

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté de Technologie
Département de Génie des procédés

THÈSE DE DOCTORAT

En chimie industrielle

**BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES
POLYCYCLIQUES ET PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS PAR
DES SOUCHES BACTERIENNES THERMOPHILES ISOLEES A
PARTIR D'UN SOL CONTAMINE PAR LE PETROLE BRUT DE LA
REGION DE HASSI-MESSAOUD**

Par

Fatma Zohra MESBAIAH

A. AOUABED	Professeur, Université de Blida 1	Président
M. ABOU-SAOUD	Professeur, Université YF de Médéa	Examineur
H. LOUNICI	Professeur, Université de Bouira	Examineur
M. EL-HATTAB	Professeur, Université de Blida 1	Examineur
L. LAMARI	Professeur, ENS de Kouba	Examinatrice
A. BADIS	Professeur, Université de Blida 1	Directeur de thèse
K. EDDOUAOUDA	MCB, Université de Blida 1	Invité

Blida, 2015

ملخص

تهدف هذه الدراسة الى اختبار قدرة سلالة بكتيرية محبة للحرارة المرتفعة، عزلت من تربة ملوثة بالبترول الخام، على تفكيك ا لهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات و إنتاج المفاعلات السطحية البيولوجية.

ان السلالة 1C والمعروفة بـ *Paenibacillus popilliae* بنسبة تطابق قدرت بـ 98,4% قادرة على تفكيك النفثالين و الانتراسين تحت درجة حرارة 45 م° كما أظهرت دراسة تأثير مفاعلات السطح الكيميائية أن اضافة هذه المفاعلات ليس لها تأثير كبير على نسبة التفكيك و أن السلالة 1C قادرة على تفكيك ا لهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات بدون اضافة مفاعلات السطح الكيميائية.

ان السلالة 1C قادرة على استعمال الانتراسين كمصدر للكربون و الطاقة، 92.58% من الانتراسين تم تفكيكه بعد 48 سا تحت درجة حرارة 45 م°. ان مواد الاستقلاب الأساسية لتفكيك الانتراسين هي 10،9 انتراكينون و حمض الفتالين.

بينت دراسة مقارنة لمجموع النتائج المتعلقة بإنتاج ، خصائص و تطبيق المفاعل السطحي البيولوجي المستخرج من السلالتين 1J و 1C أن زيت الزيتون يعتبر أحسن مصدر للكربون حيث أن توتر السطح كان على الترتيب 32,6 و 33,3 و التركيز الحرج CMC يساوي 0,5 و 1 مغ/ل. أن أحسن استقرار حراري (من 4 الى 70 م°)، كيميائي (pH من 2 إلى 12) و الهلوجة من 0 إلى 20% من NaCl. تعتبر المفاعلات السطحية المدروسة ، مذيبي جيد و تمكّن من تفكيك الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات و كذلك مضاد جي للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات - التحليل الجيوي - المفاعل السطحي البيولوجي - المعالجة البيولوجية.

RESUME

La capacité de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de produire des biosurfactants par une souche bactérienne thermophile isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut a été étudiée.

La souche 1C, identifié comme *Paenibacillus popilliae* avec un pourcentage de similitude de 98,4%, est capable de dégrader les HAP (naphtalène, anthracène et pyrène) dans des conditions thermophiles (45 °C). Les résultats de l'effet des surfactants chimiques sur la biodégradation de naphtalène et d'anthracène par la souche 1C montrent que l'ajout de ces substances n'a aucun effet significatif sur le taux de dégradation et que cette souche peut utiliser les HAP sans l'ajout de surfactants chimiques.

La souche 1C est capable d'utiliser l'anthracène comme source de carbone et d'énergie. Un taux de 92,58% a été enregistré après 48 h d'incubation à 45°C. La dégradation de l'anthracène (100 mg/l) est optimale dans un milieu acide-neutre (4 – 8,5) et salin (jusqu'à 8%). L'étude des métabolites de dégradation d'anthracène par la souche 1C montre que l'anthracène est transformé en 9,10 anthraquinone et ensuite en acide phtalique.

Une étude comparative sur la production des biosurfactants par deux souches thermophiles 1C et 1J a montré que l'huile d'olive est la meilleure source de carbone et d'énergie de production. Les deux biosurfactants produits par les deux souches 1C et 1J réduisent la tension de surface jusqu'à 32,6 et 33,3 mN /m, respectivement. Les deux biosurfactants ont conservé leurs propriétés tensioactives après exposition à des températures élevées (70 °C), des salinités relativement élevées (0-20% de NaCl) et une large gamme du pH (2-10). Les concentrations micellaires critiques (CMC) des biosurfactants produits par les souches 1C et 1J sont respectivement de 0,5 et 1g/l. En outre, La solubilité des HAP a été améliorée en présence de ces deux biosurfactants et montrent une activité antimicrobienne significative contre les agents pathogènes.

Mots clés: HAP – Bactéries thermophiles – Tensioactifs – Biodégradation Biosurfactants – Bioremédiation.

ABSTRACT

The ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and biosurfactant production by a bacterial thermophilic strain isolated from crude oil contaminated soil was studied.

The strain 1C identified as *Paenibacillus popilliae* with a similitude percentage of 98.4% was able to degrade PAHs (anthracene and pyrene) in thermophilic conditions (45 °C). The effect of the addition of chemical surfactants on naphthalene and anthracene biodegradation by 1C strain was studied; the results show that the addition of chemical surfactants has no significant effect on the degradation rate. The strain 1C can use PAHs without surfactants addition.

The strain 1C was able to use anthracene as carbon and energy source, 92,58% was degraded after 48h of incubation at 45°C. Optimal conditions were pH 7 and up to 8% of salinity. Anthracene was methabolised *via* 9,10 anthraquinone to phtalic acid.

In comparative study of the biosurfactant production of by two strains 1C and 1J showed that olive oil is the best production source. Both biosurfactant produced by the strain 1C and 1J reduces the surface tension to 32,6 and 33,3 mN / m, respectively. The two biosurfactants have retained their surface active properties after exposure to elevated temperatures (70 °C), relatively high salinity (20% NaCl) and a wide pH range (2-10). The critical micelle concentration (CMC) is 0,5 g / l and 1 g / l for the biosurfactant produced by the strain 1C and 1J, respectively. In addition, the two biosurfactants improve solubility of PAH showed significant antimicrobial activity against pathogens.

Keywords: HAPs – thermophilic strains – surfactants – Biodegradation – Biosurfactants –Bioremediation.

A ma famille
Avec amour et gratitude

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie et le laboratoire pédagogique de Microbiologie et de Biochimie, département de génie de procédés, université Blida 1.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, monsieur Abdelmalek BADIS, professeur à l'université Blida 1, de m'avoir fait confiance, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses conseils, recommandations et remarques constructives qui ont permis le bon déroulement du travail.

Mes remerciements vont également à monsieur Kamel EDDOUAOUDA, maitre de conférence B, à l'université de Blida 1, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Sami Sayadi, directeur du laboratoire de bioprocédés environnementaux (LBPE-CBS, Tunisie), pour les conditions d'accueil permettant le bon déroulement de nos travaux de recherche.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Ali AOUABED, Professeur à l'université de Blida 1, qui m'a fait un grand honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : Madame Lynda LAMARI, Professeur à l'École Normale Supérieure de Kouba, Monsieur Mahmoud ABOUSEOUD, Professeur à l'université Yahia Ferès de Médéa, Monsieur Hakim LOUNICI ; professeur à l'université de Bouira et Monsieur Mohamed EL-HATTAB Professeur à l'université de Blida 1.

Je voudrais remercier également mes collègues du CNRDPA pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Je souhaite également remercier tous les membres de ma famille pour leur soutien absolu et inconditionnel et leurs encouragements illimités

Enfin je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS.....	4
INTRODUCTION GENERALE.....	13
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
1.1 Les hydrocarbures aromatiques polycyclique.....	16
1.1.1 Définition	16
1.1.2 Source d'émission	16
1.1.3 Propriétés physico-chimiques	16
1.1.4 Toxicité des HAP	17
1.1.5 Les HAP dans l'environnement	18
1.1.6 Remédiation des sites contaminés.....	18
1.2 Biodégradation des HAP	19
1.2.1 Mécanismes de biodégradation des HAP	20
1.2.1.1 Biodégradation des HAP à faible poids moléculaire (Anthracène) .	22
1.2.1.2 Biodégradation des HAP à haut poids moléculaire (Pyrène).....	25
1.2.2 Facteurs affectant la biodégradation des HAP	27
1.3 Les surfactants	29
1.3.1 Classification des surfactants.....	29
1.3.2 Comportement des surfactants en solution	30
1.3.3. Dégradation des HAP en présence des surfactants	31
1.4 Biosurfactants.....	37
1.4.1 Classification des biosurfactants	37
1.4.2 Avantages des biosurfactants	38
1.4.3 Production de biosurfactant	39
1.4.4 Facteurs affectant la production de biosurfactant	42
1.4.4.1. Effet de la source de carbone	42
1.4.4.2. Effet de la source d'azote	42
1.4.4.3. Effet des facteurs environnementaux.....	42
1.4.5 Criblage des microorganismes producteurs	43
1.4.6 Application des biosurfactants.....	44
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	49
2.1 Origine et isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes	49
2.2.1 Repiquage des souches et préparation des précultures.....	50
2.2.2 Milieu de dégradation des hydrocarbures.....	50
2.3 Biodégradation des HAP en présence des surfactants chimiques	50
2.3.1 Croissance de la souche 1C sur les surfactants.....	51

2.3.2 Biodégradation de naphthalène et de l'anthracène	51
2.4 Etude de la biodégradation des HAP	52
2.4.1 Facteurs influençant la biodégradation de l'anthracène.....	52
2.4.2 Identification des métabolites de la biodégradation d'anthracène.....	53
2.4.3 Croissance de la souche 1C sur le pyrène	53
2.4.5 Croissance de la souche 1C sur d'autres composés aromatiques	53
2.5 Production de biosurfactants	54
2.5.1 Optimisation de la production de biosurfactants	56
2.5.1.1 Effet de la source de carbone	56
2.5.1.2 Effet de la source d'azote	56
2.5.1.3 Optimisation de la concentration de la source de carbone, pH et salinité.....	56
2.5.2 Extraction des biosurfactants	58
2.5.3 Caractérisation des biosurfactants	58
2.5.3.1 Caractérisation biochimique et structurale	58
2.5.3.2 La concentration micellaire critique.....	58
2.5.3.3 Pouvoir émulsifiant	59
2.5.3.4 Activité antimicrobienne.....	59
2.5.4 Etude de la stabilité des biosurfactants.....	60
2.5.4.1 Stabilité chimique	60
2.5.4.2 Stabilité thermique.....	60
2.5.5 Solubilité des hydrocarbures par les deux biosurfactants.....	60
2.6 Identification des souches bactériennes	61
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS	62
3.1 Biodégradation des HAP en présence des surfactants chimiques	62
3.1.1 Croissance de la souche 1C sur les surfactants chimiques	62
3.1.2 Biodégradation de naphthalène en présence de surfactant.....	63
3.1.3 Biodégradation de l'anthracène en présence de surfactant.....	65
3.2 Biodégradation d'anthracène par la souche 1C	68
3.2.1 Croissance de la souche 1C sur l'anthracène	69
3.2.2 Effet de la concentration de l'anthracène	70
3.2.3 Effet du pH.....	72
3.2.4 Effet de la salinité.....	73
3.2.5 Métabolisme de dégradation d'anthracène.....	74
3.3 Biodégradation du pyrène par la souche 1C.....	76
3.4 Capacité biodégradative la souche 1C	79
3.5 Production de biosurfactants	80

3.5.1 Effet de la source de carbone sur la production de biosurfactants	80
3.5.2 Etude cinétique de la production de biosurfactants	82
3.5.3 Effet de la source d'azote sur la production de biosurfactants	84
3.5.4 Optimisation de la production des biosurfactants par les souches 1C et 1J	85
3.5.5 Caractérisation des biosurfactants	100
3.5.6. Détermination de la concentration micellaire critique	103
3.5.7. Stabilité des biosurfactants	105
3.5.8 Activité émulsifiante des biosurfactants.....	108
3.5.9 Solubilisation des HAP	110
3.5.10. Activité antimicrobienne	112
3.6 Identification des souches 1C et 1J	114
Discussion générale	116
CONCLUSION GENERALE	120
REFERENCES	122

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 Structures chimiques et caractéristiques de quelques HAP classés prioritaires.....	17
Figure 1.2 Différentes voies de dégradation aérobie des HAP	22
Figure 1.3 Synthèse des voies métaboliques de la dégradations bactérienne aérobie d’anthracène.....	24
Figure 1.4 Synthèse des voies métaboliques de la dégradations bactérienne aérobie du pyrène.....	26
Figure 1.5 Représentation schématique d’un surfactant.....	29
Figure 1.6 Comportement des tensioactifs en milieu aqueux – phénomène de micellisation.....	31
Figure 1.7 Détermination de la CMC par mesure de tension superficielle.....	31
Figure 1.8 Mécanismes proposés pour l’incorporation des HAP à l’intérieur des cellules bactériennes par l’intermédiaire de surfactant.....	35
Figure 1.9 Structure de quelques biosurfactants.....	38
Figure 2.1 Sols contaminés par le pétrole brut.....	49
Figure 2.2 Réalisation du test d’émulsification (E_{24}).....	55
Figure 2.3 Technique de déplacement d’huile (oil displacement test).....	55
Figure 3.1 Croissance bactérienne sur les trois surfactants.....	62
Figure 3.2 Biodégradation du naphthalène en présence de surfactants.....	64
Figure 3.3 Biodégradation d’anthracène en présence de surfactants	66
Figure 3.4 Cinétique de la croissance de la souche 1C sur l’anthracène.....	69
Figure 3.5 Chromatogramme de dégradation d’anthracène par la souche 1C.....	70
Figure 3.6 Effet de la concentration d’anthracène sur Le taux de dégradation après 48h d’incubation.....	71
Figure 3.7 Effet du pH sur le taux de dégradation d’anthracène après 48h d’incubation.....	72
Figure 3.8 Effet de la salinité sur le taux de dégradation après 48h d’incubation.....	73
Figure 3.9 Spectres de masse de métabolites de la dégradation d’anthracène par la souche 1C.....	75
Figure 3.10 Cinétique de croissance de la souche 1C sur le pyrène.....	77
Figure 3.11 Chromatogramme de dégradation du pyrène par la souche 1C.....	78
Figure 3.12 Variation de la tension de surface durant la croissance de la souche 1C sur le pyrène.....	78
Figure 3.13 Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant par la souche 1C.....	81
Figure 3.14 Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par la souche 1J.....	82
Figure 3.15 Production de biosurfactant par les souches 1C et 1J en présence	

l'huile d'olive.....	82
Figure 3.16 Diamètre de déplacement de pétrole brut de biosurfactants après 24 h d'incubation.....	83
Figure 3.17 Variation de la tension de surface durant la croissance sur l'huile d'olive.....	83
Figure 3.18 Effet de la source d'azote sur la production de biosurfactants.....	85
Figure 3.19 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de la croissance bactérienne de la souche 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	89
Figure 3.20 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de la croissance bactérienne de la souche 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	90
Figure 3.21 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de DDP biosurfactant 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	93
Figure 3.22 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de DDP biosurfactant 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	94
Figure 3.23 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de TS biosurfactant 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	97
Figure 3.24 Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de TS biosurfactant 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).....	98
Figure 3.25: Courbes d'isoréponses de TS et DDP (A : biosurfactant 1C, B : biosurfactant 1J).....	99
Figure 3.26 Biosurfactants produits par les deux souches (1% huile d'olive): a- souche 1C, b- souche 1J.....	101
Figure 3.27 Spectre IR du biosurfactant produit par la souche 1J.....	102
Figure 3.28 Spectre IR du biosurfactant produit par la souche 1C.....	102
Figure 3.29 Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant 1C.....	104
Figure 3.30 Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant 1J.....	104
Figure 3.31 Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants produits par les des deux souches (1J et 1C).....	105
Figure 3.32 Effet du pH sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches 1J et 1C.....	106
Figure 3.33 Effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches 1J et 1C.....	107
Figure 3.34 Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche 1C.....	108
Figure 3.35 Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche 1J.....	109
Figure 3.36 Effet de biosurfactant produit par la souche 1C sur la solubilisation d'antracène, phénanthrène et pyrène.....	111
Figure 3.37 Effet de biosurfactant produit par la souche 1J sur la solubilisation d'antracène, phénanthrène et pyrène.....	111
Figure 3.38 Activité antimicrobienne du biosurfactant de la souche 1J.....	113

Figure 3.39 Observation microscopique de la souche 1C: a- microscope optique ; b- microscope électronique.....	114
Figure 3.40 Arbre phylogénétique établie pour la souche 1C.....	115
Figure 3.41 Observation microscopique de la souche 1J.....	115
Tableau 1.1 Microorganismes dégradant les HAP.....	19
Tableau 1.2 Effet des surfactants chimiques sur la biodégradation des HAP.....	34
Tableau 1.3 Différents biosurfactants avec leur source microbienne.....	41
Tableau 1.4 Comparaison entre les techniques de détection des biosurfactants	44
Tableau 1.5 Utilisation en biotechnologie environnementale des biosurfactants.	46
Tableau 2.1 Propriétés des surfactants utilisés.....	51
Tableau 2.2 Domaine d'étude (plans Box-Bhenken pour trois facteurs).....	57
Tableau 2.3 Matrice expérimentale du plan Box-Bhenken.....	57
Tableau 3.1 Analyse statistique (ANOVA).....	67
Tableau 3.2 Croissance de la souche 1C sur différents substrats.....	80
Tableau 3.3 Analyse de la variance (croissance bactérienne).....	88
Tableau 3.4 Analyse de la variance (DDP).....	92
Tableau 3.5 Analyse de la variance (TS).....	96
Tableau 3.6 Concentration minimale inhibitrice du biosurfactant de la souche 1C.....	113

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
CMC	Concentration micellaire critique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DDP	Diamètre du déplacement du pétrole brut
E ₂₄	Activité émulsifiante (indice d'émulsion)
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
LB	<i>Milieu Luria Bertani</i>
MEB	Microscope électronique à balayage
MM	Milieu minimum
TS	Tension de surface

INTRODUCTION GENERALE

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représente un défi majeur auquel doivent inéluctablement faire face les scientifiques et les gestionnaires de l'environnement [1]. Les HAP sont formés par deux cycles benzéniques ou plus, ils sont des constituants naturels des combustibles fossiles et sont générés lors d'une combustion incomplète de la matière organique (hydrocarbures), le charbon et le pétrole brut représentent les principales sources des HAP.

Les HAP sont considérés comme des substances toxiques, persistantes et bioaccumulables dont certains d'entre eux ont été classés comme cancérigènes. En effet, il est donc primordial de mettre en œuvre des moyens de remédiation des sites contaminés. Les voies physiques et chimiques restent très limitées du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement.

La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes, notamment les bactéries, est une méthode plus efficace et économique. En outre, elle ne génère aucun effet secondaire pour l'environnement et la santé humaine [2].

Cependant, l'un des facteurs essentiels limitant l'action des microorganismes sur les HAP est leur faible solubilité dans l'eau, dans ce cas intervient un problème de biodisponibilité. Cet inconvénient est réduit par l'augmentation de la température de dégradation (conditions thermophiles), l'ajout de surfactants chimiques et l'utilisation des hydrocarbonoclastes producteurs de biosurfactants [3-5]. En fait, les biosurfactants jouent un rôle important dans l'élimination des hydrocarbures en accélérant la vitesse du transfert en émulsionnant les hydrocarbures.

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont considérés comme des biotopes prometteurs pour l'isolement des microorganismes ayant un potentiel biodégradatif élevé d'une part et producteurs de biosurfactants d'autre part. Par conséquent, des travaux de recherche antérieure sur la biodégradation du pétrole brut et la production de biosurfactants, par des souches locales isolées à partir de

site contaminé par le pétrole brut (même origine que celle des souches utilisées dans ce travail), ont donné des résultats prometteurs [6-8].

Ce travail de thèse s'intègre dans le cadre des activités de recherche du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) et du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS). Il s'est intéressé plus particulièrement à la bioremédiation des eaux marines contaminées par les hydrocarbures. En effet, ce présent travail a pour objectif d'étudier la solubilisation et l'optimisation de la biodégradation de certains HAP de 2 à 4 cycles (naphtalène, anthracène et pyrène), ainsi d'étudier les voies métaboliques de l'anthracène. Parallèlement, une partie intéressante de l'étude a été consacrée à la production, la caractérisation de biosurfactants ainsi que leur application environnementale par des souches bactériennes thermophiles isolées localement à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud.

Ce présent manuscrit est structuré en trois grandes parties:

La première partie est une synthèse bibliographique qui dresse un état des connaissances sur :

- Les HAP : définition, propriétés physico-chimiques et la pollution par les HAP ;
- Les différentes méthodes de décontamination des sites pollués par les HAP ;
- La bioremédiation qui synthétise l'ensemble des connaissances acquises pour l'élimination des HAP par voie biologique ;
- Les surfactants chimiques et leur impact sur la biodégradation des HAP ;
- Les biosurfactants : propriétés physico-chimiques, classification, leur rôle dans le domaine de la protection de l'environnement et les facteurs affectant leur production.

La deuxième partie s'intéresse à l'étude expérimentale : le matériel et les principales méthodes utilisées.

La troisième partie est consacrée aux résultats et discussions, elle regroupe les différents résultats obtenus sur :

- La biodégradation des HAP par une souche thermophile ;
- L'effet des surfactants chimiques sur la biodégradation des HAP ;
- La production, la caractérisation physico-chimique et structurale et les applications environnementales de biosurfactants issus de deux souches hydrocarbonoclastes;
- L'identification phénotypique et génotypique de deux souches performantes, dégradant les HAP et productrices de biosurfactants.

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

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les hydrocarbures aromatiques polycyclique

1.1.1 Définition

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés [9-10]. Selon le nombre de cycles aromatiques, ils sont classés en HAP légers (ayant deux ou trois cycles) ou lourds (au-delà de trois cycles).

Les HAP sont considérés comme des contaminants importants de l'environnement du fait de leur ubiquité, leur abondance dans l'environnement et/ou de leur toxicité. En raison des risques réels ou potentiels pour la santé humaine ces HAP font partie des listes établies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2004) et de la Communauté Européenne (JOCE, 2004) relatives à la qualité des eaux [11].

1.1.2 Source d'émission

Ils sont issus de la combustion incomplète de matières organiques. L'utilisation du bois, du charbon et du pétrole en tant que combustible a fortement influencé l'accumulation des HAP dans l'environnement. Également, une partie des HAP présents dans l'environnement provient de processus naturels tels que les éruptions volcaniques et les feux des forêts.

1.1.3 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des HAP dépendent de leurs structures et de leurs masses moléculaires et conditionnent leur devenir et leur distribution dans l'environnement. En fait, les HAP sont des composés apolaires, stables et peu volatils. Ils sont très peu solubles dans l'eau, peu mobiles dans le sol car facilement adsorbés sur les matrices solides. Il en résulte que les HAP sont hydrophobes, et persistants. Les valeurs de K_{ow} sont relativement élevées (3,4 – 6,8), ce qui indique un fort potentiel d'adsorption sur la matière organique. Par

suite, leur capacité à pénétrer les membranes biologiques et donc à s'accumuler dans les organismes vivants.

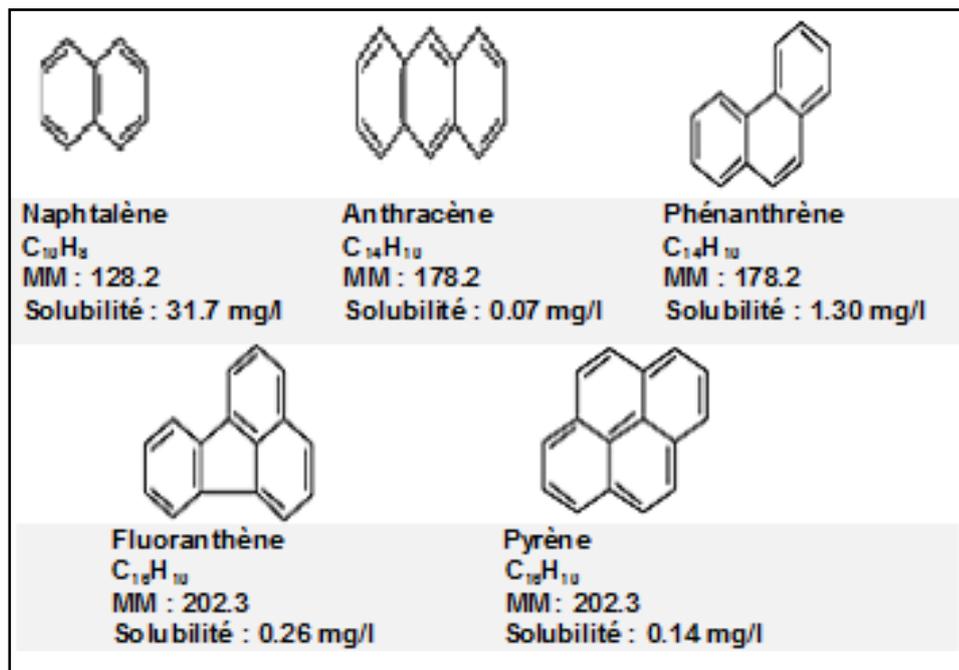


Figure 1.1 Structures chimiques et caractéristiques de quelques HAP classés prioritaires [12].

Les propriétés physicochimiques des 16 HAP sont regroupées dans l'annexe 1.

1.1.4 Toxicité des HAP

La toxicité des HAP augmente également avec le nombre de cycles. La structure moléculaire de certains types de HAP les amène à être transformés dans l'organisme en composés extrêmement toxiques, appelés époxydes et/ou en dérivés hydroxylés. Les époxydes réagissent très facilement avec l'ADN, ce qui peut entraîner des mutations génétiques menant parfois au cancer.

Les données expérimentales disponibles chez l'animal ont montré que certains HAP pouvaient induire spécifiquement de nombreux effets sur la santé, des effets systémiques (hépatiques, hématologiques, immunologiques et développement d'athéroscléroses), et/ou des effets sur la reproduction ainsi que des effets génotoxiques et cancérigènes [13,14].

1.1.5 Les HAP dans l'environnement

Les HAP sont présents dans les écosystèmes sous forme de mélanges plus ou moins complexes. Ils sont émis dans l'atmosphère sous forme de gaz ou de particules. Les HAP de l'air sont souvent adsorbés sur les particules solides. Ils sont ensuite transférés dans le sol et dans l'eau par déposition ou avec les précipitations.

Dans les milieux aquatiques, les HAP sont généralement présents en faibles concentrations en raison de leur hydrophobicité. La plupart d'entre eux sont issus du ruissellement urbain, des retombées atmosphériques, des effluents industriels et du déversement ou fuite de pétrole [15].

1.1.6 Remédiation des sites contaminés

La réglementation internationale, de plus en plus sévère vis-à-vis de l'environnement, a permis le développement et l'optimisation de procédés visant la réduction de la pollution dans les trois compartiments. Ces procédés peuvent être classés en deux catégories : physico-chimiques et biologiques [16].

- **Procédés physico-chimiques** : Plusieurs procédés peuvent être appliqués pour traiter la pollution par les hydrocarbures à savoir : l'injection de l'air ou de la vapeur, la flottation, le lavage, la désorption thermique, l'extraction par solvant, l'oxydation avancée, le traitement électrochimique [17], l'ultrason [18], ou par l'adsorption sur un substrat. Le choix de la technique dépend de la nature, le degré de la pollution et les caractéristiques du milieu.
- **Procédés biologiques** : La bioremédiation est la technologie la plus «écologique». Elle repose sur l'utilisation d'organismes ou micro-organismes afin de dégrader ou d'extraire les polluants : le landfarming, bioventing, bioslurry et la phytoremédiation sont les techniques biologiques les plus utilisées pour remédier les sites contaminés par les hydrocarbures.

1.2 Biodégradation des HAP

La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes, appelés **hydrocarbonoclastes**, a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. La biodégradation des HAP consiste à les dégrader complètement et/ou de les transformer en produits moins nocifs.

A ce jour, les travaux de recherche sur la dégradation biologique des hydrocarbures ont montré que les microorganismes, notamment les bactéries, possèdent la capacité de métaboliser les HAP. Ce qui permet leur application pour remédier les sites contaminés par les HAP [19]. Le tableau 1 donne la liste non exhaustive des microorganismes connus pour leur utilisation des HAP comme source de carbone.

Tableau 1.1 : Microorganismes dégradant les HAP [20].

HAP	Microorganismes
Naphtalène	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. vesicularis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. testosteroni</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Corynebacterium renale</i> , <i>Moraxella sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , et <i>Bacillus cereus</i>
Anthracène	<i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Phodococcus sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> et <i>Arthrobacter sp.</i>
Phénanthrène	<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Streptomyces griseus</i> , et <i>Acinetobacter sp.</i>
Fluoranthène	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. paucimobilis</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , et <i>Pseudomonas sp.</i>
Pyrène	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , et <i>Rhodococcus sp.</i>
Chrysène	<i>Rhodococcus sp.</i>
Benz[a] anthracène	<i>Alcaligenes dentrificans</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , et <i>P. putida</i>
Benzo[a]pyrène	<i>Beijerinckia sp.</i> et <i>Mycobacterium sp.</i>

On distingue deux grandes voies métaboliques : aérobie et anaérobie. Dans le premier cas, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène alors que, dans le deuxième cas, ceux sont des composés autres que l'oxygène (nitrate (NO_3^-), manganèse (MnO_2), fer ferrique (Fe^{3+}), sulfate (SO_4^{2-}), dioxyde de carbone (CO_2) ou la molécule elle-même (fermentation)). Le rendement énergétique du catabolisme dépend de l'accepteur et du donneur d'électron utilisé. Cependant, la dégradation aérobie a été généralement considérée comme une approche prédominante et efficace pour la dépollution des sites contaminés [21,22].

1.2.1 Mécanismes de biodégradation des HAP

Un grand nombre de microorganismes ont la capacité de dégrader les HAP. [23,12]. L'attaque initiale est un processus oxydatif nécessitant l'activation et l'incorporation d'oxygène. Les bactéries oxydent les HAP par l'action d'une dioxygénase qui attaque un des noyaux aromatiques pour former un cis-dihydrodiol. Ce dernier est déshydraté en catéchol par une enzyme déshydrogénase. Dans le cas d'une implication d'une monooxygénase, le clivage est effectué par l'incorporation d'un atome d'oxygène en donnant un oxyde arène qui est oxydé en trans-dihydrodiol puis convertie en catéchol. Ce dernier est un produit intermédiaire à partir duquel peut avoir lieu l'ouverture du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (ortho-fission) ou adjacente (méta-fission) et va conduire à la formation de composés simples (pyruvate, succinate) pouvant entrer dans le métabolisme centrale des bactéries.

En revanche, peu de bactéries sont capables d'utiliser les HAP de haut poids moléculaire comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire se fait généralement par co-métabolisme. Dans ce cas, les bactéries utilisent un substrat structurellement proche aux HAP de haut poids moléculaire (par exemple, un HAP de bas poids moléculaire) pour leur croissance. Les enzymes non spécifiques produits sont alors impliquées dans la biodégradation des HAP de haut poids moléculaire [24]. Les métabolites ainsi formés peuvent être des produits finaux de dégradation, en particulier dans le cas de culture pure. Dans le cas des cultures mixtes, ces produits peuvent être dégradés par d'autres souches présentes.

- **Dégradation par les champignons**

Les champignons utilisent un mécanisme différent par rapport aux bactéries pour la dégradation des HAP. Généralement les champignons ont des vitesses de croissance et de dégradation moins importantes que celles des bactéries. Les voies de dégradation des HAP chez les champignons non lignolytiques, qui sont généralement majoritaires, et les champignons lignolytiques, également connus sous le terme de pourriture blanche, sont différentes. Au moins deux mécanismes sont appliqués : l'un passe par l'utilisation du système enzymatique du cytochrome P450 et l'autre utilise les enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine (la lignine peroxydase, la manganèse peroxydase et les laccases) [25]. La dégradation des HAP par les champignons génère des composés phénoliques, des tétralones, des quinones, ou des diol-époxydes eux-mêmes très réactifs et qui peuvent être toxiques [26, 27].

Il est à noter que les champignons sont capables de dégrader les HAP de haut poids moléculaire produisant des intermédiaires plus solubles et plus réactifs, qui sont potentiellement métabolisables par certaines bactéries aérobies [28]. Les principales voies de dégradation microbienne des HAP sont illustrées dans la figure 1.2.

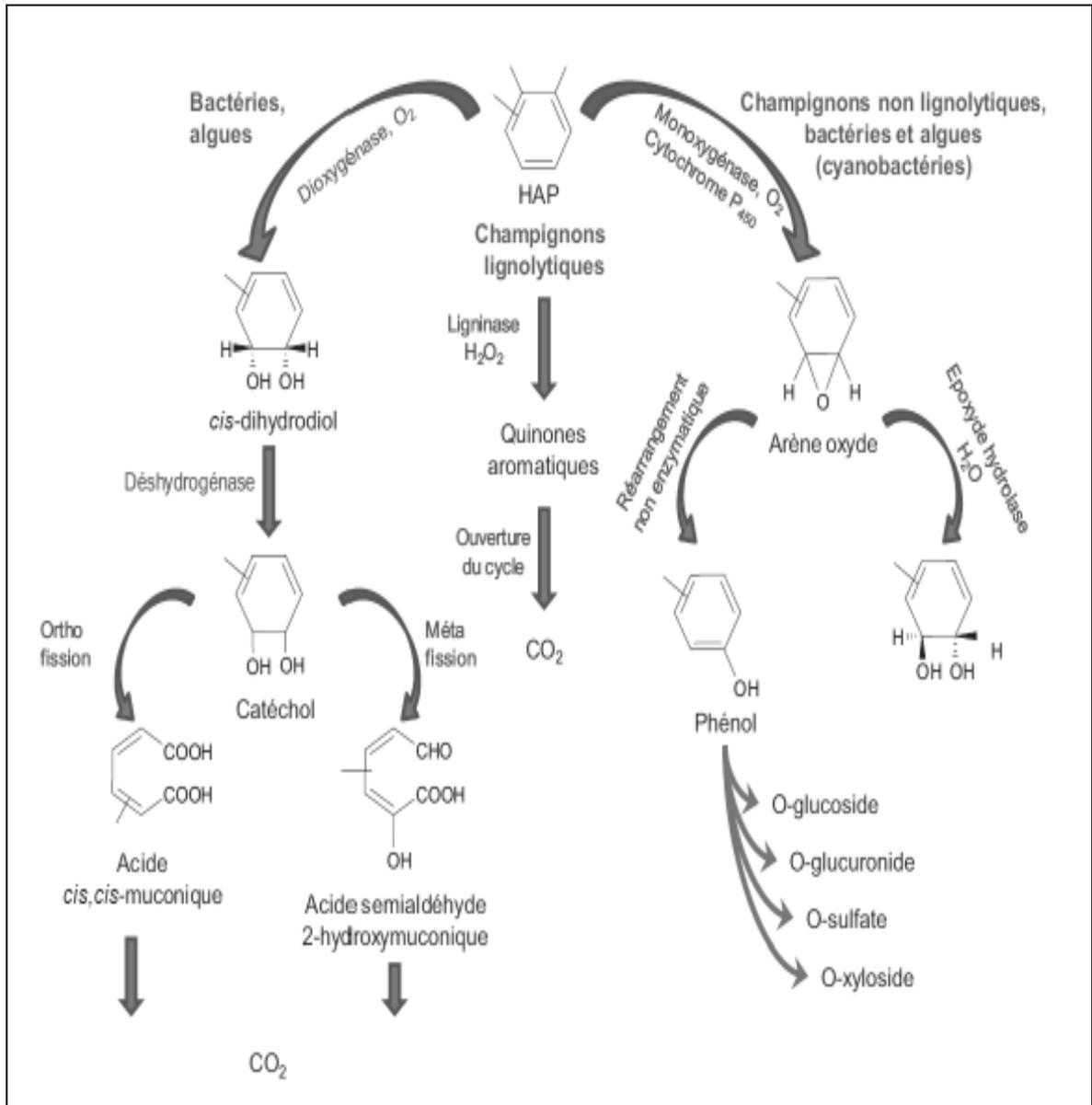


Figure 1.2 : Différentes voies de dégradation aérobie des HAP [12].

1.2.1.1 Biodégradation des HAP à faible poids moléculaire (Anthracène)

L'anthracène ($C_{14}H_{10}$) est un HAP de faible poids moléculaire. Il possède dans sa structure trois cycles aromatiques. A température ambiante, il est solide cristallisé sous forme de feuillets. La distillation des goudrons de charbon permet de recueillir de l'huile d'anthracène. L'anthracène est utilisé comme intermédiaire chimique pour la préparation de matières colorantes et pour la formation de polyradicaux destinés à la fabrication de résines. Egalement, il est utilisé comme diluant des produits de protection du bois, comme insecticide et comme fongicide. Il est essentiellement produit lors de la combustion incomplète des hydrocarbures,

du bois ou du charbon. On en trouve également dans la fumée de charbon de bois, les échappements de moteur Diesel ou à essence (INERIS, 2005).

Une variété de microorganismes notamment les bactéries peuvent utiliser ce dernier comme seule source de carbone et d'énergie [29,30]. Les voies métaboliques de la dégradation d'anthracène par les bactéries aérobies sont représentées sur la figure 1.3.

La première étape de la dégradation aérobique fait intervenir une dioxygénase qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un cis dihydrodiol. Les dihydrodiols sont ensuite transformés en biphénols, lesquels sont attaqués par d'autres dioxygénases [32,33]. De la même manière, tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires simples, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phtalique ou le catéchol [32].

L'anthracène est métabolisé par une *Pseudomonas aeruginosa* via l'anthracène cis-1,2-dihydrodiol, le 1,2-dihydroxyanthracène, l'acide cis-4-(2'-hydroxynapht-3-yl)-2-oxobut-3-énoïque, le 2-hydroxy-3-naphtaldéhyde et l'acide 2-hydroxy-3-naphtoïque [34]. Le dernier composé est minéralisé via l'acide salicylique et le catéchol.

La souche bactérienne *Cunninghamella elegans* oxyde l'anthracène en anthracène trans-1,2-dihydrodiol. Il est ensuite conjugué pour former du 1-anthryl-sulfate [35]. Dans le cas de *Rhizoctonia solani*, l'anthracène trans-1,2-dihydrodiol est métabolisé en 3 conjugués xylosides différents [36].

Hammel et Green (1991) [37] ont trouvé que la souche *Phanerochaete chrysosporium* transforme l'anthracène via la 9-10-anthraquinone et l'acide phtalique, en CO₂. Également, la bactérie *Bjerkandera* sp. et quelques autres champignons métabolisent l'anthracène en 9,10-anthraquinone. Alors que la souche *Trametes versicolor* le métabolise sans accumulation d'antraquinone [38,39].

