroliers

La présence de microorganismes dans les réservoirs pétroliers a été établie depuis longtemps. Cependant, c'est seulement depuis une vingtaine d'année que les industries pétrolières ont pris en considération le rôle de ces microorganismes dans la formation des huiles et les problèmes en relation avec la dégradation des systèmes d'extraction. En effet, la première étude de la microflore associée aux gisements pétroliers a mis en évidence la présence de bactéries sulfato-réductrices [30] et depuis cette époque l'auteur se posait la question sur la nature indigène de ces microorganismes. Aujourd'hui encore, et malgré toutes les études menées au cours des dernières décennies sur la microbiologie des réservoirs pétroliers, il n'est pas établi que ces microorganismes soient indigènes de ces environnements profonds. Si c'était le cas, ils auraient survécu depuis le dépôt de la matière organique dans les bassins sédimentaires, il y a plusieurs centaines de millions d'années, jusqu'à la formation des hydrocarbures dans la roche réservoir, après une série d'événements géologiques qui diffère d'un réservoir à l'autre. Sinon, la présence d'un grand nombre de ces microorganismes pourrait être le résultat de contaminations au cours des opérations de forage ou à la suite d'injection d'eau dans les réservoirs lors de l'exploitation pétrolière. Cette dernière hypothèse est néanmoins à relativiser, car dans de nombreux cas les conséquences géochimiques de certaines activités bactériennes, dont la plus importante est la biodégradation *in situ* des hydrocarbures, auraient été observées [29].

L'étude de la microflore de gisements pétroliers pose le délicat problème lié à l'origine des microorganismes présents dans les échantillons étudiés. En effet, le

mécanisme d'extraction du pétrole notamment les techniques d'extraction secondaires et tertiaires (forage, injection d'eau...) constituent des sources non-négligeables de contamination :

- L'eau injectée dans la nappe au cours de l'exploitation peut avoir diverses origines : eau d'un réseau interne à l'entreprise de forage: injectée, récupérée, traitée et réinjecté ; eau de rivière ou de mer dans le cas d'exploitation « *off-shore* » ; eau de nappe phréatique adjacente à la nappe de pétrole ; eau de consommation courante lorsqu'aucune nappe souterraine n'est proche du puits ou lorsque ce puits est trop éloigné du site de production pour être alimenté par un réseau d'eau interne.
- La contamination peut également provenir du matériel utilisé au cours de l'exploitation. En effet, les têtes de forage et les canalisations peuvent perturber la composition initiale de la nappe. La nature de ces dernières favorise particulièrement le développement de bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui, en se multipliant en biofilm autour de canalisations, provoquent une dégradation accélérée des installations.
- Les microorganismes présents dans les différentes couches stratigraphiques qui surmontent la nappe peuvent eux aussi contaminer l'eau de production de pétrole. Dans les couches superficielles on retrouve des microorganismes chimioorganotrophes se développant sur la matière organique présente en grande quantité dans le sol. Il s'agit de souches aérobies ou anaérobies qui interviennent dans le cycle de l'azote, du soufre et des métaux [31].

Pour cela, plusieurs critères peuvent être utilisés pour évaluer la nature indigène ou exogène des isolats. En effet, le premier critère est la technique d'échantillonnage. Par instance, les échantillons des eaux de production collectés à partir des séparateurs ont de fortes probabilités de contenir des contaminants exogènes, comparés aux échantillons collectés à partir des têtes de puits pétroliers. Les échantillons d'eau à partir de réservoirs exploités par injection d'eau sont susceptibles de contenir des bactéries originaires des eaux d'injections utilisées au cours de l'exploitation et non pas des bactéries indigènes. Une autre possibilité pour évaluer si un microorganisme est originaire d'un tel système est de

comparer les caractéristiques physiologiques de la souche avec les conditions physico-chimiques *in situ*. En effet, la température optimale de croissance d'un microorganisme isolé d'un réservoir pétrolier peut être un indicateur de son adaptation physiologique à l'environnement, si elle correspond à la température *in situ* du puits pétrolier [32].

1.3.2 Diversité microbienne des puits de pétrole

Une grande variété de microorganismes a été isolée à partir de différentes profondeurs dans des gisements pétroliers, notamment, des sulfato-réductrices, des méthanogènes, des réductrices de fer et de manganèse [32].

1.3.2.1 Les Bactéries Sulfato-Réductrices (BSR)

Les BSR, qu'elles soient d'origines indigène ou exogène, représentent une communauté microbienne ubiquiste qui s'adapte à différentes salinités et températures dans les environnements pétroliers [33]. Très tôt, les BSR ont été rendues responsables de la production d'H₂S dans les réservoirs entraînant une réduction de la qualité du produit, la corrosion des matériaux en acier et des problèmes de santé chez les employés à cause de sa toxicité [34]. Ceci peut justifier que ces bactéries sont parmi celles qui ont été les plus étudiées par les microbiologistes et les plus fréquemment retrouvées dans les gisements pétroliers [35, 36].

✓ Les BSR mésophiles

La plupart des souches isolées des eaux de gisements pétroliers appartiennent au genre *Desulfovibrio* (*D. longus* selon MAGOT et al. 1992 [37] et *D. vietnamensis* selon NGA et al. 1996 [38]), isolées respectivement d'un puits français et d'un puits vietnamien). Elles sont considérées comme halotolérantes ou légèrement halophiles et *D. gabonensis* [39] est une bactérie modérée halophile, en plus de *D. capillatus* qui a été isolée d'un puits pétrolier mexicain [40].

Récemment, il a été démontré que des bactéries sulfato-réductrices sont capables de dégrader le phénanthrène [41] (Figure 1.5). Les enzymes intervenant dans cette voie métabolique sont : *p*-crésol méthylhydroxylase, benzyle alcool

déshydrogénases, aldéhyde déhydrogénases et hydroxybenzoate décarboxylase [41].

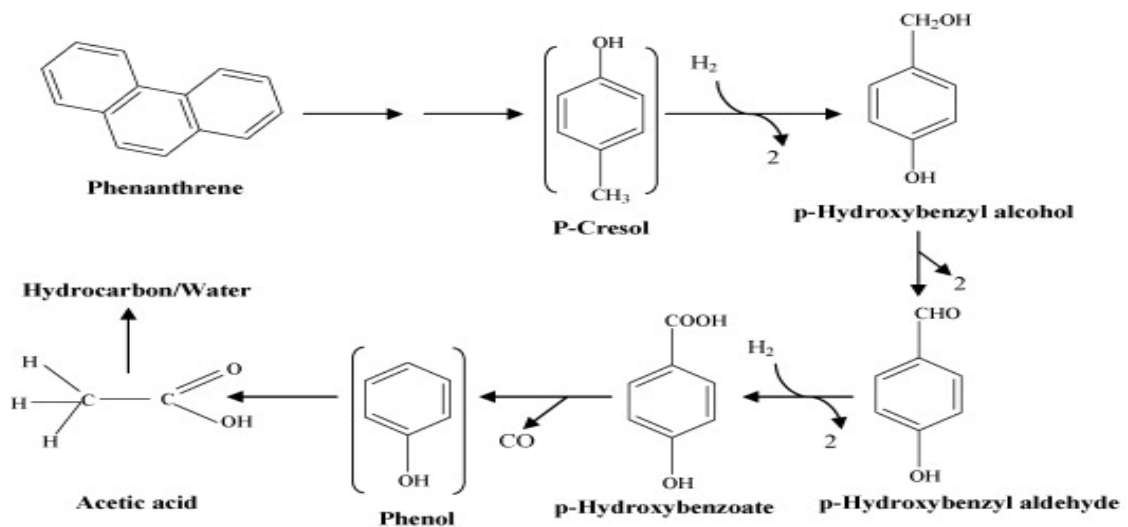


Figure 1.5 : Voie de dégradation du phénanthrène par les BSR [41]

✓ Les BSR thermophiles

Les BSR thermophiles peuvent être isolées à partir des gisements pétroliers chauds [33]. Contrairement aux mésophiles qui appartiennent seulement aux domaines des *Bacteria*, les thermophiles peuvent appartenir aux domaines des *Bacteria* et des *Archaea* [33]. Les BSR thermophiles appartenant au domaine *Bacteria*, isolées à partir des eaux de gisements pétroliers, ont été bien étudiées [42]. Parmi ces souches, nous pouvons citer *Desulfotomaculum kuznetsovii* qui a été isolée à partir des eaux de deux gisements pétroliers du bassin Parisien [33]. Dans le domaine des *Archaea*, les seules BSR connues sont des bactéries thermophiles à hyperthermophiles qui appartiennent au genre *Archeoglobus* dont l'espèce *A. fulgidus* a été isolée à partir de gisements pétroliers chauds dans la partie norvégienne de la Mer du Nord [43].

1.3.2.2 Les bactéries thiosulfato-réductrices (BTR)

Les BTR sont capables de réduire le thiosulfate en sulfure d'hydrogène via une enzyme ; le thiosulfate réductase [35]. Les BTR incluent des espèces de *Clostridiaceae* et d'*Enterobacteriaceae*.

1.3.2.3 Les bactéries méthanogènes

Les bactéries méthanogènes sont des microorganismes appartenant exclusivement au domaine des *Archaea*. Ce sont des anaérobies stricts qui tiennent leur énergie de la réduction du CO₂ en oxydant l'H₂ tout en produisant du méthane (CH₄). Elles sont souvent associées à des puits pétroliers riches en sels.

Parmi les méthanogènes présentes dans les environnements pétroliers, il existe des méthylotrophes telle que *Methanohalophilus euhalobius* qui a été isolée d'un puits pétrolier avec une salinité de 140 g/l de NaCl [44] alors que *Methanosarcina siciliae* HI350, une souche légèrement halophile, a été isolée d'un puits pétrolier dans le Golfe du Mexique [45]. *Methanoculleus receptaculi* est une bactérie anaérobie stricte thermophile et méthanogène isolée à partir d'un gisement de pétrole de Shengli, Chine [46].

1.3.2.4 Les bactéries fermentaires

Les bactéries fermentaires mésophiles comme *Fusibacter paucivorans* [47] tandis que la présence de souches de *Thermotoga* dans les gisements pétroliers a été confirmé pour la première fois par STETTER et *al.* (1993) [48] et les bactéries hyperthermophiles telle que *Thermotoga hypogea* [49].

1.3.2.5 Les bactéries réductrices des métaux

Les puits pétroliers sont des écosystèmes où l'on peut trouver de nouvelles bactéries réductrices de fer ou de manganèse. Cependant, la présence de ces métaux n'est pas encore bien étudiée, et on ne connaît pas l'impact de ces métabolismes bactériens *in situ*. *Deferribacter thermophilus* est une bactérie thermophile qui est capable de réduire le fer, le manganèse et le nitrate. Elle utilise comme source d'énergie l'extrait de levure, la peptone, les Casamino-acides, la tryptone, l'hydrogène et des acides organiques comme l'acétate, le lactate et le valérate [50]. *Geoalkalibacter subterraneus* a été isolée à partir des eaux de production de gisement pétrolier. C'est une bactérie anaérobie stricte qui croît dans des conditions optimales de température de 40°C, de pH 7 et de NaCl égal à 20 g/l. Elle est capable de réduire le Fe (III), le Mn (IV), le nitrate et le soufre élémentaire [51].

1.3.2.6 Les Bactéries Nitrato-Réductrices (BNR)

Les BNR présentes dans les gisements pétroliers peuvent être des microaérophiles ou des anaérobies facultatives [52].

Des microbiologistes de l'Institut de Recherche et de Développement (IRD) de France et leurs partenaires, qui étudient ces écosystèmes particuliers, ont identifié deux nouvelles bactéries appartenant aux espèces consommatrices de nitrates dans des puits de pétrole australiens et mexicains : *Petrobacter succinatimandens* et *Garciella nitratreductens*, qui se distinguent par leurs activités métaboliques [53].

L'espèce *Petrobacter succinatimandens*, isolée d'un puits de pétrole situé dans le Queensland, à l'Est de l'Australie, s'est révélée capable d'oxyder les acides organiques. Elle se caractérise par un métabolisme aérobie. Parmi les souches qui utilisent le nitrate comme accepteur final d'électrons, on distingue celles qui oxydent l'hydrogène ou les sulfures comme les souches FWKO, CVO, YK-1 [52], des hétérotrophes qui peuvent utiliser les acides organiques comme l'acétate, que l'on trouve dans certains réservoirs pétroliers.

1.3.2.7 Les bactéries aérobies

Les eaux de formation de pétrole contiennent environ 30 g/l NaCl, ce qui constitue un environnement favorable pour la croissance des bactéries halophiles comme celles du genre *Halomonas*, bactérie halophile modérée capable de croître pour des concentrations en NaCl comprises entre 30 et 150 g/l [54]. La présence de l'oxygène dissout dans les eaux d'injection des gisements pétroliers peut rendre ces derniers favorables à la croissance des bactéries aérobies [55]. Les bactéries du genre *Geobacillus*, croissant aux températures entre 35 et 75 °C, sont répandues dans le monde entier et peuvent être récupérées de divers environnements normaux. Parmi les bactéries aérobies mésophiles isolées à partir des gisements pétroliers, on cite : *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Brevibacillus* sp., *Methylobacterium* sp. Et *Dietzia* sp. [56]. *Modicisalibacter tunisiensis* a été isolée à partir des eaux d'injection de pétrole, elle est capable de se développer à des températures comprises entre 15 et 45 °C avec un optimum de 37 °C. Cette bactérie est qualifiée comme halophile

modérée du fait qu'elle est capable de croître à des concentrations en NaCl allant de 10 à 250 g/l avec un optimum de 100 g/l NaCl [56]. Ces bactéries aérobies ont des capacités biodégradatives intéressantes sur les hydrocarbures et leurs dérivés. Comme exemple, la souche C5 a été isolée d'un gisement pétrolier tunisien (Litayem) à partir d'un enrichissement sur le tyrosol en condition thermophile et en présence de 30 g/l de NaCl. Cette souche est affiliée au genre *Geobacillus* avec l'espèce *Geobacillus pallidus* qui constitue l'espèce la plus proche. Cette bactérie est capable de dégrader le pétrole brut et divers composés aromatiques [57]. Une autre souche tunisienne C2SS100, appartenant au genre *Halomonas* a été isolée à partir du gisement pétrolier (Sercina) à 100 g/l de NaCl et à 37 °C, avec le pétrole brut 1% (v/v) comme source de carbone et d'énergie. Cette souche est capable de croître sur le pétrole brut, présent dans le milieu minimum, sans l'ajout de l'extrait de levure. En plus de sa capacité à dégrader le pétrole brut, C2SS100 est active sur le mazout (1%, v/v) et l'huile de moteur (1%, v/v) [58].

1.3.3 Etude des microorganismes

Il existe deux méthodes essentielles pour étudier les microorganismes de l'environnement pétroliers.

1.3.3.1 Approche culturale

Cette approche est basée sur les techniques de la microbiologie classique se basant sur l'utilisation des milieux de culture liquides et solides et de vérification de la pureté des isolats par observations microscopiques. L'inconvénient majeur de ces techniques, c'est qu'elles favorisent la multiplication d'une espèce par rapport à l'autre suite à la sélection réalisée avec le milieu de culture utilisé.

Cette approche basée sur la cultivabilité a l'avantage de prendre en considération l'adaptation de ces microorganismes à leur environnement.

1.3.3.2 Approche non-culturale

Les méthodes non-culturelles basées sur l'analyse de l'ADNr 16S ont montré que les microorganismes cultivables peuvent représenter des constituants mineurs des communautés microbiennes. Ces techniques basées sur la biologie moléculaire ont été récemment utilisées pour étudier la diversité microbienne des échantillons

collectés en tête des puits à partir des champs pétroliers on-shore et off-shore en Californie [59, 60]. Une diversité microbienne intéressante a pu être mise en évidence grâce à ces techniques moléculaires.

Les deux approches, culturelle et non-culturelle, sont donc complémentaires. La comparaison de la diversité des eaux de production des gisements pétroliers, obtenue grâce aux techniques moléculaires et à celle des isolats obtenus grâce à des cultures d'enrichissement sur les mêmes échantillons, a montré que les deux approches ont sélectionné chacune une sous-partie de la population microbienne [59].

a) Le clonage et le séquençage des ADNr

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne. Les différentes étapes de cette technique décrites par [61, 62]:

- Extraction des acides nucléiques de l'échantillon
- Amplification spécifique des gènes codant pour l'ARNr
- Clonage du produit amplifié
- Séquençage et analyse des clones de la banque

b) Les sondes nucléiques et les techniques d'hybridation

L'utilisation des sondes nucléiques permet d'accéder individuellement à la cellule. L'alternance de domaines conservés variables, observées sur l'ARNr permet de dessiner des sondes au spectre de spécificité plus ou moins large. La technique d'hybridation implique la formation d'un duplex entre une sonde nucléique et un ARNr cible.

La technique d'hybridation in situ appliqué à l'écologie microbienne s'est bien développé du fait de l'augmentation du nombre des séquences déposées dans des banques de données et du développement de logiciels de détermination de sondes performantes [63, 64]. Elle est également utilisée pour des quantifications de microorganismes.

c) L'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

La technique d'analyse de polymorphisme de longueurs de fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à digérer

l'ADN codant pour le gène auquel elle est appliquée par des enzymes de restriction et de comparer les profils de restriction obtenus après migration sur gel d'agarose. Lorsqu'elle est appliquée à des ADN_r, on parle d'analyse de restriction d'ADN ribosomaux amplifiés ou d'ARDRA. La comparaison des différents profils de restriction, permet de décrire grossièrement la diversité de la population microbienne et sa structure [65, 66].

d) La T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

La T-RFLP est une méthode développée pour estimer la diversité phylogénétique et la composition des populations microbiennes dans différents environnements [68]. La détermination du nombre et de l'abondance des microorganismes est possible à partir d'un mélange de produits PCR des ADN_r 16S. Cette technique permet d'accéder rapidement à la diversité microbienne d'un échantillon biologique et d'étudier les changements structuraux d'une communauté microbienne, suite à des perturbations environnementales par exemple [67].

e) La SSCP (Single Strand Confirmation Polymorphism)

La technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ou d'analyse de polymorphisme de confirmation d'acides nucléiques simples brins est une méthode sensible fréquemment utilisée en écologie microbienne [68, 69, 70]. Elle permet de séparer les molécules d'ADN_r 16S en fonction de leur séquence [71]. Le principe de cette technique consiste à une conformation différente de l'ADN monocaténaire qui détermine la mobilité dans un gel dénaturant. Cette technique SSCP permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens. Elle permet de caractériser, sans mise en culture, la diversité microbienne, de comparer les microflore semblables et d'en suivre la dynamique [68, 72].

f) La DGGE (Denaturing Gradient Gel electrophoresis)

Le principe de la DGGE se base sur la séparation par électrophorèse des ADNs double brins, de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente, sous l'action d'un agent dénaturant [73]. Cette technique est utilisée en écologie microbienne pour distinguer les différents microorganismes présents dans l'échantillon étudié, après amplification de leur ADN_r 16S, dans les zones à faibles

température de fusion, font que des séquences différentes stoppent leur migration dans les emplacements différents du gradient dénaturant [74].

La DGGE est une méthode sensible. Elle permet la comparaison de souches présentes dans un échantillon étudié par comparaison du profil de migration à des profils obtenus sur des cultures pures [75] et l'identification par séquençage après excision ou par hybridation sur le gel d'électrophorèse à l'aide de sonde spécifiques [76, 77]. Elle permet également, l'analyse de l'évolution d'une communauté microbienne dans le temps et l'étude des effets des facteurs environnementaux sur un système biologique et l'action d'un inoculum ou de nutriments sur des cultures [78].

g) La PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel est de combiner l'amplification de l'ADN et sa détection. Il est possible ainsi de réduire le temps nécessaire au traitement du produit d'amplification. La RT-PCR (Real Time PCR) nécessitera l'utilisation d'un marqueur fluorescent, par exemple le SYBR Green I, qui s'intercale entre les bases azotées de l'ADN. La fluorescence émise peut être immédiatement mesurée.

Des protocoles de la PCR quantitatives en temps réel ont été développés pour identifier et dénombrer spécifiquement certaines espèces en utilisant des amorces spécifiques de l'ADNr. La sensibilité de la détection apporté par le criblage moléculaire associée à la rapidité et la quantification sont appréciables lors des contrôles dans le domaine vignoble de *Sacharomyces cerevisiae*, d'*Oenococcus oeni*, de *Brettanomyces bruxellensis* et des bactéries acétiques [79, 80]. Un système de RT-PCR (Taqman PCR) a été développé pour la détection des bactéries fécales dominantes en ciblant l'ADNr 16S [81].

CHAPITRE 2

LES BIOSURFACTANTS

2.1 Introduction

De nombreuses industries (pétrolière, chimique, cosmétique et agroalimentaire) utilisent des surfactants pour maîtriser les phénomènes d'émulsion, de dispersion, d'adhérence ou de viscosité, de leurs produits. Cependant, les surfactants synthétiques actuellement utilisés risquent de poser autant des problèmes environnementaux qu'ils n'en résolvent. Pour la plupart de dérivées du pétrole, ces molécules sont en général toxiques et extrêmement persistantes dans les milieux naturels, car non biodégradables. En outre, leur efficacité diminue dans des conditions physiques extrêmes de température, pH ou salinité [82].

Au cours des années 80, un grand intérêt est donné pour des microorganismes appartenant à diverses espèces (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* etc.) utilisant des hydrocarbures, des huiles végétales ou minérales, ou des carbohydrates comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Il a été démontré que ces microorganismes libèrent leurs propres agents surfactants dans le milieu, facilitant la désorption des nutriments de la matrice du sol, ou leur dispersion dans l'eau. Ces surfactants biologiques appelés "biosurfactants" en améliorent l'accès, confèrent ainsi grâce à leur structure amphiphile un avantage compétitif aux souches microbiennes qui les sécrètent [83].

En termes d'abaissement de la tension interfaciale ou superficielle, de stabilité thermique et chimique (pH), beaucoup de biosurfactants sont comparables aux surfactants synthétiques. D'autre part, les biosurfactants présentent l'avantage d'être biodégradables et non toxiques d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques et agroalimentaires [7, 84].

Les biosurfactants peuvent être produits en utilisant divers substrats et par conséquent, ils ont divers structures chimiques. Les bactéries produisant les biosurfactants, sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes [85].

2.2 Définition

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes des levures, bactéries et champignons [86, 87, 88] de structures différentes [89, 90, 91]. Ils s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface [92]. Les biosurfactants sont constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire [93] (figure 2.1). Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [7].

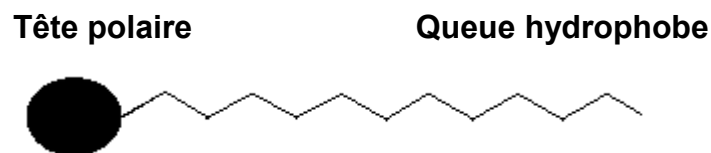


Figure 2.1 : Schéma représentatif d'une molécule de tensioactif

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques [85, 93]: les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre. La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification [94].

2.3 Classification des biosurfactants

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés en fonction : de leur origine naturelle ou synthétique ; de la longueur de la partie lipophile en agents mouillants (C8-C10), détergents (C12-C16),

émulsionnants ou adoucissants (C18-C22); ou en fonction de la nature de leur tête polaire [95]. Leur mode de dissociation dans l'eau, biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, la masse moléculaire, les propriétés physico-chimiques et le mode d'action et d'origine microbienne

✚ Selon la nature du groupement hydrophile de la molécule, les tensioactifs chimiques sont classés en quatre groupes [96, 93], comme le montre la figure 2.2.

✓ Tensioactifs anioniques

L'anion est en général un métal alcalin ou les tensioactifs anioniques se dissocient dans l'eau, donnant des ions de charge négative un ammonium. Ils sont fréquemment utilisés comme agents détergents et moussant. Les tensioactifs anioniques peuvent être divisés en plusieurs types, notamment des acides carboxyliques, sulfoniques et phosphoriques.

✓ Tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques se dissocient en solution aqueuse, donnant des ions de charge positive (exemple: amines R_3NH^+). Ils sont généralement utilisés comme adoucissants textiles et bactéricides.

✓ Tensioactifs non ioniques

Ils sont constitués d'une tête polaire non ionisable en solution aqueuse. Les tensioactifs de cette classe sont reconnus par leurs pouvoirs émulsifiants et mouillants (exemple: les composés polyéthoxylés).

✓ Tensioactifs amphotères

Ces composés ont la particularité d'avoir les deux caractères anionique et cationique dans une même molécule (p.ex. : les phospholipides). Ils sont caractérisés par leurs pouvoirs moussant et détergent.

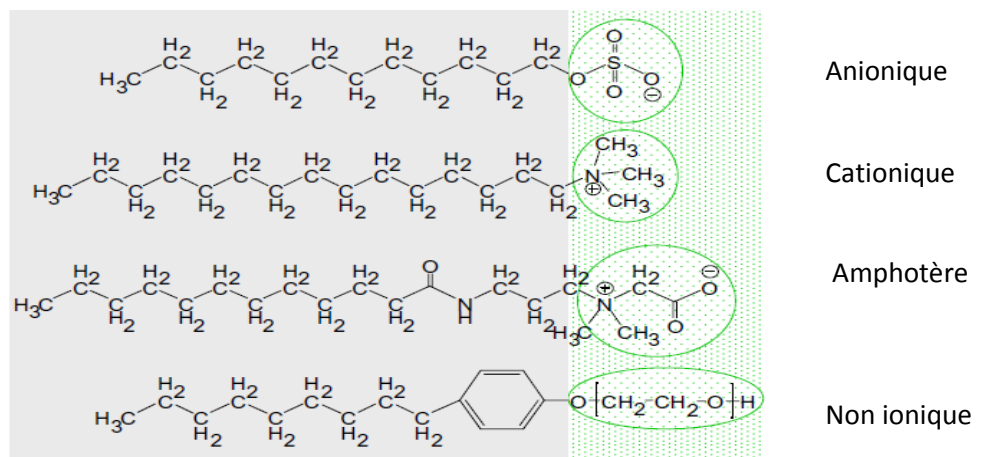


Figure 2.2: Classification des biosurfactants selon la nature des groupements

✚ Selon la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. Les données bibliographiques révèle que la majorité des biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique [97, 98]. Il existe peu de structures cationiques [99].

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [87].

2.3.1 Les glycolipides

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques [87,100]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.

a) Les rhamnolipides: glycolipides les mieux étudiés, dans lesquels un ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules des β -hydroxydécanoïque, alors que le groupement OH de l'un des acides est lié à la portion glycosidique, le groupement OH du deuxième acide entre dans la formation d'un ester [101]. La production de glycolipides contenant un rhamnose a d'abord été réalisée en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* [102]. Le L- rhamnosyl- L- β - rhamnosyl- hydroxydecanoïl- β - hydroxydécanoate (figure 2.3) et L-

longue chaîne hydroxyle d'acides gras par liaisons glycosidique. Généralement, les sophorolipides sont produits par un mélange de macrolactones et d'acides. Il a été démontré que la forme de sophorolipides est nécessaire, ou préférable pour de nombreuses applications [108]. Ces biosurfactants sont un mélange d'au moins six à neuf différents sophorolipides hydrophobes.

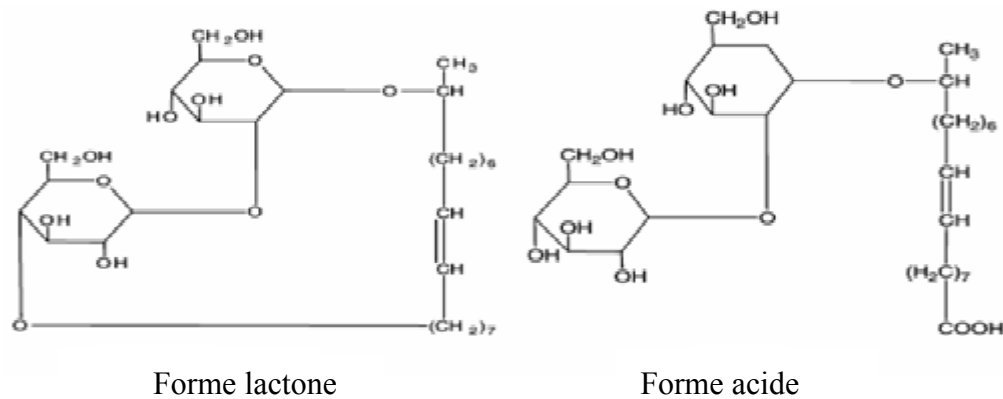


Figure 2.5 : Structure des formes lactonisé et d'acide des sophorolipides

2.3.2 Les lipopeptides et lipoprotéines

Un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris les antibiotiques décapeptides (gramicidines) et des antibiotiques lipopeptides (polymyxines) sont produites. Elles consistent en un attachement entre un lipide et une chaîne polypeptidique.

a) Surfactin: La surfactine est un lipopeptide cyclique (figure 2.6), produite par *Bacillus subtilis* ATCC21332. Il est composé d'une structure de sept acides aminés couplés à une chaîne d'acide gras par un lien lactone. Il abaisse la tension superficielle de 72 à 27,9 mN/m à de très faibles concentrations (0,005%) [109].

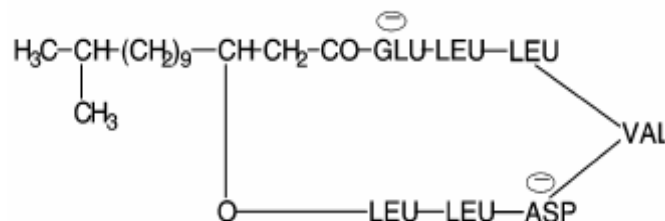


Figure 2.6: Structure du surfactin produite par *Bacillus subtilis* ATCC 21332 [109]

b) Lichenysin: L'espèce *Bacillus licheniformis* produit plusieurs biosurfactants qui présentent une excellente stabilité thermique et chimique. Ils sont similaires aux propriétés structurales et physico-chimiques du surfactin [110]. Les tensioactifs produits par *B. licheniformis* abaissent la tension superficielle de l'eau à 27 mN/m et la tension interfaciale entre l'eau et *n*-hexadécane à 0,36 mN/m.

2.3.3 Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de tensioactifs phospholipidiques au cours de la croissance sur *n*-alkanes [111]. La balance hydrophile-lipophile (HLB) est directement liée à la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans leurs structures. La souche *Acinetobacter* sp. HO1-N produit le phosphatidyléthanolamine [112], qui forme des micros émulsions optiquement claires des alcanes dans l'eau. Le phosphatidyléthanolamine produit par *Rhodococcus erythropolis* cultivée sur *n*-alcanes provoque un abaissement de la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1 mN/m et une concentration micellaire critique (CMC) de 30 mg/l [113].

2.3.4 Les biosurfactants polymériques

Les biosurfactants mieux étudiés se sont les polymères : Emulsan, liposan, alasan, lipomanan et d'autres complexes polysaccharides-protéines. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produit un bioémulsifiant efficace polyanionique hétéropolysaccharide [114]. Emulsan est un agent émulsifiant efficace pour les hydrocarbures dans l'eau [108], même à une concentration faible allant de 0,001 à 0,01%. Le liposan composé de 83% glucides et 17% protéines, est un émulsifiant d'eau soluble synthétisé par *Candida lipolytica* [115].

2.3.5 Les biosurfactants particuliers

Les biosurfactants particuliers jouent un rôle important dans l'absorption d'alcanes par les cellules microbiennes. Les vésicules produites par la souche *Acinetobacter* sp. HO1-N ont un diamètre de 20-50 nm et une densité de flottaison de 1,158 g/cm³, ils sont composés de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharide [114].

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biotensioactifs les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [7, 116].

2.4 Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs

2.4.1 Concentration Micellaire Critique

La concentration micellaire critique (CMC) est la concentration en tensioactif dans un milieu au dessus de laquelle des micelles se forment spontanément (figure 2.7).

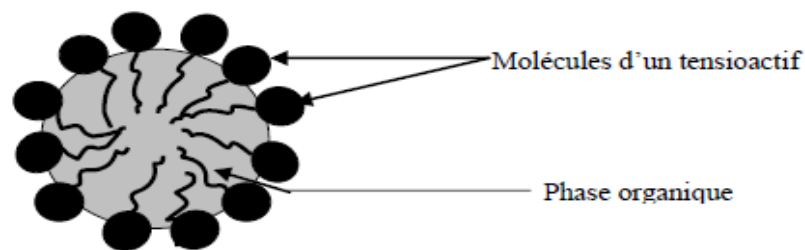


Figure 2.7 : Schéma d'une micelle sphérique [117]

La propriété principale des tensioactifs est de pouvoir s'auto-organiser. Cette tendance est d'habitude caractérisée par la concentration micellaire critique (CMC). En dessous de la CMC, le tensioactif forme une couche en surface du liquide et le reste est dispersé dans la solution. Lorsqu'on augmente la quantité de tensioactif, sa concentration augmente de manière proportionnelle jusqu'à atteindre une valeur limite dite CMC [118]. Dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau.

La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques [119].

2.4.2 Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants

Les microorganismes peuvent produire des agents tensioactifs communément appelés biosurfactants. Ces derniers sont excrétés dans le milieu ou se retrouvent associés à la membrane cellulaire des microorganismes. Le type, les propriétés et la quantité de biosurfactants produite dépendent de la souche bactérienne et de la source de substrat utilisé [120]. Bien souvent, plus d'un seul type de biosurfactant

est produit et c'est pourquoi il est difficile d'en définir les propriétés. Le groupe hydrophobe le plus commun est une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou un acide gras tandis que la partie polaire ou hydrophile est formée par une variété de groupes fonctionnels. Par exemple, on retrouve les phosphates dans les phospholipides, les sucres dans les glycolipides, les esters et les alcools dans les lipides neutres [121].

Dans les systèmes sols contaminés/eau (Figure 2.8), les tensioactifs peuvent se retrouver sous les formes de monomères en solution, adsorbés sur le sol ou agrégés sous forme de micelles dans la phase liquide.

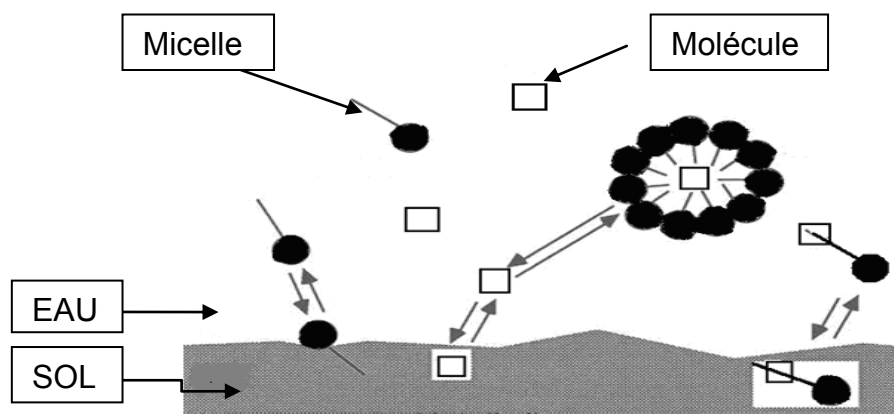


Figure 2.8 : Représentation schématique du partage des hydrocarbures dans un système sol/eau [122]

2.5 Caractérisation des biosurfactants

2.5.1 Activité superficielle et interfaciale

Un agent tensioactif efficace peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale eau - hexadécane de 40 à 1 mN/m [123].

