

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté de Technologie
Département de génie des procédés

THÈSE DE DOCTORAT

en Chimie industrielle

Spécialité : Chimie industrielle

**ETUDE DES VOIES METABOLIQUES DE LA BIODEGRADABILITE
DES HYDROCARBURES EN VUE D'UNE APPLICATION D'UN
PROCEDE DE BIODEPOLLUTION DES EAUX DE MER**

Par

Fatma-Zohra FERRADJI

Y. DAGHBOUCHE	Professeur, Université de Blida 1	Présidente
M. BOULAHIDID	Professeur, ENSSMAL	Examineur
M. ABOUSAOUD	Professeur, Université Yahia Farès de Médéa	Examineur
H. BOUTOUMI	MCA, Université de Blida 1	Examineur
L. LAMARI	MCA, ENS de Kouba	Examinatrice
A. BADIS	Professeur, Université de Blida 1	Directeur de thèse

Blida1, Septembre 2014

ملخص

ثلاثة سلالات تابعة للستربتومييسات (*Streptomyces sp. AB1*, *Streptomyces sp.* ثلاثه سلالات تابعة للستربتومييسات (*Streptomyces sp. AM2*, *Streptomyces sp. AH4*), مصدرها من التربة السطحية لمنطقة متيجة، تم إختبارها لمعرفة قدرتها التحليلية للهيدروكربونات (النفط الخام، النفثالين و الفينانترين)، تحديد مواد إستقلاب تفكيك الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات و إنتاج المفاعلات السطحية البيولوجية من أجل تطبيقات بيئية.

بينت نتائج التفكيك البيولوجي أن:

○ بعد 30 يوم من التحضين، نسب التحليل ن-ألكان (C₁₁ حتى C₃₀) هي على الترتيب من طرف السلالات AH4، AB1 و AM2: 80,96، 76,65 و 67,94 تحت درجة حرارة 30 م° و الرج 150 دورة في دقيقة.

○ بعد 12 يوم من التحضين، أحسن نسب تحليل النفثالين (81,03، 82,36 و 85,23%) و الفينانترين (93,65، 98,52 و 93,71%)، التي تم الحصول عليها باستخدام التركيز الإبتدائي المقدر بـ 100مغ/ل من طرف السلالات AM2، AB1 و AH4 على الترتيب.

○ مواد الإستقلاب الأساسية لتفكيك النفثالين و الفينانترين هي مركبات أكثر بساطة تم الحصول عليها من منحى حمض الفتالين و المركبات الفينولية.

بينت مجموع النتائج المتعلقة بإنتاج، خصائص و تطبيق المفاعل السطحي البيولوجي المستخرج من السلالة AB1 أن:

○ زيت الزيتون أحسن مصدر للكربون (30,26 mN.m⁻¹) و التركيز الحرج CMC يساوي 125 مغ/ل، استحلاب كلي مع البترول الخام (E24 يساوي 100%)، أحسن استقرار حراري (من 4 إلى 70 م°)، كيميائي (pH من 2 إلى 11 و ملوحة من 0 إلى 30 غ/ل من NaCl)، و مضاد جيد للأحياء الدقيقة.

○ يتميز المفاعل السطحي المعزول، بأنه عبارة عن جليكوليبيد و مذيب جيد للنفثالين و للفينانترين و يعد أحسن مزيل للنفط الخام من التربة الملوثة بالهيدروكربونات مقارنة بالمفاعل السطحي الكيميائي «Tween 80» .

أثبتت التجارب المخبرية أن سلالات الستربتومييسات المعزولة محليا لها القدرة الجيدة على تحليل الهيدروكربونات و لهذا فهي تستحق أن تُولى اهتماما لاستعمالها للمعالجة البيولوجية ميدانيا.

الكلمات المفتاحية: التحليل البيولوجي - النفط الخام - النفثالين - الفينانترين - الستربتومييسات - مواد الإستقلاب - المفاعل السطحي البيولوجي - الاستحلاب - المعالجة البيولوجية.

RESUME

Trois souches de streptomycètes (*Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2), d'origine du sol de surface de la région de la Mitidja, ont été examinées pour leurs potentiels dégradatifs des hydrocarbures (pétrole brut, naphthalène et phénanthrène), la mise en évidence des métabolites de dégradation des HAP et la production de biosurfactants en vue d'une application environnementale.

Les résultats de la biodégradation ont montré que :

- Après 30 jours d'incubation, les taux de dégradation des n-alcanes (n-C₁₁ à n-C₃₀) sont respectivement : 80,96; 76,65 et 67,94% par les souches AH4, AB1 et AM2, à 30 °C et 150 tr.min⁻¹.
- Après 12 jours d'incubation, les meilleurs taux de dégradation de naphthalène (81,03; 82,36 et 85,23%) et de phénanthrène (93,55; 98,52 et 93,71%) ont été obtenus avec une concentration initiale en HAP de 100 mg.l⁻¹ par les souches AM2, AB1 et AH4, respectivement.
- Le naphthalène et le phénanthrène ont été métabolisés principalement en composés plus simples *via* la voie de l'acide phtalique et les composés phénoliques.

L'ensemble des résultats relatifs à la production, la caractérisation et l'application du biosurfactant issu de la souche AB1 ont révélé que :

- L'huile d'olive présente une meilleure source de carbone (30,26 mN.m⁻¹), une CMC égal à 125 mg.l⁻¹, une émulsion totale avec le pétrole brut (E24= 100%), une bonne stabilité thermique (4 à 70 °C) et chimique (pH de 2 à 11 et salinité entre 0 et 30 g.l⁻¹ de NaCl) et un effet antimicrobien efficace.
- Le biosurfactant est caractérisé comme un glycolipide, un bon solubilisant des HAP (naphthalène et phénanthrène) et avoir une bonne remobilisation de pétrole brut que celle obtenue avec le surfactant chimique «Tween 80».

Les souches de streptomycètes isolées localement ayant montrées des capacités importantes en dégradation au laboratoire mériteront d'être des bonnes candidates en bioremédiation *in situ*.

Mots clés : Biodégradation - Pétrole brut - Naphthalène - Phénanthrène - Streptomycètes - Métabolites - Biosurfactants - Emulsification - Bioremédiation.

ABSTRACT

Three strains of streptomycetes (*Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 and *Streptomyces* sp. AM2), originally from the surface soil of the Mitidja region, were examined for their degradative potential of hydrocarbons (crude oil, naphthalene and phenanthrene), the highlighting of metabolites from PAH degradation and their biosurfactants productions for environmental application.

The results obtained of biodegradation show that :

- After 30 days of incubation, the rates of n-alkenes degradation (n-C11 to n-C30) are respectively, 80.96, 76.65 and 67.94% by AH4, AB1 and AM2, at 30 °C and 150 r.p.m.
- After 12 days of incubation, the highest rates of biodegradation of naphthalene (81.03, 82.36 and 85.23%) and of phenanthrene (93.55, 98.52 and 93.71%) were obtained with initial concentration of PAH at 100 mg.l⁻¹ by the strains AM2, AB1 and AH4, respectively.
- Naphthalene and phenanthrene were metabolized mainly into simpler compounds *via* phthalic acid and phenolic compounds pathway.

The results related to the production, characterization and application of the biosurfactant from the AB1 strain show that :

- The olive oil has a better carbon source (30.26 mN.m⁻¹) and a CMC equal to 125 mg.l⁻¹, a very good emulsifying activity on crude oil (E24= 100%), a very good thermal stability (4 –70 °C) and chemical one (pH 2 to 11 and salinity between 0 and 30 g.l⁻¹ of NaCl) and also an effective antimicrobial effect.
- The biosurfactant is characterized as a glycolipid, a good PAH solubisant (naphthalene and phenanthrene) and a good crude oil remobilization of than that obtained with the chemical surfactant «Tween 80».

Streptomycetes strains isolated locally that showed significant degradation capacity in laboratory deserve to be good candidates for *in situ* bioremediation.

Keywords: Biodegradation - Crude oil - Naphthalene - Phenanthrene
Streptomycetes - Metabolites - Biosurfactants - Emulsification - Bioremediation.

REMERCIEMENTS

Un grand merci à mon directeur de thèse le professeur Abdelmalek BADIS de m'avoir fait confiance et surtout de m'a confié un sujet si exaltant et à lui exprimer toute ma gratitude «toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable».

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur Sami SAYADI, directeur général du Centre de Biotechnologie de Sfax et directeur du laboratoire de bioprocédés environnementaux (LBPE-CBS, Tunisie), pour les conditions d'accueil permettant le bon déroulement de nos travaux de recherche. Ainsi je souhaiterais remercier en particulier le docteur Sami MNIF du même laboratoire pour ses conseils précieux et l'aide sans cesse.

J'adresse également mes remerciements à Madame Yasmine DAGHBOUCHE, 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, MCA à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Monsieur Mestfa BOULAHID, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et d'aménagement du littoral d'Alger, Monsieur Mahmoud ABOUSAUD, professeur à l'Université Yahia Ferès de Médéa et Monsieur Houcine BOUTOUMI, MCA à l'Université de Blida 1.

Je tiens à remercier vivement mon Directeur et mes collègues de CNRDPA.

Je tiens à remercier Madame Samia YALA et Monsieur Kamel EDDOUAOUA pour leurs aides et leurs conseils précieux.

Au risque de me répéter, encore MERCI à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin et pardon à ceux que j'aurais maladroitement oublié.

A tous les membres de ma famille qui m'ont toujours aidé et encouragé durant toutes ces années. Plus particulièrement, merci à mes parents pour leur soutien absolu et inconditionnel et leurs encouragements illimités.

TABLE DES MATIERS

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
1.1 HYDROCARBURES AROMATIQUES	17
1.1.1 Introduction	17
1.1.2 Pétrole	17
1.1.3 Hydrocarbures aromatiques	18
1.1.4 Techniques de biodépollution des hydrocarbures polyaromatiques	25
1.2 BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	27
1.2.1 Introduction	27
1.2.2 Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques	28
1.2.3 Voies métaboliques de dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques polycycliques	32
1.2.4 Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques	37
1.3 BIOSURFACTANTS ET APPLICATIONS	41
1.3.1 Introduction	41
1.3.2 Classification de biosurfactants	42
1.3.3 Facteurs influençant la production du biosurfactants	45
1.3.4 Propriétés de biosurfactants	48
1.3.5 Applications de biosurfactants	51
1.3.6 Mécanisme d'élimination des HAP par les microorganismes en présence de biosurfactants	54
1.3.7 Utilités des actinomycètes dans la biodégradation et la production de biosurfactants	57
1.4 CONCLUSION	59
2 MATERIEL ET METHODES	60
2.1 Introduction	60

2.2	Souches de streptomycètes	60
2.3	Biodégradation des hydrocarbures	61
2.3.1	Adaptation des souches et préparation de précultures	61
2.3.2	Croissance des streptomycètes sur différents types d'hydrocarbures	61
2.3.3	Etude de la biodégradation du pétrole brut	61
2.3.4	Etude de la biodégradation du naphtalène et du phénanthrène	62
2.4	Identification des intermédiaires métaboliques de biodégradation des HAP	64
2.4.1	Extraction des métabolites	64
2.4.2	Analyses par l'UV-Visible et par IRTF	65
2.4.3	Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse	66
2.5	Production de biosurfactant et application dans le biodépollution des sites contaminés par les hydrocarbures	66
2.5.1	Sélection de la souche performante et la source de carbone	66
2.5.2	Extraction et purification de biosurfactant	68
2.5.3	Caractérisation du biosurfactant	69
2.5.4	Applications environnementales	72
3	RESULTATS ET DISCUSSION	74
3.1	BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	74
3.1.1	Introduction	74
3.1.2	Croissance des streptomycètes sur les hydrocarbures	74
3.1.3	Etude de la biodégradation du pétrole brut	76
3.1.4	Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques	84
3.1.5	Étude comparative de l'action des streptomycètes sur le naphtalène et le phénanthrène	96
3.2	IDENTIFICATION DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES ISSUS DE LA DEGRADATION DU NAPHTALENE ET DU PHENANTHRENE PAR LES TROIS SOUCHES DE STREPTOMYCETES	102
3.2.1	Introduction	102
3.2.2	Métabolites issus de la dégradation aérobie du naphtalène	103
3.2.3	Métabolites issus de la dégradation aérobie du phénanthrène	113

3.3 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET APPLICATION ENVIRONNEMENTALE	122
3.3.1 Introduction	122
3.3.2 Production de biosurfactants	122
3.3.3 Sélection de la souche performante et la source de carbone	123
3.3.4 Séparation et purification du biosurfactant.	125
3.3.5 Caractérisation physicochimique et antimicrobienne du biosurfactant	126
3.3.6 Etude structurale	136
3.3.7 Application environnementale du biosurfactant	139
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	145
APPENDICE	148
A Liste des symboles et des abreviations	148
B Propriétés physicochimiques des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA	149
C Techniques d'isolement, identification phénotypique et génotypique des souches AB1, AH4 et AM2	150
D Courbe d'étalonnage	153
E Teste d'emulsion	156
F Milieux	157
G Spectres de CG-SM de la biodégradation de pétrole brut	158
H Etude de la biodégradation du naphtalène	161
I Etude de la biodégradation du phénanthrène	163
J Spectres HPLC	165
REFERENCES	171

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts.	18
Figure 1.2	Structure des hydrocarbures aromatiques monocycliques	19
Figure 1.3	Structure des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA.	20
Figure 1.4	Devenir des HAP en milieu océanique (milieu aquatique)	22
Figure 1.5	Génotoxicité de certains HAP en fonction de leur masse moléculaire.	23
Figure 1.6	Impacts des hydrocarbures sur l'écosystème aquatique	24
Figure 1.7	Biodégradation des composés aromatiques et les métabolites sous action anaérobie.	29
Figure 1.8	Stratégie générale de la biodégradation des composés aromatiques et les métabolites sous une action aérobie.	30
Figure 1.9	Formation de résidus liés après dégradation incomplète des HAP.	31
Figure 1.10	Synthèse des voies métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie du naphthalène.	34
Figure 1.11	Synthèse des voies métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie du pénéanthrène.	36
Figure 1.12	Différentes formes de disposition de biosurfactants.	41
Figure 1.13	Structure du rhamnolipide produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	42
Figure 1.14	Structures de deux types de biosurfactants : (A) Trehalopide produit par <i>Rhodococcus erythropolis</i> et (B) Sophorolipide produit par <i>Torulopsis bombicola</i> .	43
Figure 1.15	Structure de la surfactine produit par <i>Bacillus subtilis</i> .	44
Figure 1.16	Structure de la phosphatidylethanolamine produit par <i>Acinetobacter</i> sp. strain HO1-N.	44
Figure 1.17	Structure de l'emulsan produit par <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1.	45
Figure 1.18	Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant.	48
Figure 1.19	Quatre types de microémulsions.	50
Figure 1.20	Récupération de pétrole brut par les biosurfactants.	51
Figure 1.21	Applications industrielles de biosurfactants.	52

Figure 1.22	Représentation schématique des processus de la solubilisation des HAP en présence de surfactant.	53
Figure 1.23	Mécanisme de la dégradation des HAP par les microorganismes en présence d'un biosurfactant.	55
Figure 1.24	Mécanismes de la formation de biofilm sous le rôle du biosurfactant.	56
Figure 2.1	Technique de déplacement du pétrole.	67
Figure 2.2	Montage de la purification de biosurfactant brut.	69
Figure 3.1	Effet des hydrocarbures en tant que sources uniques de carbone et d'énergie sur la croissance de trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2).	75
Figure 3.2	Biomasse de précultures obtenues après une étape d'adaptation des souches de streptomycètes sur le naphthalène.	75
Figure 3.3	Propagation du mycélium et disparition de la couche du pétrole: (a) <i>Streptomyces</i> sp. AB1, (b) <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et (c) <i>Streptomyces</i> sp. AM2.	76
Figure 3.4	Observation microscopique : (a) optique ($\times 100$) et (b) microscopique électronique à balayage ($\times 4000$) du mycélium de trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) avant et après la biodégradation du pétrole brut (1% (v: v), 30 °C et 150 tr.min ⁻¹). (1 et 1') culture t ₀ , (2 et 2') par AB1, (3 et 3') par AH4, (4 et 4') par AM2, (5) photo de référence par microscope optique et 5' photo de référence par MEB sur pétrole brut.	78
Figure 3.5	Spectres CG-SM de la dégradation du pétrole brut (1%, v: v) par: (a) <i>Streptomyces</i> sp. AB1, (b) <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et (c) <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹) après 30 jours d'incubation.	80
Figure 3.6	Pourcentage de dégradation des n-alcanes par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 après 30 jours d'incubation (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	82
Figure 3.7	Comparaison de la moyenne des pourcentages de tous les n-alcanes (n-C ₁₁ à n-C ₃₀) entre <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 après 14 et 30 jours d'incubation (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	82
Figure 3.8	Spectres d'absorption de l'UV-vis du naphthalène au cours de la dégradation par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	86

Figure 3.9	Dégradation du naphthalène sous l'effet de la concentration (32 et 100 mg.l ⁻¹) par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	88
Figure 3.10	Spectres HPLC de la dégradation du naphthalène (100 mg.l ⁻¹) à différents temps d'incubation par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	90
Figure 3.11	Spectres d'absorption UV-Vis du phénanthrène au cours de la dégradation par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	92
Figure 3.12	Dégradation du phénanthrène sous l'effet de la concentration (1,4 et 100 mg.l ⁻¹) par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	94
Figure 3.13	Spectres HPLC de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l ⁻¹) à différents temps d'incubation par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	95
Figure 3.14	Cinétique de la dégradation du naphthalène (100 mg.l ⁻¹) et phénanthrène (100 mg.l ⁻¹) par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	97
Figure 3.15	Dégradation du naphthalène (Nap) et du phénanthrène (Phe) par <i>Streptomyces</i> sp. AB1, <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (100 mg.l ⁻¹ , 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	101
Figure 3.16	Spectre UV-Vis des fractions intermédiaires des cultures sur le naphthalène par <i>Streptomyces</i> sp. AB1 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	102
Figure 3.17	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphthalène par <i>Streptomyces</i> sp. AB1 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	105
Figure 3.18	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphthalène par <i>Streptomyces</i> sp. AH4 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	106
Figure 3.19	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphthalène par <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	107

Figure 3.20	Chromatogramme CG-SM des métabolites de dégradation du naphthalène (100 mg.l ⁻¹ , 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹). (a) <i>Streptomyces</i> sp. AB1, (b) <i>Streptomyces</i> sp AH4 et (c) <i>Streptomyces</i> sp AM2.	109
Figure 3.21	Spectres UV-Vis des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par <i>Streptomyces</i> sp. AB1 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH=7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	112
Figure 3.22	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par <i>Streptomyces</i> sp. AB1 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	115
Figure 3.23	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par <i>Streptomyces</i> sp. AH4 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	116
Figure 3.24	Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (100 mg.l ⁻¹ , 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	117
Figure 3.25	Chromatogramme CG-SM des métabolites de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l ⁻¹ , 30°C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹). (a): souche <i>Streptomyces</i> sp. AB1, (b): souche <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et (c): souche <i>Streptomyces</i> sp. AM2	120
Figure 3.26	Production du biosurfactant par les streptomycètes (AB1, AH4 et AM2). (a) La zone claire autour des colonies sur gélose au sang indique une hémolyse des globules. (b) Indice de l'émulsion (E24) en utilisant le pétrole brut comme substrat.	122
Figure 3.27	Evolution du diamètre de déplacement de pétrole brut (DDP) au cours de temps. (a) <i>Streptomyces</i> sp. AB1 avec l'huile d'olive, (b) <i>Streptomyces</i> sp. AH4 avec l'huile de soja et (c) <i>Streptomyces</i> sp. AM2 avec l'huile de soja.	123
Figure 3.28	Sélection de la source du carbone et le temps de la production du biosurfactant par: (a) <i>Streptomyces</i> sp. AB1, (b) <i>Streptomyces</i> sp. AH4 et (c) <i>Streptomyces</i> sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min ⁻¹).	124
Figure 3.29	Conditions optimales retenues pour purifier le biosurfactant en chromatographie sur colonne C18.	126
Figure 3.30	Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche AB1	127

Figure 3.31	Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche AB1	129
Figure 3.32	Effets de la température d'incubation (24h) sur le biosurfactant (à CMC) produit par la souche AB1.	130
Figure 3.33	Effet de la variation de salinité en NaCl sur la stabilité chimique de biosurfactant de la souche AB1 (temps d'incubation 24 h).	132
Figure 3.34	Effet de la variation de pH sur la stabilité chimique de biosurfactant de la souche AB1 (temps d'incubation 24 h)	133
Figure 3.35	Activité antimicrobienne par l'extrait du biosurfactant de la souche AB1.	134
Figure 3.36	Spectre d'IRATR de biosurfactant de la souche AB1.	137
Figure 3.37	Analyse LC-MS de biosurfactant de la souche AB1 (F7).	138
Figure 3.38	Effets de biosurfactant produit par la souche AB1 (Bio-AB1) et Tween 80 sur la solubilisation du naphtalène (100 mg.l ⁻¹) et du phénanthrène (100 mg.l ⁻¹) dans l'eau douce et l'eau de mer.	140
Figure 3.39	Spectre CG-SM de la remobilisation du pétrole (hydrocarbures) par le Bio-AB1.	141
Tableau 1.1	Biodégradation des HAP sous l'effet de biosurfactant.	58
Tableau 3.1	Croissance de trois souches sur différents hydrocarbures.	74
Tableau 3.2	Variation du pH et de la TS au cours de la dégradation du naphtalène par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7,2, 150 tr.min ⁻¹ et durée d'incubation de 0 à 12 jours).	84
Tableau 3.3	Variation du pH et de la TS au cours de la dégradation du phénanthrène par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7,2, 150 tr.min ⁻¹ et durée d'incubation de 0 à 12 jours).	91
Tableau 3.4	Temps de rétention (apparition /disparition) au cours de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l ⁻¹) par la souche AB1	96
Tableau 3.5	Etude comparative de la dégradation des HAP par les trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2).	98
Tableau 3.6	Longueurs d'onde d'absorption par l'UV-Vis pour les fractions acides et neutres de dégradation du naphtalène chez les trois souches comparées à la fraction simple.	103
Tableau 3.7	Longueurs d'onde d'absorption par l'UV-Vis pour les fractions acides et neutres de dégradation du phénanthrène chez les trois souches comparées à la fraction simple.	113
Tableau 3.8	Quantité minimale inhibitrice du Bio-AB1.	134

INTRODUCTION GENERALE

L'exploitation des gisements pétroliers (extraction, transport et consommation énergétique) entraînent des risques de pollution qui pouvant influencer l'équilibre écologique [1]. Ce type de pollution marine et terrestre qu'elle que soit intentionnelle ou accidentelle, petite ou grande, provoque des dommages et des répercussions énormes ayant des lourdes conséquences.

Parmi les produits pétroliers, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) occupent une place centrale au sein des préoccupations environnementales [1, 2]. La diversité des sources anthropogéniques et naturelles des HAP combinée avec le phénomène global du transport sont les principaux facteurs qui contribuent largement à leur distribution à travers le monde. Par voie de conséquence, la concentration des HAP dans l'environnement varie et dépend de la proximité des sites contaminés à la source de production, du niveau de développement industriel et les modes de transport des HAP [2, 3].

En Algérie, le raffinage et le transport du pétrole et ses dérivés *via* les navires de ballastage, comme ce fut le cas en 1989 par le pétrolier 'MAAS LUIS' et en 2003 par le navire italien 'VALBRUNA' [2], ainsi que les déversements des rejets industriels, sont encore cités comme les plus grands responsables de la pollution marine de la côte algérienne. Ceci peut influencer l'équilibre écologique et parfois engendrer une destruction totale ou partielle des écosystèmes aquatiques aussi bien marins que continentaux [1, 4].

De nombreuses stratégies ont été développées pour éliminer les hydrocarbures de l'environnement, y compris la volatilisation, la photooxydation, l'oxydation chimique, l'adsorption et la biodégradation [5]. Actuellement, la bioremédiation ainsi que le couplage physicochimique et biologique ont gagné l'acceptation comme des alternatives pour l'élimination de ces polluants [5, 6, 7]. En raison de leur coût relativement faible, les techniques biologiques ont reçu une attention considérable, [7, 8, 9].

Les microorganismes hydrocarbonoclastes (à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures), actuellement connus, appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*

[5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Par ailleurs, les streptomycètes possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour des applications en bioremédiation des sites contaminés par des polluants organiques [16]. Ils sont de bons producteurs des enzymes extracellulaires qui dégradent une large gamme de composés organiques complexes [6, 16, 17, 18, 19, 20] et de bons producteurs des agents tensioactifs (biosurfactants) [6, 16, 17, 18]. Cependant, peu de données sont disponibles sur les mécanismes et les métabolites de dégradation des HAP en utilisant ce groupe de microorganismes. A cet effet, la production de biosurfactants pourrait, donc, ouvrir de nouvelles perspectives pour mieux s'adapter aux usages environnemental et/ou industriel moins coûteux.

Ce travail de thèse s'est intégré dans le cadre des activités de recherche du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA, Bou-Ismaïl, Tipaza) et du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie). Il s'est intéressé plus spécifiquement au développement d'un procédé de biotraitement des sites contaminés par les hydrocarbures et le pétrole brut. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la capacité de trois souches de streptomycètes à dégrader les hydrocarbures et qui sont connues par leurs potentialités de production enzymatiques (peroxydases et protéases) [19, 20, 21] afin de les employer dans la bioremédiation des sites contaminés. Ces souches ont été isolées de sols de surface de la plaine de la Mitidja [22, 23].