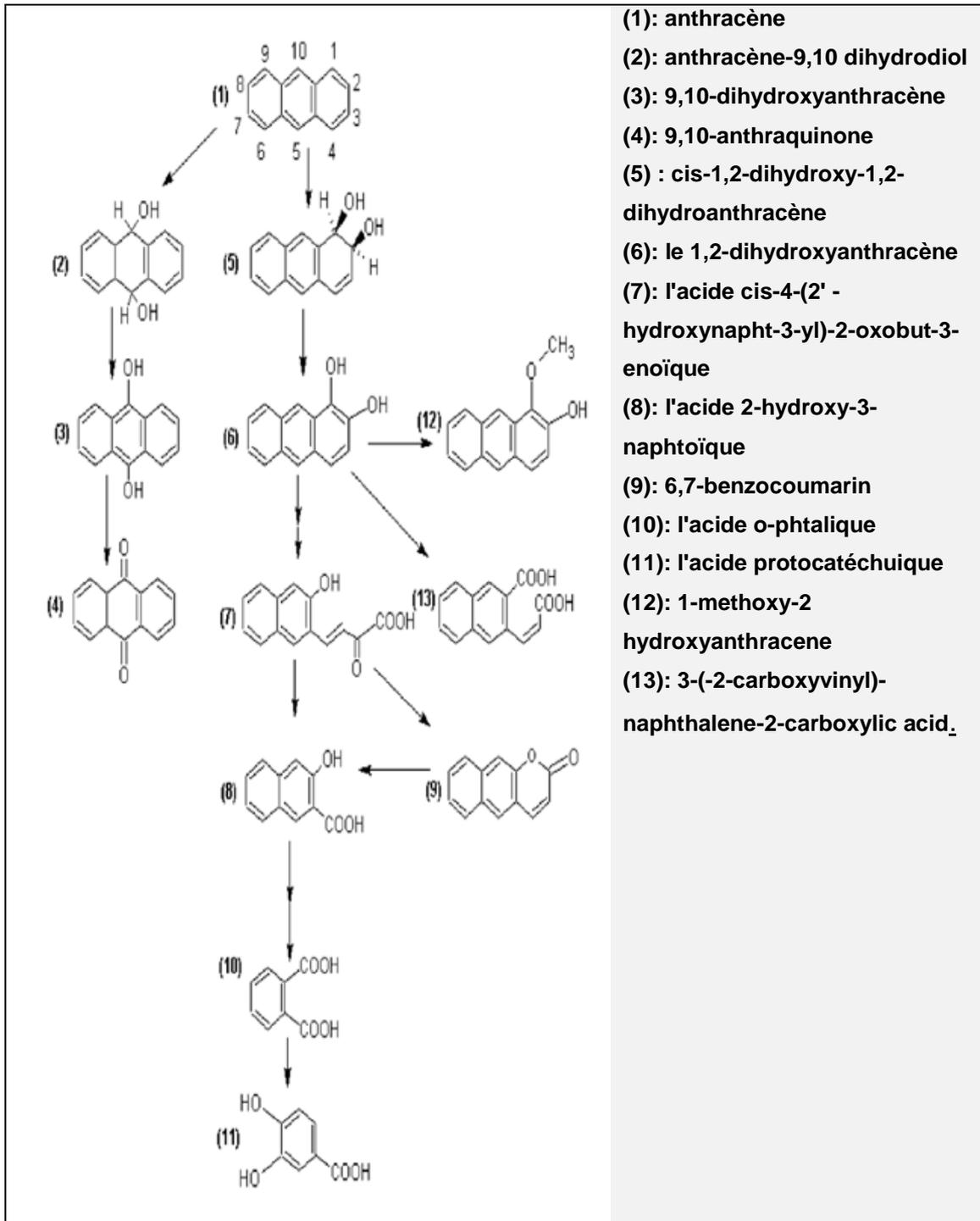


Figure 1.3: Synthèse des voies métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie d'anthracène [31].

1.2.1.2 Biodégradation des HAP à haut poids moléculaire (Pyrène)

Le pyrène ($C_{16}H_{10}$) est un HAP de haut poids moléculaire. Il possède dans sa structure quatre cycles aromatiques. A température ambiante, il se trouve sous forme de plaquettes jaunes pâles. Le pyrène est un constituant du goudron de houille à 3 %, qui est utilisé pour fabriquer le brai de houille. Ce dernier, rentre dans la fabrication du graphite (lui-même utilisé dans des électrodes en aciérie, dans des moteurs...), des anodes et comme liant dans des revêtements anticorrosion pour conduites, fibres et mousses de carbone, des liants réfractaires, des agents utilisés en fonderie. On note aussi qu'il se trouve dans la créosote à 8,4%,(elle provient du goudron de houille et elle est utilisée dans le traitement du bois).

Le pyrène est généralement utilisé comme modèle dans l'étude de la biodégradation des HAP à haut poids moléculaire à cause de la similarité structurale de ce dernier et les autres HAP dite cancérigènes. [40].Plusieurs travaux ont été réalisés pour déterminer les voies métaboliques de la dégradation du pyrène. La première description détaillée de la minéralisation complète du pyrène en CO_2 a été rapportée par Kim *et al.* (2007) [41]. Les voies métaboliques de la dégradation du pyrène par les bactéries aérobies sont représentées sur la figure1.4.

Le pyrène est catabolisé par une *Mycobacterium* sp. pour produire du CO_2 ; les intermédiaires incluent le pyrène cis-4,5-dihydrodiol, la 4-hydroxypérinaphthénone, l'acide 4-phénanthroïque, l'acide phtalique, l'acide cinnamique, mais aussi un *trans-dihydrodiol* [42-44].

La souche *Rhodococcus* sp. produit des différents métabolites du pyrène, parmi lesquels les 1,2- et 4,5-dihydroxypyrène, l'acide cis-2-hydroxy-3-(périnaphthénone-9- yl)propénique, et l'acide 2-hydroxy-2-(phénanthrène-5-one-4-enyl)acétique [45].

En utilisant la souche *Cunninghamella elegans*, le pyrène est métabolisé en 1-hydroxypyrène, 1,6- et 1,8- pyrènequinones, et trois conjugués de glucosides [46].

La souche *Mycobacterium* sp. produit du pyrène trans-4,5-dihydrodiol et un pyrénol comme intermédiaires en plus des cis-dihydrodiols et des autres produits mentionnés ci-dessus [43].

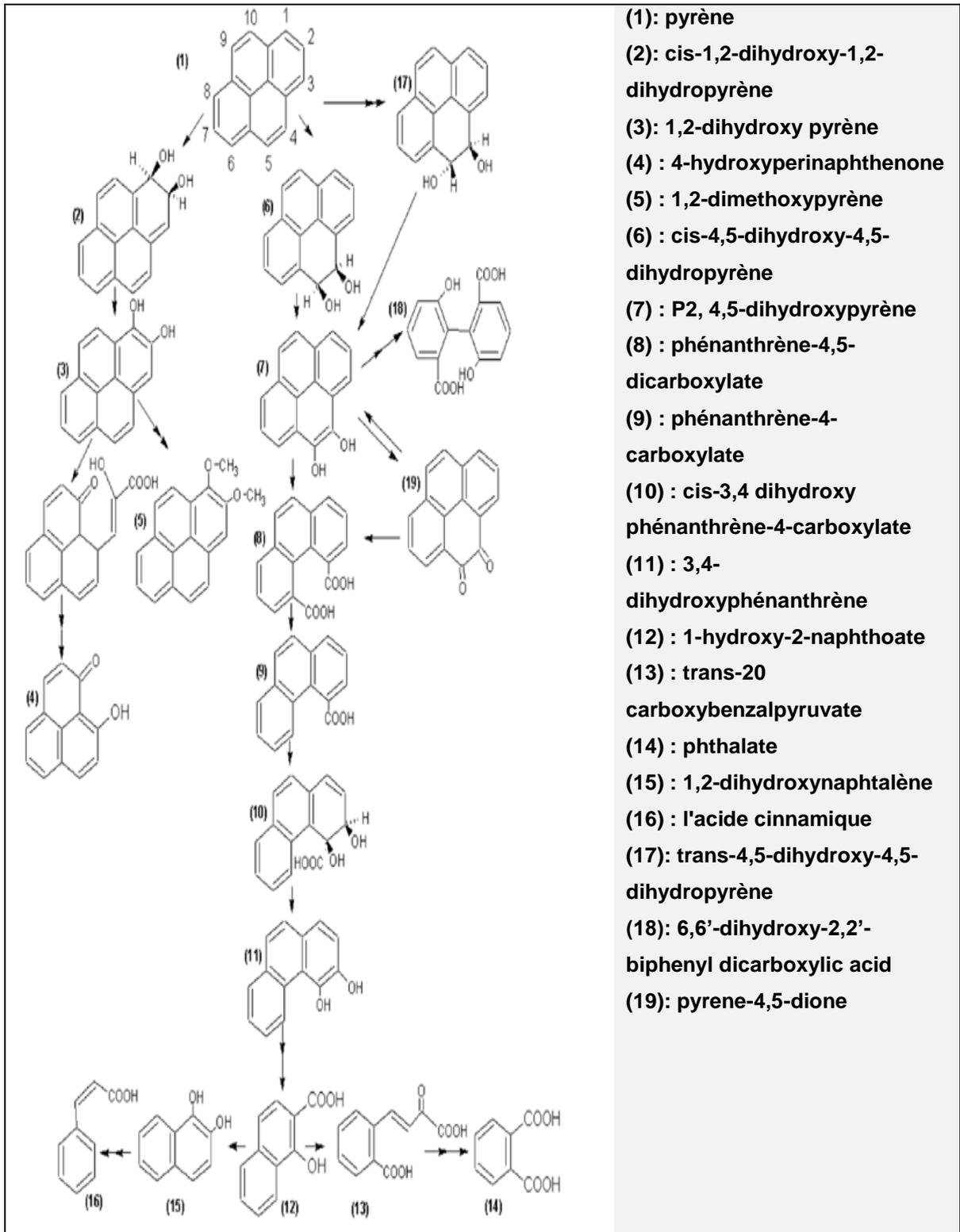


Figure 1.4: Synthèse des voies métaboliques de la dégradations bactérienne aérobie du pyrène [31].

1.2.2 Facteurs affectant la biodégradation des HAP

Les conditions environnementales qui varient d'un site à un autre, peuvent influencer le procédé de la bioremédiation par l'inhibition de la croissance des microorganismes responsables de la dégradation des polluants [12]. Les principaux facteurs qui influent sur la biodégradation des HAP sont :

- **La température**

La température a un effet considérable sur les capacités biodégradatives des microorganismes *in situ*. La solubilité des HAP augmente avec l'augmentation de la température ce qui améliore par conséquent la biodisponibilité de ces molécules. Mais l'augmentation de la température affecte la solubilité de l'oxygène ce qui conduit à une réduction de l'activité métabolique des microorganismes aérobies.

- **Le pH du milieu**

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

La croissance des microorganismes étant favorisée par un pH proche de la neutralité, Leahy et Colwell (1990) [47] ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. D'après les travaux de Jacques *et al.*, (2005) [48], le maximum de croissance de la souche *Pseudomonas citronellolis* 222A sur l'antracène a été observé à pH neutre.

- **L'oxygène (aération)**

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures dans les sols et les eaux souterraines par les bactéries aérobies. L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures par les bactéries inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable [49].

Dans les niveaux supérieurs de la colonne d'eau, le problème de l'oxygène ne pose pas. Néanmoins, dans les sédiments aquatiques qui sont généralement anoxique, à l'exception d'une couche fine de la partie supérieure. La disponibilité de l'oxygène dans les sols dépend de plusieurs paramètres : le taux de consommation d'oxygène par les microorganismes, le type de sol et la présence de substrats [50].

- **La disponibilité des nutriments**

En plus des composés organiques utilisés comme source de carbone, les microorganismes dégradant les HAP ont besoin de l'azote (N) et le phosphore (P) pour leur croissance. Les besoins en ces deux sources varient selon le type de bactérie, la source de carbone à métaboliser et les conditions du milieu.

L'ajout de nutriments (N et P) est largement pratiqué lors de la remédiation des sites contaminés par les hydrocarbures. Un rapport molaire C/N/P égale à 100/10/1 est généralement recommandé pour la bioremédiation des sols [51].

- **La biodisponibilité de polluant**

L'hydrophobicité des composés chimiques est généralement utilisée comme indicateur de leur biodisponibilité, en particulier, pour les microorganismes qui ont sensé utilisent que la fraction soluble dans l'eau [52]. La faible solubilité des HAP limite leur biodégradation. Afin de réduire ce problème et par conséquent d'augmenter la biodisponibilité des HAP, les microorganismes peuvent développer plusieurs stratégies d'adaptation. Parmi ces derniers, on peut citer :

l'hydrophobicité cellulaire ou modification de la composition de la paroi cellulaire de la bactérie, l'usage de différents substrats, la production de biofilm et la production de biosurfactant [53]. L'addition de surfactants semble une approche valable pour augmenter la biodisponibilité et sans doute la biodégradation des contaminants hydrophobes (qui sera détaillé dans la section suivante).

1.3 Les surfactants

Les surfactants (ou tensioactifs) sont des molécules amphiphiles, capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement [54-56].

Les surfactants sont constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe apolaire (figure 1.5). Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants.

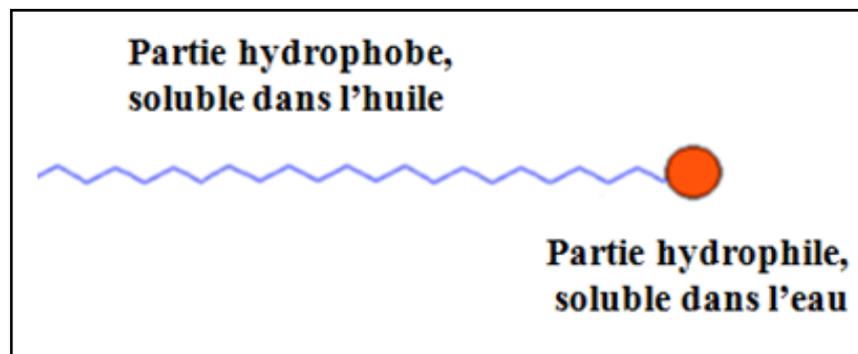


Figure 1.5 : Représentation schématique d'un surfactant [57].

1.3.1 Classification des surfactants

Selon la nature du groupement hydrophile de la molécule, les surfactants chimiques sont classés en quatre groupes: [58,59].

- **Les surfactants anioniques** : Libèrent une charge négative (anion) en solution aqueuse. Ils ont une tendance hydrophile plus marquée. Ils ne sont pas compatibles avec les tensioactifs cationiques. La plus connue est le dodécylsulfate de sodium (SDS).

- **Les surfactants cationiques** : Sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires triméthylés ou des sels de pyridinium. Ils ont des propriétés bactériostatiques et émulsionnantes.
- **Les surfactants zwitterioniques ou amphotères** : Possèdent sur la partie hydrophile à la fois une charge positive et une charge négative. Ce type de tensioactifs peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution dans laquelle ils sont solubilisés. Les tensioactifs amphotères sont utilisés comme détergents.
- Les surfactants non ioniques: ne comportent aucune charge nette. On dit que ce sont souvent les meilleurs détergents, car généralement, leur activité superficielle et la capacité de solubilisation sont plus élevées. De plus, ils ont de très faibles valeurs de CMC. Le Tween 80 est l'un des plus usuels, [60,61].

1.3.2 Comportement des surfactants en solution

La structure amphiphile des molécules tensioactives induit leur forte tendance à s'accumuler dans la zone interfaciale entre l'eau (ou solvant organique) et l'air. On observe ainsi, la modification de la tension superficielle à la surface du liquide. On parle de tension de surface γ , cette force définie comme l'énergie libre F par rapport à l'aire interfaciale A à la température (T), volume (v) et composition constants (n).

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T, v, n}$$

L'ajout progressivement de surfactant dans une solution, les molécules tensioactives s'accumulent à la surface du liquide au fur et à mesure que l'on augmente la concentration. Ceux-ci s'organisent préférentiellement de façon à former des micelles sous forme de monocouches compactes pour atteindre la concentration micellaire critique au-delà de laquelle le liquide est saturé en surfactants monomères (Figure 1.6).

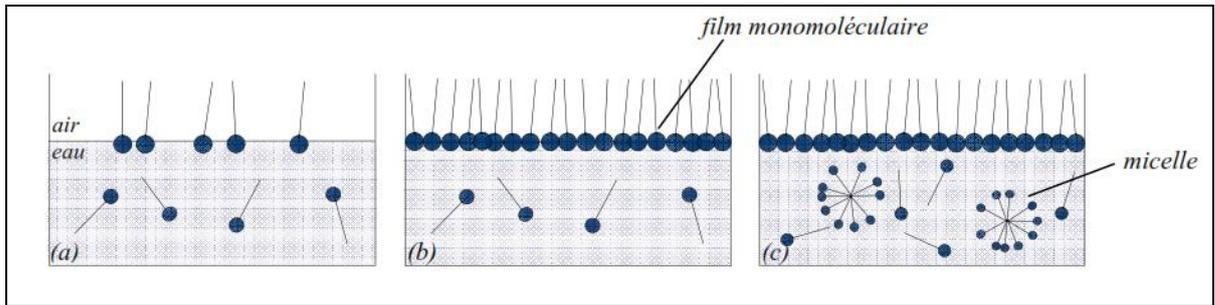


Figure 1.6 : *Comportement des tensioactifs en milieu aqueux – phénomène de micellisation*

La CMC peut être déterminée par plusieurs méthodes. La méthode la plus connue est la mesure de la tension superficielle en fonction de la concentration. La micellisation observée à partir de la CMC, correspond à une variation brutale traduit par la «cassure» sur les courbes expérimentales de l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en surfactants. Au-delà de la CMC, la tension de surface γ n'est presque plus affectée par l'augmentation de la concentration (Figure 1.7).

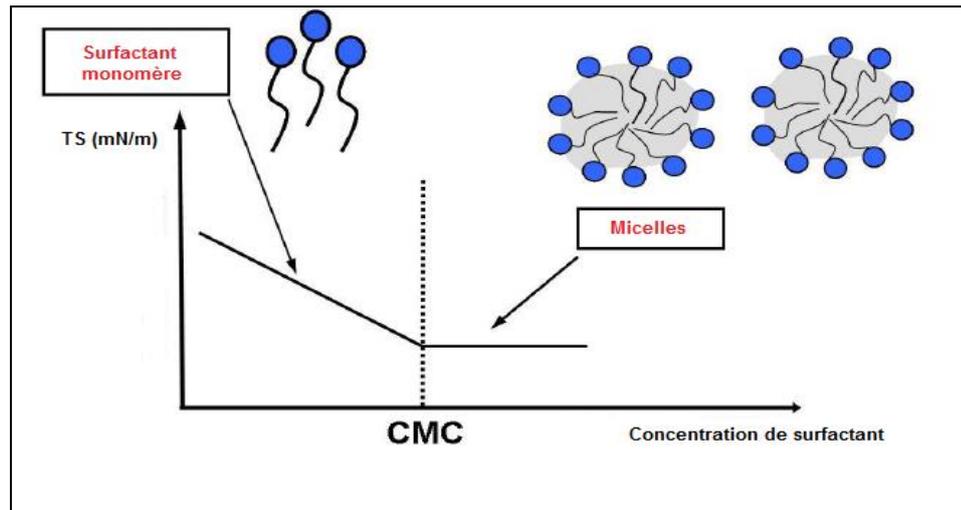


Figure 1.7: Détermination de la CMC par mesure de tension superficielle [62].

1.3.3. Dégradation des HAP en présence des surfactants

La faible solubilité aqueuse de la plupart des HAP est considérée comme un des principaux facteurs limitant leur dégradation. En effet, dans le cas des sols pollués, les HAP sont fortement adsorbés sur la matière organique et sont faiblement mobiles, ce qui diminue l'efficacité de certaines méthodes abiotiques

de dégradation [63]. Cependant, c'est surtout la biodégradation des HAP qui est restreinte par leur faible solubilité [64, 65,12]. L'augmentation de la concentration d'un composé dans la phase aqueuse, par l'ajout d'un surfactant, favorise sa disponibilité à l'attaque microbienne ou l'élimination par d'autres traitements.

De nombreux travaux ont été réalisés afin d'étudier l'effet des tensioactifs sur la solubilisation et la biodégradation des HAP. Néanmoins, les tests conçus pour améliorer la biodégradation des HAP grâce à l'utilisation des surfactants ont donné des résultats contradictoires.

Deschênes *et al.* (1995) [66] ont montré que le SDS était consommé préférentiellement par les bactéries, ce qui a conduit à une diminution du taux de dégradation des HAP. Des résultats similaires ont été observés par Tiehm (1994) [67], la dégradation des HAP par *Mycobacterium* sp. était inhibée par le SDS. Bramwell et Laha (2000) [68] ont étudié l'effet de quatre tensioactifs (Tween 20, SDS, Ibromure de tétradécyl triméthyl ammonium et l'émulsifiant commercial Citrikleen) sur la dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas aeruginosa*. Ils ont trouvé que tous ces tensioactifs en concentrations égales ou supérieures de la CMC inhibaient la minéralisation du phénanthrène.

Putcha et Domach (1993) [69] ont constaté que la présence du surfactant Triton X-100 semblait protéger significativement le naphtalène de la biodégradation en le piégeant dans ses micelles, à moins qu'il n'inhibe la croissance cellulaire. Ghosh *et al.* (1995) [70] ont également observé que l'addition de Triton X-100, à des concentrations jusqu'à 24 fois sa CMC, n'augmentait pas la biodégradation des HAP dans un sol contaminé.

Chen *et al.* (2001) [71] ont rapporté que la dégradation du naphtalène n'est pas affectée par l'addition de SDS. Par contre, l'ajout de T-maz 80 et CA-620 diminue le taux de dégradation et la dégradation a été inhibée par l'ajout du SDBS. En présence de surfactant Brij 30, Mukesh Kumar *et al.* (2012) [72]. ont observé qu'il y a une augmentation de la croissance bactérienne et du taux de dégradation du naphtalène par *Pseudomonas* sp. PSS6l. Aussi Bautista *et al.* (2009) [73] ont rapporté que le Tween 80 augmente la dégradation du naphtalène et d'anthracène par les trois souches testées, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. et *Stenotrophomonas* sp.

L'effet des surfactants sur la biodégradation des HAP reste toujours non clair. Certains chercheurs ont observé l'inhibition de la dégradation des HAP en présence de surfactants [74, 75, 67]. Alors que d'autres ont trouvé que la biodégradation de certains HAP est améliorée par l'addition de surfactants [76,77]. Généralement, l'effet positif de l'ajout des surfactants est dû à l'augmentation de la solubilité des composés hydrophobes et par la suite l'amélioration de leur biodisponibilité dans le milieu.

Il a été trouvé que la solubilité des HAP augmente linéairement avec la concentration de surfactants au-dessus de la CMC [78]. Dans ces conditions la solubilisation micellaire a lieu, c'est-à-dire que la solubilité aqueuse des HAP augmente grâce à la diminution de la tension interfaciale et l'incorporation des HAP dans des micelles [79, 80]. Le taux de la solubilisation micellaire dépend de plusieurs facteurs, tels que la structure du surfactant, le nombre d'agrégation (le nombre des molécules du tensioactif qui constituent la micelle), la géométrie de la micelle, la température, la taille de l'HAP solubilisé [79].

Schippers *et al.* (2000) [81] proposent trois approches pour faciliter la biodégradation des HAP à l'aide des surfactants (figure 1.8). Dans la première approche, l'HAP pénètre dans la bactérie par fusion partielle des membranes bactérienne et micellaire. Dans la deuxième, le surfactant augmente le transfert de matière. La bactérie n'utilise que le HAP dissous. Alors que la troisième approche est que l'ajout de surfactant change l'hydrophobicité de la membrane et facilite le contact entre la cellule et l'HAP.

Tableau 1.2 : Effet des surfactants chimiques sur la biodégradation des HAP (synthèse)

Microorganismes	Hydrocarbure	Surfactant	Effet	Références
<i>Mycobacterium sp.</i>	Phénanthrène	SDS	Négatif	Tiehm (1994) [67]
	Fluorène, Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène.	Tegopren 5851 Sapogenat T-300	Positif	
<i>Pseudomonas putida</i> ,	Pyrène	Triton X-100, Brij 30, Brij 35, Tween 80	Négatif	Doong et Lei [82]
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> VKM B-2469	Fluorène	Tween 60	Positif	Kolomytseva <i>et al.</i> (2009) [83]
		Triton X-100	Négatif	
<i>Neptunomonas naphthovorans</i>	Phenanthrène	Tergitol X (X = 7, 9 et 12),	Positif	Li et Chen (2009) [84]
<i>Pseudomonas sp.</i> HOB1	Naphtalène	SDS, CTAB, et Tween 80	Négatif	Pathak <i>et al.</i> (2009) [85]
<i>Sphingomonas sp.</i> GF2B	Phénanthrène	Tween 80	Négatif	Pei <i>et al.</i> (2010) [86]
<i>Klebsiella oxytoca</i> PYR-1	Pyrène	Tween 80	Positif	Zhang et Zhu. (2012) [76]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Pyrène	Tween 80	Positif	Chen <i>et al.</i> (2013) [77]
<i>Burkholderia multivorans</i>	Hydrocarbures aliphatiques	Triton X-100	Positif	Mohanty et Mukherji (2013) [87]
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17514	Anthracène fluoranthène	Tween 20	Positif	Rodrigues <i>et al.</i> (2013) [88]
		SDS	Positif (A) / Négatif (F)	
		CTAB	Négatif	

Cationique : CTAB.

Anionique : SDS.

Non-ionique : Tween 20, 60 et 80 ; Triton X-100 ; Tergitol X (X = 7, 9 et 12) ; Brij 30 et 35, Tegopren 5851 et Sapogenat T-300.

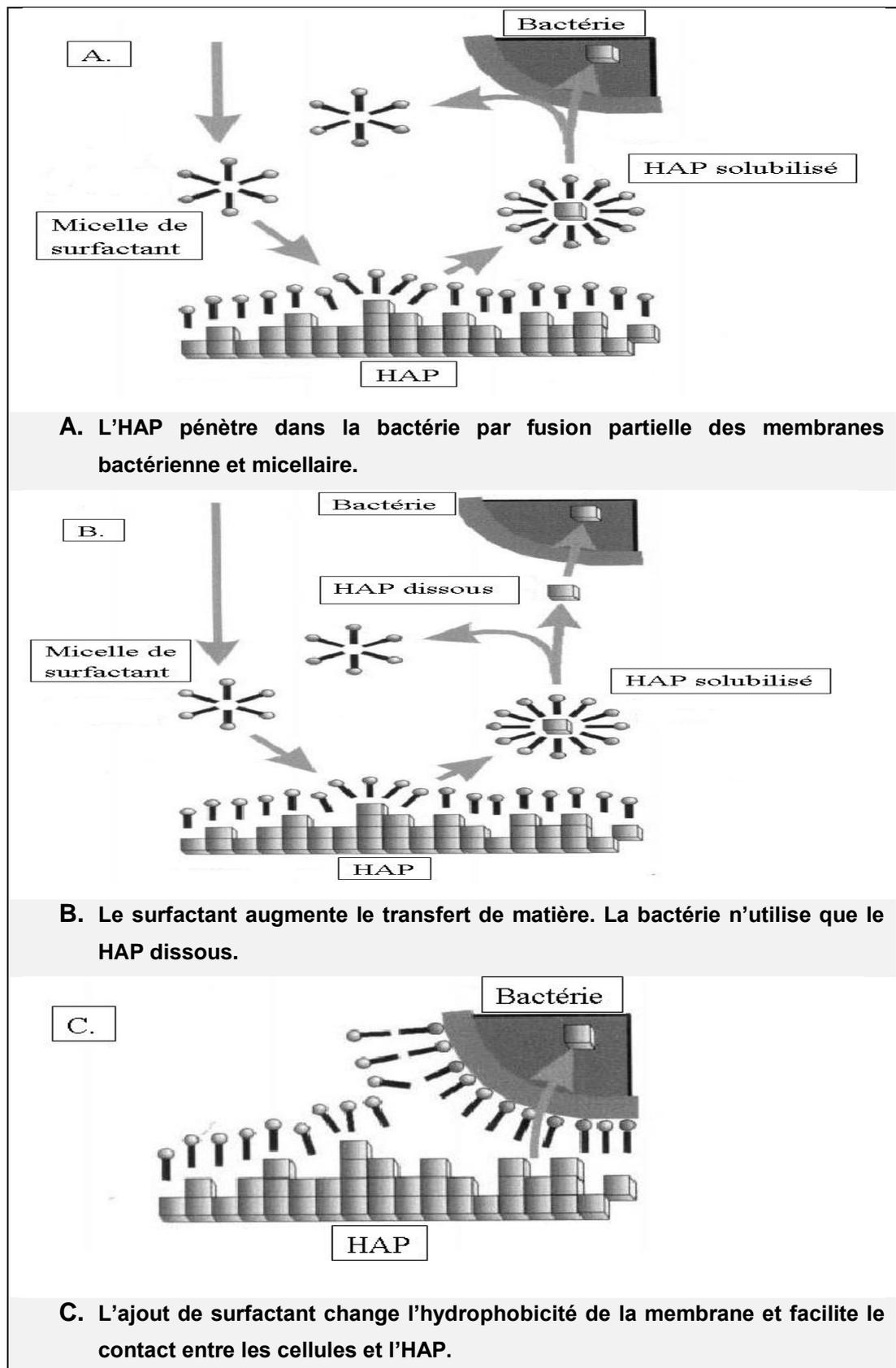


Figure 1.8 : Mécanismes proposés pour l'incorporation des HAP à l'intérieur des cellules bactériennes par l'intermédiaire de surfactant [81].

L'effet négatif de surfactants sur la biodégradation des HAP peut être dû aux plusieurs facteurs comme la toxicité des surfactants pour les microorganismes, la compétition ou l'utilisation de surfactants par les microorganismes comme source de carbone en parallèle avec l'hydrocarbure.

Li et Chen (2009) [84] ont proposé trois mécanismes pour expliquer l'effet de surfactant sur la biodégradation du phénanthrène.

- **Mécanisme 1: Faible biodisponibilité des substrats hydrophobes comme HAP en présence de surfactant à forte concentration**

Généralement, l'ajout des surfactants augmente la solubilité des HAP et donc leur biodisponibilité, mais la présence de surfactant en forte concentration conduit à la formation des micelles sous forme d'une couche épaisse ce qui entraîne une réduction du taux du transfert d'HAP.

Par conséquent, des faibles concentrations des surfactants sont recommandées pour augmenter la biodisponibilité des HAP. Le choix de la souche est très important à cause des interactions spécifiques entre la souche et le surfactant se qui influe sur la biodisponibilité de substrat en question.

- **Mécanisme 2: Compétition entre les HAP et les surfactants, utilisation de surfactants comme source de carbone par les microorganismes**

Les surfactants peuvent être utilisés comme substrats de croissance par les microorganismes. La présence des surfactants en forte concentration dans le milieu peut favoriser l'utilisation préférentielle de ces derniers par rapport aux HAP, par conséquent la biodégradation des HAP sera significativement retardée.

- **Mécanisme 3: Réduction de l'activité microbienne en présence des surfactants en forte concentration**

Il très important de noter que la présence des surfactants en forte concentration peut tuer les microorganismes. Plusieurs études ont révélé la toxicité des surfactants, à cause de leur nature amphiphile, les surfactants peuvent être

solubilisés dans les membranes lipidiques des cellules bactériennes en provoquant la lyse des cellules et la modification des propriétés physicochimiques des membranes cytoplasmiques.

Nous concluons que malgré le nombre d'études réalisées, on ne peut pas prédire avec certitude si l'ajout d'un surfactant est bénéfique pour la biodégradation ou non. L'analyse des données disponibles à ce jour montre que les conditions de la biodégradation jouent un rôle important sur le résultat final. La biodégradation dépend de l'hydrocarbure en question, la souche utilisée, le type et la concentration de surfactant appliqué

1.4 Biosurfactants

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes : levures, bactéries et champignons. Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques. Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système [91] et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures [92].

La production de biosurfactants est une forme d'adaptation développée par les microorganismes et généralement représente une réponse physiologique aux besoins spécifiques rencontrés par les microorganismes dépendant de leur environnement [93].

1.4.1 Classification des biosurfactants

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau, les biosurfactants sont différenciés essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne. En fait, ils sont classés en cinq grandes catégories : (1) les glycolipides, (2) les lipopeptides et lipoprotéines, (3) les acides gras, phospholipides et lipides neutres, (4) les biosurfactants polymériques, (5) les biosurfactants particuliers [94-96].

La partie hydrophile peut être ionique ou non ionique et consiste de mono-, di- ou polysaccharides, d'acides carboxyliques ou de peptides. Les parties hydrophobes consistent généralement en des acides gras saturés, insaturés ou hydroxylés [97].

Les biosurfactants de faible poids moléculaire (glycolipides, les lipopeptides) sont plus efficaces pour diminuer les tensions de surface et interfaciale. Alors que les biosurfactants de haut poids moléculaire (polysaccharides amphiphiles, des protéines, des lipopolysaccharides, et les lipoprotéines) connus comme bioémulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans une réduction importante de la tension de surface [98].

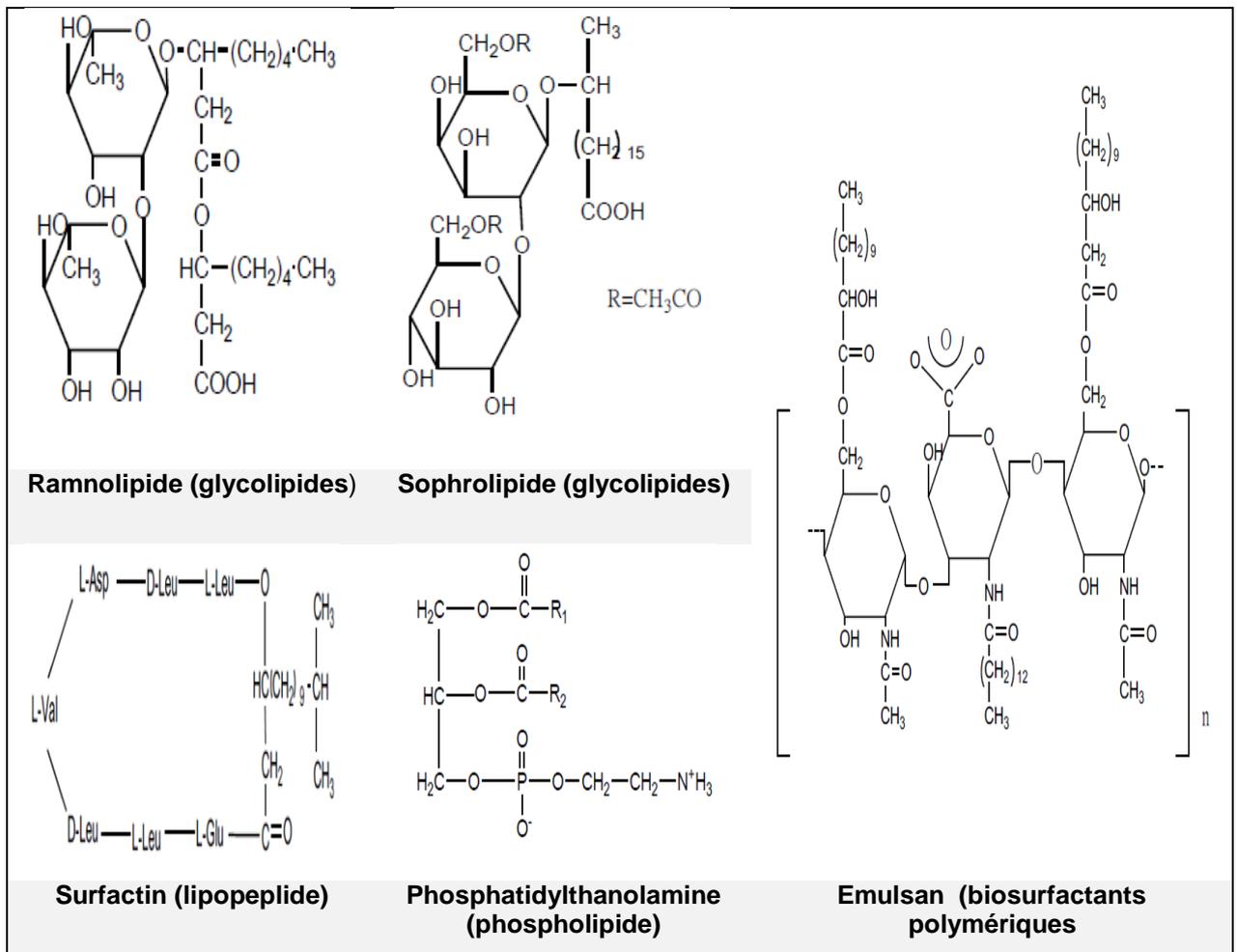


Figure 1.9. Structure de quelques biosurfactants [99].

1.4.2 Avantages des biosurfactants

Comparé aux surfactants chimiques, les biosurfactants présentent des avantages, parmi ceux-ci on peut citer [100, 96, 101] :

- ✓ Bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), salinité (jusqu'à 30%) et de température (jusqu'à 100 °C) ;
- ✓ Biodégradables et non toxiques favorisant leur utilisation de point de vue environnemental ;
- ✓ Biocompatibilité-digestibilité ce qui permet l'introduction des biosurfactants dans des formules cosmétiques, pharmaceutiques et même l'agro-alimentaire ;
- ✓ Production à partir des déchets industriels (substrat effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon, ...) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production.

1.4.3 Production de biosurfactant

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau. Cameotra (2009) [102] explique ce phénomène comme un comportement de microorganismes pour augmenter la biodisponibilité des substrats hydrophobes, Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *Torulopsis. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds [103].

Les biosurfactants sont synthétisés par les microorganismes (notamment les hydrocarbonoclastes) en utilisant plusieurs sources de carbone, généralement les hydrocarbures, les carbohydrates et les huiles végétales [104]. Dans certains cas, les biosurfactants sont produits seulement durant la croissance des microorganismes sur des substrats hydrophobes (*Rhodococcus* et *Corynebacterium*). Egalement, ils peuvent être synthétisés en utilisant des

substrats variés : hydrophiles et hydrophobes (*Pseudomonas aeruginosa* et *Torulopsis . bombicola*) [96].

L'inconvénient majeur de la production de biosurfactants réside dans leur coût élevé. Afin de réduire ce problème, les recherches actuelles s'intéressent de plus en plus à la production de biosurfactants à partir de substrats non conventionnels à savoir divers sous-produits agricoles et déchets industriels. Freitas de Oliveira *et al.* (2013) [105] ont rapporté la production d'un biosurfactant par la souche *Bacillus subtilis* LAMI005 en utilisant le jus de pomme clarifié comme source de carbone. De même, Silva *et al.* (2014) [106] ont montré que *Pseudomonas cepacia* CCT6659 produit un biosurfactant en utilisant l'huile de friture usagée (soja) comme source de carbone.

Les travaux de Mnif *et al.* (2013) [107] ont mis en évidence l'utilisation d'un mélange de la farine de poisson et les déchets de la pomme de terre pour la production d'un biosurfactant par *Bacillus subtilis* SPB1. En présence de *Pseudomonas aeruginosa*, Thavasi *et al.*, (2011) [108] ont synthétisé un biosurfactant à partir d'huile moteur usagée et de tourteaux d'arachide.

Le type de biosurfactant dépend de microorganisme utilisé. La synthèse de biosurfactants est généralement effectuée par des microorganismes isolés à partir de sols contaminés par des substances hydrophobes comme les hydrocarbures. Le tableau 3 rassemble quelques biosurfactants et leurs microorganismes producteurs.

Tableau 1.3 : Différents biosurfactants avec leur source microbienne [100 modifié].

Microorganismes	Types de biosurfactant
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptidolipides
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactines
<i>Bacillus sp. AB-2</i>	Rhamnolipides
<i>Bacillus velezensis</i>	Peptidolipides
<i>Arthrobacter sp. RAG-1</i>	Hétéropolysaccharides
<i>Arthrobacter sp. MIS38</i>	Peptidolipides
<i>Arthrobacter sp.</i>	Lipides de tréhalose, Lipides de saccharose
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Glycopeptide
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glycolipide
<i>Halomonas sp. ANT-3b</i>	Glycolipide
<i>Halomonas eurihalina</i>	Exopolysaccharides
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPCL	Rhamnolipide
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SH10-3B	Viscosin (Peptidolipide)
<i>Rhodococcus sp. ST5</i>	Glycolipide
<i>Rhodococcus sp. 33</i>	Polysaccharide
<i>Rhodococcus sp. TA6</i>	Lipides, Glycolipide
<i>Ochrobactrum sp. 1C</i>	Glycolipide
<i>Staphylococcus sp. 1E</i>	Lipopeptide
<i>Brevibacterium aureum</i>	Lipopeptide
<i>Brevibacterium sp. 7G</i>	Glycolipide
<i>Nocardiopsis lucutensis</i>	Glycolipide
<i>Candida sphaerica</i>	Glycolipides
<i>Candida bombicole</i>	Sophorolipides
<i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéine

1.4.4 Facteurs affectant la production de biosurfactant

La quantité et la qualité de biosurfactant dépend de paramètres suivants : la nature et la concentration du substrat de croissance (source de carbone et d'azote), la concentration des éléments minéraux du milieu (phosphore, magnésium, fer et le manganèse) et les conditions de culture : pH, salinité, température et l'agitation [104, 109].