La surfactine produite par *B. subtilis* réduit la tension superficielle de l'eau jusqu'à 25 mN/m et la tension interfaciale eau / hexadécane à moins de 1 mN/m [124].

Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* diminuent la tension superficielle de l'eau jusqu'à 26 mN/m et la tension interfaciale eau / hexadécane à moins de 1 mN/m [125]. En général, les biosurfactants sont plus efficaces que des tensioactifs chimiques synthétiques.

2.5.2 La biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont facilement dégradables [126] et particulièrement adaptés pour applications environnementales telles que la bioremédiation et la dispersion des déversements de pétrole [123].

2.5.3 Faible toxicité

Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens (tableau 2.1). Ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et donc, appropriés pour des utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

La LC50 (concentration létale de 50% de population) du tensioactif anionique synthétique (Corexit) est dix fois plus élevé que celui de rhamnolipides, démontrant une toxicité plus élevée du tensioactif chimique.

Il a été rapporté que les biosurfactants ont un CE50 (concentration efficace pour 50% de population) supérieure à celle d'un tensioactif dispersant synthétique [127]. La toxicité et les propriétés mutagènes d'un agent tensioactif synthétique (Marlon A-350) largement utilisé dans l'industrie, sont plus élevées que celles d'un biosurfactant produit par *P. aeruginosa*, ce dernier a été considéré comme légèrement non-toxique et non mutagène [128].

Tableau 2.1: Toxicité de biosurfactants comparée à celle de surfactants chimiques [129]

Surfactant	Origine	CE50 (mg/l)
Glycolipide de <i>Rhodococcus ruber</i> AC 235	Biologique	650
Tréhalose tetraester de <i>R. erythropolis</i>		286
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>		49
Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP22		0.004

2.6 Utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes [7, 130]. C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines :

- Utilisation industrielle : Cosmétiques, peintures, pharmaceutique, industrie textile, nettoyants ménagers, produits de l'agriculture et récupération assistée de pétrole.
- Utilisation environnementale : Dans la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures et la dispersion des nappes de pétrole et pour une meilleure récupération de ce pétrole.

Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique (tableau 2.2) [7, 129].

Tableau 2.2 : Applications industrielles des biosurfactants [131]

Industrie	Applications	Rôle du biosurfactant
Pétrolière	Récupération du pétrole	- Amélioration du drainage de l'huile dans les puits de forage, le mouillage des surfaces solides, réduction de la viscosité de l'huile, l'abaissement de la tension interfaciale, la dissolution de l'huile.
	De-Emulsification	- Solubilisation d'huile, émulsification d'huile, réduction de la viscosité, agent mouillant. - Émulsification des hydrocarbures, l'abaissement de la tension interfaciale, la séquestration de métaux
Environnementale	Remédiation de sol et rinçage et bioprocédés	- Émulsification à travers l'adhésion aux hydrocarbures, la dispersion, agent moussant, détergent, rinçage des sols - Émulsifiant, solubilisant, désémulsifiant, la suspension, le mouillage, le moussage, démoussage, épaississant, agent lubrifiant.
Pharmaceutique	Pharmaceutique et thérapeutique	- Mobilité cellulaire, communication cellulaire, adhésion des nutriments. - Pharmaceutiques, thérapeutiques, antibactériens, antifongiques, antiviraux, agents adhésifs, vaccins, la thérapie génique.
Agriculture	Lutte biologique	- Facilite les mécanismes de lutte biologique contre les microbes tels que le parasitisme, antibiose, de la résistance

Alimentaire	Production d'enzymes	hypovirulence. - Biocatalyse en milieu aqueux des systèmes biphasique et de microémulsions, biotransformations, la récupération des produits intracellulaires, la production accrue d'enzymes.
Cosmétique	Les produits de santé et de beauté.	- Émulsifiant et solubilisant.

2.7 La production des surfactants biologiques

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes (tableau 2.3) qui se développent de manière aérobie [99] dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone telles que les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [98, 99]. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [129].

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général isolées de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux, voire quatre rhamnolipides [132, 133] indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciales, ainsi que des polymères de masses molaires élevées, qui se lient fortement aux surfaces [100]. Les biosurfactants de faibles masses molaires sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masses molaires élevées sont constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoprotéines. Ces derniers sont moins efficaces pour

réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence.

Tableau 2. 3 : Majeures classes de biosurfactants et les microorganismes producteurs [101]

Biosurfactants	Microorganismes
Glycolipides Rhamnolipides Trehalose lipides Sophorolipides Lipides de Mannosylerythritol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus erithropolis</i> et <i>Arthobacter</i> sp. <i>Candida bombicola</i> et <i>C. apicola</i> <i>C. antarctica</i>
Lipopeptides Surfactine/iturine/fengycine Viscosine Lichensine Serrawettine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>P. fluorescens</i> <i>B. licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i>
Phospholipides	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Corynebacterium lepus</i>
Antibiotiques Gramicidine Polymixine Antibiotique TA	<i>Brevibacterium brevis</i> , <i>B. polymyxa</i> et <i>Myxococcus xanthus</i>
Acides gras/Lipides neutres Acide corynomicolique	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Biosurfactants polymériques Emulsan Alasan Liposan Lipomanane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>A. radioresistens</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. tropicalis</i>
Biosurfactants particuliers Vesicules	<i>A. calcoaceticus</i>

2.7.1 Paramètres influençant la production

Plusieurs paramètres influencent la production du biosurfactant, tels que les sources de carbone et d'azote, la température, la salinité, le pH, l'agitation et l'oxygène [134, 135].

2.7.1.1 Source de carbone

De nombreux travaux ont montré que le type, la qualité et la nature du biosurfactant sont affectés par la nature de la source de carbone. Le gasoil et le pétrole ont été trouvés comme une bonne source de carbone [135]. D'autres auteurs ont signalé que les composés solubles dans l'eau comme le glucose et le glycérol sont aussi convenables pour la production du biosurfactant [7, 134]. Notons positivement que les substrats hydrophobiques, l'huile d'olive, l'huile de maïs et les longues chaînes d'alcool maximisent la production du biosurfactant (100 – 165 mg/g de substrat) [91]. Les alcanes de C11 et C12, succinate, pyruvate, citrate, fructose, glycérol, huile d'olive, glucose et mannitol peuvent être aussi comme source de carbone pour la production du biosurfactant [136].

Les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a produit des tensioactifs sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène [137], la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène. Cependant, les glucides et les huiles végétales sont parmi les substrats les plus largement utilisés pour la production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* [134].

MATA-SANDOVAL et al. (2000) [91], rapportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le changement du substrat carboné altère la structure des molécules produites. En effet, FIECHTER (1992) [138] indique que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production.

DESAI et BANAT (1997) [7] indiquent qu'un ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de glucose pendant la phase de croissance stationnaire provoque une augmentation de rendement.

2.7.1.2 Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactants, certaines souches préfèrent les sels d'ammonium et l'urée comme source inorganique d'azote, alors d'autres produisent un maximum de biosurfactants en présence de nitrate comme source d'azote [139, 140]. La carence en azote non seulement affecte quantitativement la production, mais aussi change la composition de biosurfactant produit [141].

GUERRA-SANTOS et *al.* (1986) [139] ont montré qu'une meilleure production (rhamnolipides) a été obtenue pour un rapport C/N varie de 16/1 à 18/1, une production nulle est observée avec un rapport 11/1.

2.7.1.3 Cations

L'ajout des cations multivalents dans le milieu de culture joue un rôle positif pour la production de biosurfactant. Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [139].

2.7.1.4 Agitation et taux d'oxygène

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactants. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre, l'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures [7]. La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur la croissance et sur l'activité cellulaire ; il a été montré que le transfert d'oxygène est l'un des facteurs importants influençant la production de Surfactine par *Bacillus*.

2.7.1.5 pH

Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipide [142]. Une production maximale de rhamnolipide est obtenue dans une gamme de pH de 6 à 6.5, un pH supérieur à 7 diminue la production [139]. En revanche, la production de penta et disaccharide lipidique n'est pas affectée par le pH allant de 6,5 à 8 [143].

2.7.1.6 Température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles sont résistants à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants telles que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification sont stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [144].

2.7.1.7 Salinité

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques soit observée [144].

2.7.2 Séparation des biosurfactants du milieu de croissance

L'extraction du biotensioactif du milieu de croissance, se fait d'abord en séparant les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux membranes cellulaires). Les techniques les plus utilisées sont :

- **Extraction**

Extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. [7] ou des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après élimination des cellules productrices.

- **Précipitation**

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) comme l'ont fait PARRA et *al.* (1989) [145]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

- **Adsorption**

Il existe des techniques de récupération en continu. Reiling et *al.* (1986) [146] ont réalisé une adsorption sur de l'Amberlite XAD-2 suivie d'une purification et lyophilisation, donnant des rendements variant de 60 à 90% de pureté.

- **Ultrafiltration**

La capacité des biosurfactants à s'agréger aux surfaces a également été utilisée pour les retenir sur des membranes de filtration. Par exemple, une membrane XM-50, dont le seuil de coupure est de 5000 D, a été utilisée sur une surfactine pure à 97% et un taux de récupération de 98% est obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de coupure plus élevé (10000 D) fournit un rendement de récupération de 92% [7].

CHAPITRE 3

DEGRADATION DES HYDROCARBURES

3.1 Introduction

Les hydrocarbures provenant de différents types d'industries constituent les principaux composés de déchets organiques qui contaminent l'environnement. La présence de ces composés semble être largement attribuable aux techniques inadéquates d'élimination. Ce type de déchets peut causer de sérieux problèmes de pollution environnementale tels que la contamination des eaux souterraines. La réglementation nationale et internationale, de plus en plus sévère vis-à-vis de l'environnement, a permis le développement et l'optimisation de technologies visant la réduction de la pollution de l'air, de l'eau et du sol.

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques issues de la combustion incomplète de matières carbonées, suite à des processus naturels (volcanisme), mineurs, et des processus anthropiques, majoritaires. Ils sont libérés dans tous les compartiments de l'environnement.

La majeure partie des sources sont émises dans l'atmosphère et sont le plus souvent reliées à la densité de population humaine (chauffage, transport ...). Les sols et les eaux sont également touchés par cette pollution, suite à des dépôts atmosphériques ou des déversements accidentels de type créosote ou d'hydrocarbures. Désormais largement répandus, la concentration des HAP dans l'environnement a fortement augmenté depuis les 150 dernières années.

Les HAP présentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes. Du fait de leur forte hydrophobicité liée à la présence de noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination et/ou leur transformation par réaction chimique difficile. De plus, les HAP sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend

persistants dans l'environnement. Ainsi leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant.

Les techniques de remédiation des sols reposent sur des processus physico-chimiques ou biologiques. Il existe des techniques modifiant totalement l'intégrité des sols qui sont le plus souvent très coûteuses : l'excavation, la vitrification ou l'incinération.... Une des techniques largement utilisée pour traiter les sols *in situ* est le "pompage et traitement", qui consiste en une circulation d'eau dans la zone de pollution, celle-ci étant retraitée en sortie. Cependant, du fait de la faible solubilité des HAP, les rendements obtenus demeurent faibles, et il est souvent nécessaire d'ajouter des substances supplémentaires pour favoriser la désorption. Dans la plupart des cas, des co-solvants organiques ou des tensioactifs chimiques sont employés, mais ceux-ci sont toxiques et peu biodégradables. Ainsi, afin de ne pas induire de pollution supplémentaire, l'intérêt se porte depuis quelques années sur la remédiation assistée par des tensioactifs d'origine biologique ou biosurfactants.

3.2 Définition des HAP et origines

Les HAP sont des composés organiques aromatiques hydrophobes fréquemment retrouvés dans l'environnement. Ce sont des sous-produits issus de la combustion incomplète de la matière organique [147]. Les HAP sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés [148, 149].

Les HAP sont émis dans l'environnement par trois processus : la diagenèse, la combustion et la pyrolyse de matières carbonées ou par biogenèse. Ces processus sont généralement regroupés en deux sources principales : les sources naturelles et les sources anthropiques.

Bien que la majorité des HAP soit émise dans l'atmosphère, le sol et les sédiments constituent le principal point de fuite environnementale de ces polluants [150, 151]. En effet, WILD et JONES (1995) [152] estiment que 90% des HAP émis dans l'environnement sont stockés dans les sols. Ce chiffre ne prenant pas en compte les sites contaminés suite à des activités industrielles (usines à gaz,

raffineries de pétrole ou usines de traitement de bois). Dans ce cas, la pollution s'étend vers les horizons plus profonds du sol.

Au cours de cette étude nous avons choisi comme HAP modèles : le naphthalène et le phénanthrène, qui diffèrent principalement par leur solubilité aqueuse (égale à 31 mg/l et 1.1 mg/l respectivement à 20 °C) [153].

a) Naphtalène

Les sources de naphthalène dans l'environnement sont multiples. Le naphthalène est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication d'anhydride phtalique (plus de 60% de la production), servant à produire des plastifiants, résines, teintures, papiers d'emballage, répulsifs pour insectes (mites notamment) [154, 155]. En dehors des zones industrielles, le chauffage résidentiel, les répulsives anti-mites et les émissions provenant des gaz d'échappement des véhicules, sont identifiés comme étant à ce jour les trois principaux contributeurs à l'émission de naphthalène dans l'environnement [156].

b) Phénanthrène

On le trouve dans l'environnement surtout dans les sols et les sédiments, et il est essentiellement produit avec les goudrons, par une mauvaise combustion des hydrocarbures ou du bois (inserts, foyers fermés faiblement alimentés en air). On l'utilise pour produire, descolorants, des explosifs, des produits pharmaceutiques, des produits chimiques (9,10-phénanthrénequinone, acide 2,2 diphénique). Les taux actuellement présents dans l'environnement : Selon la base de données HSDB (1999) [157], on en trouve habituellement moins de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ dans l'air et jusqu'à $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ dans l'eau de pluie ou les eaux de surface, le sol et les sédiments en contenant habituellement moins de $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

3.3 Propriétés chimiques des HAP

A l'état pur, les HAP sont des solides souvent colorés et cristallins à température ambiante. Leurs propriétés physico-chimiques varient avec leur masse molaire et leur structure.

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Les HAP ont un point de fusion supérieur à 100 °C et un point d'ébullition élevé (supérieur à 300 °C). Ce sont des composés neutres et non polaires.

L'homme est exposé aux HAP par l'ingestion de denrées alimentaires (légumes, viandes grillées...). PHILLIPS (1999) [158] indique que l'alimentation est la source majoritaire d'exposition aux HAP pour les non fumeurs (70% de l'exposition). Des études menées dans différents pays ont montré que la quantité de HAP ingérée variait de 1,2 à 5 $\mu\text{g.jour}^{-1}$. Par comparaison, la fumée de cigarette ajoute 2 à 5 $\mu\text{g.jour}^{-1}$ pour une consommation d'un paquet.jour⁻¹. Les tests de toxicité sont souvent effectués sur des animaux ou des microorganismes ; cela représente donc un problème pour extrapoler et évaluer la toxicité des HAP envers les humains. Des tests d'écotoxicologie permettent de caractériser un niveau de toxicité des polluants présents dans les sols. Pour cela, il est possible de faire des tests sur les plantes ou sur les organismes du sol (bactéries, vers de terre) mais ils sont coûteux, longs et les microorganismes doivent être au préalable adaptés aux polluants.

L'une des raisons ayant conduit au classement des HAP dans la liste des polluants prioritaires de l'EPA (Environmental Protection Agency) est le caractère toxique de certains d'entre eux (tableau 3.1). Ce sont des molécules biologiquement actives qui, une fois absorbées par les organismes, se prêtent à des réactions de transformation sous l'action d'enzymes conduisant à la formation d'époxydes et/ou de dérivés hydroxylés. Les métabolites ainsi formés peuvent avoir un effet toxique plus ou moins marqué en se liant à des molécules biologiques fondamentales telles que les protéines, l'ARN, l'ADN et provoquer des dysfonctionnements cellulaires.

Le tableau suivant présente un récapitulatif des effets de certains HAP d'après des renseignements fournis par le SAX'S, 1996 [159].

Tableau 3.1: Toxicité de quelques HAP pour l'homme [159].

HAP	Toxicité	Cancérogènes	Mutagènes	Rapporté dans
Naphtalène	Modérée	Non confirmée		EPA-TSCA
Acénaphthylène	Modérée	Non confirmée	Constatée	EPA-TSCA
Phénanthrène	Modérée	Non confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Anthracène	Modérée	Non confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Benzo[a]anthracène	Elevée	Confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Benzo[a]pyrène	Elevée	Confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC
Dibenzo(a,h)anthracène	Elevée	Confirmée	Constatée	EPA-TSCA, IARC

3.4 Méthodes de dégradation des hydrocarbures

Les méthodes de dégradation peuvent être classées en deux catégories : physico-chimiques (photo-oxydation) et biologiques [160, 161].

➤ Cas de HAP

Au sein de la famille des HAP, la résistance à la dégradation et, par conséquent, la persistance dans le milieu, varie notablement selon la molécule considérée. Ce caractère hétéroclite de l'intensité des processus de dégradation fut à l'origine de plusieurs travaux de recherche. A travers ces derniers, les règles régissant les phénomènes de dégradation ont pu être clairement définies. L'existence d'une corrélation entre le poids moléculaire du composé et sa résistance à la dégradation constitue le principe fondamental permettant d'expliquer l'hétérogénéité des comportements des diverses molécules aromatiques face au processus de dégradation. Ce principe s'applique à la distribution globale en HAP, mais aussi à chacun des composés considérés individuellement à travers la distribution en dérivés substitués et composés parents.

Plus les molécules sont de petite taille, plus elles sont sujettes aux processus de biodégradation. Par conséquent, au sein d'un échantillon fortement dégradé, on

notera une augmentation relative des composés de haut poids moléculaire [162, 163]). BENCE et BURNS (1995) [164], au cours de leurs travaux respectifs sur les marées noires, ont été confrontés à ce type de phénomènes. Tous deux s'accordent à dire que les échantillons ayant subi une dégradation poussée, sont appauvris en composés légers tels que le naphthalène, le biphenyl, l'acénaphène ou l'acénaphylène. Cette perte de composés légers induit nécessairement un accroissement de la quantité relative en composés plus lourds tel que le chrysène. Pour un même composé, le degré de dégradation diffère selon qu'il s'agit d'un parent ou d'un homologue substitué. Pour ce dernier cas, le degré de substitution influe sur la dégradation. De manière générale, les composés à faible degré de substitution, et a fortiori les composés parents, sont plus sensibles à la dégradation. Ce principe est similaire à celui énoncé précédemment puisque, là aussi, la résistance des composés est corrélée à leur poids moléculaire. Du processus de dégradation résulte donc une augmentation de la quantité relative en homologues substitués. On acquiert une distribution que l'on qualifie de «Water Washed Distribution» au sein de laquelle les composés de haut poids moléculaire sont prédominants sur les composés de faible poids moléculaire [164, 165].

➤ Cas des *n*-alcanes

Les *n*-alcanes sont une famille de composés qui, lorsqu'ils sont émis dans l'environnement, sont sujets à une forte dégradation contrôlée par les conditions (éventuellement climatiques) et les processus naturels (dégradation microbienne). Cette dégradation cause des changements considérables dans les propriétés physiques et chimiques des huiles [165]. Le premier phénomène de dégradation qui se produit juste après le déversement d'hydrocarbures dans le milieu naturel est l'évaporation. Celle-ci peut avoir des conséquences importantes sur la distribution des *n*-alcanes. Il a été estimé que cette altération par évaporation pouvait aboutir à des diminutions respectives de 70% (par rapport au volume initial), 40 et 10% pour des huiles légères, modérément lourdes et lourdes. Dans le cas d'une dégradation faible, seuls les *n*-alcanes légers sont altérés. Par contre, si celle-ci est forte, on peut aboutir à une disparition totale des *n*-alcanes et même des isoprénoïdes [165].

3.4.1 Traitements physico-chimiques

3.4.1.1 Méthode de Fenton

La méthode de Fenton ou l'oxydation au peroxyde d'hydrogène catalysée par le fer ferreux peut être utilisée pour la dégradation des HPC. Ce réactif permet la formation en milieu aqueux de radicaux hydroxyles [166], entités fortement oxydantes et susceptibles de dégrader des polluants persistants tels que les HPC [167].

3.4.1.2 Ultrasons

Les ultrasons peuvent être utilisés pour la dégradation des HPC en solution [168] ou dans des mélanges solvant/eau.

Les solvants utilisés sont l'éthanol, le benzène [169] et l'acétonitrile [170]. Suite à une sonication, il est possible d'observer des réactions radicalaires, des phénomènes de combustion, de pyrolyse ou d'oxydation supercritique [171]. Les hautes fréquences favorisent les réactions radicalaires tandis que les basses fréquences favorisent les phénomènes mécaniques et physiques [172].

3.4.1.3 L'ozonation

L'ozone est un oxydant puissant, instable en milieu aqueux. Il est donc nécessaire de le produire sur le lieu de consommation. L'ozone est produit à partir de l'oxygène :



C'est un composé allotropique (plusieurs formes de résonance), à forte réactivité, possédant les propriétés d'un dipôle. De ce fait, l'ozone possède donc une grande capacité d'attaquer des composés organiques.

Le premier phénomène qui se présente lors de la mise en contact d'une solution avec l'ozone est le transfert de l'ozone de la phase gazeuse vers la phase liquide. Lorsque l'ozone dissous est consommé par réactions chimiques, le transfert gaz/liquide est amélioré.

Pendant l'ozonation des HAP, peuvent intervenir les réactions directes et indirectes (Radicalaires) à pH neutre.

3.4.1.4 Charbon actif

Le charbon actif granulaire (CAG) est techniquement faisable pour la purification de l'eau.

Le charbon actif présente une très grande surface spécifique qui lui confère un fort pouvoir adsorbant. Le charbon actif retient un grand nombre de composés organiques, tels les pesticides.

Un lit compact de charbon actif à 4 fonctions : Filtration, traitement biologique (purification de l'eau), action catalytique (oxydation du chlore dans l'eau) et l'adsorption.

Les traitements physico-chimiques sont reconnus pour produire des substances intermédiaires plus toxiques et de plus, les coûts d'opération sont élevés.

3.4.2 Traitement biologique

La performance des méthodes biologiques pour le traitement d'une grande variété de composés organiques et inorganiques est prouvée depuis déjà plusieurs années. Leur développement et leur utilisation à l'échelle industrielle croient d'une façon exponentielle. Le traitement biologique est devenu populaire en tant que méthode simple et non onéreuse pour la réduction des odeurs. Comparées aux technologies physico chimiques, où le contaminant est quelques fois tout simplement transféré d'une phase à l'autre, les technologies de bio- traitement présentent la possibilité de dégrader complètement les contaminants en produits inoffensifs ou moins polluants [24]. De plus, les coûts d'opération du traitement biologique sont moins coûteux comparés à ceux des processus physiques et chimiques [24].

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons...) et peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone.

Pour la dégradation des hydrocarbures, différents microorganismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardia* ou *Pseudomonas*. Si la flore locale est

inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante, des souches bactériennes performantes allochtones sont ajoutées au sol.

La biodégradation assistée par des tensioactifs ou même des biotensioactifs a fait l'objet de plusieurs travaux [173, 174, 175, 176]. Sur le terrain le bioventing (bioaération) et la biodégradation en bioréacteurs sont les procédés les plus efficaces, pour de faibles concentrations en gasoil [174].

Actuellement, les méthodes biologiques semblent être prometteuses pour la dépollution des sols et des eaux contaminés par les hydrocarbures. Toutefois, elles nécessitent des durées de traitement très longues (plusieurs mois ou années), et ne peuvent donc être utilisés pour traiter des pollutions très concentrées. En plus, les métabolites formés au cours de la dégradation des hydrocarbures, peuvent présenter dans certains cas un risque de toxicité majeur pour l'environnement [174, 177].

3.4.2.1 La biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant sur l'activité bactérienne, à savoir la toxicité des polluants, les conditions environnementales du milieu (pH, humidité, structure du sol, etc.) et la biodisponibilité des éléments nutritifs [178, 179, 180, 181]. Ce processus étant destructif de la structure initiale de l'hydrocarbure (Figure 3.1), est particulièrement intéressant pour l'élimination des hydrocarbures; à condition que les produits formés (métabolites) aient une toxicité moindre [182, 183].

Ce type de dégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence par ZOBEL dès (1946) [184]. Cette voie est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène (1 noyau) au benzo-(a)-pyrène (BaP) (5 noyaux) [24]. Onze souches ont été isolées à partir de différents sites contaminés y compris celles par le produit de raffinage de pétrole brut capables de dégrader le BaP. Ces souches ont été identifiées aux genres *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* et *Flavobacterium*. Des bactéries aérobies et anaérobies sont capables de dégrader les hydrocarbures

monoaromatiques comme les BTEX [185, 186]. Ces microorganismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes [187]. Ils ont même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les déserts [188] ou les gisements pétroliers [57, 58].

De nombreux auteurs indiquent que les HAP ne peuvent être biodégradés que lorsqu'ils sont biodisponibles [179, 180, 189]. Généralement, plus le taux en matières organiques des sols est élevé et moins les HAP sont biodisponibles du fait des fortes interactions hydrophobes entre le polluant et le sol. CHUNG et ALEXANDER (1999) [190] ont prouvé que cette "séquestration" se produise pour les forts comme pour les faibles taux de contamination. Et lorsque la contamination est ancienne, la biodégradation est réduite [178, 189, 191].

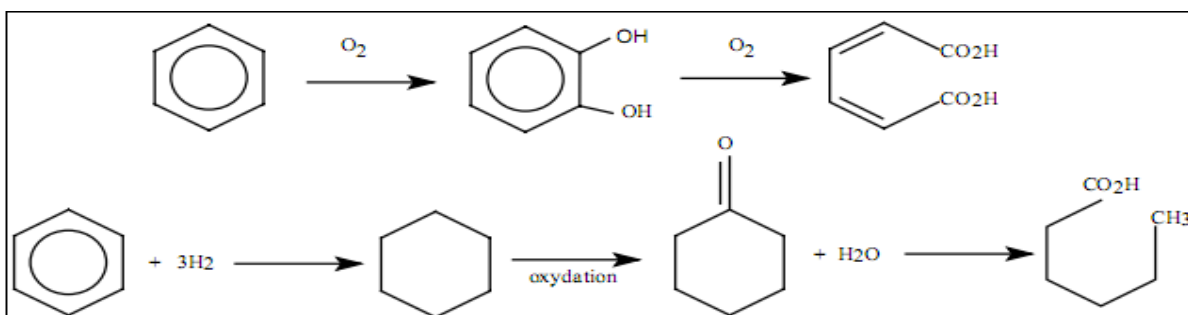


Figure 3.1 : Dégradation aérobie et anaérobie d'un noyau benzénique [192]

3.4.2.2 Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Parmi les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique [18, 193].

- Composition chimique des hydrocarbures

La spécificité des substrats à l'attaque microbienne a été largement étudiée. ATLAS (1981) [18] et LEAHY et COLWELL (1990) [193] ont classé les composés de pétrole en quatre familles : les hydrocarbures saturés, les aromatiques, les

asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides, et amides). Ces composés diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible.

Les hydrocarbures saturés incluent les *n*-alcane, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes (naphtènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants (10 à 40% des hydrocarbures totaux dans le cas du pétrole léger et peuvent atteindre dans certains cas 60%) et les plus rapidement dégradables: les *n*-alcane à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les microorganismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C_{10} - C_{24}) sont généralement les plus facilement dégradables. Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les *n*-alcane et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des microorganismes [194, 195]. Les expériences montrent de façon non équivoque que la biodégradation des cycloalcanes est très limitée [18]. La non accumulation des hydrocarbures cycliques dans l'environnement, implique des phénomènes non conventionnels de dégradation telle que l'intervention des phénomènes de co-oxydations impliquant plusieurs souches microbiennes dont l'équipement enzymatique est complémentaire [193, 196, 197, 198].

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier [199]. Des études sur la transformation de ces hydrocarbures par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire [196]. Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaires constituent généralement 2 à 20% des hydrocarbures des pétroles légers et moins de 2% des hydrocarbures des pétroles lourds, tels que les alkyl-benzènes légers qui sont les plus toxiques à cause de leur solubilité dans l'eau, mais peuvent cependant être

métabolisés par les microorganismes quand ils sont présents en faibles concentrations. La structure moléculaire de ces substrats détermine la vitesse de leur dégradation : un grand nombre de substituants méthyle empêche l'oxydation initiale [18, 200]. Les polyaromatiques sont moins toxiques pour les microorganismes, mais ils sont rarement métabolisés et quand ils le sont leur biodégradation est lente: c'est ce qui explique leur accumulation dans l'environnement. Ces hydrocarbures aromatiques lourds constituent 2 à 10% des hydrocarbures des pétroles légers et plus de 35% des hydrocarbures des pétroles lourds.

Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5% du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25% d'asphaltènes et 20% de résines. Cette dernière classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou très lentement dégradable [16].

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition [201]; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd.

Par exemple, un brut à très faible teneur en soufre et très riche en composés saturés (exemple : Louisiane du Sud) (Tableau 3.2) sera facilement biodégradé, contrairement à un carburant de type "Bunker C", à très haute teneur en soufre et composés aromatiques.

Tableau 3.2 : Proportion des différentes familles de composés dans divers bruts pétroliers [199].

Bruts Pétroliers	Saturés	Aromatiques	Polaires (résines)	Asphaltènes
Louisiane du Sud	69	20	10.3	0.3
Léger d'Arabie Saoudite	48	35	9	7.5
Vénézuélien	46	21.6	19.3	9
Tunisien (Asthart)	48	32	12	8

RATLEDGE (1978) [202], a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des microorganismes:

- Les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement.
- Les *n*-alcanes à chaînes courtes, tel que le *n*-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcanes plus courts que le *n*-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au delà de C9, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît.
- Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés.
- Les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés non substitués.

▪ Etat physique et concentration des hydrocarbures

Les hydrocarbures dans les milieux marins tendent à se dissiper dans l'eau formant ainsi des marées noires. Sous l'action du vent et des vagues, le pétrole dans l'eau et l'eau dans le pétrole peuvent former des émulsions, ce qui augmente la surface du pétrole et par conséquent favorise l'attaque microbienne. Par contre les grandes masses ou les nappes de mousse pétrolière de viscosité très importante et qui ont un rapport surface/volume faible inhibent la croissance.

La formation d'émulsions par la production et la sécrétion de biosurfactants est un processus très important dans l'assimilation des hydrocarbures par les bactéries [203, 204, 205, 206, 207, 208].

La dispersion artificielle a été étudiée comme moyen d'augmentation de la surface de contact entre les hydrocarbures et les membranes cellulaires des microorganismes, cependant, les dispersants sont dans la plupart du temps toxiques et peuvent conduire à des dommages dans la faune et la flore, et ils peuvent aussi inhiber le processus microbien [193].

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses. RATLEDGE (1978) [202] rapporte que les *n*-alcane de courtes chaînes (<C9) sont très toxiques pour les microorganismes alors que ceux plus longs que le *n*-nonane, les alcènes >C12, les alkyle-bromides >C10, et les alcanols >C14 ne sont toxiques pour aucun microorganisme. Broderick et Cooney (1982) [206], ont montré que la dégradation des *n*-alcane longs ($\geq$ C12), pour lesquels les solubilités sont inférieures à 0,01 mg/l s'effectue à des vitesses qui dépassent les vitesses de dissolution des hydrocarbures et sont fonction de la surface des hydrocarbures disponibles pour l'émulsification et leur fixation par les cellules.

- Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes [18, 193].

A basse température, la viscosité du pétrole augmente, la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilisation, ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes [201, 209]. Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation [210, 211, 212]. Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0 °C [213], ou élevées 70-80 °C [214], le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C [215]. Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. ROLING et *al.* (2003) [216] mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au delà de 80-90 °C malgré l'isolement

de bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermodesulfobacterium*) et d'Archae hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100 °C.

- Influence de l'oxygène

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable [18, 193, 199]. Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole; Zobell (1969) [184], a calculé que la quantité d'oxygène dissoute dans 320 m³ d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 1 litre de pétrole brut.

Dans un site très pollué, on aboutira fréquemment à un ralentissement de la biodégradation par suite d'une carence en oxygène. MARIN et *al.* (1996) [217], en étudiant les facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des *n*-alcanes de 10% après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation.

Les sédiments aquatiques, sont par contre généralement anoxiques, à l'exception de la fine couche superficielle [193]. BERTRAND et MILLE (1989) [199], ont étudié dans des systèmes à flux continu, l'évolution des différents hydrocarbures en fonction de la concentration en oxygène. Ils ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures a lieu essentiellement dans la partie superficielle des sédiments (0-1 cm), où la concentration en oxygène est de 8 ppm, alors qu'elle est plus faible en profondeur. Par contre aucune dégradation n'a été observée dans des conditions anaérobies (0,2-0,3 ppm), en dépit d'une activité sulfato-réductrice très élevée dans les sédiments.

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols [218, 219] et les eaux souterraines [220].

La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme de moindre importance.

- Influence des éléments nutritifs

Le rejet des hydrocarbures dans l'environnement aquatique, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne [193]. Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple: dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes [199]. Les sources d'azote et de phosphore sont toujours faibles, surtout pendant les périodes de forte activité des organismes photosynthétiques. L'azote et le phosphore sont aussi des facteurs limitants de la biodégradation des hydrocarbures dans les sols [210, 221].

- Effet de la salinité et du pH

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5% et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3 et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes [199]. Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1 M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation [222, 223, 224]. BERTRAND et *al.* (1993) [225] ont étudié l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont trouvé que la biodégradation est maximale pour une concentration de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. WARD et BROCK

(1978) [226] ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4‰, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone [225, 227] ont montré que *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine halotolérante dégrade l'eicosane, avec un taux de biodégradation de 90% pour des concentrations en chlorure de sodium comprises entre 0,2 et 2,5 M.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité [184]. DIBBLE et BARTHA (1979) [228] et HAMBRICK et *al.* (1980) [229] ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

- Effet de la pression

La pression n'est considérée comme une variable dans la biodégradation des hydrocarbures que dans les profondeurs des océans (18, 193, 199]. En effet, le pétrole qui n'est pas dégradé dans les eaux de surface va progressivement s'enfoncer, en subissant une lente transformation, et ce sont les molécules difficilement dégradables qui atteindront le fond des océans. La profondeur moyenne de ceux-ci est de 3800 m (ce qui correspond à une pression de 380 bars) et la température est inférieure à 5 °C [199]. SCHWARZ et *al.* (1974, 1975) [230, 231], ont étudié la croissance et l'utilisation des hydrocarbures par les bactéries isolées de sédiments marins profonds, en fonction de la pression. Ils ont trouvé que la vitesse d'utilisation des hydrocarbures est fortement diminuée à hautes pressions. Sous une pression de 1 bar (pression atmosphérique), ces bactéries dégradent 94% de l'hexadécane en 8 semaines alors qu'il leur faut 40 semaines pour arriver au même résultat à 500 bars. Il apparaît donc, que les

hydrocarbures qui parviennent aux grandes profondeurs océaniques sont très lentement dégradés par les microorganismes et par conséquent peuvent persister pendant de longues périodes.

3.4.3 Critères de choix d'une méthode de dépollution

Le choix d'une méthode de dépollution et sa faisabilité sont fonction [232] :

- ✓ de l'extension de la pollution,
- ✓ de la nature des polluants,
- ✓ des caractéristiques du milieu souterrain,
- ✓ des caractéristiques propres au site,
- ✓ des exigences et/ ou contraintes économiques et administratives.