En effet, cette présente étude concentre sur la dégradation du pétrole brut et des HAP (cas du naphthalène et du phénanthrène), l'étude des voies métaboliques de la dégradation de ces deux HAP modèles et la recherche d'éventuelle production de biosurfactants.

Le présent manuscrit s'organise en trois grandes parties :

La première partie est une approche bibliographique permettant de replacer les connaissances de bases et le contexte de l'étude. En effet, de nombreux points de la thématique des hydrocarbures, et plus particulièrement les HAP et leur biodégradabilité, ainsi que la production de biosurfactants ont été abordés aussi bien sur leur aspect fondamental qu'appliqué. Seront présentés dans la

deuxième partie les principaux matériel et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation. La troisième partie est consacrée aux résultats et discussions.

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

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 HYDROCARBURES AROMATIQUES

1.1.1 Introduction

Les hydrocarbures sont des composés organiques retrouvés de manière naturelle au sein de l'environnement (produits pétrolifères, dégradation de la matière organique, feux de forêts,...) ou par les activités anthropiques (raffinage du pétrole brut ou industries chimiques) [1, 2]. Malheureusement, ces composés s'accumulent dans les écosystèmes et génèrent des pollutions. La prise de conscience des problèmes posés par un environnement pollué par les hydrocarbures, notamment, au regard de leur impact sur la santé publique, les aquifères et la ressource en eau, a contribué à promouvoir l'étude des processus de biodégradation dans les différentes situations aérobies et anaérobies envisageables [1, 24, 25].

1.1.2 Pétrole

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

Le pétrole brut est un mélange très complexe de composés organiques dont la composition chimique varie énormément selon son origine géographique et géologique (figure1.1) [26, 27, 28].

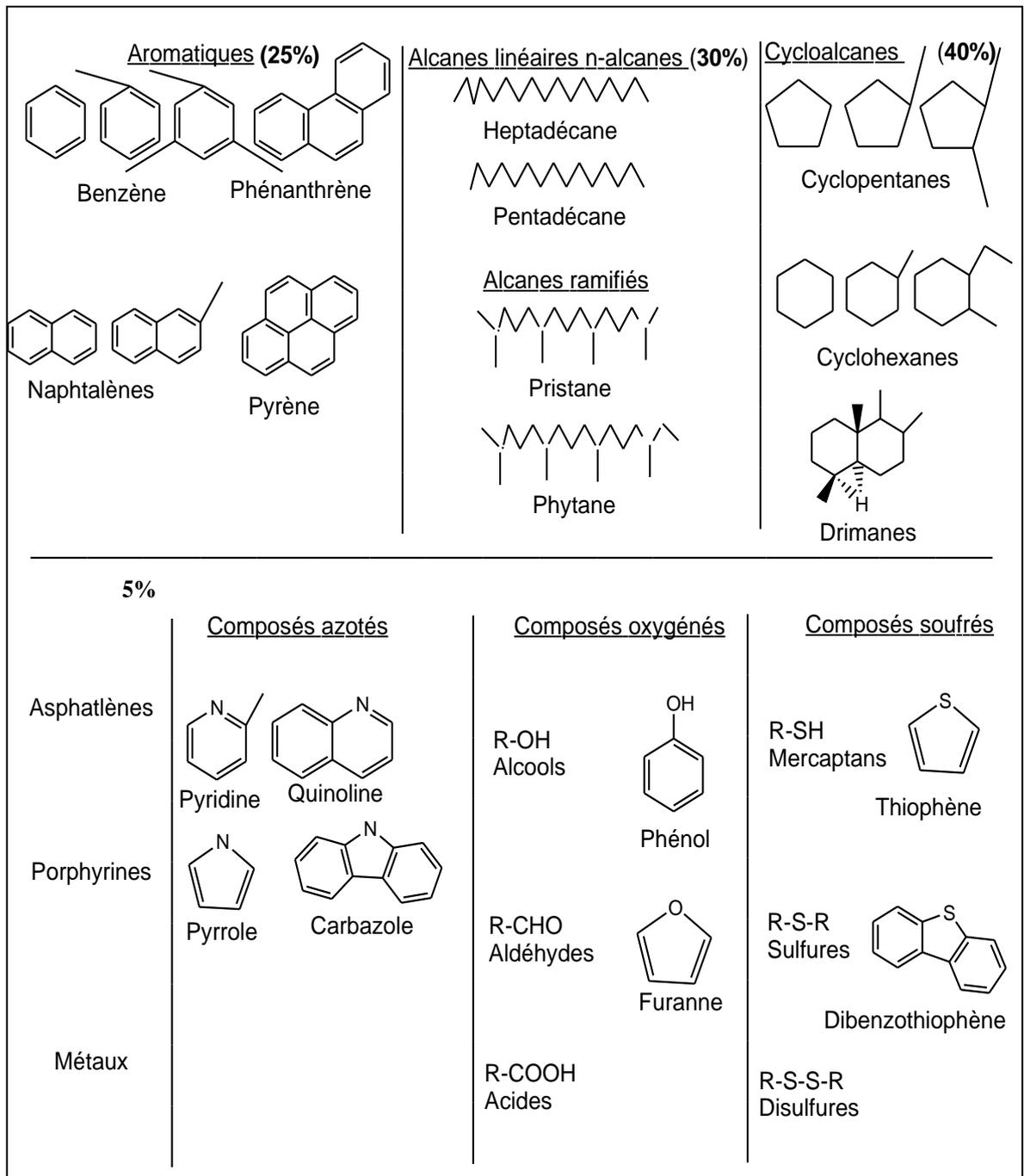


Figure 1.1 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts

[26, 27, 28].

1.1.3 Hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont séparés en deux groupes distincts: les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

1.1.3.1 Hydrocarbures aromatiques monocycliques

Les HAM sont des polluants ubiquistes dans l'environnement, tels que les BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène et *o*-, *m*- et *p*- Xylène) (figure 1.2). Ils se trouvent surtout dans l'essence et les carburants des avions et sont largement répandus dans les synthèses industrielles [27, 29, 30]. Les BTEX pénètrent fréquemment dans le sol, les sédiments et les eaux souterraines en raison de la fuite des réservoirs et les canalisations de stockage souterraines. Les BTEX sont cancérigènes et neurotoxiques et sont classés comme polluants prioritaires réglés par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (US-EPA) [30].

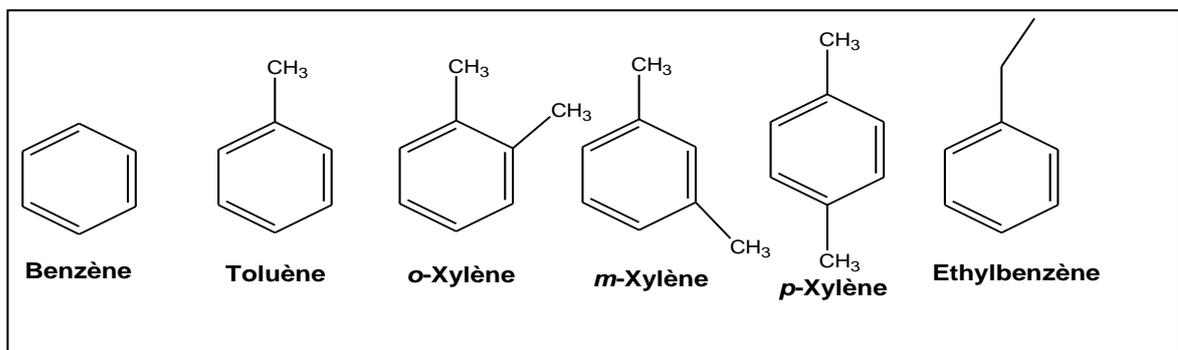


Figure 1.2 : Structure des hydrocarbures aromatiques monocycliques [30].

1.1.3.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

1.1.3.2.1 Structures et propriétés physicochimiques

Les HAP sont des composés organiques neutres apolaires, constitués au moins deux cycles aromatiques fusionnés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin [1, 31, 32].

Au sens strict, ils ne contiennent que des atomes de carbone et d'hydrogène. Cependant, certains composés aromatiques contenant du soufre, de l'azote ou de l'oxygène, leur sont parfois associés [1, 31].

Le nombre des HAP identifiés à ce jour est de l'ordre de 130. Parmi ceux-ci, 16 HAP qui sont classés comme polluants prioritaires par US-EPA [33, 34, 35].

Les structures des 16 HAP sont présentées dans la figure 1.3 ainsi que leurs propriétés physicochimiques (voir tableau 1 en APPENDICE B).

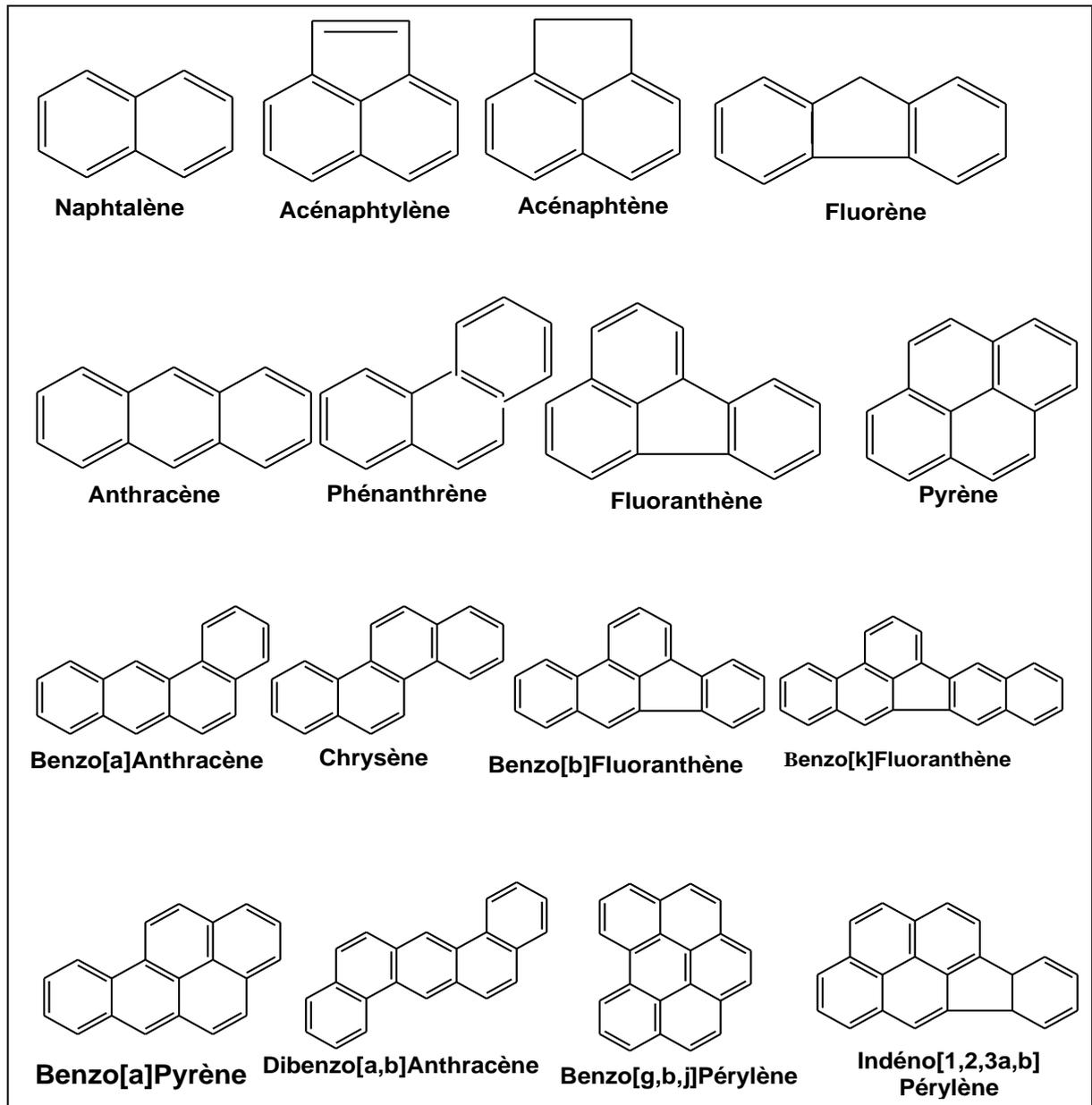


Figure 1.3 : Structure des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA [33, 34, 35].

1.1.3.2.2 Sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Actuellement, c'est l'origine pyrolytique (combustion incomplète de la matière organique) et anthropique qui est considérée comme la source majeure des HAP dans l'environnement, notamment à cause des émissions domestiques et industrielles [36, 37, 38]. En revanche, environ 230 000 tonnes de HAP d'origine anthropique atteignent l'environnement marin chaque année [39].

Les HAP proviennent de sources pétrolières et pyrolytiques :

- Les HAP anthropiques d'origine pétrolière (nommés HAP fossiles) correspondent aux HAP provenant des pétroles bruts et de ses produits

dérivés (essence, fioul, lubrifiant, bitume) obtenus par distillation dans les raffineries. Dans une acceptation plus large du terme d'origine pétrolière, nous incluons tous les HAP issus de matières organiques fossiles incluant ainsi le charbon qui est une matière organique [39].

- Les HAP pyrolytiques sont générés par des processus de combustion incomplète de la matière organique à haute température, avec une déficience en oxygène durant la combustion. Ces HAP de combustion sont émis dans l'atmosphère et engendrent une pollution qui diffuse dans l'atmosphère, des sédiments aquatiques et des sols [33, 38, 39].

1.1.3.2.3 Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement

La conjonction des diverses causes de pollution décrites dans les paragraphes précédents se traduit par une contamination étendue de l'hydrosphère par les HAP. Celle-ci résulte soit des rejets directs d'effluents domestiques et industriels pollués par ces composés, soit par les apports dus aux précipitations qui, par action conjointe du dépôt sur le sol et du ruissellement, transfèrent ces molécules de l'atmosphère vers les eaux superficielles continentales et marines [40].

Par suite de leur faible solubilité dans l'eau et de leur faible pression de vapeur, les HAP sont adsorbés par la matière organique particulaire et colloïdale et incorporés dans les sédiments dans lesquels ils peuvent s'accumuler pour donner de très fortes concentrations [41]. En 1997, une étude de LIPIATOU *et al.* [42], concernant la zone ouest de la Méditerranée, a estimé que 50% des HAP introduits dans cette zone finissent incorporés dans les sédiments côtiers (0-200 m de profondeur) et près de 13% dans les sédiments compris entre 1000 et 2000 m de profondeur. Les phénomènes de bioturbation, de resuspension et de diffusion les remettent ensuite en circulation dans les eaux marines. Ils peuvent être absorbés (ou ingérés) par les organismes dits «filtreurs» [41]. Ces composés passent ensuite dans les réseaux trophiques océaniques où ils présentent divers processus de bioaccumulation voire de bioamplification, surtout chez les invertébrés [40, 41]. Cependant, chez les vertébrés marins, les HAP ne

s'accumulent que faiblement dans les tissus, empêchant la bioamplification au niveau supérieur de la chaîne alimentaire [40, 41].

Bien que les HAP puissent être partiellement métabolisés par les animaux aquatiques, ils sont en grande partie rejetés dans les excréta et les matières fécales ou encore libérés par la décomposition des organismes morts et recyclés au niveau dans les sédiments [40, 41].

La connaissance des phénomènes de métabolisation et de détoxification chez les organismes marins est essentielle à la compréhension des effets toxiques et à leur prédiction. Dans le cas d'une pollution, il est nécessaire de distinguer les fractions de contaminant auxquelles les organismes sont exposés (biodisponibilité) et les fractions accumulées par ces mêmes organismes (bioaccumulation) [40, 41]. La figure 1.4 explique le devenir des HAP en milieu océanique.

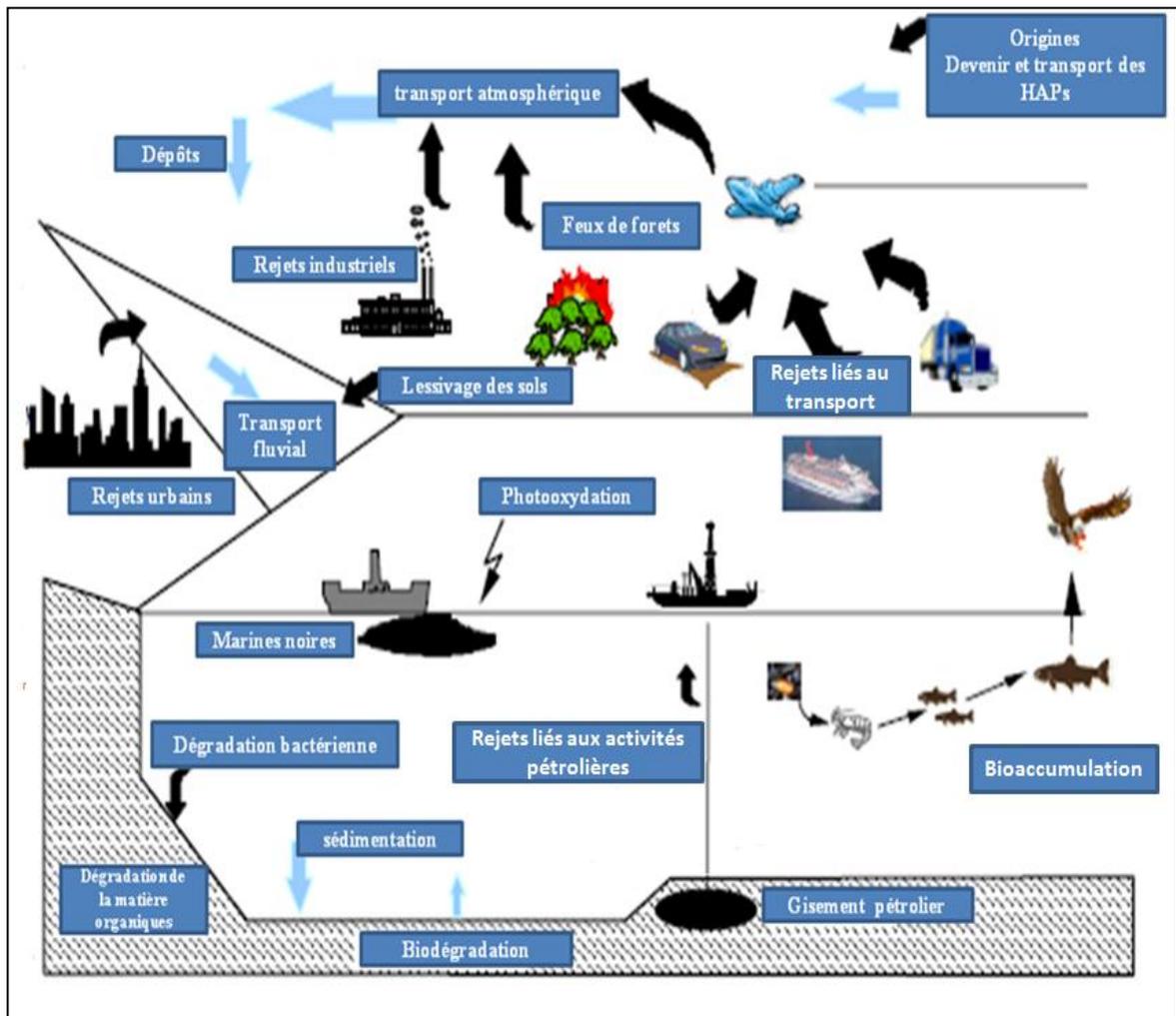
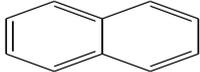
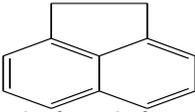
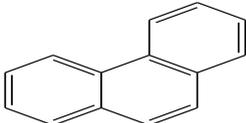
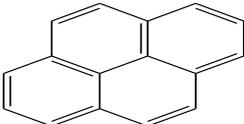
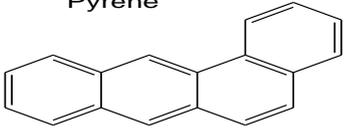


Figure 1.4 : Devenir des HAP en milieu océanique (milieu aquatique) [40].

1.1.3.2.4 Toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Actuellement, les effets toxicologiques de tous les HAP sont imparfaitement connus. Toutefois, 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 [1, 32].

La toxicité des HAP augmente également avec le nombre de cycles [43, 44], ce qui contribue à la persistance de ces composés dans l'environnement (figure 1.5).

HAP	Masses moléculaires (g.mol ⁻¹)	Génotoxicité
 Naphthalène	128,2	+ au test d'Ames (potentiel mutagène)
 Acénaphthène	154,2	+ au test d'Ames (potentiel mutagène)
 Anthracène	178,2	+ au test d'Ames (potentiel mutagène)
 Phénanthrène	178,2	+ au test d'Ames (potentiel mutagène)
 Pyrène	202,3	+ au test d'Ames (potentiel mutagène) Synthèse d'ADN atypique Echange de chromatides soeurs
 Benzo (a) anthracène	228,3	+ au test d'Ames (potentiel mutagène) Aberrations chromosomiques Echange de chromatides soeurs Cancérigène

↓ Toxicité

Figure 1.5 : Génotoxicité de certains HAP en fonction de leur masse moléculaire [44].

Dans les écosystèmes aquatiques, la pollution par les HAP conséquent toute perturbation à leur niveau peut avoir des répercussions sur les niveaux trophiques supérieurs [45].

La figure suivante (1.6) montre les différents impacts causés par les hydrocarbures et qui résultent au niveau des écosystèmes aquatiques (cas de faune).

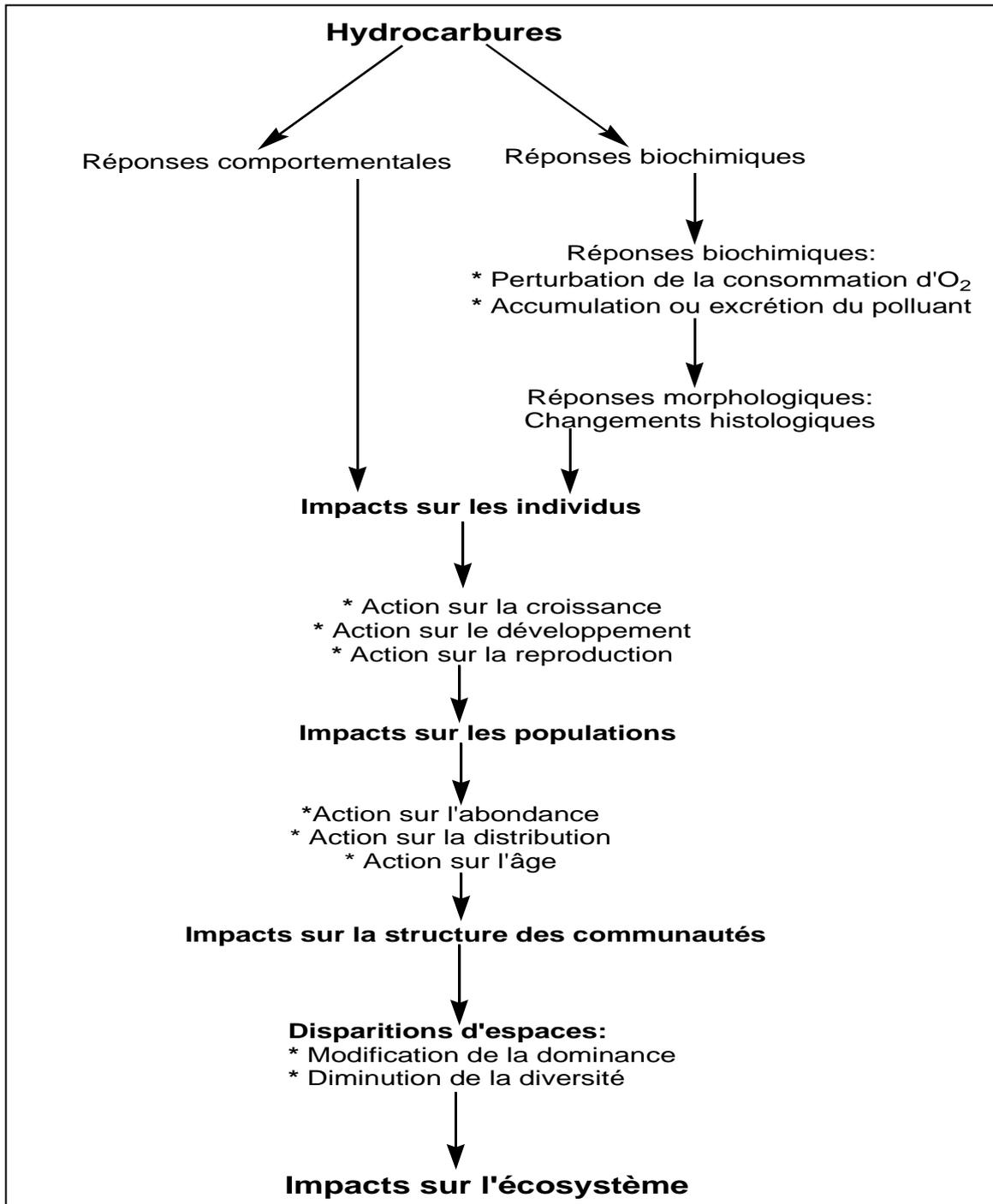


Figure 1.6 : Impacts des hydrocarbures sur l'écosystème aquatique [45].

1.1.3.2.5 Règlementation de la pollution par des HAP

Ces dernières années, une avancée considérable a été constatée dans le monde entier dans le domaine de la réglementation des pollutions, particulièrement, celles dues aux hydrocarbures. Ceci est dû essentiellement à l'émergence des préoccupations liées à l'environnement et au développement durable dans les différents pays.