1.4.4.1. Effet de la source de carbone

La source de carbone est le facteur le plus important lors de la production de biosurfactant. Elle détermine le type et la quantité du biosurfactant [110]. Plusieurs sources de carbone ont été utilisées pour la production de biosurfactants à savoir les hydrocarbures, les sucres et les huiles végétales [111, 8, 7, 112]

Les recherches actuelles s'orientent vers l'utilisation des substrats non conventionnels pour la production de biosurfactants. L'huile de friture résiduaire, la margine, les déchets agro-alimentaires ont fait l'objet de plusieurs travaux [105,106, 107, 113] et donnent des résultats intéressants.

A nos jours les substrats hydrophobes restent les plus étudiés et souvent donnent un rendement plus important par rapport aux substrats solubles.

1.4.4.2. Effet de la source d'azote

La source d'azote peut avoir un rôle important dans la régulation de la synthèse de biosurfactant. Plusieurs études ont montré que la production du biosurfactant est maximale lorsque la concentration de l'azote dans le milieu est faible [114-116]. D'autres recherches ont prouvé que la limitation de la source d'azote affecte non seulement le taux de production mais aussi la composition du biosurfactant [117].

1.4.4.3. Effet des facteurs environnementaux

Les conditions environnementales ont un effet significatif sur le rendement et les caractéristiques des biosurfactants produits. Pour obtenir un maximum de biosurfactant, il est important d'optimiser les conditions de la production.

La production de biosurfactant est influencée par le pH du milieu. Un pH de 7 est optimal pour la production de biosurfactant par *Bacillus licheniformis* TKU004 [118]. 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 [119]. En revanche, la production de composés lipidiques de penta- et disaccharide par la souche *Nocardia corynbacteroides* n'est pas affectée par un pH allant de 6,5 à 8 [120].

Des études ont montré que l'augmentation de la concentration du sel dans le milieu entraîne une diminution dans la production de biosurfactant par certaines bactéries. Ilori *et al.* (2005) [121] ont rapporté qu'une faible production de biosurfactant par *Aeromonas* sp. a été enregistrée lorsque la salinité dépasse les 5%. Alors que pour certaines bactéries, la production n'est pas affectée par des salinités supérieures à 10% [122].

Abu-Rawaida *et al.* (1991b) [123] ont signalé que les propriétés physico-chimiques (la tension de surface, l'activité émulsifiante) de biosurfactant, produit par *Bacillus* sp. à des températures supérieures à 40 °C, restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min. Joshi *et al.* (2008) [124] ont rapporté que les souches *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 et *Bacillus* sp. HS3 produisent des biosurfactants en utilisant la mélasse de cane à sucre ou le lactosérum comme source de nutrition à 45 °C.

L'agitation affecte la production de biosurfactant, les travaux de Margaritis *et al.* (1979) [125] et Wang et Wang (1990) [126] ont montré que le rendement de production de biosurfactant a diminué avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Par contre, pour la synthèse de biosurfactant par les levures, le taux de production a augmenté avec la vitesse d'agitation.

1.4.5 Criblage des microorganismes producteurs

Plusieurs techniques sont utilisées pour détecter la production des biosurfactants par les microorganismes [127,128]. Généralement, le choix de la technique est lié directement à l'application désirée. Les techniques de la sélection des souches productrices donnent des résultats qualitatifs et quantitatifs. Six méthodes ont été utilisées par Plaza *et al.* (2006) [129] pour déceler la production de biosurfactants. Le tableau 4 regroupe les techniques utilisées

Tableau 1.4: Comparaison entre les techniques de détection des biosurfactants [130]

Technique analytique	Analyse Qualitative	Analyse Quantitative	Rapidité d'analyse
Mesure directe de la tension de surface (ou interfaciale)	++	+	min
Test d'effondrement de goutte	++	-	min
Test de Microplaque	++	-	min
Essai de pénétration	++	-	min
Test de déplacement d'huile	++	-	min
Indice d'Emulsification	+	-	j
Solubilisation d'anthracène cristalline	+	-	j
Test d'hydrophobicité	+	-	min
Chromatographie d'interaction hydrophobe	+	-	h
Essai sur plaque de Replica	+	-	j
Test d'agrégation du sel	+	-	min
Test de gélose CTAB	+	-	j
Activité hémolytique	+	-	j

1.4.6 Application des biosurfactants

Les caractéristiques fonctionnelles et écologiques des biosurfactants permettent leur exploitation dans divers domaines [92]. Plusieurs travaux ont mis en évidence la possibilité d'utiliser les biosurfactants dans le domaine pharmaceutique [131-133]. Les biosurfactants montrent un potentiel d'application dans l'industrie alimentaire, ils peuvent être utilisés dans les transformations des aliments, ainsi qu'ils interviennent comme ingrédients de la formulation des aliments et agents antiadhésifs [134]. Le biosurfactant synthétisé par *Enterobacter cloacae* est caractérisé par une bonne viscosité dans les pH acide, ce qui lui permet son utilisation dans les produits agroalimentaire pour augmenter la viscosité [135].

Les travaux du Das et Mukherjee (2007) [136] ont montré que le biosurfactant (lipopeptide cyclique) produit par la souche *Bacillus subtilis* présente un pouvoir émulsifiant très intéressant et une compatibilité et stabilité avec la composition des détergents chimiques ce qui favorise de l'introduire dans la formulation des nettoyants et détergents.

Les biosurfactants peuvent être utilisés dans l'industrie pétrolière : récupération assistée de pétrole [137,138] et le nettoyage des réservoirs [139].

L'application environnementale de biosurfactants reste la plus étudiée, ils peuvent être utilisés pour solubiliser les substances hydrophobes (HAP) [140], augmenter la biodégradabilité des hydrocarbures (Rahman *et al.*, 2002a), remobiliser le pétrole brut [7] et éliminer les métaux lourds (Mulligan *et al.*, 2001, Ochoa-Loza *et al.*, 2001). Le tableau 1.5 regroupe les principales utilisations environnementales des biosurfactants.

Tableau 1.5 : Utilisation de biosurfactants en biotechnologie environnementale
(Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011)

Biosurfactants	Microorganisme	Utilisation en biotechnologie environnementale
Glycolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Amélioration de la dispersion et de la dégradation des hydrocarbures, émulsification des hydrocarbures et des huiles végétales, remédiation de sols contaminés par les métaux lourds
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.	Amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures
	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i>	Élimination des HAP présents dans les boues, élimination des métaux lourds des sédiments, amélioration de la dégradation du pétrole
Acides gras, phospholipides et lipides neutres	<i>Corynebacterium lepus</i>	Amélioration de la régénération du bitume
	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Élimination des métaux lourds, préparation de nouveaux gels organiques et de microcapsules super fines
	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Amélioration de la tolérance des bactéries vis-à-vis des métaux lourds
Lipopeptides	<i>Bacillus subtilis</i>	Amélioration de la biodégradation des HAP et des pesticides, élimination des métaux lourds, amélioration de la phytoextraction
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Amélioration de la dégradation du pétrole
Biosurfactants polymériques	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1 <i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53	Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	Dispersion du calcaire dans l'eau
	<i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau

Les HAP, molécules organiques dont la toxicité et la persistance dans la nature, sont à l'origine de sérieux problèmes environnementaux. La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est l'un des processus majeurs permettant la remédiation des sites contaminés par les HAP. La biodégradation est un processus dépendant essentiellement de la nature et de la quantité des hydrocarbures, les propriétés physico-chimiques de site contaminé et la capacité biodégradative des microorganismes. Les conditions environnementales jouent un rôle très important dans le contrôle de la croissance et l'activité bactérienne durant la biodégradation des HAP. Par conséquent, il est très intéressant d'étudier l'effet des facteurs physico-chimiques sur la biodégradation des HAP pour une implantation de la biodégradation comme une technologie de bioremédiation.

Afin de dégrader les HAP, les microorganismes doivent avoir accès à ces molécules, ce qui constitue la condition de biodisponibilité des HAP. En effet, l'utilisation des températures élevées, l'ajout des surfactants ou l'utilisation des microorganismes producteurs de biosurfactants sont des moyens proposés pour augmenter la biodisponibilité des HAP et par la suite augmenter le taux de dégradation des HAP.

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

La relation entre la biodégradation des hydrocarbures et les surfactants chimiques reste toujours non clair. L'analyse des données disponibles à ce jour montre que pour améliorer la biodégradation des HAP, il faut trouver un compromis entre les caractéristiques de substrat (HAP), microorganisme et surfactant.

Les biosurfactants sont synthétisés par les microorganismes (notamment les hydrocarbonoclastes) en utilisant plusieurs sources de carbone. Afin de réduire le

coût de production, les recherches actuelles s'intéressent de plus en plus à la production de biosurfactants en utilisant des substrats non conventionnels à savoir divers sous-produits agricoles et déchets industriels. Les caractéristiques fonctionnelles et écologiques des biosurfactants permettent leur exploitation dans divers domaines. L'application environnementale de biosurfactants reste la plus étudiée, les biosurfactants peuvent être utilisés pour solubiliser substances hydrophobes, augmenter la biodégradabilité des hydrocarbures, remobiliser le pétrole brut et éliminer les métaux lourds.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Origine et isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

Le biotope utilisé, pour isoler des souches bactériennes aérobies hydrocarbonoclastes, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). Les échantillons du sol sont caractérisés par une teneur en hydrocarbures totaux varie de 27,83 à 59,07 g/kg de sol, un pH neutre (7,25 – 7,57) et une forte salinité (conductivité 13,06 - 17,32 mS/cm). La figure 2.1 montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes.



Figure 2.1: Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) [7]

Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs tout en respectant les conditions aseptiques. La méthode d'adaptation progressive [7], en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, a permis d'isoler des souches à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures et leurs dérivés (bactéries hydrocarbonoclastes).

Les différentes étapes de l'isolement sont regroupées dans les annexes 2 et 3

2.2.1 Repiquage des souches et préparation des précultures

A partir de la collection des bactéries hydrocarbonoclastes (Mesbaiah, 2010 ; 7], le repiquage est réalisé par ensemencement (pour chaque souche) d'une seule colonie dans 50 ml du milieu Luria–Bertani (LB) liquide dont la composition (en g/l) est : 10 peptone, 5 d'extrait de levure et 10 de NaCl. Après l'ajustement du pH à $7,0 \pm 0,2$, le milieu est stérilisé par autoclavage à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min. Les précultures ont été obtenues par incubation à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 24h et sous agitation (150 tr/min).

2.2.2 Milieu de dégradation des hydrocarbures

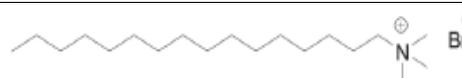
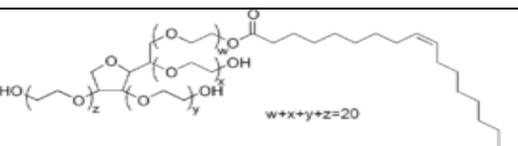
Le milieu syntétique utilisé est à base de sels minéraux (milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05) et 1 ml de la solution d'oligoéléments. Le milieu MM est supplémenté de 0,1 g/l d'extrait de levure. Après l'ajustement du pH à $7,0 \pm 0,2$, le milieu est autoclavé à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min. Ce milieu est utilisé dans la biodégradation des HAP et la production de biosurfactants. Les HAP sont ajoutés comme source de carbone (voir ci-après).

2.3 Biodégradation des HAP en présence des surfactants chimiques

Afin d'étudier l'effet des surfactants chimiques sur la biodégradation des HAP, nous avons utilisé la souche codée 1C préalablement sélectionnée (Mesbaiah, 2010). C'est une souche thermophile, elle a une croissance optimale à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le naphthalène et l'anthracène ont été employés comme modèles des HAP. Trois types de surfactants chimiques ont été utilisés dont les propriétés de ces surfactants sont présentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Propriétés des surfactants utilisés

Surfactant	Type	Structure chimique	CMC (mM)
Sodium dodécyl sulfate (SDS)	Anionique		7-10
Bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB)	Cationique		1
Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooleate (Tween 80)	Non-ionique		0,012

2.3.1 Croissance de la souche 1C sur les surfactants

La dégradation des surfactants chimiques par la souche 1C a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu synthétique MM. Les surfactants chimiques sont additionnés séparément : 0,02% (p/v) de SDS, 0,02% (p/v) de CTAB et 0,02% (v/v) de Tween 80. La température est fixée à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min.

La croissance bactérienne de la souche 1C est évaluée par la mesure de l'absorbance à 600 nm.

2.3.2 Biodégradation de naphthalène et de l'antracène

- **Préparation de la solution des HAP**

La solution mère est préparée par dissolution l'hydrocarbure dans l'acétate d'éthyle (10 g/l). Lors de son utilisation, un volume de la solution d'hydrocarbure est ajouté au milieu de dégradation (sans inoculum) pour avoir la concentration désirée. Le milieu de dégradation est laissé pendant 3h dans une chambre stérile à fin d'évaporer le solvant.

- **Biodégradation des HAP (naphthalène et anthracène)**

Un (01) ml de l'inoculum bactérien a été ajouté à 100 ml de milieu synthétique MM. Les concentrations des surfactants utilisés sont : 0,02% (p/v) de SDS, 0,02% (p/v)

de CTAB et 0,02% (v/v) de Tween 80. Les concentrations de naphthalène et de l'anthracène sont fixées à 100 mg/l (Chupurgars et al, 2009, Pinyakong et al., 2012). Les conditions de dégradation restent inchangées (45 °C, pH = 7, 150 tr/min). Des tests de biodégradation sans l'ajout de surfactants ont été considérés comme témoins.

- **Dosage des hydrocarbures résiduels**

L'hydrocarbure (naphthalène / ou l'anthracène) résiduel sont extraits par hexane (v : v). L'échantillon subit en suite une agitation pendant 5 min pour dissoudre le naphthalène ou l'anthracène dans l'hexane. La phase organique est récupérée après centrifugation à 6000 tr/min pendant 10 min. Le naphthalène et l'anthracène sont quantifiés moyennant un spectrophotomètre UV-Vis (type Shimadzu-1100, Japon). La courbe d'étalonnage a été réalisée à l'aide de différentes concentrations de naphthalène et d'anthracène dans l'hexane.

2.4 Etude de la biodégradation des HAP

2.4.1 Facteurs influençant la biodégradation de l'anthracène

- **Effet de la concentration initiale du substrat**

Dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu synthétique, différentes concentrations de l'anthracène sont ajoutées (0,01 0,05 et 0,1 g l⁻¹). Les témoins sont préparés de la même façon sans l'ajout de l'inoculum bactérien. L'incubation a été réalisée à 45 °C et à 150 tr/mn.

- **Effet du pH du milieu**

Dans cette étude, la dégradation a été effectuée à différentes valeurs de pH : 4 ; 5,5 ; 7 ; 8 ; 10 et 11,5. La concentration initiale de l'anthracène était 100 mg l⁻¹. Le milieu de culture a été incubé pendant 3 jours à 45 °C et sous une agitation de 150 tr/mn.

▪ Effet de la salinité

Une série d'expériences a été réalisée pour différentes concentrations en sel (0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10% de NaCl). La concentration du substrat était de 100 mg l⁻¹. Les cultures ont été incubées à 45 °C sous l'agitation de 150 tr/min.

2.4.2 Identification des métabolites de la biodégradation de l'anthracène

À fin de déterminer les métabolites de dégradation d'anthracène par la souche 1C, les milieux de culture, contenant l'anthracène à différents temps d'incubation, sont soumises à des extractions par l'acétate d'éthyle répétées 2 fois (v : v). La phase organique récupérée est par la suite séchée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200) à 45 °C. L'anthracène résiduel est dissout dans l'acétate d'éthyle. L'extrait obtenu est analysé par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (CG/SM): Chromatographe : Agilent Technologie 6890N/5975, Colonne HP-5 (5 % phenyl methyl siloxane) (longueur, 30 m ; diamètre interne, 0,25 cm ; épaisseur du film, 0,25 µm). Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml/min. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de la température est comme suit : 2 min à 70 °C, puis la température augmente jusqu'atteindre 230 °C à raison de 20 °C/min. La température passe par la suite de 230 à 300 °C pendant 2 min pour enfin se stabiliser à 300 °C pendant 10 min.

2.4.3 Croissance de la souche 1C sur le pyrène

Une d'expériences de dégradation a été réalisée en utilisant le pyrène comme modèle des HAP de poids moléculaire élevé et qui représente les HAP de caractère cancérigène. Pratiquement, dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu culture et 100 mg/l de pyrène, 2 ml de la culture bactérienne sont ajoutés et incubés à 45 °C sous une agitation de 150 tr/mn. La croissance bactérienne est suivie par la mesure de l'absorbance à 600 nm. La dégradation du pyrène a été évaluée par l'analyse CG-SM.

2.4.5 Croissance de la souche 1C sur d'autres composés aromatiques

La capacité de la souche 1C de croitre sur d'autres composés d'hydrocarbures a été également évaluée : HAP (naphtalène, phénanthrène et

fluoranthène), mélange d'hydrocarbures (pétrole brut et gasoil) et les intermédiaires de la dégradation des HAP (acide salicylique, acide benzoïque et acide phtalique). Les substrats sont additionnés au milieu synthétique à raison de 100 mg/l. Le pétrole brut et le gasoil ont été ajoutés pour une concentration finale de 1% (v/v).

2.5 Production de biosurfactants

Dans cette partie de l'étude nous avons utilisé deux souches thermotolérantes 1C et 1J afin de connaître leur capacité à produire de biosurfactants. L'évaluation de la production a été réalisée par la mesure de la tension de surface, l'indice d'émulsification et le test de déplacement du pétrole.

▪ Mesure de la tension de surface

La mesure de la tension de surface a été réalisée par l'utilisation d'un tensiomètre (GIBERTINI TSD 132389, Italie), qui détermine la tension de surface ou interfaciale à l'aide d'une sonde idéale, permettant un mouillage parfait quels que soient les liquides étudiés. Le périmètre de mouillage de la sonde étant parfaitement défini et connu (longueur de la lame), nous pouvons utiliser la force mesurée pour calculer la tension de surface ou interfaciale.

Vingt (20) ml de culture ont été prélevés et centrifugés (4000 tr/mn pendant 20 min). Le surnageant de culture est filtré à travers un papier filtre Wattman avant d'effectuer la mesure de la tension de surface.

▪ Mesure de l'activité émulsifiante

Cette méthode a été mise au point par Broderick et Cooney (1979) et modifiée par Francy *et al.* (1991) et Bodour *et al.* (2004). elle permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (substrat) dans une phase hydrophile (le milieu de culture ou la solution de biosurfactant). La méthode consiste à mélanger 4 ml du milieu de culture avec 4 ml de substrat hydrophobe. Le mélange est agité au vortex pendant 2 min. Après 24h d'incubation, on procède au calcul de l'indice d'émulsification, en les comparant à un témoin qui est constitué du milieu de culture aseptique (ou de l'eau) et du substrat et qui est soumis aux mêmes conditions.

Calcul de l'indice d'émulsion:

C'est le rapport entre la hauteur de l'émulsion formée et la hauteur totale du mélange, multipliée par 100 (figure 2.2).

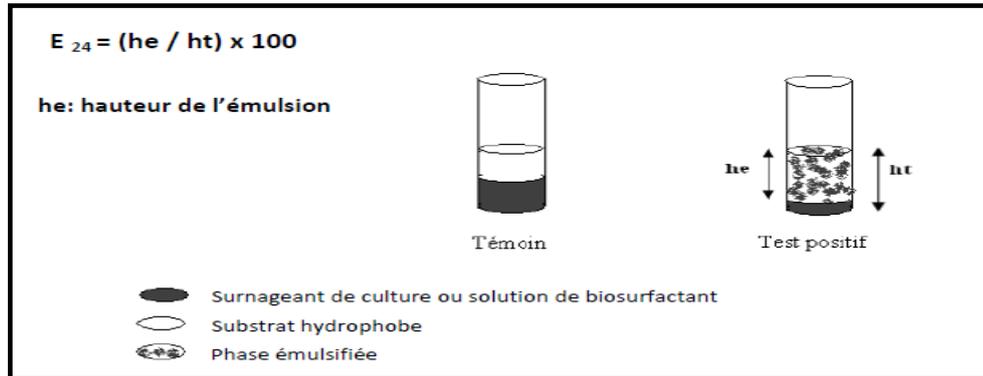


Figure 2.2: Réalisation du test d'émulsification (E_{24}).

▪ Test de déplacement de l'huile

Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. La méthode décrite ci-dessous est basée sur celle déjà décrite par Morikawa *et al.* (1993), avec quelques modifications. Un (01) ml de pétrole brut est étalé sur toute la surface d'eau distillée (25 ml) remplissant une boîte de Pétri (90 mm de diamètre). Une fine couche d'huile se forme immédiatement. Par la suite, 200 μ l de la solution de l'échantillon sont déposés doucement au centre de la couche d'huile, entraînant la formation d'un halo clair. Le diamètre du cercle ainsi formé est mesuré. Les étapes de réalisation de ce test sont présentées dans la figure 2.3.

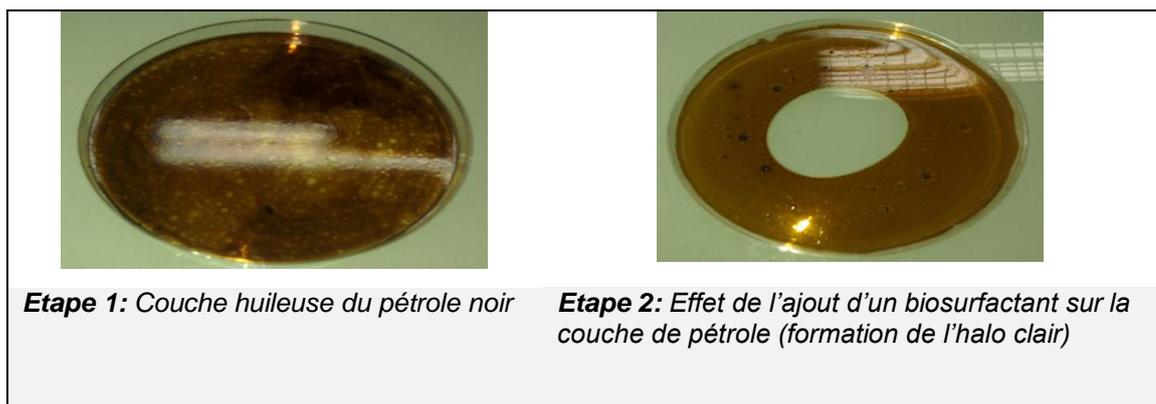


Figure 2.3 : Technique de déplacement d'huile

2.5.1 Optimisation de la production de biosurfactants

La production de biosurfactants est suivie par la mesure de la tension de surface et l'indice d'émulsification. La croissance bactérienne est estimée par la mesure de la DO à 600 nm après 24h d'incubation à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min. Les paramètres étudiés sont : la nature et la concentration du substrat carboné ainsi que la nature de la source d'azote.

2.5.1.1 Effet de la source de carbone

Plusieurs sources de carbone ont été testées dans cette étude : l'huile d'olive, l'huile de friture, la margine et le pétrole avec une concentration de 1% (v/v).

2.5.1.2 Effet de la source d'azote

Trois sources d'azote ont été utilisées à savoir : le nitrate de potassium (KNO_3), le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) et le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) avec une concentration de 0,4 g/l.

2.5.1.3 Optimisation de la concentration de la source de carbone, pH et salinité

La production de biosurfactant est influencée par les conditions de culture. Le plan d'expériences de Box- Behnken est choisi pour optimiser la production de biosurfactants par les deux souches 1C et 1J.

Les plans de Box-Behnken sont de mise en œuvre aisée car tous les facteurs ne prennent que trois niveaux : - 1, 0 et + 1, en variables codées. Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans pour les surfaces de réponse est un modèle du second degré avec interactions d'ordre 2, il s'écrit comme suit :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2$$

Les trois facteurs sélectionnés pour optimiser la production de biosurfactant par les deux souches 1C et 1J sont : la concentration de la source de carbone, le pH du milieu et la salinité. Les niveaux haut et bas de chaque facteur sont définis comme l'indique le tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Domaine d'étude (plans de Box-Bhenken pour trois facteurs).

Facteur	Code	Niveaux	
		Bas (-1)	Haut (+1)
Concentration	X_1	1% (v/v)	10% (v/v)
pH	X_2	3	11
Salinité	X_3	10 g/l	80 g/l

Les réponses choisies sont : la croissance bactérienne (y_1), l'activité émulsifiante (y_2) et la tension de la surface (y_3).

Le tableau 2.3 regroupe la matrice des expériences (Box-Bhenken)

Tableau 2.3 : Matrice expérimentale du plan Box-Bhenken.

Essai	Niveaux réels			Niveaux codés		
	Concentration	pH	salinité	Concentration	pH	Salinité
1	1	3	45	-	-	0
2	10	3	45	+	-	0
3	1	11	45	-	+	0
4	10	11	45	+	+	0
5	1	7	10	-	0	-
6	1	7	80	-	0	+
7	10	7	10	+	0	-
8	10	7	80	+	0	+
9	5,5	3	80	0	-	+
10	5,5	11	10	0	+	-
11	5,5	3	10	0	-	-
12	5,5	11	80	0	+	+
13	5,5	7	45	0	0	0
14	5,5	7	45	0	0	0
15	5,5	7	45	0	0	0

Le traitement des données expérimentales a été effectué à l'aide du logiciel Minitab16.

2.5.2 Extraction des biosurfactants

Après 24h d'incubation, le bouillon de culture a été centrifugé à 8000 tr/min pendant 20 min. Le surnageant est acidifié à un pH 2 avec l'HCl 3N. Ensuite, il est laissé au repos pendant une nuit à 4 °C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 12000 tr/min pendant 20 min à 4 °C. L'extraction a été effectuée une fois à l'aide d'un mélange (Chloroforme / Méthanol : 2/1 (v/v)). Le solvant a été ensuite évaporé à l'aide d'un rotavapeur à 45 °C. Le biosurfactant obtenu est un liquide visqueux d'une couleur marron-jaunâtre (couleur du miel).

2.5.3 Caractérisation des biosurfactants

2.5.3.1 Caractérisation biochimique et structurale

- **Composition biochimique** : La composition des biosurfactants a été déterminée en utilisant des méthodes standards :
 - Les protéines ont été déterminées par la méthode de Bradford (1976), l'albumine sérique bovine (ASB) a été utilisée comme standard.
 - Les glucides ont été déterminés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956). Le glucose a été utilisée comme standard.
- **Analyse par IR** : Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge Nicolet 380 Thermo

2.5.3.2 La concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la mesure de la tension de surface des solutions de biosurfactant à différentes concentrations. L'augmentation de la concentration de biosurfactant entraîne une diminution de la tension de surface jusqu'à une concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), au-delà de laquelle la tension de surface demeure constante.

2.5.3.3 Pouvoir émulsifiant

Afin d'évaluer le pouvoir d'émulsifiant des deux biosurfactants, ces derniers ont été testés contre huit types de liquides hydrophobes à savoir le pétrole brut, le kérosène, gasoil, hexadécane, hexane, l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile de moteur. L'activité émulsifiante a été mesurée selon la méthode de Cooper et Goldenberg (1987). Brièvement, un mélange composé de 4 ml de la solution de biosurfactant (2 g/l) et 4 ml de liquide hydrophobe, est agité pendant 2 min à une vitesse maximale (8000 tr/min) (agitateur IKA-Mini MR) puis laissé au repos pendant 24 h avant de prendre les mesures.

2.5.3.4 Activité antimicrobienne

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des biosurfactants produits par les deux souches (1C et 1J), deux méthodes ont été utilisées : Méthode de microplaque à 96 puits pour le biosurfactant de la souche 1C et la méthode à disque pour le biosurfactant de la souche 1J.

L'activité antimicrobienne du biosurfactant 1C a été testée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (Gram+) et les bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella enterica* CIP 8039, *Erwinia* sp., *Agrobacterium* sp. et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

- **Détermination des CMI**

Cent (100) µl de la solution de biosurfactant, préparés dans le méthanol à 1mg/ml (Das *et al.*, 2008), sont ajoutés dans le premier puits de la microplaque stérile, puis des dilutions successives (au 1/2) sont effectuées de la colonne 1 à la colonne 10 incluse. Ensuite, 100 µl de milieu de culture contenant environ 10^8 UFC/ml du microorganisme testé et 30 µl de résazurine à 0,02% (indicateur coloré) sont déposés dans tous les puits. La plaque était ensuite soumise à une légère agitation afin d'homogénéiser les milieux.

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

Après 16 à 20 h d'incubation aérobie à 30 °C, la lecture de la CMI est faite par simple regard au travers de la microplaque. La lecture repose sur le changement de la coloration initiale (du bleu au rose) dans la microplaque. La CMI est la plus petite concentration avec absence de croissance visible ; elle correspond au premier puits qui ne vire pas au rose (il reste bleu).

L'activité antimicrobienne du biosurfactant 1J est testée contre les espèces *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (Gram négatif) selon la technique de Dhiman *et al.* (2011). Chaque espèce cible a été inoculée ($100 \mu\text{l}$ à 10^6 UFC.ml^{-1}) par étalement sur gélose et un disque stérile (6 mm) immergé dans une solution de 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. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition (zone claire autour du disque) permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

2.5.4 Etude de la stabilité des biosurfactants

2.5.4.1 Stabilité chimique

Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions HCl (1N) ou NaOH (1N). Pour examiner également l'effet de la salinité, le surnageant a été soumis à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) : 10, 20, 50, 100, 150 et 200 g/l. Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24 h avant de mesurer la TS.

2.5.4.2 Stabilité thermique

Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 25, 30, 40, 70°C pendant 24h.

2.5.5 Solubilité des hydrocarbures par les deux biosurfactants

Afin de déterminer l'effet de deux biosurfactants sur la solubilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des quantités fixes (0,006 g) de chaque HAP (anthracène, phénanthrène et pyrène) sont ajoutées séparément à chaque solution de biosurfactant (10 ml) de différentes concentrations (0,2 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 et 1,5 g/l.). Ces tubes sont agités à 30 °C et 200 tr/min à l'abri de la lumière

pendant 24 h, puis centrifugés à 12000 tr/min à 4 °C pour une durée de 30 min. Un volume de 5 ml de surnageant à été recueilli. L'extraction des HAP, dissous dans la solution de biosurfactant, est réalisée par l'ajout d'un volume égal d'hexane. Puis concentré à 1ml avant d'être analysé par le spectrophotomètre UV-Vis à 254, 250 et 273 nm pour le phénanthrène, anthracène et le pyrène, respectivement.

2.6 Identification des souches bactériennes

L'identification des souches 1J et 1C est réalisée en se basant sur des études phénotypique et génotypique. Les tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique Api 50 CH ; alors que l'identification complète a été réalisée par la technique ARN 16S au sein du Laboratoire de Bioprocédés Environnementaux (Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie).

Nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems). Les résultats de la séquence ont été importés dans le Bio Edit v5.0.9 (Hall *et al.*, 1999) et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blast, non redondant) (Altschul *et al.*, 1997) avec la séquence complète, par l'intermédiaire de Gen Bank (Benson *et al.*, 2000), a permis d'identifier la souche vis-à-vis des pourcentages de similitude entre souches apparentées.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Biodégradation des HAP en présence des surfactants chimiques

La biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques est un facteur très important pour leur biodégradation, l'ajout des surfactants chimiques est l'un des solutions possibles pour les solubiliser et les rendre accessibles aux microorganismes.

3.1.1 Croissance de la souche 1C sur les surfactants chimiques

La capacité de la souche 1C, à utiliser les trois surfactants comme source de carbone et d'énergie, a été testée. La Fig.3.1 regroupe les résultats obtenus.

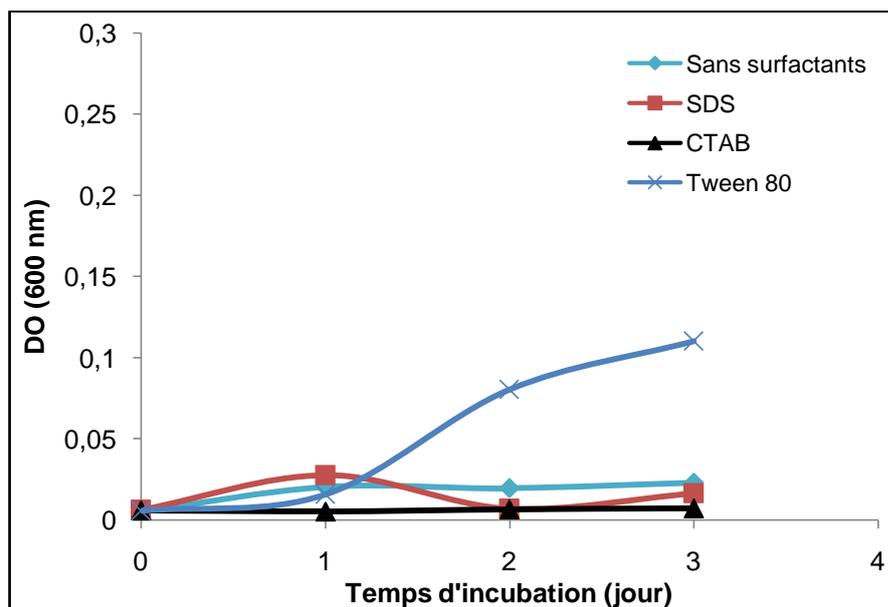


Figure 3.1 : Croissance bactérienne sur les trois surfactants (T= 45°C, pH = 7, Agitation = 150 tr/mn)

Les résultats de la croissance bactérienne sur les trois types de surfactants montrent que la souche 1C peut utiliser le Tween 80 comme seule source de carbone et d'énergie. Par contre, aucune croissance bactérienne n'a été observée

sur le SDS et le CTAB. Ce qui indique que la souche 1C ne peut pas utiliser ces deux surfactants comme seule source de carbone et d'énergie.

Doong et Lei (2003) ont rapporté que la croissance de *Pseudomonas putida* a été inhibée par Brij 35 et le Tween 80. Mais la même souche peut utiliser Triton X-100 et Brij 30 comme seule source de carbone.

3.1.2 Biodégradation de naphtalène en présence de surfactant

Afin d'étudier l'effet des surfactants sur la biodégradation du naphtalène, trois types de surfactants ont été choisis pour cette série d'expériences à savoir le Tween 80, SDS et CTAB. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.2

D'après ces résultats, nous remarquons que le taux de dégradation du naphtalène par la souche 1C a légèrement diminué (6 %) en présence de Tween 80. Par contre, la croissance bactérienne a augmenté lorsque le Tween 80 est ajouté au milieu. Le taux de dégradation du naphtalène a diminué probablement à cause de l'utilisation en parallèle ou préférentielle du surfactant comme source de carbone et d'énergie par la souche 1C. Des résultats similaires ont été rapportés par Pathak *et al.* (2009). La dégradation du naphtalène par *Pseudomonas sp.* a diminué en présence de Tween 80.

En présence de CTAB, le taux de dégradation du naphtalène a légèrement augmenté. Par contre, la croissance bactérienne a nettement augmenté. Pathak *et al.* (2009) ont observé que la dégradation du naphtalène par *Pseudomonas sp.* HOB1 a été inhibée en présence de CTAB.

L'ajout de SDS n'a aucun effet significatif sur la dégradation du naphtalène. Par contre, l'augmentation de la croissance bactérienne observée est due à l'utilisation du SDS comme source de carbone par la souche 1C avec le naphtalène. Un effet négatif de SDS sur la biodégradation du naphtalène par la souche *Pseudomonas sp.* HOB1 a été rapporté par Pathak *et al.* (2009). Les travaux de Chen *et al.* (2001) ont révélé que l'ajout de SDS ne change pas le taux de dégradation du naphtalène.

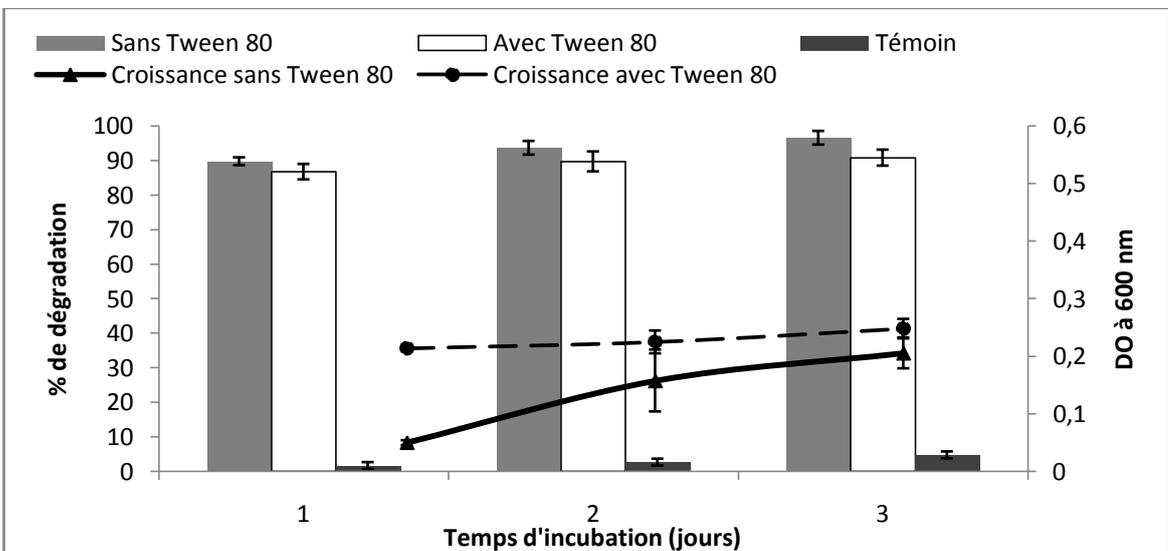
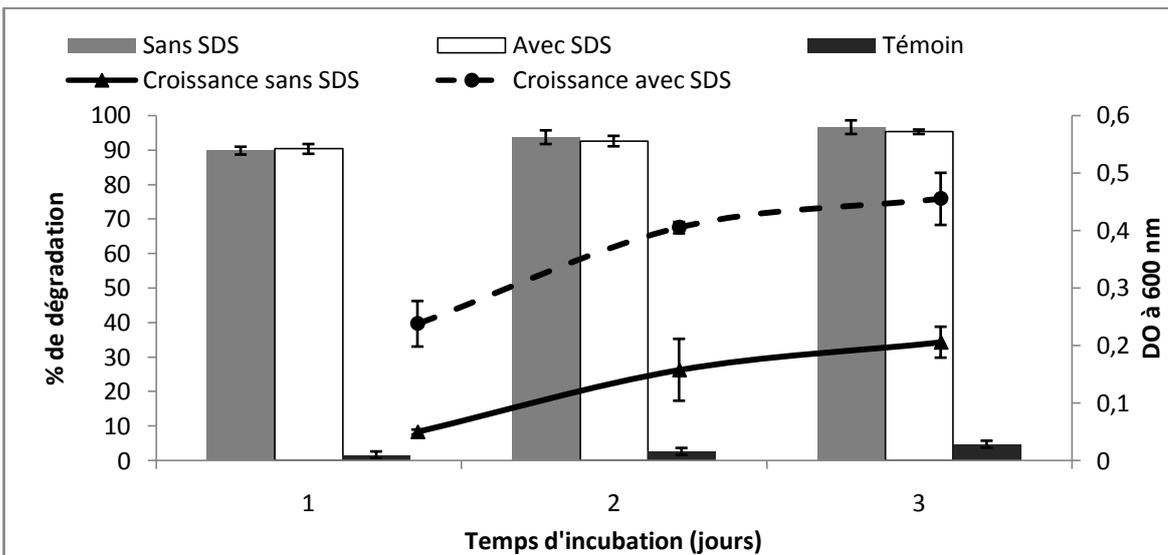
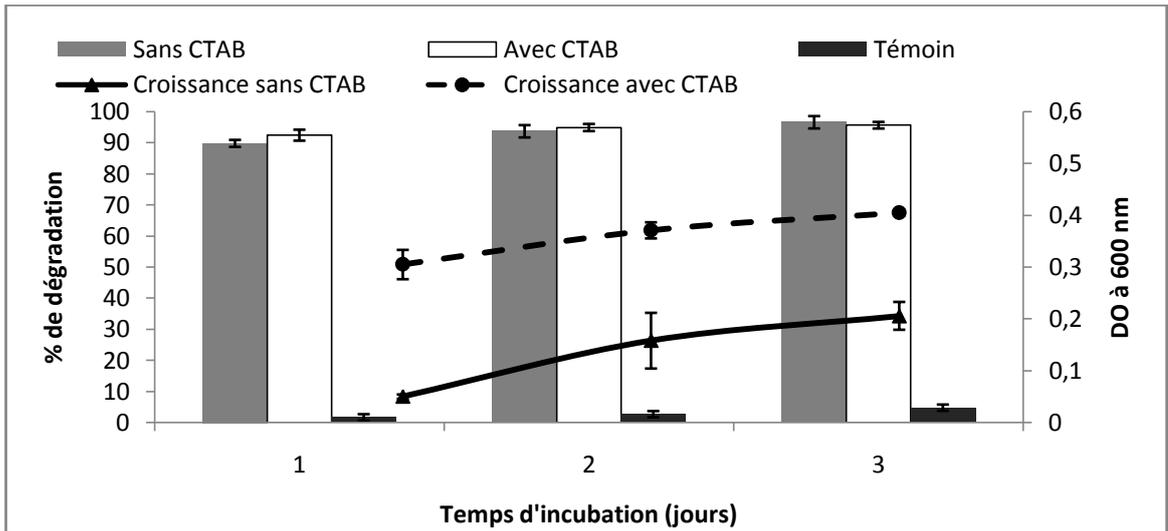


Figure 3.2 : Biodégradation du naphthalène en présence de surfactants (T= 45°C, pH = 7, Agit. =150 tr/mn, 100 mg/l du Naph)

3.1.3 Biodégradation de l'anthracène en présence de surfactant

La croissance bactérienne a augmenté en présence de Tween 80. Alors que le taux de dégradation d'anthracène par la souche 1C a augmenté seulement dans le premier jour d'incubation. Au-delà, il a diminué par rapport au témoin (sans surfactant).