Ainsi, avant de faire le choix d'une méthode particulière de dépollution, des paramètres comme: la nature et le degré de la pollution, la superficie du site et le volume de terres polluées, la stabilité des substances à dépolluer, les objectifs de dépollution, etc., sont à prendre en compte [233].

Ces dernières années, plusieurs surfactants ont été étudiés afin d'évaluer leur efficacité potentielle, lors de processus de dépollution de sols contaminés par des composés organiques hydrophobes. En fait, la majeure partie de ces travaux, effectués en laboratoire ou à l'échelle pilote, ont été réalisés sur des colonnes ou en batch. Ces travaux ont montré l'efficacité des surfactants sur des sols provenant de sites industriels contaminés ou de sols artificiellement contaminés [234, 235, 236]. Dans les deux cas, la concentration des contaminants retrouvés dans la phase aqueuse était toujours plus élevée en présence de surfactants.

Généralement, il a été suggéré que les tensioactifs peuvent augmenter l'extraction des hydrocarbures des sols contaminés avec une concentration supérieure à celle de la CMC. Cependant quelques travaux indiquent que des agents tensioactifs comme le SDS [237, 238] et le TW80 [237], ainsi qu'un biotensioactif produit à partir de bactéries peuvent présenter une activité non négligeable au dessous de la CMC.

Du fait de la lenteur du processus de dégradation des HAP, notamment attribuable à leur forte adsorption au sol, il peut être nécessaire d'augmenter la

biodisponibilité des HAP par ajouts de tensioactifs. En effet, KOSARIC (2001) [176] a observé une réduction significative de la concentration en HAP après 22 jours de bioremédiation et ajout de biotensioactifs.

L'efficacité de l'extraction des polluants organiques par agents tensioactifs dépend de plusieurs paramètres : température, durée de traitement, débit et concentrations des surfactants. Les résultats indiquaient que la température de lavage était le paramètre ayant le plus d'influence sur l'élimination du pétrole alors que la durée du traitement en avait le moins. Généralement, il a été suggéré que les tensioactifs peuvent augmenter l'extraction des Hydrocarbures des sols contaminés.

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODES

4.1 Présentation du biotope

4.1.1 Champ de production pétrolière de Hassi Messaoud

Le gisement de Hassi Messaoud, dont les caractéristiques sont indiquées ci-dessous, est l'un des plus grands champs pétroliers dans le monde. Sa superficie est de 2500 Km² avec une surface imprégnée d'huile environ 1600 Km², il se trouve à 142 m au dessus du niveau de la mer. La découverte du champ remonte à 1956 et sa mise en production a démarré en 1958. Depuis cette date les forages se développent et se multiplient sans cesse, jusqu'à arriver à plus de 1200 puits en 2007. Il couvre presque la moitié de la production algérienne en pétrole [239].

a) Caractéristiques géoclimatiques du champ (figure 4.1) :

- Position : 870 km au Sud - Est d'Alger, et 80 km à l'Est de Ouargla.
- Climat : Désertique
- Température : 0 - 47 °C, la valeur moyenne annuelle est de 23,7 °C
- Vents dominants : Nord - Nord - Est.

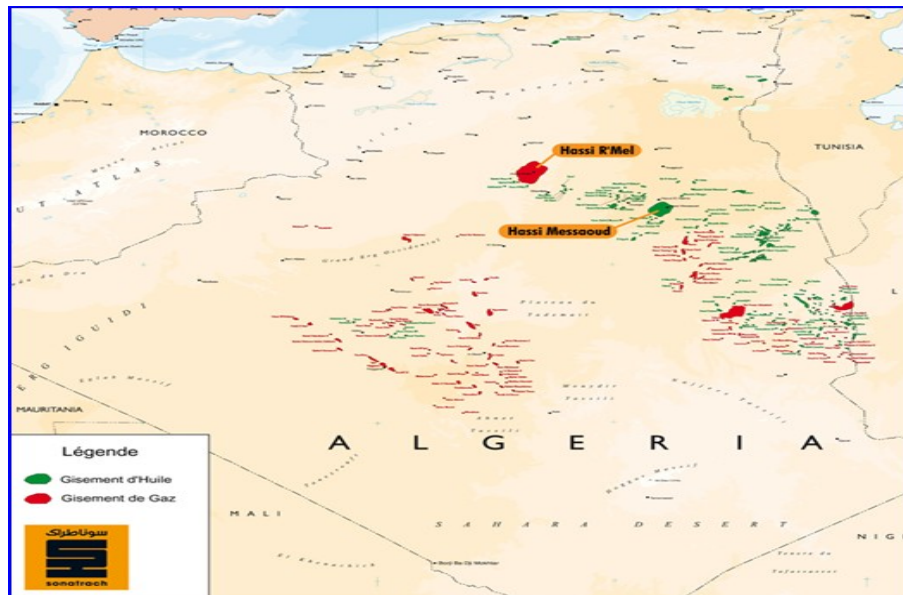


Figure 4.1 : Situation du champ de Hassi-Messaoud [240]

b) Type de rejets liquides à Hassi Messaoud

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

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

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

Les hydrocarbures non solubles dans l'eau se retrouvent en flottation sur la surface de l'étendue d'eau, alors que les hydrocarbures solubles dans l'eau se

verront entraînés en profondeur par infiltration du fluide vecteur, en l'occurrence l'eau de rejet.

4.1.2 Biotope

Le biotope utilisé pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux anciennement contaminé par des rejets de forage au niveau des puits du champ de Hassi-Messaoud, Sud d'Algérie (figure 4.2). Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à partir de sols de surface (5-20 cm de profondeur).

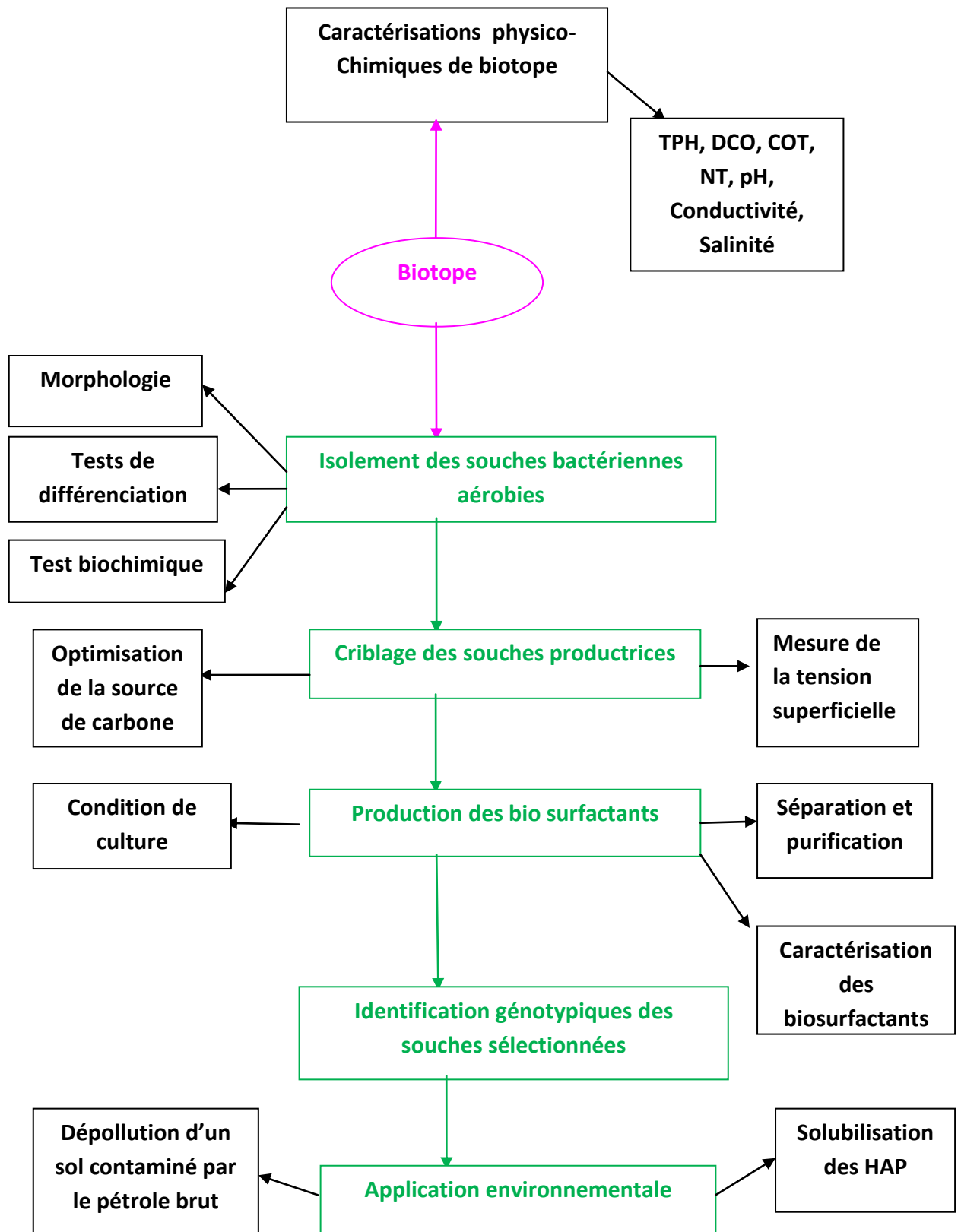


Figure 4.2: Sols contaminés par les fluides de forage (Hassi-Messaoud) (CRD, 2008) [241]

La partie matérielle et méthodes explique la méthodologie du travail expérimental, elle comprend les étapes suivantes et dont le plan expérimental est détaillé ci-dessous.

- ❖ Echantillonnage et caractérisation physico-chimique des échantillons.
- ❖ Isolement des souches bactériennes aérobies.
- ❖ Criblage des souches productrices de tensioactifs.
- ❖ Production et caractérisation du biosurfactant.
- ❖ Identification des souches performantes sélectionnées.
- ❖ Applications environnementales.

Plan d'expérience



4.1.2.1 Prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été prélevés selon la technique de Pochon et Tardieux (1962). A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 20 centimètres de profondeur), 100 à 150 g de terre qui sont déposés sur une feuille d'aluminium stérile. Les gros débris sont écartés (pierres, racines, etc.) et environ 50 g sont placés dans un sachet stérile. Les échantillons ont été conservés à 4 °C jusqu'à l'arrivée au laboratoire pour analyse. Sachant que l'échantillon n° 1 a été traité par une des méthodes physiques : la solidification (pour minimiser le taux de pollution). Trois sites différents ont été utilisés pour le prélèvement du sol (tableau 4.1).

Tableau 4.1 : Sites et origines des échantillons utilisés pour l'isolement des microorganismes.

N° d'Echantillon	Puits	Date	Profondeur
01	OMOZ # 472	04-01-2005	20 cm
02	OMOKZ # 32	13-09-2006	5 cm
03	OMOKZ #502	03-03-2008	5 cm

4.1.2.2 Prétraitement du sol

- séchage de l'échantillon à l'air,
- faire passer à travers un tamis de maille inférieure à 5 mm puis 2 mm,
- conservée la partie inférieure à 2 mm de l'échantillon à T = 4 °C.

4.1.2.3 Caractérisations physico-chimiques du sol

à part le TPH qui a été mesuré selon la norme Afnor 90114 au niveau du laboratoire des méthodes spectrales du Centre de Recherche et Développement de SONATRACH (CRD, Boumerdes, Algérie), toutes les caractéristiques du sol, à savoir, DCO, COT, conductivité, salinité et pH ont été effectuées selon des

méthodes chimiques universelles au sein du laboratoire de bioprocédés du centre de biotechnologie de Sfax, Tunisie.

✓ Hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) :

Le dosage d'hydrocarbures totaux était réalisé par Spectrophotomètre infrarouge (Afnor 90114). Après avoir homogénéisé les échantillons, on procède au dosage du TPH selon les étapes suivies successivement : Extraction, récupération du solvant et mesure de la concentration en hydrocarbures (les étapes sont détaillées en appendice B1).

✓ Détermination du pH, conductivité, DCO, COT, N_T et salinité

La description des méthodes analytiques est détaillée en appendice B2.

- ✓ Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre de type Metler Toledo.
- ✓ La conductivité mesure a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type Consort C831 (Multi-Parameter Analyser).
- La teneur en carbone organique total (COT) est obtenue par différence entre les mesures de carbone total (CT) et de carbone inorganique (CI). Les mesures de CT et de CI sont effectuées à l'aide d'un COT-mètre (5000A de SHIMADZU). Le CT est obtenu par oxydation et combustion d'une quantité connue d'échantillon de terre finement broyée sous flux d'oxygène à 900 °C. La quantité de CO₂ ainsi dégagé est mesurée par absorption IR. La teneur en CI est approchée par une attaque acide (avec H₃PO₄) suivie d'une combustion (à 200°C sous flux d'oxygène) d'une quantité connue d'échantillon. La quantité de CO₂ ainsi dégagé par décomposition des carbonates est également mesurée par absorption IR.
- La demande chimique en oxygène (DCO) correspond à la consommation d'oxygène nécessaire à l'oxydation complète de la matière organique du substrat, l'oxydation se fait par ébullition en présence d'un excès de bichromate de potassium en milieu acide après incubation à 150 °C (voir appendice C).
- Le paramètre azote Kjeldahl regroupe l'azote organique et l'azote ammoniacal. L'azote total Kjeldahl est déterminé par minéralisation d'une

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

$$N_T (\%) = \frac{(V - V_0) \times C \times 14}{m} \times 100 \dots\dots\dots (\text{Eq 1})$$

V : volume de H₂SO₄ qui sert pour le titrage de l'échantillon,

V₀ : volume de H₂SO₄ qui sert pour le titrage du blanc,

C : Concentration de la solution de l'acide sulfurique pour le titrage de l'ammoniac,

m : masse de l'échantillon en mg.

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

$$S (\text{salinité}) = 1,8 \times \text{Conductivité (ms/cm)}$$

4.2 Isolement criblage des bactéries productrices de biosurfactants

4.2.1 Isolement et purification des bactéries

a) Milieu de culture et enrichissement :

La composition est donnée en appendice B3. Le milieu d'enrichissement permettra une meilleure adaptation de la microflore du sol à la dégradation du pétrole. Les étapes de la préparation des milieux de culture sont :

- ✓ Préparation du milieu de culture minéral (MM) avec un pH égale à 7,0 et autoclavé à 120 °C pendant 20 min.
 - Préparation d'une solution d'oligoéléments.
 - Préparation de la solution d'enrichissement = MM + solution d'oligoéléments + 2g de sol + 2% de pétrole brut stérilisé à l'autoclave.

- Incuber à 37 °C avec une agitation de 180 tr/min pour obtenir une culture contenant les microorganismes capables de dégrader le pétrole brut et qui sont fort possible producteurs de biosurfactants.
- 1 ml du trouble bactérien de milieu d'enrichissement est ajouté dans un tube contenant 10 ml de bouillon d'extrait de malt et incuber à 37 °C sous agitation (180 tr/min) pendant 24h.
- La biomasse (DO 600 nm) a été suivie en utilisant un spectrophotomètre UV-vis (Shimadzu UV probe 2.0-1650 PC) pour retenir les enrichissements positifs (croissance abondante).

➤ Préparation des dilutions et ensemencement

L'isolement bactérien a été réalisé à partir de la culture positive du milieu d'enrichissement suite à des séries de 8 à 10 dilutions successives au 1/10^{ème} dans l'eau distillée auxquels est ajouté 1 ml de la solution mère contenant la culture positive.

Après une incubation sous agitation (180 tr/min), à la température adéquate pendant 48 à 72h, nous procédons à l'ensemencement de 200 µl de chacune des dilutions sur un milieu King B coulé dans des boîtes de Pétri et qui sont incubées dans l'étuve à 37 °C pendant 24h.

Des observations microscopiques à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50) et des repiquages successifs ont été faite afin de purifier les colonies obtenues.

➤ Conservation des isolats

Pour la conservation de courte durée, des repiquages en stries ont été réalisés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu riche (LB). Les boîtes sont conservées à plus de 4 °C pour les prochaines utilisations. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois [242].

Pour la conservation de longue durée, elle est réalisée à partir d'une culture jeune de la souche bactérienne isolée, soumise à -80 °C sur milieu LB additionné avec du glycérol à 20 % (v/v) [58].

4.2.2 Criblage des souches productrices de biosurfactants

Le criblage des souches productrices consiste à produire le tensioactif par toutes les souches bactériennes afin de choisir les meilleurs isolats en mesurant la tension superficielle du surnageant récupéré après centrifugation.

✓ Préparation de l'inoculum :

Le milieu utilisé pour la préculture contient (en g/L) [58] : Extrait de carne (3), Peptone de gélatine (5), avec $\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$. Le milieu est ensemencé à raison d'une colonie puis incubé pendant 24h à 37 °C sous agitation (180 tr/min).

Les précultures ont servi d'inoculer le milieu de production à raison de 8% (v/v). L'incubation est assurée à 37°C sous agitation (200 tr/min) [82].

✓ Milieu de production :

C'est un milieu minéral contenant (g/L) : Na_2HPO_4 (2,2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,06), NaCl (0,05), KH_2PO_4 (1,4), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), CaCl_2 (0,02), Extrait de levure (0,02).

Ce milieu est additionné par 1ml d'une solution d'oligoéléments composés de ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (525), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (705), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (200), $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (27), H_3BO_3 (15). Le milieu est stérilisé par autoclave à 121 °C pendant 20 min, le pH est ajusté à 7,0 [140].

Le choix de la source de carbone : Les sources de carbone utilisées sont : l'huile d'olive (1%, v/v), glucose (20 g/L), hexadécane (2%, v/v) et le pétrole brut (1%, v/v), le choix se repose sur la mesure de la tension de surface (cf. 4.3.1.3.1).

- Caractérisation phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique est basée sur la morphologie, les tests de différenciation et les tests biochimiques.

a) Etude morphologique

La description micromorphologique (forme, mobilité et présence des spores) est directement observée sous microscope optique. Elle se fait en deux temps, à l'état frais ou après coloration non vitale (coloration de Gram).

b) Tests de différenciation

Ces tests permettent d'orienter l'identification aux grandes familles microbiennes. Ils s'agissent des tests suivants : catalase, oxydase et Gram. Le détail de ces tests est mentionné en appendice B4.

c) Analyses biochimiques

Cette analyse permettra de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles [243], en étudiant la voie métabolique suivie par les souches bactériennes à identifier et les enzymes qu'elles possèdent. Dans notre cas, les souches bactériennes isolées ont été identifiées en utilisant les galeries API.

- Système API 20 E

Galerie de 20 microtubes contenant le milieu déshydraté permettant de réaliser 23 tests biochimiques afin d'identifier les espèces appartenant à la famille des *Enterbacteriaceae*.

La suspension bactérienne introduite dans le tube dissout les substrats déshydratés (appendice B5).

- Système API 50 CH

La galerie API 50 CH permet d'étudier le métabolisme des hydrates de carbone par les microorganismes [244]. Elle est constituée de 50 microtubes comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube), pour les études de fermentation, et une zone d'aérobiose (la cupule) pour les études d'oxydation et d'assimilation. Le premier tube, sans substrat, sert de témoin négatif. Les tubes suivants contiennent chacun une quantité définie de substrat déshydraté, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques) (appendice B6).

- Système API CORYNE

API CORYNE est un système d'identification en 24h des bactéries corynéformes. Elle est composée d'une galerie constituée de 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense qui réhydrate les substrats enzymatiques. Les réactions

produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les substrats sucrés. La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré (appendice B7).

4.3 Production des biosurfactants

4.3.1 Conditions de production

Les deux isolats utilisés pour la production de biosurfactants sont : 1C et 7G. Ils ont été sélectionnés pour leurs performances à produire de biosurfactants.

1. Préparation de l'inoculum: l'inoculum a été préparé selon l'étape décrite précédemment en section (4.2.1.1)

2. Milieu de production: Voir section (4.2.1-1.2) L'héxadécane était la seule source de carbone dont la concentration optimale est fixée à 2% (v/v).

3. Méthodes analytiques

La production du biosurfactant a été estimée par deux grandeurs principales qui sont la tension superficielle (γ) et l'indice d'émulsification (E_{24}).

3.1 Tension superficielle (γ)

La tension de surface est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface.

La mesure de la tension superficielle est réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine à l'aide d'un tensiomètre (Tensiomètre K6, Krüss GmbH, Hamburg, Allemagne) [240].

Le milieu de production est centrifugé à 4500 tr/min pendant 15 min, afin de séparer la biomasse. Le surnageant séparé est le liquide employé pour mesurer la tension superficielle.

3.2 Indice d'émulsification

L'émulsification est basée sur la tension superficielle (interfaciale). Elle est estimée pratiquement par l'indice d'émulsification E_{24} où on met des volumes égaux de surnageant et de l'hydrocarbure ou d'huile (4 ml) dans un tube à essai, et on mélange avec un vortex (VTX 400) à une vitesse maximale (8000 tr/min) pendant 2 min.

L'indice (E_{24}) est calculé après 24h (figure 4.3). En divisant la longueur de la couche émulsionnée par toute la longueur du mélange et en multipliant par 100 [246, 247] selon la formule suivante : équation 2.

$$E_{24} = \frac{E}{E'} \cdot 100 \dots\dots\dots (\text{Eq2})$$

Avec E : La longueur de la couche émulsionnée

Et E' : La longueur totale du mélange

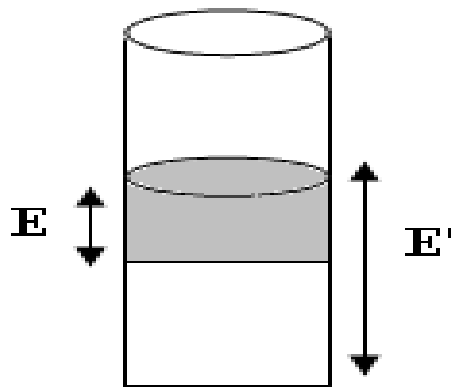


Figure 4.3 : Mesure de l'indice d'émulsification

4.3.2 Séparation et purification du biosurfactant

Le biosurfactant est précipité par acétone, en ajoutant au surnageant à trois volume égale d'acétone dans un bain marie glacé (figure 4.4), on laisse 24h à 4°C et on centrifuge (200tr/min) (Centrifugeuse D-78532 Tuttlingen).

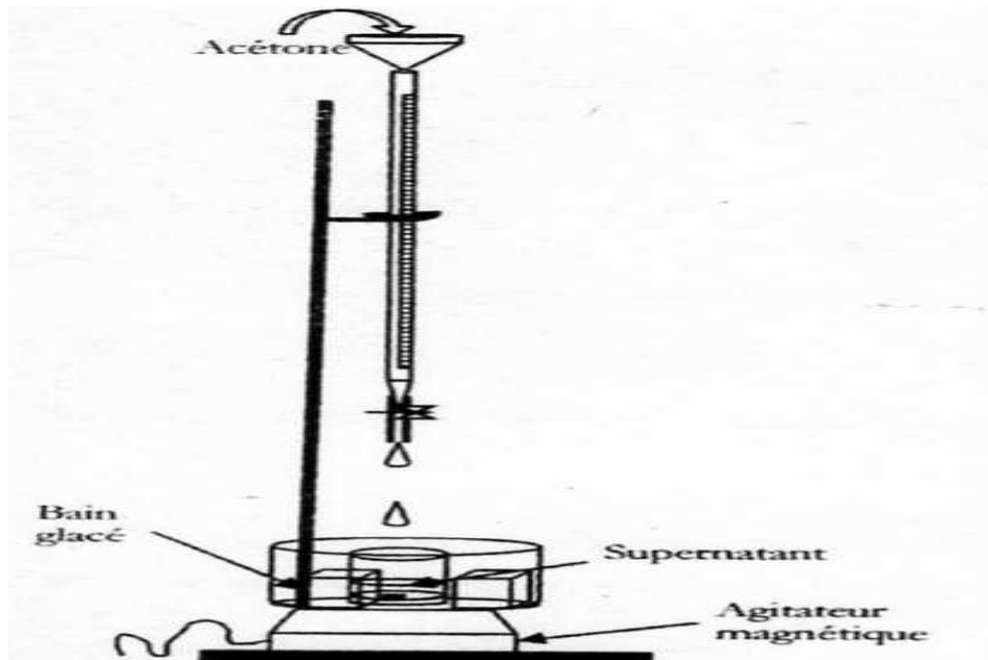


Figure 4.4 : Séparation du biosurfactant par acétone

Le biosurfactant obtenu est séché dans une étuve (D-91126 Schwa Bach FR G) à 37 °C, puis il est redissout dans l'eau distillée.

Le rendement de production des biosurfactants a été également déterminé.

4.3.3 Caractérisation des biosurfactants

4.3.3.1 Caractérisation fonctionnelle

a) Pouvoir moussant

Le pouvoir moussant a été déterminé en mettant dans un tube à essai une solution de tensioactif dans l'eau distillée, puis agité manuellement pendant 30 secondes et laissé reposer pendant 5 min.

b) Pouvoir émulsifiant

La propriété émulsifiante a également été évaluée avec du gasoil, du kérosène, d'huile de tournesol et d'huile moteur en mélangeant des volumes égaux de surnageant avec l'hydrocarbure ou l'huile. Le mélange est agité pendant 2 min à une vitesse maximale (8000 tr/min) (agitateur IKA-Mini MR) et laissé pendant 24h au repos. L'indice d'émulsification a été également calculé (d'après l'équation 2).

c) Pouvoir antimicrobien

Les espèces utilisées pour les tests antibactériens sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1544 (obtenues du centre biotechnologique de Sfax, Tunisie).

L'activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* ATCC9144 et *P. aeruginosa* ATCC1544 a été déterminé selon la technique de DHIMAN et *al.* (2011) [248]. Chaque bactérie cible a été inoculée ($100 \mu\text{l}$ à 10^6 ufc.ml^{-1}) par étalement sur gélose LB et un disque stérile (6 mm) immergé dans une solution du biosurfactant (dissous dans l'eau distillée à la CMC) a été déposé sur la surface du milieu. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h. L'activité inhibitrice a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone claire autour du disque.

4.3.3.2 Caractérisation physico-chimique

a) Stabilité thermique

La stabilité thermique a été évaluée par incubation du surnageant contenant le biosurfactant à différentes températures : 20, 50, 70 et 100°C pendant 15 min, puis en mesurant la tension de surface et l'indice d'émulsification [249].

b) Stabilité chimique

▪ **Effet du pH**

L'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH du surnageant de 2 à 11. Quinze minutes après, la tension de surface et l'indice d'émulsification ont été mesurés [82].

▪ **Effet de la salinité**

Pour déterminer l'effet de la salinité, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au surnageant à différentes concentrations (5, 15, 50 et 100 g.l^{-1}). Après 30 min à température ambiante, leur tension de surface et l'indice d'émulsification ont été mesurés [82].

c) La concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la méthode de dilution en mesurant la tension superficielle à chaque dilution [121], puis en

traçant la courbe de la tension de surface en fonction de la concentration de la solution du biosurfactant [250]. La concentration du biosurfactant, au delà de laquelle la tension de surface n'a pas changé, a été définie comme la CMC.

4.3.3.3 Caractérisation structurale

a) Test Rhamnose

La présence de groupements glucosidiques dans la molécule a été appliquée par le test rhamnose en utilisant la méthode de DUBOIS et *al.* (1956) [251]. Un volume de 1 ml de surnageant a été ajouté à 2 ml de réactif de phénol à 5%, puis on ajoute 5 ml d'acide sulfurique pur (98%). On incube pendant 1 heure à 65 °C (Tyrkovskaya et *al.*, 2001) [242]. Un résultat positif sera indiqué par une coloration rougeâtre.

b) Analyse par FTIR

Les spectres infrarouge ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, série 8400, Shimadzu, Japon). Le précipité du biosurfactant a été dissous dans le tétrachlorure de carbone (CCl_4) et l'analyse a été effectuée aux longueurs d'onde comprises entre 500 et 4000 cm^{-1} selon LOTFABAD et *al.* (2009) [2].

c) Analyse par HPLC

L'obtention du chromatogramme par la chromatographie liquide à haute performance a été réalisée en dissolvant le biosurfactant dans le mélange acetonitrile (ACN):eau (1 :1, v/v), puis centrifugé, filtré et injecté dans une colonne C18 de l'appareil HPLC (Shimadzu, LC-10ATvp pompe avec un détecteur UV SPD-10Avp, Japon) avec un débit de 1 ml/min, une phase mobile d'ACN : d'eau (60 :40, v/v), un volume d'injection égale à 10 μl et une longueur d'onde égale à 280nm [57].

d) Analyse par LC-MS

Les biosurfactants ont également été analysés par chromatographie liquide spectrométrie de masse (LC-MS). Il a été dissous dans le méthanol. Les résultats ont été obtenus en utilisant l'appareil LC-MS (Agilent série 1100LC-MSD système) couplé au spectromètre de masse (Agilent MSD Piège d'ions XCT)

équipé d'une source d'ions ESI. Le système chromatographique était équipé d'un injecteur automatique et d'une colonne phase inverse C18 (2.1 x 150 mm).

Les conditions analytiques d'HPLC sont : 5 µl d'échantillons injectés à un double taux de 1:4. La colonne a été éluée initialement à un débit de 250 µl. min⁻¹ avec un mélange d'ACN 25% et 75% d'eau, puis en appliquant un gradient linéaire de plus de 30 min à 50% ACN et 50% d'eau et plus de 15 min à 90% ACN et 10 % d'eau. La colonne est ensuite lavée pendant 1 min, et finalement rééquilibrée à 25% ACN et 75% d'eau pendant 30 min. Pour l'ionisation electrospray avec polarité des ions positifs de la tension capillaire a été mise à 3,5 kV, la température de séchage à 350°C, la pression du nébuliseur à 40 psi, et le taux de séchage du gaz à un débit de 10 l.min⁻¹. Le temps d'accumulation maximum est 50 ms, la vitesse de balayage est de 26000 m.z⁻¹.s⁻¹ (ultra mode de balayage), et le temps de fragmentation 30ms.

4.4 Identification génotypique des souches retenues

- Etude phylogénétique

Deux souches bactériennes (1C et 7G), à fort potentiel de production de biosurfactants, ont subies des analyses phylogénétiques par séquençage de l'ADN correspondant à la sous- unité 16S de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Pour cela plusieurs étapes sont nécessaires [253].

o Extraction de l'ADN génomique

Les différentes étapes ont été effectués successivement comme suit :

- ❖ Pour une culture de 24h, on réalise la centrifugation de 10 ml dans un tube conique (Falcon) pendant 5 min à 12000 tr/min.
- ❖ Après avoir ôté le surnageant, le culot est resuspendu dans 487 µl de tampon Tris-EDTA (TE) et 40 µl de lysozyme à une concentration de 20 mg/ml (pour lyser les parois cellulaires).
- ❖ Après incubation pendant 1h à 37 °C, on ajoute 30 µl de sodium dodecylsulfate (SDS) à une concentration de 10% et 5 µl de protéinase K à 20 mg/ml et le mélange est incubé 1h à 50 °C.

- ❖ On ajoute au mélange, 100 µl de NaCl (5 M) avec 800 µl CTAB/NaCl (10% CTAB dans une solution NaCl 0.7 M). L'ensemble est mélangé en retournant le tube et incubé 10 min à 65 °C.
- ❖ Afin de séparer l'ADN des protéines, on ajoute 750 µl chloroforme/alcool isoamylique dans les proportions (24:1, v/v), on mélange vigoureusement et on centrifuge 5 min à 14000 rpm. Le surnageant obtenu est transféré dans un tube eppendorf propre et stérile en faisant attention de ne pas prendre l'interface blanche.
- ❖ L'ajout de 300 µl de phénol et de 300 µl de chloroforme/alcool iso-amylique (24:1, (v/v) est suivi d'une centrifugation 5 min à 14000 tr/min et le surnageant est transféré dans un nouveau tube.
- ❖ Pour précipiter l'ADN, on ajoute 600 µl d'isopropanol froid et on incube les tubes dans la glace pendant 30 min.
- ❖ Le culot obtenu après centrifugation (10 min à 14000 tr/min), est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70 %. Le culot ainsi obtenu est séché sous vide pour enlever toute trace d'alcool.
- ❖ Pour dégrader les ARNs, le culot obtenu est resuspendu dans 200 µl de tampon TE (Tris-EDTA) contenant 1 µl RNase (20 mg/ml) et le mélange est incubé pendant 1h à 37 °C.
- ❖ Ensuite on rajoute 300 µl phénol + 300 µl chloroforme/alcool isoamylique et on centrifuge pendant 5 min à 14000 tr/min.
- ❖ Le surnagent obtenu est précipité avec 600 µl d'isopropanol. Après incubation dans la glace pendant 30 min, on effectue la centrifugation pendant 10 min à 14000 tr/min.
- ❖ Le culot obtenu contenant l'ADN est suspendu dans 20 µl d'eau stérile puis conservé à -20 °C.

○ Electrophorèse et quantification de l'ADN

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

bromure d'éthidium (BET). Le marqueur de taille utilisé est lambda *Hind III* dont la taille des bandes allant de 1000 à environ 23000 pb. Cette étape nous permettra d'optimiser les dilutions qu'on doit réaliser pour amplifier le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S.

o Amplification par PCR du gène de l'ARN ribosomal 16 S

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant un grand nombre de fois grâce à une polymérase. Les amorces nucléotidiques universelles Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ont été utilisées afin d'amplifier le gène de l'ARNr 16S et obtenir un produit PCR de taille approximative de 1,5 kb [254].

- **Appareillage** : Robocycler 96 Accessories (Stratagene).

- **Mélange réactionnel** : 2 µl ADN génomique + 5µl Tampon *Taq* DNA polymérase (10x) + 0.5 µl (5U/µl) *Taq* DNA polymérase + 3.5 µl MgCl₂ 6 H₂O (25 mM) + 1µl Amorce Fd1 (50 µM) + 1 µl Amorce Rd1 (50 µM) + 0.5 µl (10 mM) dNTPs + 50 µl H₂O distillée stérile q.s.p.

- **Cycles de PCR** : La réaction d'amplification consiste en une première étape de dénaturer l'ADN génomique suivie par une succession d'étapes de dénaturation, appariement et élongation, au cours desquelles le fragment d'intérêt est multiplié en un très grand nombre de fois sous l'action de polymérase. Au cours de l'appariement, les amorces oligonucléotidiques Fd1 et Rd1 viennent se fixer spécifiquement au niveau des extrémités du gène codant pour l'ARNr 16S. La *Taq* DNA polymérase, en présence des quatre dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) va permettre une élongation des amorces fixées. La réaction est terminée par une dernière étape dont le but est de terminer toutes les élongations en cours. Le programme de la PCR est détaillé dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Programme des cycles de PCR.

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

○ Electrophorèse et quantification du produit de la PCR

Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose afin d'estimer leur taille et leur concentration en comparant les bandes obtenues avec celles du marqueur de taille (DNA Leader 100 pb, Promega ; Bandes: 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 600 pb, 700 pb, 800 pb, 900 pb, 1000 pb et 1500 pb).

A pH neutre, les fragments d'ADN sont chargés négativement et migrent vers l'anode. Le produit PCR est déposé sur le gel, puis soumis à l'action d'un champ électrique de 100 mV pendant 30 min.

Grâce à la présence dans le gel, du BET qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence orange de 254 à 365 nm, les bandes de migration sont visualisées sous un rayonnement UV à l'aide d'un transilluminateur (Bioblock Scientific).