Plus que 10 ans, l'Algérie adopte la loi 03-10 du 19 juillet 2003 relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable [46]. Cette loi vise à compléter les lois Algériennes déjà en vigueur dans le domaine de l'environnement, lesquelles incitent à la protection des eaux souterraines. Elle fixe un objectif ambitieux de bon état de la qualité des eaux en Algérie au futur. A titre d'exemple, l'article 51 de cette loi interdit tout déversement d'eaux polluées dans les eaux souterraines [46]. Dans le domaine de la pollution de l'environnement (sols, eau, air), les industriels sont soumis au **Principe de Pollueur/Payeur (PPP)**. Ce principe repose sur le fait que le pollueur devrait se voir amputer les dépenses relatives aux mesures arrêtées par les pouvoirs publics pour que l'environnement soit dans un état acceptable.

De plus, la loi 06-141 du 19 Avril 2006 fixe la valeur maximale de 10 mg.l^{-1} pour la somme de concentrations des hydrocarbures (hydrocarbures totaux) dans les rejets industriels [47].

1.1.4 Techniques de biodépollution des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les caractères ubiquistes et carcinogènes des HAP dans l'écosystème en font des objectifs les éliminer depuis plusieurs années. Il existe plusieurs procédés biologiques et physicochimiques pour éliminer ces composées afin de réduire leur impact sur les écosystèmes récepteurs.

Parmi les procédés physicochimiques les plus efficaces, on peut citer: Fenton, Ultrason et Ozonation, qui représentent une bonne alternative d'élimination des HAP en raison de leur possibilité de générer des radicaux hydroxyles OH° qui présentent un fort pouvoir oxydant [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54] par rapport aux autres méthodes physicochimiques comme la méthode thermique [26]. Mais leur limite réside aussi dans la potentielle production d'intermédiaires toxiques et même le coût est relativement élevé.

A cet effet, les méthodes biologiques représentent la performance environnementale du traitement d'une grande variété de composés organiques et inorganiques. Elles sont prouvées depuis déjà plusieurs années [26]. De plus, les coûts d'opérations du traitement biologique sont moins chers en comparaison avec ceux des processus physiques et chimiques.

Les méthodes biologiques les plus utilisées dans le traitement des polluants organiques (hydrocarbures) sont:

1.1.4.1 Phytoremédiation

Certaines plantes permettent de transformer (phytoremédiation) ou de stabiliser (phytostabilisation) les polluants dans les sols et dans les eaux. En effet, les racines de celles-ci sont étroitement associées à une microflore bactérienne et fongique qui va aider ou faciliter la dégradation des hydrocarbures [55, 56]. La phytoremédiation est restée longtemps essentiellement appliquée aux métaux lourds, mais des études actuelles ont montré que cette technique est utilisable pour les HAP [55, 56, 57].

1.1.4.2 Biodégradation

Dans la section 1.2, seront détaillées les connaissances bibliographiques sur la biodégradation et leurs voies métaboliques des HAP: notamment, le naphthalène et le phénanthrène qui sont les sujets de notre présente étude.

1.2 BIODEGRADATIONS DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

1.2.1 Introduction

La biodégradation des hydrocarbures, par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes, a été mise en évidence pour la première fois par ZOBELL en 1946 [55]. Les microorganismes procaryotes et eucaryotes ont la capacité enzymatique qui leur permet d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène (1 noyau) au benzo-(a)-pyrène (BaP) (5 noyaux) [4].

Les bactéries dégradatrices des HAP appartiennent aux principaux genres suivants : *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardioides*, *Mycobacterium* et *Flavobacterium*, [5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 58].

Parmi des centaines d'espèces de champignons lignolytiques ayant des capacités de dégrader les HAP : *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus* [44, 59]. La dégradation des HAP par les champignons filamenteux non lignolytiques a été fortement étudiée. Par exemple, des études ont pu mettre en évidence 13 souches de deuteromycètes, isolées du sol, capables de dégrader le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène [59, 60]. Ces capacités de biodégradation sont principalement dues à la sécrétion des enzymes extracellulaires comme les peroxydases [60].

Plusieurs travaux ont montré que les algues (les algues vertes et bleues) oxydent les HAP [11, 61, 62, 63]. Toutefois, WARSHAWSKY *et al.* [63] ont montré que *Selenastrum capricornutum* métabolise complètement le benzo[a]pyrène (BaP) en dihydrodiols tandis que les algues jaunes sont incapables de métaboliser les HAP.

Certains espèces d'actinomycètes ont la capacité de dégrader des HAP et d'améliorer leurs solubilité (molécules fortement hydrophobes), par la production de biosurfactants (formation de micelles), ou par la production de biofilms (matrices extracellulaires adhésives et protectrices) [12, 16, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]. C'est par exemple, le cas de *Nocardia* et de *Rhodococcus* qui sont capables de produire de biosurfactants améliorant fortement la solubilisation des

HAP [12, 16, 64, 65, 66, 67, 68]. Les streptomycètes sont connues en tant que productrices de biosurfactants que dégradatrices des HAP [12, 16, 68, 69, 70].

1.2.2 Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques

1.2.2.1 Dégradation anaérobies des HAP

La biodégradation anaérobie nécessite une activité biochimique spécifique afin de convertir les hydrocarbures apolaires en composés comportant des groupements fonctionnels (hydroxyle, carbonyle ou carboxyle) indispensables pour toute réaction d'oxydation ultérieure (figure 1.7) [73, 74].

La dégradation anaérobie des composés aromatiques se fait par l'enlèvement des chaînes aliphatiques latérales par les réactions suivantes: Les β -oxydations, les déshydroxylations réductrices et les transhydroxylations [75]. Par la suite, les intermédiaires centraux (le benzoyl-CoA, le résorcinol et le phloroglucinol) subissent l'attaque des enzymes réductases et les composés alicycliques qui en résultent sont oxydés à leur tour par les β -oxydations et clivés hydrolytiquement [75, 76, 77].

La figure 1.7 représente les mécanismes de la biodégradation anaérobie des composés aromatiques.

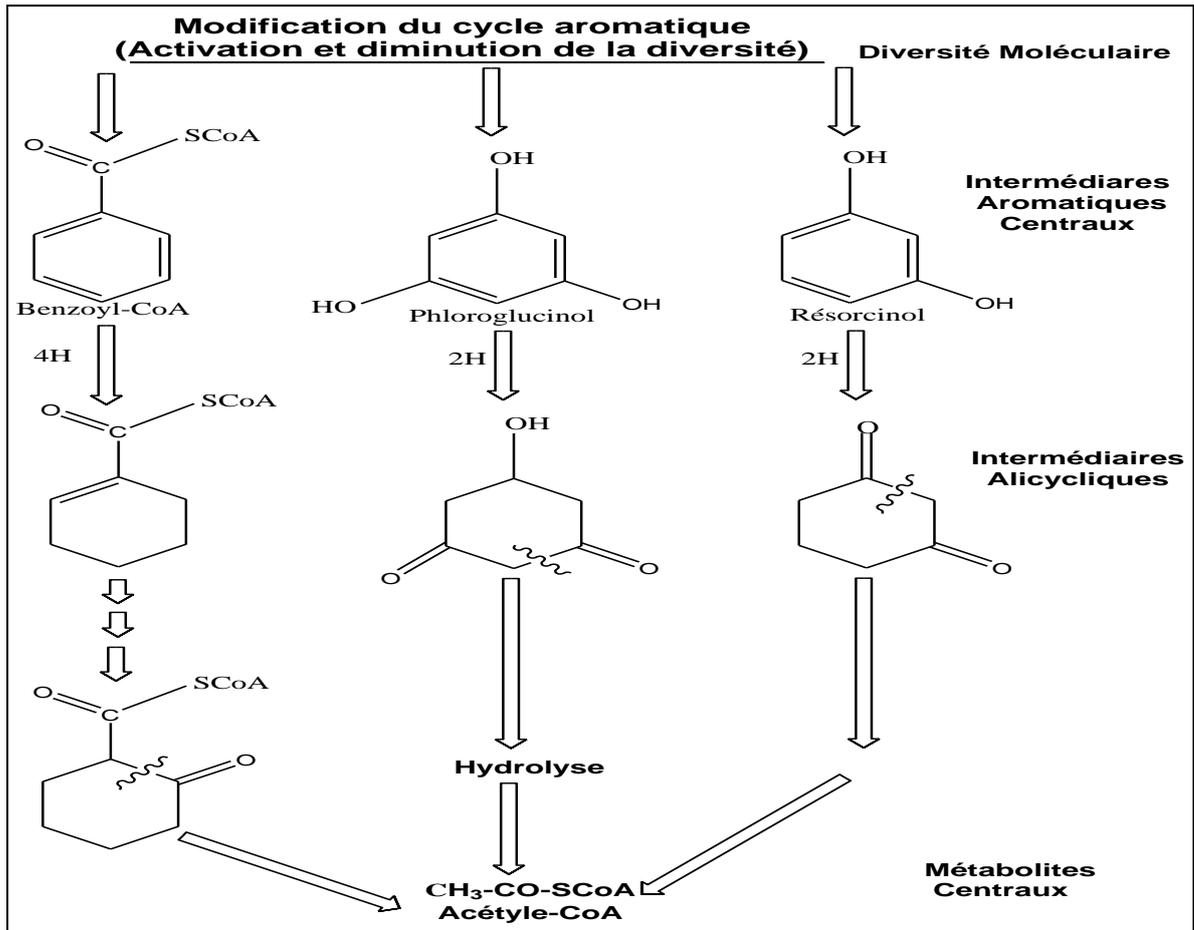


Figure 1.7 : Biodégradation des composés aromatiques et les métabolites sous action anaérobie [75].

1.2.2.2 Dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Il existe une grande diversité de voies métaboliques aérobies des HAP. Les principales enzymes d'attaque impliquent soit des dioxygénases, soit des monooxygénases, soit des ligninases et soit des peroxydases [1, 26] (figure 1.8).

La dégradation des HAP par les bactéries aérobies se fait par les mono ou dioxygénases extra ou intracellulaires [78, 79, 80]. Les HAP sont alors oxydés en *cis*-dihydrodiols par l'incorporation de deux atomes d'oxygène. Cette molécule est transformée en catéchol (noyau aromatique avec deux hydroxyles) par l'action d'une déshydrogénase. Ce catéchol peut alors être dégradé par clivage de cycle aromatique [39, 80].

Deux voies d'attaques ont été décrites pour les champignons, l'une s'effectue par des monooxygénases qui forment des époxydes (souvent des cytochromes P450), l'autre par des enzymes lignolytiques (généralement

extracellulaires). Chez les champignons non lignolytiques, l'attaque initiale des HAP, catalysées par une monooxygénase, se traduit par l'incorporation d'un atome d'oxygène dans un cycle aromatique du HAP, qui forme alors une arène oxyde [39, 80]. Ce mécanisme est le même que celui utilisé par les organismes supérieurs pour la détoxification des molécules aromatiques [1, 26, 39, 80]. Les champignons lignolytiques possèdent quant à eux des cytochromes P450 qui leur permettent de dégrader des HAP en formant notamment des *trans*-dihydrodiols. Cependant, ils produisent également, dans certaines conditions de culture, des enzymes extracellulaires: les lignines peroxydases (ou ligninases), et les peroxydases manganèse dépendantes (produit par les actinomycètes et les champignons). Ces enzymes ont un rôle principal de dégrader la matière organique, et plus particulièrement de la lignine. Egalement, ces enzymes (très peu spécifiques), permettent, outre l'oxydation de la lignine, celle des HAP et d'autres composés organiques comme les phénols [12, 16, 26] et les acides humiques [19, 20, 21, 22, 23, 79].

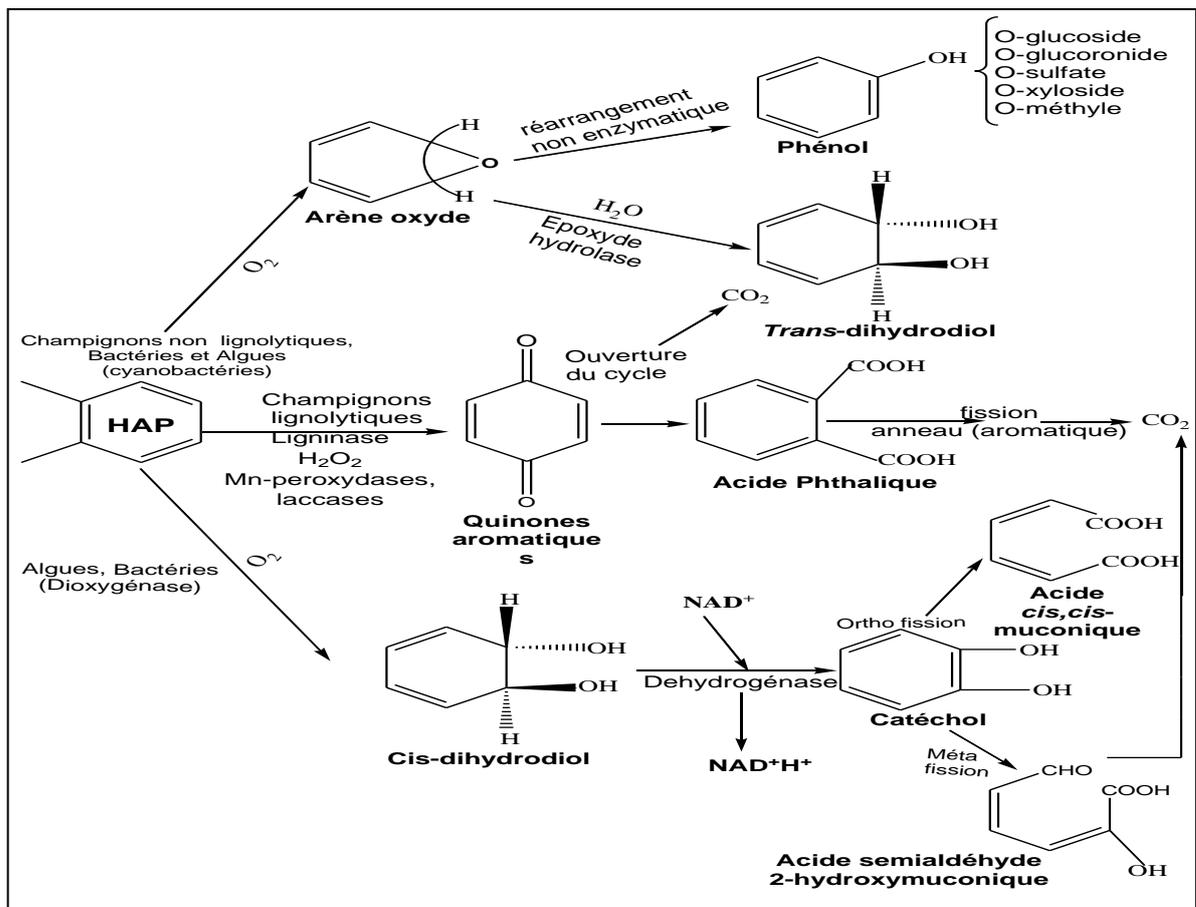


Figure 1. 8 : Stratégie générale de la biodégradation des composés aromatiques et les métabolites sous une action aérobie [1, 26, 39, 80].

Certains microorganismes sont capables de dégrader les HAP en ouvrant les cycles aromatiques après un processus d'oxydation. La totalité des noyaux benzéniques d'un HAP peut être ouverte et on parlera alors de minéralisation ou dégradation complète de l'HAP. Dans ce cas, la molécule initiale est entièrement dégradée et tout le carbone est transformé en CO_2 . Dans d'autres cas, les caractéristiques de milieu (pH, température, salinité, ...) et des HAP font que la biomasse microbienne ne parvient pas à ouvrir tous les noyaux benzéniques et les HAP restent alors dans une forme oxydée intermédiaire. Ces formes fonctionnalisées (catéchol, phénol, acide phthalique, quinone) grâce à l'insertion de molécules d'oxygène ont un comportement très différent de leur molécule mère et peuvent se lier à la matière organique de l'environnement en formant avec elle des liaisons covalentes (ester, éther ou carbone-carbone). On parle alors de dégradation incomplète des HAP et formation de résidus liés [81, 82]. La liaison des HAP fonctionnalisés à la matière organique du sol est représentée sur la figure 1.9, ces molécules métabolisées et liées chimiquement ne sont plus considérées comme étant des HAP car n'étant plus susceptibles de revenir à leur état initial. Lors de la dégradation incomplète des HAP, leur fonctionnalisation par l'insertion dans leur structure de molécules d'oxygène induit une liaison facilitée des HAP avec la matière organique du sol (notamment les acides humiques).

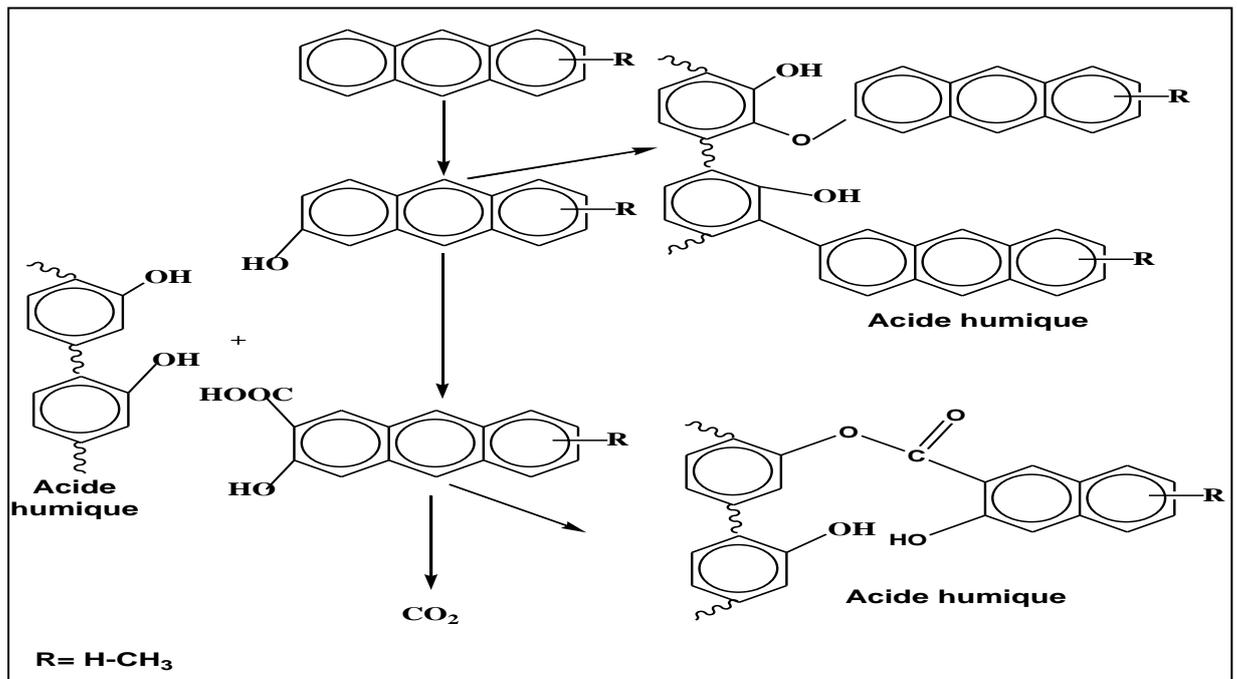


Figure 1.9 : Formation de résidus liés après dégradation incomplète des HAP [81, 82].

Certains paramètres sont susceptibles de faire varier l'intensité de la biodégradation ainsi que la proportion des HAP transformés en résidus liés par rapport aux HAP totalement dégradés. Tout d'abord, les HAP à hauts poids moléculaires sont plus résistants à la biodégradation que les hydrocarbures aromatiques légers [81]. De plus, la formation de résidus liés diminue avec l'augmentation du temps de contact entre les microorganismes et les HAP [81, 82]. Enfin, l'activité biologique de la dégradation dépend en général des paramètres abiotiques de milieu de dégradation (pH, O₂, température,...) [82].

1.2.3 Voies métaboliques de dégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Dans le cas idéal d'une minéralisation totale, les produits finaux sont de l'eau et du CO₂. Or lors de la biodégradation des HAP de nombreux composés, qu'ils soient intermédiaires ou finaux, peuvent être générés. De nombreuses études traitent des voies de dégradation des HAP par différents microorganismes, avec l'identification de métabolites et d'intermédiaires de réaction (quelques exemples, concernant le naphthalène et le phénanthrène sont décrits ci-dessous).

1.2.3.1 Naphtalène

Plusieurs mécanismes de la biodégradation du naphthalène (deux cycles aromatiques) ont été rapportés par plusieurs chercheurs [1, 29, 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89]. La figure 1.10 représente les différents mécanismes aérobie de la biodégradation du naphthalène.

L'étape initiale de la dégradation du naphthalène (1) par les bactéries aérobioses est réalisée par naphthalène 1, 2- dioxygénase (a) pour former le *cis*-1, 2-naphthalène dihydrodiol (2). Le 1 -naphthole (3) et le 2-naphtole (4) seront formés par des enzymes non identifiés. Le *cis*-1,2-naphthalène dihydrodiol (2) est ensuite oxydé par une *cis*-1,2-dihydrodiol déhydrogénase (b) en 1,2-dihydroxynaphthalène (5). Une nouvelle réaction d'oxygénation par 1,2-dihydronephthalène dioxygénase (c) dite *méta* ouvre alors le cycle aromatique dihydroxyle en formant le 2-hydroxychromène-2-carboxylate (6) et l'acide *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate (8) par l'enzyme 2-hydroxy-chromène-2-carboxylate isomère (d). Le 2-hydroxychromène-2-carboxylate (6) sera transformé en coumarin (chromen-2-one) (9) en suite vers 2-acide carboxycinnamique (7).

Une réaction non connue par un enzyme permet d'ouvrir le cycle aromatique du 1,2-dihydroxynaphtalène (5) aux 2-acide carboxycinnamique (7) ou acide *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate (8). L'acide *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate (8) va former directement le 2-carboxybenzaldéhyde (10) sous l'action de l'enzyme 2-hydroxy-chromène-2-carboxylate isomère (e).

L'enzyme *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate hydratase-aldolase (f) permet de former le salicylaldéhyde (11) qui sera transformé en acide salicylique (12) sous l'effet de l'enzyme salicylaldéhyde déshydrogénase (g). Enfin, l'acide salicylique (12) est converti en catéchol (13) par l'enzyme salicylate hydroxylase (f). Ainsi que, le salicylaldéhyde (11) et l'acide salicylique (12) seront transformés l'acide gentisique (14) par les enzymes gentisate 1, 2-dioxygénase (i) et salicylate 5- hydroxylase (j). De plus, la biodégradation du naphtalène (1) donnera soit directement le 1,2-naphtoquinone (15) après la transformation le 1, 2-dihydroxynaphtalène (5).

Le catéchol (13) sera formé soit par la transformation successive du naphtalène (1) en: 1,2-dihydroxynaphtalène (5) et 2-acide carboxycinnamique (7). Finalement, le catéchol va donner les dérivés portant le coenzyme.

Le 1,2-dihydroxynaphtalène (5) sera transformé successivement aux acide *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate (8), 2-acide hydroxycinnamique (16), acide cinnamique (17), en suite à l'acide benzoïque (18). Un autre mécanisme de la biodégradation du 1, 2-dihydroxynaphtalène (5) forme le acide *trans*-o-hydroxybenzylidène pyruvate (8) en suite sera transformé en 2-carboxybenzaldéhyde (10) et en acide phtalique (19), ce dernier sera métabolisé vers le 3, 4-dihydrodiol de l'acide phtalique (20), le 3, 4 -dihydroxy d'acide phtalique (21) et l'acide gentisique (14) sous l'action d'enzymes 2-carboxybenzaldéhyde déshydrogénase (k) et phthalate dioxygénase (l).

Remarque : Les flèches double et sans lettres peuvent représenter une ou plusieurs étapes enzymatiques inconnues, les métabolites représentés ayant été les plus détectés et enregistrés par les chercheurs.