Plusieurs études ont examiné la possibilité d'utiliser le Tween 80 comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes. Les tests de croissance sur les surfactants ont montré que la souche 1C peut utiliser le Tween 80 comme substrat de croissance ce qui justifié l'augmentation de la croissance bactérienne en présence de Tween 80. L'augmentation du taux de dégradation d'anthracène observé après le premier jour d'incubation peut être due à l'augmentation de la fraction soluble d'anthracène dans le milieu en présence de Tween 80. Les travaux de Rodrigues *et al.* (2013) ont montré que le Tween 20 a amélioré la dégradation d'anthracène et fluoranthène par *Pseudomonas putida* ATCC 17514.

En comparant avec le Tween 80, des résultats similaires ont été obtenus par l'ajout de CTAB. En présence de ce dernier, le taux de dégradation d'anthracène a augmenté après le premier jour d'incubation. Au-delà, aucune différence significative n'a été observée. Rodrigues *et al.* (2013) ont trouvé que la biodégradation d'anthracène et du fluoranthène par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 17514 a diminué en ajoutant le CTAB.

Le taux de dégradation d'anthracène est très important sans l'ajout de SDS. Cependant, la croissance bactérienne a diminué en présence de SDS. Des résultats semblables ont été rapportés par Deschenes *et al.* (1995), la dégradation d'anthracène dans le sol n'a pas augmenté par l'ajout de SDS. En utilisant la souche *Pseudomonas putida* ATCC 17514, Rodrigues *et al.* (2013) ont montré que l'ajout de SDS réduit le taux de dégradation du fluoranthène. Cependant, le taux de dégradation d'anthracène a augmenté deux fois.

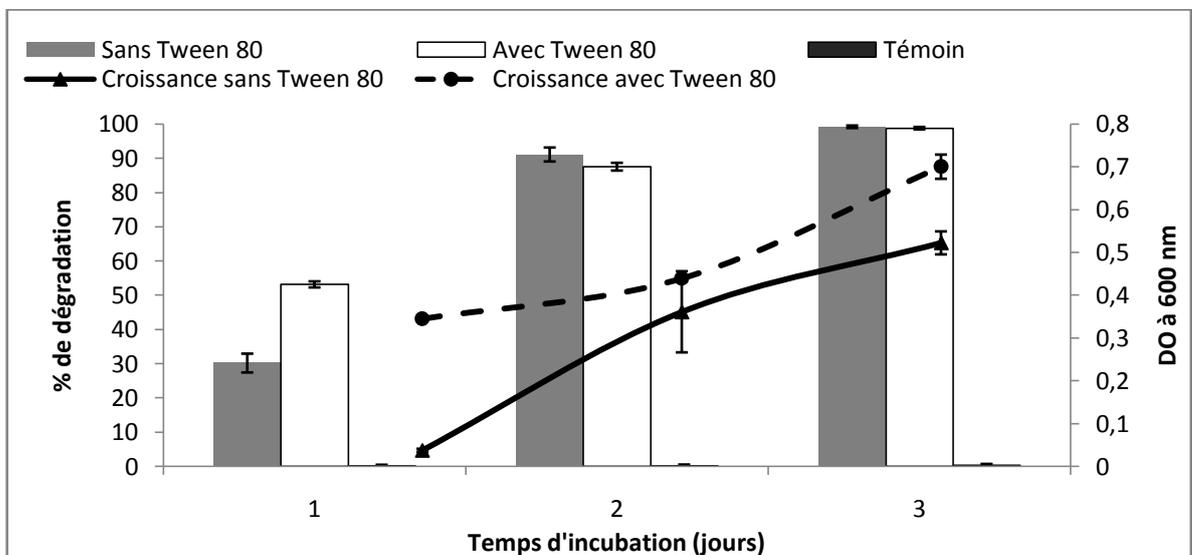
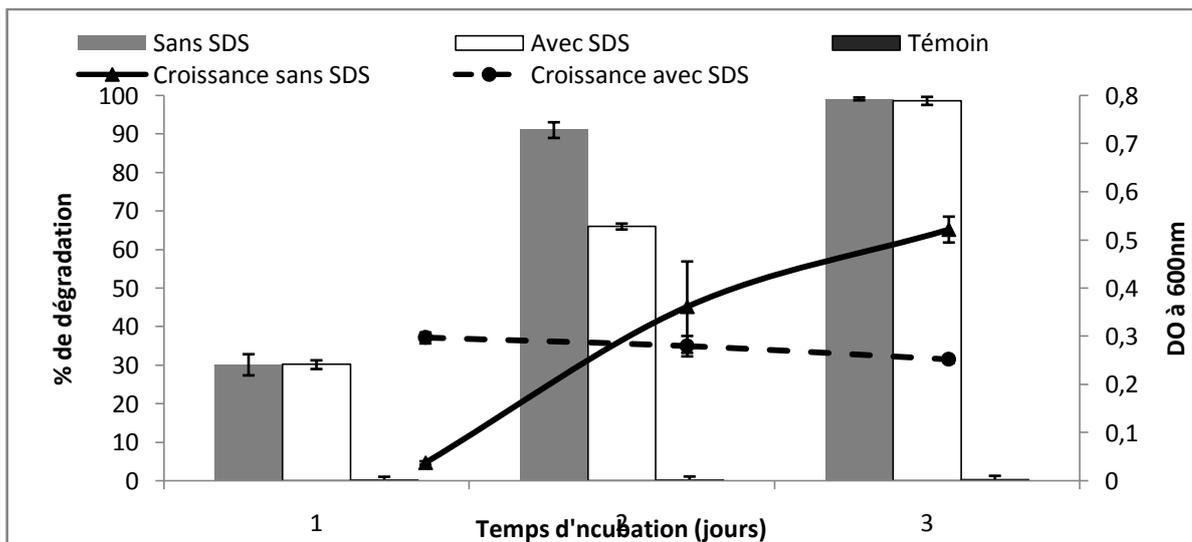
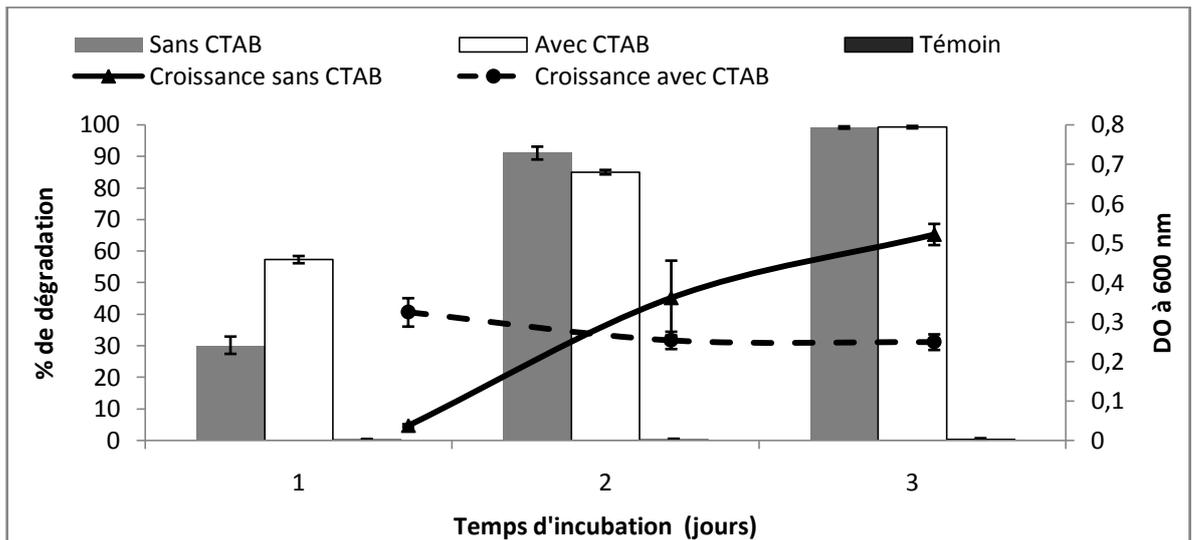


Figure 3.3 : Biodégradation d'anthracène en présence de surfactants (T= 45°C, pH = 7, Agit. = 150 tr/mn, 100 mg/l d'Anth)

L'analyse de la variance de la dégradation des HAP et de la croissance bactérienne est représentée dans le tableau 3.1. Les résultats obtenus indiquent que l'ajout des surfactants chimiques n'a aucun effet significatif sur la dégradation du naphthalène et d'anthracène par la souche 1C. Toutefois, un effet significatif sur la croissance bactérienne dans le système naphthalène-surfactants est observé.

Tableau 3.1: Analyse statistique (ANOVA)

Facteur	Source de variation	ddl	Moyenne carrée	F (valeur calculé)	F (valeur de table)	Niveau de signification
Dégradation du naphthalène	Ajout du surfactant	3	15.5385111	2.48376081	4.07	Non significatif
	Temps d'incubation	8	6.25604167			
Dégradation d'anthracène	Ajout du surfactant	3	156.201502	0.1728342	4.07	Non significatif
	Temps d'incubation	8	903.765015			
Croissance bactérienne sur le naphthalène	Ajout du surfactant	3	0.03405197	5.2874965	4.07	Significatif
	Temps d'incubation	8	0.00644009			
Croissance bactérienne sur l'anthracène	Ajout du surfactant	3	0.0417346	1.98084404	4.07	Non significatif
	Temps d'incubation	8	0.0210691			

La relation entre la biodégradation des hydrocarbures et les surfactants chimiques reste toujours non clair. Des résultats différents ont été rapportés sur la biodégradation des HAP en présence de surfactants. Généralement, l'effet positif est dû à l'augmentation de la solubilité de ces composés et par la suite l'augmentation de leur biodisponibilité dans le milieu. L'effet négatif peut être dû aux plusieurs facteurs comme la toxicité des surfactants pour les

microorganismes, la compétition ou l'utilisation de surfactants par les microorganismes comme source de carbone en parallèle avec l'hydrocarbure.

Le Triton X100, SDS et Tween 80 ont des effets variables sur la biodégradation du phénanthrène selon le microorganisme utilisé et donc l'effet de surfactant dépendra aussi de type et d'espèce des microorganismes. La nature chimique de surfactant influe sur la biodégradation des hydrocarbures. Mais, l'effet des surfactants sur la biodégradation des HAP dépendra aussi de l'hydrocarbure lui-même (Rodrigues *et al.*, 2013).

Chen *et al.* (2013) ont trouvé que la biodégradation du pyrène par *Burkholderia cepacia* a augmenté en présence de Tween 80. Des résultats similaires ont été obtenus par Zhang and Zhu (2012), l'ajout de Tween 80 améliore la biodégradation du pyrène par *Klebseilla oxytoca*. Par contre, un effet négatif du Tween 80 sur la biodégradation du naphthalène a été rapporté par Pathak *et al.* (2009).

Les résultats obtenus par Rodrigues *et al.* (2013) montrent que le même surfactant a des effets différents sur la biodégradation de l'anthracène et du fluoranthène. Afin d'améliorer la biodégradation des HAP, il faut trouver un compromis entre les caractéristiques de substrat (HAP), microorganisme et surfactant.

3.2 Biodégradation de l'anthracène par la souche 1C

La biodégradation est un processus dépendant essentiellement de la nature et de la quantité des hydrocarbures, les propriétés physico-chimiques de site contaminé et la capacité biodégradative des microorganismes. Les conditions environnementales jouent un rôle très important dans le contrôle de la croissance et l'activité bactérienne durant la biodégradation des HAP. Par conséquent, il est très important d'étudier l'effet des facteurs physico-chimiques sur la biodégradation des HAP pour une implantation de la biodégradation comme une technologie de bioremédiation.

3.2.1 Croissance de la souche 1C sur l'anthracène

Les résultats obtenus montrent que la souche 1C peut croître sur l'anthracène (100 mg/l) dans des conditions thermophiles (45 °C). Après 4 jours d'incubation, la croissance bactérienne (DO à 600 nm) a atteint une valeur de 0,5. La cinétique de croissance bactérienne est représentée sur la figure 3.4.

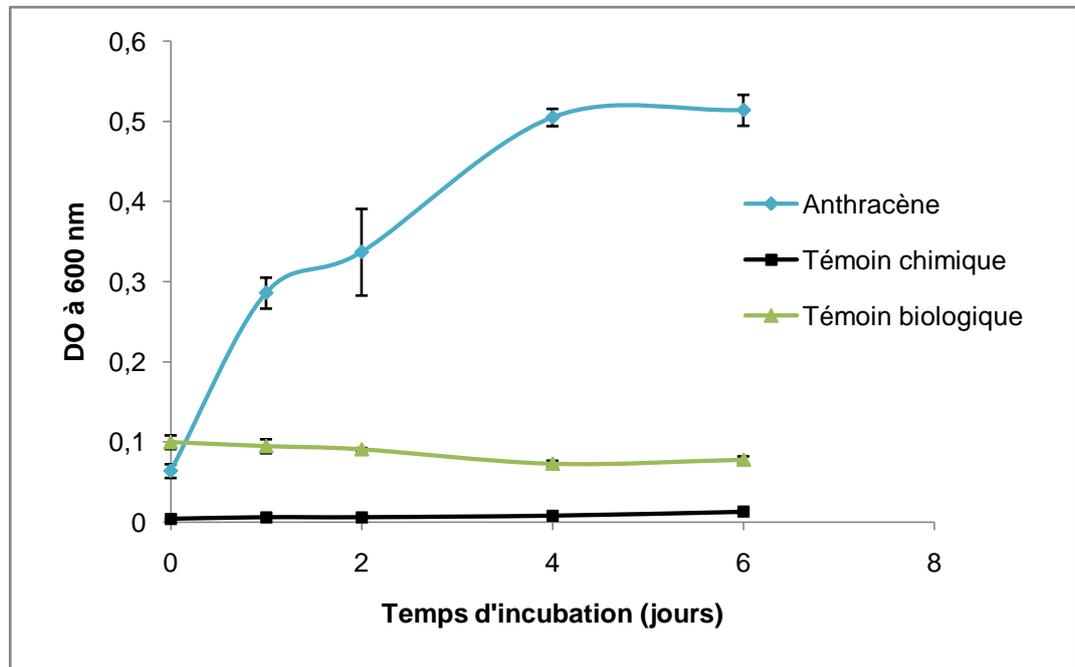


Figure 3.4 : Cinétique de croissance de la souche 1C sur l'anthracène

Plusieurs travaux ont décelé qu'un nombre de microorganismes sont capables d'utiliser l'anthracène comme source de carbone. Les travaux réalisés par Ye *et al.* (2011) ont montré que la souche *Aspergillus fumigatus*, isolé à partir d'un sol contaminé à coté d'une station de gaz, peut utiliser l'anthracène comme source de carbone à 30 °C.

Egalement, *Martelella* sp. AD-3, isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures pétroliers avec de fortes salinités, est capable de dégrader l'anthracène après 6 jours d'incubation à 30 °C (Cui *et al.*, 2014).

Reddy *et al.* (2010) ont rapporté qu'après 48h d'incubation, la croissance bactérienne de la souche *Bervibacillus* sp. PDM-3 a aboutit une valeur de 0,6 (DO à 600 nm) en présence de 250 mg/l d'anthracène. Cependant, Zeinali *et al.* (2007) ont rapporté que *Nocardia* sp. TSH1 est capable de métaboliser des

concentrations élevée en anthracène (500 mg/l) à 50 °C. Un taux de dégradation de 25% a été enregistré après 7 jours d'incubation.

La souche 1C est capable d'utiliser l'anthracène comme source de carbone et d'énergie, Un taux de 92,58% de dégradation est atteint après 48 h d'incubation. Les chromatogrammes CG-SM obtenus sont présentés sur la figure 3.5.

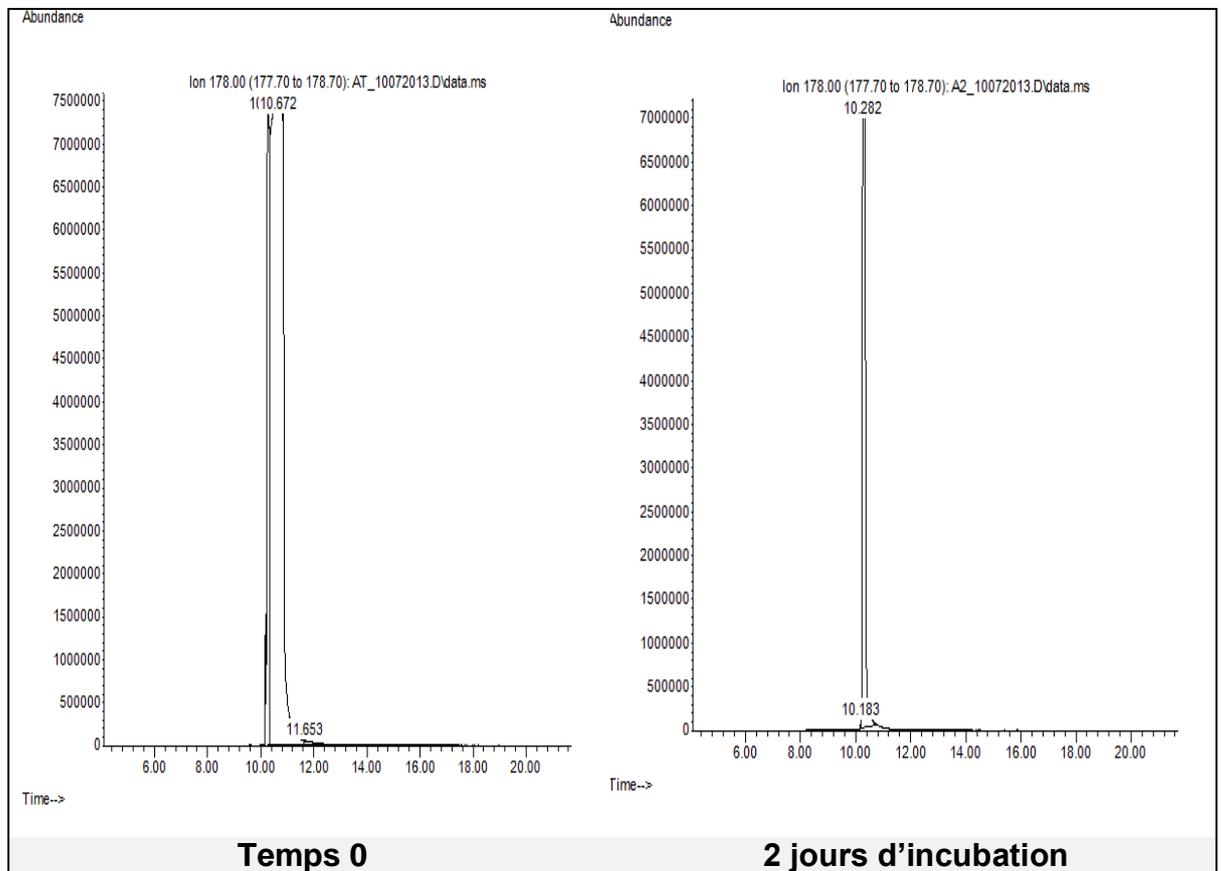


Figure 3.5 : Chromatogramme de dégradation d'anthracène par la souche 1C (100 mg.l⁻¹, 45 °C et 150 tr.min⁻¹).

3.2.2 Effet de la concentration de l'anthracène

La concentration du substrat est un facteur très important influençant la dégradation. L'effet de la concentration d'anthracène, sur le taux de dégradation par la souche 1C, a été étudié (Figure 3.6).

Ces résultats montrent que l'efficacité de dégradation est proportionnelle à la quantité du substrat ; plus la quantité est élevée plus le taux d'élimination est important. Il est à noter que les concentrations élevées des HAP ont un effet positif sur la croissance des bactéries car ces derniers sont la seule source de

carbone. Par contre, les faibles concentrations est un facteur limitant pour la croissance bactérienne (Norzila *et al.*, 2009). La présence d'une concentration moyenne d'anthracène dans le milieu provoque une force motrice importante pour réduire la concentration du substrat afin de le solubiliser et par suite l'utiliser comme source de carbone nécessaire pour la croissance bactérienne (Lin *et al.*, 2010).

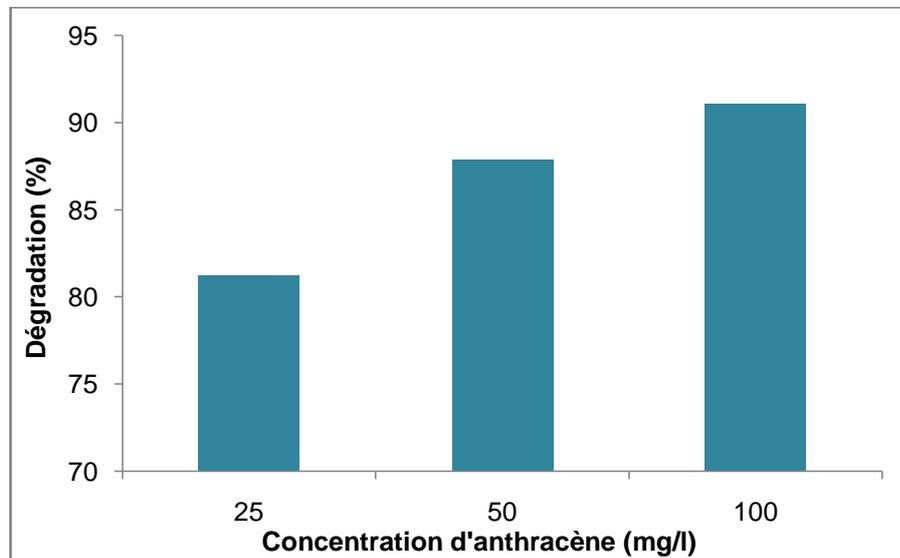


Figure 3.6: Effet de la concentration d'anthracène sur Le taux de dégradation après 48h d'incubation (T= 45°C, pH = 7, Agit. =150 tr/mn)

Swaathy *et al.* (2014) ont étudié l'effet de la concentration d'anthracène sur la croissance de la souche *Bacillus licheniformis* (100-1000 mg/l). Les résultats obtenus montrent qu'à partir de 500 mg/l, aucune croissance bactérienne n'a été observée. La meilleure croissance a été enregistrée lorsque la concentration d'anthracène était de 300 mg/l avec un taux de dégradation de 95% après 15 jours d'incubation.

Arulazhagam et Vasudevan (2011) ont rapporté que la capacité d'*Ochrobacterium* sp. VA1 d'utiliser l'anthracène comme source de carbone est intéressante car 90% d'anthracène (concentration initiale de 3 mg/l) a été dégradé après 5 jours d'incubation à 37 °C et 30 g/l de NaCl. Lorsque la concentration d'anthracène augmente jusqu'à 100 mg/l, seulement 56% a été dégradé.

Cui *et al.* (2014) ont signalé que l'antracène (40 mg/l) a été complètement dégradé après 6 jours d'incubation à 30°C par la souche *Martelella* sp. AD-3. Alors que seulement 60% d'antracène (concentration initiale égale à 10 mg/l) a été dégradé après 5 jours d'incubation à 30 °C par la souche *Aspergillus fumigatus*.

Dans les mêmes conditions, Chupungars *et al.* (2009) ont révélé que 92% d'antracène a été dégradé par la souche *Agrocybe* sp. CU-43. Alors que ce taux a réduit jusqu'à 70% en remplaçant cette souche par une autre nommée *Xylaria* sp. CU-1.

3.2.3 Effet du pH

Généralement, une bonne croissance des microorganismes est observée pour un pH neutre. Les écosystèmes aquatiques ont souvent un pH stable autour de 7. En revanche, le sol peut avoir des valeurs de pH allant de 2,5 à 11,0. Dans ce cas peu de microorganismes peuvent tolérer ces valeurs de pH. En effet, la variation de pH sur la dégradation d'antracène a été étudiée. Les résultats expérimentaux obtenus sont illustrés dans la figure 3.7.

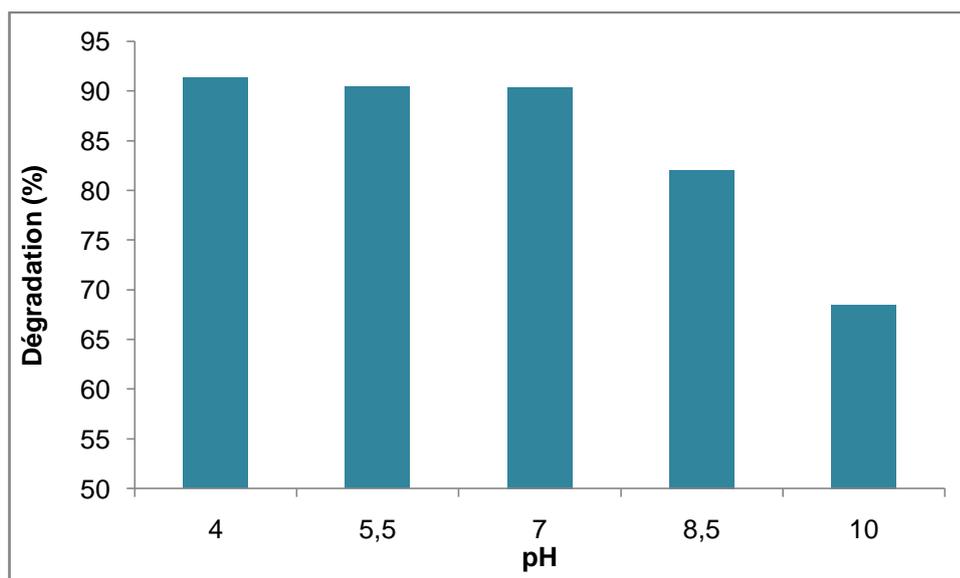


Figure 3.7 : Effet du pH sur le taux de dégradation d'antracène après 48h d'incubation (100 mg/l d'anthr. , T= 45°C, pH = 7, Agit. =150 tr/mn)

Les résultats obtenus montrent que la souche 1C est capable de tolérer à d'importantes variations de pH (4 à 10). La gamme optimale du pH varie de 4 à 7.

Dans cette gamme de pH, la dégradation est importante (aux alentours de 90 %). Néanmoins, dans les milieux alcalins, la biodégradation est retardée. Des résultats similaires ont été rapportés par Jacques *et al.* (2005) où le maximum de croissance de la souche *P. Citronellolis* 222A sur l'anthracène a été observé à pH neutre.

La biodégradation d'anthracène par *Aspergillus fumigatus* est affectée par les conditions d'incubation, les résultats obtenus montrent que le maximum de dégradation est obtenu lorsque le pH de milieu est de 7,5. Le taux de dégradation diminue lorsque le pH est de 4 ou de 8-10 (Ye *et al.* 2011). Les travaux de Cui *et al.* (2014) ont montré que le pH = 9 est considéré comme optimal pour la dégradation d'anthracène par *Marteella* sp. AD-3.

3.2.4 Effet de la salinité

Vu les grandes variétés en sel dans les sites contaminés (mers, lacs, différents types de sols) et l'effet de ce paramètre sur la physiologie des microorganismes en affectant l'efficacité de la biodégradation, différentes concentrations en sel (NaCl) ont été examinées : 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10% (p/v). La concentration de l'anthracène est fixée à 100 mg/l. Les résultats expérimentaux obtenus sont présentés dans la figure 3.8.

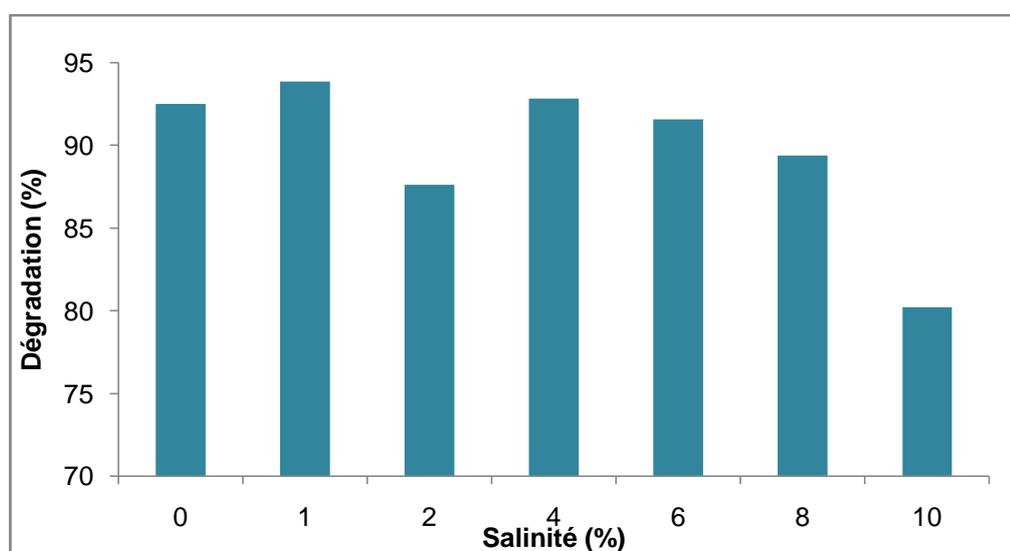


Figure 3.8 : Effet de la salinité sur le taux de dégradation après 48h d'incubation (100 mg/l d'anthr. , T= 45°C, pH = 7, Agit. =150 tr/mn)

Excepté 10% de salinité, où nous avons constaté une diminution du taux de dégradation, la souche 1C tolère des concentrations très importantes en sel. Par exemple, pour une salinité de 8%, le taux de dégradation atteint 89%. Egalement, des salinités nulles n'affectent pas la dégradation d'anthracène ; un taux de 92,5% d'élimination a été enregistré. Par conséquent, la souche 1C peut être classée comme une souche halotolérante.

Minai-Tehrani *et al.* (2009) ont rapporté que la salinité optimale de dégradation dépend de l'hydrocarbure à dégrader ; la biodégradation de pétrole brut est élevée en absence de sel alors que la dégradation du mélange d'hydrocarbures (phénanthrène, anthracène, fluouranthène, pyrène et le chrysène) est optimale à 1%. Ye *et al.* (2011) ont signalé que la souche *Aspergillus fumigatus* dégrade entre 60-65% d'anthracène lorsque et la concentration de NaCl égale à 0 g/l. En revanche, la souche *Martelella* sp. AD-3 pouvait croître sur l'anthracène en présence des concentrations en sel allant jusqu'à 30 g/l (Cui *et al.*, 2014).

3.2.5 Métabolisme de dégradation d'anthracène

L'anthracène est l'un des HAP les plus étudiés, il est utilisé comme modèle des HAP à faible poids moléculaire. La souche 1C est capable de dégrader l'anthracène (100 mg/l) en aérobiose. L'analyse de milieu de croissance par GC-MS a permis l'identification de quelques structures pouvant constituer des intermédiaires de la biodégradation d'anthracène. Les spectres de masse des composés proposés comme métabolites sont regroupés dans la figure 3.9.

Les chromatogrammes GC-MS ont permis l'identification de deux métabolites désigné comme métabolite I et II :

- Le premier métabolite est élué à 11,053 min, son spectre de masse en ion moléculaire (M)⁺ à 208 m/z et des fragments d'ions à 180, 152, 126 et 76 m/z indiquant que le composé peut être 9,10-anthraquinone. Ce composé a été déjà proposé comme métabolite de la dégradation d'anthracène par *Martelella* sp. AD-3 (Cui *et al.*, 2014), *Mycobacterium* (Moody *et al.*, 2001) et *Bacillus* (Ahmed *et al.*, 2012).
- Le métabolite II est élué à 10,735 min, son spectre de masse en ion moléculaire (M)⁺ à 149 m/z et des fragments d'ions à 223 , 205,6, 149

(100), 104, 76 et 57 m/z. En se basant sur ses valeurs m/z et après comparaison de son spectre de masse avec les spectres de la bibliothèque disponible en GC-MS indiquant que le composé peut être acide benzène-1,2-dicarboxylique

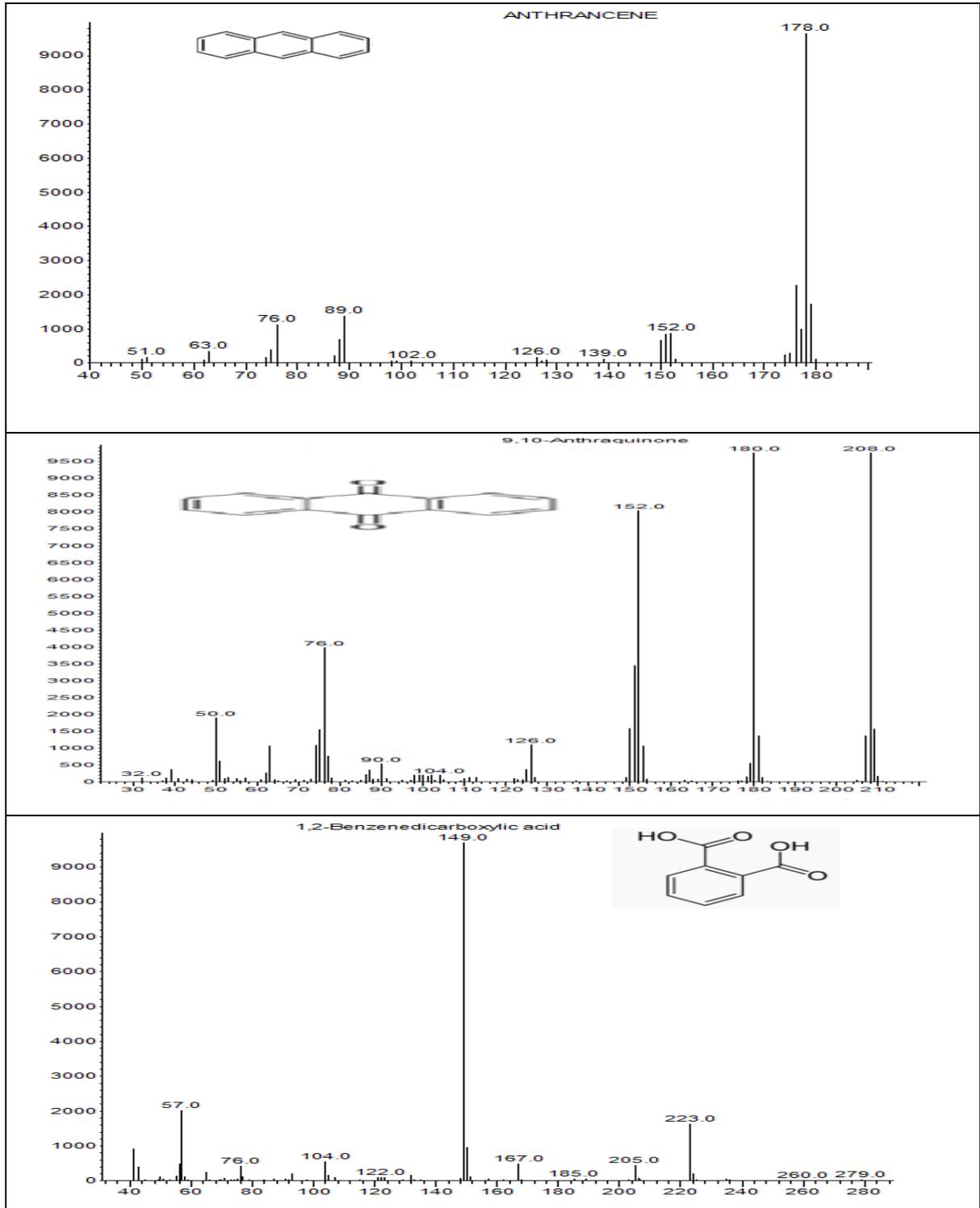


Figure 3.9 : Spectres de masse de métabolites de la dégradation d'anthracène par la souche 1C

Ye *et al.* (2011) ont rapporté que l'anhydride phtalique, anthrone et l'antraquinone sont les métabolites de la dégradation d'anthracène par *Aspergillus fumigatus*. Les travaux de Cui *et al.* (2014) ont permis d'identifier l'acide 9,10-antraquinone, 3-hydroxy-2-naphthoïque et 6,7-benzocoumarin comme métabolites de la dégradation d'anthracène par *Martelella* sp. AD-3.

Swaathy *et al.* (2014) ont identifié le naphthalène, naphthalène-2-méthyl, benzaldehyde-4-propyl, acide 1,2 benzène di-carboxylique et acide benzène acétique comme métabolites de la dégradation d'anthracène par *Bacillus licheniformis* MTC 5514.

3.3 Biodégradation du pyrène par la souche 1C

Le pyrène est l'un des HAP qui posent de sérieux problèmes pour l'environnement et la santé humaine. C'est pour cette raison, une étude de la dégradation de pyrène par la souche 1C a été réalisée. La croissance bactérienne de la souche 1C sur le pyrène est illustrée dans la figure 3.10.

En comparaison avec les témoins chimique et biologique, la souche 1C est capable d'utiliser le pyrène comme source de carbone et d'énergie. L'analyse du pyrène résiduel par GC-MS (figure 3.11) montre que la souche 1C dégrade 45,6% du pyrène (100 mg/l) après 8 jours d'incubation à 45 °C et sous une agitation de 150 tr/min.

Des résultats similaires ont montré que 30% du pyrène (100 mg/l) a été dégradé par *Bacillus cepacia* J6, après 80h d'incubation à température ambiante, l'ajout de Tween 80 (500 mg/l) a augmenté la croissance bactérienne avec un taux de dégradation de 50%, après 80h d'incubation (Chen *et al.*, 2013).

Les 50% du phénanthrène et pyrène (100 mg/l) ont été dégradés par *Ganoderma lucidum* BCRC 36021 après 10 jours d'incubation à 30 °C (Ting *et al.*, 2011). *Paenibacillus* sp. PR-P1 est capable de dégrader 90% de pyrène (50 mg/l) après 21 jours d'incubation (Danne *et al.*, 2001).

La capacité de la souche *Ochrobacterium* sp. VA1 à dégrader 84% de pyrène (3 mg/l), après 5 jours d'incubation à 37 °C et 30 g l⁻¹ de NaCl, a été rapportée par Arulazhagam et Vasudevan (2011). Cette souche a dégradé seulement 32% de ce HAP lorsque sa concentration initiale est de 100 mg/l.