○ Le profil ARDRA (Analyse de Restriction de l'ADN Ribosomal Amplifié)

Le profil ARDRA consiste à digérer les ADNr 16S par des enzymes de restriction et de comparer les profils de restriction obtenus sur un gel d'agarose (1%). Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées : *HaeIII*, *MboI* et *AluI*.

Le milieu réactionnel est le suivant : ADN 5 µl ; Enzyme (10 U/µl) 1 µl; Tampon (10x) 1 µl ; H₂O: q.s.p 10 µl final. Le mélange réactionnel est incubé pendant 2h à la température adéquate d'activité enzymatique (37 °C).

Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

○ Purification de l'ADN génomique amplifié

L'ADN amplifié par PCR est purifié par le kit QIAquick (QIAGEN) d'extraction sur gel. Afin d'avoir une quantité d'ADN acceptable après avoir réalisé la purification, on dépose dans chaque puits du gel 25 µl du produit de PCR de l'ADN ribosomal 16S. Après migration, on coupe les fragments d'ADN du gel visualisé sous UV à l'aide d'un scalpel stérile. Après avoir déterminé la masse de chaque fragment, on ajoute 3 volumes de tampon QC pour un volume du gel. Cette étape est suivie par une incubation à 50 °C pendant 10 min pour dissoudre complètement le gel d'agarose tout en mélangeant les tubes 2 à 3 min durant l'incubation.

Le contenu des tubes est placé par suite dans la colonne « QIA quick spin ». Après la centrifugation des tubes colonnes pendant 1 min, on rejette le surnageant, on additionne 0.5 ml de tampon QC à la colonne QIA quick et on centrifuge pendant 1 min à 13000 rpm. Cette dernière étape est refaite avec 0,75 ml de tampon PE.

Pour l'élution d'ADN, on place un nouveau tube eppendorf stérile au dessous de la colonne, on additionne 50 µl de tampon EB (10 mM tris HCl pH 8.5) au niveau du centre de la colonne, puis on effectue la centrifugation pendant 1 min. Le filtrat obtenu est celui de l'ADN purifié prêt pour le séquençage.

○ Séquençage et analyse phylogénétique

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

Les résultats de la séquence ont été importés dans BioEdit v5.0.9 [244] et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blastn, non redondant) [245] avec la séquence complète, par

l'intermédiaire de GenBank [246], a permis d'identifier la souche étudiée en comparant avec les souches les plus proches.

4.5 Remobilisation des hydrocarbures

4.5.1 Dépollution d'un sol contaminé par le pétrole brut

Les hydrocarbures que se soit en état de mélange (forme complexe: mazout, pétrole brut et huile moteur) ou pure, sont analysés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS).

Après autoclavage du sol contaminé par le pétrole (10 g dans chaque erlenmeyer) on ajoute la solution du biosurfactant à différentes concentrations. On incube pendant 24h à 30 °C. On passe à l'extraction par le dichlorométhane (DCM), la phase organique est par la suite séchée au rotavapeur. Les hydrocarbures résiduels ont été dissouts dans du dichlorométhane. L'extrait est ensuite filtré par une colonne de Florisil pour passage en Chromatographie phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse.

On utilise comme appareillage : Chromatographe (Shimadzu, LC-10ATvp pompe avec un détecteur UV SPD-10Avp, Japon), Colonne HP-5 (5% phenyl methyl siloxane) (longueur, 30 m; diamètre interne, 0.25 cm; épaisseur du film, 0.25µm), Ordinateur Hewlett Packard.

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

4.5.2 Solubilisation des HAP

Les essais de solubilisation se sont portés sur: les hydrocarbures aromatiques polycycliques : Naphtalène et Phénanthrène.

La solubilité décroît avec l'augmentation du nombre de cycle aromatique. Le phénanthrène contient trois cycles aromatiques, sa solubilité dans l'eau est de 1290. 10⁻⁶ g.l⁻¹ et le naphtalène à deux cycles armatiques, sa solubilité est de 30000 g.l⁻¹[154, 258].

Pour réaliser les essais de solubilisation, 0.006g de chaque HAP choisis (pureté 98%, Aldrich-Germany) est ajoutée à 10ml de solution de biosurfactant à la CMC. Ces tubes sont agités à 30 °C et 200 tr/min à l'abri de la lumière pendant 24h, puis centrifugés à 12500 tr/min à 4 °C pour une durée de 3min. 5 ml de surnageant a été séparé est ajusté à l'aide du HCl (6M). Un pH égal à 2, puis un volume égal de dichloromethane (DCM) est ajouté pour extraire le HAP dissous dans la solution de biosurfactant. Nous récupérons la phase organique à l'aide d'une pipette pasteur puis analyser par spectrophotomètre UV-Vis (Shimadzu-1100, Japon) [259].

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1. Biotope et échantillonnage

5.1.1. Caractéristiques du sol

Les caractéristiques des sols sont illustrées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Composition des sols anciennement contaminés par le pétrole brut

Echant N°	TPH (g/kg de sol)	DCO (g/l)		COT (mg/l)		NOT (mg/l)	Conductivité (msiemens)	Salinité (g/l)	pH
		TOT	SOL	CT	CI				
01	27.84	3.806	1.0194	22.21	7.227	0.336	17.32	14.72	7.5
02	59.07	1.0903	0.824	44.21	8.562	0.285	13.06	11.10	7.57
03	36.05	2.0537	2.0537	33.41	4.984	0.663	13.95	11.86	7.25

DCO : Demande Chimique en Oxygène ; COT : Carbone Organique total ;

N_T : Azote total Kjeldahl ; TPH : Hydrocarbures Pétroliers Totaux [241].

D'après ces résultats, nous constatons que l'échantillon n° 2 est le plus chargé en hydrocarbures totaux (59,07 g/kg de sol) et en carbone organique total, par rapport aux échantillons 1 et 3, ce qui est peut être du aux différents points de prélèvement, dates de forage, composition des fluides de forage, profondeurs, l'infiltration,etc.

A cet effet, l'échantillon du sol n° 2 est avéré la plus adéquate pour faire l'objet de l'isolement des souches bactériennes les plus adaptées à des concentrations élevées en hydrocarbures.

5.2 Isolement et criblage des souches productrices de biosurfactants

5.2.1 Caractérisation phénotypique des isolats

L'isolement sélectif a permis d'obtenir 14 isolats à potentiel producteur de biosurfactants. Les résultats préliminaires obtenus par observation microscopique et tests de différenciations (coloration de Gram, mobilité, catalase et oxydase) sont représentés dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Résultats de la coloration de Gram, mobilité, oxydase et catalase.

Isolat	Forme	Gram	Mobilité	Oxydase	Catalase
1F	bacillaire	-	+	+	+
2G	bacillaire	-	+	+	+
7H	bacillaire	-	+	+	+
2J	bacillaire	-	+	+	+
2A	bacillaire	-	+	+	+
2E	bacillaire	-	+	+	+
7E	bacillaire	-	-	+	+
7F	bacillaire	-	+	+	+
1E	bacillaire	-	+	+	+
2K	bacillaire	+	-	-	+
1A	coccobacilles	-	-	+	+
2B	coccobacilles	-	-	+	+
7G	Bacilles-coques	+	-	-	+
1C	bacilles	-	+	+	+

En plus de ces tests de différenciations, l'utilisation des méthodes biochimiques (API 20E, API 50CH et API Coryne), nous a permis de rattacher ces isolats aux genres correspondants. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 5.3.

Tableau 5.3 : Identification phénotypique des isolats obtenus à partir des sols anciennement contaminés par le pétrole brut.

Isolats	Identification de souche	(%)
1F	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	96.5%
2G	<i>Pseudomonas</i> sp.	41.3%
7H	<i>Pseudomonas</i> sp.	41.3%
2J	<i>Pseudomonas</i> sp.	41.3%
2A	<i>Pseudomonas</i> sp.	41.3%
2E	<i>Pseudomonas</i> sp.	41.3%
7E	<i>Pasteurella</i> sp.	86.6%
7F	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	98.3%
1E	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	96.5%
2K	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%
1A	<i>Bordetella</i> sp.	93.3%
2B	<i>Bordetella</i> sp.	93.3%
1C	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99.9%
7G	<i>Brevibacterium</i> sp.	99.9%

% : Pourcentage de similitude avec les espèces apparentées.

L'identification préliminaire a pu être réalisée à l'échelle du genre ou de l'espèce. En effet, parmi les 14 souches bactériennes isolées, elles appartiennent aux genres suivants [260] :

- ***Pseudomonas*** : D'après la description macromorphologique, les isolats (1F, 2G, 7H, 2J, 2A, 2E et 1E) sont rattachés au genre *Pseudomonas*, ayant comme caractéristiques : Gram négatif, oxydase positive, catalase positive, aérobie stricte, ADH et citrate positif [260].

- ***Bacillus*** : L'isolat 2K fait partie du genre *Bacillus* : bacille, Gram positif, sporulant et possède une catalase.

- ***Acinetobacter*** : D'après les formes microscopiques (bacilles courts, Gram négatif, immobiles), et les tests biochimiques (lactose-, nitrate-, oxydase-,

catalase+, test positif avec le glucose), l'isolat 7F appartient au genre *Acinetobacter* défini par BOUVET et GRIMONT (1986) [261].

- ***Bordetella*** : Les deux isolats (1A et 2B) font parties du genre *Bordetella*, d'après leurs aspects microscopiques (coccobacilles courts, non sporulantes et immobiles) et leurs caractères biochimiques (aérobies, test négatif sur les glucides).

- ***Ochrobactrum*** : L'isolat 1C a été rattachée au genre *Ochrobactrum* et cela d'après les observations microscopiques (bacille, Gram négatif, mobile) et biochimiques (aérobie strict, croissance entre 20 et 37 °C, oxydase et catalase positives). L'*Ochrobactrum* est un chimioorganotrophe, capable d'utiliser de nombreux acides aminés, sucres ou acides organiques comme unique source de carbone, non indologène (n'hydrolysant ni l'esculine ni la gélatine) [262].

- ***Brevibacterium*** : L'isolat 7G appartient au genre *Brevibacterium* et cela d'après les résultats de tests de différenciation effectués et les résultats des tests biochimiques (Gram positif, non sporulée, immobile, aérobie stricte, catalase positive, oxydase et nitrate réductase variables, chimioorganotrophe à métabolisme oxydatif et inactive sur les sucres).

Le genre *Brevibacterium* est l'unique genre de la famille des *Brevibacteriaceae*. Il appartient au sous-ordre des *Micrococcineae*, ordre des *Actinomycetales*, sous-classe des *Actinobacteridae*, classe des *Actinobacteria*. Leurs températures de croissance sont comprises entre 20 et 37 °C et elles possèdent un pH de croissance optimum allant de 6,5 à 8,5. Ces espèces sont halotolérantes (15-25% de NaCl). Les *Brevibacteriaceae* appartiennent aussi aux bactéries corynéformes, c'est-à-dire qu'elles changent de forme au cours de leurs croissances. En phase exponentielle, elles sont en forme de bâtonnet mais à l'entrée de la phase stationnaire, elles se transforment en coques [263].

- ***Pasteurella*** : Ce sont des parasites d'invertébrés et sont souvent pathogènes pour les mammifères et les oiseaux mais provoquent rarement des maladies chez l'homme : bacilles Gram-, non mobiles et oxydase et catalase positives.

Les résultats des API Coryne et API 50 CH ont permis l'affiliation de l'isolat 7E au genre *Pasteurella*.

5.2.2. Criblage des souches à fort potentiel de production

En se basant sur la mesure de la tension superficielle du surnageant obtenu après culture sur hexadécane, nous avons trouvé que tous les isolats peuvent produire des biosurfactants (figure 5.1) et, les deux meilleures sont les souches 7G et 1C donnant les meilleurs résultats (31.2 mN/m et 31 mN/m, respectivement). La poursuite de l'étude est réalisée avec ces deux souches bactériennes.

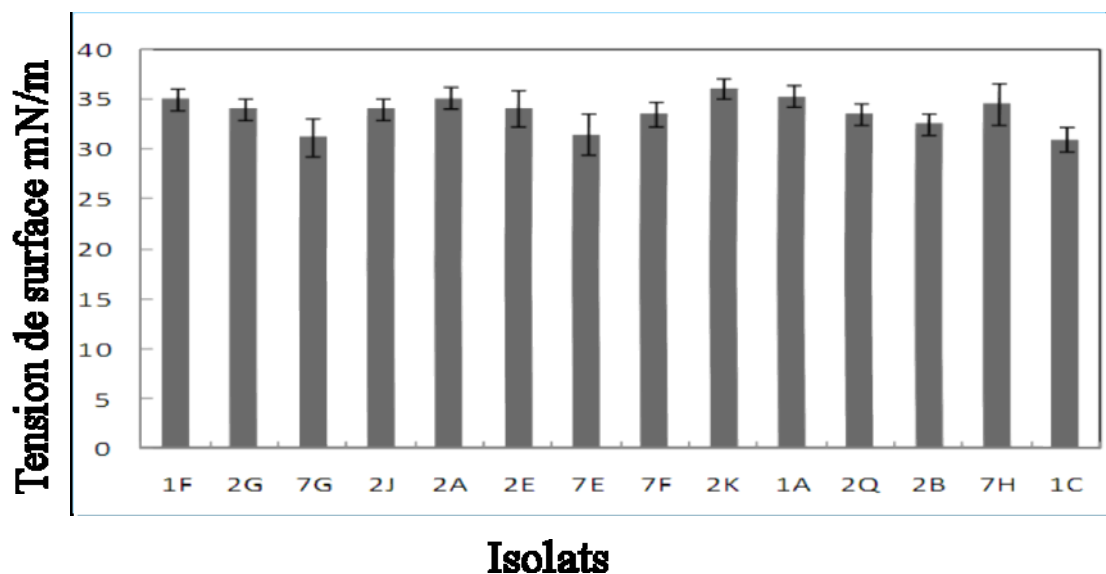


Figure 5.1 : La mesure de la tension superficielle pour différents isolats

GHOJAVAND et *al.* (2008) [264] ont pu isoler des souches bactériennes à partir du sol capables de produire des biosurfactants. Des travaux similaires ont aboutit à la production de biosurfactants à partir de souches isolées à partir de sols contaminés par les hydrocarbures : *Pseudomonas* (Prieto et *al.*, 2008) [265], *Ochrobactrum anthropi* [266] et *Brevibacterium* sp. [111, 267].

5.2.3. Choix de la source de carbone

L'influence de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant en utilisant l'hexadécane, l'huile d'olive, le glucose anhydre et le pétrole brut est

montrée sur la figure 5.2 en se basant sur la mesure de la tension superficielle (γ).

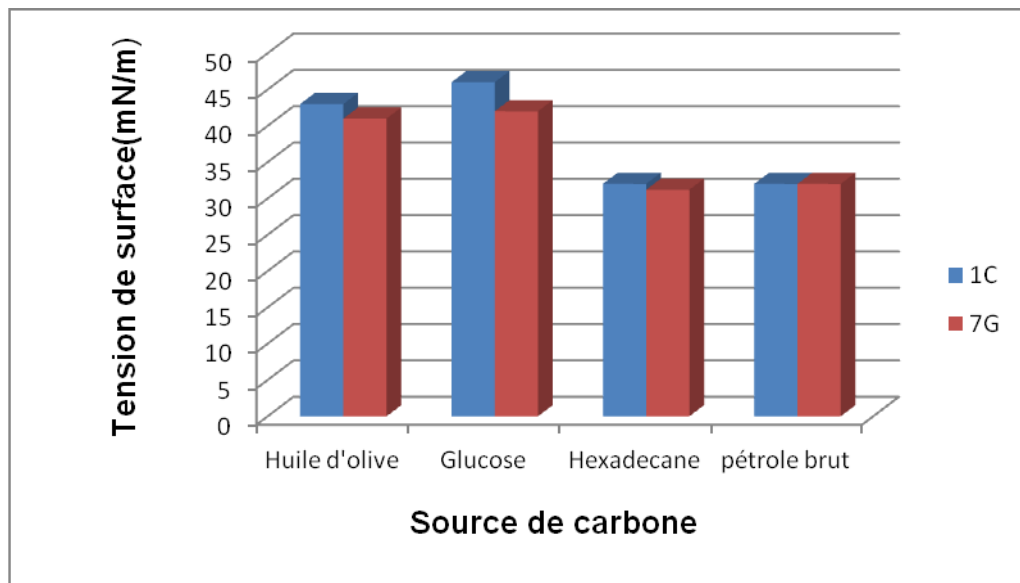


Figure 5.2 : Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par les deux souches sélectionnées.

L'examen des résultats obtenus en se basant sur la tension superficielle montre que la source de carbone a une influence sur la tension superficielle. Cependant, nous avons noté que les deux espèces bactériennes sont capables de croître sur les quatre substrats (huile d'olive, glucose, hexadécane et pétrole brut) avec une meilleure adaptation avec l'hexadécane où la tension de surface atteint 31.2 et 33.6 mN/m pour les souches 7G et 1C respectivement après 48h d'incubation. Ceci est conforme avec le fait que ces souches étaient isolées de sols contaminés aux hydrocarbures donc l'hexadécane a été une bonne source de carbone dans des conditions naturelles [58]. La même observation a été faite par SNEHAL et *al.* (2008) [268] avec *Rhodococcus* sp. d'où leur capacité à croître sur l'hexadécane pour produire du biosurfactant.

5.3. Purification et caractérisation des biosurfactants

5.3.1. Purification des biosurfactants

Après centrifugation et séchage, nous avons obtenu un précipité portant les caractéristiques suivantes: une poudre cristalline blanche, soluble dans l'eau distillée et dans le méthanol. Les rendements de production étaient de 2,0g/L pour

la souche 7G et 2,5 g/L pour la souche 1C. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par HABA et *al.* (2000) [269] et avec les résultats rapportés par LOTFABAD et *al.* (2009) [2].

Le calcul du rendement de production par rapport à la concentration de l'hexadécane des biosurfactants sont obtenus en utilisant les formules suivantes :

$$a) Y_{p1/s} = \frac{[p]}{[s]} = \frac{2.0 \text{ g/l}}{2\% (v/v)} = 1.292 \text{ g de biosurfactant (7G) / g d'hexadécane.}$$

$$Y_{p2/s} = \frac{[p1]}{[s]} = \frac{2.5 \text{ g/l}}{2\% (v/v)} = 1.616 \text{ g de biosurfactant (1C) / g}$$

d'hexadécane.

Avec :

[p1] : concentration en biosurfactant produit.

[s] : concentration en substrat initial (l'hexadécane)

Nous pouvons conclure que les rendements obtenus avec les deux souches sont nettement meilleurs que ceux obtenus en 2006 par KONAR et KAHYAOGU : [0,613-0,058, g/g de source de carbone] [270].

5.3.2. Caractérisation des biosurfactants

5.3.2.1. Caractérisation fonctionnelle

✓ **Pouvoir moussant**

Agissant sur l'interface eau-air, les tensioactifs permettent la dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide et donc la formation de mousse, ou c'est le degré d'aptitude à former de la mousse, Le contrôle du pouvoir moussant est fait par des méthodes nécessitant une mesure visuelle [271]. Les deux biosurfactants ont montré un grand pouvoir moussant justifié par la stabilité de la mousse qui a été observée durant 10 min.

✓ **Pouvoir émulsifiant**

Le pouvoir émulsionnant est le degré d'aptitude d'un produit à faciliter la formation d'une émulsion. [271].

Les tensions superficielles et interfaciales et la stabilisation d'une émulsion huile/eau sont couramment utilisés comme indicateurs de l'activité de surface [100]. Comme l'indique la Figure 5.3, le kérosène et le gasoil qui n'ont pas été émulsionnés par les biosurfactants. Par contre les valeurs E_{24} enregistrées pour les deux biosurfactants lorsque l'huile moteur et l'huile de tournesol ont été utilisées.

Les biosurfactants produits ont une bonne activité émulsifiante sur les huiles. L'indice d'émulsification des biosurfactants produits par les souches 7G et 1C respectivement égale à 45 et 52,2 % avec l'huile de tournesol et 92,31 et 95,23 % avec l'huile moteur (figure 5.3).

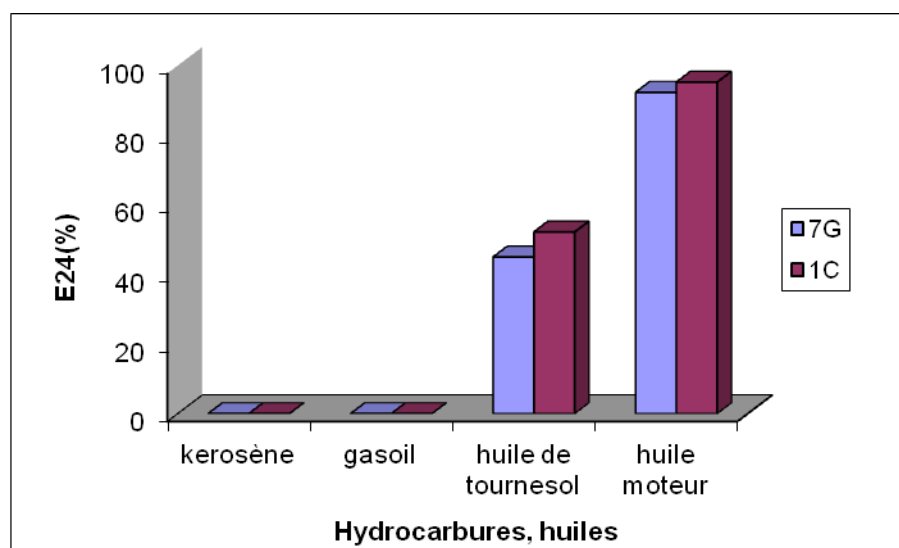


Figure 5.3 : Pouvoir émulsifiant des biosurfactants sur les hydrocarbures et les huiles.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans des travaux antérieurs. L'indice d'émulsification du biosurfactant glycolipidique produit par *Brevibacterium casei* MSA19 est plus élevé que celui des tensioactifs synthétiques tels que SDS, Tween 20 et Tween 80 [267]. Par ailleurs, un émulsifiant EPS produit par *Ochrobactrum anthropi* a montré d'importantes activités émulsifiantes contre les hydrocarbures tels que l'octane, le toluène et le pétrole brut [272].

La figure 5.4 montre le bon pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants produits sur l'huile moteur.

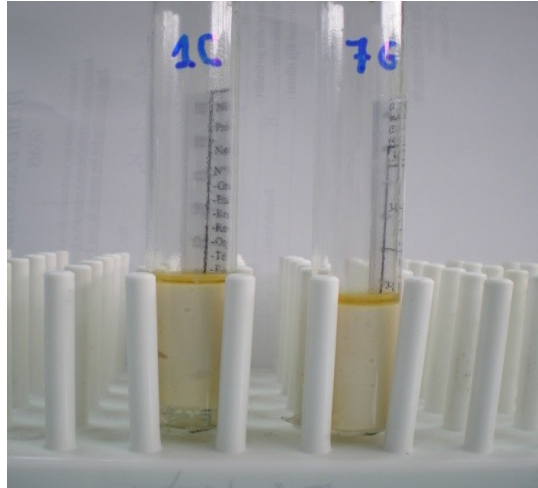


Figure 5.4 : Le bon pouvoir émulsifiant des deux biosurfactants sur l'huile moteur.

✓ **Pouvoir antimicrobien**

L'antibiogramme réalisé sur les espèces de *S. aureus* ATCC9144 et *P. aeruginosa* ATCC1544 montre le pouvoir inhibiteur des biosurfactants produits à partir de *Brevibacterium* (7G) et *Ochrobactrum* (1C). Seulement, où il apparaît une zone claire autour du disque (tableau 5.4) qui signifie l'absence de croissance dans cette zone à cause de la diffusion des molécules du biosurfactant (Photo, appendice B8).

Une large gamme antimicrobienne des surfactants sur *Escherichia coli* et *Lactococcus lactis*, tous deux étaient inhibés par le même biosurfactant [273]. Un lipopeptide produit par *Brevibacterium aureum* MSA13 a été caractérisé et a montré un large spectre d'activité contre les souches pathogènes, y compris *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* [274].

Tableau 5.4 : Pouvoir antimicrobien des biosurfactants produits par les souches 7G et 1C

Biosurfactant de	diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur:	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1C	18	12.63
7G	22	17.27

5.3.2.2. Caractérisation physico-chimique

➤ Stabilité thermique

Les variations de la tension de surface γ et de l'indice d'émulsification E_{24} en fonction de la température sont illustrées sur les figures 5.5 a et b.

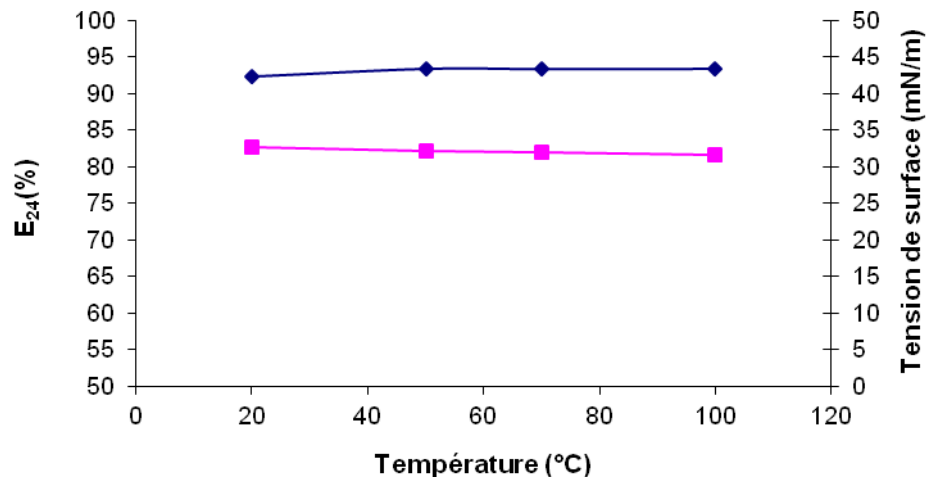


Figure 5.5 a : Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 7G représenté par E_{24} (♦) et la tension superficielle (■)

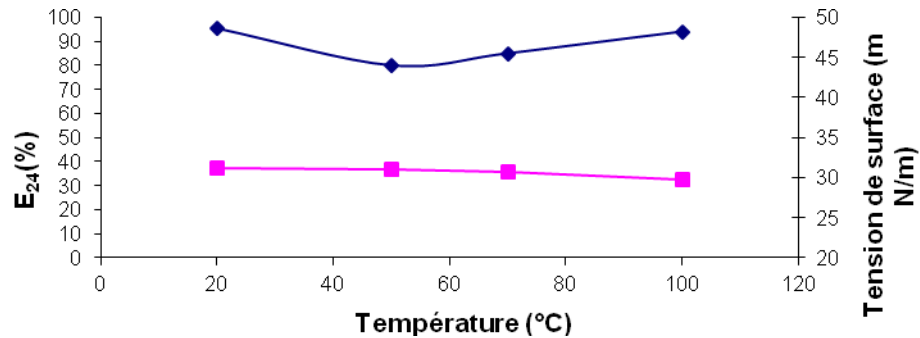


Figure 5.5 b : Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1C représenté par E₂₄ (♦) et la tension superficielle (■).

La figure 5.5a montre que la tension superficielle du biosurfactant produit par 1C n'a pas été influencée par la température. Sa tension de surface reste similaire sur une gamme de température comprise entre 20 et 100 °C (31 mN /m). Cependant, les valeurs de E₂₄ ont diminué avec des températures entre 20 °C (95,23%) et 50°C (72,72%), et cette valeur a augmenté à des températures supérieures à 70°C (85,10%) pour atteindre une valeur de E₂₄ à 94% à 100 °C (Figure 5.5 b). Cela peut être dû à la présence de substances altérées par la température, et qui ont un effet léger sur l'émulsification.

De même, la tension superficielle du biosurfactant produit par 7G était thermostable (32 mN/m entre 20 et 100 °C) et les valeurs de E₂₄ restent stables (95%) (Figure 5.5 a).

Ces résultats montrent que la thermostabilité des biosurfactants produits par les souches 7G et 1C est comparable à celle d'autres biosurfactants [275]. L'indice d'émulsification de ces biosurfactants a été assez stable par rapport aux tensioactifs synthétiques tel que le SDS, où une baisse de l'indice d'émulsification plus de 70% était enregistrée pour une gamme de température : 20- 90 °C [276].

- Stabilité chimique
- Influence du pH

La tension superficielle du biosurfactant produit par 1C était stable (30,5-31 mN/m) et 7G (31,4 – 32,2 mN/m) pour des valeurs différentes de pH allant de 2 jusqu'à 11 (figure 5.6 a et b).

L'effet du pH sur la tension de surface a été étudié pour des biosurfactants produits par différents microorganismes [277]. De même, la tension superficielle de Liposan produite par *Candida lipolytica* reste stable entre pH 2,0 et 5,0 [111], et celle de l'Emulsan produite par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 était stable pour des valeurs de pH allant de 5 à 6.

En ce qui concerne les valeurs de E_{24} du biosurfactant 7G, les valeurs de l'indice d'émulsification étaient optimales à des pH : 4 à 7 (95%) et elles ont diminué à un pH basique (32,2%) (Figure 5.6 a). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par PORNUNTHORNTAWEE et al. (2008) [278]. D'autre part, l'indice d'émulsification du biosurfactant 1C était optimale à pH 7-11 (~ 95 %), mais il a diminué à un pH acide (70,58%) (Figure 5.6 b). SHAVANDI et al. (2011) [279] ont prouvé que la capacité d'émulsification a été très sensible aux changements de pH. Le biosurfactant produit par la souche 1C montre une efficacité d'émulsification avec un pH entre 4 et 7. Des résultats similaires ont été obtenus pour un biosurfactant produit par *P. aeruginosa* MR01 [2]. A titre comparatif, le surfactant synthétique SDS maintient sa capacité émulsifiante pour les valeurs de pH variant entre 4,0 et 9,5.

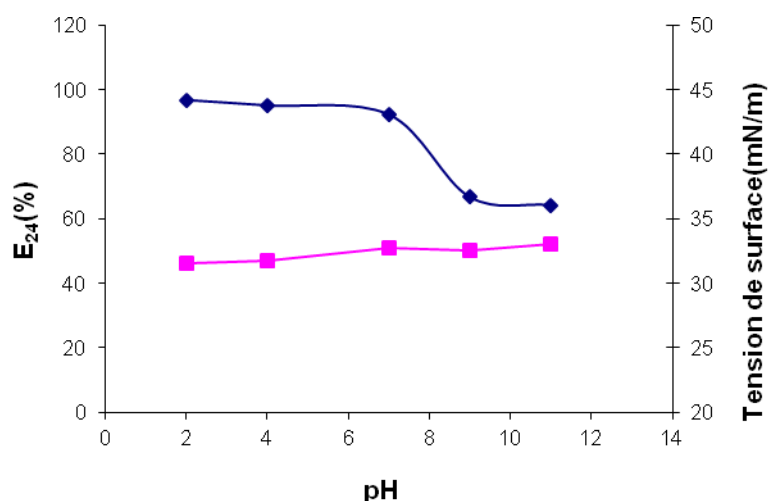


Figure 5.6 a : Influence du pH sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 7G représenté par E_{24} (♦) et la tension superficielle (■).

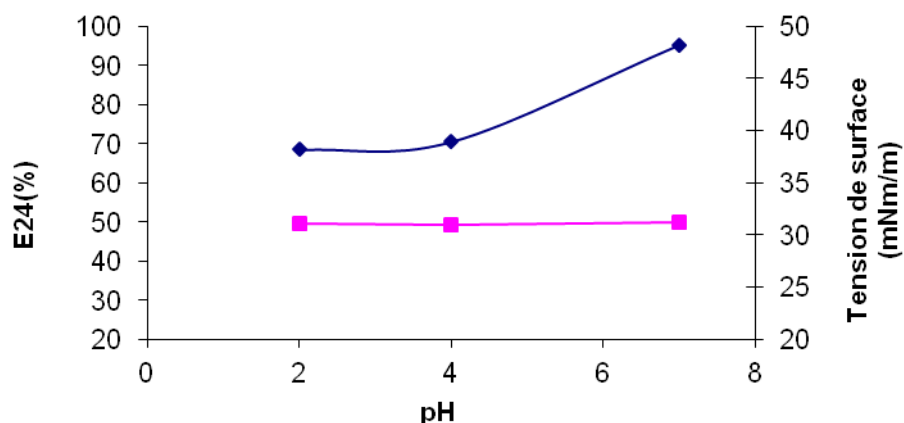


Figure 5.6 b: Influence du pH sur la stabilité du biosurfactant produit par la souche 1C représenté par E₂₄ (♦) et la tension superficielle (■)

➤ Influence de la salinité

D'après les figures 5.7 a et b, la tension superficielle des deux biosurfactants produits était stable (31 mN/m) pour toute la gamme de concentration de NaCl (5 à 100 g.l⁻¹). D'autre part, l'indice d'émulsification diminue avec l'augmentation des concentrations en sels.

JUNG et *al.* (1995) [280] ont rapporté que la présence de sels perturbait les émulsions huile/eau, affectant ainsi la tension de surface et l'indice d'émulsification.

Comme le montre les figures 5.7 a et b, la tension superficielle des biosurfactants reste stable jusqu'à 100 g.l⁻¹ de NaCl. Cela indique également que les biosurfactants produits par les isolats 1C et 7G restent efficaces avec la présence d'ions monovalents (Na⁺). Alors que 20 à 30g.l⁻¹ de sel est souvent suffisante pour désactiver les tensioactifs chimiques [268,271].

Les biosurfactants des souches 1C et 7G n'ont pas été précipités dans des solutions de chlorure de sodium (jusqu'à 100 g.l⁻¹). Cette tolérance aux forces ioniques offre aux biosurfactants plus d'efficacité dans les industries pétrolières dont la plupart pratiquent en conditions salines très élevées [281].

PRIETO et al. (2008) [265] ont signalé que le biosurfactant produit par une souche de *P. aeruginosa* forme des émulsions stables à des faibles concentrations de NaCl (5 g.l⁻¹). Toutefois, il a été capable de maintenir environ 80% de son activité initiale jusqu'à un niveau de salinité de 100 g.l⁻¹. Il y a peu de travaux indiquant que dans les sols salins, par rapport aux non salins, la dégradation du pétrole brut a été réduite [282, 283]. Ainsi, le besoin de plus d'études approfondies est fortement exigé afin d'évaluer l'efficacité du processus de bioremédiation pour les sites pollués ayant différents niveaux de salinité.