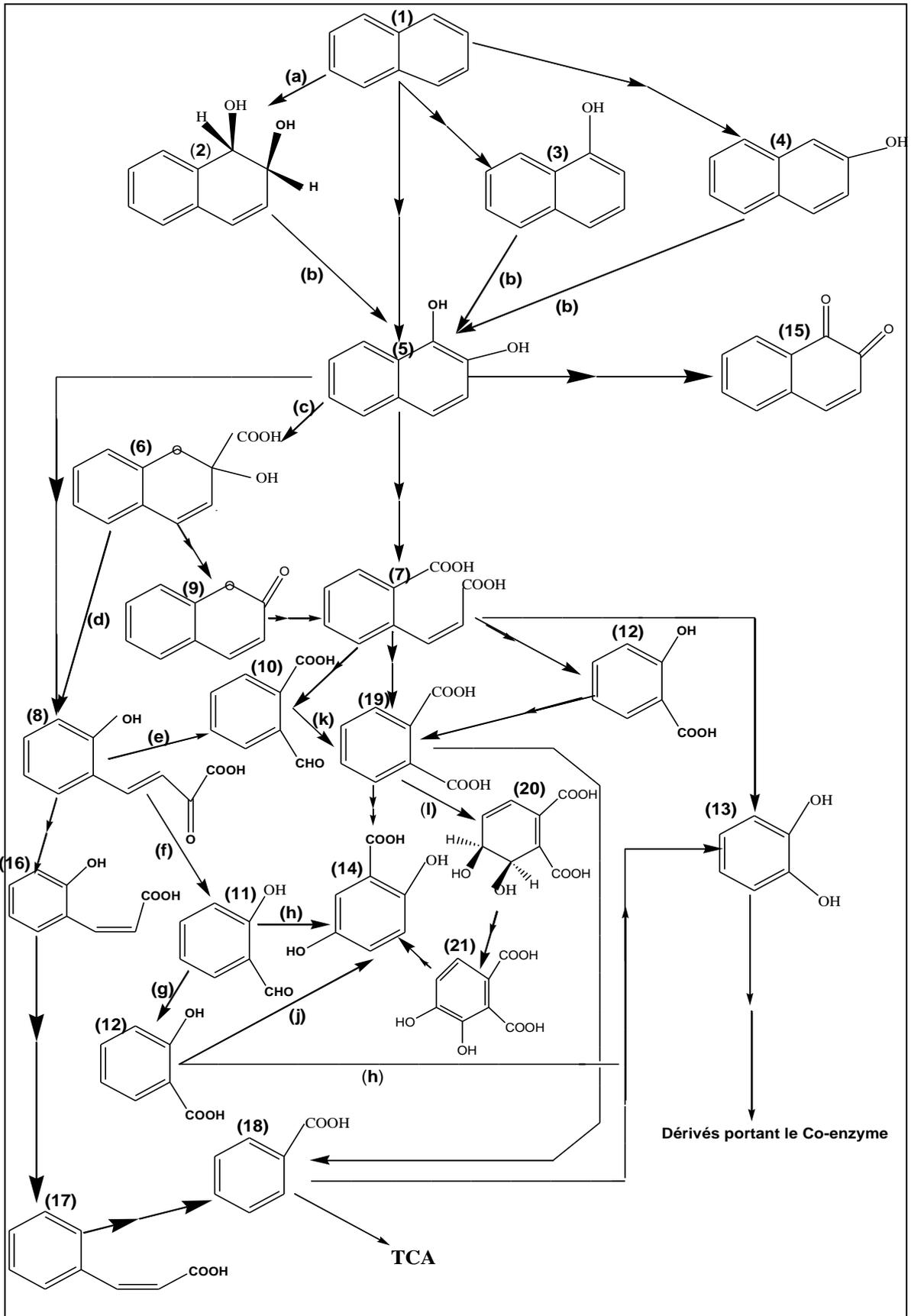


Figure 1.10 : Synthèse des voies métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie du naphthalène.

1.2.3.2 Phénanthrène

Plusieurs voies de dégradation microbiennes aérobies du phénanthrène (trois cycles aromatiques) ont été mises en évidence [86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101] (figure 1.11).

Une dioxygénase (**a**) initiale catalyse le phénanthrène (**1**) tout d'abord une attaque majoritairement effectuée en position 3 et 4, entraînant la formation du *cis*-3, 4-phénanthrène dihydrodiol (**2**). Ce dernier est converti 3, 4-dihydroxyphénanthrène (**3**) via l'action d'une déshydrogénase (**b**). Ce composé va ensuite être clivé en position *méta* pour former un acide *trans* - 4-(1-hydroxynaph-2-yl)-2-oxobut-3-énoïque (**4**) via l'action d'une dioxygénase et d'une isomérase (**c**). Enfin, grâce à l'action d'une hydratase-aldolase (**d**) et d'un aldéhyde déshydrogénase (**e**), l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque (**7**) va être formé. Ce composé est le point de départ de deux voies:

- L'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque (**7**) sera transformé en 1, 2-dihydroxynaphtalène (**8**) à l'aide d'un salicylate oxygénase (**f**). La molécule ainsi obtenue subit ensuite la même voie de dégradation décrite pour le naphthalène (figure 1.10).
- La formation de l'acide phtalique (**11**) nécessite trois étapes enzymatiques réalisées successivement par une 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygénase (**g**), une *trans*-2-carboxybenzalpyruvate aldolase (**h**) et une 2-carboxybenzaldéhyde déshydrogénase (**i**). Ces enzymes permettent la transformation successive de 1 -hydroxy-2-naphthoate (**7**), de *trans*-o-carboxybenzylidène puruvate (**9**), et de 2 -carboxybenzaldéhyde (**10**).

Le salicylaldéhyde (**27**) a été produit par une dégradation successive du phénanthrène (**1**) vers *cis* -1, 2-phénanthrène dihydrodiol (**12**), 1, 2-dihydroxyphénanthrène (**13**), 3-hydroxy-3H-benzo-chromène-3-carboxylate (**14**), *cis*-4-(2-hydroxynap-1-yl)-2-oxobut-3-énoate (**15**), acide 2-hydroxy-1-naphthoïque (**17**), et *trans*-2, 3-dioxo-5-(2-hydroxyphényle)-pent-4-énoate (**26**) sous l'effets des enzymes: *cis*-3,4-dihydroxy-3,4-dihydro- phénanthrène déhydrogénase (**j**), 3,4-dihydroxy-phénanthrène dioxygénase (**k**), isomérase (**l**) et hydratase-aldolase (**m**). Sur la même voie le 1, 2-dihydroxyphénanthrène (**13**) sera

transformé vers 1-(2-carboxy-vinyl)-naphtalène-2-carboxylate (**23**) ensuite vers naphtalène 1, 2-carboxylate (**25**).

Enfin, le phénanthrène capable de se transformer vers le cis-9, 10-phénanthrène dihydrodiol (**20**), le 9, 10-dihydroxyphénanthrène (**21**) et l'acide 2, 2-diphénique (**22**) sous l'action deux enzymes (dioxygénase et déhydrogénase).

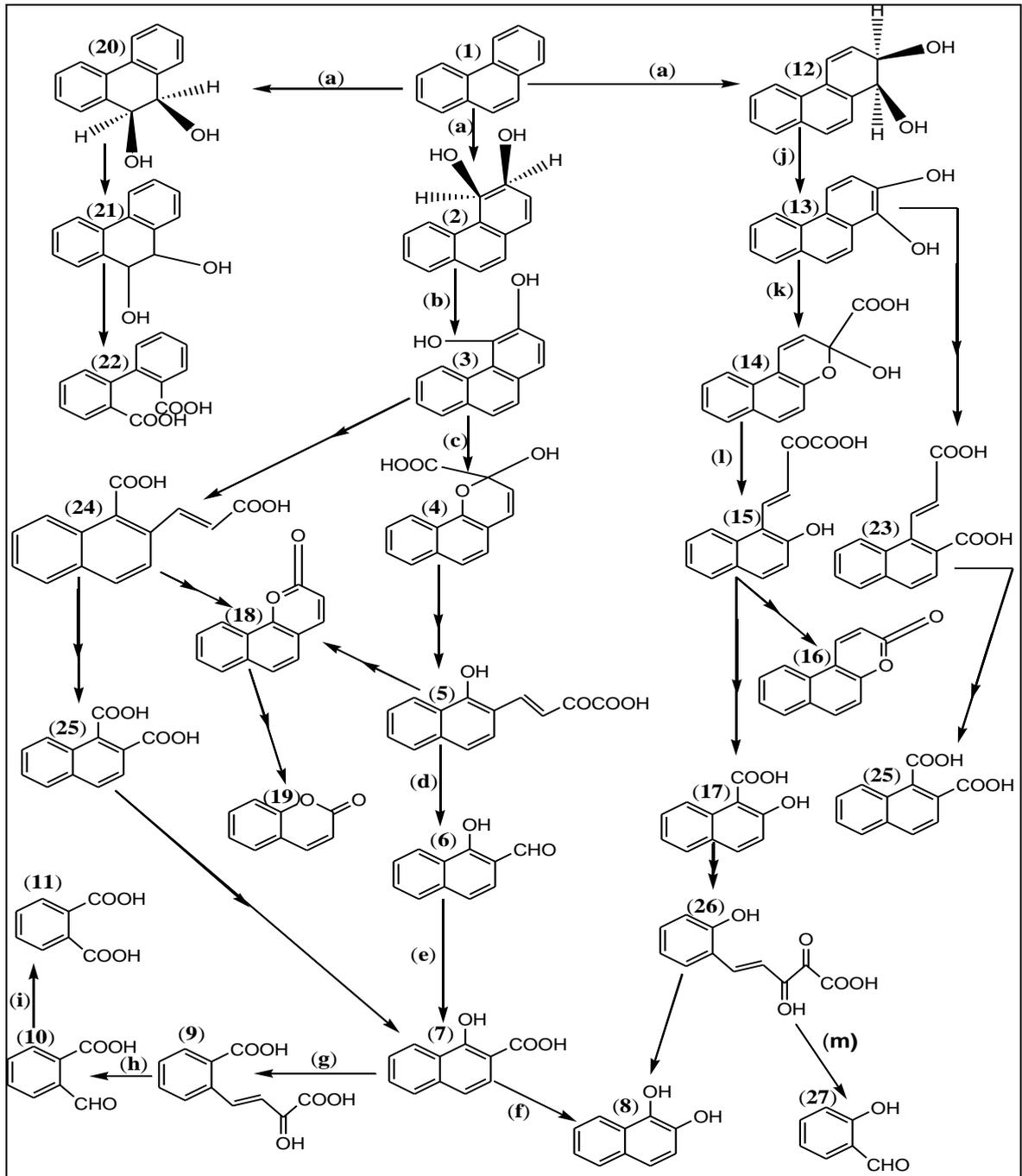


Figure 1.11 : Synthèse des voies métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie du phénanthrène.

1.2.4 Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques

L'efficacité de la biodégradation des HAP dépend de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, qui devront être pris en compte lors de processus de la biodégradation des HAP [102].

1.2.4.1 Facteurs abiotiques

1.2.4.1.1 Température

La température est le facteur le plus important qui influe sur l'activité et la capacité de l'espèce microbienne présente dans l'environnement ainsi que sur l'état physique des HAP. La biodégradation des hydrocarbures peut se faire dans une large gamme de températures, par trois sortes de microorganismes: psychrotrophes, mésophiles et thermophiles [103].

IQBAL *et al.* [103] ont étudié l'influence de la température sur la dégradation des HAP lors de la bioremédiation d'un sol contaminé par le diesel. Une température de 42 °C a augmenté le taux de la bioremédiation de 19% par rapport à 21 °C.

Bien que la plupart des bactéries thermophiles dégradent les HAP, RÖLING *et al.* [104] ont mentionné une inhibition totale de la dégradation des HAP au delà de 80 °C par les bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermodesulfobacterium*) et d'Archae hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*).

1.2.4.1.2 pH

Le pH influe directement sur l'activité des microorganismes et sur la solubilité des HAP. BERTHELIN *et al.* [105] ont signalé que la plupart des microorganismes du sol croissent à des pH compris entre 5 et 9. La croissance des microorganismes étant favorisée par un pH proche de la neutralité, LEAHY et COLWELL [106] ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. De même, KÄSTNER *et al.* [107] ont étudié l'influence du pH sur la dégradation des HAP par *Sphingomonas paucimobilis*. Ils ont remarqué que la dégradation du phénanthrène est 10 fois

plus importante après le passage de pH 5,2 à 7. Par contre, ZHAO *et al.* [13] ont montré que la souche *Pseudomonas stutzeri* ZP2 dégrade 96% du phénanthrène (200 mg.l⁻¹) pendant 6 jours à pH optimum égal à 8.

1.2.4.1.3 Oxygène

L'étape initiale du catabolisme des HAP par les bactéries inclut l'oxydation par l'enzyme oxygénase, d'où l'oxygène est un paramètre limitant de la dégradation des HAP par les bactéries aérobies [108, 26]. La disponibilité de l'oxygène dans l'environnement des microorganismes dépend de plusieurs paramètres (type des microorganismes et type de sol).

1.2.4.1.4 Salinité

Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation des hydrocarbures [1]. Des concentrations en sel plus de deux fois de la salinité des eaux de mer diminuent le taux de dégradation (la salinité moyenne des milieux océaniques est située entre 33 à 37‰) [26, 110]. WARD et BROCK [110] ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4‰, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes. DE.CARVALHO et FONSECA [111] ont examiné la dégradation des hydrocarbures (n-C₅ à n-C₁₆) par *Rhodococcus erythropolis* DCL14 en présence de 1, 2 et 2.5% (p : v) de NaCl. Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la concentration de NaCl a un effet négatif sur la croissance bactérienne.

1.2.4.1.5 Source du carbone

Plusieurs chercheurs ont montré que la biodégradabilité d'un HAP est inversement proportionnelle au nombre de cycles [29, 44, 112]. Celle est directement reliée aux propriétés physicochimiques des HAP (notamment la solubilité). La solubilité des HAP peut être améliorée par ajouts de tensioactifs (chimiques ou biologiques), dont les microorganismes développent leur stratégie de la biodégradation des HAP par la production de biosurfactants (voire section 1.3) [113, 114].

Aussi, la biodégradabilité des HAP est fonction de leur concentration et leur répartition sur le site contaminé. PATEL *et al.* [112] ont étudié la biodégradation du phénanthrène à différentes concentrations (300 à 1500 mg.l⁻¹) par un consortium bactérien. Ils ont montré que la dégradation de phénanthrène par ce consortium augmente avec l'augmentation de la concentration du phénanthrène. Cependant d'autres chercheurs ont montré qu'à partir d'une certaine concentration, les HAP peuvent devenir toxiques pour les microorganismes.

1.2.4.1.6 Humidité

De manière générale, la présence de l'eau dans le sol en quantité suffisante permet une activité microbienne optimale (échanges biochimiques). Toutefois, en quantité trop importante, elle devient un facteur limitant (empêche la diffusion de l'oxygène) [104]. VIÑAS *et al.* [113] ont étudié la bioremédiation d'un sol sec contaminé par le crésote, aucune diminution des teneurs en contaminants alors que pour un sol humidifié à 40%, la diminution des teneurs en hydrocarbures totaux atteint 87% au bout de 200 jours d'incubation. En cas de la dessiccation, il sera nécessaire de réhumidifier le milieu de la biodégradation.

1.2.4.1.7 Éléments nutritifs

Les nutriments notamment l'azote et le phosphore sont importants et peuvent devenir des facteurs limitants pour la biodégradation des HAP [1, 29]. CARMICHAEL et PFAENDER [114] et MCMILLEN *et al.* [115] ont rapporté que le ratio C/N est optimal pour des valeurs comprises entre 2 et 200. Signalons enfin que d'autres nutriments sont nécessaires au métabolisme bactérien: le potassium, le magnésium, le calcium, le soufre, le sodium, le manganèse, le fer et les métaux de traces.

1.2.4.2 Facteurs biotiques

Les microorganismes responsables de la dégradation des HAP dans l'environnement sont principalement les bactéries et les champignons [1, 4, 11, 29, 116]. La dégradation des HAP est souvent améliorée en présence de consortium bactérien par rapport à l'activité d'une seule espèce. Ainsi, la dégradation d'un composé par une souche ou une espèce peut entraîner la formation de métabolites pouvant eux-mêmes être dégradés par une autre [116].

De plus, PATEL *et al.* [112] ont montré que l'efficacité de la biodégradation du naphthalène (1000 mg.l^{-1}) est 100% par consortium bactérien au bout de 48 h.

Signalons enfin que l'association (co-culture) des microorganismes (bactéries, champignons et microalgues) peut être bénéfique pour la bioremédiation: les microalgues fournissent l'oxygène (photosynthèse) qui est utilisé par les bactéries pour l'oxydation des hydrocarbures. Les champignons excrètent des enzymes extracellulaires (comme peroxydases) capables de dégrader les HAP à grosse taille (comme fluoranthène) vers des métabolites intermédiaires (comme 8- et 9-hydroxyfluoranthène *trans*-2,3-dihydrodiols). Ces métabolites traversent facilement la membrane cellulaire de la bactérie [1, 29, 117].

1.3 BIOSURFACTANTS ET APPLICATIONS

1.3.1 Introduction

Les tensioactifs (surfactants) sont des molécules capables de réduire la tension interfaciale entre deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau [118, 119]. Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants. Les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [120, 121]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants (les tensioactifs biologiques ou biosurfactants). Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces. Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles à surfaces actives et produites par des cellules vivantes. Ils s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface [122]. Les biosurfactants sont constitués d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (figure 1.12).

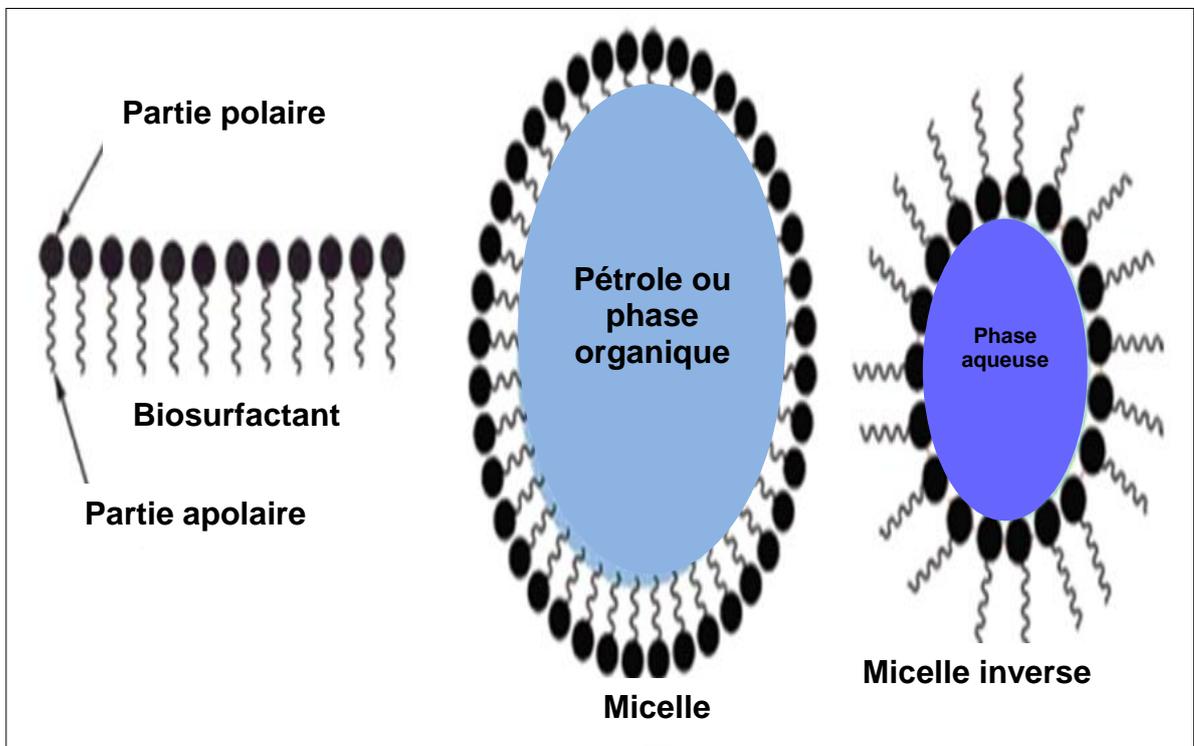


Figure 1.12 : Différentes formes de disposition de biosurfactants [123].

1.3.2 Classification de biosurfactants

La classification des biosurfactants est généralement basée sur la nature chimique de leurs constituants hydrophobes et hydrophiles. On distingue les grandes classes de biosurfactants: les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides, les lipopolysaccharides et les polymères [124].

1.3.2.1 Glycolipides

Les glycolipides sont les biosurfactants les plus connus. Ils sont formés d'hydrates de carbone en combinaison avec des acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides hydroxyaliphatiques. Parmi les glycolipides, les plus connus sont :

1.3.2.1.1 Les Rhamnolipides : sont les glycolipides les mieux étudiés, dans lesquels une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules des β -hydroxydécanoïque, alors que le groupement OH de l'un des acides est lié à la portion glycosidique. Le groupement OH du deuxième acide entre dans la formation d'un ester [124, 125]. Le rhamnolipide représenté ci-dessous (figure 1.13) est produit par *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [125].

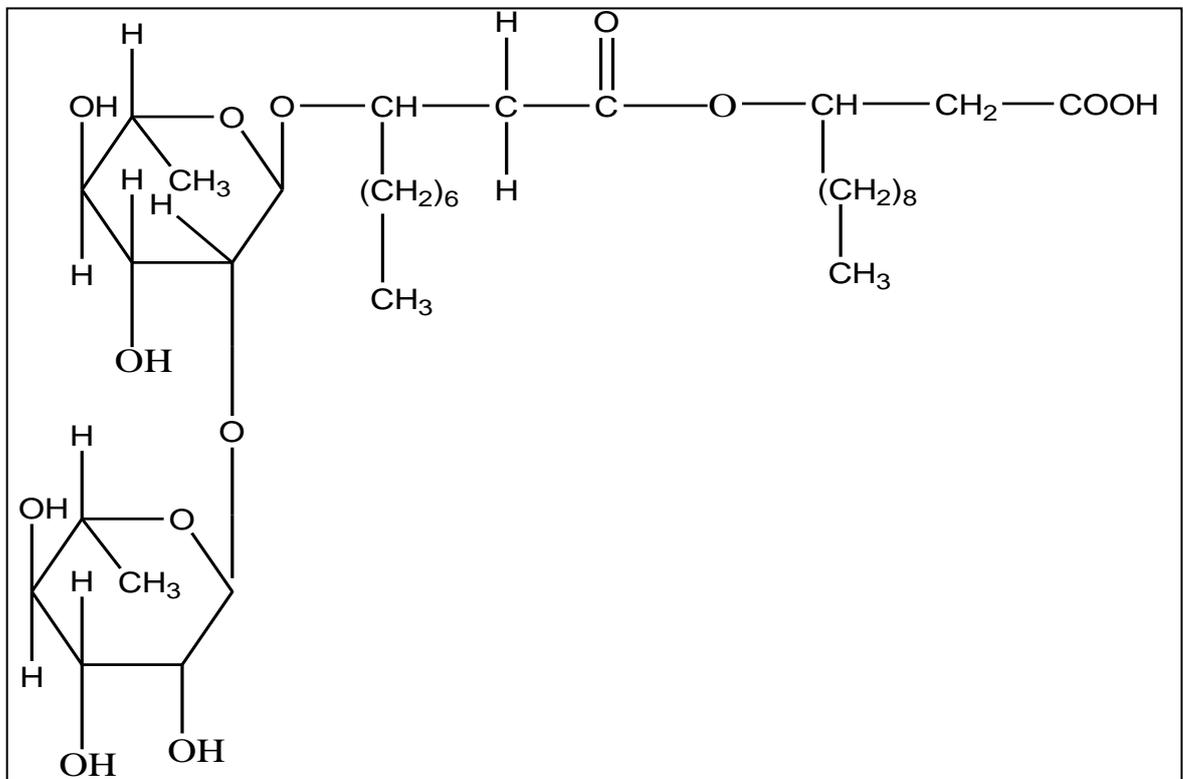


Figure 1.13 : Structure du rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [125].

1.3.2.1.2 Les trehalolipides : sont composés par le trehalose, disaccharide lié avec le carbone (C5) et le carbone (C5'), ce type de biosurfactant produit dans la plupart des cas par les espèces de genres *Rhodococcus*, *Nocardia* et *Corynebacterium* [126].

1.3.2.1.3 Les sophorolipides : produits principalement par des levures telles que *Torulopsis bombicola* et *Torulopsis apicola*. Ce type de biosurfactant est composé d'un dimère sophorose glucide lié à une longue chaîne hydroxyle d'acides gras par une liaison glycosidique [127].

La figure 1.14 représente les structures de deux biosurfactants: trehalolipides et sophorolipides.

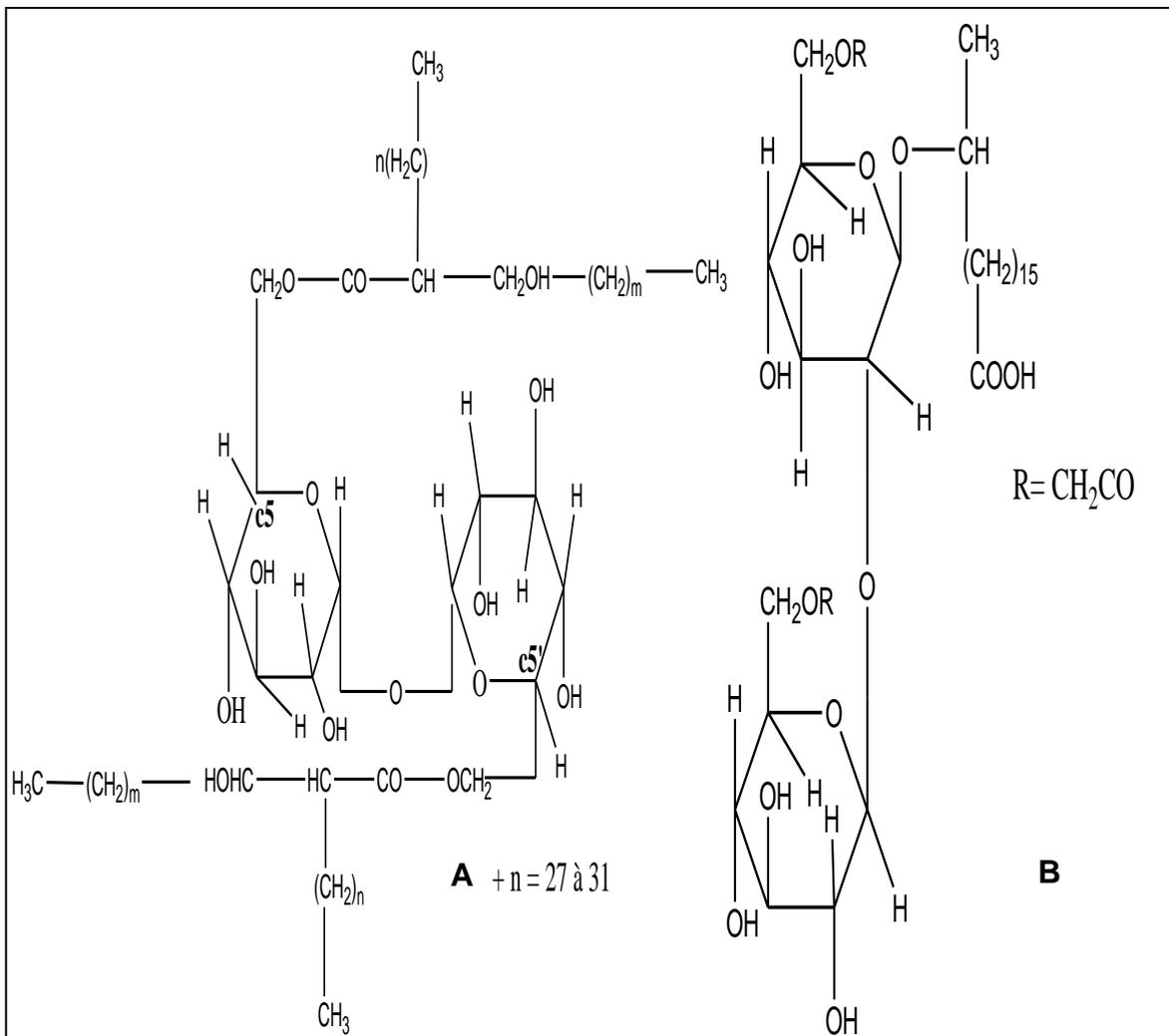


Figure 1.14 : Structures de deux types de biosurfactants : (A) Trehalolipide produit par *Rhodococcus erythropolis* [126] et (B) Sophorolipide produit par *Torulopsis bombicola* [127].