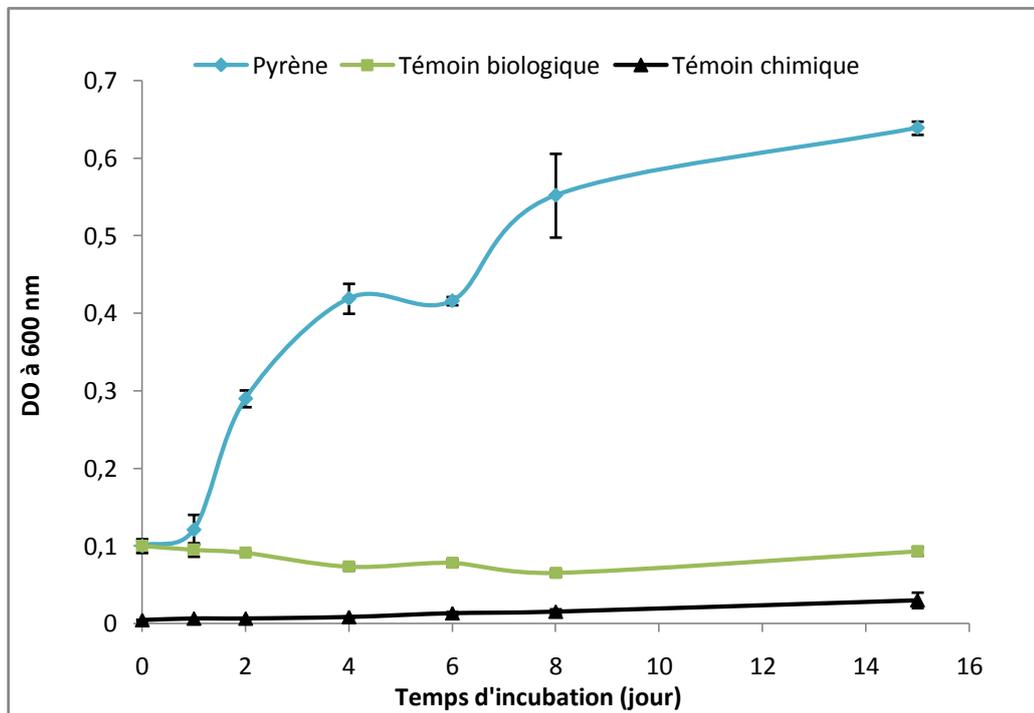


Figure 3.10 : Cinétique de croissance de la souche 1C sur le pyrène

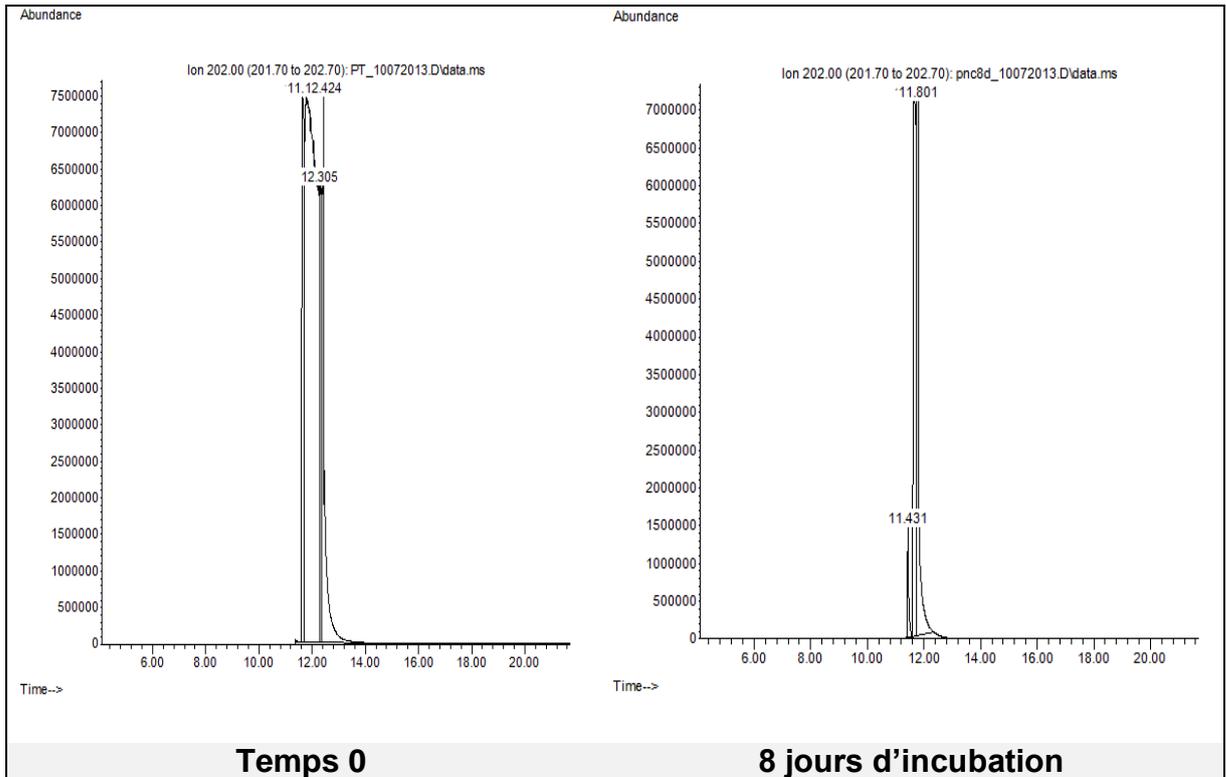


Figure 3.11 : Chromatogramme de dégradation du pyrène par la souche 1C (100 mg.l⁻¹, 45 °C et 150 tr.min⁻¹). Le suivi de la tension de surface au cours de la dégradation du pyrène (100 mg/l) a montré une réduction très importante de la tension de surface (58,2 à 30,2 mN/m) (figure 3.12).

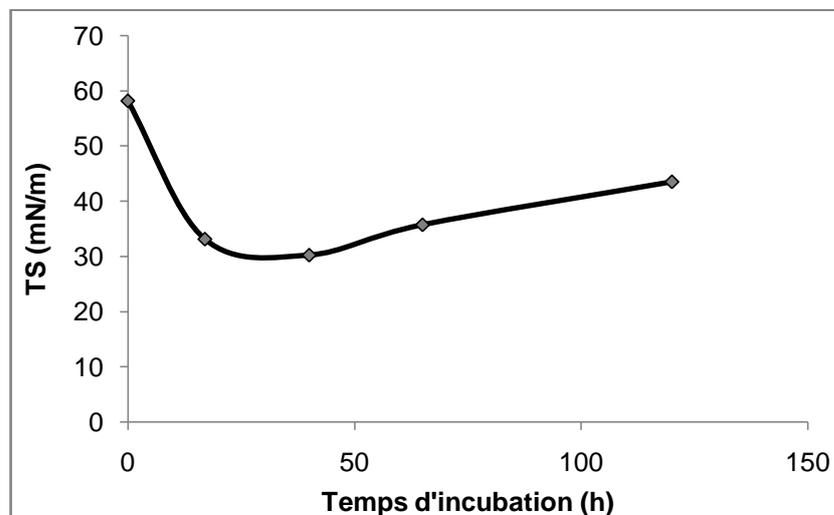


Figure 3.12 : Variation de la tension de surface durant la croissance de la souche 1C sur le pyrène

La réduction de la tension de surface durant la croissance de la souche 1C sur le pyrène indique la production d'un biosurfactant. Les résultats obtenus montrent une relation entre la dégradation du pyrène et la production de biosurfactant par la souche 1C. La biodisponibilité du pyrène a été augmentée en favorisant probablement sa dégradation.

Santos *et al.* (2008) ont rapporté que seule la souche *Pseudomonas citronellolis* 222A dégrade l'antracène en produisant un biosurfactant, tandis que *P. aeruginosa* 332C et 312A ont dégradé l'antracène mais aucune production de biosurfactant n'a été détectée.

La production de biosurfactant par les souches hydrocarbonoclastes a été décrite par plusieurs auteurs. Les travaux de Mnif *et al.* (2009) ont montré que *Halomonas* sp. C2SS100 est capable de dégrader les hydrocarbures dans des conditions extrêmes de salinité. Cette dégradation est associée à la production de biosurfactant. Ganesh et lin (2009) ont signalé que *Paenibacillus* sp. est capable de dégrader le gasoil en produisant de biosurfactant. Egalement, *Bacillus subtilis* JK-1 pouvait croître sur le pétrole brut avec production de biosurfactant (Joo et Kim, 2013).

Dans notre cas, la souche 1C est considérée comme hydrocarbonoclaste productrice de biosurfactant.

3.4 Capacité biodégradative la souche 1C

La croissance de la souche 1C sur les composés aromatiques a été étudié (Tableau 3.2). La souche 1C est capable d'utiliser le naphthalène ($Abs_{max} = 0,2$), anthracène ($Abs_{max} = 0,5$), pétrole brut ($Abs_{max} = 0,5$) et le gasoil ($Abs_{max} = 0,26$), comme sources de carbone et d'énergie. La souche 1C peut croître aussi sur l'acide salicylique, l'acide benzoïque et l'acide phtalique connus en tant que métabolites de la biodégradation des HAP. Par contre cette souche ne peut pas utiliser le phénanthrène ($Abs_{max} = 0,10$) et le fluranthène ($Abs_{max} = 0,16$) comme seule source de carbone et d'énergie.

Tableau 3.2 : Croissance de la souche 1C sur différents substrats

Composé	Croissance	Composé	Croissance
Hexadécane	+	Anthracène	++
Acide benzoïque	+	Phénanthrène	-
Acide salicylique	+	Fluoranthène	-
Acide phtalique	+	Pyrène	++
Xylène	+	Gasoil	+
Naphtalène	+	Pétrole brut	++

++ : DO>0.4, + : DO>0.2, - : DO < 0.2.

Des travaux similaires ont montré la capacité de différentes souches bactériennes du même genre (*Paenibacillus*) de croître sur différents hydrocarbures. *Paenibacillus* sp. SN501 est capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, à 28 °C (Yastrebova *et al.*, 2009). Les résultats de Danne *et al.*, (2002) ont montré que la souche *Paenibacillus naphthalnovorans* PR-P1 peut utiliser le naphtalène et le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie. Omotayo *et al.*, (2013) ont rapporté que *Paenibacillus lautus* et *Paenibacillus polymyxa* peuvent utiliser le pétrole brut, gasoil, kérosène, hexadécane et le xylène.

3.5 Production de biosurfactants

Plusieurs études ont rapporté que les microorganismes utilisant les hydrocarbures sont capables de produire des biosurfactants. Donc la sécrétion du biosurfactant est un processus très important pour que les hydrocarbures soient assimilés par les bactéries et les champignons

3.5.1 Effet de la source de carbone sur la production de biosurfactants

L'influence de la source de carbone sur la production de biosurfactants par les souches 1C et 1J a été évaluée par la mesure de la tension de surface (figures 3.13 et 3.14).

Généralement, la production de biosurfactant est évaluée en se basant sur la capacité des souches à réduire la tension de surface de milieu à des valeurs inférieures à 40 mN/m ou de former une émulsion supérieure à 50% et qui reste stable après 24h de sa formation [7].

Dans notre cas, les résultats obtenus montrent que la souche 1C utilise les quatre substrats (pétrole, huile moteur, huile de friture et huile d'olive) pour produire de biosurfactant. La valeur de la tension de surface était inférieure à 40 mN/m pour les substrats utilisés. Alors que le maximum de production a été enregistré en présence d'huile d'olive traduit par une valeur minimale de la tension de surface (33 mN/m).

Concernant la souche 1J, des sous produits ont été utilisés pour la production de biosurfactants (huile de friture, lactosérum, margine) en plus d'huile d'olive. Les résultats obtenus révèlent que l'huile d'olive constitue la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactant par la souche 1J (TS = 31 mN/m). Egalement, la margine présente un bon substrat (31,67 mN/m) pour la production de biosurfactant. Cependant, cette souche est considérée non productrice de biosurfactant en présence de lactosérum.

L'huile d'olive a été sélectionnée, comme meilleur substrat de la production de biosurfactant, pour la poursuite de travail.

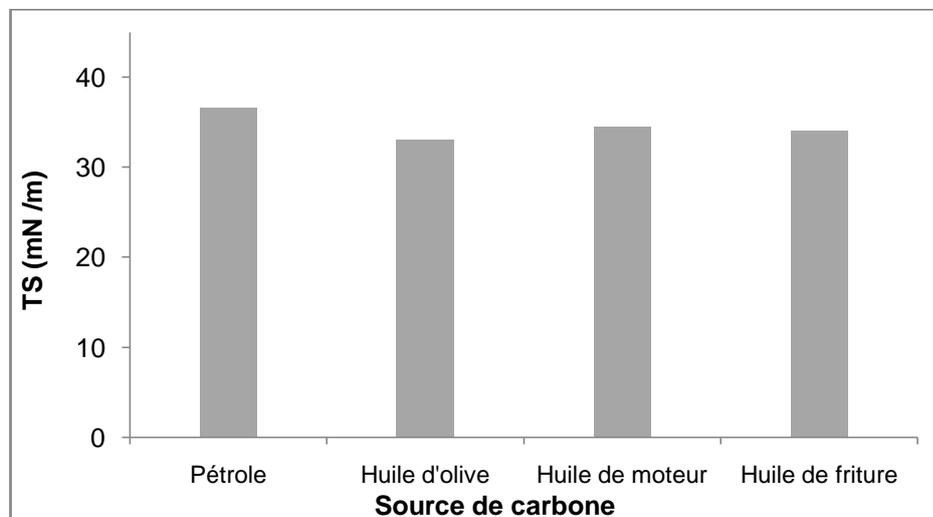


Figure 3.13 : Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant par la souche 1C

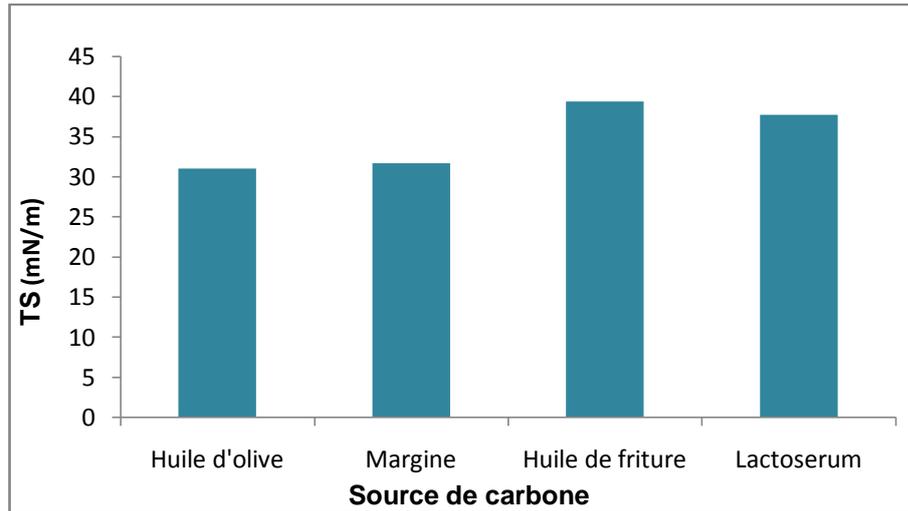


Figure 3.14 : Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant par la souche 1J

3.5.2 Etude cinétique de la production de biosurfactants

L'évaluation de la production de biosurfactants a été suivie par la mesure de la tension de surface au cours du temps. L'huile d'olive (1%, v/v) a été utilisée comme substrat pour les deux souches 1C et 1J.

Le premier critère utilisé dans la littérature pour suivre la production de biosurfactant est la réduction de la tension de surface (Cooper et Zajic, 1980 ; 8]. En effet, la souche 1C a montré la réduction la plus importante de la tension de surface (60 à 32 mN/m) et la souche 1J (60 à 33,3 mN/m).

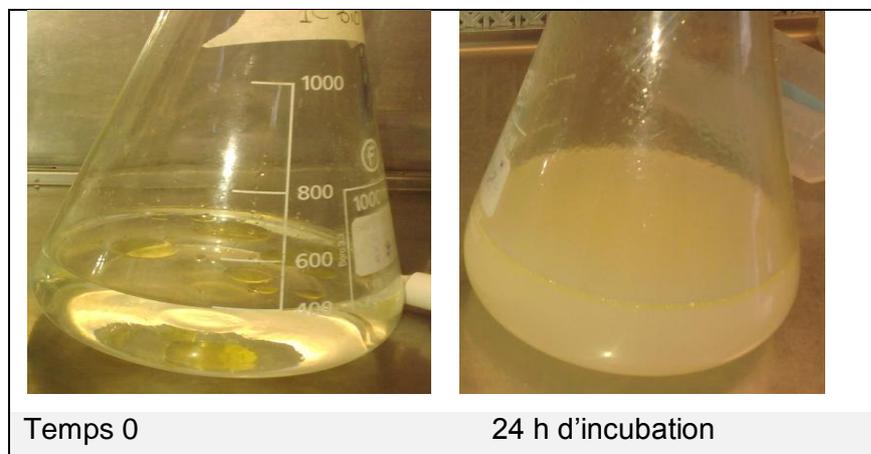


Figure 3.15: Production de biosurfactant par les souches 1C et 1J en présence l'huile d'olive (45 °C, pH 7,2 et 150 tr/min).

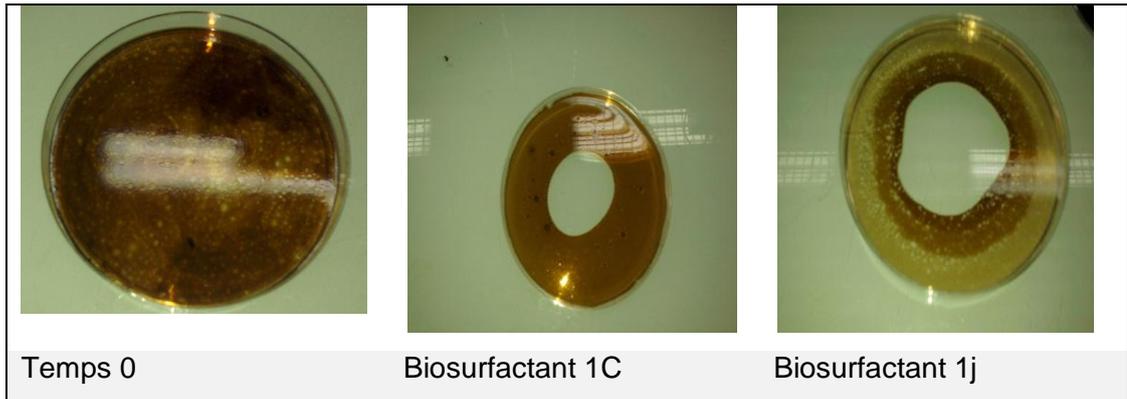


Figure 3.16 : Diamètre de déplacement de pétrole brut sous l'effet des biosurfactants

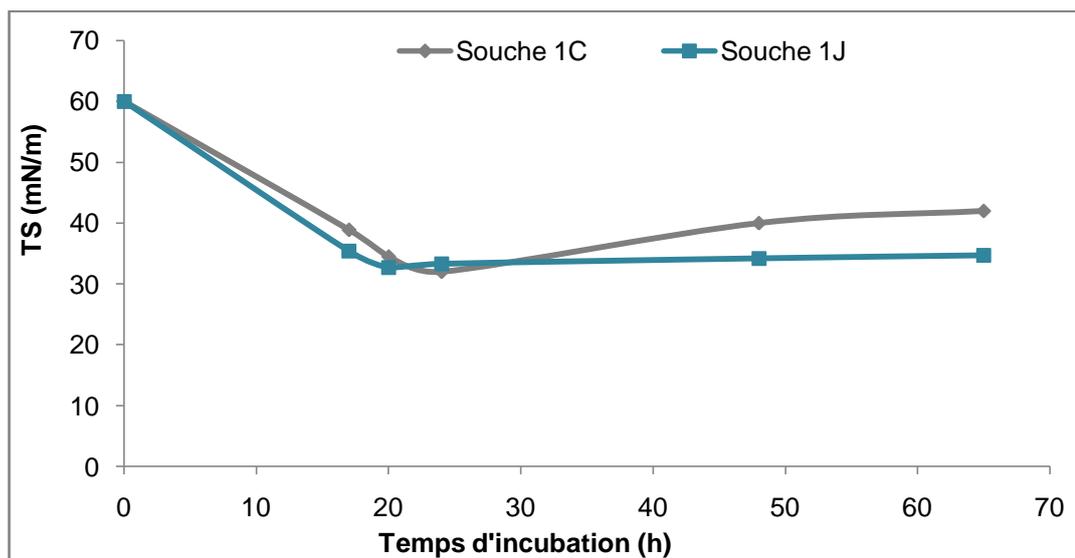


Figure 3.17 : Variation de la tension de surface durant la croissance sur l'huile d'olive

La capacité des souches (1C et 1J) à utiliser une variété de substrats pour produire de biosurfactants a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que la production maximale est atteinte en 20 et 24h d'incubation pour les souches 1J et 1C, respectivement. A titre d'exemple, les valeurs minimales de la tension de surface sont 32 et 32,7 mN/m pour les souches 1C et 1J, respectivement. Nous pouvons conclure que le temps d'incubation optimale correspondant à la production maximale dépend de la nature de la souche.

La souche *Paenibacillus macerans* TKU029 produit un biosurfactant réduisant la tension de surface de l'eau jusqu'à 35,34 mN/m en utilisant la poudre de calamar comme source de carbone et d'énergie (Liang *et al.*, 2014). De même, Nadjafi *et al.* (2011) ont rapporté que *Paenibacillus alvei* ARN 63 est capable de produire un

biosurfactant qui réduit la tension de surface jusqu'à 35 mN/m après 17h d'incubation à 37 °C. Ce biosurfactant réduit la tension de surface à 31,7 mN/m après 48h d'incubation à 40 °C et 150 tr/min. En outre, l'huile d'olive a été sélectionnée comme meilleure source de carbone pour la production de biosurfactant par *Staphylococcus* sp. 1E [7]. Ce biosurfactant a montré une réduction très intéressante de la tension de surface (25,8 mN/m) après 48h d'incubation à 37 °C et 200 tr/min.

En utilisant le saccharose (10 g/l) comme source de carbone, Pereira *et al.* (2013) ont rapporté que le biosurfactant, produit par *Bacillus subtilis* #311, a réduit la tension de surface jusqu'à 27,9 mN/m après 5 jours d'incubation à 40 °C. En plus, Al-wahaibi *et al.* (2014) ont signalé qu'une réduction importante de la tension de surface (26,63 mN/m) a été obtenue par un biosurfactant issu de *Bacillus subtilis* B30, en utilisant la mélasse de datte comme source de carbone (12 h d'incubation, 40 °C et 160 tr/min).

3.5.3 Effet de la source d'azote sur la production de biosurfactants

Le choix de la source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse des biosurfactants notamment par sa nature et aussi par la limitation de sa concentration dans le milieu de culture. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.18.

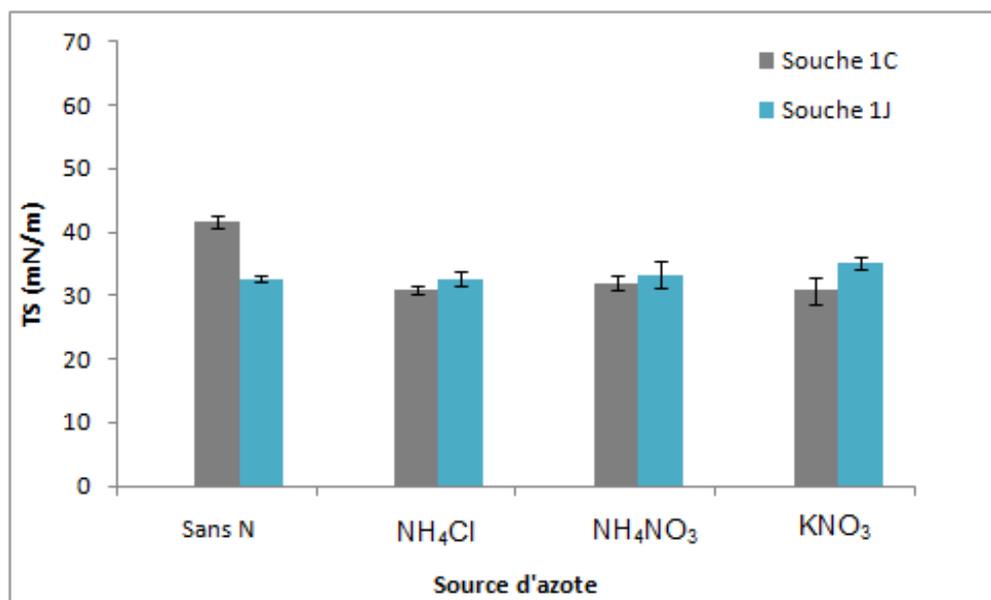


Figure 3.18: Effet de la source d'azote sur la production de biosurfactants

Les résultats obtenus montrent que les deux souches 1C et 1J sont capables d'utiliser différentes sources d'azote telles que le nitrate de potassium, le nitrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium. La production de biosurfactants est maximale lorsque le chlorure d'ammonium est utilisé comme source d'azote.

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries : par exemple, la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium et l'urée (Duvrjak *et al.*, 1983). *Pseudomonas aeruginosa* produit un biosurfactant en utilisant le glycérol comme source de carbone et le chlorure d'ammonium comme source d'azote (Das et Mukherjee, 2005). Freitas de Oliveira *et al.* (2013) [105] ont rapporté l'utilisation du sulfate d'ammonium comme source d'azote pour la production de biosurfactant par *Bacillus subtilis* LAMI005.

3.5.4 Optimisation de la production des biosurfactants par les souches 1C et 1J

La méthodologie des surfaces de réponses (RSM) est une approche robuste pour la compréhension et l'optimisation des paramètres expérimentaux. Elle permet une étude rationnelle de leurs influences sur les réponses choisies avec une diminution considérable du nombre d'essais. La RSM nous permet d'étudier un très grand nombre de facteurs, de détecter d'éventuelles interactions et de modéliser les résultats obtenus.

Dans ce travail nous avons choisi le plan de Box-Behnken. Les trois facteurs sélectionnés sont : la concentration de la source de carbone, le pH du milieu et la salinité. La croissance bactérienne (y_1), le diamètre de déplacement d'huile (DDP) (y_2) et la réduction de la tension de surface (y_3) sont choisies comme réponses. Les estimations des effets et des interactions ont été calculés en utilisant le logiciel Minitab version 16.

- **Croissance bactérienne :**

Les résultats obtenus et le calcul des coefficients du modèle, nous permettront d'établir le modèle du second degré :

Pour la souche 1C : $y_1 = 1.55 + (-0.12) x_1 + 0.259 x_2 + (-0.34) x_3 + 0.12 x_1 x_3 + 0.28 x_2 x_3 + (-0.04) x_1^2 + (-0.39) x_2^2 + 0.29 x_3^2$. (Unités codées)

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. Le pH, la salinité, pH^2 , salinité^2 et l'interaction pH–salinité sont les facteurs les plus déterminants pouvant affecter la croissance bactérienne de la souche 1C. Les valeurs des coefficients montrent que l'augmentation de la concentration d'huile et la salinité ont un effet négatif sur la croissance de la souche 1C. Cette dernière augmente dans des milieux neutres ou alcalins.

Pour la souche 1J, le modèle postulé est : $y_1 = 1,23 + (-0.25) x_1 + (-0.11) x_2 + (-0.38) x_3 + 0.53 x_1x_2 + (-0.03) x_1x_3 + (-0.2) x_2x_3 + 0.4 x_1^2 + (-0.62) x_2^2 + 0.01 x_3^2$. (Unités codées).

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. La salinité, pH^2 et l'interaction concentration–pH sont les facteurs les plus influents sur la croissance bactérienne de la souche 1J. Les valeurs des coefficients montrent que la croissance de la souche 1J diminue avec l'augmentation de la concentration d'huile, pH et salinité. La représentation de la surface de réponse ainsi que les courbes isoréponses sont regroupés dans les figures 3.19 et 3.20.

La figure 3. 19 A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur la croissance de la souche 1C, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure la croissance est maximale avec des faibles concentrations de la source de carbone et un pH neutre ou proche de neutralité, une diminution de la croissance est observée dans des pH acides ou alcalins et lorsque la concentration d'huile d'olive augmente dans le milieu. A pH initial neutre (7,0), on remarque que la croissance est maximale pour des concentrations faibles en huile d'olive et en sel (figure 3.19 B), la croissance diminue avec l'augmentation de la salinité ou huile d'olive dans le milieu. La figure 3.19C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que la croissance est importante sur une large gamme de pH avec des faibles salinités.

La figure 3. 20A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur la croissance de la souche 1J, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure, la croissance est maximale pour des concentrations faibles en source de carbone et un pH neutre ou acide. Une diminution de la croissance est observée pour des pH alcalins et lorsque la concentration d'huile d'olive augmente dans le

milieu. A pH initial neutre (7,0), on remarque que la croissance est maximale pour des concentrations faibles en huile d'olive et en sel (figure 3.20B). La croissance diminue avec l'augmentation de la salinité ou l'huile d'olive dans le milieu. La figure 3.20C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que la croissance est importante sur une gamme de pH (acide –neutre) et avec des salinités variant de 10 à 45 g/l. Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans le tableau 3.3

Tableau 3.3 : Analyse de la variance (croissance bactérienne)

Source de variation	Somme des carrés		ddl	Carré moyen		Fisher		Prob	
	1C	1J		1C	1J	1C	1J	1C	1J
Modèle corrigé de la moyenne	2,90824	5,22149	9	0,323137	0,58017	8,83	2,41	0,014	0,173
Concentration	0,11069	0,48610	1	0,110685	0,48610	3,03	2,02	0,142	0,215
pH	0,53872	0,09331	1	0,538722	0,09331	14,73	0,39	0,012	0,561
Salinité	0,91869	1,15672	1	0,918690	1,15672	25,11	4,80	0,004	0,080
Concentration ²	0,00435	0,72207	1	0,006423	0,57999	0,18	2,41	0,693	0,181
pH ²	0,64308	1,44269	1	0,573058	1,42926	15,67	5,94	0,011	0,059
Salinité ²	0,30581	0,00071	1	0,305812	0,00071	8,36	0,00	0,034	0,959
Conc* pH	0,00010	1,15778	1	0	1,15778	0	4,81	0,960	0,080
Conc* salinité	0,06076	0,00292	1	0,060762	0,00292	1,66	0,01	0,254	0,917
pH* salinité	0,32604	0,15920	1	0,326041	0,15920	8,91	0,66	0,031	0,453
Résidus	0,18291	1,20369	5	0,036582	0,24074				
Réponses mesurées corrigées de la moyenne	3,09114	6,42517	14						

Le R^2 est un bon indicateur de la qualité du modèle mathématique. Les résultats obtenus montrent que le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées avec un $R^2= 0.940$ pour la souche 1C et $R^2=0.813$ pour la souche 1J.

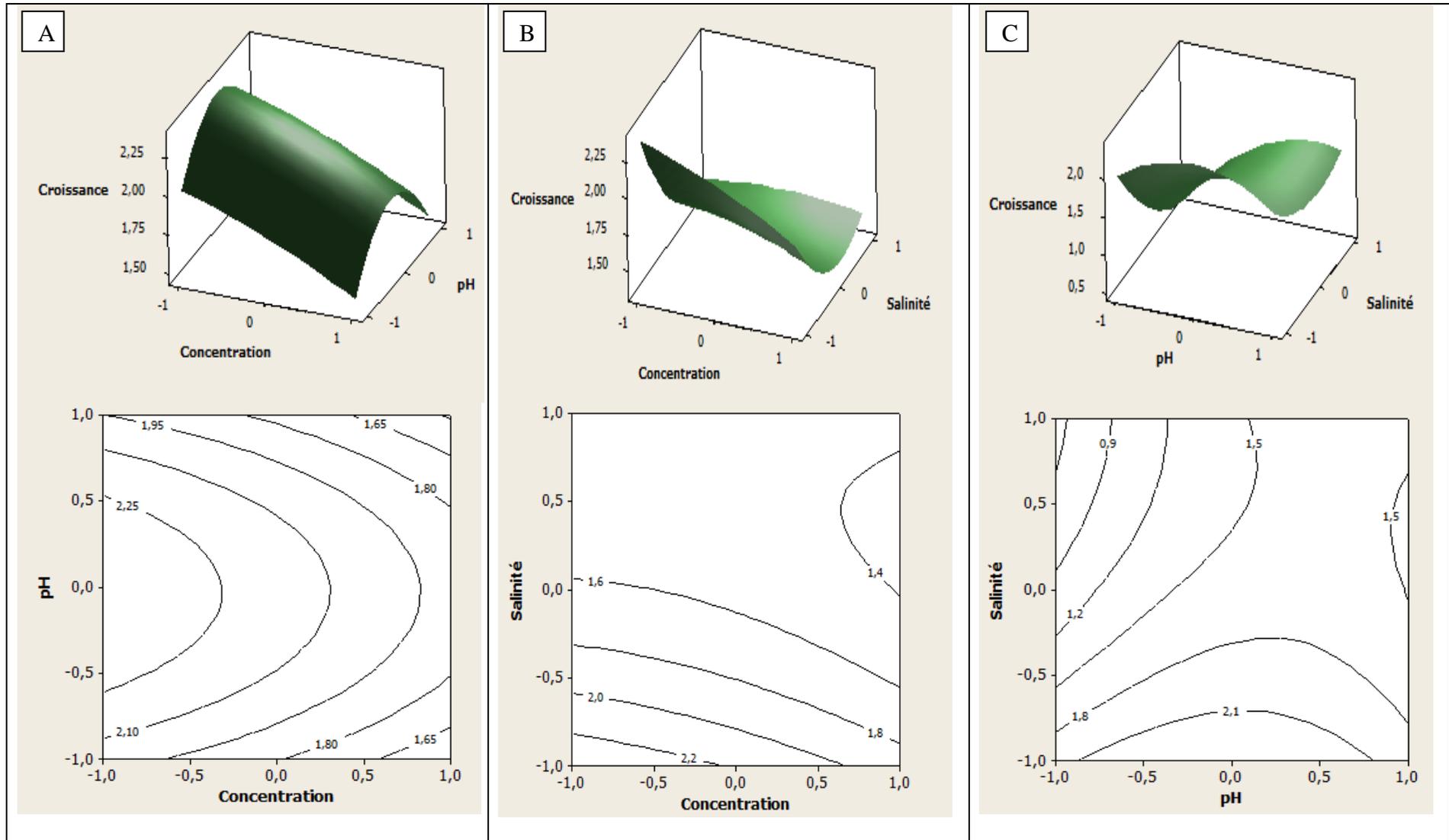


Figure 3. 19 : Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de la croissance bactérienne de la souche 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).

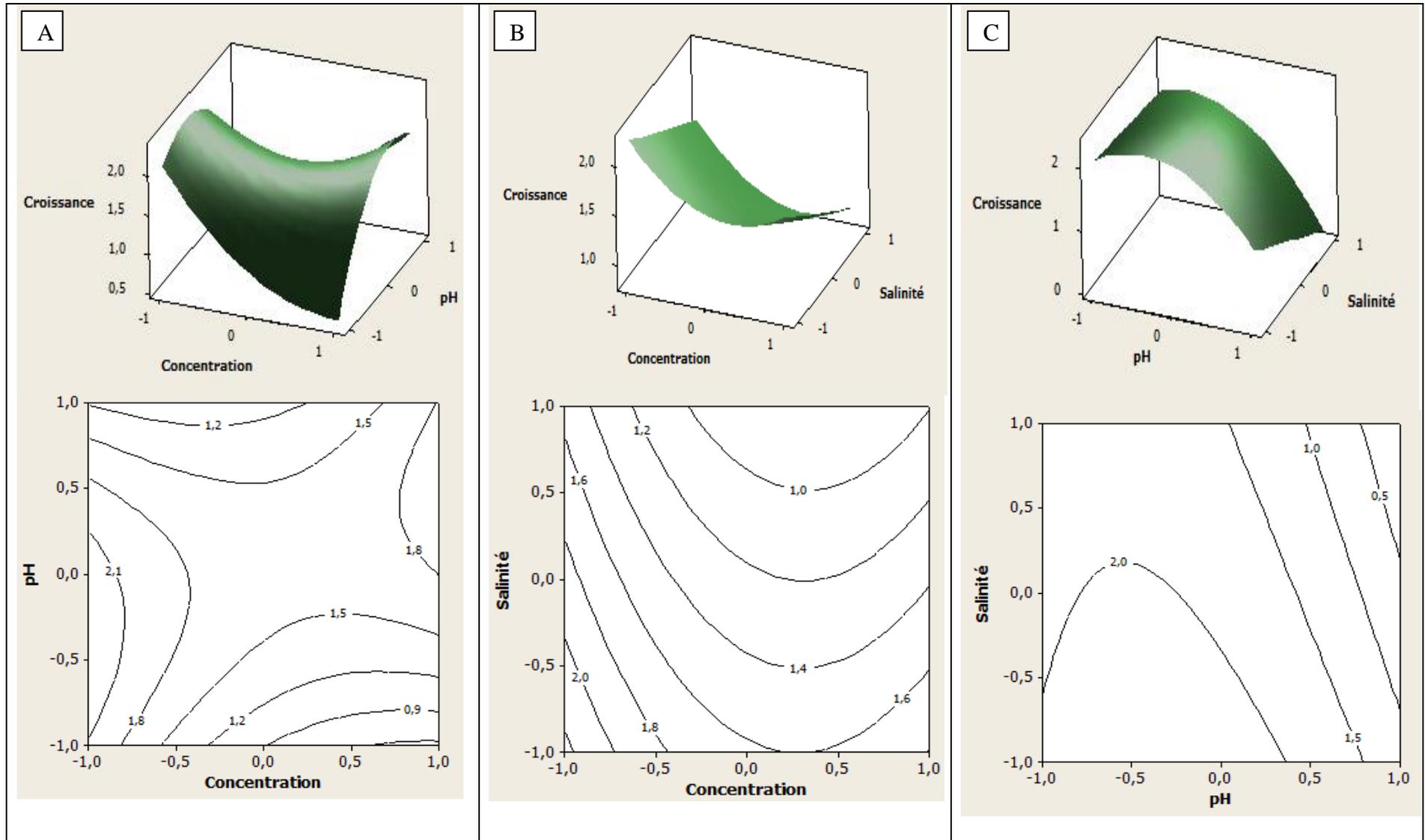


Figure 3.20 : Surface de réponse et les courbes d'isoreponses de la croissance bactérienne de la souche 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).

▪ **Déplacement d'huile (DDP) :**

Les résultats obtenus et le calcul des coefficients du modèle, nous permettront d'établir le modèle du second degré :

Pour la souche 1C : $y_2 = 2.66 + 0.79 x_1 + 1.46 x_2 + (-1.07) x_3 + 0.30x_1x_2 + (-0.62) x_1x_3 + 0.32 x_2x_3 + 0.97 x_1^2 + 1.57 x_2^2 + 0.24 x_3^2$. (Unités codées).

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. Le pH, la salinité, la concentration et pH^2 sont les facteurs les plus influents de la production de biosurfactant par la souche 1C (DDP). Les valeurs des coefficients montrent que la concentration et le pH ont un effet positif alors que la salinité a un effet négatif sur le DDP par le biosurfactant 1C.

Pour la souche 1J, le modèle postulé est : $y_2 = 6 + 0.56 x_1 + (-0.96) x_2 + (-0.47) x_3 + (-1.42)x_1x_2 + 0.2 x_1x_3 + (-0,25) x_2x_3 + (-0.24) x_1^2 + (-2.69) x_2^2 + (-0.81) x_3^2$. (Unités codées).

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. Le pH^2 est le facteur le plus influençant sur la production de biosurfactant par la souche 1J (DDP). Les valeurs des coefficients montrent que le DDP par le biosurfactant 1J augmente avec l'augmentation du pH. La représentation de la surface de réponse ainsi que les courbes isoréponses sont regroupés dans les figures 3.21 et 3.22.

La figure 3. 21A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur le DDP par le biosurfactant 1C, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure le DDP est maximal dans des milieux alcalins en présence de concentrations élevées d'huile d'olive, une diminution du DDP est observée lorsque le pH et la concentration d'huile d'olive diminue dans le milieu. Lorsque le pH initial du milieu est 7, on remarque que le DDP est maximum en présence de concentrations élevées en huile d'olive mais avec des quantités faibles en sel (figure 3.21 B), le DDP diminue avec l'augmentation de la salinité et la diminution d'huile d'olive dans le milieu. La figure 3.21C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que le DDP est important sur toute la gamme de salinité (10- 80 g/l) dans un milieu alcalin.

La figure 3.22 A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur le DDP par le biosurfactant 1J, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure, le DDP est maximum dans un pH neutre quelque soit la concentration d'huile d'olive, une diminution du DDP est observée pour des pH acides ou alcalins. Lorsque le pH initial du milieu est 7, on remarque que le DDP est maximum alors que la concentration d'huile d'olive est élevée sur une large gamme de salinité (figure 3.22 B). La figure 3.22 C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que le DDP est important dans des pH neutre ou proche de la neutralité et une salinité allant de 10 à 45 g/l. Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans le tableau 3.4

Tableau 3.4: Analyse de la variance (DDP).