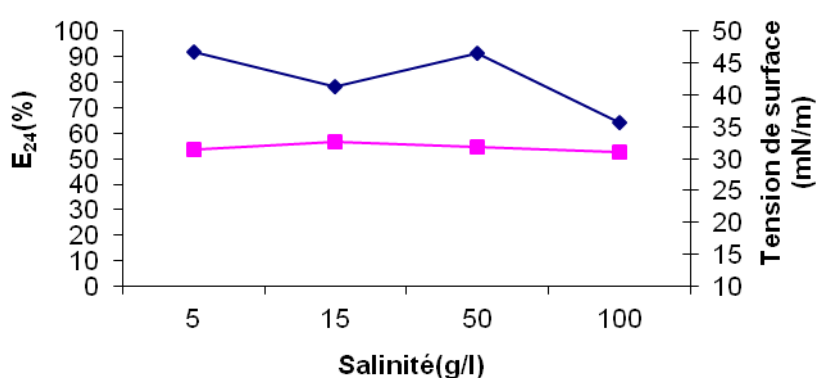


Figure 5.7a: Influence de la salinité sur l'efficacité du biosurfactant produit par la souche 7G représenté par E₂₄ (♦) et la tension superficielle (■)

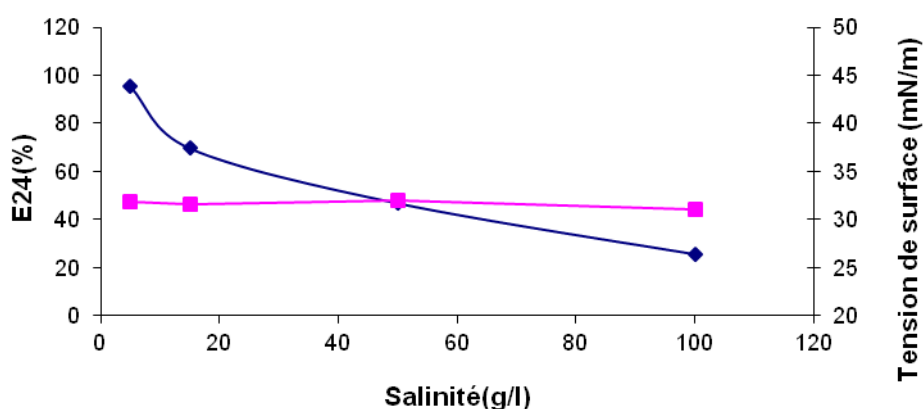


Figure 5.7b: Influence de la salinité sur l'efficacité du biosurfactant produit par la souche 1C représenté par E₂₄ (♦) et la tension superficielle (■)

➤ La concentration micellaire critique

La tension de surface diminue avec des dilutions successives de biosurfactant, atteignant une valeur minimale à proximité de 31-32 mN/m pour une concentration du biosurfactant supérieure ou égale à 1,5 mg/ml pour 1C et 2 mg/ml pour 7G. Ces valeurs définissent la CMC pour les biosurfactants respectifs (Figure 5.8 a et b). Les CMC pour les deux biosurfactants produits sont inférieurs à ceux des tensioactifs chimiques tels que le SDS [284].

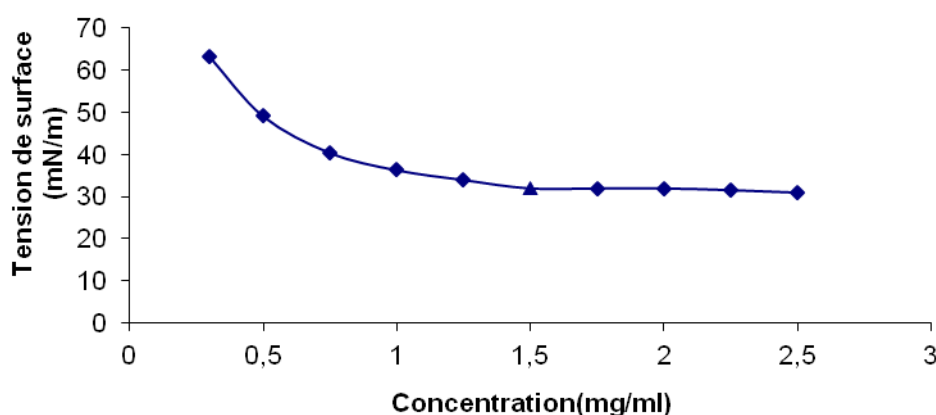


Figure 5.8 a : La CMC du biosurfactant produit par la souche 1C.

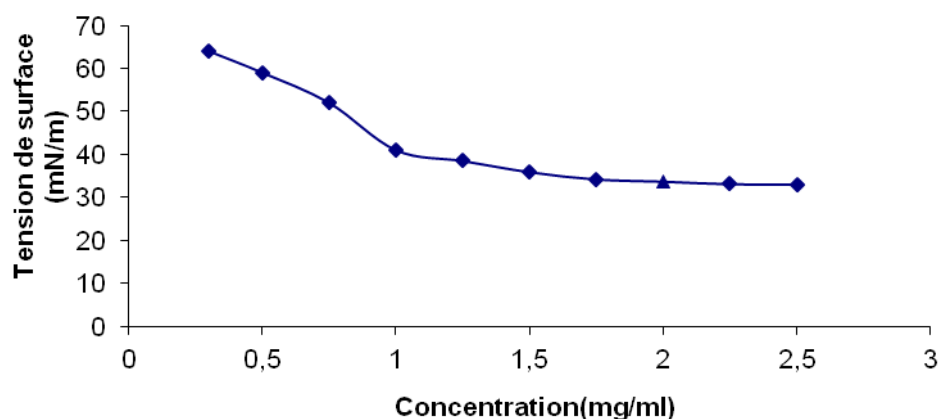


Figure 5.8 b : La CMC du biosurfactant produit par la souche 7G

5.3.2.3. Caractérisation structurale

➤ Test Rhamnose

Le test Rhamnose basé sur la méthode de Dubois et *al.* (1956) était positif (Figure 5.9), ce qui indique que les biosurfactants isolés peuvent être des glycolipides.

Un biosurfactant glycolipidique a également été produit à partir de la souche *Brevibacterium casei* MSA 19 isolée du milieu marin [285], tandis qu'un

biosurfactant lipopeptidique produite par *Brevibacterium aureum* MSA13 a été également caractérisé [274]. Cependant, quelques rapports ont décrit et caractérisé la production de biosurfactant d'*Ochrobactrum*. Par exemple, un émulsifiant EPS a été produite par une souche *O. anthropi* [272].

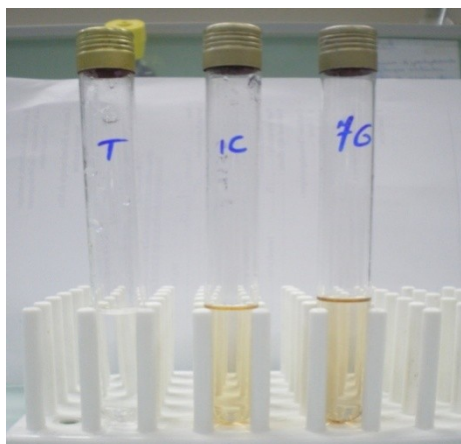


Figure 5.9 : Test Rhamnose sur les deux biosurfactants par rapport au témoin (T)
(Changement de couleurs pour les deux échantillons 1C et 7G).

➤ Analyse par IRTF (FTIR)

Les analyses par FTIR ont montré des profils relativement similaires pour les deux biosurfactants. Les vibrations de déformation à 1377 cm^{-1} (Figure 5.10 a) et à 1461 cm^{-1} (Figure 5.10 b) confirment la présence de groupements alkyles. La bande carbonyle de valence a été trouvée à 1700 cm^{-1} , qui est caractéristique pour les composés esters. Le groupe carbonyle d'ester a également apparu à 1310 cm^{-1} , qui correspond aux vibrations de déformation C-O sur les deux figures. Confirmant ce que DESAI et BANAT (1997) [7], Ron et Rosenberg (2001) [286] ont prouvé presque tous les biosurfactants ont un groupement ester ou acide carboxylique dans leurs structures.

Les bandes d'adsorptions situées à 2723 et à $1377\text{-}1461\text{ cm}^{-1}$ (Figure 5.10 a et b) montrent que les deux produits ont une structure chimique identique à celle des glycolipides. Les pics d'adsorptions présents à 2723 cm^{-1} sur les deux figures sont celles de la vibration de valence C-H des chaînes hydrocarbonées, sachant que toutes les classes de biosurfactants en contiennent. Les pics caractéristiques apparaissent à $1770\text{-}1774\text{ cm}^{-1}$ qui se rapportent à la vibration de valence C=O du

groupement carbonyle, tandis que les bandes à $1458\text{--}1461\text{ cm}^{-1}$ à 1377 cm^{-1} , confirment la présence des liaisons formées entre les atomes de carbone et les groupements hydroxyles dans les structures chimiques de la partie glucosidique. Les types de glycolipides produits dépendent de la souche bactérienne, de la source de carbone utilisée et le processus de production [287].

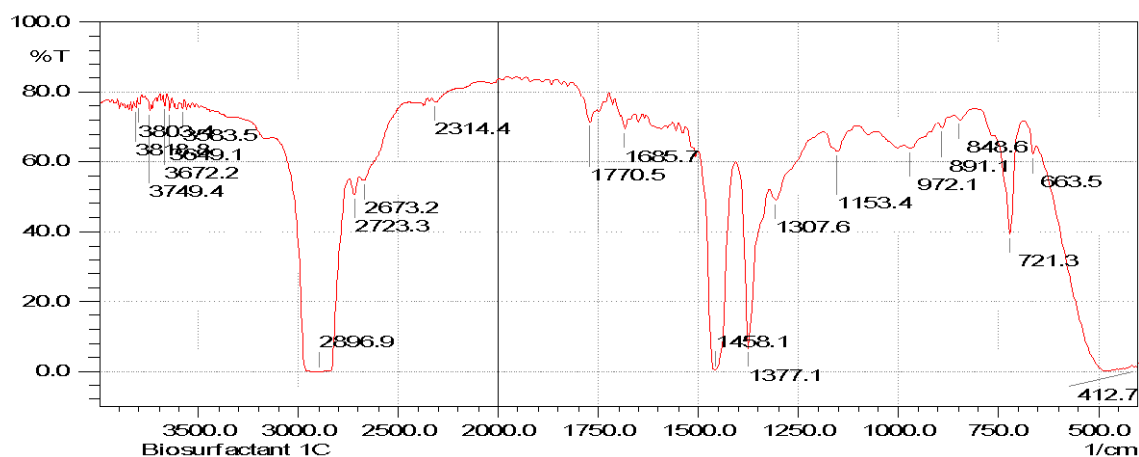


Figure 5.10 a : Analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche 1C

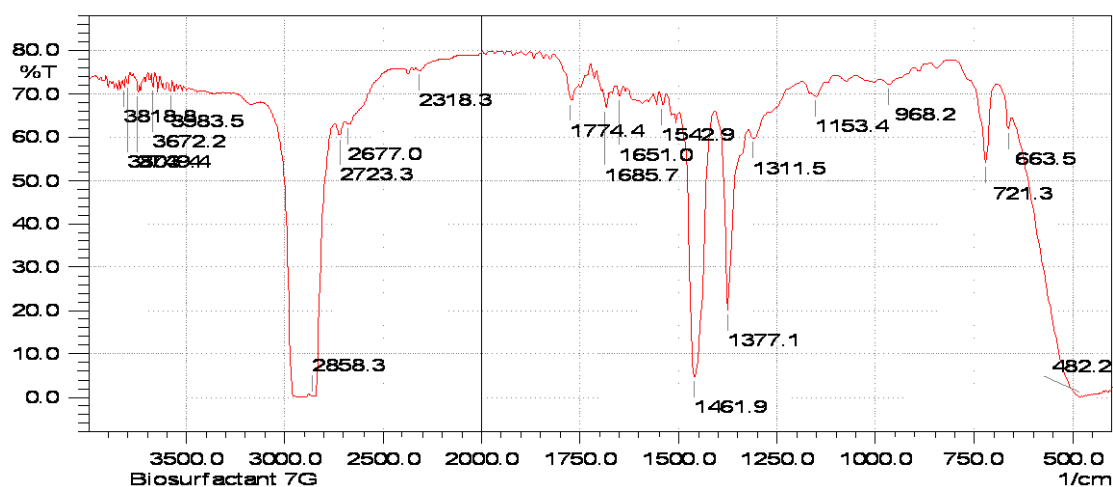


Figure 5.10 b : Analyse par FTIR du biosurfactant produit par la souche 7G.

➤ Analyse par CLHP (HPLC)

Les chromatogrammes obtenus par chromatographie en phase liquide sont donnés sur les figures 5.11 a et b.

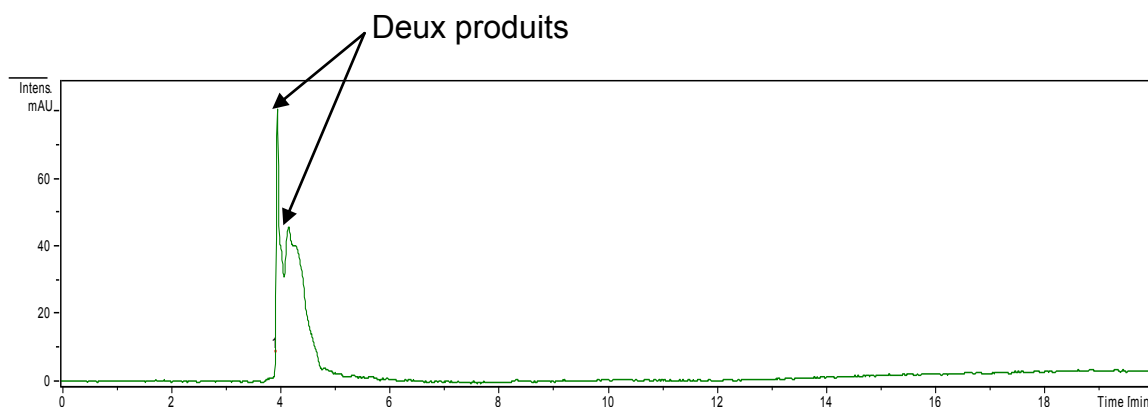


Figure 5.11 a : chromatogramme du biosurfactant produit par la souche 7G.

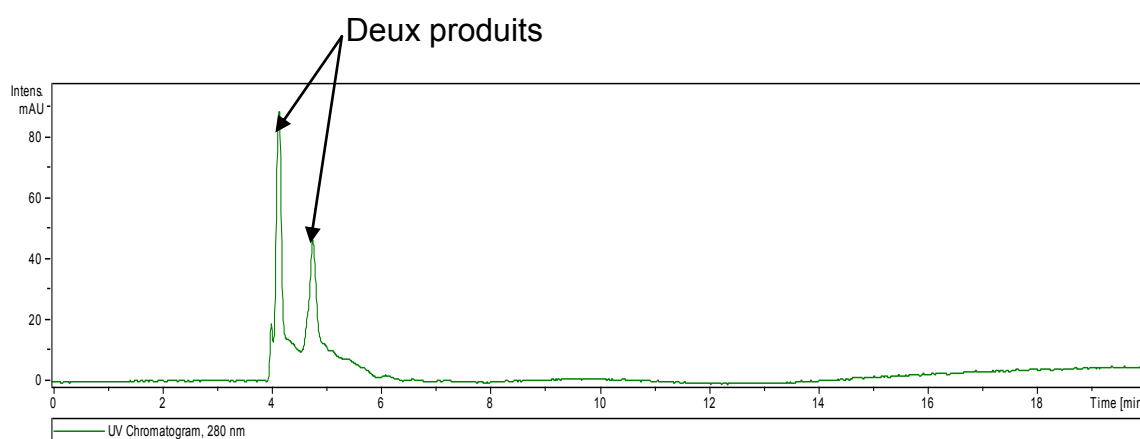


Figure 5.11 b : chromatogramme du biosurfactant produit par la souche 1C.

D'après les chromatogrammes obtenus (Figure 5.11 a et b), les biosurfactants produits par les souches bactériennes 7G et 1C constituent un mélange de deux biosurfactants et en ce basant sur les analyses par FTIR, et les tests Rhamnose, une forte probabilité qu'ils soient des rhamnolipides.

D'autres travaux ont montré que le produit obtenu est un mélange de rhamnolipides synthétisés par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* [288].

➤ Analyse par CL-SM (LC-MS)

L'analyse par LC-MS du biosurfactant 1C (Figure 5.12 a) montre deux pics présentant la même masse moléculaire de 328 et modèle de fragmentation à m/z de 328,9, 312,8, 250,8, 207,8. Les spectres de LC-MS du biosurfactant 7G (Figure 5.12b) montre deux pics présentant les modèles de fragmentation m/z de 144,8, 127,9, 99,9, 85,8, 72 et 57,1 pour les pics 1 et 336,5, 318,4, 300,5 pour le pic 2.

Cette analyse devrait être confirmée par la RMN afin de déterminer les structures exactes des biosurfactants.

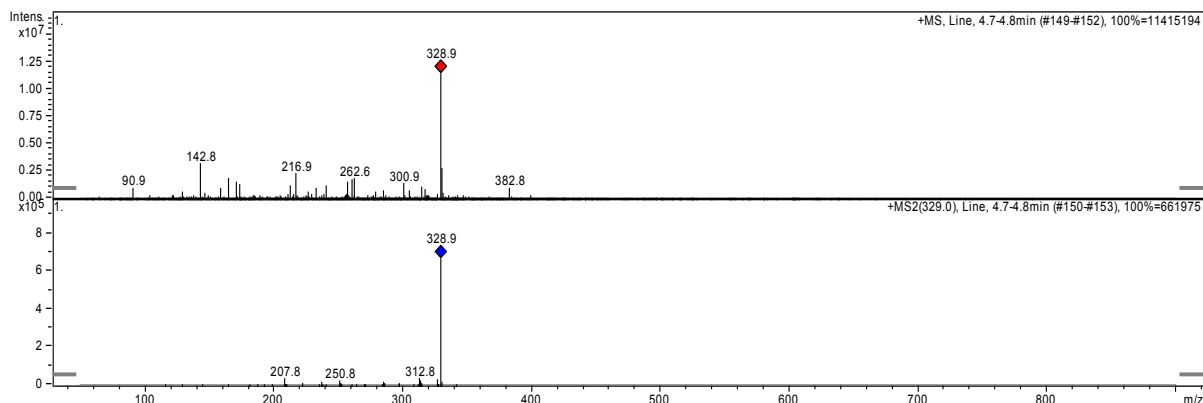


Figure 5.12 a : Analyse par LC-MS du biosurfactant produit par la souche 1C.

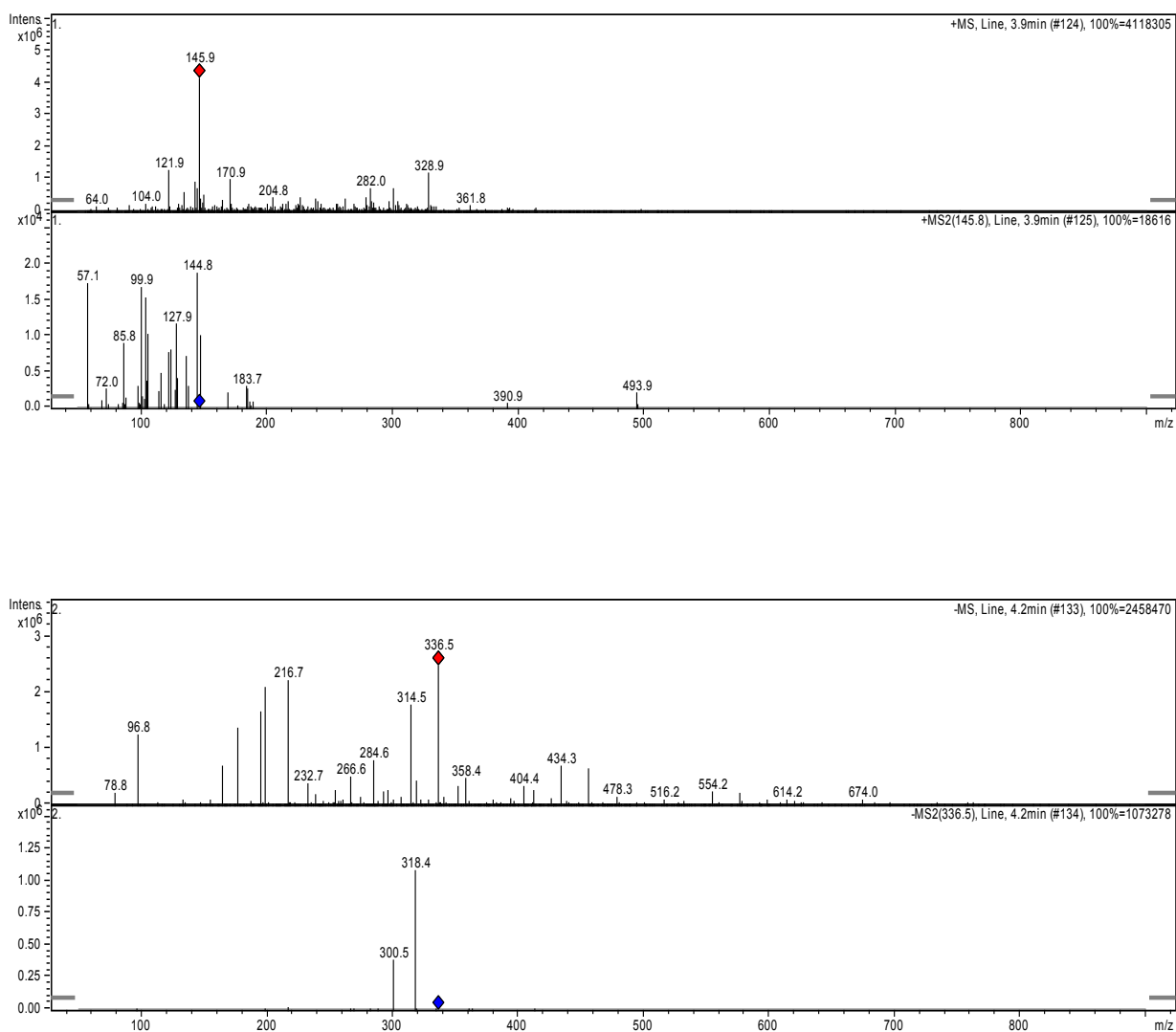


Figure 5.12 b : Analyse par LC-MS du biosurfactant produit par la souche 7G.

La caractérisation structurale nous a permis d'identifier préliminairement nos biosurfactants. Pour le biosurfactant produit à partir de la souche 7G, c'est un glycolipide, mais il manque de faire la RMN pour avoir une structure finale.

Le biosurfactant produit par la souche 1C, est aussi un glycolipide ayant comme masse de 328 (fragmentation: 328/312/250/207),

- a) 328 à 312, la libération d'un oxygène (16)
- b) 312 à 250, la libération d'une molécule de H₂O (18) avec des liaisons CH₃-CH₂-CH₃ (44)
- c) 250 à 207, une libération de CH₂-CH₂-CH₃

La structure proposée est indiquée dans la figure suivante :

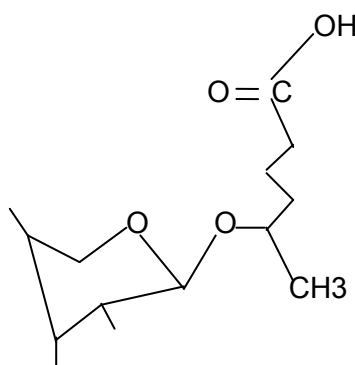


Figure 5.13 : Structure proposée du biosurfactant 1C

C'est une structure proposée et que des travaux de purification complémentaires et des analyses par RMN seront envisagées pour déterminer la structure exacte.

5.4. Identification génotypique des souches performantes

Le séquençage de l'ADN correspondant à l'ARN ribosomal 16S de deux isolats 1C et 7G en utilisant la base de données Genbank (BLAST Genbank) sous les numéros d'adhésion JF 293081 et JF 293080, respectivement nous a permis d'affiler la souche 1C étroitement lié à l'espèce *Ochrobactrum intermedium*, avec un pourcentage d'homologie de 99,2%, et l'isolat 7G était lié à l'espèce *Brevibacterium lutescens*, avec un pourcentage de similarité de 99,8% (figure

5.14). Plusieurs souches telles que *Brevibacterium* et *Ochrobactrum* ont été isolées de la microflore du sol et dans les milieux hydriques [289].

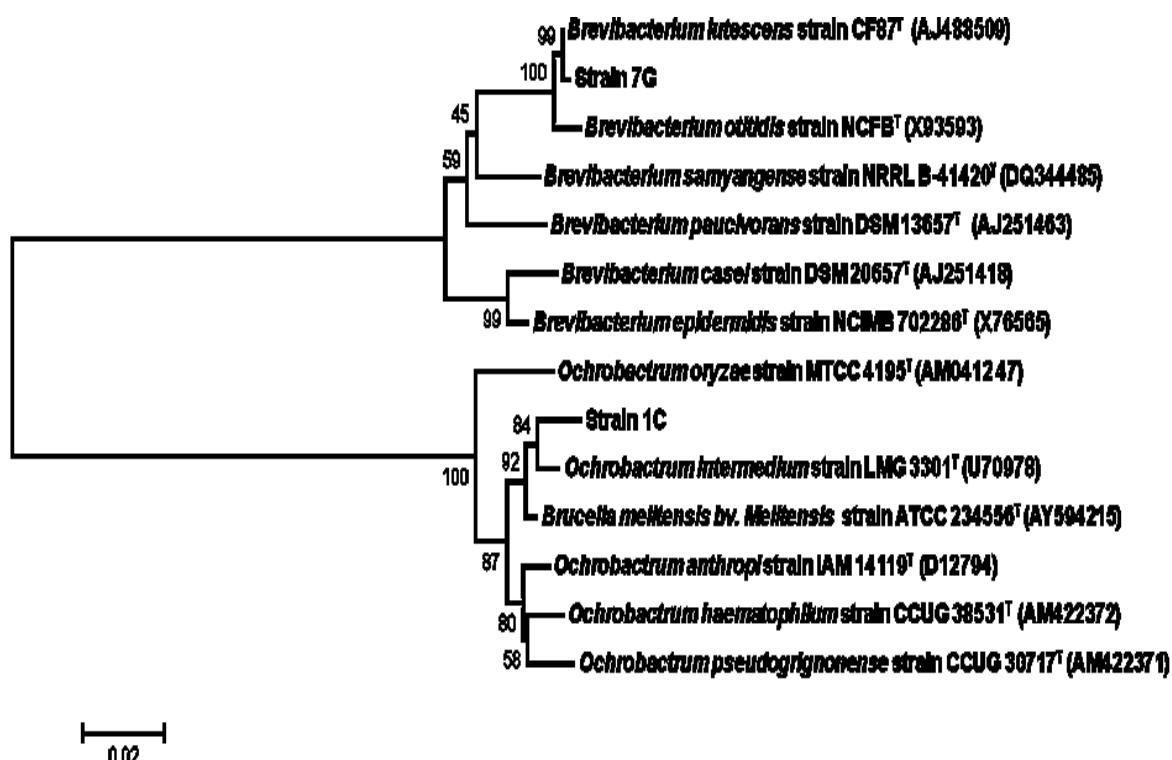


Figure 5.14 : Positions phylogénétiques des souches isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures. La barre représente deux substitutions nucléotidiques par 100 nucléotides.

5.5. Applications environnementales

5.5.1 Solubilisation des HAP

D'après les résultats obtenus (Figure 5.15 a et b), nous avons remarqué que la concentration du naphthalène et du phénanthrène a augmenté après l'ajout du biosurfactant. Alors les biosurfactants produits sont aptes à solubiliser le naphthalène et le phénanthrène, avec un taux de solubilisation du naphthalène plus grand que celui du phénanthrène.

La solubilité décroît avec l'augmentation du nombre de cycle aromatique. LI et CHEN (2002) [149] ont prouvé que des surfactants chimiques (Triton x-100, Tween 20 et Tween 80) et un biosurfactant non ionique (Tergitol) ont solubilisé le phénanthrène. WONG et *al.* (2010) [290] ont produit un biosurfactant par

Acinetobacter calcoaceticus BU03, qui a solubilisé le phénanthrène. De même, la solubilisation du naphthalène en utilisant des surfactants chimiques (TX-100, CTAB) a été prouvée par RAO (2009) [292], et en utilisant un biosurfactant produit par *Pseudomonas fluorescens* par ABOUSEOUD et al. (2010) [292].

Par ailleurs, plusieurs recherches sur la solubilité des hydrocarbures aromatiques par les biosurfactants ont été réalisées [293]. Les biosurfactants produits par *Pseudomonas* sp. sont capables de solubiliser plus le naphthalène à un pH neutre, que le SDS et le Triton [88].

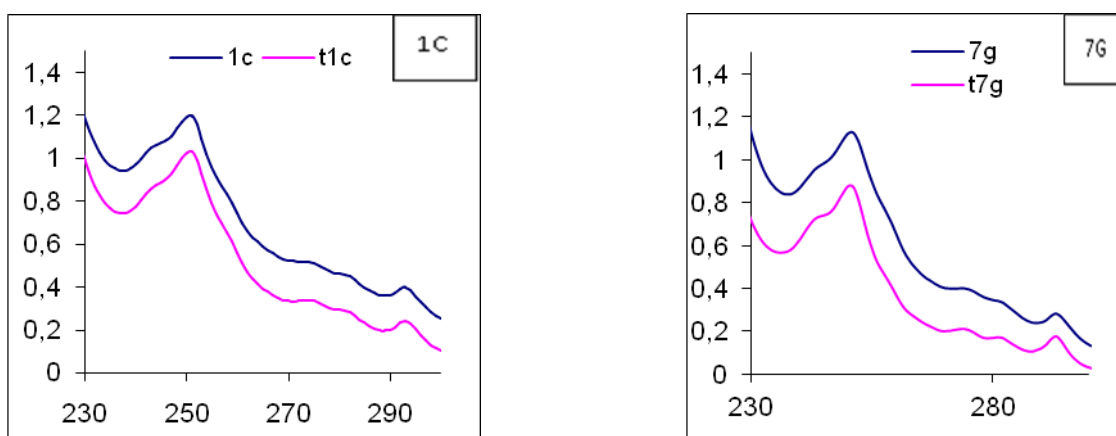


Figure 5.15 a: Solubilisation du phénanthrène par les biosurfactants produits

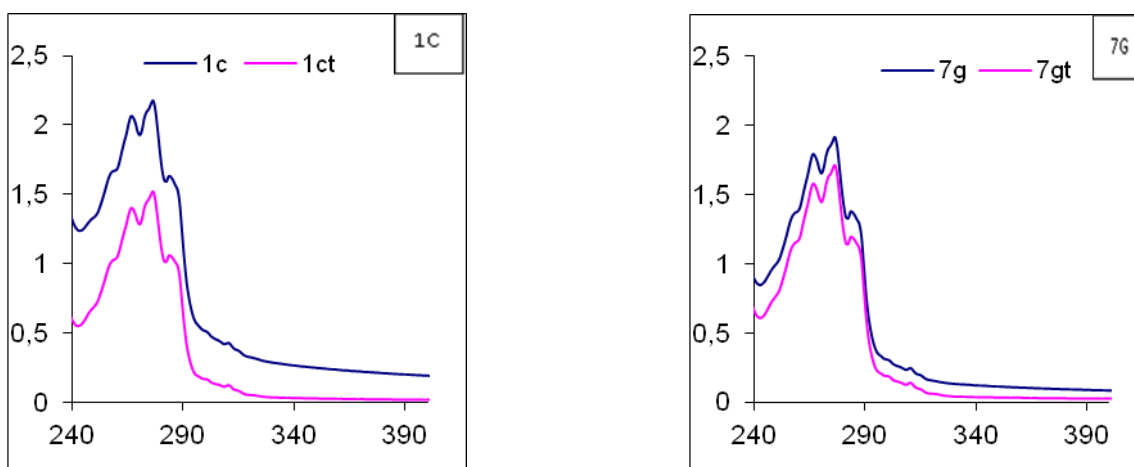


Figure 5.15 b: Solubilisation du naphthalène par les biosurfactants produits

1ct et 7gt, étants les témoins (eau+hydrocarbure)

Influence de la concentration du biosurfactant sur la solubilisation des HAP :

En faisant varier les concentrations en dessus et en dessous de la CMC des deux biosurfactants, nous avons obtenu les résultats illustrés dans les tableaux 5.5a et b.

Tableau 5.5a : Solubilité de naphtalène en fonction de la concentration des biosurfactants.

Naphtalène	eau	1C (0.75g/l)	1C (1.5g/l)	1C (3g/l)	7G (1g/l)	7G (2g/l)	7G (4g/l)
DO	0.550	0.923	2.250	1.100	1.165	1.954	1.570

Tableau 5.5b : Solubilité du phénanthrène en fonction de la concentration des biosurfactants.

Phénanthrène	eau	1C (0.75g/l)	1C (1.5g/l)	1C (3g/l)	7G (1g/l)	7G (2g/l)	7G (4g/l)
DO	0.350	0.870	1.250	0.962	0.571	1.200	0.799

D'après l'examen des résultats de ces deux tableaux, nous remarquons qu'une augmentation de la concentration de naphtalène et de phénanthrène solubilisée par les biosurfactants utilisés à une concentration de 0.75 mg/ml à 1.5 mg/ml (1C) et de 1 mg/ml à 2 mg/ml (7G). Mais au-delà des dernières concentrations, la quantité du naphtalène et du phénanthrène solubilisée est moins importante, cela peut être dû à la formation de complexes entre les molécules du biosurfactant au delà de la CMC, ce qui influe sur la quantité solubilisée de l'hydrocarbure.

5.5.2 Remobilisation du pétrole

La confirmation de la dégradation des hydrocarbures présents dans le pétrole brut a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (Figure 5.16 a, b et C). A la concentration micellaire critique, la quantité du pétrole présente est extraite par le dichlorométhane. Le spectre de CG-SM (GC-MS), montre que les deux biosurfactants ont montré une efficacité de dégradation sur la plupart des hydrocarbures aliphatiques présents dans le pétrole brut.

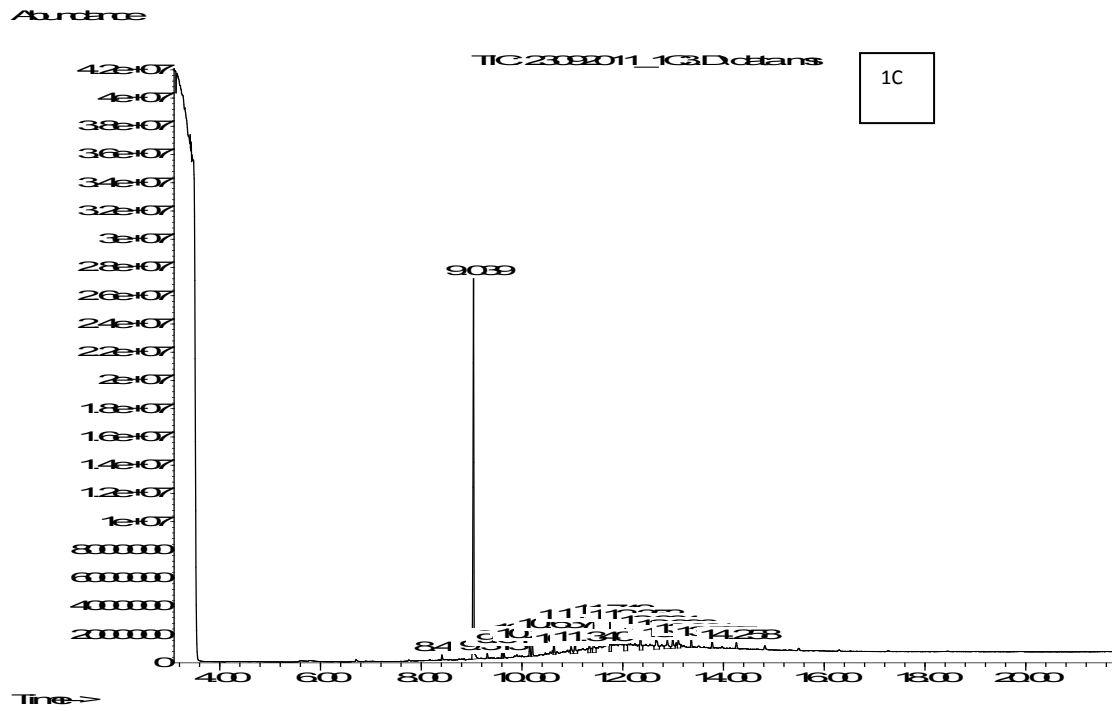


Figure 5.16 a: Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le biosurfactant produit par la souche 1C.