1.3.2.2 Lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides et les lipoprotéines sont généralement produits par les microorganismes sécréteurs des antibiotiques. Le biosurfactant le plus connu est la surfactine.

La surfactine, produite par *Bacillus subtilis*, est un lipopeptide cyclique composé de sept acides aminés relié à un acide gras par un lien lactane (figure 1.15) [128].

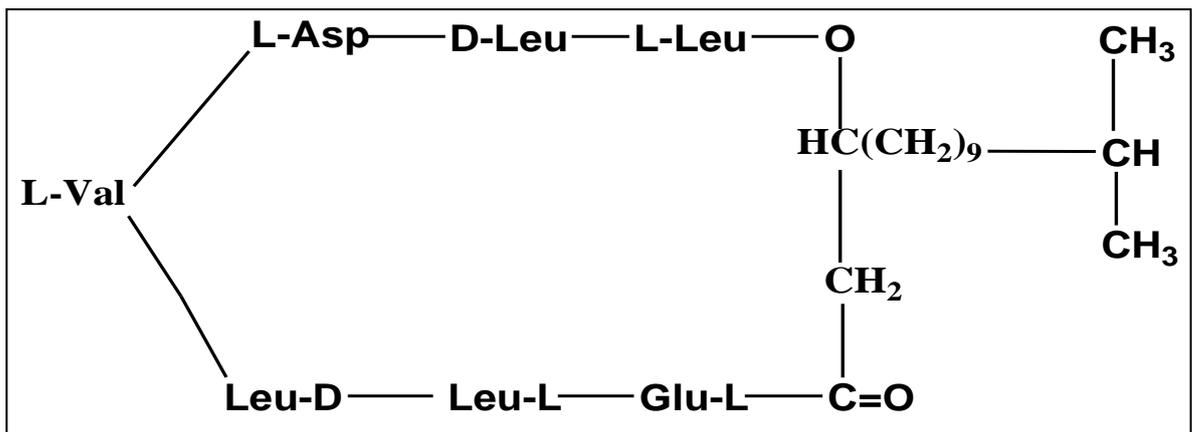


Figure 1.15: Structure de la surfactine produit par *Bacillus subtilis* [128].

1.3.2.3 Acides gras, phospholipides ou lipides neutres

Ces biosurfactants sont produits par plusieurs bactéries et levures. La figure 1.16 montre une structure d'un biosurfactant (phosphatidyléthanolamine) qui a été produit par la souche *Acinetobacter* sp. HO1-N [129].

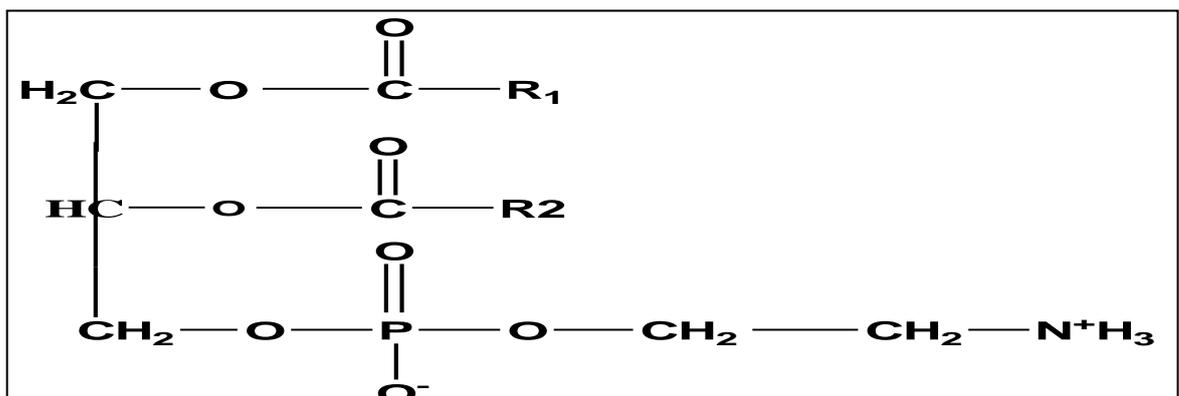


Figure 1.16 : Structure de la phosphatidylethanolamine produit par *Acinetobacter* sp. strain HO1-N. R1 et R2 sont des chaînes hydrocarbonées d'un acide gras [129].

1.3.2.4 Biosurfactants polymères

Les biosurfactants de nature polymères les plus étudiés sont: emulsan, liposan, alasan, et d'autres complexes polysaccharides-protéines. Par exemple, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produit l'emulsan qui est un agent émulsifiant efficace pour les hydrocarbures dans l'eau (figure 1.17) [130].

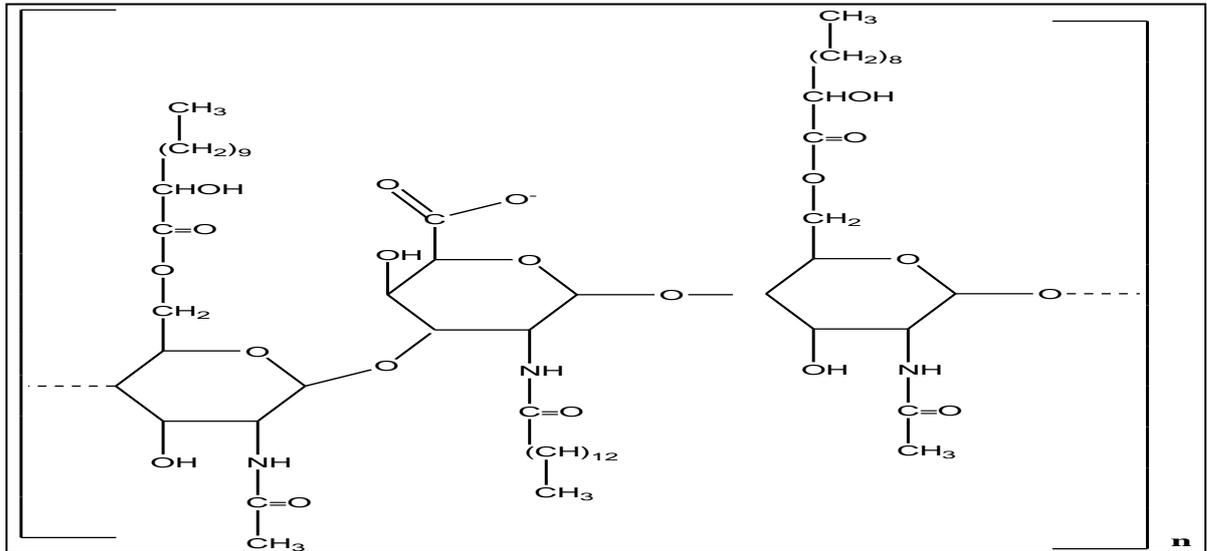


Figure 1.17 : Structure de l'emulsan produit par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [130].

1.3.3 Facteurs influençant la production du biosurfactant

La nature et la quantité de la production du biosurfactant sont influencées par les facteurs et biotiques [127, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137].

1.3.3.1 Facteurs abiotiques

1.3.3.1.1 Source de carbone

De nombreux travaux ont montré que la nature du biosurfactant dépend fortement de la source de carbone. Le gasoil et le pétrole présentent une bonne source de carbone [131]. D'autres auteurs ont signalé que les composés solubles dans l'eau comme le glucose sont aussi convenables pour la production des biosurfactants [127]. L'huile d'olive, l'huile de maïs ont été optimisés à la production du rhamnolipide par la souche *Pseudomonas aeruginosa* UG-2 (100 – 165 mg/g de substrat) [132].

1.3.3.1.2 Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la production du biosurfactant, certaines souches préfèrent les sels d'ammonium et l'urée comme source inorganique d'azote, alors d'autres produisent un maximum de biosurfactant en présence de nitrate [133, 134].

1.3.3.1.3 Cations

Les cations ont un effet direct sur la production de biosurfactants. L'ajout des cations dans le milieu de culture joue un rôle positif pour la production de biosurfactants de type lipopeptidiques par *Bacillus subtilis* [135]. Aussi l'ajout de ZnSO₄ et/ou de MnSO₄ pourrait augmenter la production de rhamnolipide par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* OCD1 [136]. Alors que, la limitation des concentrations de sel de magnésium, de sel de calcium et de sel de potassium conduit à un meilleur rendement de production de rhamnolipide par la souche de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 [133].

1.3.3.1.4 pH

Plusieurs chercheurs ont rapporté que le pH influe la production de biosurfactants. Le pH entre 6,5 et 9,5 est optimum pour la production de biosurfactant par les souches BiBiB5 et Ilam E3P4 de *Bacillus*, isolées à partir de réservoir pétrolier IRANIEN [137]. La production maximale de rhamnolipide était obtenue dans une gamme très restreinte de pH de 6 à 6,5 par *Pseudomonas aeruginosa* [133].

1.3.3.2 Facteurs biotiques

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes aérobies [138, 139] sur une ou plusieurs sources de carbone telles que les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures [138]. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [140]. Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [118, 141, 142].

Les principaux microorganismes producteurs de biosurfactants, actuellement connus: *Acinetobacter calcoaceticus* IMUb-7241 [143], *Staphylococcus* sp. strain 1E [144], *Pseudomonas aeruginosa* NY3 [145] et *Pseudomonas aeruginosa* MR01 [146], *Pseudomonas aeruginosa* SP4 [147], *Bacillus* sp. strain [148], *Bacillus methylotrophicus* USTB [149], *Bacillus* sp. I-15 [150], *Candida lipolytica* [151], *Pseudoxanthomonas* sp. strain PNK-04 [152], *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 [153], *Micrococcus kristinae*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* et *Yersinia enterocolitica* [154], *Brevibacterium aureum* MSA13 [155], *Lactobacillus paracasei* [156], *Ochrobactrum* sp. strain 1C et *Brevibacterium* sp. strain 7G [157].

A titre d'exemple, les actinomycètes producteurs de biosurfactants sont: *Rhodococcus erythropolis* [158], *Rhodococcus wratislaviensis* [159], *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 [160], *Gordonia* sp. strain JE-1058 [161], *Nocardiopsis* sp. strain B4 [162] et *Nocardioides* sp. strain [163].

La production de biosurfactants par les streptomycètes a été rapportée dans de très rares cas. KHOPADE *et al.* [164] ont isolé une souche de *Streptomyces* sp. strain B3 productrice de biosurfactant où l'extrait de levure représente la meilleure source de carbone, ce biosurfactant réduit la tension de surface jusqu'à 29 mN.m⁻¹. Le biosurfactant issu de la souche de *Streptomyces* sp. strain S1 a montré une réduction de la tension de surface jusqu'à 42,6 mN.m⁻¹ et sa valeur en CMC est de 300 mg.l⁻¹ [165]. Egalement, DEEPIKA et KANNABIRAN [159] ont montré que les deux souches de *Streptomyces* sp. strain VITDDK1 et VITDDK2, productrices de biosurfactants, sont résistantes aux métaux lourds (mercure, cuivre, zinc, cadmium et plomb). RICHTER *et al.* [167] ont isolé *Streptomyces tendae* Tuë 901/8c, cette souche produit un biosurfactant de type streptofactin, où la tension de surface diminue jusqu'à 39,4 mN.m⁻¹ et la valeur de la CMC égale à 36 mg.l⁻¹.

1.3.4 Propriétés de biosurfactants

1.3.4.1 Concentration micellaire critique

Par définition, la Concentration Micellaire Critique (CMC) est la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [168]. Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, capables de former des liaisons hydrogènes en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système [169]. En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (figure 1.18). La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques [170, 171].

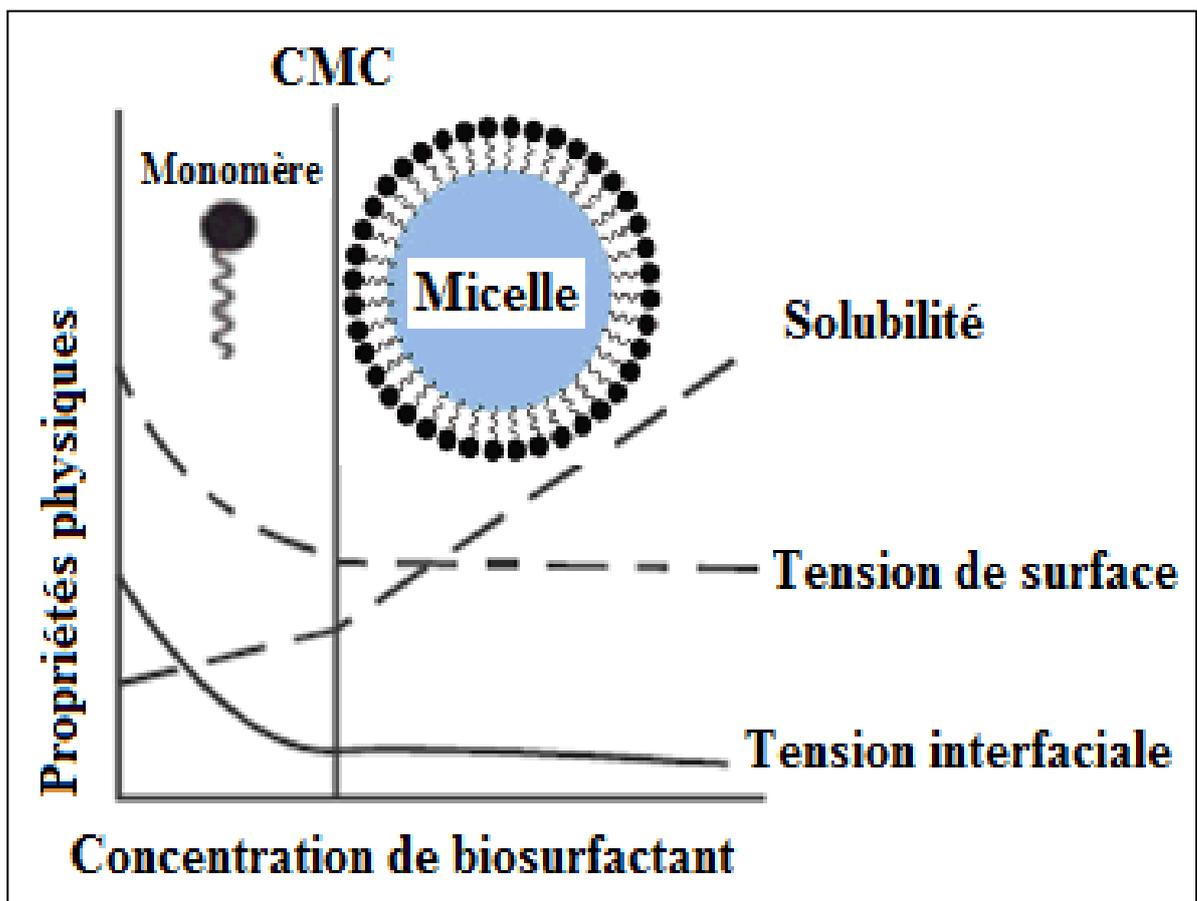


Figure 1.18 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant [169].

1.3.4.2 Stabilité de biosurfactants

Les biosurfactants sont caractérisés par une émulsion stable avec une durée de vie de plusieurs mois à plusieurs années [27]. En outre, les biosurfactants peuvent stabiliser les émulsions (émulsifiants) ou les déstabiliser (dé-émulsifiants). Les biosurfactants sont stables dans une large gamme de température, de pH et de salinité [172].

1.3.4.3 Toxicités

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux [27, 144, 173].

1.3.4.4 Biodégradabilité

De nombreux auteurs indiquent que les biosurfactants sont biodégradables par rapport aux surfactants chimiques [121, 174, 175]. Une étude réalisée par VILPULANANDAN et REN [121] a décelé que la biodégradation de biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* sp. strain était en compétition avec la biodégradation du naphthalène. De plus, HABA *et al.* [174] et DESCHENES *et al.* [175] ont rapporté que les biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa* étaient biodégradables.

1.3.4.5 Activité à l'interface

En présence d'un biosurfactant issu de la souche *Bacillus* sp. strain, JOSHI *et al.* [176] ont montré que la diminution de la tension interfaciale (TI) eau/pétrole brut était entre 0,05 et 12,5 m.Nm⁻¹. Egalement, le biosurfactant produit par *Bacillus licheniformis* TT42 a abaissé la TS de l'eau à 28 mN.m⁻¹ et la TI (eau/pétrole brut) jusqu'à 0,05 mN.m⁻¹ à 80 °C [177].

1.3.4.6 Pouvoir émulsifiant

L'émulsion est un système hétérogène composé au moins d'un liquide non miscible intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse en général 0,1 mm (microémulsion) [27]. Il y a quatre formes d'émulsions (figure 1.19) [178].

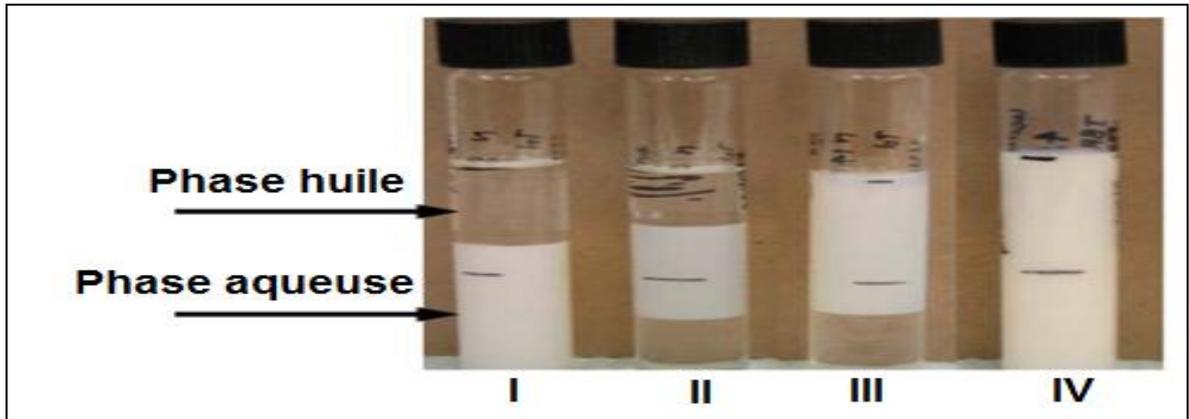


Figure 1.19 : Quatre types de microémulsions. Type I : huile-dans-eau, type II : trois phases, dans lequel les microémulsions de phase du milieu sont en équilibre avec l'huile et l'eau, Type III : eau-dans-huile et Type IV : huile et l'eau sont incorporés dans une seule phase [178].

1.3.4.7 Activité biologique

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les microorganismes pathogènes. Le lipopeptide iturin de *Bacillus subtilis* a montré une activité puissante antifongique [179]. Les rhamnolipides inhibent la croissance des espèces nuisibles de bloom algale (*Heterosigma akashivo* et *Protocentrum dentatum*) pour des concentrations variant de 0,4 à 10 mg.l⁻¹ [180]. Selon les travaux réalisés par EDDOUAOUA *et al.* [144], le lipopeptide synthétisé par la souche *Staphylococcus* sp. strain 1E a montré une activité inhibitrice contre les bactéries: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*.

1.3.5 Applications de biosurfactants

Les biosurfactants ont une meilleure compatibilité avec l'environnement et possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants chimiques, tels que la biodégradabilité, la faible toxicité, ont la plus sélectivité, la stabilité thermique et chimique élevée, etc. Les biosurfactants peuvent être synthétisé à partir de matières premières renouvelables [181]. Ces propriétés intéressantes permettent d'appliquer les biosurfactants à grande échelle (environnementale et industrielle).

1.3.5.1 Applications industrielles de biosurfactants

1.3.5.1.1 Récupération du pétrole

La récupération d'une partie de pétrole restante dans le gisement (roches) ou dans les réservoirs s'effectue par des procédés thermiques et chimiques. Les biosurfactants (procédés biologiques) peuvent aider à l'émulsification de pétrole et également aider le détachement de films d'huile à partir de roches et de réservoir [181, 182] (figure 1.20).

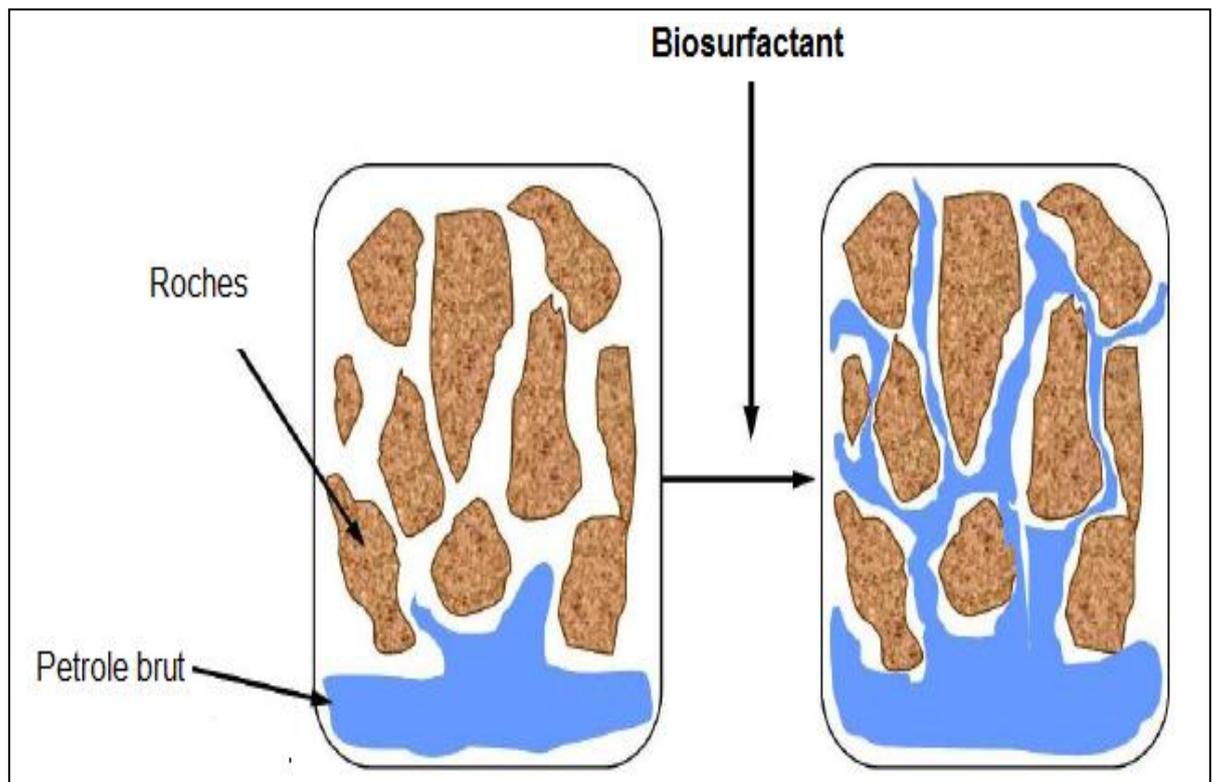


Figure 1.20 : Récupération de pétrole brut par les biosurfactants [182].

1.3.5.1.2 Autres applications industrielles de biosurfactants

Les biosurfactants sont utilisés dans de nombreux domaines tels que: cosmétiques, transformation alimentaire, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, nettoyants ménagers, produits de l'agriculture, pharmaceutique, médecine, et d'autres (figure 1.21) [26, 27]. Les applications potentielles des biosurfactants sont: l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité.