Source de variation	Somme des carrés		ddl	Carré moyen		Fisher		Prob	
	1C	1J		1C	1J	1C	1J	1C	1J
Modèle corrigé de la moyenne	45,3982	48,3118	9	5,0442	5,3680	10,26	1,34	0,010	0,391
Concentration	4,9613	2,5312	1	4,9613	2,5312	10,09	0,63	0,025	0,463
pH	17,1113	7,4112	1	17,1113	7,4112	34,79	1,85	0,002	0,232
Salinité	9,2450	1,8050	1	9,2450	1,8050	18,80	0,45	0,007	0,532
Concentration ²	2,6186	0,0006	1	3,4503	0,2083	7,02	0,05	0,046	0,829
pH ²	8,9014	25,5938	1	9,0626	26,6683	18,43	6,66	0,008	0,049
Salinité ²	0,2156	2,4375	1	0,2156	2,4375	0,44	0,61	0,537	0,471
Conc* pH	0,3600	8,1225	1	0,3600	8,1225	0,73	2,03	0,431	0,214
Conc* salinité	1,5625	0,1600	1	1,5625	0,1600	3,18	0,04	0,135	0,849
pH* salinité	0,4225	0,2500	1	0,4225	0,2500	0,86	0,06	0,397	0,813
Résidus	2,4592	20,0175	5	0,4918	4,0035				
Réponses mesurées corrigées de la moyenne	47,8573	68,3293	14						

Le R^2 est un bon indicateur de la qualité du modèle mathématique. Les résultats obtenus montrent que le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées avec un $R^2= 0.948$ pour la souche 1C et $R^2=0.707$ pour la souche 1J.

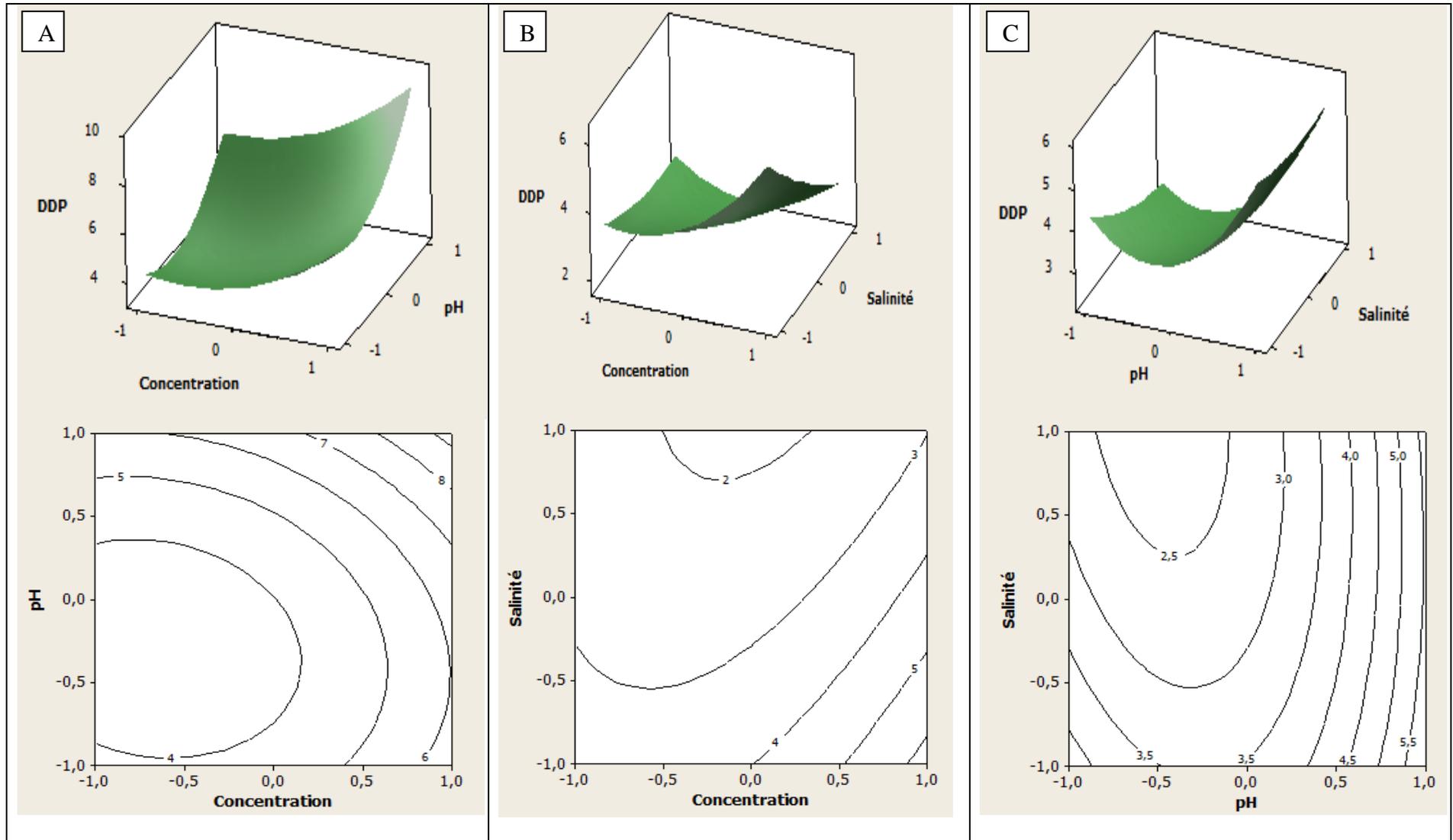


Figure 3.21 : Surface de réponse et les courbes d'isorréponses de DDP biosurfactant 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).

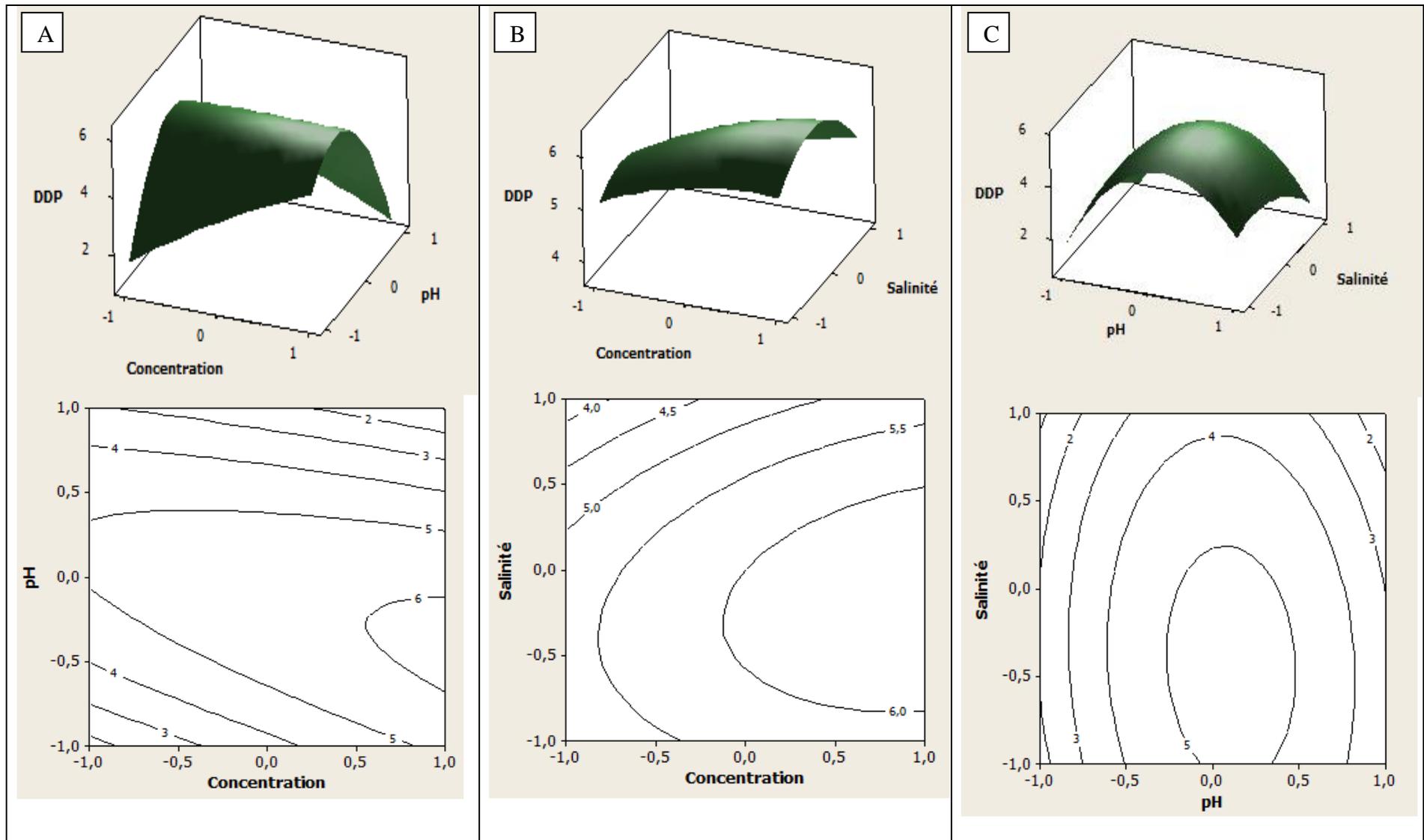


Figure 3.22 : Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de DDP biosurfactant 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive)

- **Réduction de la tension de surface (TS) :**

Les résultats obtenus et le calcul des coefficients du modèle, nous permettront d'établir le modèle du second degré :

Pour la souche 1C : $y_3 = 36.72 + 1.82 x_1 + (-2.97) x_2 + (-1.69) x_3 + 0.72 x_1 x_2 + (-0.13) x_1 x_3 + 1.08 x_2 x_3 + (-1.62) x_1^2 + 1.60 x_2^2 + 1.01 x_3^2$. (Unités codées)

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. Le pH, est le facteur le plus influent de la production de biosurfactant par la souche 1C (TS), la tension de surface diminue lorsque le pH augmente.

Pour la souche 1J, le modèle postulé est : $y_3 = 33.05 + 0.27 x_1 + (-3.37) x_2 + 0.23 x_3 + (-1.10) x_1 x_2 + (-1.34) x_1 x_3 + (-3.54) x_2 x_3 + 1.70 x_1^2 + 0.17 x_2^2 + 2.40 x_3^2$. (Unités codées).

D'après les valeurs des coefficients, le *t de Student* et la *p-value*. Le pH et l'interaction pH-salinité sont les facteurs les plus déterminants de la production de biosurfactant par la souche 1J (TS). La tension de surface diminue en augmentant le pH.

La représentation de la surface de réponse ainsi que les courbes isoréponses sont regroupés dans les figures 3.23 et 3.24.

La figure 3. 23 A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur la production de biosurfactant par la souche 1C, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure, la réduction de la tension de surface est maximale dans un milieu alcalin avec des concentrations faibles d'huile d'olive. Lorsque le pH initial du milieu est 7, on remarque que la tension de surface est minimale lorsque la concentration d'huile d'olive est faible sur une large gamme de salinité (figure 3.23 B). Aussi, la tension de surface augmente lorsque la concentration d'huile d'olive augmente. La figure 3.23 C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que la réduction de la tension de surface est importante dans les milieux alcalins quelque soit la salinité du milieu, cette réduction de la TS est fortement affectée par le pH, les milieux acides affectent négativement la production de biosurfactant traduit par l'augmentation de la TS.

La figure 3.24 A montre l'effet de la concentration d'huile d'olive et le pH initial du milieu sur la production de biosurfactant par la souche 1J, la salinité est fixée à 10 g/l. D'après la figure, la réduction de la tension de surface est maximale dans un milieu acide avec des concentrations faibles en huile d'olive. La tension de surface croît avec l'augmentation de la concentration d'huile d'olive ou du pH. Lorsque le pH initial du milieu est 7, on remarque que la tension de surface est minimale lorsque la concentration d'huile d'olive est de 5% (v/v) et la salinité de 45 g/l (figure 3.24 B). La tension de surface augmente en éloignant du point central. La figure 3.24 C montre l'effet du pH et de salinité lorsque la concentration d'huile d'olive est fixée à 1% (v/v). On remarque que la réduction de la tension de surface est importante dans les milieux alcalins quelque soit la salinité du milieu. Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans le tableau 3.5

Tableau 3.5 : Analyse de la variance (TS).

Source de variation	Somme des carrés		ddl	Carré moyen		Fisher		Prob	
	1C	1J		1C	1J	1C	1J	1C	1J
Modèle corrigé de la moyenne	151,697	183,799	9	16,8552	20,4221	1,62	1,94	0,310	0,242
Concentration	26,572	0,572	1	26,5720	0,5725	2,55	0,05	0,171	0,825
pH	70,805	90,788	1	70,8050	90,7878	6,80	8,60	0,048	0,033
Salinité	22,916	0,437	1	22,9165	0,4371	2,20	0,04	0,198	0,847
Concentration ²	12,202	8,638	1	9,7051	10,7231	0,93	1,02	0,379	0,360
pH ²	8,590	0,001	1	9,4375	0,1026	0,91	0,01	0,385	0,925
Salinité ²	3,795	21,209	1	3,7945	21,2087	0,36	2,01	0,573	0,215
Conc* pH	2,059	4,818	1	2,0592	4,8180	0,20	0,46	0,675	0,529
Conc* salinité	0,070	7,209	1	0,0702	7,2092	0,01	0,68	0,938	0,446
pH* salinité	4,687	50,126	1	4,6872	50,1264	0,45	4,75	0,532	0,081
Résidus	52,099	52,754	5	10,4198	10,5508				
Réponses mesurées corrigées de la moyenne	203,796	236,553	14						

Le R^2 est un bon indicateur de la qualité du modèle mathématique. Les résultats obtenus montrent que le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées avec un $R^2= 0.744$ pour la souche 1C et $R^2=0.777$ pour la souche 1J.

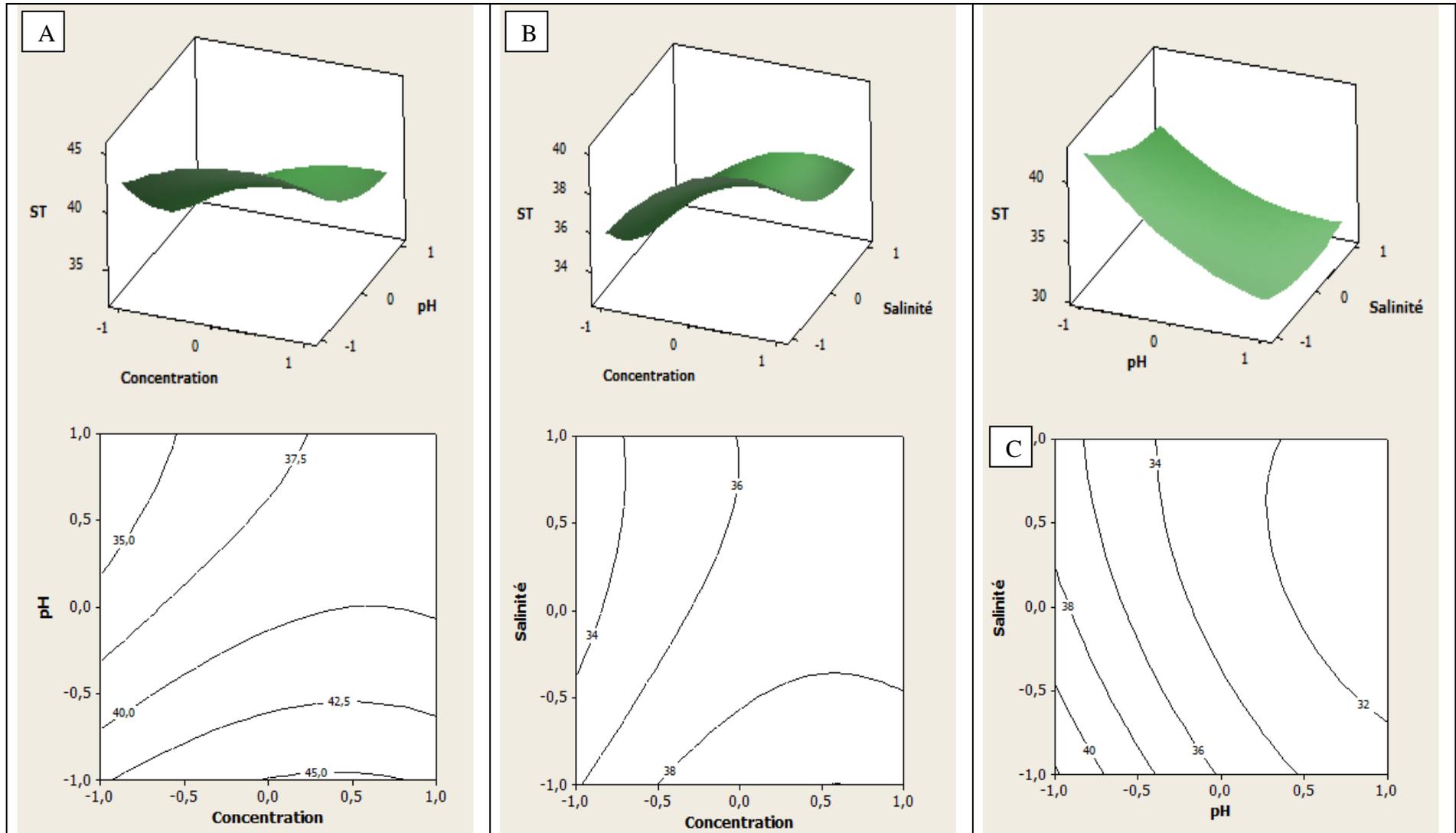


Figure 3.23: Surface de réponse et les courbes d'isoresponses de TS biosurfactant 1C (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).

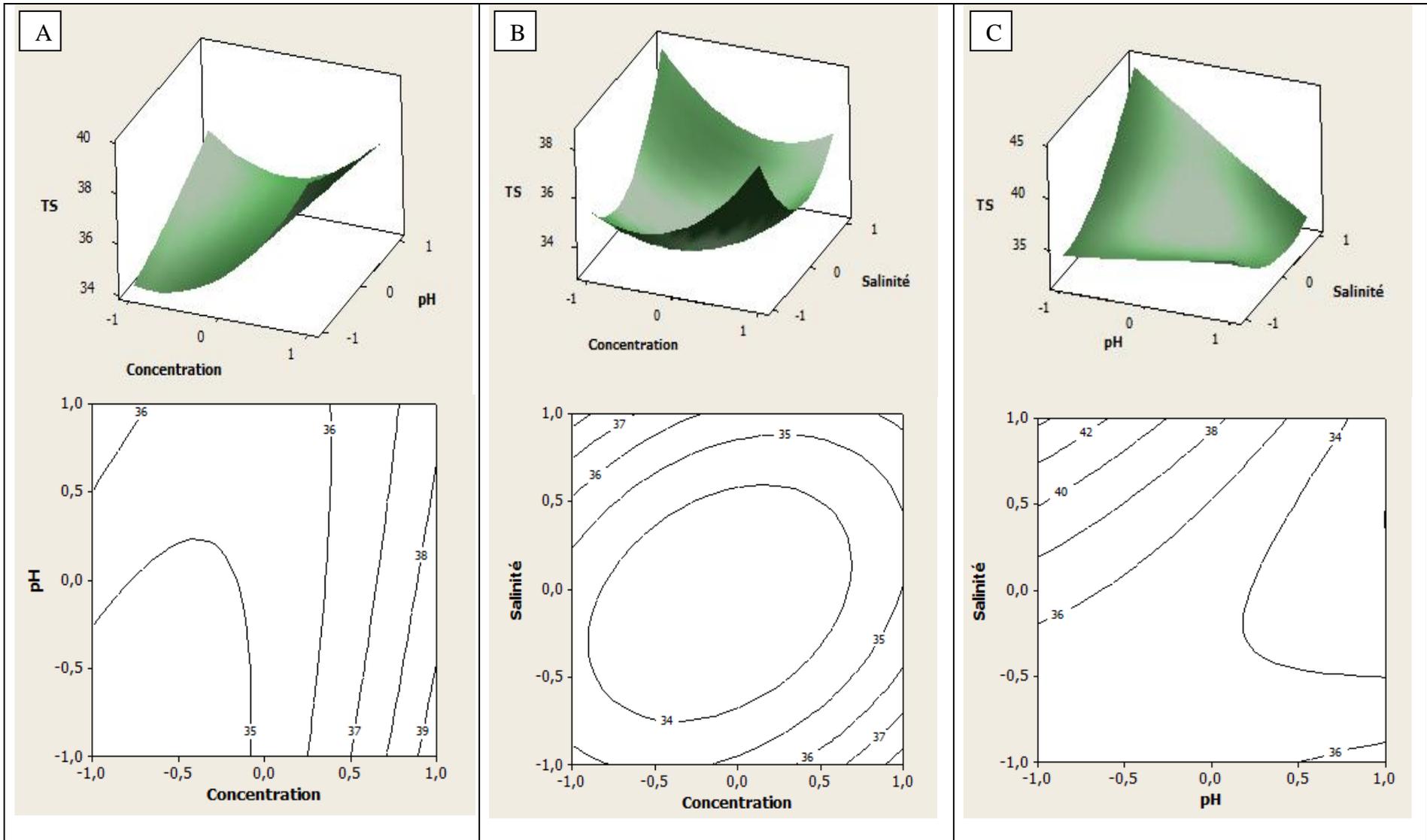


Figure 3.24 : Surface de réponse et les courbes d'isoréponses de TS biosurfactant 1J (A : salinité 1%, B : pH = 7 et C : 1% huile d'olive).

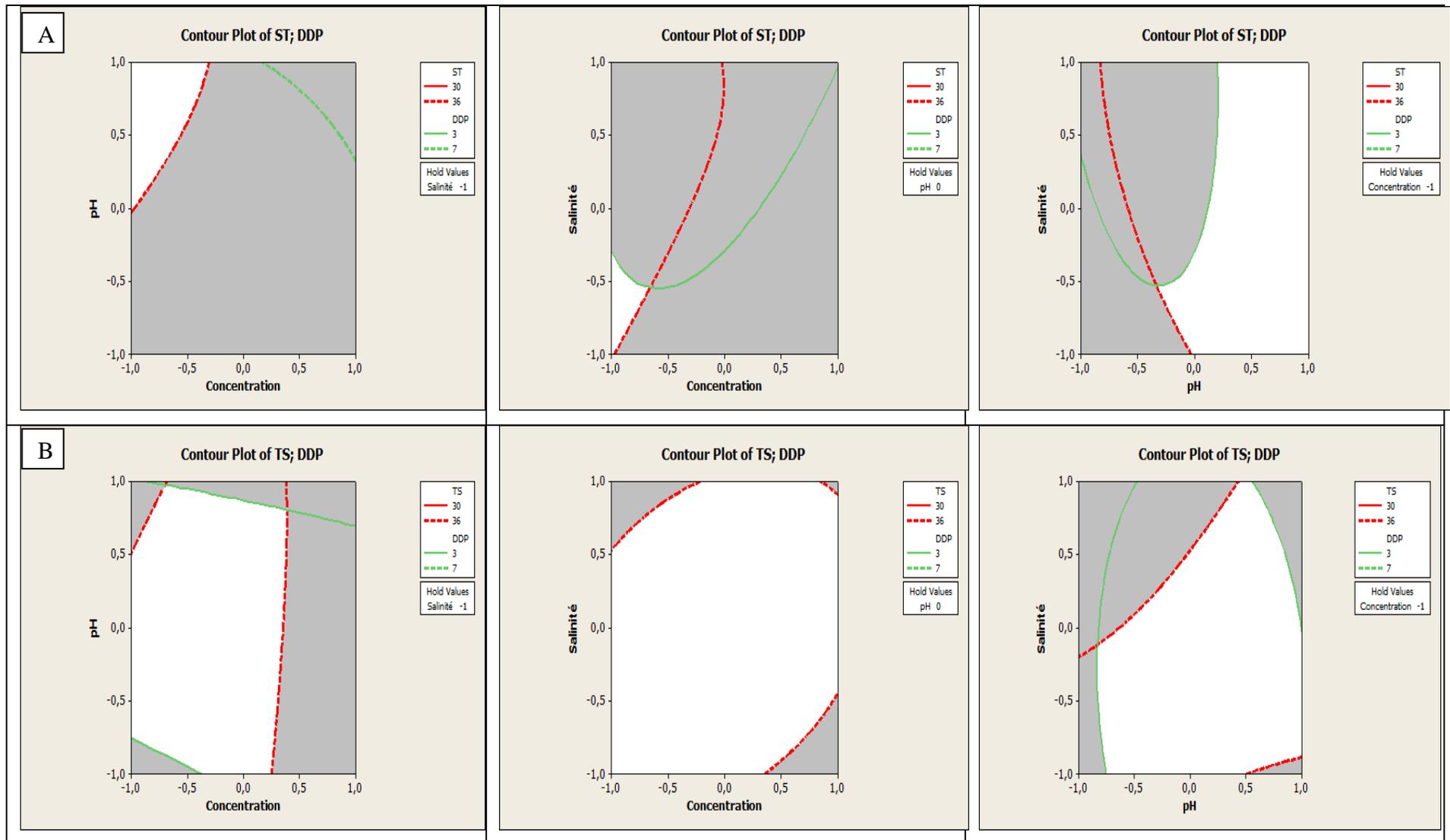


Figure 3.25 : Courbes d'isoresponses de TS et DDP (A : biosurfactant 1C, B : biosurfactant 1J)

Généralement, la réduction de la tension de surface et le diamètre de déplacement de pétrole sont des critères d'évaluation de la production de biosurfactant. La figure 3.25 représente l'intersection de deux critères. La tension de surface : 30-36 et le DDP : 3-7. La surface blanche représente la zone où les critères sont satisfaits.

D'après la figure 3.25A, la production de biosurfactant par la souche 1C est optimale avec des faibles concentrations d'huile d'olive dans un milieu alcalin lorsque la salinité est de 10 g/l alors que cette dernière est optimale avec des faibles concentrations d'huile d'olive et des faibles salinités dans un milieu neutre. En utilisant des faibles concentrations d'huile d'olive dans un milieu neutre ou alcalin, la production est optimale quelque soit la salinité du milieu.

Par contre pour la souche 1J (figure 3.25B), les deux conditions sont satisfaites dans une large gamme de pH, salinité et concentration d'huile d'olive. En présence de faibles concentrations d'huile d'olive, par exemple la production de biosurfactant par la souche 1J est optimale sur toute la gamme de salinité si le pH du milieu est légèrement alcalin.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'optimisation de la production de biosurfactant par l'approche des plans d'expériences (Sen, 1997, Gu et al., 2005, Kiran et al., 2009, Najafi et al., 2010, Amodu et al., 2014). Les différents facteurs affectant la production ont été étudiés à savoir la concentration de la source de carbone, le pH, la salinité, la température et la concentration des oligoéléments.

La croissance bactérienne et la production de biosurfactant sont fortement influencées par le pH du milieu, Kiran *et al.* (2009) ont rapporté que la production de biosurfactant par *Aspergillus ustus* MSF3 est maximale dans un pH neutre, des résultats similaires ont été trouvés par Najafi *et al.* (2011) où la production de biosurfactant par *Paenibacillus alvei* ARN 63 est importante dans un milieu neutre.

La salinité influe aussi sur la production de biosurfactant ; 3% NaCl est la salinité optimale pour la production de biosurfactant par *Aspergillus ustus* MSF3. En absence de NaCl, la production est faible (Kiran *et al.*, 2009). Les travaux de Najafi *et al.* (2010) ont montré que la production de biosurfactant, par la souche marine *Bacillus micoïdes*, est favorisée dans des milieux salins.

Les travaux de Najafi *et al.* 2010 ont révélé que la production de biosurfactant augmente avec l'augmentation de la concentration du glucose (6,45 – 16,55 g/l). Mais, la production chute lorsque la concentration du glucose est de 20 g/l. En revanche, Gu *et al.* (2005) ont rapporté que l'augmentation de la concentration de sucrose a un effet positif sur la production de biosurfactant par *Bacillus subtilis* (15 – 25 g/l).

3.5.5 Caractérisation des biosurfactants

Les deux biosurfactants obtenus sont des liquides visqueux d'une couleur marron-jaunâtre et une odeur caractéristique. La figure 3.26 montre l'aspect des produits bruts.

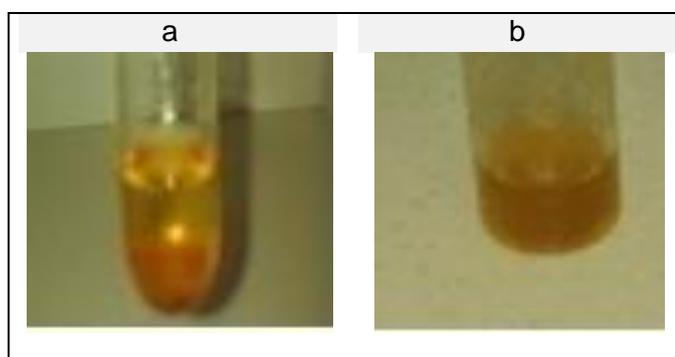


Figure 3.26 : Biosurfactants produits par les deux souches (1% huile d'olive): a- souche 1C, b- souche 1J

▪ Composition biochimique

Le résultat de dosage des protéines (selon la méthode de Bradford) montre que les deux biosurfactants contiennent des protéines, tandis que le dosage des glucides (selon la méthode de Dubois) montre que le biosurfactant 1C ne contient pas de glucides tandis que le biosurfactant 1J est constitué d'environ 2,56% de glucides.

▪ Analyse IR

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans les biosurfactants produits par les souches 1C et 1J et donc de prédire leurs structures. Les spectres d'infrarouge

obtenus pour les deux biosurfactants, issus par les souches 1J et 1C en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone, sont regroupés dans les figures suivantes (figures 3.27 et 3.28).

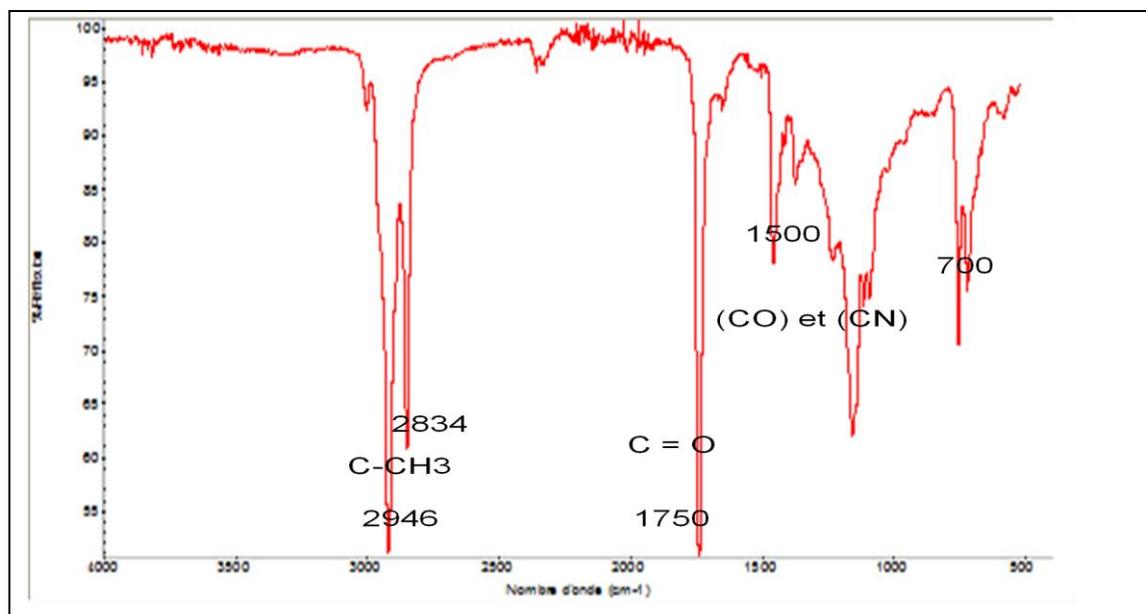


Figure 3.27 Spectre IR du biosurfactant produit par la souche 1J

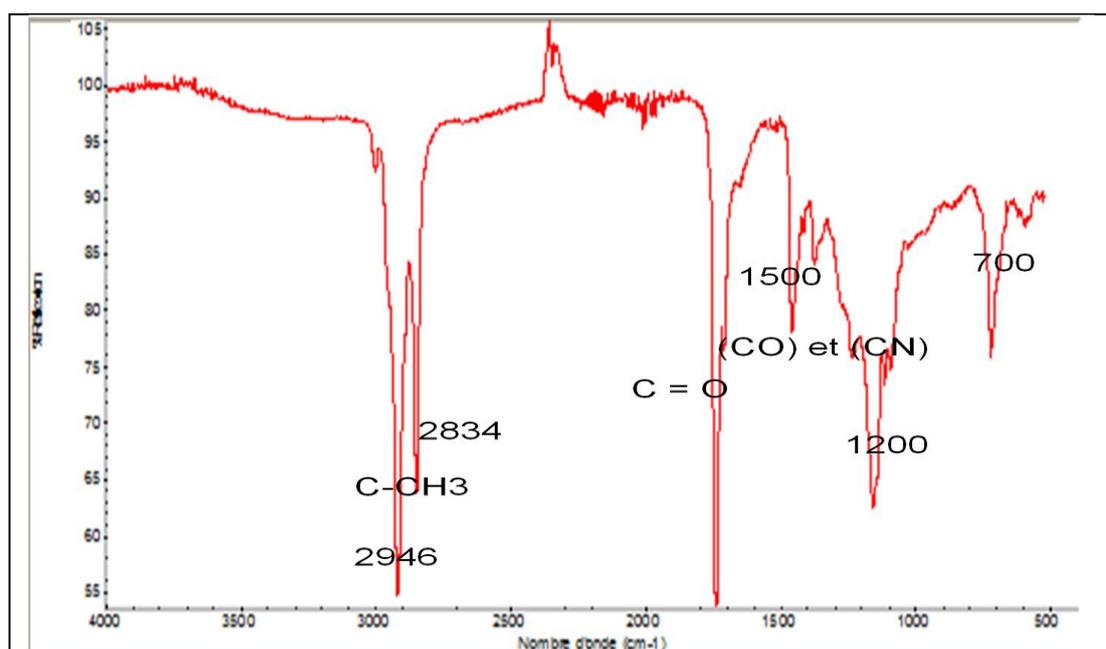


Figure 3.28 Spectre IR du biosurfactant produit par la souche 1C

La composition moléculaire des biosurfactants évaluée par FTIR a révélé la présence de plusieurs bandes provenant de la contribution des différents groupes fonctionnels appartenant à des lipides, des protéines et d'autres.

- La bande de faible absorbance à 3100 cm^{-1} résulte des vibrations d'élongation des liaisons N–H dans les amides.
- Les bandes intenses situées à 2922 cm^{-1} et à 2852 cm^{-1} ont été assignées aux vibrations d'étirement des groupes des aliphatiques CH_x pour les deux types de biosurfactants.
- La bande de haute absorbance centrée autour de 1700 cm^{-1} (pour les deux biosurfactants) correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=O dans les esters, aldéhydes ou l'acide carboxylique. L'absorbance dans cette région signifie la présence de groupement carbonyle dans la partie peptidique de la molécule
- Deux bandes situées à 1446 cm^{-1} et à 1389 cm^{-1} sont dues aux vibrations de d'élongation des liaisons C-H dans les alcanes et aux déformations des groupes -CH₂ et -CH₃.
- Les bandes situées à 1241 cm^{-1} et à 1046 cm^{-1} (pour les deux biosurfactants) sont affectées aux liaisons C-O et C-N qui s'étendent par vibration.

Les deux biosurfactants produits par les souches 1J et 1C peuvent être de nature lipopeptidique. D'autres moyens analytiques comme LC-MS et RMN sont nécessaires pour confirmer l'exactitude de la nature et la structure des biosurfactants.

3.5.6. Détermination de la concentration micellaire critique

Afin de déterminer la concentration micellaire critique (CMC) des deux biosurfactants, différentes concentrations en biosurfactants (0,1 à 2,5 g/l) ont été préparées pour mesurer les tensions de surface correspondantes. Les résultats obtenus montrent qu'à partir d'une certaine concentration (CMC), la tension superficielle demeure constante : le biosurfactant 1C ($TS_{\text{minimale}} = 29,4\text{ mN/m}$; CMC = 0,5 g/l) et le biosurfactant 1J ($TS_{\text{minimale}} = 29\text{ mN/m}$; CMC = 1 g/l). Au-delà de ces deux valeurs de CMC, la tension de surface demeure constante. Les

figures 3.29 et 3.30 illustrent l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration de biosurfactants.

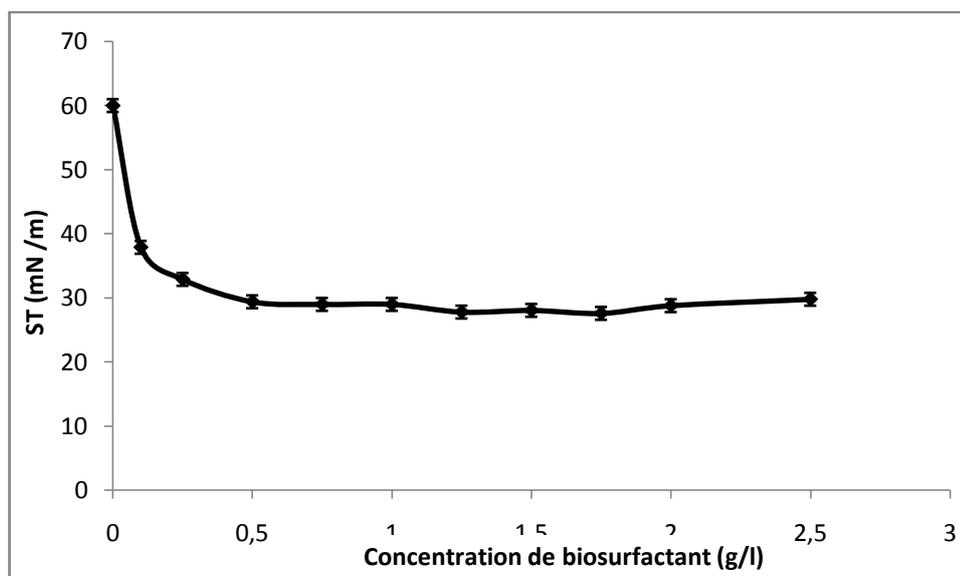


Figure 3.29 : Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant 1C

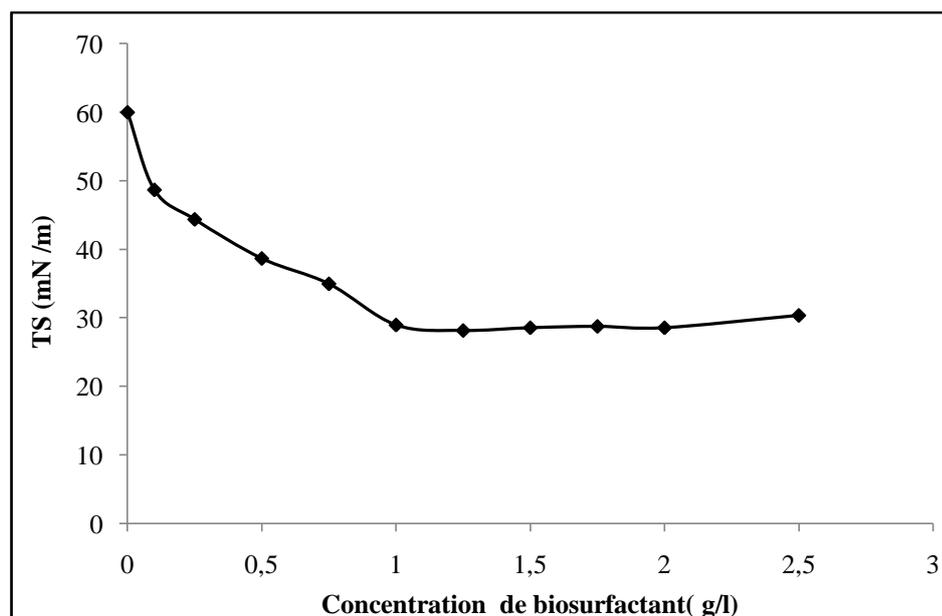


Figure 3.30 : Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant 1J

La CMC des deux biosurfactants bruts est inférieure à la CMC de SDS et certains biosurfactants. Les travaux de Ferhat *et al.* (2011) [8] ont trouvé que la CMC des

deux biosurfactants issus des souches *Ochrobactrum intermedium* et *Brevibacterium lutescens* sont 1,5 et 2 g/l, respectivement. Aussi, Liang *et al.* (2014) ont rapporté que la CMC de biosurfactant produit par *Paenibacillus macerans* TKU029 est de 2,76 g/l.