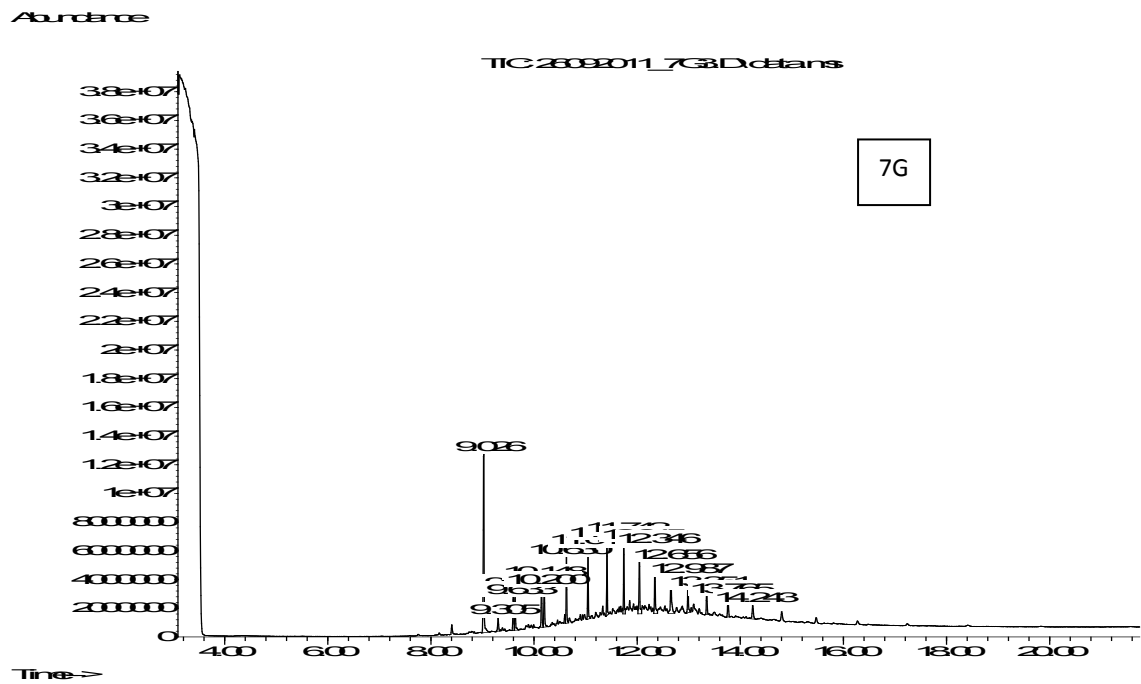


Figure 5.16 b: Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le biosurfactant produit par la souche 7G.

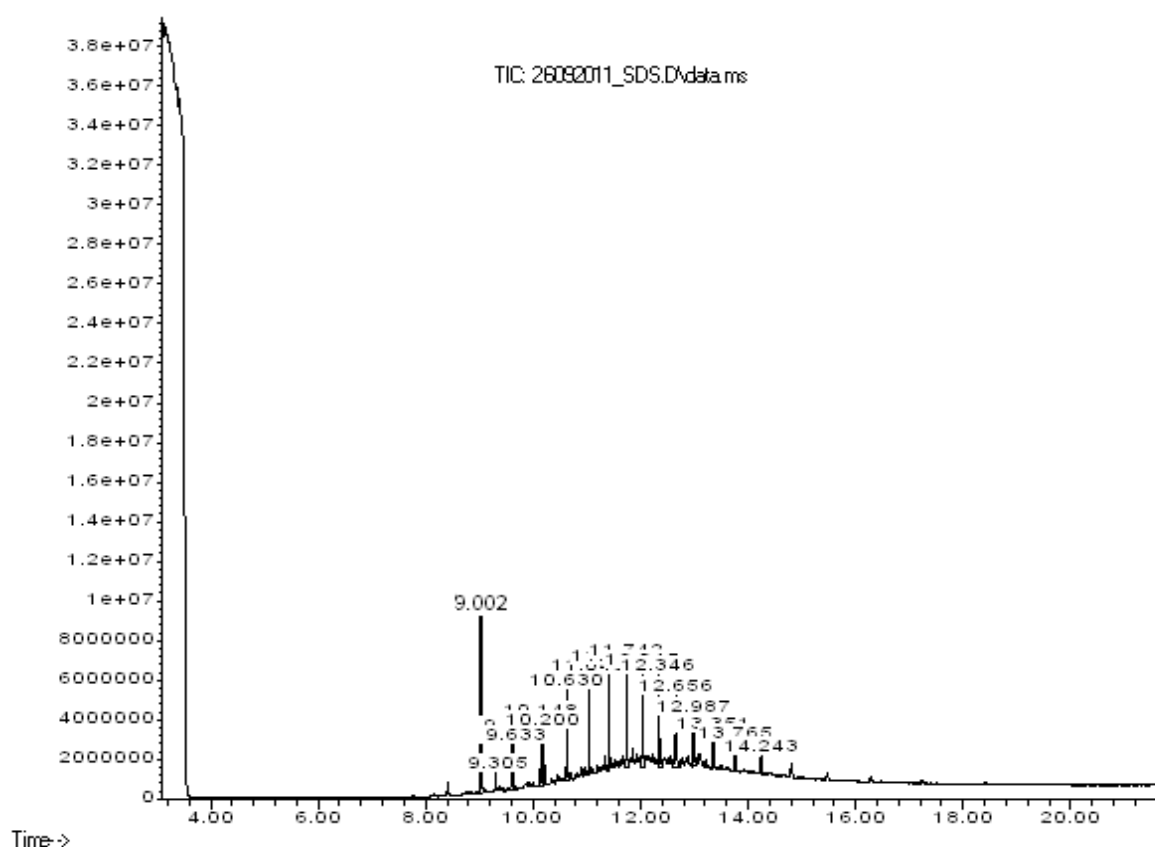


Figure 5.16 c : Analyse GC-MS de dégradation du pétrole brut par le surfactant SDS.

Le spectre obtenu est comparé par calcul des aires des pics obtenus avec celui d'un témoin chimique (SDS).

La figure 5.17 indique le pourcentage de solubilisation des différents alcanes du pétrole. Les substances solubilisantes sont les tensioactifs produits et un surfactant chimique.

Nous avons remarqué que la plupart des hydrocarbures saturés ont été solubilisés par les biosurfactants et par le SDS.

La différence de pourcentage de dégradation du pétrole entre les surfactants biologiques et chimiques est montrée sur la figure 5.18.

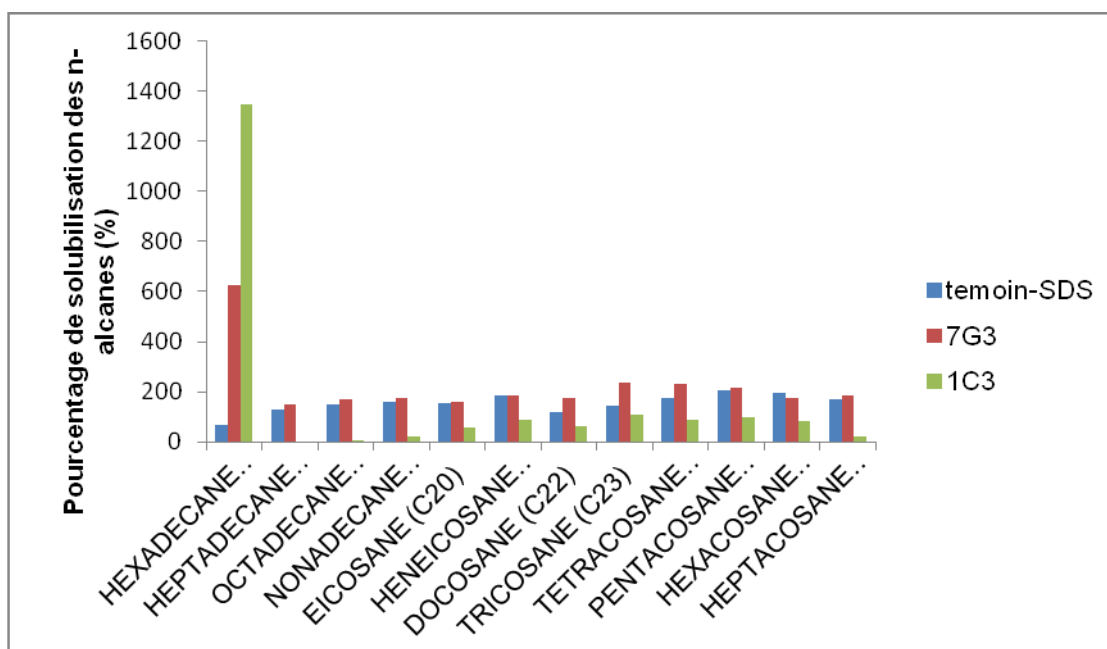


Figure 5.17: solubilisation des n-alcanes

Nous observons qu'il y a une nette baisse de dégradation des hydrocarbures aliphatiques en cas d'utilisation du SDS par rapport à l'utilisation des biosurfactants produits par les souches bactériennes (7G et 1C).

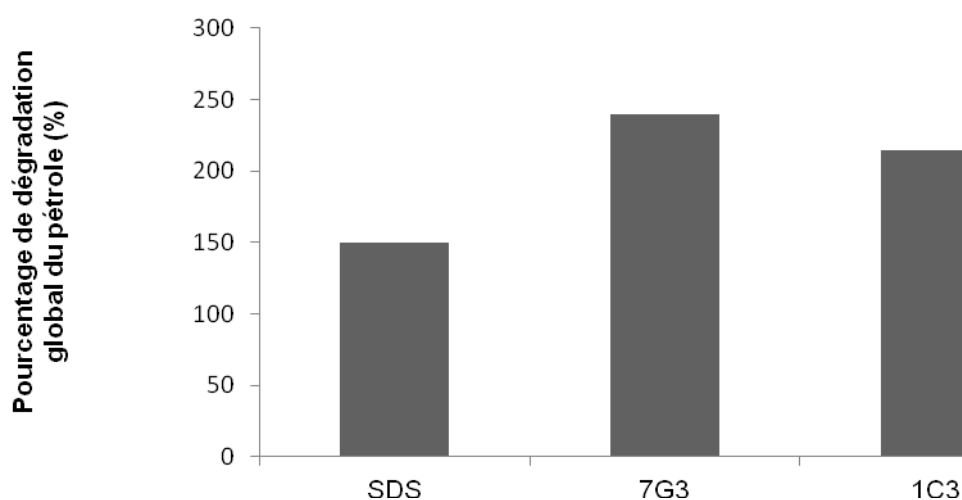


Figure 5.18: dégradation globale du pétrole brut par les deux biosurfactants et SDS.

Le diagramme illustré sur la figure 5.18 donne le taux de dégradation globale du pétrole brut, ainsi on conclut que les surfactants biologiques dégradent plus les hydrocarbures que celles chimiques (SDS). ANAND et al. (2008) [294] ont trouvé que l'activité émulsifiante sur les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, par

les biosurfactants produits par la souche *Pseudoxanthomonas sp.* PNK-04 est plus importante que dans le cas d'utilisation de tensioactif chimique.

Ceci a été confirmé par Hua et *al.* (2003) [285]. Ils ont démontré que le biosurfactant BS-UC, produit par la souche *Candida antarctica* à un effet positif sur la biodégradation des *n*-alcane.

De même, Eddoueouda et *al.* (2011) [296], ont confirmé la biodégradation des hydrocarbures par un biosurfactant produit à partir de *Staphylococcus ssp.* isolé d'un sol contaminé par les hydrocarbures.

La dégradation de l'hexadécane par les tensioactifs biologiques a été étudiée en analysant par GC-MS les mélanges « biosurfactant + pétrole brut », les résultats obtenus confirment qu'il y a une nette hausse de concentration en hydrocarbures aliphatiques surtout l'hexadécane (C16), dont les taux de dégradation, sont montrés sur les figures 5.19 a et b

En plus, la variation de concentration en tensioactif a influé directement sur le taux de dégradation de cet hydrocarbure. Pour le biosurfactant produit par la souche 1C, et celui produit par la souche 7G, la concentration optimale de dégradation était la CMC.

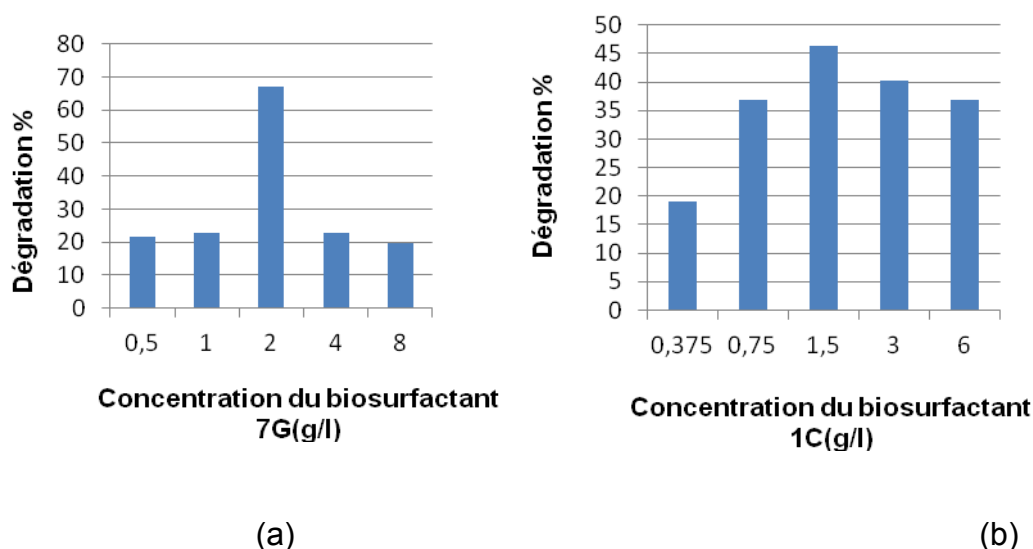


Figure 5.19 (a, b) : Taux de dégradation de l'hexadécane par les biosurfactants

En conclusion, de même que pour la solubilisation des hydrocarbures aromatique, la CMC est la concentration optimale du biosurfactant pour la solubilisation des hydrocarbures aliphatiques. Cela a été confirmé par PENNEL (1993) [236], car il a prouvé que, généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effets sur la plupart des contaminants hydrophobes. Par ailleurs, WEST et HARWELL (1992) [94], ont indiqué que si la concentration en tensioactif est trop élevée, il peut précipiter et provoquer des colmatages de pores du sol et ainsi faire échouer la remédiation.

KEVIN et *al.* (2008) [297] ont constaté qu'il y a plus d'efficacité de biosurfactant à dégrader l'hexadécane que les surfactants chimiques : le SDS et le Triton-100.

Les différentes valeurs des résultats obtenus sont données en appendice B9.

Discussion générale des résultats :

L'isolement adaptatif et sélectif des souches bactériennes à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures a révélé une diversité de genres et d'espèces dont les *Pseudomonas* sont dominants. Le milieu sélectif « King B » a été utilisé pour diminuer le nombre de souches bactériennes présentes dans les échantillons et ceci pour guider l'isolement vers l'obtention des souches de *Pseudomonas* et souches apparentées.

Le genre *Pseudomonas* est le mieux étudié et caractérisé en tant que producteur de biosurfactants de tout le groupe ; il est très répandu dans la nature (adaptation nutritionnelle), plusieurs espèces résident dans le sol, dans l'eau et sur des surfaces comme la peau humaine. La plupart peuvent croître sur plus de 50 substrats différents et certain peuvent utiliser plus de 100 composés organiques différents. Plusieurs souches bactériennes appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* ont été isolées du sol contaminé par les hydrocarbures : MNIF et *al.* (2011) [298], ont isolé *Pseudomonas stutzeri*, et *aeruginosa*, de même PRIETO et *al.* (2008) [265] ont aussi isolé *Pseudomonas aeruginosa*.

Le criblage des souches à fort potentiel de production de biosurfactants a permis la mise en culture de deux espèces rares appartiennent aux genres *Ochrobactrum* et *Brevibacterium*.

RANJANA et DASGUPTA (2008) [266], ont produit des tensioactifs biologiques à partir *Ochrobactrum anthropi*. De même SEGHAL KIRAN et *al.* (2010a) [266] ainsi que CIRIGLIANO et CARMAN (1985) [111], ont pu synthétiser des biotensioactifs en utilisant comme souche bactérienne; *Brevibacterium* sp.

Les conditions de production de biosurfactants ont fait l'objet de plusieurs travaux, tels que l'optimisation de la source de carbone. Mnif et *al.* (2009) [58] ont trouvé que l'hexadécane a été une bonne source de carbone dans des conditions naturelles. La même observation a été faite par Snehal et *al.* (2008) [268] avec *Rhodococcus* sp. d'où leur capacité à croître sur l'hexadécane pour produire du biosurfactant. De même, le glucose était la meilleure source de carbone pour produire un biosurfactant à partir de la souche bactérienne *Arthrobacter* AK19, Abouseoud et *al.* (2008) [82] ont produit un biosurfactant à partir de *Pseudomonas fluorescens*, en utilisant l'huile d'olive comme seule source de carbone.

Ainsi, les conditions physico-chimiques, ont été également étudiées et optimisées par plusieurs chercheurs tel que: Makkar et Cameotra (2002) [276] qui ont prouvé une thermo- stabilité des biosurfactants produits.

Shavandi et *al.* (2011) [279] ont prouvé que la capacité d'émulsification a été très sensible aux changements de pH. Prieto et *al.* (2008) [265] ont signalé que le biosurfactant produit par une souche de *P. aeruginosa* forme des émulsions stables à de faibles concentrations de NaCl (5 g.l⁻¹). Toutefois, il a été capable de maintenir environ 80% de son activité initiale jusqu'à un niveau de salinité de 100 g.l⁻¹.

Les méthodes de caractérisation de biosurfactants, universellement adoptées, sont basées essentiellement sur les techniques spectrales. Seghal-Kiran et *al.* (2010a) [267], ont caractérisé un glycolipide produit par *Brevibacterium casei* MSA19 isolé d'un milieu marin.

Les caractéristiques des biosurfactants obtenus sont comparables à ceux produits par des souches bactériennes isolées à travers le monde. Les biosurfactants produits par Eddoueouda et *al.* (2011) [296] à partir de *Staphylococcus* sp isolé du sol contaminé par les hydrocarbures étaient stables thermiquement et chimiquement. En plus, des tensioactifs du type glycolipide, ont été produits par Seghal-Kiran et *al.* (2010c) [285] à partir de *Brevibacterium casei*.

L'intérêt environnemental et industriel de ces deux biosurfactants, obtenus localement, est certain. Le pouvoir moussant, la solubilisation des HAP (naphtalène et phénanthrène) et la remobilisation des hydrocarbures (sol contaminés par le pétrole brut) sont des facteurs très favorables permettant l'utilisation de ces produits dans le domaine environnemental et industriel.

CONCLUSION GENERALE

Notre objectif a consisté à étudier la composition microbiologique d'une niche écologique très particulière de l'Algérie (sol anciennement contaminé par les hydrocarbures de la région de Hassi-Messaoud) afin de sélectionner des souches bactériennes à fort potentiel de production de biosurfactants. En finalité de ce présent travail et par l'emploi de ces biomolécules, nous envisagerons une application environnementale dans la remobilisation du pétrole brut et la solubilisation du naphthalène et du phénanthrène comme modèles des HAP les plus toxiques.

Quatorze souches bactériennes ont été isolées et criblées en tant que productrices de biosurfactants. Elles sont rattachées aux genres suivants : *Pseudomonas* (7 isolats), *Bordetella* (2 isolats), *Ochrobacter* (1 isolat), *Bacillus* (1 isolat), *Pasteurella* (1 isolat), *Ochrobactrum* (1 isolat) et *Brevibacterium* (1 isolat). Parmi lesquelles deux souches « dites performantes » ayant un fort potentiel de production ont été identifiées (par séquençage du gène d'ADN codant pour l'ARNr 16S) : *Ochrobactrum* sp. 1C et *Brevibacterium* sp. 7G, étroitement liées à l'espèce *Ochrobactrum intermedium* avec un pourcentage d'homologie de 99,2% et à l'espèce *Brevibacterium lutescens* avec un pourcentage de similarité de 99,8%, respectivement.

Le procédé de production des biosurfactants en batch, quantifiée par deux grandeurs en mesurant la tension superficielle et l'indice d'émulsification, a révélé une diminution de tension de surface aux limites minimales de 31.2mN/m et 31 mN/m par les deux souches performantes 1C et 7G, respectivement. Les sources

de carbone suivantes : Glucose, huile d'olive, hexadécane et le pétrole brut ont donné une production appréciable d'où l'optimal était avec l'hexadécane (rendement : 1,292 g et 1,616 g de biosurfactant / g d'hexadécane par 1C et 7G, respectivement).

Les principaux résultats concernant les caractéristiques des deux biosurfactants produits sont :

- ✓ une bonne séparation et extraction avec l'acétone à 4 °C,
- les deux biosurfactants ont un pouvoir moussant et émulsifiant ainsi qu'une activité inhibitrice contre les espèces *S. aureus* ATCC9144et *P. aeruginosa* ATCC1544,
- une stabilité thermique sur une large gamme de température (20 à 100 °C), les deux biosurfactants produits restent efficaces en présence d'ions Na^+ (100g. l^{-1}) et pour tout l'intervalle du pH avec un changement remarquable du pouvoir émulsifiant justifié par l'influence du milieu sur l'efficacité du biosurfactant.
- la CMC était : 2 et 1.5 g l^{-1} pour les deux biosurfactants produits par les souches 7G et 1C, respectivement,
- le test rhamnose, l'IRTF (FTIR), la CLHP (HPLC) et la CL-SM (LC-MS) prouvent que les deux biosurfactants font partis des glycolipides.

En vue d'une application environnementale, les deux biomolécules étaient aptes à solubiliser le naphtalène et le phénanthrène, avec un taux de solubilisation meilleur du naphtalène plus grand que celui du phénanthrène. En plus, la CMC est la concentration optimale du biosurfactant pour la solubilisation de ces HAP.

Des essais de remobilisation de pétrole brut ont aboutit à une efficacité remarquable de ces biosurfactants à solubiliser plusieurs types de composés aliphatiques avec 200-250%, bien meilleure que celle du tensioactif chimique « SDS » (150 %).

Le travail présenté ici a évidemment une durée limitée et est loin de venir à bout des problèmes envisagés. Sa prolongation devrait se porter sur les points suivants :

- L'identification géotypique des souches restantes qui pourrait enrichir nos connaissances sur d'autres espèces à fort potentiel de production de biosurfactants.
- L'utilisation d'autres méthodes spectrales telle que « la RMN » pour une identification précise des tensioactifs produits.
- La combinaison des techniques d'immobilisation de biosurfactants pour mieux maîtriser l'application environnementale et industrielle.

APPENDICE

A. LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARN : Acide ribonucleique

ARN_r : Acide ribonucleique ribosomique

ATP : Adénosine triphosphate

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BTEX: benzene, toluene, ethylbenzene et xylene

BNR : Bactéries nitratoréductrices

BSR : Bactéries sulfite-réductrices

BTR : Bactéries thiosulfate-réductrices

CE50 : Concentration efficace pour 50% de population

CMC : Concentration micellaire critique

COT : Teneur en carbone organique total

COV : Composés organiques volatils

CTAB: Cetyl Trimethylammonium Bromide

CTP : Cytidine triphosphate

DCO : demande chimique en oxygène

DO : Densité optique

DGGE : Denaturing Gradient Gel electrophoresis

E₂₄ : Indice d'émulsification

EPA: Environmental Protection Agency

EPA-TSCA : Environmental Protection Agency-Toxic Substances Control Act
FTIR: Infra rouge avec transformé de fourrier
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse liée à la spectométrie de masse
GTP : Guanosine triphosphate
HAM: Les hydrocarbures aromatiques monocycliques
HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques
HPC : hydrocarbure polycyclique
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
HSDB : Hazardous Substances Data Bank
IARC : Centre international de recherche sur le cancer
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
LC50 : Concentration létale de 50% de population
LC-MS : Chromatographie en phase liquide liée à la spectométrie de masse
LCPE : Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement
MM : milieu de culture minéral
N_T : Azote total
PCR : Polymerase Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RPAL: Risk & Policy Analysis Limited
RT-PCR : Real Time PCR (temps réel de la PCR)
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR (transcriptase inverse de la PCR)
SDS: Sulfate Dodecyl Sodium
SSCP : Single Strand Confirmation Polymorphism
T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TPH : Hydrocarbures pétroliers totaux
TW-80 : Tween 80
TX-100 : Triton X-100
UV : Ultraviolet
 γ : Tension de surface

B : Quelques méthodes et résultats

B1 : Le dosage d'hydrocarbures totaux du sol

➤ Extraction

- Fixer les cartouches aux adaptateurs,
- Peser les échantillons dans les cartouches,
- Placer une boule de coton hydrophile au dessus de l'échantillon et mettre en place les cartouches dans l'unité d'extraction,
- Mettre sur position Boiling et les cartouches sont immergées dans le solvant CCl_4 à 160 °C (20-30 min).

a) Récupération du solvant

Après rinçage des échantillons avec CCl_4 , les extraits sont récupérés puis placés sur Florisil et Na_2SO_4 .

b) Mesure de la concentration en hydrocarbures

L'extrait est introduit dans une cuve en quartz de 1 cm d'épaisseur, puis analysé par FTIR. Le logiciel CxHx traitant les analyses donne directement la concentration de l'hydrocarbure recherché en mg/kg.

B2 : La demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène a été mesurée selon des méthodes classiques souvent employées (Knechtel, 1978, Bremner, 1965), d'après les étapes suivantes :

- Stériliser 3 Erlenmeyer propres (120°C, 20 min) pour les 3 échantillons : 1, 2 et 3
- Mettre 5 g du sol pesé à l'aide d'une balance électronique (Itten Noarrv 70) dans un Erlenmeyer contenant 45 ml d'eau stérile physiologique (1l d'eau osmosée + 0.9 g de NaCl, autoclavage à 120°C pendant 20 min): 3 échantillons du sol correspondent à 3 Erlenmeyer
- Agiter dans un shaker pendant 2h à la température ambiante (les 3 Erlenmeyer)
- Laisser décanter pendant 30 à 45 min
- Prendre le surnageant pour l'utilisation ultérieure

Pour la mesure de la Demande chimique en oxygène (DCO), on divise le surnageant en deux parties :

- une partie filtrée par un papier filtre pour la mesure de la DCO soluble et l'autre partie non filtrée donne la DCO totale
- Faire dilution 1/10 pour la partie non filtrée
- Préparer 6 tubes de digestion pour les échantillons
- Introduire 1,5 ml de solution de digestion dans un tube de digestion. Ajouter 2,5 ml d'échantillon (le surnageant), agiter. Ajouter 3,5 ml de solution catalytique. Fermer les tubes et bien agiter (par vortex) sans verser les tubes
- Préparer un blanc (B) en remplaçant le volume d'échantillon (2,5 ml) par l'eau distillée

- Placer les tubes (plus le blanc) dans un réacteur et chauffer à 150°C pendant 2 h. Laisser refroidir (mettre dans l'eau sans les ouvrir)
- Préparer un titre (témoin T) même façon que le blanc mais sans chauffage
- Transférer le contenu des tubes dans des Erlenmeyer de 100 ml. Rincer les tubes et ramener le volume final à 25 ml
- Ajouter quelques gouttes (2 gouttes) de ferroïne (indicateur de virage), agiter
- Titrer avec sel de Mohr (N/40) jusqu'à ce que la couleur bleu vire au rouge brique
- Noter le volume versé de sel de Mohr : le volume du blanc V_B et le volume du titre V_T

Calcul :

$$\text{DCO (g DCO /l)} = (V_B - E_{\text{échantillon}}) \times F_t \times 0,2 \times 1000 / \text{prise} \dots\dots (\text{Eq B2})$$

Avec :

Prise = 2,5 ml d'échantillon

$$F_t = 15/V_T$$

***Solution de digestion**

Dissoudre 12.25 g de bichromate de potassium (séché à 140°C) et 33.3 g de sulfate de mercure dans 500 ml d'eau distillée. A cette solution, ajouter 167 ml d'acide sulfurique concentré, doucement et tout en refroidissant. Compléter à un litre dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée et bien mélanger

*** Solution catalytique**

Dissoudre 22 g de sulfate d'argent dans 2,5 l d'acide sulfurique. Pour un bon mélange, laisser toute une nuit.

***Solution de sel de Mohr**

Dissoudre 9.8 g de sulfate de fer et d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée et 25 ml d'acide sulfurique. Transférer dans une fiole et compléter jusqu'à 1 litre d'eau distillée

***Solution d'indicateur de ferroïne**

Dissoudre 0.98 g de sulfate de fer ($\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) dans 80 ml d'eau distillée. Ajouter 1.485 g de 1.1phénanthroline monohydrate. Agiter jusqu'à une dissolution complète. Diluer à 100 ml avec d'eau distillée.

B3 : Composition de différents milieux de culture

- ✓ La composition d'un litre du milieu de culture de base (MB) est la suivante :

0.5 g KH_2PO_4 ; 0.4 g NH_4Cl ; 0.33 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.04 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; (0 à 1) g extrait de levure.

- La composition de la solution d'oligo-éléments (Pfennig et Widdel, 1981) est la suivante :

6.7 ml HCl (35%); 1500 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 190 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 70 mg ZnCl_2 ; 6 mg H_3BO_3 ; 36 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 2 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1000 ml H_2O . Le pH du milieu est ensuite ajusté à 7 avec une solution de NaOH 1N.

- Le milieu solide est le MM contenant 18 g d'agar pour 1 litre de milieu. Après stérilisation par autoclavage, il est refroidi jusqu'à environ 50 °C et écoulé dans des boîtes de Pétri disposées sous une hotte à flux laminaire (FluFrance, France).
- Le milieu de culture riche utilisé est le milieu Luria-Bertani (LB) dont la composition par litre est la suivante: 5 g extrait de levure, 10 g tryptone et 10 g NaCl .
- La composition du King B : 20 g/l Peptone; 10 ml/l Glycerol; 1.5 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1.5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 18 g/l Agar, avec un pH=7.

B4 : Tests biochimiques des isolats

i. Test d'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : l'aphénylène diamine oxydase ou le cytochrome oxydase ; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction; des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine.

Déposer sur une lame porte objet propre, un disque «OX »et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile ; prélever une partie de la colonie à l'étude à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

Une coloration violet foncé (figure B4.1) apparaît immédiatement sur le disque en quelques secondes puis vire au noire : test oxydase positif (+) (Marchal et Bourdon, 1982).



Aspect du test négatif

Aspect du test positif

Figure B4.1: Résultat positif et négatif du test oxydase

a) Test catalase

Sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on ajoute l'inoculum bactérien d'une culture jeune. Si on remarque l'apparition de bulles (dégagement gazeux de dioxygène), le test est qualifié de catalase+. S'il n'y a pas de bulles, le test est catalase-. Selon la réaction suivante :



b) Coloration de Gram

Une goutte de culture bactérienne est déposée sur une lame propre et fixée par passage dans la flamme. Par suite, la lame est rincée avec du cristal violet pendant une minute. Une étape de lavage avec de l'eau de robinet est nécessaire avant l'ajout de la solution d'iode. L'action de l'iode dure une minute et elle est suivie par une étape de décoloration par rinçage de la lame avec une solution de décoloration "decolorizer counterstain 3 step GRAM SAFRANINS" pendant 20 à 50 secondes. La lame est ensuite séchée à l'air sec avant l'observation au microscope. Si la coloration obtenue est bleue violette, le test est qualifié de Gram +, si la coloration obtenue est rose, il s'agit d'une bactérie Gram -.

Les bactéries qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram+) (Perry, 2004). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (Marchal et Bourdon, 1982).

B5 : Lecture de galeries API 20E

Inoculation d'une galerie API 20 E : A partir d'une culture pure de 18 à 24h, faire une suspension bactérienne ayant une concentration de (ou 10^8) germe/ml dans 10 ml d'eau physiologiques.

- Bien mélanger la suspension bactérienne au vortex 5-10 secondes.
- Déposer soigneusement 150 µl de la suspension dans chaque cupule de la galerie.
- Ajouter de nouveau 150 µl de la suspension aux cupules CIT, VIP et GEL (total 300 µl) par puits.
- Après l'inoculation recouvrir les cupules ADH, LDC, ODC, H₂S, URE avec d'huile de vaseline.
- Ajouter de l'eau distillée dans les supports y déposer la galerie et mettre le couvercle.
- Incuber à 37 °C pendant 18 à 24h.

Les recherches spécifiques de cette galerie concernent les tests suivants : ONPG, ODC, LDC, ADH et l'uréase.

- Lecture de galerie :

- Faire la lecture des galeries sous une hotte chimique.
- Consigner les réactions sur une fiche de résultat.
- La lecture des galeries se fait généralement au bas de chaque cupule sauf CIT, IND.

Pour la cupule VP :

- ajouter 1 goutte d'hydroxyde de potassium (40%).
- ajouter 1 goutte d'alpha naphthol (6%)
- attendre 10 min
- Pendant ce temps, faire la lecture des autres cupules sauf TDA et IND en inscrivant la couleur et la réaction (+ ou -) sur une fiche de résultats.
- Lire la réaction de VP.
- GLU avant l'addition des résultats, observer s'il y a présence de bulles (+ ou -) qui indiquent une réduction du nitrate à l'état gazeux (N₂).
 - Ajouter 2 gouttes d'acide sulfanilique (0.8%).
 - Ajouter 2 gouttes de NN-dimethyl-alpha naphthylamine (0.05%)
 - attendre 2à3 min.

Pendant ce temps, faire les réactions TDA et IND.

- TDA ajouter 1 goutte de chlorure ferrique (10%), lire la réaction immédiatement.
- IND ajouter 1 goutte du réactif de Kovac lire la réaction immédiatement.
- Lire la réaction GLU. Si la réaction est négative ajouter de la poudre de zinc attendre 10 minutes et faire la lecture de cette dernière réaction (Larpent, 2000).

Donc l'identification est obtenue à partir d'un profil numérique à x chiffres, qui est toujours établie à partir de la fiche de relevés des résultats (tableau B5.1) suivant le même principe (sur la fiche du résultat, les testes sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2, 4 est indiquée pour chacun ; en additionnant à l'intérieure de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient sept chiffres qui constituent le profil numérique). L'identification est ensuite réalisée à partir d'une base de données :

à l'aide du catalogue analytique de la galerie en recherchant le profil numérique dans la liste de profils (Dellouass, 2007).