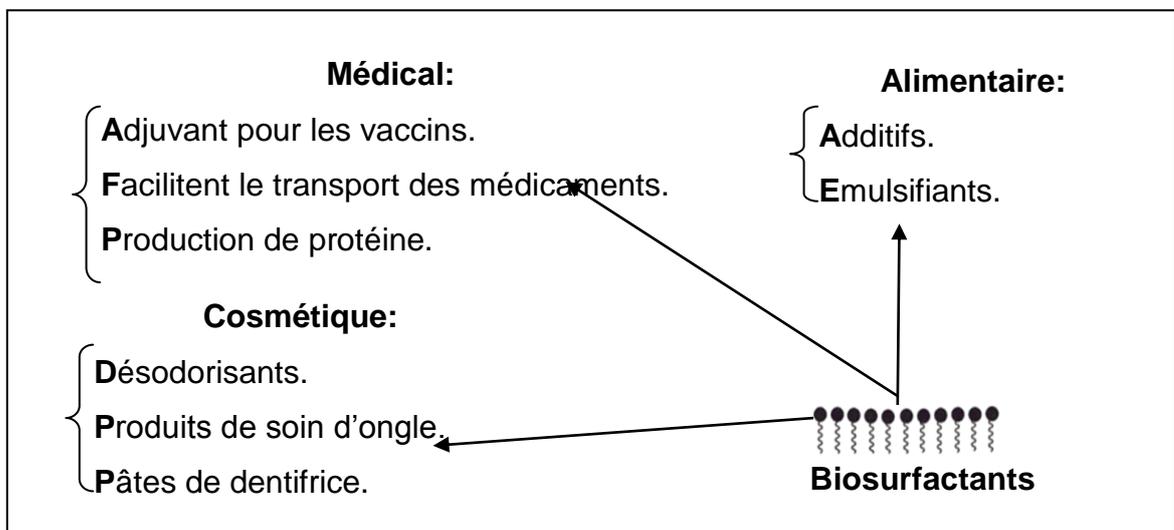


Figure 1.21 : Applications industrielles des biosurfactants [26, 27].

1.3.5.2 Applications environnementales de biosurfactants

1.3.5.2.1 Remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures

La bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures dépend de la nature et la concentration d'hydrocarbures (biodisponibilité), de l'espèce microbienne, des facteurs abiotiques (disponibilité d'oxygène, humidité, température, pH, nutriments,..). L'addition de tensioactifs synthétiques ou biologiques conduit à une mobilité accrue et une solubilité importante des hydrocarbures et donc une élimination efficace du polluant [142, 173].

Le rôle principal du tensioactif est de solubiliser les molécules hydrophobes (HAP) en les piégeant dans la pseudo-phase hydrophobe formée par les micelles (figure 1.22).

L'utilisation de biosurfactants dans la remédiation des hydrocarbures a donné des résultats variables selon les conditions d'applications. LINDLEY et HEYDEMAN [183] ont utilisé l'extrait des acides gras et des phospholipides (principalement l'acide dodécanoïque et de la phosphatidylcholine) produit par *Cladosporium resiuae*, ils ont amélioré le taux de dégradation des alcanes jusqu'à 30%.

BERG *et al.* [184] ont utilisé un biosurfactant (nommé UG2), produit par *Pseudomonas aeruginosa*, pour la remobilisation des hydrocarbures, ce qui a entraîné une remobilisation de 31% des hydrocarbures dans la phase aqueuse.

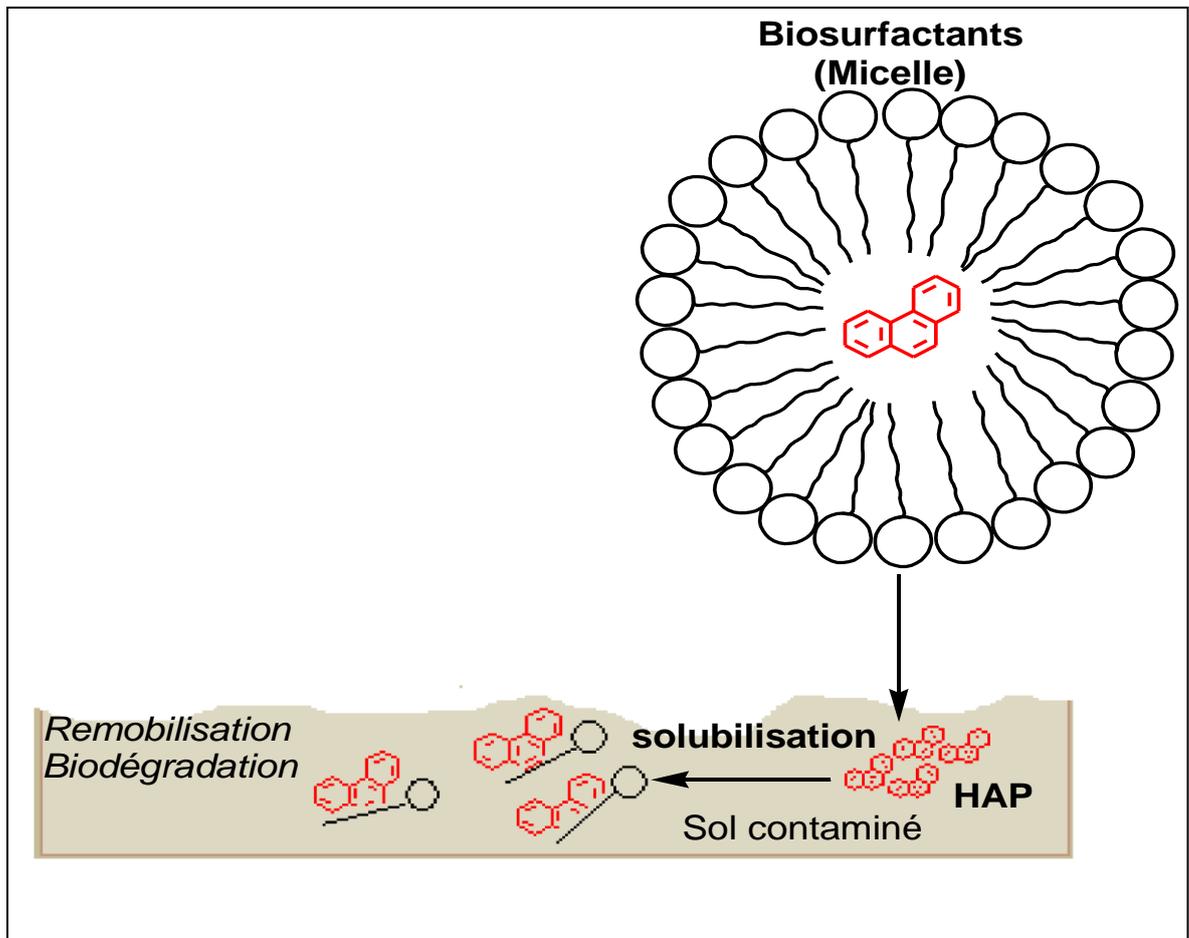


Figure 1.22 : Représentation schématique des processus de la solubilisation des HAP en présence de surfactant.

1.3.5.2.2 Remédiation des milieux aquatiques contaminés par les hydrocarbures

Lorsque les hydrocarbures sont déversés dans le milieu aquatique, les plus légers volatilisent alors que les polaires se dissolvent dans l'eau [26]. Toutefois, en raison de la faible solubilité de l'huile, la plupart des composants de l'huile reste à la surface de l'eau [1, 26]. Le premier moyen de suppression d'hydrocarbures est la photooxydation, l'évaporation, et la dégradation microbienne. La biodégradation peut être l'une des méthodes les plus efficaces pour éliminer ces polluants [1, 26]. Les surfactants renforcent la dégradation par les dispersants et les émulsionnants des hydrocarbures [1, 26].

Egalement, les microorganismes telluriques qui produisent les biosurfactants peuvent être utiles dans le milieu aquatique. REDDY *et al.* [185] ont signalé qu'une nécessité de la solubilisation spécifique des hydrocarbures par les surfactants pendant la croissance microbienne donne un bon rendement de la biodégradation.

1.3.6 Mécanisme d'élimination des HAP par les microorganismes en présence de biosurfactants

La faible solubilité des HAP (substrat) augmente leur sorption sur les surfaces et limite leur biodisponibilité pour les microorganismes, ce qui constitue un obstacle pour l'efficacité de la bioremédiation des sites contaminés par les HAP. Le biosurfactant peut favoriser la croissance microbienne sur des substrats liés par leur désorption ou en augmentant leur solubilité [186, 187]. Les biosurfactants sont particulièrement efficaces pour mobiliser des molécules hydrophobes liées et les rendent disponibles pour la biodégradation [26, 186, 187, 188]. La figure (1.23) ci-dessous montre le mécanisme de la biodégradation des HAP en présence des biosurfactants.

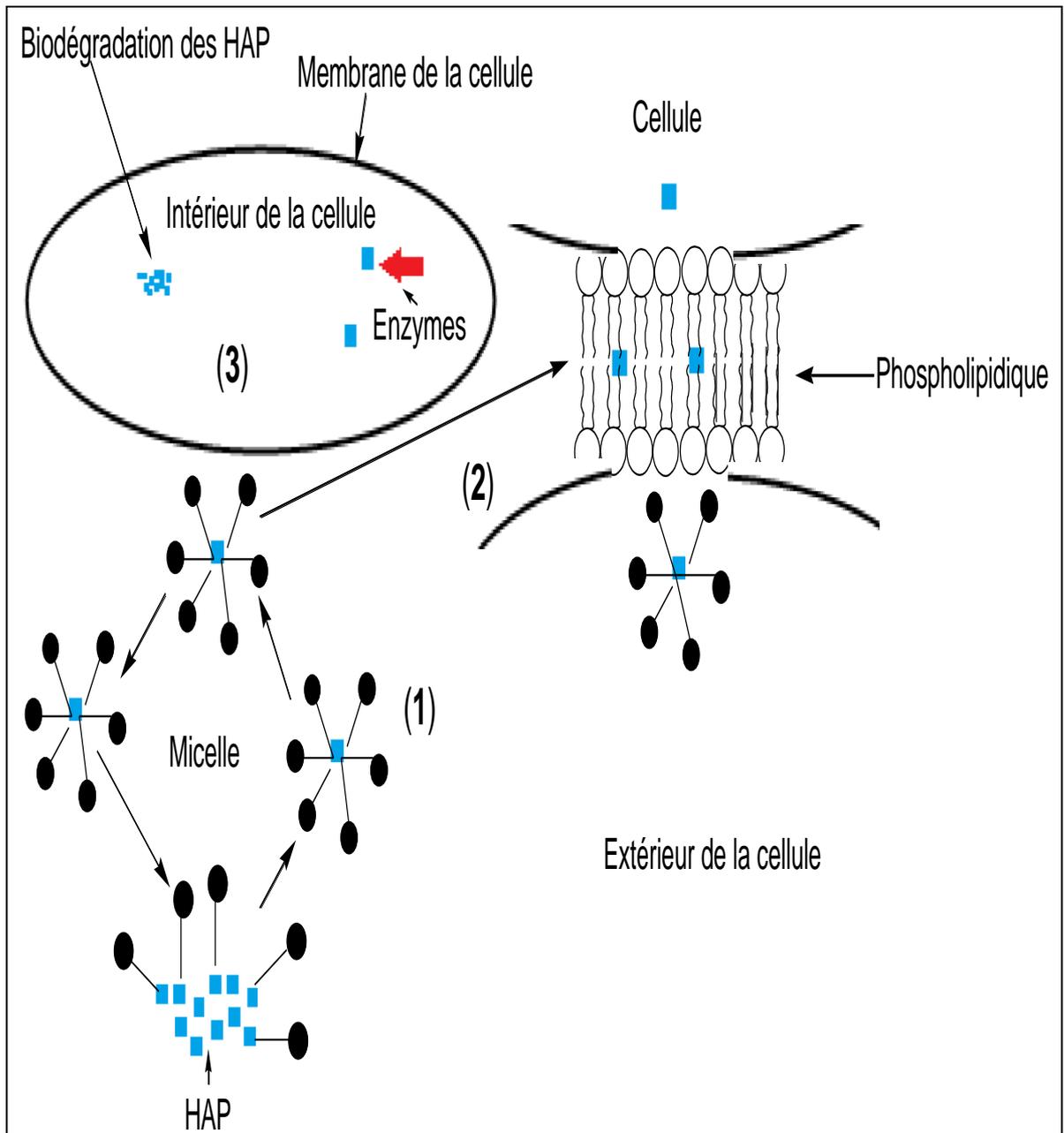


Figure 1.23 : Mécanisme de la dégradation des HAP par les microorganismes en présence d'un biosurfactant.

La première étape est la formation de micelles contenant l'HAP, où la partie hydrophobe du tensioactif s'attache au HAP grâce à des interactions hydrophobes. Le contact entre la micelle et la membrane cellulaire qui est très hydrophile où la porosité de la membrane augmente, l'HAP entre dans la cellule où l'HAP a été dégradé par les enzymes nécessaires [187, 188, 189].

Un autre mécanisme d'action possible du biosurfactant impliquant une modification de l'hydrophobicité cellulaire. Si un biosurfactant s'attache à la membrane cellulaire, l'hydrophobie de la cellule augmente. Ce qui conduit à une absorption des HAP par la cellule et par suite leur dégradation. Donc, les microorganismes peuvent former un biofilm à base d'un biosurfactant comme le montre la figure 1.24 [189].

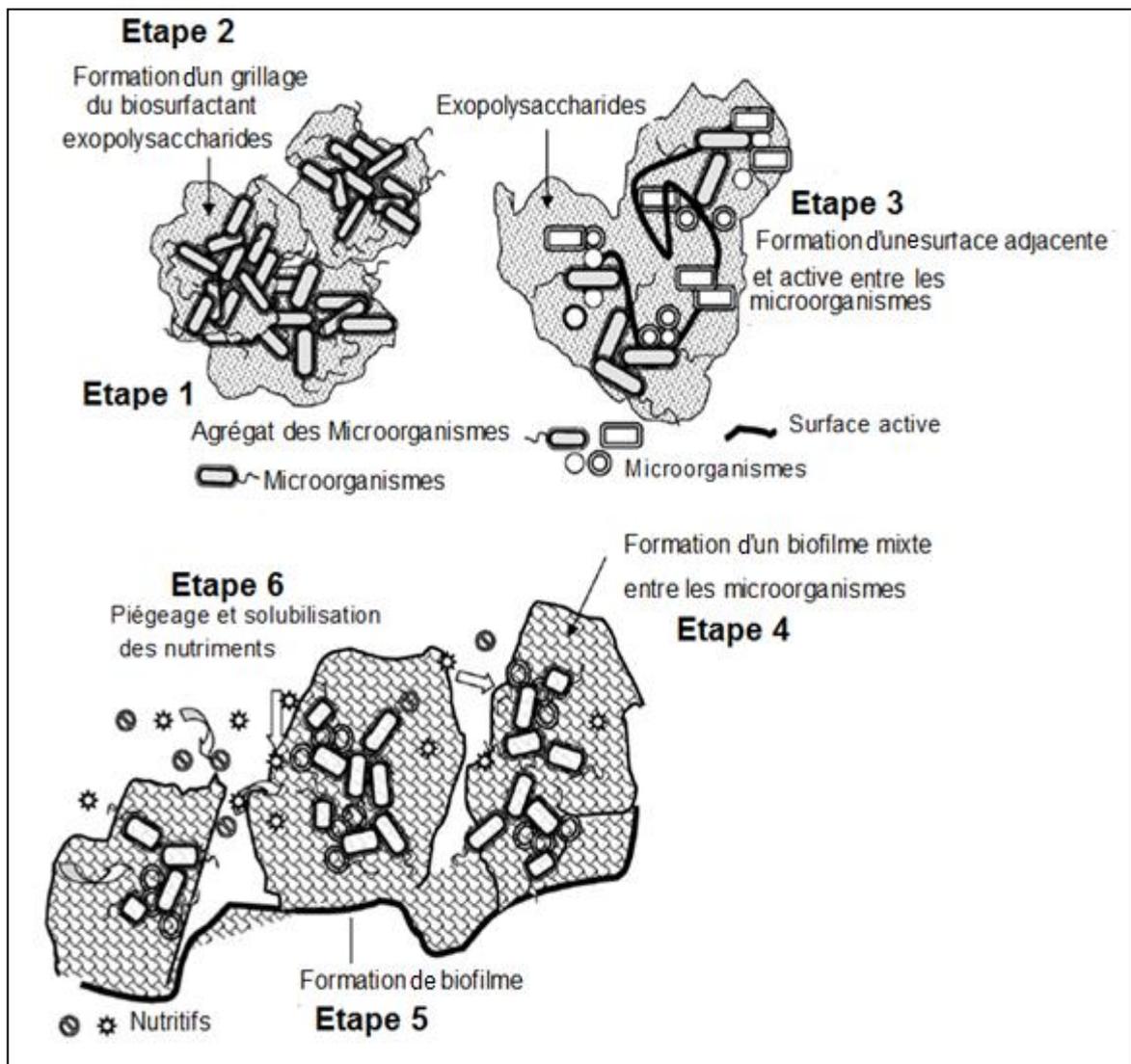


Figure 1.24 : Mécanismes de la formation de biofilm sous le rôle du biosurfactant [189].

Plusieurs chercheurs ont testé l'efficacité de la biodégradation des HAP en présence de biosurfactants à des pourcentages de dégradation entre 92,3 à 100% [121, 188, 190, 191], par contre la dégradation d'un mélange des HAP ne dépasse pas 67% par *Pseudomonans aeruginosa* [192].

Le tableau 1.1 indique l'importance de l'ajout de biosurfactant pour la biodégradation des HAP.

Tableau 1.1 : Biodégradation des HAP sous l'effet de biosurfactant.

HAP	Microorganisme	Biosurfactant	%D	Réf
Naphtalène	<i>Pseudomans</i> sp. strain	Rhamnolipide	100	121
Phénanthrène	<i>Pseudomans putida</i>	Sophorolipides	99,4	188
Anthracène	<i>Rhodococcus</i> sp. strain	Rhamnolipide	95	190
Phénanthrène	Culture mixte: <i>Pseudomanse</i> sp. strain et <i>Rhodococcus</i> sp. strain.	Rhamnolipide	95	191
Mélange d'HAP	<i>Pseudomans aeruginosa</i>	Sophorolipide	67	192

1.3.7 Utilités des actinomycètes dans la biodégradation et la production de biosurfactants

Les actinomycètes possèdent de nombreuses propriétés qui en font de bons candidats pour l'application dans la bioremédiation des sites contaminés par des polluants organiques. Ils produisent des enzymes extracellulaires qui dégradent un large éventail de composés organiques complexes et aussi des spores qui résistent à la dessiccation [17, 79, 193, 194].

Les actinomycètes ont la capacité de dégrader une grande variété de polymères comme les lignocelluloses ou encore la chitine [79, 193], les acides humiques [19, 20, 21, 22, 23, 79]. Les actinomycètes possèdent ainsi toute une variété d'enzymes intervenant dans ces dégradations: chitinases, endoglucanases, cellulases [19, 20, 21, 22, 23, 79, 195, 196] et des peroxydases [19, 20]. Elles produisent aussi de multiples protéases [21, 197] qui peuvent ensuite trouver des applications dans l'industrie alimentaire ou l'industrie des détergents [21]. En outre, les enzymes issues d'actinomycètes sont aussi utilisées dans les procédés de bioconversion.

Ainsi, les actinomycètes peuvent avoir un rôle important dans le processus de dépollution grâce à leur capacité de dégrader les matières organiques à haut poids moléculaires (acides humiques) [19, 20, 21] et une large variété de composés organiques, ainsi elles représentent des candidats prometteurs pour le

recyclage [16]. *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Gordonia* sont des actinomycètes qui jouent un rôle important dans la bioremédiation de sols contaminé par les matières organiques [3, 6,16, 19, 90, 99, 111, 158].

Les actinomycètes, en particulier les streptomycètes, sont de puissants producteurs d'enzymes extracellulaires (peroxydases, oxygénases,..). Ces enzymes jouent un rôle important dans la dégradation de la matière organique et dans l'industrie. La dégradation des matières organiques par les enzymes de streptomycètes peut être le résultat d'un mécanisme radicalaire (oxydation biologique) ou d'un changement chimique (hydrolyse biologique). Les enzymes réagissent directement avec l'oxygène comme les cytochromoxydases qui sont des enzymes actives dans la chaîne respiratoire. La plupart du temps, l'oxygène est incorporé directement au substrat (cas des oxygénases). Parfois, il joue le rôle d'un accepteur d'hydrogène (cas des oxydases). Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification des substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les monooxygénase ou les dioxygénases : il y a formation de groupes polaires qui permettent l'augmentation de la solubilité de nombreux substrats organiques peu solubles dans l'eau (hydrocarbures) et de facilité ainsi leur assimilation [44, 198, 199].

Les streptomycètes sont de bon choix en tant que producteurs de biosurfactants en raison de leur abondance dans le sol et leur rôle majeur dans le recyclage des matériaux dans la nature. En outre, ils ont été trouvés à produire de nombreux types de métabolites, notamment des antibiotiques, des pigments, des enzymes et de biosurfactants [19, 20, 21, 195, 200, 201, 202]. Jusqu'à tout récemment, il y a eu seulement un nombre limité de rapports publiés sur les streptomycètes genre *Streptomyces* producteurs de biosurfactants. Par exemple, *Streptomyces tendae* Tu901/8c produit un composé peptidique hydrophobe extracellulaire, appelée streptofactine [167]. Le glycopeptide vancomycine a été produit par *Streptomyces orientalis*, ce biosurfactant est utilisé comme antibactérien contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthycilline [193]. Les biosurfactants ont été produits par *Streptomyces* sp. strain B3 [164] et par *Streptomyces* sp. [165, 166], qui ont été utilisés dans la bioremédiation de sols contaminés par les hydrocarbures et les métaux lourds.

1.4 CONCLUSION

Les HAP sont des contaminants environnementaux primordiaux quelles que soient les origines (naturelles ou anthropiques). Ce sont des composés organiques très peu solubles et servent comme des sources d'énergie aux microorganismes hydrocarbonoclastes.

La dégradation par les actinomycètes présentent un intérêt doublement efficace pour la dépollution grâce à leur potentiel de production de biosurfactants et aux enzymes (peroxydases et oxygénases).

La faible solubilité des HAP limite le potentiel biodégradatif et afin de faciliter le contact entre le substrat et la cellule et par la suite améliorer l'efficacité de la dégradation, les microorganismes produisent une variété de biosurfactants. La nature du biosurfactant est déterminée par le type de microorganisme, les sources de carbone et d'azote. Certains microorganismes développent un autre mécanisme lié à l'hydrophobicité cellulaire pour adhérer au substrat hydrophobe.

La biodégradation des HAP est un processus complexe et diffère selon le microorganisme et dépend de facteurs abiotiques, y compris ceux liés aux HAP (solubilité, la toxicité, ...) et les conditions environnementales (pH, température, ...) ainsi que les facteurs biotiques liés aux microorganismes.

La biodégradation peut être réalisée aussi bien par voie aérobie que par voie anaérobie. Néanmoins, la dégradation aérobie reste la plus efficace. En général, les HAP sont presque métabolisés vers le catéchol et les acides benzoïque, phtalique, salicylique et gentisique. En outre, certains microorganismes peuvent métaboliser les HAP vers d'autres sous produits.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Introduction

Notre approche expérimentale est divisée en trois grandes parties :

- La première partie a été consacrée à l'étude de la dégradation de deux HAP (naphtalène et phénanthrène) et de pétrole brut par trois souches de streptomycètes isolées localement (AB1, AH4 et AM2).
- La deuxième partie a été réservée à la mise en évidence des métabolites de dégradation de ces deux HAP par ces trois souches.
- La troisième partie consiste à étudier la production et la caractérisation d'un biosurfactant produit par la souche AB1 afin de l'utiliser dans la dépollution d'un sol contaminé par le pétrole brut et de solubiliser deux HAP contenus dans l'eau douce et l'eau de mer.

2.2 Souches de streptomycètes

Trois souches de streptomycètes, isolées et identifiées dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioM) de l'université de Blida 1 et le Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) du centre de Biotechnologie Sfax, (Tunisie) [19, 20, 21, 22, 23], ont été utilisées pour la dégradation des HAP et le pétrole brut et à la production de biosurfactant.

Les données concernant le site de prélèvement des sols employés pour isoler ces microorganismes (techniques d'isolement, identification phénotypique et génotypique) sont présentées en APPENDICE C.

Ces trois souches ont montré une forte aptitude à dégrader les acides humiques [22, 23]. Notamment, les souches AM2 et AH4 sont à l'origine de nouvelles enzymes extracellulaires de type peroxydases appelés HaP (HaP1 et HaP2 pour AM2 et HaP3 pour AH4) et la souche AB1 productrice de Kératinase [19, 20, 21]. Ces propriétés très particulières de production enzymatique nous ont incités à les utiliser dans la dégradation des hydrocarbures et la production de biosurfactants.

2.3 Biodégradation des hydrocarbures

2.3.1 Adaptation des souches et préparation de précultures

A partir d'une culture jeune en milieu ISP9 solide (voir composition en annexe 2), les souches AB1, AH4 et AM2 ont été inoculées à raison d'un disque de 1 cm de diamètre rempli de spores dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu liquide minéral minimum "MM" (voir composition en APPENDICE C) L'ajout de glucose (10 mg.l^{-1}) permettra le bon démarrage de croissance microbienne [23]. Le naphthalène (ou le phénanthrène) a été utilisé comme source de carbone et d'énergie (100 mg.l^{-1}). Les cultures ont été alors incubées à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) pendant 5 jours à l'obscurité et sous une agitation de 150 tr.min^{-1} .

2.3.2 Croissance de streptomycètes sur différents types d'hydrocarbures

Avant d'entamer les expériences de la biodégradation, nous avons vérifié la tolérance de nos souches vis-à-vis l'effet toxique des hydrocarbures aromatiques et de pétrole brut sur la croissance de streptomycètes. Ceci a été réalisé séparément par ensemencement des souches sur milieu solide minéral contenant 10 mg.l^{-1} du glucose et 100 mg.l^{-1} du chaque hydrocarbure aromatique (naphthalène (panreac), phénanthrène (Aldrich-Germany), anthracène (Aldrich-Germany) et xylène) et 1% (v : v) du pétrole brut. Après 5 jours d'incubation à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, nous avons vérifié visuellement la croissance des souches sur milieu solide pour chaque souche ainsi pour chaque hydrocarbure.