La CMC de biosurfactant produit par *Lactobacillus paracasei* A20 est 2,5 g/l (Gudina *et al.*, 2010). Pour une CMC égale à 750 mg/l, le biosurfactant produit par *Staphylococcus* sp. 1E a diminué la TS jusqu'à 27,3 mN/m [7]. D'autres études ont rapporté la production de biosurfactants présentant de très faibles CMC. Le biosurfactant, produit par *Pseudomonas aeruginosa* RS29 en utilisant le glycérol comme source de carbone, possède une CMC égale à 90 mg/l (Saikia *et al.*, 2012). Egalement, le biosurfactant issu de la souche *Oleomonas sagaranensis* AT18 a réduit la tension de surface jusqu'à 25 mN/m avec une valeur très intéressante de CMC (8 mg/l) (Saimmai *et al.*, 2012).

3.5.7. Stabilité des biosurfactants

Les deux biosurfactants produits par les souches 1J et 1C présentent une excellente stabilité dans la gamme de température allant de 4 à 70 °C. Dans cette gamme, les valeurs de TS varient de 30 à 33 mN/m pour la souche 1C et de 32 à 34,5 mN/m pour la souche 1J (figure 3.31).

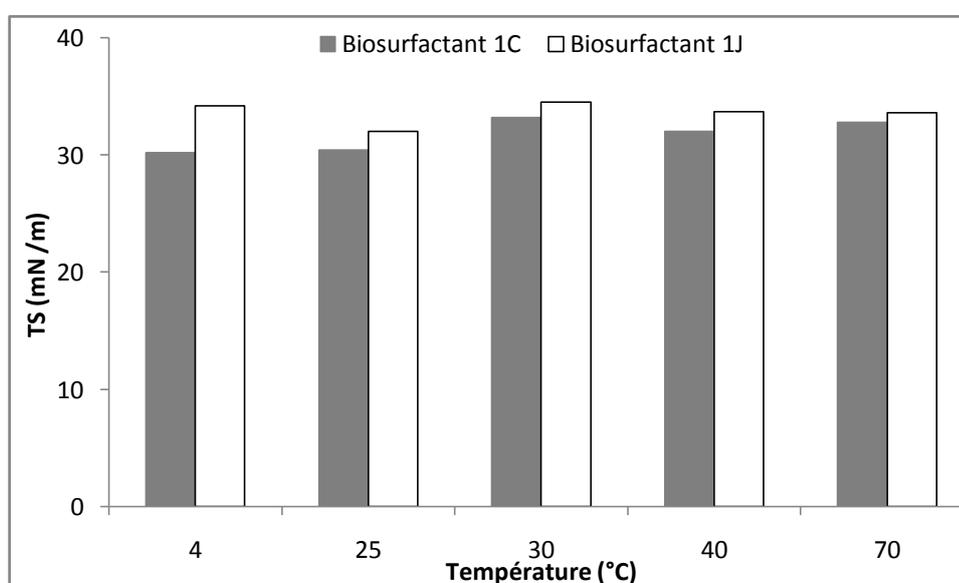


Figure 3.31 : Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants produits par les des deux souches (1J et 1C)

Ces résultats montrent que les deux biosurfactants produits sont considérés comme des produits thermostables, ce qui favorise leur utilisation dans l'industrie et sous différentes conditions de température.

Les résultats obtenus par Cameotra et Makkar (1998) indiquent que l'exposition du biosurfactant, produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique du biosurfactant. D'autre part, Deleu *et al.* (2008) ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition du biosurfactant issu par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C.

Les résultats obtenus indiquent que ces deux biosurfactants présentent une très bonne stabilité dans les milieux acides et basiques dans une gamme de pH variant de 2 à 12. Une valeur presque constante de la tension de surface dans cet intervalle (figure 3.32).

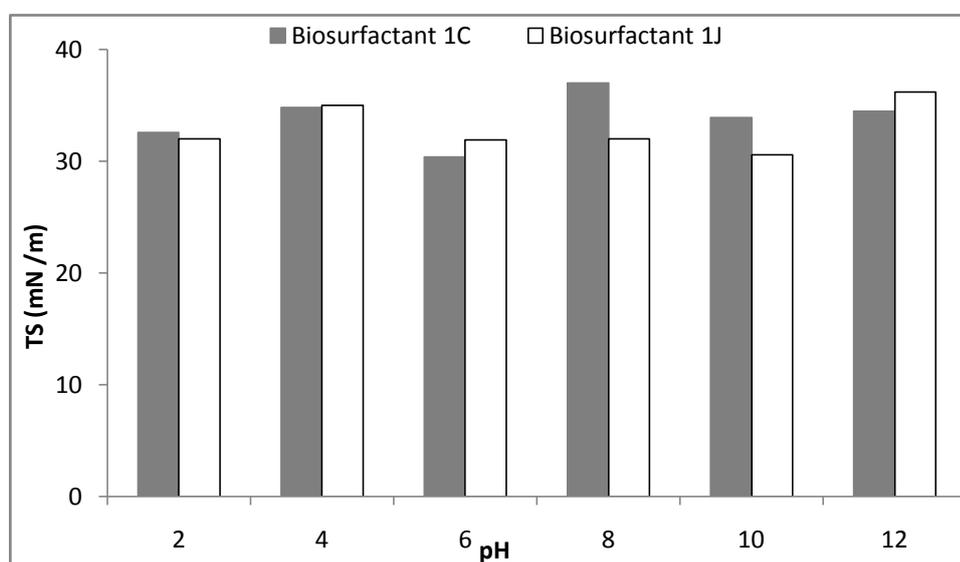


Figure 3.32: Effet du pH sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches 1J et 1C

Haddad *et al.* (2009) ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN/m. A un pH=3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN/m) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide. En variant le pH de 2 à 12, le biosurfactant

produit par la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E garde son activité tensioactive (30 – 31,5 mN/m) [7]. Egalement, des travaux réalisés ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Candida lipolytica* présente une bonne résistance (TS = 33,8 mN/m) dans les milieux acides (pH=2), cependant une légère augmentation de la TS (35,1 mN/m) a été enregistrée dans les milieux alcalins (pH=12).

Les deux biosurfactants produits par les souches thermotolérantes 1J et 1C montrent une stabilité remarquable dans les milieux salés. Le biosurfactant 1C présente une très bonne stabilité (30 – 35 mN/m) dans une gamme très large de salinité (jusqu'à 200 g/l). Cependant, le biosurfactant 1J a quasiment perdu son activité tensioactive (TS = 39 mN/m) pour une salinité de 200 g/l (figure 3.33).

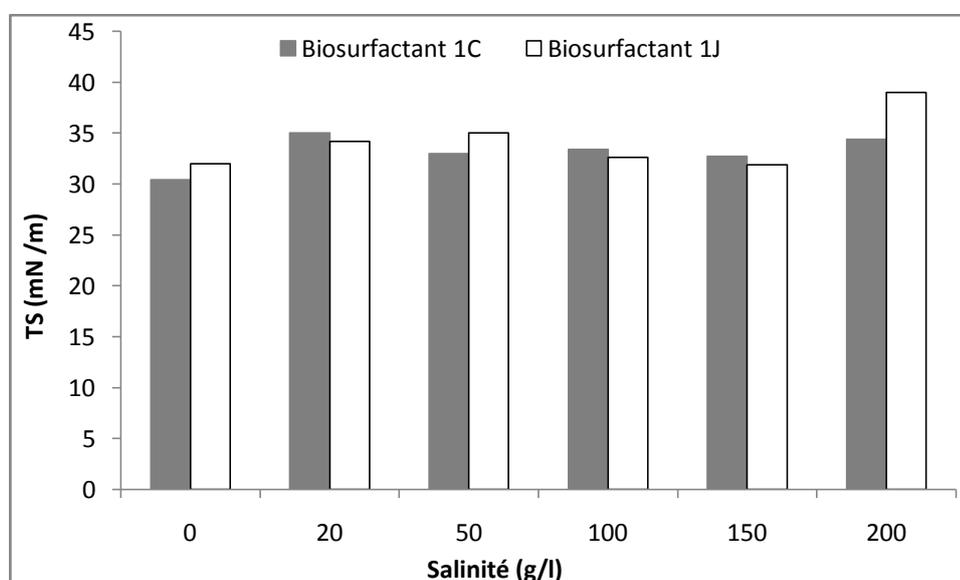


Figure 3.33 : Effet de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par les souches 1J et 1C

Selon Desai et Banat (1997) des concentrations en sel supérieures à 20 g/l sont suffisantes pour inactiver les tensio-actifs synthétiques.

Prieto *et al.* (2008) ont signalé que le biosurfactant produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa* forme des émulsions stables à des faibles concentrations de NaCl (5 g/l). La stabilité de l'émulsion en présence de sel a été

rapportée comme l'une des propriétés du biosurfactant produit par la souche *Bacillus licheniformis* JF-2. Il a été trouvé que le biosurfactant produit par *Nocardiopsis* est stable jusqu'à 80 g/l de NaCl.

Nitschke *et al.* (2006) ont rapporté que *Bacillus subtilis* est capable de produire un biosurfactant en utilisant la farine de manioc comme source de carbone, qui garde ses propriétés durant son exposition à des températures élevées (100 °C) et une forte salinité (20% NaCl). Le biosurfactant produit par *Paenibacillus macerans* TKU029 conserve sa stabilité tensioactive contre la température (4 -70 °C), le pH (3 - 11) et la concentration en sel (< 5%) (Liang *et al.*, 2014).

Nos résultats expérimentaux qualifient l'utilisation potentielle de biosurfactants des souches 1J et 1C dans les domaines environnemental et industriel.

3.5.8 Activité émulsifiante des biosurfactants

L'activité émulsifiante de biosurfactant produit par la souche 1C a été testée contre différents composés hydrophobes. Le maximum d'émulsification est obtenu avec le pétrole brut ($E_{24} = 90,90\%$). Egalement, l'huile moteur constitue un bon substrat pour l'émulsification ($E_{24} = 81,81\%$). Le kérosène est moyennement émulsifié ($E_{24} = 54,54\%$). Par contre aucune émulsification n'a été observée avec l'hexadécane, le gasoil, l'huile de tournesol et l'huile d'olive (figure 3.34).

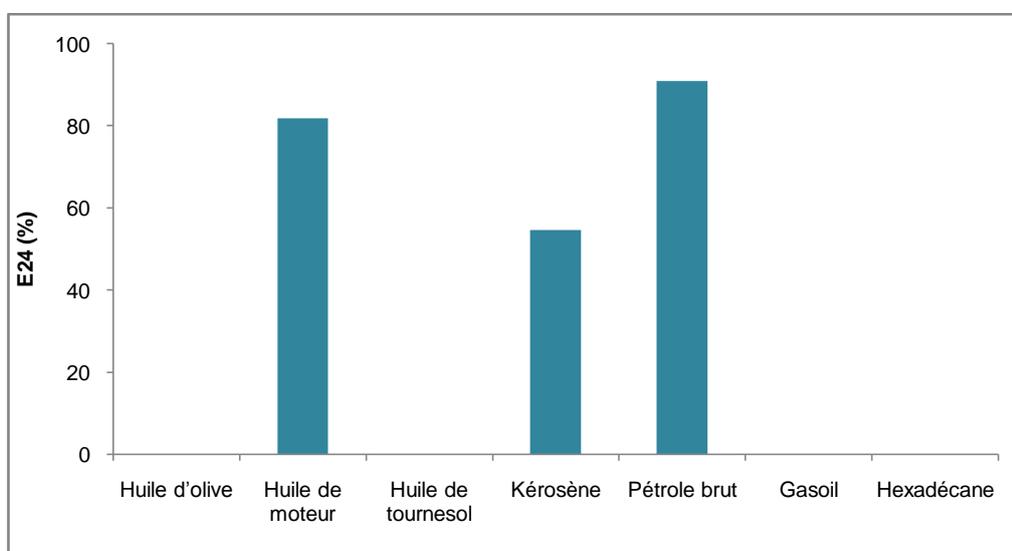


Figure 3.34: Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche 1C.

De même, le biosurfactant produit par la souche 1J présente une activité émulsifiante très intéressante. Le maximum d'émulsification est observé avec le pétrole brut ($E_{24} = 99\%$), suivi par l'huile moteur ($E_{24} = 81\%$). L'huile d'olive et l'huile de tournesol sont moyennement émulsifiées ($E_{24} 63\%$ et 40% respectivement). L'hexadécane, le kérosène et le gasoil n'ont pas été émulsifiés par le biosurfactant produit par la souche 1J (figure 3.35). La capacité des deux biosurfactants d'émulsifier le pétrole brut et l'huile de moteur permet leur utilisation dans l'industrie pétrolière.

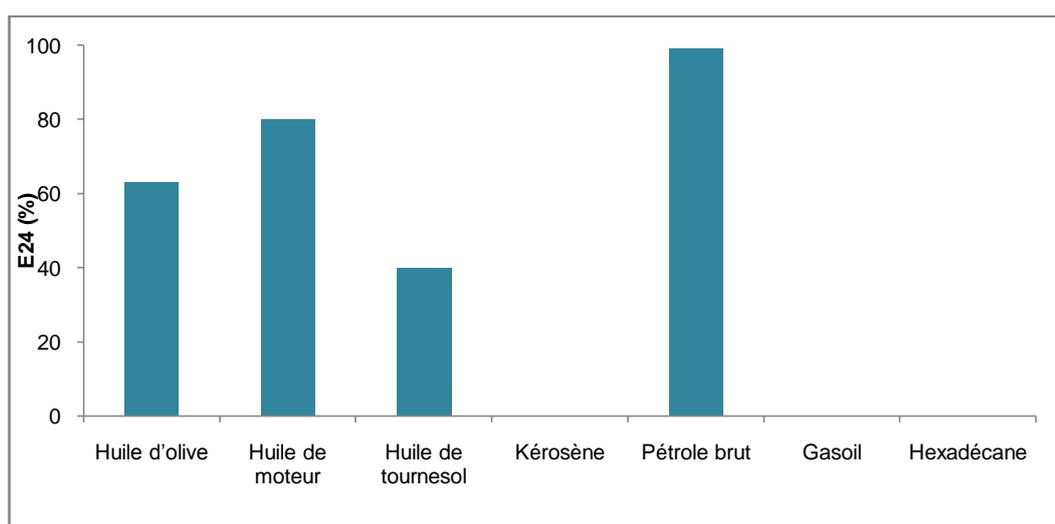


Figure 3.35: Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche 1J.

Anondho *et al.* (2012) ont rapporté que la souche *Bacillus subtilis* C19 utilise le pyrène comme seule source de carbone et d'énergie pour produire un biosurfactant avec une activité émulsifiante très importante contre l'huile végétale (70%).

Les travaux de Falatko et Novak (1992) montrent que les biosurfactants produits lors de la croissance des souches sur le glucose ou les huiles végétales ne peuvent pas émulsifier le gasoil. Par contre, les biosurfactants produits lors de la croissance sur les hydrocarbures peuvent émulsifier le gasoil. Le biosurfactant produits par *Bacillus* sp. DHT et *Pseudomonas aeruginosa* DHT2 durant leur croissance sur le glucose et l'hexadécane montrent une capacité à émulsifier

l'hexadécane, le gasoil, l'essence, le kérosène et l'octadécane (Kumar *et al.*, 2007 et Kumar *et al.*, 2008).

Ferhat *et al.* (2011) [8] ont rapporté que le kérosène et le gasoil n'ont pas été émulsifiés par les biosurfactants produits par *Ochrobactrum intermedium* et *Brevibacterium lutescens*. Mais l'activité émulsifiante est très importante avec l'huile moteur et l'huile de tournesol.

Le biosurfactant produit par *Staphylococcus* sp. 1E durant la croissance sur l'huile d'olive montre un maximum d'émulsification avec le pétrole brut ($E_{24} = 98,9\%$) et une bonne activité avec l'huile moteur ($E_{24} = 78,57$), tandis qu'une émulsification moyenne a été observée avec le gasoil, l'huile d'olive et l'huile de tournesol [7].

3.5.9 Solubilisation des HAP

L'effet des biosurfactants sur la solubilité des HAP (anthracène, phénanthrène et pyrène) a été étudié en utilisant les deux biosurfactants avec différentes concentrations (figures 3.36 et 3.37). Les résultats obtenus montrent que la solubilité des HAP a augmenté en présence des deux biosurfactants.

A une concentration de 1,5 g/l de biosurfactant 1C, la solubilité du phénanthrène, anthracène et pyrène est 5,14, 4,17 et 2,91 fois supérieure par rapport aux témoins, respectivement. En appliquant le biosurfactant 1J, la solubilité de phénanthrène, anthracène et pyrène est 6, 1,66 et 2,39 fois supérieure respectivement par rapport aux témoins.

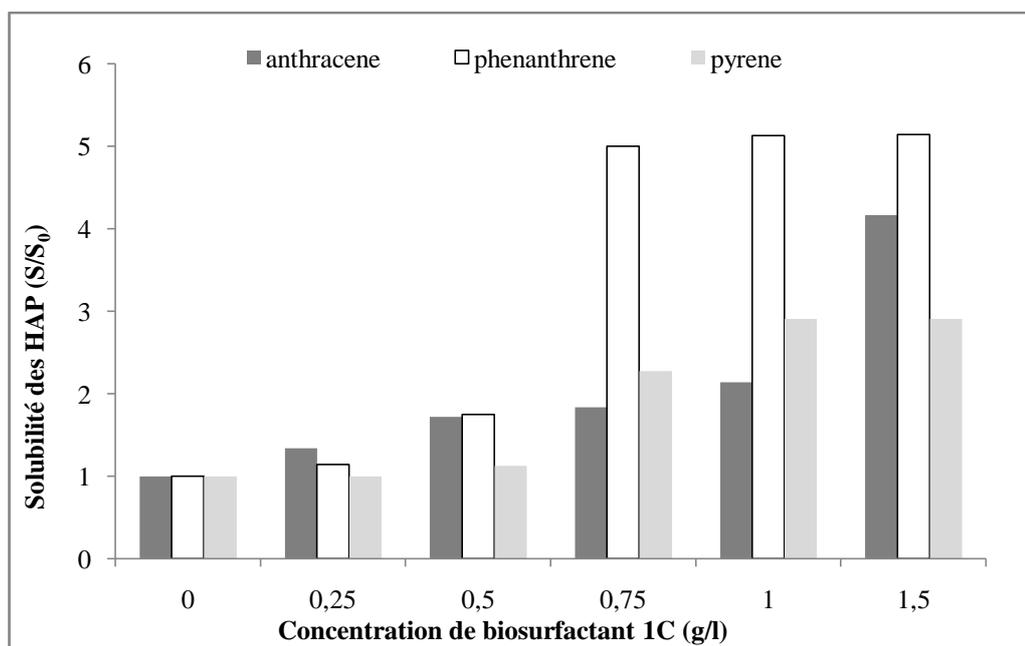


Figure 3.36: Effet de biosurfactant produit par la souche 1C sur la solubilisation d'anthracène, phénanthrène et pyrène.

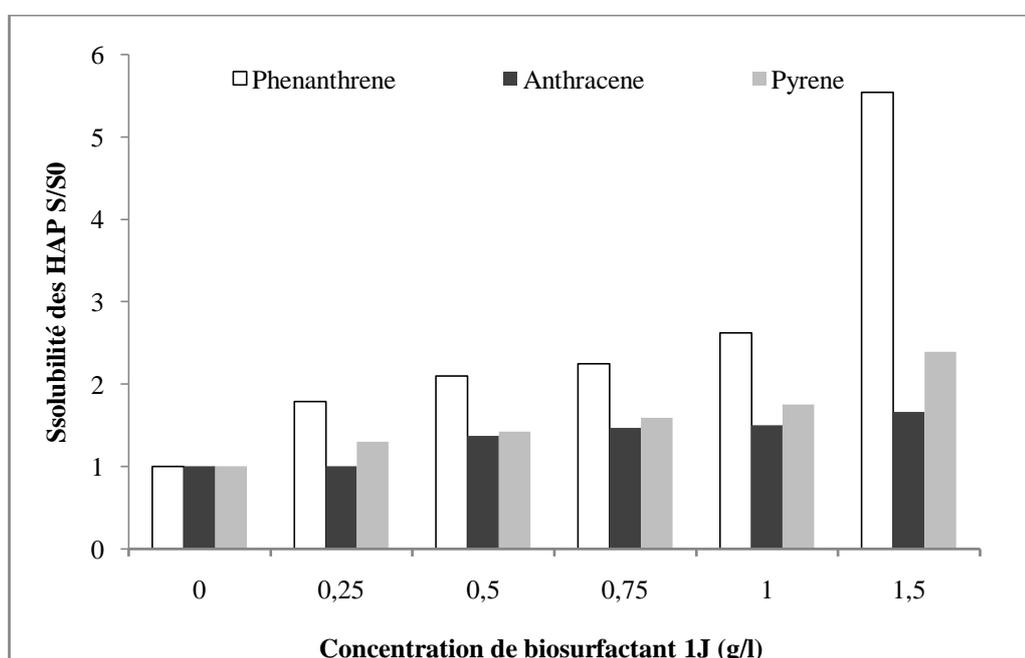


Figure 3.37: Effet de biosurfactant produit par la souche 1J sur la solubilisation d'anthracène, phénanthrène et pyrène.

Les deux biosurfactants montrent une efficacité dans la solubilisation des HAP dans une phase aqueuse. Kumar *et al.* (2008) ont rapporté que l'ajout de biosurfactant produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa* DHT2 augmente la solubilité apparente du phénanthrène, anthracène et pyrène de 2-3 fois.

Les travaux de Saimmai *et al.* (2012) ont montré que le biosurfactant produit par la souche *Oleomonas sagaranensis* AT18, isolée à partir d'un sédiment, augmente la solubilité des HAP. En effet, la solubilité apparente du naphthalène et du phénanthrène est de 2-3 fois supérieur par rapport au témoin. Alors que la solubilité d'anthracène, fluoranthène et du pyrène est de 18-20 fois supérieur par rapport au témoin.

La solubilité du phénanthrène dans une solution de biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus sp.* 1E est de 20 fois supérieur par rapport au contrôle lorsque la concentration de biosurfactant est de 1 g/l [7].

Un biosurfactant produit par une souche thermophile *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 augmente la solubilité apparente du phénanthrène et du benzo[a]pyrène à 0,054 et 0,002 g/l respectivement lorsque la concentration du biosurfactant est de 25 fois sa CMC (Wong *et al.*, 2009).

3.5.10. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de biosurfactant produit par la souche 1C a été testée sur des souches bactériennes Gram⁺ et Gram⁻. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) variant de 0,75 à 12,08 mg/ml. Ceci indique que le biosurfactant brut est un antimicrobien très efficace, les résultats obtenus montrent que le biosurfactant 1C présente une forte activité contre *Staphylococcus aureus* (tableau 3.6). Alors qu'une faible activité a été enregistrée contre *Salmonella enterica* CIP 80.39.

L'antibiogramme réalisé sur les espèces de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* montre le pouvoir inhibiteur du biosurfactant produit par la souche 1J (figure 3.38). Seulement, où il apparaît une zone claire autour du disque qui signifie l'absence de croissance dans cette zone à cause de la diffusion des molécules du biosurfactant.

Tableau 3.6: Concentration minimale inhibitrice du biosurfactant de la souche 1C

Microorganismes	CMI (mg/ml)
<i>Agrobacterium</i> sp.	1,51-3,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCCC15442	1,51-3,02
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1053	3,02-6,04
<i>Salmonella Enterica</i> CIP 8039	6,04-12,08
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	0,75-1,51
<i>Erwinia</i> sp.	3,02-6,04

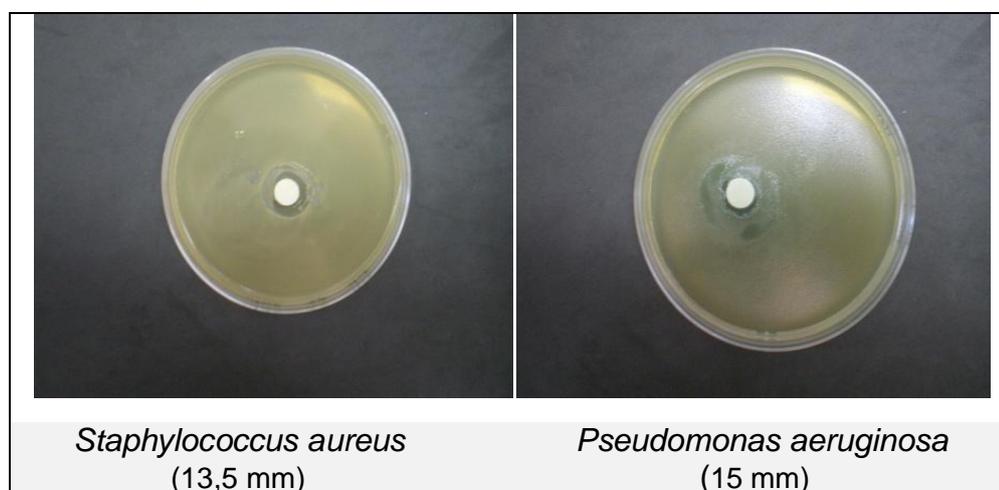


Figure 3.38: Activité antimicrobienne du biosurfactant de la souche 1J

Le biosurfactant produit par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C montre une activité antimicrobienne contre une variété de bactéries. Des résultats similaires ont été trouvés par Liang *et al.* (2014) où le biosurfactant produit par la souche *Macerans* sp. TKU029 montre une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*.

Quinn *et al.* (2012) ont rapporté que le biosurfactant de nature lipopeptidique produit par *Paenibacillus polymyxa* présente une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus*.

Egalement, les travaux de Cao *et al.* (2009) ont révélé l'activité antimicrobienne de biosurfactant produit par la souche *Bacillus natto* TK-1 contre *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Micrococcus luteus* et *Salmonella typhimurium*.

Le biosurfactant produit par la souche *Brevibacterium aureum* MSA13 montre une forte activité antimicrobienne contre *Candida albicans* et *Klebsiella pneumoniae* (Kiran *et al.*, 2010).

3.6 Identification des souches 1C et 1J

La souche 1C, isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut, montre une capacité biodégradative élevée et une production de biosurfactant. Les observations microscopiques (optique et électronique) sont visualisées sur la figure 3.39.

La souche 1C a une forme de bacille, Gram+, aérobie elle a une tendance à former une pellicule à la surface de milieu. En présence des conditions défavorables du milieu de culture elle produit des endospores.

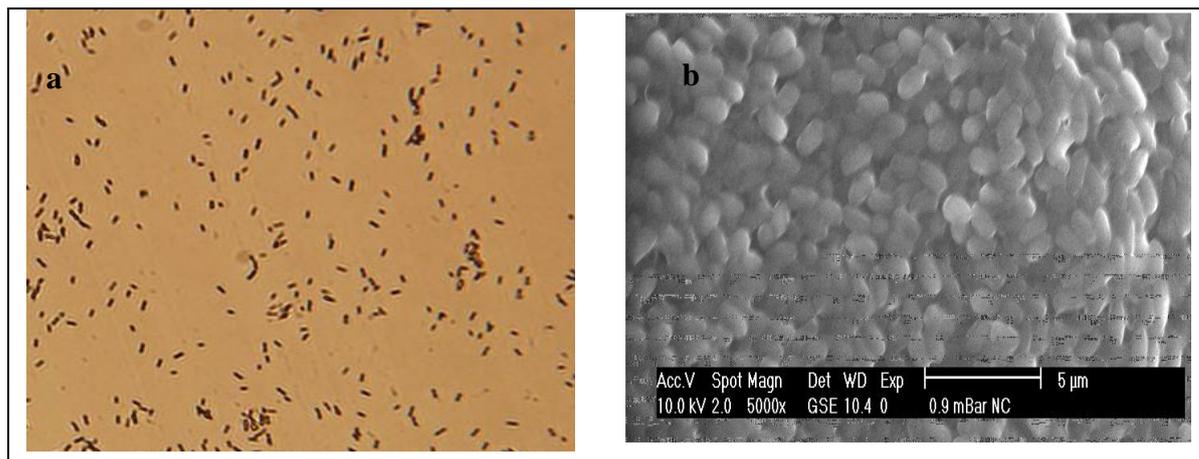


Figure 3.39 : Observation microscopique de la souche 1C: a- microscope optique ; b- microscope électronique

Cette souche appartient à l'espèce *Paenibacillus popilliae* avec une similarité de 98.47%. L'arbre phylogénétique suivant détaille la phylogénie de cette souche (Figure 3.40).

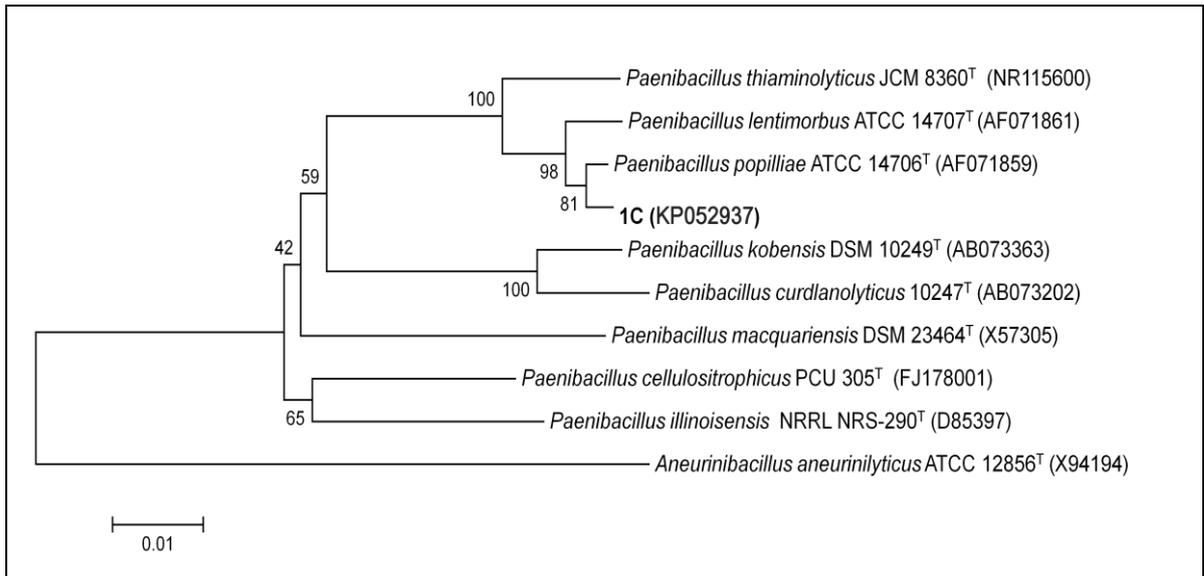


Figure 3.40: Arbre phylogénétique établie pour la souche 1C

La souche 1J, isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut a une forme de bacilles, mobile et de gram positif.

Selon la macro et micromorphologie, les caractères biochimiques de la souche bactérienne 1J, et surtout selon le tableau d'identification de la galerie biochimique API CH 50 (tableau en annexe 4), la souche bactérienne 1J a été affiliée à l'espèce *Bacillus licheniformis* avec un pourcentage de similitude de 98%.



Figure 3.41: Observation microscopique de la souche 1J

Discussion générale

Plusieurs travaux ont rapporté la capacité des bactéries et champignons mésophiles à dégrader l'anthracène, mais la biodégradation de ce composé par des souches thermophiles reste toujours peu étudiée. Les travaux de Zeinali *et al.* (2007) ont montré que la souche thermophile *Nocardia* sp. TSH1 a dégradé 25% d'anthracène (500 mg/l) après 7 jours d'incubation à 50 °C.

La souche *Paenibacillus popilliae* 1C est capable d'utiliser l'anthracène comme source de carbone et d'énergie un taux de dégradation de 92,58% a été obtenu après 48 h d'incubation à 45°C. Ce rendement de dégradation est très important en comparant avec les résultats trouvés par Arulazhagam et Vasudevan (2011) où seulement 56% de l'anthracène (100 mg/l) a été transformé par la souche *Ochrobacterium* sp. VA1 après 5 jours d'incubation à 37 °C.

Ntougias *et al.* (2015) ont révélé que 66,9 % d'anthracène (10 mg/l) a été dégradé par *Alicyclophilus denitrificans* après 5 jours d'incubation à 25°C. Des résultats proches ont été cités par Ye *et al.* (2011), où *Aspergillus fumigatus* a dégradé 60% (10 mg/l) d'anthracène après 5 jours d'incubation à 30°C.

En utilisant 100 mg/l d'anthracène ; Chupungars *et al.* (2009) ont rapporté que 92% d'anthracène a été métabolisé par la souche *Agrocybe* sp. CU-43 et 70% par *Xylaria* sp. CU-1 mais après 21 jours d'incubation. Les travaux de Pinyakong *et al.* (2012) ont montré que seulement 30% d'anthracène a été éliminé après 15 jours d'incubation ce qui montre l'intérêt de notre souche *Paenibacillus popilliae* 1C dans la biodégradation d'anthracène dans le taux et le temps de dégradation.

La dégradation de l'anthracène par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C est optimale dans un milieu acide-neutre et salin. Ces conditions dépendent de cette souche, d'autres travaux ont montré que la dégradation de l'anthracène par *Martellella* sp. AD-3 est optimale lorsque la salinité est de 30 g/l et le pH est légèrement alcalin (9) (Cui *et al.*, 2014). Alors que Ye *et al.* (2011) ont signalé que la dégradation de l'anthracène par *Aspergillus fumigatus* est optimale à pH neutre (7,5) et à faible salinité

L'étude des métabolites de dégradation d'anthracène, par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C, montre que l'anthracène est transformé en 9,10 anthraquinone puis en acide phtalique. Cette voie a déjà été observée aussi pour *Martellella* sp. AD-3 (Cui *et al.*, 2014), *Mycobacterium* (Moody *et al.*, 2001) et *Bacillus* (Ahmed *et al.*, 2012).

La souche *Paenibacillus popilliae* 1C a montré une capacité d'utiliser plusieurs composés aromatiques comme source de carbone, notamment le pyrène et le pétrole brut. Des travaux similaires ont montré la capacité des différentes souches bactériennes de même genre (*Paenibacillus*) de croître sur différents hydrocarbures (Yastrebova *et al.*, 2009 ; Danne *et al.*, 2002 ; Omotayo *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus sur la production des biosurfactants, par les deux souches thermophiles 1C et 1J, ont montré la capacité de ces souches de produire des biosurfactants en utilisant différents substrats dont l'huile d'olive et le chlorure d'ammonium sont respectivement les sources optimales de carbone et d'azote. La production des biosurfactants est maximale après 24 h d'incubation à 45°C.

Plusieurs travaux ont traité la production de biosurfactant par des souches thermophiles en utilisant une variété de sources de carbone. *Bacillus* sp AB-2 utilise le glucose et l'acide oléique pour la production de biosurfactant après 15 h d'incubation à 45 °C (Banat, 1993). La production est optimale après 96 h d'incubation à 45°C par *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant le glycérol comme source de carbone (Das et Mukherjee, 2005). Sharafi *et al.* (2014) ont rapporté la production de biosurfactant par *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 en présence d'huile de tournesol après 120h d'incubation à 45°C. L'huile d'olive a été sélectionnée comme source de carbone pour la production de biosurfactant par *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus* sp. 1E, la production maximale a été obtenue après 40- 48 h d'incubation (Abouseoud *et al.*, 2008 ; 7].

Les deux biosurfactants produits par les deux souches 1C et 1J réduisent la tension de surface jusqu'à 32,6 et 33,3 mN /m, respectivement. Ces valeurs sont proches à ceux rapportées par d'autres chercheurs. Par exemple, Liang *et al.* (2014) ont mentionné une réduction de la tension de surface jusqu'à 35,34 mN/m

par *Paenibacillus macerans* TKU029. De même Najafi *et al.* (2010) ont observé une réduction jusqu'à 35 mN/m par *Paenibacillus alvei* ARN 63.

Des faibles valeurs de TS ont été obtenues durant la production de biosurfactants : 25 mN/m par *Candida lipolytica* UCP 0988 (Rufino *et al.*, 2014), 25,42 mN/m par *Bacillus licheniformis* TKU004 [118] et 25,8 mN/m par *Staphylococcus sp.* 1E [7]. Alors que des valeurs de TS élevées ont été rapportées par d'autres auteurs : 43 mN/m par *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 (Sharafi *et al.*, 2014), 38,9 mN/m par *Rhodococcus erythropolis* 16 LM.USTHB (Sadouk *et al.*, 2008) et 44,03 mN/m par *Klebsiella sp.* [112].

La comparaison entre ces résultats montre que la réduction de la tension de surface par les biosurfactants produits par les souches 1C et 1J est acceptable. Les deux biosurfactants ont conservé leurs propriétés tensioactives après exposition à des températures élevées (70 °C), des salinités relativement élevées (0-20% de NaCl) et une large gamme du pH (2-10). Des propriétés similaires ont été rapportées par d'autres auteurs.

Les concentrations micellaires critiques (CMC) des biosurfactants produits par les souches 1C et 1J sont respectivement de 0,5 et 1g/l. Ces valeurs sont considérées comme élevées par rapport aux CMC des biosurfactants cités par d'autres auteurs. La CMC de biosurfactant produit par *Bacillus methylotrophicus* est 35 mg/l (Chandankere *et al.*, 2014). Freitas de Oliveira *et al.* (2013) [105] ont rapporté une CMC de 63 mg/l pour le biosurfactant produit par *Bacillus subtilis* LAMI005. Une purification des biosurfactants 1C et 1J peut réduire les valeurs de leur CMC.

Les deux biosurfactants présentent une activité émulsifiante très importante avec le pétrole brut et l'huile moteur alors que des faibles activités émulsifiantes ont été observées avec les autres substrats (huiles et hydrocarbures) mais ils présentent un pouvoir solubilisant des HAP intéressent. Ces résultats montrent que les deux biosurfactants 1C et 1J sont probablement classés comme des biosurfactants de faible poids moléculaire de fait que la réduction de la tension de surface et le pouvoir solubilisant sont plus importants par rapport à l'activité émulsifiante.

Finalement les deux biosurfactants 1C et 1J présentent une activité antibactérienne, une telle activité est déjà mentionnée pour les biosurfactants produits par différents microorganismes (Chen *et al.*, 2012, Quinn *et al.*, 2012 et Liang *et al.*, 2014)

Les propriétés très intéressantes citées ci-avant permettent l'utilisation des biosurfactants 1C et 1J dans différentes industries, notamment en biotechnologie environnementale.

CONCLUSION GENERALE

La biodégradation des hydrocarbures est un processus complexe qui dépend de la nature et des quantités d'hydrocarbure présentes, des conditions environnementales et de la composition des communautés microbiennes. A ce jour, seuls quelques microorganismes sont connus par leur capacité d'utiliser les HAP lourds (plus de trois cycles benzéniques) comme source de carbone dans des conditions thermophiles.

Dans cette présente étude, une souche bactérienne thermophile 1C isolée à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut, est capable de dégrader l'anthracène et le pyrène.

La faible solubilité des HAP pose un sérieux problème lors de la biodégradation de ces composés, plusieurs travaux ont proposé l'ajout des surfactants pour augmenter la biodisponibilité des HAP. Les résultats de l'influence des surfactants chimiques sur la biodégradation des HAP par la souche 1C montrent que la souche 1C est capable de dégrader le naphthalène et l'anthracène en absence des surfactants chimiques.

Les résultats obtenus montrent aussi que la dégradation d'anthracène est affectée par les conditions de culture (concentration du substrat, pH et salinité). L'analyse des métabolites montre la formation de 9,10 anthraquinone comme intermédiaire.

La production des biosurfactants est une forme d'adaptation développée par les microorganismes hydrocarbonoclastes et généralement représente une réponse physiologique aux besoins spécifiques rencontrés par les microorganismes dépendant de leur environnement. Les résultats obtenus montrent que les deux souches 1C et 1J produisent des biosurfactants en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone. Les deux biosurfactants présentent des propriétés très intéressantes (stabilité thermique et chimique, pouvoir solubilisant et activité antibactérienne) qui permettent leur utilisation dans différentes industries, notamment en biotechnologie environnementale.