Tableau B5.1: Lecture de la galerie API 20E (Figarella et Leyral, 2006)

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte	Résultat-	Résultat+
ONPG	ONPG:ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe	transparent	jaune
<u>ADH</u> <u>LDC</u> <u>ODC</u>	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe	Jaune/orange jaune Jaune/orange	Rouge/rose Rouge/orange
<u>CIT</u>	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe	vert	bleu
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de Na	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe	transparent	noir
<u>URE</u>	Urée	Uréase	Rouge de phénol	Lecture directe	jaune	orange foncé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte ajouter une goutte de réactif Fe III	jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Tryptophane ou production d'indole		Lecture indirecte ajouter une goutte de réactif Kovacs	Transparent Ou jaune	orange ou rose
VP	Pyruvate de Na	Production d'acétoine 3-hydroxybutanone		Lecture indirecte (+ une goutte de VP1 et VP2)	Transparent	orange ou rose
<u>GEL</u>	Gelatine	Gelatinase	Particules de charbon	Lecture directe	Transparent	noir
GLU à ARA	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrat carboné (glucide)	BBT	Lecture directe	bleu	jaune
NO ₂ ⁻ /N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte (+1 goutte de NIT1 et NIT2 et Zinc)	jaune	orange

B6 : Lecture de galeries API 50CH

Ces substrats peuvent être métabolisés par plusieurs voies :

- * assimilation : se traduit par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.
- * oxydation : se traduit par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- * fermentation : se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

- **Inoculation de la galerie** : Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

Répartir environ 10 ml d'eau distillée.

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie.

Incuber les galeries à la température optimum de croissance des microorganismes étudiés.

- **Lecture de la galerie** :

Deux paramètres comptent pour la lecture des réactions observées :

- *l'intensité (croissance ou acidification)
- *la vitesse d'apparition

La lecture des galeries doit se faire :

- à des temps d'incubation définis (3h, 6h, 24h, 48h par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié (fermentation ou assimilation).

- de façon semi-quantitative : on donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 1, 2, 3 ou 4 sont données aux réactions intermédiaires (3, 4 et 5 sont considérées comme positives).
- les résultats sont notés sur les fiches de résultats comme indiqué dans l'exemple. Ils constituent le profil biochimique du microorganisme.

Tableau B6.1 : Composition de la galerie API 50 CH (Figarella et Leyral, 2006)

Bande 0-9 Tube/substrat	Bande 10-19 Tube/substrat	Bande 20-29 Tube/substrat	Bande 30-39 Tube/substrat	Bande 40-49 Tube/substrat
0 Témoin	10 GALactose	20 α -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcérol	11 GLUcose	21 α -Methyl-D-Glucoside	31 SACchrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MANnosE	23 AMYgladine	33 INUline	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SORbosE	24 ARButine	34 Melezitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCuline	35 RAFFinose	45 D ARAbitol
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicine	36 AMIdon	46 L ARAbitol
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcogène	47 GlucoNATE
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XYLitol	48 2-Keto-Gluconate
9 B Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENTIobiose	49 5-Keto-Gluconate

Parmi les galeries utilisées, on cite les API 50 CHB : pour l'identification des *Bacillus*, il est composé de Sulfate d'ammonium (2 g), extrait de levure (0.5 g), tryptone (1 g), rouge de phénol (0.18 g), base minérale (Cohen-Bazire, 10 ml), tampon phosphate (1000 ml) (Figarella et Leyral, 2006).

B7 : Lecture de galeries API CORYNE

Après incubation 24 h à 35-37 °C, la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue ou d'un logiciel d'identification (Figarella et Leyral, 2006).

- Inoculation de la galerie :

1) Dans les onze premiers tests de la galerie (test NIT à GEL, répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (incliner légèrement la boîte vers l'avant) :

- Pour les tests de NIT à ESC : environ 100 µl dans chaque cupule.
- Pour le test URE : remplir uniquement le tube.
- Pour le test GEL : remplir tube et cupule.

2) Dans les neuf derniers tests de la galerie (test 0 à GLYG) :

- ouvrir une ampoule de GP et y transférer le reste de la suspension, environ 0.5 ml. Bien homogénéiser.
- répartir cette nouvelle suspension dans les tubes seulement.

3) Remplir les cupules des tests soulignés URE, 0 à GLYG avec de l'huile de paraffine en formant un léger ménisque convexe, renfermer la boîte d'incubation et incubé 24 h à 35-37 °C.

- Lecture et interprétation :

Après 24h d'incubation :

- Ajouter les réactifs :

-test NIT : 1 goutte de NIT 1 et NIT 2

-test PYZ : 1 goutte de PYZ

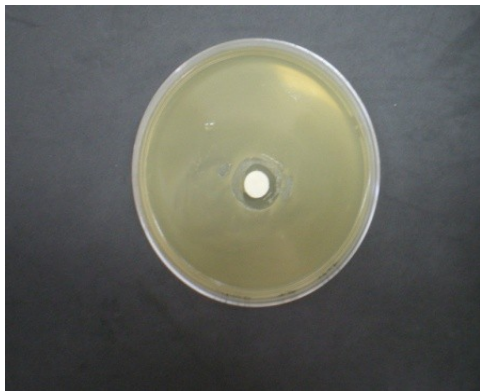
-PyrA, PAL, β GUR, β GAL, α GLU, β NAG (1 goutte de ZYM A et ZYM B)

- Attendre 10 min, puis lire toutes les réactions en se référant au tableau de lecture (tableau B7.1).
- Réaliser le test CATIase (+1 goutte de peroxyde d'hydrogène à 3% dans le test ESC ou GEL). Attendre 1 min. L'apparition de bulles correspond à une réaction positive.
- Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

Tableau B7.1 : lecture de la galerie API CORYNE (Figarella et Leyral, 2006)

Tests	Réactions	Résultats Négatif	Résultats positif
NIT	Réduction des nitrates	Incolore ou Rose très pâle	Rose intense ou rouge
PYZ	PYraZiamidase	Incolore, brun très pâle Ou orage très pâle	Brun orange
PyrA	Pyrrolidonyl Arylamidase	Incolore Orange pâle	orange
PAL	Phosphatase ALcaline	Incolore, Beige-pourpre pâle ou Orange pâle	pourpre
β GUR	Beta-GlucURonidase	Incolore, gris pâle ou beige pâle	bleu
β GAL	Beta-GALactosidase	Incolore, beige ou pourpre pâle	pourpre
α GLU	Alpha-GLUcosidase	Incolore, beige ou pourpre pâle Ou vert pâle	pourpre
β NAG	N-Acétyle- β NAG- Glucosaminidase	Incolore, beige, pourpre pâle, brun pâle ou gris pâle	Brun
ESC	ESCuline(β NAG- Glucosidase)	Incolore Gris	Noir
<u>URE</u>	UREase	Jaune, orange	Rouge, rose
<u>GEL</u>	GELatine	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir

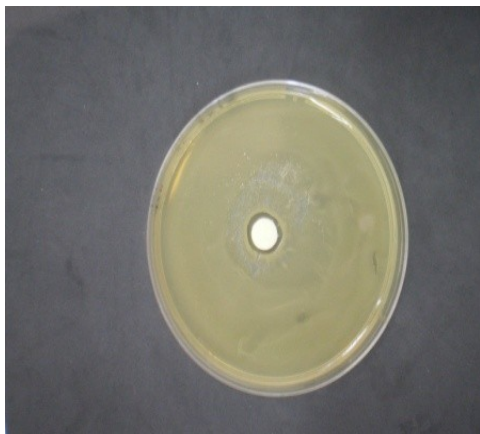
<u>0</u>	Contrôle (fermentation)	Rouge	Jaune, jaune orangé
<u>GLU</u>	GLUcose (fermentation)	Orange	
<u>RIB</u>	RIBose (fermentation)		
<u>XYL</u>	XYLose (fermentation)		
<u>MAN</u>	MANnitol (fermentation)		
<u>MAL</u>	MALtose (fermentation)		
<u>LAC</u>	LACtose (fermentation)		
<u>SAC</u>	SACcharose (fermentation)		
<u>GLYG</u>	GLYcogène (fermentation)		
CAT	CATalase	Absence de bulles	Présence de bulles

B8 : Effet inhibiteur des biosurfactants sur les microorganismes

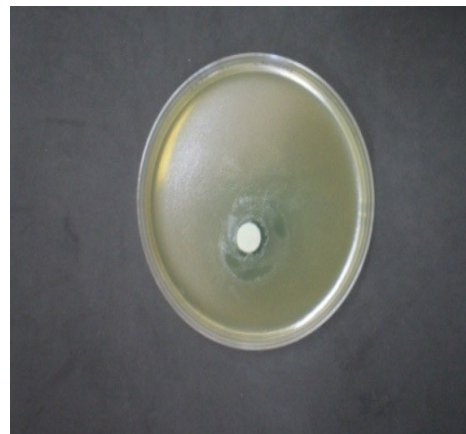
7G+ *Staphylococcus aureus*



7G+ *Pseudomonas aeruginosa*



1C + *Staphylococcus aureus*



1C+ *Pseudomonas aeruginosa*

Figure B8.1: Effet inhibiteur des biosurfactants sur les microorganismes

B9: différentes valeurs des résultats obtenus

Tableau B9.1 : valeurs obtenues de l'influence des isolats sur la production des biosurfactants

Souches bactériennes	Tension de surface (mN/m)	Souches bactériennes	Tension de surface (mN/m)
1F	35	1A	35.3
2G	34	2B	32.5
7G	31.2	7H	34.5
2J	34	1C	31
7E	31.5	2A	33
7F	33.5	2E	31.8
2K	36	1E	32.7

Tableau B9.2 : résultats obtenus (tension superficielle Mn/M) après l'optimisation de la source de carbone

Source de carbone	Souche 1C	Souche 7G
Huile d'olive	43	41
Glucose	46	42
Hexadecane	32	31.2
pétrole brut	32	32

Tableau B9.3 : valeurs obtenues de l'indice d'émulsification sur les hydrocarbures et les huiles

Hydrocarbures, huiles	Souche 1C	Souche 7G
Kérosène	0	0
gasol	0	0
Huile de tournesol	45	52.2
Huile moteur	92.31	95,23

Tableau B9.4 : résultats obtenus après l'influence de la température

Température	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
20	92.31	32.7
50	93.33	32.2
70	93.3	32
100	93.33	31.6

Tableau B9.5 : résultats obtenus après l'influence de la température (1C)

Température	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
20	95.23	31.2
50	80	31
70	85	30.7
100	94	29.8

Tableau B9.6 : valeurs obtenues après l'influence du pH (pour 7G)

pH	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
2	96,81	31.5
4	95.12	31.7
7	92.31	32.7
9	66.7	32.5
11	64.2	33

Tableau B9.7 : valeurs obtenues après l'influence du pH (pour 1C)

pH	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
2	68.5	31.1
4	70.58	31
7	95.23	31.2
9	95.45	30.6
11	97.5	30.4

Tableau B9.8 : valeurs obtenues après l'influence du pH (pour 7G)

Salinité (g.l ⁻¹)	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
5	91.83	31.4
15	78.43	32.7
50	91.3	31.8
100	64.17	31

Tableau B9.9 : valeurs obtenues après l'influence du pH (pour 1C)

Salinité (g.l ⁻¹)	E ₂₄ (%)	Tension de surface (mN/m)
5	95.65	31.8
15	69.76	31.6
50	46.8	32
100	25.54	31

Tableau B9.10 : résultats obtenus après le changement de la concentration des biosurfactants

C (g/ml)	0.30	0.50	0.75	1.00	1.25	1.5	1.75	2.00	2.25	2.5
Tension superficielle (7G)	64	59	52	41	38.5	35.9	34.2	33	33.1	33
Tension superficielle (1C)	63.20	49.1	40.4	36.3	34	32	32	32	31.6	31

Tableau B9.11 : valeurs obtenues après dégradation de l'hexadecane

concentration du biosurfactant 7G	% de dégradation de l'Hexadecane
0.5	21.62
1	22.81
2	67.04
4	22.68
8	19.7

Tableau B9.12 : valeurs obtenues après dégradation de l'hexadecane

concentration du biosurfactant 7G	% de dégradation de l'Hexadecane
0.375	19.05
0.75	36.94
1.5	46.24
3.0	40.29
6.0	36.89

Tableau B9.13: résultats obtenus après dégradation du pétrole brut

HYDROCARBURES	AIRES-DES-PICS		
	temoin-SDS	7G	1C
HEXADECANE (C16)	35406864	151062940	301212560
HEPTADECANE (C17)	26235722	28579071	11133904
OCTADECANE (C18)	34655967	37712940	15258123
NONADECANE (C19)	39004248	41375327	18173115
EICOSANE (C20)	42670399	43567203	26450243
HENEICOSANE (C21)	45182521	45447426	29778612
DOCOSANE (C22)	38369324	47546339	28397930
TRICOSANE (C23)	36924994	50732417	31734008
TETRACOSANE (C24)	39487115	47440252	26799231
PENTACOSANE (C25)	47313149	49258954	30520647
HEXACOSANE (C26)	30650351	28453920	18913233
HEPTACOSANE (C27)	19329108	20759059	8764293
SOMME	435229762	591935848	547135899
% DE SOLUBILISATION TOTALE	149,913941	239,89638	214,171734

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MED POL / MED PAS, "Plan d'Action National pour la réduction de la pollution marine due à des activités menées à terre", Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (MATE), (2005).
2. Lotfabad, T.B., Shourianc, M., Roostaazada, R., Najafabadib, A.R., Adelzadeha, M.R. et Noghabic, K.A., "An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran". Coll. Surf. B: Biointerf., V. 69, n° 2, (March 2009), 183-193.
3. Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G. et Baldi, F., "An antartic psychotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipids". FEMS Microbio. Ecol., V. 53, n° 1, (June 2005), 157-166.
4. Ellaiah, P., Prabhakar, T., Sreekanth, M., Taleb, A.T., Raju, P.B., Saisha, V., "Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species". Exp. Biol., V.40, n° 9, (September 2002), 1083–1086.
5. Corsaro, M.M., Lanzetta, R., Parrilli, E., Parrilli, M., Tutino, M.L. et Ammarino, S., "Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125". Bacteriol., (January 2004), V. 186, n° 1, 29–34.
6. Calvo, C., Toledo, F.L., Pozo, C., Martinez-Toledo, M.V. et Gonzalez-Lopez, J., "Biotechnology of bioemulsifiers produced by microorganisms". Fd. Agric. Environ., (September 2004), V. 2, n° 3-4, 238-243.
7. Desai, J.D. et Banat, I.M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential". Microbiol Molec Biol. Reviens., V. 61, n° 1, (March 1997), 47-64.
8. Khalladi, R. "Utilisation recyclage et réutilisation des tensioactifs dans le traitement de la pollution par les hydrocarbures". (2011), Thèse. Doc., Uni. Scienc. technol «Houari Boumediene».Alger-Algérie.
9. Gabet, S., "Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique". (2004).Thèse. Doc., Uni. limoge.
10. IRD., "210-Deux nouvelles bactéries isolées des puits de pétrole". Fiche d'actualité scientifique. (2004).

11. Thomas, P. (2013), "Géologie des hydrocarbures conventionnels", Encyclop. Univers. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/geologie-des-hydrocarbures-conventionnels/>
12. Sandison C.M., Alexander R., Kagi R.I. et Boreham C.J., "Sulfurisation of lipids in marine-influenced lignite". Organ Geochemis., V. 33, n° 9, (September 2002), 1053-1077.
13. Head, I.M., Jones, D.M. et Larter, S.R., "Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil". Nature, V. 426, n° 6964, (Novembre 2003), 344-352.
14. Thévard, B. (2011). [http:// www.avenir-sanspetrole.org/article-comprendre-le-petrole-54826965.html](http://www.avenir-sanspetrole.org/article-comprendre-le-petrole-54826965.html).
15. Tissot, B.P. et Welte, D.H., "Petroleum Formation and Occurrence". Springer –Verlag: New York, (1984), 699 p.
16. Soltani, M., "Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram- négatives hydrocarbonoclastes : Variation en fonction de la source de carbone". (2004), Thèse. Doc. Uni. Paris 6, France.
17. Neff, J.M., "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, sources, fates and biological effects". App. Scien. Publis. Ltd., Essex, Angleterre, (1979), 262 p.
18. Atlas, R.M. "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". Microbial Reviews, V. 45, n° 1, (March 1983), 180-209.
19. Smith Brander, D., "Protégeons nos eaux". Rapport final du comité d'examen public des systèmes de sécurité des navires-citernes et de la capacité d'intervention en cas de déversements en milieu marin (Canada), Ottawa, Ontario, (1990).
20. Som, D., Dutta, C., Chatterjee, A., Mallick, D., Jana, T.K. et Sen, S., "Studies on commuters' exposure to BTEX in passenger cars in Kolkata, India". Science of the Total Environ., (Janvier 2007), V. 372, n° 2-3, Janvier 2007), 426–432.
21. Bjorseth, A. et Becher, G., "PAH in work atmospheres. Occurrence and determination". Boca Raton, Floride, CRC Press, (1986), 137 P.
22. Arnaud, P., "Cours de Chimie Organique". Enseig. Chim., (1983), 505 P.

23. Yang, H.H., Lee, W.J., Chen, S.J. et Lai, S.O., "PAH Emission From various industrial stacks". Haz Mat., V. 60, n° 17, (June 1998), 159-174.
24. Haritash, A.K. et Kaushik, C.P., "Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)". J Haz. Mat., V. 169, n° 1-3, (Septembre 2009), 1-15.
25. Hinwood, A.L., Berko, H.N., Farrar, D., Galbally, I.E. et Weeks, I.A., "Volatile organic compounds in selected micro-environments". Chemos., (April 2006), V. 63, n°3, 421-429.
26. Phillips, D.H., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the diet". Mutat. Resea., V. 443, n° 1-2, (July 1999), 139-147.
27. Greenpeace, 2011. "Transport, pétrole et Gaz à effet de serre". <http://www.greenpeace.org/france/fr/campagnes/energie-et-climat/fiches-thematiques/Transport-petrole-et-Gaz-a-effet-de-serre/>
28. Lavado, R., Rocio Urena, R., Martin Skilton, R., Torreblanca, A., Del Ramo, J., Raldua, D. et Porte, C., "The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the ebro river". Environ. Poll., V. 139, n° 2, (January 2006), 330-339.
29. Alazard, D., Magot, M. et Ollivier, B., "Ecologie microbienne des réservoirs pétroliers". (2010), Geosciences.
30. Bastin, E.S., "The problem of natural reduction of sulfates". Bull. Am. Associat Petrol. Geologists, V. 10, n° 12, (December 1926), 1270-1299.
31. Corre, E., "Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers". (2000). Th. Doc. UBO.
32. Guillaume, M. "Deux nouvelles bactéries isolées de puits de pétrole". (October 2004). Fiches d'actualité scientifique.
33. Magot, M., Ollivier, B. et Patel, B.K.C., "Microbiology of petroleum reservoirs". Antonie van Leeuwenhoek, V. 77, n° 2, (September 2000), 103-116.
34. Cord-Ruwich, R., Kleinitz, W. et Widdel, F., "Sulphate-reducing bacteria and their activities in oil production". Petrol. Technol., V. 39, n° 1, (September 1987), 97-106.
35. Agrawal, A., Vanbroekhoven, K. et Lal, B., "Diversity of culturable sulfidogenic bacteria in two oil-water separation tanks in the north-eastern oil fields of India". Ecology/environ. Microbial., V. 16, n° 4, (April 2009), 12-18.

36. Tang, K., Baskaran, V., Nemati, M., "Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries". *Biochem. Engin.*, V. 44, n° 1, (April 2009), 73-94.
37. Magot, M., Caumette, P., Desperrier, J.M., Matheron, R., Dauga, C., Grimont, F. et Carreau, L., "Desulfovibrio longus sp. nov., a sulfate-reducing bacteria isolated from oil-producing well". *Int. J. Syst. Bacteriol*, V. 42, n° 3, (July 1992), 398-403.
38. Nga, D.P., Cam Ha, D.T., Hien, LT. et Stan-Lotter, H., "Desulfovibrio vietnamensis sp. nov., a halophilic sulfate-reducing bacterium from vietnamese oil fields". *Anaerobe*, V. 2, n° 6, (December 1996), 385-392.
39. Tardy-Jacquenod, C., Magot, M., Laigret, F., Kaghad, M., Patel, B.K.C., Guezennec, J., Matheron, R. et Caumette, P., "Desulfovibrio gabonensis sp. nov., a new moderately halophilic sulfate-reducing bacterium isolated from an oil pipeline". *Int. J. System. Bacteriol*, V. 46, n° 3, (July 1996), 710-715.
40. Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Fernandez, L., Ramirez, F., Cayol, J.L., Thomas, P., Garcia, J.L. et Ollivier, B., "Desulfovibrio capillatus sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from an oil field separator located in the Gulf of Mexico". *Anaer.*, V. 9, n° 2, (April 2003a), 97-103.
41. Tsai, J.C., Kumar, M. et Lin, J.G., "Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway". *J. Haz. Mat*, V. 164, n° 2-3, (May 2009), 847-855.
42. Nilsen, R.K., Torsvik, T. et Lien, T., "Desulfotomaculum thermocisternum sp. nov., a sulfate-reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir". *Int. J. Syst. Bacteriol*, V. 46, n° 2, (April 1996), 397-402.
43. Beeder, J., Nilsen, R.K., Rosnes, J.T., Torsvik, T. et Lien, T., "Archaeoglobus fulgidus isolated from hot North Sea oil field water". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 60, n° 4, (April 1994), 1227-1231.
44. Davidova, I.A., Harmsen, H.J.M., Stams, A.J.M., Belyaev, S.S. et Zehnder, A.J.B., "Taxonomic description of Methanococcoides euhalobius and its transfer to Methanohalophilus genus". *Antonie van Leeuwenhoek*, V. 71, n° 4, (May 1997), 313-318.
45. Ni, S. et Boone, D.R., "Isolation and characterization of a dimethyl sulfide-degrading methanogen, Methanobus siciliae H1350, from an oil well". *Int. J. Syst. Bacteriol*, V. 41, n° 3, (July 1991), 410-416.
46. Cheng, L., Qiu, T.L., Li, X., Wang, W.D., Deng, Y., Yin, X.B. et Zhang, H., "Isolation and characterization of *Methanoculleus receptaculi* sp". nov. from

- Shengli oil field, China. FEMS Microbiol. Let, V. 285, n° 1, (August 2008), 65-71.
47. Ravot, G., Magot, M., Fardeau, M.L., Patel, B.K.C., Thomas, P., Garcia, J.L. et Ollivier, Raza, Z.A., Khan, M.S. et Khalid, Z.M., "Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant". Process Biochem., V. 42, n° 3, (June 2007), 686-692.
 48. Stetter, K.O., Hoffmann, A. et Huber, R., "Microorganisms adapted to high temperature environments". In: Guerrero, R. et Pedros-Alio, C. (Eds.), Trends in Microb. Ecol., (1993), 25-28.
 49. Fardeau, M.L., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Magot, M., Thomas, P., Rimbault, A., Rocchiccioli, F. et Garcia, J.L., "Thermotoga hypogea sp. nov., a xylanolytic, thermophilic bacterium from an oil-producing well". Syst. Bacteriol. V. 47, n° 4, (October 1997), 1013-1019.
 50. Greene, A.C., Patel, B.K.C et Sheehy, A., "Deferribacter thermophilus gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic manganese- and iron-reducing bacterium isolated from a petroleum reservoir". Syst. Bacteriol, V. 47, n° 2, (April 1997), 505-509.
 51. Greene, A.C., Patel, B.K.C. et Yacob, S., "*Geoalkalibactersubterraneus* sp. nov., an anaerobic Fe (III) - and Mn (IV)-reducing bacterium from a petroleum reservoir, and emended descriptions of the family *Desulfuromonadaceae* and the genus *Geoalkalibacter*". Syst. Evol. Microbiol., V. 59, n° 4, (April 2009), 781-785.
 52. Gevertz, D., Telang, A.J., Voordouw, G. et Jenneman, G.E., "Isolation and characterization of strains CVO and FWKOB, two novel nitrate-reducing, sulfide-oxidizing bacteria isolated from oil field brine". Appl. Environ. Microbiol, V. 66, n° 6, (June 2000), 2491-2501.
 53. Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Sepúlveda, J., Fernández, J.L., Cayol, J.L., Thomas, T. et Ollivier, B., "Garciella nitratreducens gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, nitrate- and thiosulfate-reducing bacterium isolated from an oilfield separator in the Gulf of Mexico". Syst. Evol. Microbiol, V. 53, n° 5, (September 2003b), 1509-1514.
 54. Wang, Y., Tang, S.K., Lou, K., Mao, P.H., Jin, X., Jiang, C.L., Xu, L.H. et Li, W.J., "*Halomonaslutea* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt lake". Syst. Evol. Microbiol., V. 58, n° 9, (September 2008), 2065-2069.
 55. Vasconcellos, S.P., Crespim, E., da Cruz, G.F., Senatore, D.B., Simioni, K.C.M., Santos Neto, E.V., Marsaioli, A.J. et Oliveira, V.M., "Isolation,

biodegradation ability and molecular detection of samples from a Brazilian offshore basin". *Org. Geochemis.*, V. 40, n° 5, (May 2009), 574–588.

56. Ben Ali Gam, Z., Abdelkafi, S., Casalot, L., Tholozan, J.L., Oueslati, R. et Labat, M., "Modicisalibacter tunisiensis gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family *Halomonadaceae* Franzmann *etal.* 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007". *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, V. 57, n° 10, (October 2007), 2307-2313.
57. Chamkha, M., Mnif, S., Sayadi, S., "Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading *Geobacillus* from a Tunisian high temperature oil field". *FEMS Microbiol. Let.*, V. 283, n° 1, (June 2008), 23-29.
58. Mnif, S., Chamkha, M., Sayadi, S., "Isolation and characterization of a *Halomonas* sp. a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline condition". *Journal of Applied Microbiology*, V. 107, n° 3, (September 2009), 785-794.
59. Orphan, V.J., Taylor, L.T., Hafenbradl, D. et Delong, E.F., "Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with hightemperature petroleum reservoirs". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 66, n° 2, (February 2000), 700–711.
60. Orphan, V.J., Goffredi, S.K., DeLong, E.F., et Boles, J.R., "Geochemical influence on diversity and microbial processes in high temperature oil reservoirs". *Geomicrobiol.*, V. 20, (April 2003), 295–311.
61. Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. et Moletta, R., "Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis". *App. Environ. Microbiol.*, V. 63, n° 7, (July 1997), 2802–2813.
62. Snell-Castro, R., Gordon, J. J., Delgenes, J. P. et Dabert, P., "Characterization of the microbial diversity in pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis". *FEMS Microbiol. Ecol.*, V. 52, n° 2, (April 2005), 229-242.
63. Amann, R. et Ludwig W., "Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology". *FEMS Microbiol. Rev.*, V. 24, n° 5, (December 2000), 555-565.
64. Pernthaler A., Pernthaler J. et Amann R., "Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 68, n° 6, (June 2002), 3094-3101.
65. Cambon-Bonavita, M.A., Lesongeur, F., Menoux, S., Lebourg, A. et Barbier, G., "Microbial diversity in smoked salmon examined by a culture-

- independent molecular approach - a preliminary study". *Internat J. Food Microbiol.*, V. 70, n° 1-2, (October 2001), 179-187.
66. Jang J., Kim B., Lee J., Han H., A., "rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis". *J. Microbiol. Meth.*, V. 55, n° 1, (October 2003), 295–302.
 67. Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. et Forney, L.J., "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 63, n° 11, (November 1997), 4516-4522.
 68. Chachkhiani, M. Dabert, P. Abzianidze, T. Partskhaladze, G. Tsiklauri, L. Dudaui, T. Godon, J.-J., "16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure". *Bioresour. Technol.*, V. 93, n° 3, (July 2004), 227–232.
 69. Delbes, C., Moletta, R., Godon, J.J., "Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem". *FEMS Microbiol. Ecol.*, V. 35, n° 1, (March 2001), 19–26.
 70. Schwieger, F. et Tebbe, C.C., "A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 64, n° 12, (December 1998), 4870–4876.
 71. Zumstein, E., Godon, J.J. Moletta, R., "Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis". *Environ. Microbiol.*, V. 2, n° 1, (February 2000), 69-78.
 72. Duthoit, F., Godon, J.J. et Monte, M.C., "Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16 S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 69, n° 7, (July 2003), 3840–3848.
 73. Fischer, S.G. et Lerman, L.S., "Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis". *Cell*, V. 16, n° 1, (January 1979), 191-200.
 74. Theron, J., Cloete, T.E., "Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments". *Crit. Rev. Microbiol.*, V. 26, n° 1, (May 2000), 37– 57.

75. Ji, N.N., Peng, B., Wang, S.Y. et Peng, X.X., "Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of pathogenic bacteria in fishery". J. Microbiol Meth., V. 57, n° 3, (June 2004), 409–413.
76. Ferris, M.J., Muyzer, G. et Ward, D.M., "Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community". Appl. Environ. Microbiol, V. 62, n° 2, (February 1996) ,340-346.
77. Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O. et Jannasch H.W., "Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments". Arch. Microbiol., V. 164, n° 3, (September 1995), 165–172.
78. Jackson, C.R., Roden, E.E. et Churchill. P.F., "Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with varying inoculum dilution as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis". Appl. Environ. Microbiol., V. 64, n°12, (December 1998), 5046-5048.
79. González, S.S., Barrio, E., Gafner, J. et Querol, A., "Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations". FEMS Yea. Res, V. 6, n° 8, (December 2006), 1221–1234.
80. Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A. et Guillamon, J.M., "Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine". Appl. Environ. Microbiol., V. 72, n° 11, (November 2006), 7148-7155.
81. Rousselon, N., Delgenes, J.P. et Godon, J.J., "A new real time PCR (TaqMan® PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria". J. Microbiol. Methods. V. 59, n° 1, (October 2004), 15–22.
82. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. et Nabi, I., "Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*". Desalin., V. 223, n° 1 et 3, (March 2008), 143-151.
83. Jemal, F., "la bioremediation". Laboratoire de nutrition et métabolisme azotes, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Campus Universitaire, 1060 Tunis-Tunisie. Revue H.T.E N° 122, (Mars 2002).
84. Okoliegbe, I.N. et Agarry, O.O., "Application of microbial surfactant". Schol. J. Biotechnol., V. 1, n° 1, (April 2012), 15-23.

85. Cameotra, S. S. et Makkar, R. S., "Synthesis of biosurfactants in extreme conditions". Appl. Microbiol. Biotechnol., V. 50, n° 5, (November 1998). 520-529.
86. Parra, J.L., Guinea, J., Manresa, M.A., Robert, M., Marcadé, M.E., Comelles, F. et Ron, E.Z. et Rosenberg, E., "Biosurfactants and oil remediation". Curr. Opin. Biotechnol., V. 3, n° 1, (2002), 249-252.
87. Healy, M.G., Devine, C.M. et Murphy R., "Microbial production of biosurfactants". Resources, Conservation and Recycling, V. 18, n°1-4, (November 1996), 41-57.
88. Vipulanandan, C. et Ren, X., "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant". J Environ. Engineer., V. 126, n° 7, (July 2000), 629-634.
89. Chen, S.Y., Wei, Y.H. et Chang, J.S., "Repeated Ph-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2". Appl. Microbiol. Biotechnol., V. 76, n° 1, (August 2007), 67-74.
90. Mata-Sandoval, J.C., Karns, J. et Torrents. A., "High-performance liquid chromatography method for the characterisation of mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil". J. Chromatogr. A., V. 864, n° 2, (December 1999), 211-220.
91. Mata-Sandoval, J.C., Karns, J. et Torrents. A., "Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides". Environ. Sci. Technol., V. 34, n° 23, (October 2000), 4923-4930.
92. Fiechter, A., "Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*", Appl. Environ. Microbiol., V. 51, n° 5, (May 1986), 985-989.
93. Larpent, C., "Les tensioactifs, Constantes physico-chimiques, Edit". Technique de l'ingénieur, (1993), V. K2.
94. West, C.C. et Harwell, J.H., "Surfactants and subsurface remediation, Environ ". Sci. Technol., V. 26, n° 12, (December 1992), 2324-2330.
95. Benvegna, T., Plusquelle, D. et Noiret, N., "Tensioactifs à base de substances renouvelables". Actu. Chim., (2002), 11-12, 70-75
96. Puisieux, F., "Seiller M., Les systèmes disperses: Agents de surface et émulsions". Edit. Tec & Doc. Lavoisier". (1983).

97. Cameotra, S.S. et Makkar, R.S., "Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, Appl. Microbiol". Biotechnol., V. 50, n° 5, (November 1998), 520-529.
98. Bognolo, G. "Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects", V. 152, n° 1, (July 1999), 41-52.
99. Mulligan, C.N., Young, R.N. et Gibbs, B.F., "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil". A review, Engin. Geol., V.60, n° 1, (June 2001), 371-380.
100. Ron, E. et Rosenberg, E., "Biosurfactants and oil bioremediation". Cur. Opin. Biotechnol. V.13, n° 4, (April 2002), 249-252.
101. Karanth, N.G.K., Deo, P.G. et Veenanadig, N.K., "Microbial production of biosurfactants and their importance". Curr. Sci., V. 77, n° 1, (July 1999), 116–123.
102. Jarvis, F.G. et Johnson, M.J., "A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*". J. Am. Oil Chem. Soc., V. 71, n° 12, (December 1949), 4124–4126.
103. Asselineau, C. et Asselineau, J., "Trehalose containing glycolipids". Prog. Chem. Fats Lipids, V. 16, n° 1, (February 1978), 59–99.
104. Kretschmer, A., Bock, H. et Wagner, F., "Chemical and physical characterization of interfacial active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane". Appl. Environ. Microbiol., V. 44, n° 4, (October 1982), 864–870.
105. Lang, S., Philip, J.C. "Surface-active lipids in rhodococci". Antonie van Leeuwenhoek, V. 74, n° 1-3, (October 1998), 59–70.
106. Cooper, D. G. et Paddock, D. A., "*Production of biosurfactants from Torulopsis bombicola*". Appl. Environ. Microbiol., V. 48, n° 4, (October 1984), 173–176.
107. Hommel, R.K., "Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates". In: Ratledge, C. (Ed.). Biochem. Microbial degradat. Dordrecht, Boston. Kluwer Acad. Publis., (1994), 63-87.
108. Hu, Y. et Ju, L.K., "Purification of lactonic sophorolipids by crystallization". J. Biotechnol., V. 87, n° 3, (May 2001), 263–272.
109. Arima, K., Kakinuma, A. et Tamura, G., "Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterisation and its

- inhibition of fibrin clot formation". Biochem.Biophys. Res. Commun., V. 31, n° 3, (May 1968), 488–494.
110. McInerney, M.J., Javaheri, M. et Nagle, D.P. "Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2.1". J.Microbiol. Biotechnol., V. 5, n° 1, (September 1990), 95–102.
 111. Cirigliano, M.C. et Carman, G.M., "Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*". Appl. Environ. Microbiol. V. 50, n° 4, (October 1985), 846–850.
 112. Kappeli, O. et Finnerty, W. R., "Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*". J. Bacteriol., V. 140, n° 2, (November 1979), 707–712.
 113. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. et Gutinck, D.L., "Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties". Appl. Environ. Microbiol., V. 37, n° 3, (March 1979), 402–408.
 114. Zosim, Z., Guntick, D. L. et Rosenberg, E., "Properties of hydrocarbon in water emulsion". Biotechnol. Bioeng., V. 24, n° 1, (October 1982), 281–292.
 115. Cirigliano, M.C et Carman, G.M., "Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipodytica*". Appl. Environ. Microbiol., V. 48, n° 4, (October 1984), 747–750.
 116. Fataiko, D.M. et Novak, J.T., "Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon". Wat. Environ. Resea., V. 64, n° 1, (October 1992), 163-169.
 117. Poré, J., "Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples". Edit. Techn. Indust. Corps Gras". (1992), 270 P.
 118. Li, Y., "Microelectronic applications of chemical mechanical planarization". Wiley-Interscience, (2008), 734 P.
 119. Edwards D.A., Luthy R.G. et Liu Z., "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, Environ". Sci. Technol., V. 25, n° 1, (June 1991), 127-133.
 120. Parkinson, M., "Biosurfactants". Biotech, (1985), Adv. 3, 65-83.
 121. Zajic, J E. et Seffens, W., "Biosurfactants". CRC Crit. Rev. Biotech., V. 1, n° 2, (January 1984), 87-107.
 122. Edwards, D.A., Adeel, Z. et Luthy, R.G., "Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system". Environ. Sci. Technol., V. 28, n° 8, (January 1994), 1550-1560.