2.3.3 Etude de la biodégradation du pétrole brut

Un (01) ml de préculture a été inoculé dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu MM. Le pétrole brut (1%, v : v) et le glucose (10 mg.l^{-1}) ont été ajoutés au milieu après stérilisation par microfiltration (microseringue de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$). Après l'ajustement de pH à 7.2, le milieu de culture a été incubé à l'obscurité à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ et sous une agitation de 150 tr.min^{-1} . Dans les mêmes conditions, des erlenmeyers contenant des souches mortes (autoclavées à $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min) ont été incubées simultanément afin de servir de témoins chimiques et biologiques.

Les étapes suivantes ont permis à la fois d'observer la croissance et de suivre la dégradation :

- o Afin de vérifier la croissance et le changement morphologique de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) cultivées sur le pétrole brut, nous avons observé l'échantillon à l'aide d'un microscope optique de marque Leica et une observation après traitement à l'aide d'un microscope électronique à balayage de marque ESEM XC30FEG. Les étapes de préparation pour l'observation par le MEB sont: centrifugation $6000 \text{ tr.min}^{-1}/30 \text{ min}$ du milieu de culture incubé pendant 30 jours, rinçage des culots avec l'eau physiologique, séchage des échantillons à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 48 h sous étuve, puis observation.
- o La dégradation de pétrole brut a été suivie par analyse quantitative en utilisant la chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Après incubation, les cultures de dégradation et leurs témoins ont été soumises à des extractions par le dichlorométhane (DCM) répétées 2 fois (v: v), à différents temps d'incubation (0, 14 et 30 jours). La phase organique récupérée était par la suite séchée par l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200) à $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Les hydrocarbures résiduels ont été dissouts dans le DCM. L'extrait obtenu est analysé par CG-SM de type Agilent Technologie 6890N/5975. Vingt (20) hydrocarbures (de n-C11 à n-C30) ont été analysés pour vérifier leur dégradation par les trois souches.

2.3.4 Etude de la biodégradation de naphthalène et de phénanthrène

Nous avons choisi deux hydrocarbures: le naphthalène (2 cycles aromatiques) et le phénanthrène (3 cycles aromatiques). Sachant que l'analogie structurale entre les différents HAP est à l'origine d'analogies métaboliques [3, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 70, 121, 188, 192].

2.3.4.1 Préparation de la solution mère de l'HAP

La solution mère (10g.l^{-1}) a été préparée en dissolvant de naphthalène (ou de phénanthrène) dans l'acétate d'éthyle. Lors de son utilisation, un volume de la solution mère est mélangé avec le milieu de culture pour obtenir la concentration désirée. Avant d'ajouter l'inoculum, le milieu de culture est laissé sous hotte pendant 3 à 4h afin d'évaporer le solvant.

2.3.4.2 Biodégradation

Pour étudier la dégradation de naphthalène (ou de phénanthrène) nous avons appliqué les mêmes conditions que celles utilisées pour la dégradation de pétrole brut (préculture, milieu de culture, stérilisation et incubation).

Pour chaque HAP nous avons choisi deux concentrations : 32 mg.l⁻¹ (solubilité à 25 °C dans l'eau distillée) et à 100 mg.l⁻¹ pour le naphthalène et 1,4 mg.l⁻¹ (solubilité à 25 °C) et à 100 mg.l⁻¹ pour le phénanthrène.

Plusieurs mesures ont été effectuées pendant la dégradation des HAP :

- Tension de surface (TS) : la TS a été mesurée chaque 2 jours pendant 12 jours d'incubation en présence de l'HAP. La mesure a été faite à l'aide d'un tensiomètre (Gibertini TSD 132389, Italie). Vingt (20) millilitres de culture ont été prélevés et centrifugés (4000 tr.min⁻¹ pendant 20 min). Le surnageant de culture était filtré à travers un papier filtre Wattman de 0,45 µm avant d'effectuer la mesure de la tension de surface.
- pH : la variation de pH du milieu de culture au cours de la dégradation des HAP de 0 à 12 jours (chaque deux jours) a été mesurée à l'aide d'un pH mètre (Hanna pH 211) préalablement étalonné.
- Analyse UV-Visible : afin de suivre l'évolution des composés aromatiques au cours de la dégradation des HAP, le surnageant dépourvu de cellules a été analysé par un balayage en longueur d'onde de 200 à 400 nm moyennant un spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu-1100, Japon). Ce qui permettra de déterminer la diminution de la quantité en hydrocarbure d'une part et d'autre part de détecter la présence des intermédiaires métaboliques résultants de la dégradation [27].

En outre, l'HAP résiduel a été analysé à 254 nm (pour le naphthalène) et à 252 nm (pour le phénanthrène) après l'extraction avec l'acétate d'éthyle (v : v). La ligne de base était sur toute la longueur d'onde du spectre à tracer avec la cuve en quartz remplie d'échantillon de milieu MM après l'extraction par l'acétate d'éthyle.

- Analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) : après l'extraction avec l'acétate d'éthyle (v : v), l'HAP résiduel a été quantifié par chromatographie en phase inverse. La colonne est de type RP-C18 (4,6×125

mm). Le volume injecté était de 20 μ l, l'éluant a été constitué d'acétonitrile et de l'eau bidistillée à 65 : 35 (v : v). Le débit a été fixé à 0,9 ml.min⁻¹ à une température de 35 °C d'injection. La détection des produits en sortie de colonne a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV-Visible [203] à 254 nm pour le naphthalène et à 252 nm pour le phénanthrène.

2.3.4.3 Extraction des HAP résiduels

Afin de déterminer le pourcentage de dégradation des HAP (naphthalène et phénanthrène) par UV-Visible et par HPLC, nous avons utilisé l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction. Le milieu de culture a été mélangé avec l'acétate d'éthyle (v : v) puis le mélange a été soumis à une agitation pendant 10 min par vortex (IKA Vortex Genuis). Ensuite une centrifugation a été réalisée à 6000 tr.min⁻¹ pendant 30 min, la phase organique contenant le naphthalène ou le phénanthrène a été récupérée. La courbe d'étalon a été établie à partir des solutions du naphthalène ou du phénanthrène préparées dans l'acétate d'éthyle aux différentes concentrations pour les deux analyses (APPENDICE D).

2.4 Identification des intermédiaires métaboliques de biodégradation des HAP

L'identification de sous produits issus de la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène a été réalisée par analyse UV-Visible, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrophotométrie de masse (CG-SM).

2.4.1 Extraction des métabolites

Après l'élimination de la biomasse du milieu de dégradation par centrifugation à 6000 tr.min⁻¹ pendant 20 min, le milieu a été soumis à l'extraction deux fois avec l'acétate d'éthyle (v : v) à différents intervalles du temps d'incubation (2, 4, 6, 8, 10 et 12 jours). Puis, la phase organique ainsi obtenue a été concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'au 1 ml. Les fractions relatives aux différents temps ont été collectées et combinées en une seule fraction.

D'autre part et, afin de mettre en évidence d'autres intermédiaires qui peuvent ne pas être détectables, des fractions acides et neutres ont été préparées. En effet, le surnageant obtenu à différents temps d'incubation après

centrifugation (6000 tr.min^{-1} pendant 20 min) a été acidifié par HCl (6 N) à $\text{pH}= 2$, ensuite il a été extrait avec un volume égal d'acétate d'éthyle (répétée 2 fois). La phase organique combinée ainsi obtenue a été aussi extraite 3 fois par une solution de NaOH (0,01 N). La phase organique restante a été séchée par l'évaporateur rotatif et concentrée jusqu'à 1 ml d'acétate d'éthyle, servant ainsi d'une fraction neutre (FN). La phase aqueuse (phase NaOH) a été acidifiée à $\text{pH}= 2$ et reextraite avec l'acétate d'éthyle (3 fois, v : v), servant ainsi de fraction acide (FA) [23, 204].

2.4.2 Analyses par UV-Visible et par IRTF

L'analyse par UV-Vis et IRTFa été appliquée uniquement sur des fractions acides et neutres des prélèvements de fin d'incubation (12 jours). La modification structurelle et de la détection de l'apparition ou de la disparition des groupements fonctionnels au cours de la dégradation du naphthalène ou du phénanthrène a été mise en évidence.

Les fractions acides et neutres représentant les métabolites de la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène de fin d'incubation (12 jours) ont subi à un balayage en longueur d'onde de 200 à 400 nm par l'UV-Visible. Cette méthode permet de caractériser les nouveaux pics d'absorbance par apport à l'HAP témoin.

L'analyse par IRTF des fractions acides et neutres de 12 jours d'incubation permet de caractériser le changement de la structure vis-à-vis de leurs aspects fonctionnels. Les échantillons ont été préparés par micropastillage de 1 ou 2 mm dans du bromure de potassium (KBr) et soumis à une pression de 20 bar.cm^{-2} . La pastille ainsi formée a été analysée à l'aide d'un appareil de type Shimadzu IRTF 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm^{-1} et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8 cm^{-1} . Les spectres obtenus représentent $\text{Abs} = f(1/\lambda)$ avec : Abs= Absorbance, nombre d'onde= $1/\lambda$ exprimé en cm^{-1} . Le Logiciel IR solution a été utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

2.4.3 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse

Nous avons utilisé l'appareil CG-SM (Agilent Technologie 6890N/5975) à impact électronique de mode 70 eV et couplé avec un ordinateur de logiciel Hewlett Packard. Le CG-SM est équipé d'un injecteur split/splitless et d'une colonne capillaire apolaire greffée HP5MS (5% phenyl methyl siloxane) de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre intérieur et 0,25 μm d'épaisseur du film. Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Le volume de l'extrait est de 0,5 μl à température de l'injecteur fixée à 70 °C. Le programme du gradient de température est comme suit: 70 °C pendant 2 min, puis la température augmente jusqu'à atteindre 325 °C à raison de 3 °C $\cdot\text{min}^{-1}$. La température diminue par la suite à 280 °C par un gradient de température de 4 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ puis reste stable pendant 5 min à 280 °C.

2.5 Production de biosurfactant et application dans la biodépollution des sites contaminés par les hydrocarbures

2.5.1 Sélection de la souche performante et la source de carbone

Le milieu de culture utilisé pour la production de biosurfactant avec les trois souches (AB1, AH4 et AM2) était le milieu MM supplémenté avec une source de carbone et d'énergie (substrat hydrophobe: huile d'olive, huile de soja et gasoil). Le milieu MM a été stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min après l'ajustement du pH à 7,2. Les trois sources de carbone (1%, v : v) ont été utilisées après leur stérilisation sur un filtre de 0,45 μm .

Les expériences ont été réalisées séparément dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml de milieu MM et 1% (v : v) de la source du carbone. Le milieu a été inoculé avec 1% (v : v) d'une préculture âgée de 3 jours, puis l'incubation a été assurée à 30 °C sous une agitation de 150 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les testes d'activité hémolytique et de déplacement d'huile et les mesures de la tension de surface et l'indice d'émulsion permettront la sélection de la source de carbone, la souche performante et le temps pour une production optimale de biosurfactant.

Les protocoles appliqués sont détaillés comme suit :

- o L'activité hémolytique : a été déterminée sur milieu ISP9 solide additionné de sang humain (5%). Les souches ont été repiquées sur ce milieu puis incubées à 30 °C pendant 3 jours. A la fin d'incubation le milieu a été examiné par l'apparition d'une zone transparente autour des colonies (teste visuel) [165, 166].
- o Le test de déplacement du pétrole : la méthode décrite ci-dessous est basée sur celle déjà donnée par MORIKAWA *et al.* [205] avec quelques modifications. Un (01) ml de pétrole brut est déposé à la surface de 25 ml d'eau distillée remplissant une boîte de Pétri (90 mm de diamètre), une fine couche d'huile se forme immédiatement. Par la suite, 200 µl du surnageant ont été déposés doucement au centre de la couche d'huile entraînant rapidement la formation d'une zone de diffusion. Le diamètre ou l'aire du cercle ainsi formé est mesuré en cm [206] comme le montre la figure 2.1.

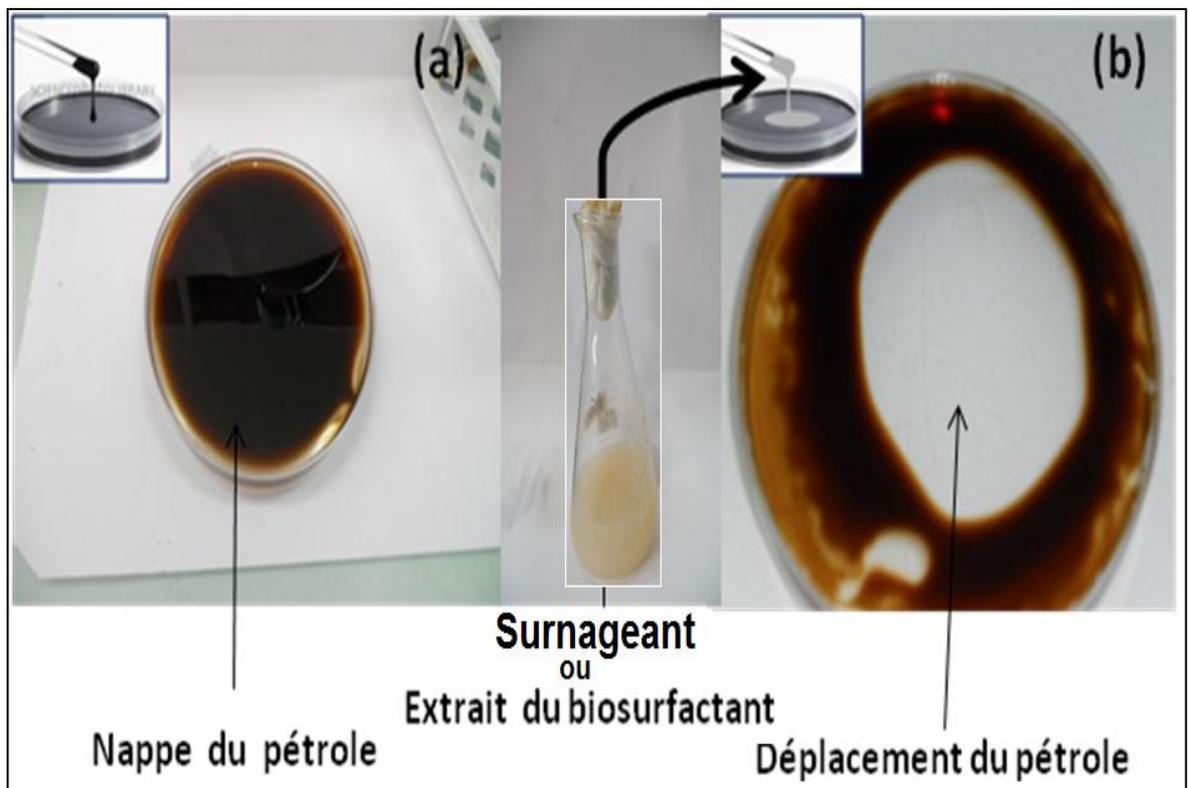


Figure 2.1 : Technique de déplacement du pétrole. (a) : Etape 1: couche huileuse du pétrole. (b) : Etape 2: effet de l'ajout d'un biosurfactant sur la couche de pétrole (formation de l'halo clair).

- o La tension de surface (TS) : voir la section 2.3.4.2.
- o L'activité émulsifiante (indice d'émulsion E24) : a été déterminée selon la méthode décrite par COOPER et GOLDENBERG [207] modifiée. Quatre (04) ml du milieu de culture de 12 jours d'incubation en présence des HAP ont été mélangés avec 4 ml d'un liquide hydrophobe (pétrole brut). Le mélange a été agité au vortex pendant 2 min, puis laissé au repos pendant 24 h à température ambiante. On procède au calcul de l'indice d'émulsion comme suit: le rapport entre l'émulsion formée et la hauteur totale du mélange multipliée par 100 (figure 7 : Schéma récapitulatif du test d'émulsion (E24) en APPENDICE E).

2.5.2 Extraction et purification de biosurfactant

Trois étapes ont été appliquées successivement: précipitation, extraction et purification.

- o Précipitation : a été réalisée par l'acidification du surnageant dépourvu de cellules à pH final de 2 par HCl (2 N). Le surnageant est laissé au repos pendant plusieurs heures à 4 °C. Enfin, le précipité est récupéré par centrifugation et remis en solution dans un tampon à pH 7,2.
- o Extraction : a été effectuée deux fois (v : v) à l'aide d'un mélange de solvant chloroforme: méthanol (2 : 1, v : v). La phase organique ainsi obtenue contenant le biosurfactant est séchée par l'évaporateur rotatif puis le précipité est considéré comme un biosurfactant brut [208].
- o Purification : le biosurfactant brut a été soumis à la séparation chromatographique sur colonne ouverte C18 (LiChroprep RP-18, 25-40 µm, Merck, diamètre 3 cm, longueur 25 cm) en utilisant comme éluant un mélange méthanol: eau avec un gradient de 65 : 35 (v : v). Les fractions ont été soumises à des mesures de test de déplacement du pétrole et de la densité optique à 280 nm. Un collecteur de fraction automatique a été utilisé (Pharmacia LKB-FRAC100) de telle façon que chaque tube (fraction) contient 4 ml de volume avec un débit de 0,12 ml.min⁻¹. Les fractions collectées ont été séchées par l'étuve à 45 °C afin de récupérer le biosurfactant purifié.

La figure 2.2 montre le montage de purification du biosurfactant brut :



Figure 2.2 : Montage de la purification de biosurfactant brut.

2.5.3 Caractérisation de biosurfactant

2.5.3.1 Propriétés de biosurfactant

2.5.3.1.1 Détermination de la concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la variation de la concentration de biosurfactant brut (mg.l^{-1}) en fonction de la TS (mN.m^{-1}). La plus basse valeur de la tension de surface correspond à la CMC, au-delà, la TS est stable en augmentant la concentration.

2.5.3.1.2 Activité émulsifiante

Le biosurfactant brut de la souche performante a été testé contre 7 liquides hydrophobes : toluène, hexadécane, huile d'olive, huile de soja, gasoil, essence et pétrole brut (4 ml de la solution de biosurfactant à CMC plus 4 ml de liquide

hydrophobe). Le mélange est bien agité au vortex pendant 2 min (obtention d'un mélange homogène), puis laissé au repos pendant 24 h à 30 °C avant de prendre les mesures (voir détail en *section 2.5.1*).

2.5.3.1.3 Détermination de la stabilité du biosurfactant

L'étude de la stabilité de biosurfactant brut a été réalisée sur une concentration CMC dont les paramètres étudiés sont : température, pH et salinité. L'évaluation de la stabilité de biosurfactant de la souche sélectionnée a été déterminée par la mesure de la TS et par E24.

2.5.3.1.4 Stabilité thermique

Le biosurfactant à CMC a été incubé à différentes températures pendant 24 h : 4, 20, 30, 40, 50, 70 et 100 °C. Après cette durée, les mesures de la TS et E24 ont été prises.

2.5.3.1.5 Stabilité chimique

2.5.3.1.5.1 Effet du pH : l'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH du biosurfactant à CMC de 2 à 12. Le biosurfactant a été incubé à 30 °C pendant 24 h, après cette durée, les mesures de la TS et E24 ont été prises.

2.5.3.1.5.2 Effet de la salinité : le NaCl a été ajouté au biosurfactant à différentes concentrations (0; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 100; 150; 200; 250 et 300 g.l⁻¹). Après 24 h à 30 °C, la TS et E24 ont été mesurés.

2.5.3.1.6 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de biosurfactant brut a été testée contre des microorganismes pathogènes : bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 9144 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633), bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella enterica* CIP 8039 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) et une souche de levure (*Candida albicans* ATCC 10231).

Les bactéries ont été cultivées sur milieu LB (composition en APPENDICE F) puis incubées à 37 °C pendant 1 jour. La souche de levure a été cultivée sur l'extrait de malt (composition en APPENDICE F) puis incubée à 37 °C pendant 2 jours. L'inoculum de ces souches a été préparé de façon à ajuster la turbidité à

10^6 CFU.m l^{-1} (absorbance entre 0,3 et 0,4 à 600 nm). Un volume de 100 μ l de chaque préculture a été étalé sur LB solide pour les bactéries et l'extrait de malt solide pour la levure.

La méthode de disques a été appliquée pour déterminer l'activité antimicrobienne du biosurfactant [209]. Les disques (9 mm, Bioscientific UK) ont été imprégnés avec 20, 50, 80, 110 μ l de la solution de biosurfactant (20 μ l. m l^{-1} dissous dans le méthanol). Un disque témoin a été imbibé avec le méthanol. Toutes les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. La quantité minimale inhibitrice (QMI) a été déterminée par la mesure de diamètre d'inhibition en mm.

2.5.3.2 Caractérisation biochimique (dosage de glycosides)

La concentration en glycosides a été déterminée selon la méthode décrite par VASILEVA-TONKOVA *et al.* [210]. Cette méthode est basée sur la réaction colorimétrique phénol et acide sulfurique. Deux cents (200) μ l d'échantillon purifié de biosurfactant sont additionnés avec 200 μ l de phénol (5%, m : v) puis 1 ml de H₂SO₄ est ajouté au mélange. Après homogénéisation, le mélange réactionnel est incubé à 100 °C pendant 5 min. Par suite, ce dernier est mis à l'obscurité pendant 30 min.

Après incubation, la densité optique a été mesurée à 492 nm. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant le glucose comme standard (APPENDICE D).

2.5.3.3 Caractérisation structurale de biosurfactant

2.5.3.3.1 Analyse par IRATR

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à réflexion totale atténuée série 8400, Shimadzu, Japon. Le biosurfactant purifié a été dissous dans le méthanol (CH₃OH) de 20 μ l.m l^{-1} , puis la solution a été disposée sur la plaque en inox de l'appareil d'infrarouge. Cette dernière a été laissée au repos pendant 10 min à l'air ambiant afin d'évaporer le solvant.

Les mesures d'absorption optique ont été effectuées dans les domaines moyen-IR dont les longueurs d'onde étaient comprises entre 500 et 4000 cm $^{-1}$.

2.5.3.3.2 Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse (LC-MS)

L'échantillon a été préparé comme suit: le biosurfactant purifié a été solubilisé dans une solution à 50% d'acétonitrile (ACN) (acétonitrile: eau), puis la solution a été centrifugée (6000 tr.min^{-1} pendant 5 min) et filtrée ($0,45 \mu\text{m}$). La séparation chromatographique a été réalisée sur colonne C18 ($150 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$, taille de particules $5 \mu\text{m}$) reliée au système HPLC (Agilent Technologies, USA). Le débit était de 250 ml.min^{-1} et le volume d'échantillon injecté dans la colonne était de $5 \mu\text{l}$. Une étape isocratique à 25% d'ACN, puis une élution par gradient linéaire à 50% d'ACN a été appliquée pendant 30 min et à 90% d'ACN pendant 15 min. La colonne a été lavée pendant 0,1 min, puis rééquilibrée à 25% d'ACN pendant 30 min.

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

- La tension de collision 70 eV.
- La tension d'ionisation 4,5 kV.
- Gaz d'atomisation et de solvatation (nébuliseur) N_2 pur.
- Température de désolvatation $400 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.5.4 Applications environnementales

2.5.4.1 Solubilisation des HAP

L'assimilation des HAP par les microorganismes est rendue difficile en raison de leur faible solubilité. Ce problème peut être résolu en présence d'un agent solubilisant. Pour cela, une étude a été réalisée sur la solubilité de deux HAP (naphtalène et phénanthrène) dans l'eau douce et dans l'eau de mer. Le pH de l'eau douce est de 6,85 et la salinité et le pH de l'eau de mer sont $35,5\text{‰}$ et 7,85, respectivement. Le Tween 80 a été utilisé comme témoin (surfactant chimique).

Une concentration de 100 mg.l^{-1} en naphtalène (ou en phénanthrène) a été additionnée avec 10 ml de la solution du biosurfactant brut à CMC. Les tubes ont été incubés en position verticale à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sous une agitation de 150 tr.min^{-1} , à l'obscurité et pendant 2 h. Une centrifugation à $12500 \text{ tr.min}^{-1}$ pendant 30 min à

4 °C a été réalisée. Par la suite, un volume de 5 ml de surnageant a été recueilli. L'extraction de l'hydrocarbure, dissous dans la solution de biosurfactant, a été réalisée par l'ajout d'un volume égal de DCM. Cette étape a été répétée deux fois afin de garantir que tout le naphthalène et le phénanthrène a été extrait de la solution aqueuse [144].

Après extraction, la phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre. Le liquide obtenu a été filtré à travers un filtre micropore (0,45 µm) avant d'être analysé par le spectrophotomètre UV-Visible (spectrophotomètre type Shimadzu-1100, Japon).

2.5.4.2 Remobilisation de pétrole brut

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence le rôle de biosurfactant issu de la souche performante dans la bioremédiation des sols contaminés par le pétrole brut et de ses dérivés.

Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé un échantillon de sol prélevé dans un borbier contaminé par le pétrole brut au niveau des puits du gisement Litayem (Tunisie). Ce sol se caractérise par une forte contamination par les hydrocarbures. En effet, 10 g de sol, contaminé par le pétrole brut préalablement stérilisé par autoclavage, ont été ajoutés à une solution de biosurfactant brut de volume de 100 ml et de concentration égale à celle de CMC. Par suite, le mélange a été mis sous une agitation de 200 tr.min⁻¹ à température ambiante pendant 2 h, le surnageant (contenant les hydrocarbures) a été récupéré par centrifugation. Les hydrocarbures ont été ensuite extraits deux fois par le DCM, puis l'extrait a été concentré à l'évaporateur rotatif [26]. La quantification des hydrocarbures a été réalisée par CG-SM. Le Tween 80 a été utilisé comme témoin.