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

- Les mécanismes réactionnels de la biodégradation et les enzymes responsables de la dégradation des HAP par la souche 1C, en particulier le pyrène.
- L'élargissement de l'étude sur la biodégradabilité à d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (pure ou mixte),
- Utilisation d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et structurales par LC-MS et RMN) pour identifier les biosurfactants produits par les deux souches.
- Elargir l'application de ces biosurfactants dans le domaine environnemental et industriel.

REFERENCES

- [1] Bado-Nilles, A. , "Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins" thèse de doctorat, université de la rochelle 2008
- [2] Boronin. A. M., Kosheleva, I. A, "Diversity of Naphthalene Biodegradation Systems in Soil Bacteria", K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_80, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- [3] Iqbal J., Metosh-Dickey C. and Portier R.J., "Temperature effects on bioremediation of PAH and PCB contaminated south louisiana soils: a laboratory mesocosm study", Soils and Sediments Journal, V.7, n°3, (2007), 153 - 158.
- [4] Zeinali, M., Vossoughi, M., Ardestani, S.K., "Characterization of a moderate thermophilic Nocardia species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons", Letters in Applied Microbiology 45 (2007) 622–628.
- [5] Heipieper. H. J, Martinez, P. M, "Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms", K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_108, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010
- [6] Mesbaiah. FZ « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique 'naphtalène' et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN » université Saad Dahlab de Blida 2011.
- [7] Eddouaouda, K., "Etude du potentiel biodegradatif des souches bactériennes isolees a partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud: biodégradation du pétrole brut et HAP, et production de biosurfactant", Thèse de Doctorat, Université de Blida 1, Algérie, (2012).
- [8] Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherit, A., Moulai- Mostefa, N., Sayadi, S., "Screening and preliminary characterization of powerful biosurfactants produced by two strains (*Ochrobactrum* sp. strain 1C and *Brevibacterium* sp. strain 7G) isolated from contaminated soils with petroleum hydrocarbons". Int. Biodeterior. Biodegrad. 65 (2011).1182-1188.
- [9] Menzie C. A., Potocki B. B. and Santodonato J. "Exposure to carcinogenic PAHs in the environment". Environmental Science and Technology, 26 (1992) 1278 - 1284.
- [10] Li J. and Chen B. H. "Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants". Chemical Engineering Science 57(2002) 2827 – 2835.
- [11] Pantsyrnaya. T, "Dissolution du phénanthrène dans des milieux aqueux en présence de tensioactifs et biodégradation par *Pseudomonas putida* dans un milieu de fermentation modèle", Thèse en co-tutelle Université Mendeleiev de Chimie Technologique de Moscou et l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011.
- [12] Bamforth. SM, Singleton. I, "Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions", J Chem Technol

Biotechnol 80 (2005) 723–736

[13] Soltani, M., "Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de Carbone", Thèse de Doctorat, Paris, (2004).

[14] Rapport d'étude, N°66244-DESP-R01, "Hydrocarbures aromatiques polycycliques: (guide méthodologiques: acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines", INERIS, (2005).

[15] Manoli, E., Samara, C., "The removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the wastewater treatment process: Experimental calculations and model predictions". *Environmental Pollution* (2008)151, 477-485.

[16] Haritash. A.K, Kaushik. C.P, "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review", *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1–15.

[17] Huong Tran. L, "Destruction par voie électrochimiques d'hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans des matrices fortement contaminée", Thèse de Doctorat, Université du Québec, 2009.

[18] Little, C., Hopher, J.M. & El Sharif, M. "The sono-degradation of phenanthrene in an aqueous environment", *Ultrasonic* 40 (2002) 667-674.

[19] Cao, B., Nagarajan, K et Loh, K-C., "Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches", *Appl Microbiol Biotechnol* (2009) 85:207–228

[20] Hadibarata, T et Tachibana, S, "Bioremediation of Phenanthrene, Chrysene, and Benzo[a]pyrene by Fungi Screened from Nature", *ITB J. Sci.* Vol. 41 A, No. 2, 2009, 20-29.

[21] Saada A., Nowak C. and Coquerea N. "Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures". Rapport intermédiaire, Résultat de la phase 1. (2005). Site internet :<http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/RP-53739FR2.pdf>

[22] Wang Q., Zhang S., Li Y. and Klassen W. "Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution". *Journal of Environmental Protection*, 2 (2011) 47-55.

[23] Cerniglia, C.E. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Biodegradation* 3(1992)351-368.

[24] Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., "Principles of microbial PAH-degradation in soil", *Environ. Pollut Journal*, V.133, (2005), 71–84.

[25] Tortella, G.R., Diez, M.C., "Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants". *Crit. Rev. Microbiol.* 31(2005)197–212.

[26] Cerniglia, "Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation" *J Ind Microbiol Biotechnol.* (1997) Nov-Dec;19(5-6):324-33.

[27] Meulenber R., Rijnaarts H. H. M., Doddema H. J. and Field J. A. "Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability". *FEMS Microbiol. Lett.* 152(1997)1: 45-49.

[28] Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A., "Degradation of high-molecular-

weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal–bacterial cocultures”. *Appl. Environ. Microbiol.* 3(2000)1007–1019.

[29] Tongpim, S. and Pickard, M.A. “Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene trans-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene”. *Can. J. Microbiol.* 45 (1999) 369-376.

[30] Wick LY, De Munain AR, Springael D, Harms H “Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene”. *Appl Microbiol Biotechnol* 58 (2002) 378–385

[31] Ri-He Peng, Ai-Sheng Xiong, Yong Xue, Xiao-Yan Fu, Feng Gao, Wei Zhao, Yong-Sheng Tian & Quan-Hong Yao, “Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons”, *FEMS Microbiol Rev* 32 (2008) 927–955

[32] Arodí Bernal-martinez “Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation – digestion anaérobie” Thèse de doctorat, Université Montpellier II, Montpellier, France 2005

[33] Gabet, S. “Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique” Université de Limoges (2005).

[34] Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E., “Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonads*”. *Biochem. J.*, Vol.95 (1965) 819-831

[35] Cerniglia C.E., “Initial reactions in the oxidation of anthracene by *Cunninghamella elegans*” *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 128,(1982) 2055-2061.

[36] Sutherland J.B., Selby A.L., Freeman J.P., Fu P.P., Miller D.W., Cerniglia C.E., “ Identification of xyloside conjugates formed from anthracene by *Rhizoctonia solani*”. *Mycol. Res.*, Vol. 96 (1992) 509-517.

[37] Hammel K.E., Green B., “Ring fission of anthracene by a eukaryote”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.88 (1991) 10605-10608.

[38] Field J.A., de Jong E., Feijoo Costa G., de Bont J.A.M., “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi”. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vo1.58 (1992) 2219-2226.

[39] Sack U., Günther T., “Metabolism of PAR by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities”. *J. Basic Microbiol.*, Vo1.33 (1993) 269-277.

[40] Kanaly R. A. and Harayama S., “Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria”. *J. Bacteriol.* 182(8) : (2000) 2059 – 2067.

[41] Kim H-M, Hyun Y, Lee K-K., “Remediation of TCEcontaminated groundwater in a sandy aquifer using pulsed air sparging: laboratory and numerical studies”. *J Environ Eng* 133 (2007) 380–388

[42] Heitkamp M.A., Franklin W., Cerniglia C.E., “Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium”. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.54 (1988a) 2549-2555

[43] Heitkamp M.A., Freeman J.P., Miller D.W., Cerniglia C.E., “Pyrene

degradation by a Mycobacterium : identification of ring oxidation and ring fission products". *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54 (1988b) 2556-2565.

[44] Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche C., "Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a Mycobacterium sp." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.59, n06 (1993)1927-1930.

[45] Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H.-J., "Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UWI". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.1.34, (1991) 671-676:

[46] Cerniglia C.E., Kelly D.W., Freeman J.P., Miller D.W., "Microbial metabolism of pyrene". *Chem. Biot Inter.*, Vol.57 (1986) 203-216.

[47] Leahy J. G. and Colwell R. R. "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment". *Microbiol. Rev.* 54: (1990) 305-315.

[48] Jacques, R.J.S., Santos, E.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., Selbach, P.S., Sa', E.L.S., Camargo, F.A.O., " Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming ". *International Biodegradation and Biodeterioration* 56 (2005)143–150.

[49] Cerniglia C.E., "Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Adv. Appl. Microbiol Journal*, V. 30, (1984), 31 - 71.

[50] Bossert I. and Bartha R. "The fate of petroleum in soil ecosystems", (1984) 434-476. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.

[51] Leys . N- M., Bastiaens. L., Verstraete. W., Springael, D., "Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil", *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 66: 726–736.

[52] Harms. H., Smith. K. E. C., Wick, L. Y., "Introduction: Problems of Hydrophobicity/ Bioavailability", K. N. Timmis (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_98, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010

[53] Kweon . O., Kim . S.-J., Cerniglia, C. E., "Genomic View of Mycobacterial High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation", *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_81, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

[54] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biot Journal*, V.53, (2000), 495-508.

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

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

[57] Desai, J.D. and Banat, I.M. "Microbial production of surfactants and their commercial potential". *Microbiol Mol Biol Rev* 61(1997) 47–64.

[58] Puisieux, F. Seiller M., "Les systèmes disperses: Agents de surface et émulsions", Edit. Tec & Doc. Lavoisier. (1983)

[59] Larpent, C. Les tensioactifs, Constantes physico-chimiques, Edit. Technique de l'ingénieur, Vol. K2. 1993.

- [60] Rosen, M.J., "Surfactants and interfacial phenomena". 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, (1989) 431.
- [61] Gelfman, M.I., Kovalevitch, O.V., Yustratov, V.P., "Chimie colloïdale" (en russe). Saint-Pétersbourg, Lan', (2003) 336.
- [62] Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. et Cameotra, S.S., "Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances", *Int J Mol Sci.* 2011; 12(1): 633–654.
- [63] Hatzinger, P.B., Alexander, M., "Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability". *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 537–545.
- [64] Wodzinski, R.S., Coyle, J. E., "Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria". *Applied Microbiol.* 27,(1974)1081-1084.
- [65] Guha, S., Jaffé, P., "Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants". *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 605-611.
- [66] Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J.P., Samson, R., "The effect of an anionic surfactant on the mobilization and biodegradation of PAHs in a creosote-contaminated soil". *Hydrolog. Sci. J.* 40 (1995) 471-484.
- [67] Tiehm A., "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants". *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 258-263.
- [68] Bramwell, D.A.P., Laha, S., "Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene". *Biodegradation* 11 (2000) 263-277.
- [69] Putcha R.V., Domach M.M., "Fluorescence monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and effects of surfactants". *Environ. Progress*, Vol.12, n02 (1993) 81-85.
- [70] Ghosh M.M., Yeom I.T., Shi Z., 1995, Hinchee R.E., Anderson D.B., Hoepfel H. (eds), Battelle Press, Ohio, U.S.A., In "Bioremediation of recalcitrant organics", pp.15-23 : Surfactant-enhanced bioremediation of PAH- and PCB-contaminated soils.
- [71] Chen, G., Strevett, K.A., Vanegas, B.A., "Naphthalene, phenanthrene and surfactant biodegradation", *Biodegradation* 12 (2001) 433–442.
- [72] Mukesh Kumar, D.J., Alamelu, M., Manjubharathi, N., Balakumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T., "Effect of surfactant Brij 35 on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. PSS6", *Der Pharmacia Sinica*, 3(3) (2012) 382–387.
- [73] Bautista, L.F., Sanz, R., Molina, M.C., Gonzalez, N., Sanchez, D., "Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria", *Int. Biodeter. Biodegrad.* (2009) 913–922.
- [74] Laha S., Luthy R.G., "Inhibition of phenanthrene mineralization by non-ionic surfactants in soil-water systems". *Environ. Sci. Technol.*, Vol.25 (1991)1920-1930
- [75] Aronstein B.N., Alexander M., "Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on, the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vo1.39 (1993)386-390
- [76] Zhang, D., Zhu, L., "Effects of Tween 80 on the removal, sorption and

- biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1", *Environ. Pollut.* 164 (2012) 169–174.
- [77] Chen, K., Zhu, Q., Qian, Y., Song, Y., Jun Yao, M., Choi, M.F., "Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia*", *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98 (2013) 361–367.
- [78] Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z., "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions". *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991)127-133.
- [79] Volkering, F., Breure, A.M., Van Andel, J.G., "Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons". *App. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 1699–1705.
- [80] Li, J.-L., Chen, B.-H., "Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants". *Chem. Eng. Sci.* 57 (2002) 2825-2835.
- [81] Schippers, C., Geßner, K., Müller, T., Scheper, T., "Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture". *J. Biotechnol.* 83 (2000) 189–198.
- [82] Doong, R.-a., Lei, W.-g., "Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant". *J. Hazard. Mater. B* 96 (2003)15-27.
- [83] Kolomytseva ,M.P., Randazzo ,Baskunov ,D.B.P., Scozzafava ,A., Briganti ,F., Golovleva,L.A., " Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469" *Bioresource Technology* 100 (2009) 839–844
- [84] Li, J.-L., Chen, B.-H., "Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans*". *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 66–73.
- [85] Pathak H., Kantharia D., Malpani A. and Madamwar D. "Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms". *Journal of Hazardous Materials.* 166 (2008) 1466 – 1473.
- [86] X.-H. Pei, X.-H. Zhan, S.-M. Wang, Y.-S. Lin, L.-X. Zhou, "Effects of a biosurfactant and a synthetic surfactant on phenanthrene degradation by a *Sphingomonas* strain", *Pedosphere* 20 (2010) 771–779.
- [87] Mohanty,S., Mukherji,S., "Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102 (2013) 644– 652
- [88] Rodrigues, A., Nogueira, R., Melo, L.F., Brito, A.G., "Effect of low concentrations of synthetic surfactants on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) biodegradation", *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 83 (2013) 48–55.
- [89] Providenti, M.A., Fleming, C.A., Lee, H., Trevors, J.T., "Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries". *FEMS Microbiol. Ecol.* 17 (1995)15-26.

- [90] Dean, S.M., Jin, Y., Cha, D.K., Wilson, S.V., Radosevich, M., "Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene degrading and biosurfactant-producing bacteria". *J. Environ. Qual.* 30 (2001)1126- 1133.
- [91] Mulligan C.N. "Environmental application for biosurfactants". *Environmental Pollution*, 133 (2005) 183 – 198.
- [92] Prommachan O., "Production And Application Of Biosurfactant From *Bacillus MUV4*", Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailand, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants. 2002.
- [93] Perfumo. A., Smyth. T. J. P., Marchant. R., Banat, I. M., "Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates", K. N. Timmis (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_103,# Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010
- [94] Kosaric N., Gray N. C. C. and Cairns W. L. "Microbial emulsifiers and de emulsifiers", (1983) p. 575–592. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, vol. 3. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla.
- [95] Desai J. D. and Banat I. M. "Microbial production of surfactants and their commercial potential". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(1997) 47-64.
- [96] Gautam, K. K. et Tyagi, V. K. "A review of microbial surfactant," *Journal of Oleo Science*, vol. 55 (2006)155–166
- [97] Banat IM "Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal—state of the art" (review). *Acta Biotechnol* 15 (1995) 251–267
- [98] Ron, E.Z., Rosenberg, E., "Biosurfactants and oil remediation", *Curr. Opin. Biotechnol Journal*, V.3, (2002), 249-252.
- [99] Chiewpattanakul, P., "Isolation and structure elucidation of biosurfactant from microorganism and its application model in drug delivery system" thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine. 2010
- [100] Kosaric, N. "Biosurfactants for Soil Bioremediation", *Food Technol. Biotechnol.* 39 (2001) 295–304
- [101] Rahman, K. S. M. and Gakpe, E. (2008) "Production, characterisation and applications of biosurfactants – Review", *Biotechnology*, 7 (2), pp.360-370.
- [102] Cameotra S. S. , Singh P., "Synthesis Of Rhamnolipid Biosurfactant And Mode Of Hexadecane Uptake By *Pseudomonas* Species", *Microb Cell Fact.* 8(2009)16
- [103] Vandecasteele J-P., "Petroleum microbiology". (2008) Tomes 1 et 2. Editions Technip, Paris
- [104] Banat I. M. "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review". *Bioresource Technol.* 51 (1995)1–12.
- [105] Freitas de Oliveira, D.W., Lima Franc,I.W., Nogueira Félix ,A.K., Lima Martinsa, J.J., Aparecida Giroa, M.E., Vânia Maria M. Melob, Luciana Rocha Barros Gonc, alves , " Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101 (2013) 34– 43

- [106] Silva, E.J., Rocha Silva, N.M.P., Rufino,R.D., Luna, J.M.,Silva, R.O., Sarubbo, L.A.,“Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117 (2014) 36–41
- [107] Mnif,I., Elleuch, M.,Ellouze Chaabouni,S., Dhouha Ghribi, D., “ *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carob moth” *Ectomyelois ceratoniae*, *Crop Protection* 50 (2013) 66-72
- [108] Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Banat, I.M., “Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil”. *Bioresour. Technol.* 102(2011)3366-3372.
- [109] Rikalovic, M., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M., Karadzic, I., “Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-a1”. *J. Serb. Chem. Soc.* 77 (2012)27–42.
- [110] Li, A.H., Xu, M.Y., Sun, W., Sun, G.P.,” Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* GIM 32 using different substrates including molasses distillery wastewater”. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163 (2011)600–611.
- [111] Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. & Nabi, I. “Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*”, *Desalination* 223 (2008) 143-151.
- [112] Jain, R.M., Mody,K., Joshi,N., Mishra, A., Jha, B., “Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 108 (2013) 199– 204
- [113] Sadouk, Z., "Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* strain. *Oil*", *Gas Science and Technology- Revue Journal*, V. 63, (2008), 747–753.
- [114] Ramana, K. V. & Karanth, N. G.” Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 45(1989)249-257.
- [115] Singh, M., Saini, V. S., Adhikari, D. K., Desai, J. D. & Sista, V. R.. “Production of bioemulsifier by producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation”. *Biotechnology Letters* 12(1990)743-746
- [116] Kosaric, N., Choi, H. Y. & Bhaszczyk, R. Biosurfactant production from *Nocardia* SFC-D. *Tenside Surfactant Detergents* 27(1990)294-297.
- [117] Syldatk, C., S. Lang, U. Matulovic, and F. Wagner, “Production of Four Interfacial Active Compounds from n-Alkanes or Glycerol by Resting Cells of *Pseudomonas* sp. DSM 2874, Z”. *Naturforsch.* 40:61 (1985).
- [118] Chen ,Y.C., Chiang,T.J., Liang,T.W., Wang, I-L., Wang, S.L., “Reclamation of squidpenby *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1 (2012) 62–69
- [119] Guerra-Santos, L., Kappeli, O. & Fiechter, A. “Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and

- environmental factors”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 (1986) 443-448.
- [120] Powalla, M., Lang, S. & Wray, V. “Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on n-alkanes”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (1989) 473-479
- [121] Ilori, M.O., Amobi, C.J., Odocha, A.C., "Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp., isolated from a tropical environment", *Chemosphere journal*, V.61, (2005), 985-992.
- [122] Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A. & Kadri, M.” Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization, and evaluation”, *Acta Biotechnologica* 11 (1991) 315-324.
- [123] Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S. and Khamis, A. “Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium”. *World J Microbiol Biotechnol* 7(1991) 53–60.
- [124] Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., “Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions”, *Bioresource Technology* 99 (2008) 195–199
- [125] Margaritis A., Zajic J. E., Gerson D. F., Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotech. and Bioeng.*, 21(1979)1151-1162.
- [126] Wang Q., Zhang S., Li Y. and Klassen W. “Potential Approaches to Improving Biodegradation of Hydrocarbons for Bioremediation of Crude Oil Pollution”. *Journal of Environmental Protection*, 2 (2011) 47-55.
- [127] Youssef , N.H., Duncan, K. E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., “Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms”, *Journal of Microbiological Methods* 56 (2004) 339– 347.
- [128] Hassanshahian. M, “Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance)”. *Marine Pollution Bulletin* 86 (2014) 361–366
- [129] Plaza , G.A., Zjawiony , I., Banat, I.M., “Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactantproducing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils”, *Journal of Petroleum Science and Engineering* 50 (2006) 71– 77
- [130] Walter, V., Sylatk, C., Hausmann, R., “Biosurfactants: screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms”. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672(2010) 1–13.
- [131] Cameotra SS, Makkar RS., “Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules”. *Curr Opin Microbiol* 7(2004)262–266
- [132] Singh, P. and Cameotra, S. S. “Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences”. *Trends in Biotechnology* 22(2004)142-146.
- [133] Banat I. M., Makkar R.S. and Cameotra S.S. “Potential commercial applications of microbial surfactants”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(2000) 495-508.
- [134] Mukherjee, A. K et Das ,K., “ Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview” Chapter 4, 2010
- [135] Iyer A, Mody K, Jha B. “Emulsifying properties of a marine bacterial

exopolysaccharide". *Enzyme Microbial Technol*; 38(2006)220-222.

[136] 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.*, 98(2007)1339-1345.

[137] Banat, I.M., N. Samarath, M. Murad, R. Horne, and S. Banerjee, "Biosurfactant Production and Use in Oil Tank Clean Up", *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7(1991) 80

[138] Youssef, N., D. Simpson , R., McInerney , M.J., Duncan, K.E., "In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production". *International Biodeterioration & Biodegradation* 81 (2013) 127-132

[139] Youssef, N., Simpson, D. R., Duncan, K. E., McInerney, M. J., Folmsbee, M., Fincher, T., Knapp, R. M., "In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir", *Journal Applied and environmental microbiology*, V. (73), n°4, (2007), 1239–1247.

[140] Barkay T, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E., " Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier *alasan*". *Appl Environ Microbiol* 65(1999) 2697–2702

[141] Rahman, K.S.M., Banat, I.M., Thahira, J., Thayumanavan, T. et Lakshmanaperumalsamy, P. "Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant", *Bioresource Technol.* 81(2002) 25-32

[142] Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil", *Eng. Geology Journal*, V.60, (2001), 371-380.

[143] Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM. "Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Qual* 30(2001)479-485.

[144] Chupungars, K., Rerngsamran ,P., Thaniyavarn, S., "Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation". *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (2009) 93–99

[145] Pinyakong, O., Tiangda, K., Iwata, K., Omori, T., "Isolation of novel phenanthrene-degrading bacteria from seawater and the influence of its physical factors on the degradation of phenanthrene". *Sci. Asia* 38(2012) 36-43.

[146] Broderick, L.S., et Cooney, J.J. "Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems", *Dev.Ind. Microbiol.* 23(1982)425-434.

[147] Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L. et Ward, C.H. "Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria". *J Industrial Microbiol*,8(1991)237-46

[148] 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", *Appl. Environ. Microb.* 10(2004)1114-1120.

[149] Morikawa M., Daido H. Takao T. Murata S., Shimonishi Y., Imanaka T., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38", *Bacteriol Journal*, V.175, (1993),.6459-6466.

- [150] Bradford M. M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248–254.
- [151] Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith, F. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, 28 (1956) 350– 356.
- [152] Cooper D. G. and Goldenberg, B. G. "Surfaceactive agents from two *Bacillus* species". *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (1987) 224-229.
- [153] Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S. et Narasimhan, B. "In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L". *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 3(2011)226-229.
- [154] Hall, T.A. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98 NT". *Nucleic Acids Symposium Series* 41 (1999) 95-98.
- [155] Altschul S. F., Madden T.L., Schäffer A. A., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.*, 25 (1997)3389-3402.
- [156] Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Rapp B. A. and Wheeler D. L. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 28 (2000) 15-18.
- [157] Ye, J.S., Yin, H., Qianga, J., Penga, H., Qin, M.H., Zhang, N., He, B.Y., "Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigates*", *J. Hazard. Mater.* 185 (2011) 174–181.
- [158] Cui , C., Ma,L., Shi ,J., Lin ,K., Luo, Q., Liu , Y., "Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic *Marteella* sp. AD-3". *International Biodeterioration & Biodegradation* 89 (2014) 67-73
- [159] Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G. and Devi, P, "Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp". *Bioresour Technol* 101 (2010) 7980–7983.
- [160] Norzila Othman, Noor Hana Hussain, Ahmad Tarmizi Abd Karim, Suhaimi Abdul- Talib "Isolation and Optimization of Naphthalene Degradative Bacteria" *International Conference on Sustainable Infrastructure and Built Environment in Developing Countries* November, 2-3, 2009
- [161] Lin C., Gan L. and Zu-lian C. "Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN)". *Journal of Hazardous Materials*. 182(2010) 771 – 777.
- [162] Swaathy, S., Kavitha,V., Sahaya Pravin, A., Baran Mandal, A., Gnanamani, A., "Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in aqueous phase by marine *Bacillus licheniformis* MTCC 5514" *Biotechnology Reports* 4 (2014) 161– 170.
- [163] Arulazhagan, P., Vasudevan, N., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halotolerant bacterial strain *Ochrobactrum* sp. VA1". *Marine Pollution Bulletin* 62 (2011) 388-394.
- [164] Dariush Minai-Tehrani, Saeed Minoui Ali Herfatmanesh "Effect of Salinity on Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) of Heavy Crude Oil in

Soil" Bull Environ Contam Toxicol (2009) 82:179–184

[165] Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., "Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1", Appl. Environ. Microbiol Journal, V.67, (2001), 1476–1483.

[166] Ahmed, A.T., Othman, M.A., Sarwade, V.D., Gawai, K.R., "Degradation of anthracene by Alkaliphilic bacteria *Bacillus badius*". Environ. Pollut. 2(2012)97-104.

[167] Chen, K., Zhu, Q., Qian, Y., Song, Y., Jun Yao, M., Choi, M.F., "Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia*", Ecotoxicol. Environ. Saf. 98 (2013) 361–367.

[168] Ting, W.T.E., Yuan, S.Y., Wu, S.D., Chang, B.V., "Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*". Inter Biodeterior. Biodegrad 65 (2011) 238-242.

[169] Daane, L.L., Harjono, I., Zylstra, G.J. and Häggblom, M.M. "Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants". Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 2683-2691.

[170] Santos ,E.C., Jacques , R. J.S., Bento , F. M., Peralba, M.C. R., Selbach, P. A., Sa´ a, E. L.S., Camargo, F.A.O., "Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp". Bioresource Technology 99 (2008) 2644–2649.

[171] Mnif, S., Chamkha, M., Sayadi, S., "Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100 a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline conditions". J. Appl. Microbiol. 107 (2009)785-794.

[172] Ganesh, A., and Lin, J., "Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates". African Journal of Biotechnology 8 (2009)5847-5854.

[173] Joo, M-H., Kim, J-Y., "Characteristics of crude oil biodegradation by biosurfactant-producing bacterium *Bacillus subtilis* JK-1". J Korean soc appl boil chem. 56 (2013)193-200.

[174] Yastrebova, O. V., Plotnikova, E. G., Anan'ina, L. N., Demakov ,V. A., "Aerobic Spore_Forming Bacteria from the region of salt mining". Russian Journal of Ecology 40, No. 7(2009)516–521.

[175] Daane, L.L., Harjono,I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleroni, N.J., Haggblom, M.M., "PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. And description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants". Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (2002)131–139.

[176] Omotayo, A. E., Egbomeade, L.O., Taiwo, O., Oyebamiji, O.O., Ilori, M.O., "Hydrocarbon Degradation by Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria". Journal of Sci. Res. Dev. 14 (2013)75 – 84.

[177] Cooper, D.G. & Zajic, J.E. "Surface-active compounds from microorganisms", Adv. Appl. Microbiol. 26(1980) 229-253.

[178] Liang, T.W., Wu, C.C., Cheng, W.T., Chen, Y.C., Wang, C.L., Wang,

- I.L., Wang, S.L., "Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029". *Appl Biochem Biotechnol* 172(2014)933–950.
- [179] Najafi, A.R., Rahimpour, M.R., Jahanmiri, A.H., Roostaazad, R., Arabian, D., Soleimani, M., Jamshidnejad, Z., "Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82(2011)33–39.
- [180] Pereira, J.F.B., Gudina, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J.A.P., Rodrigues, L.R., "Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications". *Fuel* 111(2013)259–268.
- [181] Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B., "Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114 (2014)324–333.
- [182] Duvnjak, Z., D.G. Copper, and N. Kosaric, Effect of Nitrogen Source on Surfactant Production by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, in *Microbial Enhanced Oil Recovery*, edited by J.E. Zajic, D.G. Cooper, T.R. Jack, and N. Kosaric, Pennovell Books, Tulsa, p. 66, 1983.
- [183] Das, K., Mukherjee, A.K. "Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples", *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 69: 192–199
- [184] Sen, R. K. "Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin". *J. Chem. Tech. Biotech.* 68(1997)263-270.
- [185] Gu, X.B., Zheng, Z.M., Yu, H.Q., Wang, J., Liang, F.L., Liu, R.L., "Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method", *Process Biochemistry* 40 (2005) 3196–3201
- [186] Kiran, G. S., Hema, T.A., Gandhimathi, R., Joseph Selvin, Anto Thomas, T., Rajeetha Ravji, T., Natarajaseenivasan, K., "Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73 (2009) 250–256
- [187] Najafi, A.R., Rahimpour, M.R., Jahanmiri, A.H., Roostaazad, R. D., Arabian, Ghobadi, Z., "Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology". *Chemical Engineering Journal* 163 (2010) 188–194.
- [188] Amodu, O.S., Ntwampe, S.K.O., Ojumu, T.V., "Optimisation of biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* STK01 grown exclusively on *Beta vulgaris* waste using response surface methodology". *Bioresources* 9:3 (2014) 5045-5065.
- [189] Gudiña, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., "Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76 (2010)298–304.
- [190] Saikia, R.R., Deka, S., Deka, M., Ibrahim M. Banat, I.M., "Isolation of

biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production". *Ann Microbiol* 62(2012)753–763.

[191] Saimmai, A., Rukadee, O., Onlamool, 565 T., Sobhon, V., Maneerat, S., "Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18". *World J Microbiol Biotechnol* 28(2012) 2973–2986.

[192] Cameotra, S.S., Makkar, R.S., "Synthesis of Biosurfactants in extreme conditions: A Review", *Appl. Microbiol. Biot Journal*, V.50, (1998), 520-529.

[193] Deleu M, Paquot M, Nylander T., "Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes". *Biophys J* 94(2008)2667–2679

[194] Haddad, N.I.A., Ji Wang and Bozhong Mu., "Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2". *Protein & Peptide Letters*, 16(2009) 7-13.

[195] 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". *Chemosphere* 71(2008)1781-1785.re 71, 1781-1785.

[196] Nitschke, M., Pastore, G.M., "Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater". *Bioresource Technology* 97 (2006)336–341.

[197] Anondho, W., Hanif ,Y., Heri ,H., Muhamad, S., "Isolation and Properties Characterization of Biosurfactant Synthesized by Pyrene Degrading *Bacillus subtilis* C19" *J. Chem. Chem. Eng.* 6 (2012) 889-896

[198] Falatko, D.M. & Novak, J.T., "Effects of biologically produced surfactants on themobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon", *Water Environ. Res.* 64 (1992)163-169

[199] Kumar, M., León, V., Manterano, A.D.S. & Ilzins, O.A., " A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensioactive emulsifying agent", *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2007)211-220.

[200] Kumar, M., Le_on, V., Manterano, A.D.S, Ilzins, O.A., and luis, L., « Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp". *World J Microbiol Biotechnol* 24(2008)1047–1057.

[201] Wong, J.W.C. and Zhao, Z., "Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene " . *Environ Technol* 30(2009) 291–299.

[202] Quinn, G.A., Maloy, A.P., McClean ,S.,Carney ,B., Slater, J.W., "Lipopeptide biosurfactants from *Paenibacillus polymyxa* inhibit single and mixed species biofilms", *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28:10 (2012)1151-1166.

[203] Cao, X.H., Liao, Z.Y., Wang, C.L., Yang, W.Y., Lu, M.F., "Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities". *Braz. J. Microbiol.* 40(2009) 373–

379.

[204] Kiran, S., Thomas, G., Selvin, J., "Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation", *Colloid. Surface B. Biointerfaces Journal*, V.78, (2010), 8-16.

[205] Ntougias, S., Melidis, P., Navrozidou, E., Tzegkas, F., "Diversity and efficiency of anthracene-degrading bacteria isolated from a denitrifying activated sludge system treating municipal wastewater", *International Biodeterioration & Biodegradation* 97 (2015) 151-158

[206] Sharafi, H., Abdoli, M., Hajfarajollah, H., Samie, N., Alidoust, L., Abbasi, H., Fooladi, J., Shahbani Zahiri, H., Noghabi, K.A., "First Report of a Lipopeptide Biosurfactant from Thermophilic Bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 Newly Isolated from Municipal Landfill Site", *Appl Biochem Biotechnol* 173(2014) 1236–1249

[207] Rufino, R.D., Moura de Luna, J., Maria de Campos Takaki, G., Sarubbo, L.A., "Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988" *Electronic Journal of Biotechnology* 17 (2014) 34–38

[208] Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A.K., Choi, M.M.F., "Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa". *Fuel* 122 (2014) 140–148

ANNEXES

Annexe 1 : Propriétés physicochimiques des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA

Composés	PM	S (mg.l ⁻¹)	Pf (°C)	Pe (°C)	D	log Kow
Naphtalène	128	32	80	218	1,02	3,37
Acénaphtylène	152	3,93	80	278	-	-
Acénaphène	154	3,42	93	279	-	3,92
Fluorène	166	1,68	114	298	1,2	4,18
Phénanthrène	178	1,4	101	338	1,18	4,46
Anthracène	178	0,045	215	340	1,25	4,5
Fluoranthène	202	0,206	107	384	1,20	4,9
Pyrène	202	0,132	151	396	1,27	4,88
Benzo[a]anthracène	228	0,0094	435	438	1,27	5,63
Chrysène	228	0,0018	258	441	1,27	5,63
Benzo[b]fluoranthène	252	0,0015	167	487	1,27	6,04
Benzo[k]fluoranthène	252	0,0080	217	481	-	6,21
Benzo[a]pyrène	252	0,0016	178	496	1,35	6,06
Dibenzo[a, b]anthracène	278	0,0050	263	498	1,28	6,86
Benzo[g, b, j]pérylène	276	0,0007	278	500	1,3	6,78
Indéno[123cd] pérylène	276	0,0002	164	505	1,07	6,58

PM : Poids Moléculaire.

S (mg.l⁻¹) : Solubilité dans l'eau à 25°C (en mg.l⁻¹).

Pf (°C) : Point de fusion.

Pe (°C) : Point d'ébullition.

D : Densité.

log Kow: Coefficient de partage octanol/eau.

Annexe 2 : Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches

Deux bourbiers fait l'objet de la présente étude, les prélèvements ont été effectués le 13 Mars 2007 à 16h (heure locale) à l'aide d'une spatule désinfectée par l'éthanol à une profondeur de 20 à 50 cm. Pour chaque échantillon, 1Kg de sol prélevé est mis dans un sachet en plastique stérile. La température des échantillons *in situ* est égale à 22 °C. Les échantillons ont été placés dans un frigorifiant (+4 °C) jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été ensuite conservés au réfrigérateur en attendant les analyses.

Le dosage du carbone organique total (COT) et les hydrocarbures totaux (HT) ont été réalisés, respectivement, au sein du laboratoire de géochimie minérale et le laboratoire des méthodes spectrales au niveau du Centre de Recherche et Développement de Boumerdes.

Tableau: Caractéristiques physico-chimiques du biotope

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

*COT : Carbone Organique Total ; N_T : Azote total Kjeldahl
et HPT : Hydrocarbures Pétroliers Totaux*

Annexe 3 : Isolement des souches bactériennes

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre): H_3BO_4 (0,25g), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g), NaMoO_4 (0,06g), $\text{ZnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,7g). Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min [7].

Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

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



Figure 1. Adaptation de la flore bactérienne contenue dans le sol contaminé à la dégradation du pétrole brut

Les souches obtenues sont conservés en les repiquant sur un milieu LB composé (g l^{-1}) de : 5 d'extrait de levure, 10 de peptone et 5 de NaCl et 18 g d'agar. Le repiquage de ces dernières ce fait une fois par mois pour les cultures sur boite de pétri et une fois chaque trois mois pour les tubes inclinés. La conservation à longue terme (à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) est réalisée sur milieu LB liquide additionné avec de 30% du glycérol.

Annexe 4 : Résultats des tests biochimiques des souches 1C et 1J

Souche 1C :

	Abréviations	Sucre	Après 48 h		Abréviations	Sucre	Après 48 h
0	0	Témoin	-	31	SAC	D-Saccharose	+
1	GLY	Glycérol	+	32	TRE	D-Tréhalose	+
2	ERY	Erythritol	-	33	INU	Inuline	-
3	DARA	D-Arabinose	+	34	MLZ	D-Mélézitose	+
4	LARA	L-Arabinose	-	35	RAF	D-Raffinose	+
5	RIB	D-Ribose	+	36	AMD	Amidon	+
6	DXYL	D-Xylose	-	37	GLYG	Glycogène	+
7	LXYL	L-Xylose	-	38	XLT	Xylitol	-
8	ADO	D-Adonitol	+	39	GEN	Gentiobiose	+
9	MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	-	40	TUR	D-Turanose	+
10	GAL	D-Galactose	+	41	LYX	D-Lyxose	-
11	GLU	D-Glucose	+	42	TAG	D-Tagatose	+
12	FRU	D-Fructose	+	43	DFUC	D-Fucose	-
13	MNE	D-Mannose	+	44	LFUC	L-Fucose	+
14	SBE	L-Sorbose	-	45	DARL	D-Arabitol	-
15	RHA	L-Rhamnose	-	46	LARL	L-Arabitol	-
16	DUL	Dulcitol	-	47	GNT	Potassium Gluconate	+
17	INO	Inositol	+	48	2KG	Potassium 2-CétoGluconate	-
18	MAN	D-Mannitol	-	49	5KG	Potassium 5-CétoGluconate	+
19	SOR	D-Sorbitol	-/+				
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	+				
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	+				
22	NAG	AcétylGlucosamine	+				
23	AMY	Amygdaline	+				
24	ARB	Arbutine	+				
25	ESC	Esculine	+				
26	SAL	Salicine	+				
27	CEL	D-Cellobiose	+				
28	MAL	D-Maltose	+				
29	LAC	D-Lactose	-				
30	MEL	D-Melibiose	+				



Souche 1J :

	Abréviations	Sucre	Après 48 h		Abréviations	Sucre	Après 48 h
0	0	Témoin	-	31	SAC	D-Saccharose	+
1	GLY	Glycérol	+	32	TRE	D-Tréhalose	+
2	ERY	Erythritol	-	33	INU	Inuline	+
3	DARA	D-Arabinose	+	34	MLZ	D-Mélézitose	-
4	LARA	L-Arabinose	+	35	RAF	D-Raffinose	+
5	RIB	D-Ribose	+	36	AMD	Amidon	+
6	DXYL	D-Xylose	+	37	GLYG	Glycogène	+
7	LXYL	L-Xylose	-	38	XLT	Xylitol	-
8	ADO	D-Adonitol	-	39	GEN	Gentiobiose	+
9	MDX	Méthyl-βD-Xylopyranoside	-	40	TUR	D-Turanose	+
10	GAL	D-Galactose	+	41	LYX	D-Lyxose	-
11	GLU	D-Glucose	+	42	TAG	D-Tagatose	+
12	FRU	D-Fructose	+	43	DFUC	D-Fucose	-
13	MNE	D-Mannose	+	44	LFUC	L-Fucose	-
14	SBE	L-Sorbose	-	45	DARL	D-Arabitol	-
15	RHA	L-Rhamnose	+	46	LARL	L-Arabitol	-
16	DUL	Dulcitol	-	47	GNT	Potassium Gluconate	+
17	INO	Inositol	-	48	2KG	Potassium 2-CétoGluconate	-
18	MAN	D-Mannitol	+	49	5KG	Potassium 5-CétoGluconate	-
19	SOR	D-Sorbitol	+				
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	-				
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	+				
22	NAG	AcétylGlucosamine	+				
23	AMY	Amygdaline	+				
24	ARB	Arbutine	+				
25	ESC	Esculine	+				
26	SAL	Salicine	+				
27	CEL	D-Cellobiose	+				
28	MAL	D-Maltose	+				
29	LAC	D-Lactose	+				
30	MEL	D-Melibiose	+				