123. Mulligan, C.N., "Environmental applications for biosurfactants". Environ. Pollut., V.13, n° 2, (January 2005), 183–198.
124. Cooper, D.G. MacDonald, C.R. Duff, J.B. et Kosaric, N., "Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition". Appl. Environ. Microbiol., V. 42, n° 3, (September 1981), 408–412.
125. Hisatsuka, K., Nakahara, T., Sano, N. et Yamada, K., "Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: Its function in hydrocarbon fermentations". Agric. Biol. Chem., V. 35, n° 5, (January 1971), 686–692.
126. Mohan, P.K., Nakhla, G. et Yanful, E.K., "Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions". Water Res., V. 40, n° 3, (February 2006), 533–540.
127. Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. et Wagner, F., "Toxicity testing of synthetic et biogenic surfactants on marine microorganisms". Environ. Toxicol. Water Qual., V. 6, n° 2, (May 1991), 157–163.
128. Flasz, A., Rocha, C.A., Mosquera, B. et Sajo, C., "A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925". Med. Sci. Res., V. 26, n° 3, (May 1998), 181–185.
129. Christofi, N. et Ivshina, I.B., "A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation", J. Appl. Microbiol., V. 93, n° 6, (December 2002), 915-929.
130. Banat. M., Makkar. R.S. et Cameotra. S.S., "Potential commercial applications of microbial surfactants". Appl. Microbiol. Biotechnol., V. 53, n° 5, (May 2000), 495-508.
131. Singh, A., Van Hamme, J.D. et Ward, O.P., "Singh, A., Van Hamme, J.D and biotechnology". Biotechnol, V. 25, n° 1, (February 2007), 99–122.
132. Van Dyke. M.I., Couture. P., Brauer, M., Lee, H. et Trevors, J.T., "*Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil". Can. J. Microbiol., V. 39, n° 11, (November 1993), 1071-1078.
133. Abalos, A. et Pinazo, A. et Infante, M.R. et Casals, M. Garcia, F. et Manresa, A., "Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes". Langmuir. Americ. Chemic. Socie. V. 17, n° 5, (February 2001), 1367-1371.

134. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R. et Banat, I.M., "Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials", *Biotechnol. Prog.*, V.18, n° 6, (September 2002), 1277-1281.
135. Ilori M.O., Amobi, C.J. et Odocha, A.C., "Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment". *Chemosphere*, V. 61, n° 7, (November 2005), 985-992.
136. Robert. M., Mercade. M.E., Bosch. M.P., Parra. J.L., Espuny. M.J, Manresa. M.A. et Guinea, J. "Effect of the carbone source on biosurfactant production by *pseudomonas aeruginosa* 44T1". *Biotechnol. Lett.* V. 11, n° 12, (December 1989), 871-874.
137. Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., et Bisailon, J.G. "Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". *App. Environ. Microbiol.*, V. 62, n° 6, (June 1996), 1908–1912.
138. Fiechter, A., "Biosurfactants: moving towards industrial application". *Trends in Biotech.*, V. 10, n° 6, (June 1992), 208-217.
139. Guerra-Santos, L.H., Kapelli, O. et Fiechter, A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* contonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (September 1986), V. 24, n° 6, 443-448.
140. Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S. et Khamis, A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium". *World J. Microbiol. Biotechnol.*, V. 7, n° 1, (October 1991a), 53–61.
141. Sylдатк, C., Lang, S., Matulovic, U. et Wagner, F.Z., "Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* sp". *DSM 2874. Z. Naturforsch.*, V. 40, n° 1-2, (February 1985), 61–67.
142. Gobbert, U., Lang, S. & Wagner, F. "Sophorose lipids formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*". *Biotechnology Letters*, V, 6, n° 4, (April 1984), 225-230.
143. Powalla, M., Lang, S. et Wray, V., "Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on *n*-alkanes". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V. 31, n° 5-6, (October 1989), 473-479.
144. Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, S. et Kadri, M., "Isolation of biosurfactant producing bacteria—product characterization and evaluation". *Acta Biotechnol.*, V. 11, n° 4, (1991b), 315–324.

145. Parra, J.L., Manresa, M.A., Robert, M.E., Comelles, F. et Bosch, M.P., "Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants". J. Am. Oil Chem. Soc., V. 66, n° 1, (January 1989), 141-145.
146. Reiling, H.E., Thanei-Wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Kappeli, O. et Fiechter, A., "Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*". Appl. Environ. Microbiol., V. 51, n° 5, (May 1986), 985-989.
147. Samanta, S.K., Singh, O.M. et Jain, R.K., "Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation". Review. Trends in Biotechnol., V. 20, n° 6, (June 2002), 243-248.
148. Menzie, C.A., Potocki, B.B. et Santodonato, J., "Exposure to carcinogenic PAHs in the environment". Environ. Sci. Technol., V. 26, n° 7, (July 1992), 1278-1284.
149. Li, J. et Chen, B.H. "Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants". Chemic. Engin. Scien. V. 54, n° 14, (July 2002), 2825-2835.
150. LCPE., "Liste des substances d'intérêt prioritaire -Rapport d'évaluation-Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques". (1994), 69 p.
151. Wilcke, W., "Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soils. Review. J. Plant Nutr. Soil Sci, V. 141, n° 3-4, (October 2007), 157-166.
152. Wild, S.R. et Jones, K.C., "Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget". Environ Pollut. V. 88, n° 1, (January 1995), 91-108.
153. Mackay, D., Shiu, W.Y. et Ma, K.C., "Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume II: Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins, and dibenzofurans". Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA, (1992), 597 p.
154. INERIS., "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Naphtalène". Version n° 3-2, Site web: <http://www.ineris.fr>, (2005).
155. INRS. "Fiche toxicologique FT 204. Naphtalène". <http://www.inrs.fr/htm/naphtalene.html>. (2007).
156. ATSDR. "Toxicological profile for naphthalene, U.S Department of Health and Human Services". Atlanta, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp67.html>. (2003).

157. HSDB. "Phénanthrène. Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine". [<http://www.toxnet.nlm.nih.gov> Voir]], (1999).
158. Phillips, D.H., "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the diet". *Mut. Resea.*, V. 443, n° 1-2, (July 1999), 139-147.
159. SAX'S. "Dangerous properties of industrial materials". Ninth edition. Richard J. Lewis, SR, (1996).
160. Bomboi, M.T. et Hernandez, A., "Hydrocarbon in urban runoff: their contribution to the wastewaters". *Wat. Resea.*, V. 25, n° 5, (May 1991), (May 1991), 557-565.
161. Bouloubassi, I. et Salot, A., "Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH)". *Oceanol. Act.*, V. 16, n° 2, (March 1993), 145-161.
162. Macias-Zamora, J. V., Mendoza-Vega, E. et Villaescusa-Celaya, J. A., "PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, B. C., Mexico". *Chemosphere*, V. 46, n° 3, (January 2002), 459-468.
163. Wang, Z., Fingas, M., Landriault, M., Sigouin, L., Feng, Y. et Mullin, J., "Using systematic and comparative analytical data to identify the source of an unknown oil on contaminated birds". *J. Chromatog.*, V. 775, n° 1-2, (July 1997), 251-265.
164. Bence, A.E. et Burns, W.A., "Fingerprinting hydrocarbons in the biological resources of Exxon Valdez spill area". *Exxon Valdez oil spill: fate and effects in Alaska waters*. V. 1, n° 1219, (October 1995), 84-140.
165. Wang, Z., Fingas, M. et Page, D. S. "Oil spill identification". *J. Chromatog.*, V. 843, n° 1-2, (May 1999), 369-411.
166. Flotron, V., Delteil, C., Bermond, A. et Camel, V., "Remediation of matrices contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons: Use of Fenton's reagent". *Polyc. Arom. Comp.*, V. 23, n° 4, (October 2003), 353-376.
167. Beltrán, J.F., Gonzalez, M., Rivas, J.F et Alvarez, P., "Fenton reagent advanced oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in water". *Water, Air and Soil Poll.*, V. 105, n° 3-4, (July 1998), 685-700.
168. Little, C., Hephher, J.M. et El-Sharif, M., "The sono-degradation of phenanthrene in an aqueous environment". *Ultrasonics*, V. 40, n° 1-8, (May 2002), 667-674.

169. Prack, D.J.L. et Pritchard, P.H., "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in micellar non-ionic surfactant solutions", *Wat. Res.*, V. 36, n° 1, (January 2002), 3463- 3472.
170. Psillakis, E., Goula, G., Kalogerakis, N. et Mantzavinos, D., "Degradation of polycyclic hydrocarbons in aqueous solutions by ultrasonic irradiation". *J. Hazard. Mat.*, V. 108, n° 1-2, (April 2004), 95-102.
171. Taylor, E.J., Cook, B.B. et Tarr, A.M., "Dissolved organic matter inhibition of sonochemical degradation of aqueous polycyclic aromatics hydrocarbons". *Ultrason. Sonochem.* V. 6, n° 4, (September 1999), 175-183.
172. Gonze, E., Fourel, L., Gonthier, Y., Bold, P. et Bernis, A., "Wastewater pretreatment with ultrasonic irradiation to reduce toxicity". *Chem. Eng. J.*, (May 1999), V. 73, n° 2, 93-100.
173. Junior, J.S, Mariano, A.P, Bonotto, D.M. et Angelis D.F. "Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida Viswanathii*", *Afr J. Biotechnol.*, V. 8, n° 12, (June 2009), 2774-2778.
174. Rushton, D.G., Ghaly, A. E. et Martinell, K., "Assessment of Canadian Regulations and Remediation Methods for Diesel Oil Contaminated Soils, Amer". *J. Sci.*, V. 4, n° 7, (July 2007), 465-478.
175. Mariano, A.P, Kataoka, A.G., Angelis, D.F., Bonotto, D.M., "Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station". *J. Microbiol.*, V.38, n° 2, (June 2007), 346-353.
176. Kosaric, N., "Biosurfactants and their application for Soil Bioremediation, Food Technol". *Biotechnol.*, V. 39, n° 4, (November 2001), 295-304.
177. Gimello, R., "Guidance document for the remediation of contaminated soils, Part VI: Remedial action 2, Soil treatment technologies for contaminated soils". New Jersey Depart. Environ. Protec., (1998), 163 P.
178. Lei, L. Khodadoust, A.P., Suidana, M.T., Tabak, H.H., "Biodegradation of sediment-bound PAHs in field-contaminated sediment". *Water Res.*, V.39, n° 2-3, (February 2005), 349-361.
179. Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture", *Chemos.*, V. 41, n° 9, (November 2000), 1463-1468.
180. Jacques, R.J.S., Santos, E.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., Selbach, P.A., Sá, E.L.S. et Camargo, F.A.O., "Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site, Int". *Biodeterior. Biodegrad.* V. 56, n° 3, (October 2005), 143-150.

181. Das, K. et Mukherjee, A.K., "Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India", *Bioresource Technol.*, V. 98, n° 7, (May 2007), 1339-1345.
182. ATSDR. "Toxicological profile for fuel oils, U.S". Department of health and human services, Atlanta, <http://www.atsdr.cdc.gov>. (1995).
183. Campanella, B. et Perrin, D., "Evaluation de la toxicité de l'anthracène sur les végétaux : Mise aux point de deux tests biologiques visant à mesurer l'absorption de l'anthracène par des racines transformées de *Calystegia sepium* (L) Brown et *Medicago sativa* L". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, V. 1, n° 4, (July 1997), 257-263.
184. Zobell, C.E., "Action of microorganisms on hydrocarbons". *Bacteriol Rev.*, V. 10, n° 1-2, (March 1946), 1-49.
185. Nicholson, C.A. et Fathepure, B.Z., "Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma". *FEMS Microbiol Lett.*, V. 245, n° 2, (April 2005), 257-62.
186. Sei, A. et Fathepure, B.Z., "Biodegradation of BTEX at high salinity by an enrichment culture from hypersaline sediments of Rozel Point at Great Salt Lake. *J. Appl. Microbiol.*". V. 107, n° 6, (December 2009), 2001-2008.
187. Olivera, N.L., Esteves, J.L. et Commendatore, M.G., "Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina". *Internat Biodeteriorat. Biodegrad.*, V. 40, n° 1, (1997), 75-79.
188. Al-Hadhrami, M.N., Lappin-Scott, H.M. et Fisher, P.J., "Bacterial survival and n-alkane degradation Within Omani crude oil and a mousse". *Marine Pollution Bulletin*, V. 30, n° 6, (June 1995), 403-408
189. Ortiz, I., Velasco, A., Revah, S., "Effect of toluene as gaseous co-substrate in bioremediation of hydrocarbon polluted soil". *J. Hazard. Mater.*, V. 131, n° 1-3, (April 2006), 112-117.
190. Chung, N., Alexander, M., "Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons". *Environ. Sci. Technol.*, V. 33, n° 20, (September 1999), 3605-3608.
191. Hatzinger, P.B. et Alexander, M., "Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability, *Environ. Sci. Technol.*", V. 29, n° 2, (February 1995), 537-545.

192. Saada, A., Nowak C., Coquereau N., "Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures". Rapport intermédiaire: Résultat de la phase 1, Rapport BRGM/RP-53739-FR, (2004), 107 P.
193. Leahy, J. G., Colwell, R. R., "Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment". Microbiol. Reviews, V. 54, n° 3, (September 1990), 305-315.
194. Sikkema, J., de Bont, J.A.M. et Poolman, B., "Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes". J. Bacteriol., V. 269, n° 11, (March 1994), 8022-8028.
195. Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B., "Metabolism of membrane toxicity of hydrocarbons". Microbiological Reviews, (June 1995), V. 59, n° 2, 201-222.
196. Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, J.F., Rontani, J.F., Giusti, G. et Mattei, G. "Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture". Biotechnol., V. 5, n° 8, (August 1983), 567-572.
197. Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S., "Microbiology". Edit. Dun. Paris. (2004), 891 p.
198. Rontani, J.F., Bosser-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G. et Faure, R., "Analytical study of Ashtart crude oil asphaltenes biodegradation". Chemosphere, V. 14, n° 9, (1985), 1413-1422.
199. Bertrand, J.C. et Mille, G., "Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures". In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), Microorganismes dans les écosystèmes océaniques". Masson (Paris), Chapitre 13, (1989), 343-385.
200. Cooney, J.J. et Summers, R.J., "Hydrocarbon-using microorganisms in three freshwater ecosystems". In: Sharpley, J.M. and Kaplan, A.M. (Eds.), Proceeding of the third International Biodegradation Symposium". Appl. Scien. Publ., Ltd., London, (1976), 141-156.
201. Atlas, R.M., "Effect of the temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation". Appl. Microbiol., V. 30, n° 3, (April 1975), 396-403.
202. Ratledge, C., "Degradation of aliphatic hydrocarbons". In: Watkinson, R.J. (Ed.), Devel. Biodegrade. hydrocarbon., Appl. Scien. Publ. London, United Kingdom. (1978), 1-46.
203. Kaplan, N., Zosim, Z. et Rosenberg, E., "Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 Emulsan by using pure polysaccharide and protein". Appl. Environ. Microbiol., V. 53, n° 9, (September 1987), 440-446.

204. Hommel, R.K., "Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates". In: Ratledge, C. (Ed.). *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht, Boston. Kluwer Academic Publ., (1994), 63-87.
205. Goswami, P. et Singh, D.H., "Different modes of hydrocarbons up-take by two *Pseudomonas* species". *Biotechnol. Bioengin.* V. 37, n° 1, (January 1991), 1-11.
206. Broderick, L.S. et Cooney, J.J., "Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems". *Dev. Ind. Microbiol.*, V. 23, n° 1, (January 1982), 425-434.
207. Pines, O. and Gutnick, D., "Role of emulsan in Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on crude oil". *Appl. Environ Microbiol.*, V. 51, n° 3, (March 1986), 661-663.
208. Zhang, Y. et Miller, R.M., "Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid surfactant (biosurfactant)". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 58, n° 10, (October 1992), 3276-3282.
209. Atlas, R.M. and Bartha, R., "Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature". *Canadian J. Microbiol.*, V. 18, n° 3, (May 1972), 1851-1855.
210. Walworth, J., Braddock, J. et Woolard, C. "Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil". *Cold Region Scien. Technol.*, V. 32, n° 2-3, (November 2000), 85-91.
211. Sandvik, S., Lode, A. et Pederson, T.A., "Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V. 23, n° 3-4, (October 1986), 297-301.
212. Song, H.G., Wang, X. et Bartha, R., "Bioremediation potential of terrestrial fuel spills". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 56, n° 3, (December 1990), 652-656.
213. Rike, A.G., Haugen, K.B., Borrensen, M., Engene, B. et Kolstad, P., "In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils". *Cold Region Scien. Technol.*, V. 37, n° 2, (September 2003), 97-120.
214. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. et Michaelis, W., "Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*". *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 66, n° 2, (February 2000), 518-523.

215. Bossard, I. et Bartha, R., "The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas". R.M. (Ed.). Petrol. Microbiol. Macmil., New York, (July 1984), 440-445.
216. Röling, W.F.M., Head, I.M. et Larter, S.R., "The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects". Resear. Microbiol., V. 154, n° 5, (June 2003), 321-328.
217. Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S. et Laborda, F., "Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5". Internat. Biodet. Biodeg., V. 38, n° 2, (1996), 69-75.
218. Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. et Huling, S., "Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils". Journal of Hazar. mater., V. 51, n° 1, (November 1996), 193-208.
219. El-Kadi, A.I., "Modeling hydrocarbon biodegradation in tidal aquifers with water- saturation and heat inhibition effects". J. Contamin. hydrology, V. 51, n° 1-2, (September 2001), 97-125.
220. Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. et Mueller, J.G., "Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment". Biorem. J., V. 5, n° 2, (2001), 145-157.
221. Mohn, W.W. et Stewart, G.R., "Limiting factors for hydrocarbons at low temperature in Arctic soils". Soil Biol. Biochemis., V. 32, n° 8-9, (March 2000), 1161-1172.
222. Al-Mallah, M., "Biodégradation des hydrocarbures dans les milieux sursalés ". Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille II., (1988), 192 p.
223. Tagger, S., Deveze, L. et Le Petit, J., "The conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons at sea". Mar. Poll. Bull., V. 7, n° 9, (September 1976), 172-174.
224. Bertrand, J.C., Al Mallah, M., Acquaviva, M. et Mille. "Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium". Let. Appl. Microbiol., V. 11, n° 5, (November 1990), 260-263.
225. Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. et Mille, G. "Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration". J. Experim. Mar. Biol. Ecol. V. 168, n° 1, (May 1993), 125-138.

226. Ward, D.M. et Brock, T.D., "Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments". Appl. Environ. Microbiol., V. 35, n° 2, (February 1978), 353-359.
227. Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C. et Gauthier, M., "Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by marine halotolerant bacterium. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*". System. Appl. Microbiol, V. 19, n° 1, (March 1996), 113-121.
228. Dibble, J.T. et Bartha, R., "Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge". Appl. Environ. Microbiol., (April 1979), V. 37, n° 4, 729-739.
229. Hambrick, B.A., Delaune, R.D. et Patrick, W.H. "Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation". Appl. Environ. Microbiol., V. 40, n° 2, (August 1980), 625-369.
230. Schwarz, J.R., Walker, J.D. et Colwell, R.R., "Hydrocarbon degradation at ambient and in situ Pressure". Appl. Microbiol., V. 28, n° 6, (December 1974), 982-986.
231. Schwarz, J.R., Walker, J.D. et Colwell, R.R., "Deep-sea bacteria: growth and utilization of nhexadecane at in situ temperature and pressure". Canadian J. Microbiol., V. 21, n° 5, (May 1975), 682-687.
232. EPA., "In Situ Treatment Technologies for Contaminated Soil, United States Environmental Protection Agency, EPA 542/F-06/013", (November 2006), <http://www.epa.gov>.
233. Alberta Environment, "Alberta Tier 2: Soil and groundwater remediation guidelines, Alberta Government", (February 2009), <http://environment.gov.ab.ca/info/library/7752.pdf>.
234. Edwards D.A., Luthy R.G. et Liu Z., "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions". Environ. Sci. Technol., V. 25, n° 1, (January 1991), 127-133.
235. Liu Z., Edwards D.A., Luthy R.G., "Sorption of non-ionic surfactants on to soil". Water Res , V. 26, n° 10, (October 1992), 1337-1345.
236. Pennell, K.D., Abriola, L.M. et Weber, W.J., "Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soil columns: 1, Experimental Investigation". Environ. Sci. Technol., V. 27, n° 12, (November 1993), 2332-2340.

237. Deshpande S., Shiau B.J., Wade D., Sabatini D.A. et Harwell J.H., "Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing". *Water Res.*, (February 1999), V. 33, n° 2, 351-360.
238. Khalladi, R., Benhabiles, O., Bentahar, F., Moulai-Mostefa, N., "Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil". *J. Hazard. Mater.*, (Septembre 2009), V. 164, n° 2-3, 1179-1184.
239. <http://lequotidienalgerie.org/2012/11/17/les-gisements-de-hassi-messaoud-et-hassi-rmel-en-declin-affirmatif-constat-2eme-partie/>
240. <http://www.sonatrach-dz.com/nos-activitees.html>
241. Khodja, M., "Les fluides de forage : Etude des performances et considerations environnementales". (2008), Thèse Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. France.
242. Marchal, N., Bourdon, J.L. et Richard, C.L., "Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries". Paris, Doin Edit., (1982), 225-226.
243. Tortora, G.J., Funke, B.R. et Case, C.L., "Introduction à la microbiologie". Ed. de Renouv. pédagog., (2003), 157-355.
244. Figarella, J et Leyral, G., "Microbiologie technique". ISSN, (2006), 363 p.
245. Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D., Lee, T.H., "Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L417". *Biotechnology Appl. Biochemis.*, V. 31, n° 3, (June 2000), 249-253.
246. Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L. et Ward, C.H., "Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria". *J. Industrial Microbiol*, V. 8, n° 4, (November 1991), 237-245.
247. Bodour, A.A. Gerrero-Barajas, C. et Maier, M., "Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavolipid* sp, Strain MTN11". *App. Environ. Microbiol.*, (January 2004), V.10, n° 1, 114-120.
248. Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S. et Narasimhan, B., "In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava*". *L. J. Pharm. Bioall. Scien.*, V. 3, n° 2, (April 2011), 226-229.
249. Kim, H.S., Jeon, J.W., Seong-Bin Kim, S.B., Oh, M., Kwon, T.J. et Yoon, B.D., "Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *candida Antarctica*". *Biotechnol. let.*, V. 24, n° 19, (October 2002), 1637-1641.

250. Yin, H., Qiang, J., Jia, Y., Ye, J., Peng, H., Qin, H., Zhang, N. et He, B., "characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oilcontaining wastewater". Proc. Biochem., V. 44, n° 3, (March 2009), 302-308.
251. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. et Smith, F., "Colorimetric methods for determination of sugars and related substances". Anal. Chem., V. 28, n° 3, (March 1956), 350-356.
252. Turcovskaya, O.V, Dmitrieva, T.V., Muratora, A.YU., "A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain". Appl. Biochemis., V. 37, n° 1, (January 2001), 71-75.
253. Amann, R.I., Stromley, J., Devereux, R., KEY, R. et Stahl, D.A., "Molecular and microscopic identification of sulfate reducing bacteria in multispecies biofilm". Appl. Envir. Microbiol, V. 58, n° 2, (February 1992), 614-623.
254. Winker, S. et Woese, C.R. "A definition of the domains archaea, bacteria and eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics". Syst. Appl. Microbiol. V. 14, n° 4, (October 1991), 305–310.
255. Hall, V, O'Neill, G.L, Magee, J.T et Duerden, B.I., "Development of amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Actinomyces* species and comparison with pyrolysis-mass spectrometry and conventional biochemical tests". J. Clin. Microbiol. V. 37, n° 7, (July 1999), 2255-2261.
256. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D.J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucl. Acids Res., V. 25, n° 17, (July 1997), 3389-3402.
257. Benson, D.A., Mizrachi, I.K., Lipman, D.J., J Ostell, J., Rapp, B A. et Wheeler, D.L., "GenBank.Nucleic Acids Research", (October 1999), V. 12, n° 3, 255-267.
258. INERIS. "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Anthracène". Site web: <http://www.ineris.fr>, (2006).
259. Zhu, L. et Feng, S., "Water solubility enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed surfactant solutions". Acta Sci. Circ., V. 22, (June 2002), 774-778.
260. Bergey, R. "Bergey's manual of systematic bacteriology". 9^{ème} édition. (1984), 964 p.
261. Bouvet, P.J.M. et Grimont, P.A.D., "Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacterbaumannii* sp. nov.,

- Acinetobacterhaemolyticus* sp. nov., *Acinetobacterjohnsonii* sp. nov., and *Acinetobacterjunii* sp. nov. et emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacterlwoffii*". Int. J. Syst. Bacteriol., V. 36, n° 2, (April 1986), 228-240.
262. Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. et Kersters, K., "*Ochrobactrumanthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd". Int. J. Syst. Bacteriol., V. 38, n° 4, (October 1988), 406-416.
 263. Forquin, M.P., "Etude de *Brevibacterium aurantiacum*, une bacteria d'affinage de fromage: de son metabolisme du soufre à son interaction avec *Kluyveromyces lactis*". Thèse. PhD. Agroparis Tech., (2010).
 264. Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Mehranian, M., Shahraki, A.K., Zolfagharian, F., Emadi, M.A. et Roayaei, E., "Isolation of thermotolerant, halotolerant, facultative biosurfactant-producing bacteria". Appl. Microbiol. Biotechnol., V. 80, n° 6, (October 2008), 1073-1085.
 265. Prieto, L.M., Michelon, M., Burkert, J.F.M., Kalil, S.J., Burkert, C.A.V., "The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil". Chemosp., V. 71, n° 9, (April 2008), 1781-1785.
 266. Khade, R. et Debjani, D., "Studies on biosurfactant production by *Ochrobactrum anthropi* isolated from petroleum contaminated sites". Asian J. Microbial. Biotechnol. Environ. Scien., V. 10, n° 3, (March 2008), 591-599.
 267. Seghal-Kiran, G., Sabu, A. et Selvin, J., "Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19". J. Biotechnol., (August 2010a), V. 148, n° 4, 221-225.
 268. Snehal, R., Mutalik-Bhalchandra, K., Renuka, M.J., Desai, M. et Sanjay, N., "Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* sp. MTCC 2574". Biores. Technol., V. 99, n° 16, (November 2008), 7875-7880.
 269. Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M. et Manresa, A., "Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils". J. Appl. Microbiol., (March 2000), V. 88, n° 3, 379-387.
 270. Konar, V. et Kahyaoglu, M., "The utilize of industrial waste substrate for rhamnolipid biosurfactants production and application potential". J. l'Insti. Scienc. Technol., ISSN, V. 12, n° 1, (December 2006), 1302- 3055.
 271. http://www.formulaction.com/stabilite_analyse-emulsions-suspensions-mousses.html. 2009

272. Calvo, C., Silva-Castro, G.A., Uad, I., García-Fandiño, C., Laguna, J., González-López, J., "Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays". J. Indust. Microbiol. Biotechnol., V. 35, n° 11, (November 2008), 1493-1501.
273. Saravanakumari, P. et Mani, K., "Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens". Biores. Technol., V. 101, n° 22, (November 2009), 8851-8854.
274. Seghal-Kiran, G., Anto-Thomas, T., Joseph, s., Sabarathnam, B. et Lipton, A.P., "Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture". Bioresource Technology, V. 101, n° 7, (April 2010b), 2389-2396.
275. Makkar, R.S. et Cameotra, S.S., "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications". App. Microbiol. Biotechnol., V. 58, n° 4, (March 2002), 428-434.
276. Ivshina, I.B., Kuyukina, M.S., Philp, J.C. et Christofi, N., "Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species". World J. Microbiol. Biotechnol., V. 14, n° 5, (October 1998), 711-717.
277. Abu-Ruwaida, A. S., Banat, I. M., Haditirto, S., Salem, S. et Kadri, M., "Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation". Acta Biotechnol. V. 11, n° 4, (January 1991b), 315–324.
278. Pornsunthorntawe, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M. et Rujiravanit, R., "Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil". Bioresource Technology, V. 99, n° 6, (April 2008), 1589–1595.
279. Shavandi, M., Mohebal, G., Haddadi, A., Shakarami, H. et Nuhi, A., "Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6". Coll. Surf. B. Biointer., V. 82, n° 2, (February 2011), 477-482.
280. Jung, H.K., Lee, J.B., Yim, G.B. et Kim, E.K., "Properties of microbial surfactant S-acid". Korea J. Biotechnol. Bioengin., V. 10, n° 1, (March 1995), 71-77.
281. Banat, I.M., "Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation". a review, Biores. Technol., V. 51, n° 1, (October 1995), 1-12.

282. Reddy, B.R. et Sethunathan, N., "Salinity and the persistence of parathion in flooded soil". *Soil Biol. Biochemis.*, V. 17, n° 2, (January 1985), 235-239.
283. Minai-Tehrani, D., Minoui, S. et Herfatmanesh, A., "Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil". *Contamin. Toxicol.*, V. 82, n° 2, (February 2009), 179-184.
284. Suk, W.S., Lim, H.J. et Lee, S.J., "Compositional analysis and some properties of biosurfactant from *Pseudomonas* sp. SW1". *Korea J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V. 27, n°1, (February 1999), 41-45.
285. Seghal-Kiran, S., Sabarathnam, B. et Selvin, J., "Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*". *FEMS Immunol. Medic. Microbiol.*, (August 2010c), V. 59, n°3, 432-438.
286. Ron, E. et Rosenberg, E., "Natural roles of biosurfactants". *Environ. Microbiol.*, V. 3, n° 4, (April 2001), 229-236.
287. Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A. et Villemur, R., "Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecul. Cell Biol. Lip.*, V. 1440, n° 2-3, (September 1999), 244-252.
288. Wadekar, S. D., Patil, S. V., Kale, S. B., Lali, A.M., Bhowmick, D. N. et Pratap, A. P., "Structural Elucidation and Surfactant Properties of Rhamnolipids Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on Sweet Water as Carbon Source and Stabilization Effect on Foam Produced by Sodium Lauryl Sulfate". *Tens. Surfact. Deterg.*, V. 48, n° 1, (November 2010), 286-292.
289. Teyssier, J., Gaubert, J.L., Bouquet, P.M., Maton, C. et Bocquier, F., "Utilisation de mini-bolus pour l'identification électronique des ovins : évaluation du taux de rétention et des effets de changement de conduite". *Rencontres Recherches Ruminants*, V.10, (2003), 117 P.
290. Wong, W.C.J; Zhao, Z. et Zheng, G. "Biosurfactants from *Acinetobacter Calcoaceticus* BU03 enhance the bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Wat. Ener.*, V. 15, n° 1-5, (July 2010).
291. Rao, K. J. "Solubilization and Biodegradation of Naphthalene in Presence of *Sapindus Mukoross*'. *Synthetic Mixed Surfactant Systems*". *MTech by Research thesis*. V. 113, n° 2, (January 2009), 474-481
292. Abouseoud, M., Yataghene, A., Amrane, A. et Maachi, R., "Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a

- biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*". J. Hazar. Mater., V. 180, n° 1-3, (August 2010), 291-296.
293. Pennell, K.D., Abriola, L.M. et Weber, W.J., "Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soil columns: 1. Experimental Investigation". Environ. Sci. Technol., V. 27, n° 12, (November 1993), 2332-2340.
 294. Anand S. Nayak, M.H. Vijaykumar, T.B. Karegoudar., "Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation". Internat. Biodeter. Biodegr. V. 63, n° 1, (January 2009), 73–79.
 295. Hua, Z., Chen, J., Lun, S. et Wang, X., "Influence of biosurfactants produced by *Candida Antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkane". Water Research, V. 37, n° 17, (October 2003), 4143-4150.
 296. Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Ben Younes, S., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M. et Sayadi, S., "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. Strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation". J. Bas.Microbiol., V. 51, n° 6, (December 2011), 1-11.
 297. Cheng, K. B., Jian, Z. et Wang, Z. "Emulsification Properties of Bacterial Biosurfactants Native to the Yellow River Delta on Hexadecane and Diesel Oil". Biotechnol., V. 7, n° 2, (July 2008), 135-140.
 298. Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M. et Sayadi, S. "Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria". J. Appl. Microbiol. V. 111, n° 3, (September 2011), 525–536.
 299. Wayman, M., Jenkins A.D., et Kormendy, A.G., "Biotechnology for the oils and fats industry". V. 61, n° 1, (July 1984), 129–131.

Publications internationales

1. **Ferhat Samira**, Mnif Sami, Badis Abdelmalek, Eddouaouda Kamel, Alouaoui Redha, Boucherit B, Mhiri Najla, Moulai-Mostefa Nadji et Sayadi Sami. (2011). Production et caractérisation préliminaire des biosurfactants produits par *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolées à partir du sol contaminé par les hydrocarbures. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65, 1182-1188.
2. Eddouaouda Kamel, Mnif Sami, Badis Abdelmalek, Ben Younes Sonia, Cherif Slim, **Ferhat Samira**, Mhiri Najla, Chamkha Mohamed et Sayadi Sami. (2011). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites. *Journal of Basic Microbiology*. 51, 1 – 11.

Communications internationales

- Ferhat S, Abousseoud M, Moulai-Mostefa N. Optimisation des conditions de croissance et caractérisation de biosurfactant produit par *Pseudomonas Fluorescens* et d'applications environnementales. Symposium international de biotechnologie 4-8 mai, 2008.Sfax. Tunisie
- Ferhat S, Mnif S, Eddoueouda K, Alouaoui R, Badis A et Sayadi S. Synthèse et caractérisation de biosurfactants produits par *Pseudomonas* isolée localement. Les cinquièmes journées scientifiques de microbiologie (STM). 30-31 Octobre et 1^{er} Novembre, 2009.Hammamet. Tunisie
- Ferhat S, Mnif S, Eddoueouda K, Alouaoui R, Badis A et Sayadi S. Synthèse et caractérisation de biosurfactants produits par *Brevibacterium* sp isolée d'un sol anciennement contaminé. Journées internationales de biotechnologie. 19-22 Décembre 2010. Yasmine Hammamet. Tunisie
- Ferhat S, Mnif S, Eddoueouda K, Alouaoui R, Badis A et Sayadi S. Production et caractérisation préliminaire de biosurfactants efficaces à

partir de deux souches bactériennes (*Ochrobactrum* sp 1C and *Brevibacterium* sp 7G) isolées de sol contaminé par les hydrocarbures. Journées internationales de biotechnologie. 19-22 Décembre, 2011. Sousse. Tunisie

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

Une communication nationale orale

Ferhat S, Badis A, Abousseoud M et Moulai-Mostefa N. Optimisation des conditions de croissance et caractérisation de biosurfactant produit par *Pseudomonas Fluorescens* en vue d'applications environnementales. Premier séminaire national sur les bioprocédés SNBP1. 12-13 Octobre 2008. Médéa. Algérie.