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

3.1.1 Introduction

Dans l'objectif de rechercher une alternative ou une meilleure approche pour l'élimination des hydrocarbures par voie microbologique, nous présenterons dans ce chapitre les résultats obtenus sur les potentialités dégradatives de pétrole brut et deux HAP (naphtalène et phénanthrène) par des souches de streptomycètes isolées localement.

3.1. 2 Croissance de streptomycètes sur les hydrocarbures

Les trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) sont capables de croître sur le naphtalène, le phénanthrène, l'antracène, le xylène et le pétrole brut (tableau 3.1). L'aptitude à la croissance dépend de la souche et de l'hydrocarbure. D'une manière générale, ceci pourrait s'expliquer par les spécificités enzymatiques disponibles chez ce type de microorganismes, notamment, les peroxydases présentes chez ces souches [19, 20].

Tableau 3.1 : Croissance de trois souches sur différents hydrocarbures.

Substrat Souche	Naphtalène	Phénanthrène	Anthracène	Xylène	Pétrole brut
AB1	++	++	++	+	++
AH4	++	++	++	+	++
AM2	++	++	++	+	++

+ : Croissance modérée. ++ : Bonne croissance.

L'obtention d'une bonne biomasse est un indice d'adaptation des souches à dégrader les HAP (figures 3.1 et 3.2).

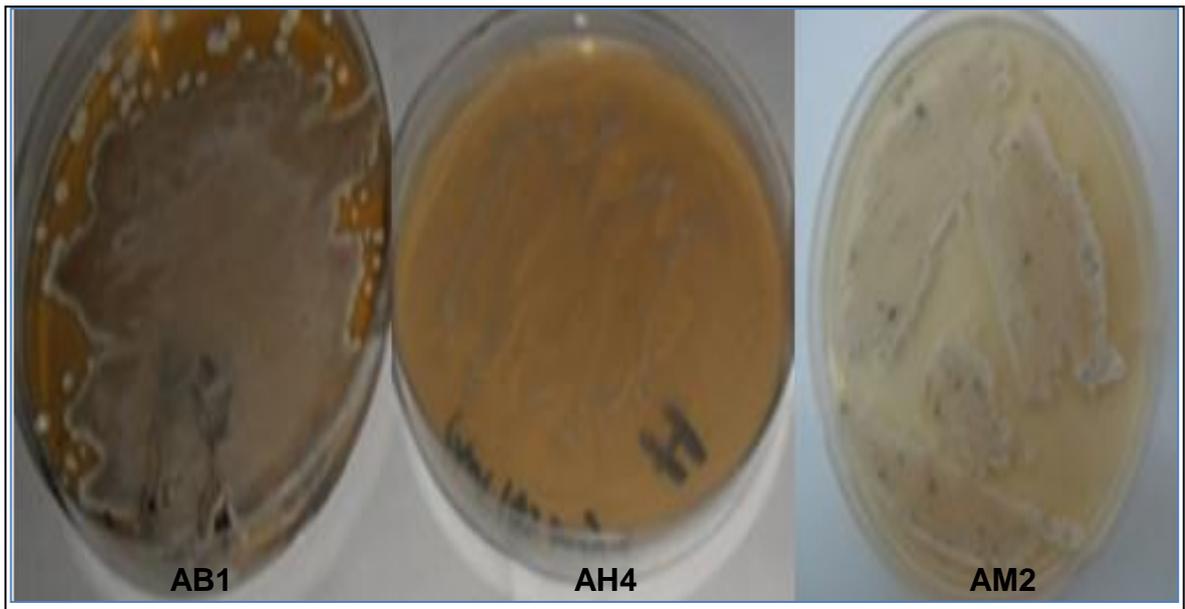


Figure 3.1 : Effet des hydrocarbures en tant que sources uniques de carbone et d'énergie sur la croissance de trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2). Exemples: AB1 avec naphthalène, AH4 avec phénanthrène et AM2 avec le xylène.

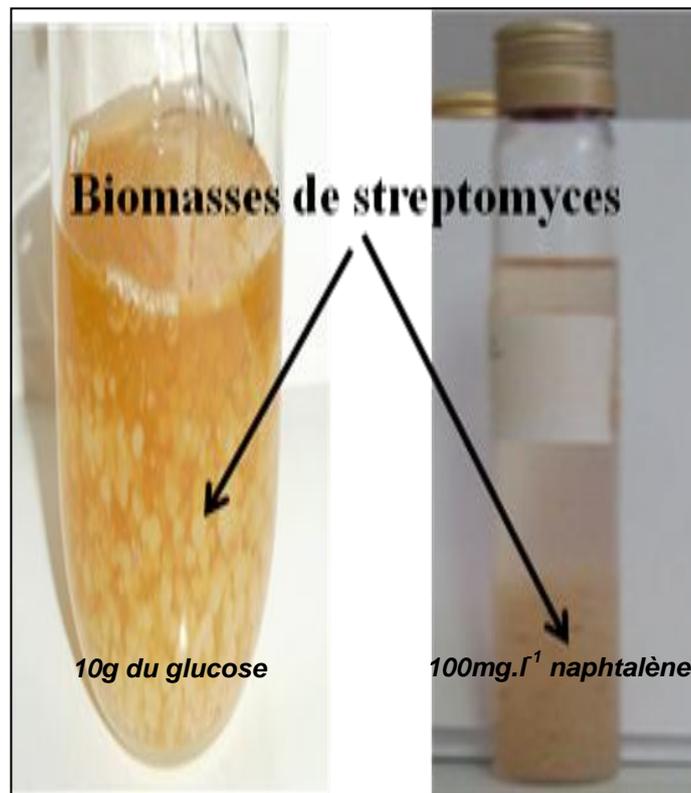


Figure 3.2 : Biomasse de cultures obtenues après une étape d'adaptation des souches de streptomycètes sur le naphthalène.

3.1.3 Etude de la biodégradation du pétrole brut

La figure 3.3 montre la croissance de trois souches de streptomycètes sur le pétrole brut. Par rapport aux premiers jours d'incubation, il y avait une disparition progressive de la couche du pétrole jusqu'au 30^{ème} jour, justifiée par la propagation importante du mycélium en surface. Ceci témoigne bien l'utilisation de pétrole brut par ces souches en tant que seule source de carbone et d'énergie. Il est à noter que le culot récolté après centrifugation de la culture de 14^{ème} jour d'incubation était de couleur beige clair alors qu'il était de couleur beige sombre à la fin de l'incubation (30^{ème} jour) et ceci semble être dû à la production des pigments mélanoïdes [79].

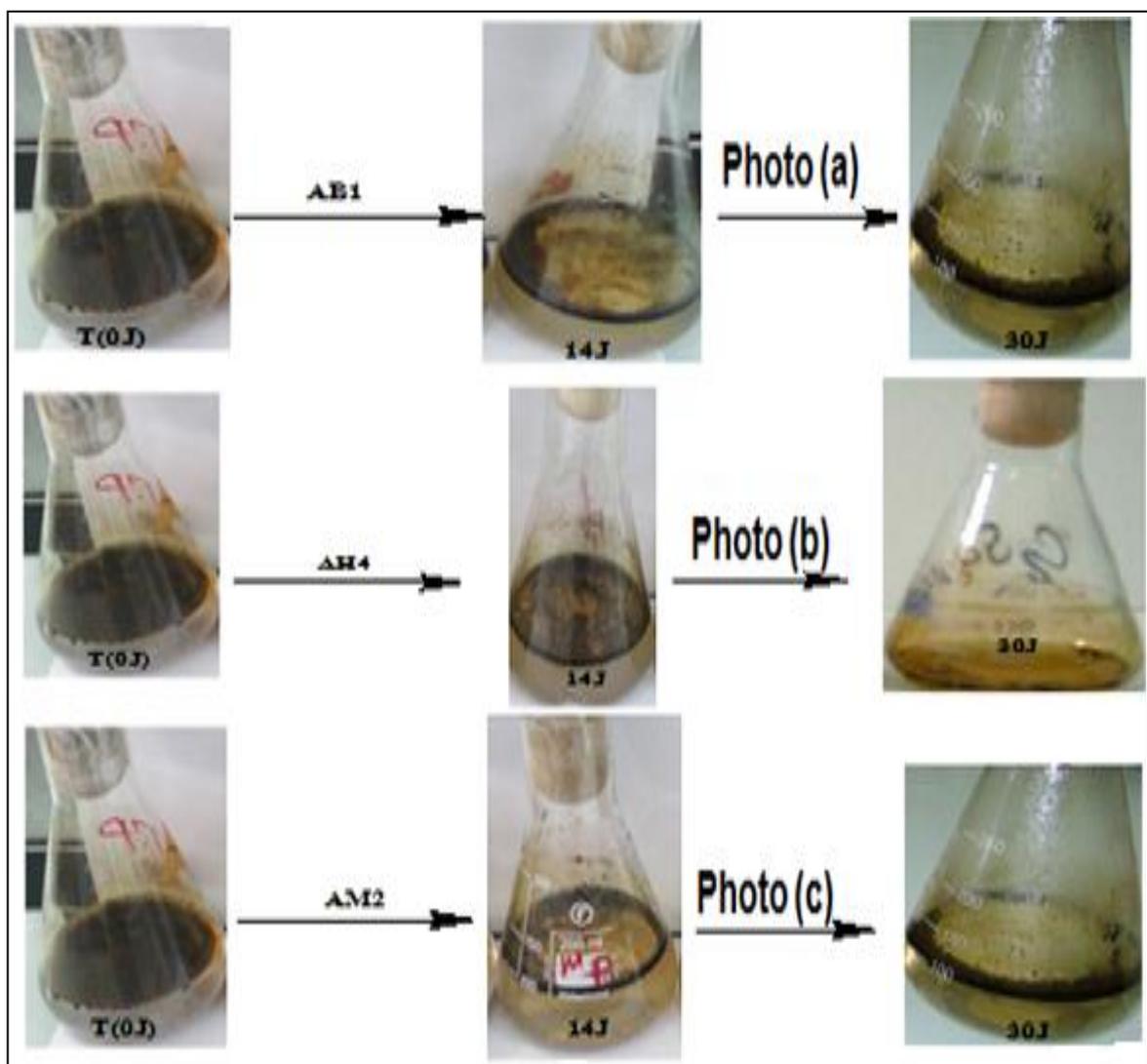


Figure 3.3 : Propagation de mycélium et disparition de la couche du pétrole:(a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4 et (c) *Streptomyces* sp. AM2.

L'observation microscopique (optique et électronique à balayage) (figure 3. 4) montre qu'il y a un changement morphologique de la souche avant et après incubation en présence du pétrole brut. Les hyphes sont entrelacés et alambiqués par rapport au témoin dont nous avons noté une zone transparente autour de groupes de fragments mycéliens. Cette zone représente la présence du biosurfactant produit dans la culture avec le pétrole brut comme rapporté ISMAIL *et al.* [150]. Egalement, la formation d'un réseau de mycélium très dense par rapport au témoin est probablement liée à la formation d'un biofilm encapsulant le pétrole [158, 206].

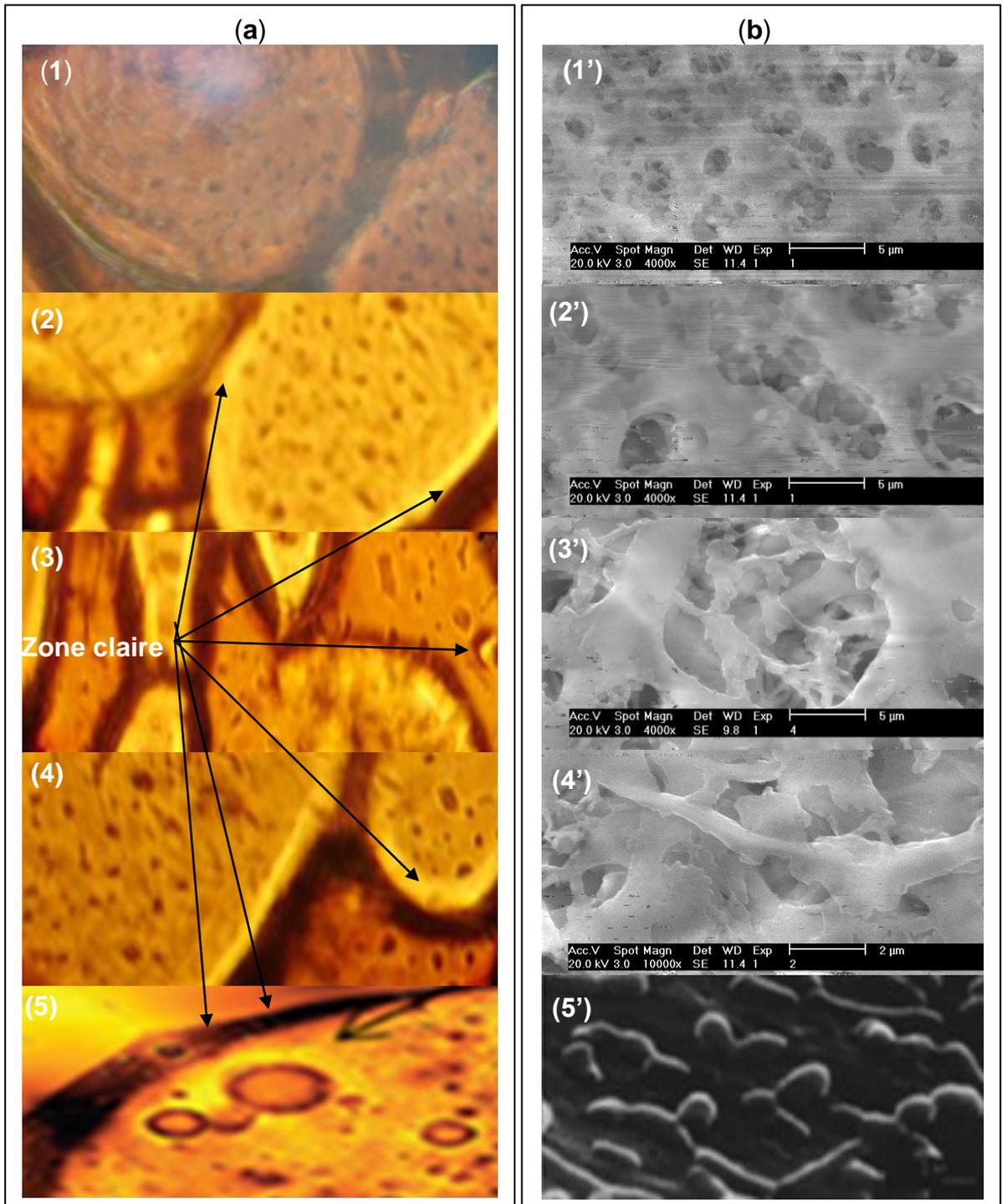


Figure 3.4 : Observations microscopiques : (a) optique ($\times 100$) et (b) microscopique électronique à balayage ($\times 4000$) du mycélium de trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) avant et après la biodégradation du pétrole brut (1% (v : v), 30 °C, pH = 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (1 et 1') culture à t₀, (2 et 2') par AB1, (3 et 3') par AH4, (4 et 4') par AM2, (5) photo de référence par microscope optique [150] et (5') photo de référence par MEB sur le pétrole brut [206].

Les analyses par CG-SM ont permis de déterminer le pourcentage de dégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (n-C₁₁ à n-C₃₀). Les spectres de pétrole témoin et de pétrole résiduel après 30 jours d'incubation sont présentés dans la figure 3.5.

Ces spectres sont traduits en pourcentages de dégradation comme le montre la figure 3.6. En outre, les spectres de CG-SM après 14 jours sont aussi donnés en APPENDICE D.

Nous traitons séparément les résultats de dégradation pour chaque souche après 30 jours d'incubation comme suit :

○ Streptomyces sp. strain AB1

Une dégradation totale (100%) pour n-C₁₁, une forte dégradation (> 80%) pour n-C₁₂, n-C₁₇ et n-C₂₅, n-C₂₇ à n-C₂₉ et une dégradation modérée (50 à 80%) pour n-C₁₃ à n-C₁₆, n-C₁₈ à n-C₂₄, n-C₂₆ et n-C₃₀.

○ Streptomyces sp. strain AH4

Des forts pourcentages de dégradation (> 80%) pour n-C₁₁, n-C₁₄, n-C₁₉, n-C₂₀, n-C₂₁, n-C₂₃ à n-C₃₀ et des taux de dégradation modérés (60 à 80%) pour n-C₁₂, n-C₁₃, n-C₁₅, n-C₁₆, n-C₁₇, n-C₁₈ et n-C₂₂.

○ Streptomyces sp. strain AM2

Dégradation totale de n-C₁₁, forte dégradation pour n-C₂₈ et n-C₂₉ (> 80%), dégradation modérée pour n-C₁₂ à n-C₁₅, n-C₁₇ à C₂₇ et n-C₃₀ (50 à 79%) et faible dégradation pour n-C₁₆ (40,42%).

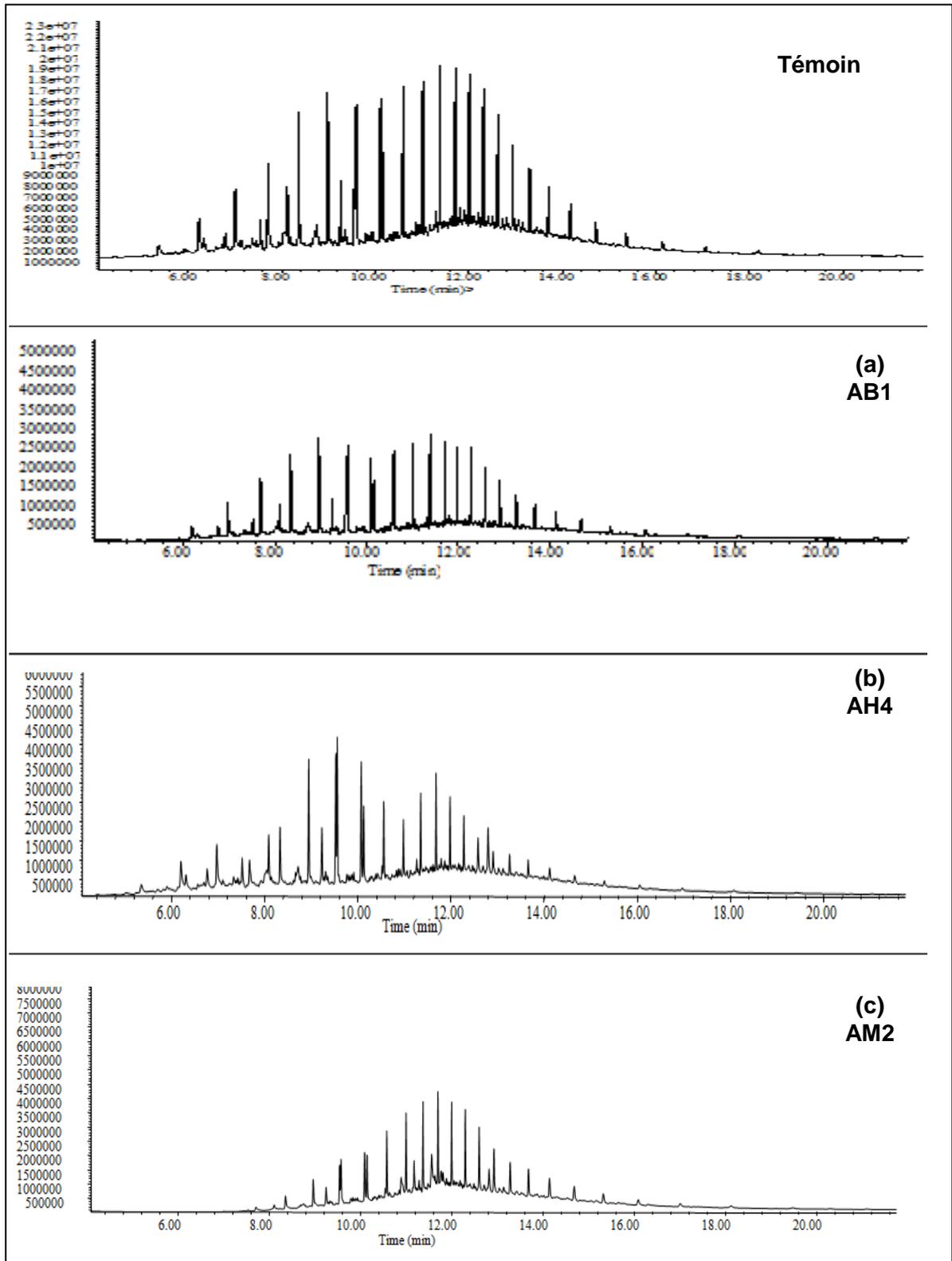


Figure 3.5 : Spectres CG-SM de la dégradation du pétrole brut (1%, v : v) par: (a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4 et (c) *Streptomyces* sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹) après 30 jours d'incubation.

En comparant l'effet de trois souches sur la dégradation de pétrole brut (n-alcanes) (figure 3.6) nous pouvons conclure ce qui suit :

- Une dégradation totale de n-C₁₁ (100%) par les souches AB1 et AM2 et une dégradation élevée par la souche AH4 (81,43%).
- Le n-C₁₂ a été dégradé jusqu'à 88,21; 71,65 et 51,2%, respectivement par les souches AB1, AH4 et AM2.
- Le n-C₁₃ ont été dégradés d'une manière un peu semblable par les souches AB1 (71,77%) et AH4 (70,93%) contrairement à la souche AM2 (59,3%).
- La souche AH4 dégrade bien le n-C₁₄ (80,85%) et le n-C₁₅ (78,06%) par rapport aux autres souches (AB1 et AM2).
- La souche AM2 dégrade faiblement le n-C₁₆ (40,42%) par rapport aux deux autres souches (63,5 et 57,28%, par AH4 et AB1, respectivement).
- Le n-C₁₇ a été éliminé jusqu'à 87,86; 75,68 et 71,24%, respectivement par les souches AB1, AH4 et AM2.
- La faible dégradation de n-C₁₈ a été observée chez la souche AM2 (54,01%) par rapport aux autres souches (74,7 et 70,38%, par AB1 et AH4, respectivement).
- Les moyennes de dégradation des n-alcanes de n-C₁₉ à n-C₃₀ sont de 86; 77,75 et 71,41% par AH4, AB1 et AM2, respectivement.

La figure 3.7 montre que la biodégradabilité des alcanes linéaires (n-C₁₁ à n-C₃₀) dépend de la nature de la souche d'où nous avons constaté que la souche AH4 a montré une capacité très marquée avec un taux moyenne de 80,96%. Egalement, la souche AB1 a un pouvoir dégradatif intéressant avec un taux d'élimination de 76,65%. Cependant, la capacité de la souche AM2 est considérée comme modérée avec un taux d'élimination de 67,94%. La différence des taux de dégradation entre les trois souches pourraient s'expliquer par les activités cataboliques spécifiques et caractéristiques de chaque souche comme signalé VASILEVA-TONKOVA *et al.* [210] et SAADOUN [211].

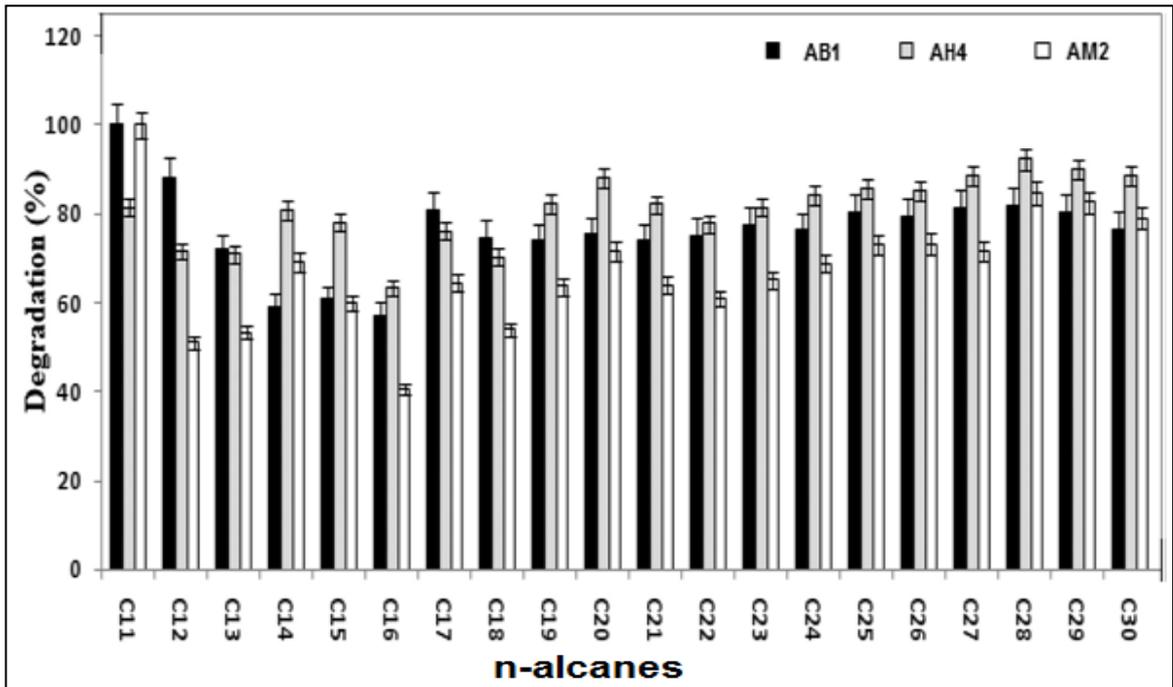


Figure 3.6 : Pourcentage de dégradation des n-alcanes par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 après 30 jours d'incubation (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

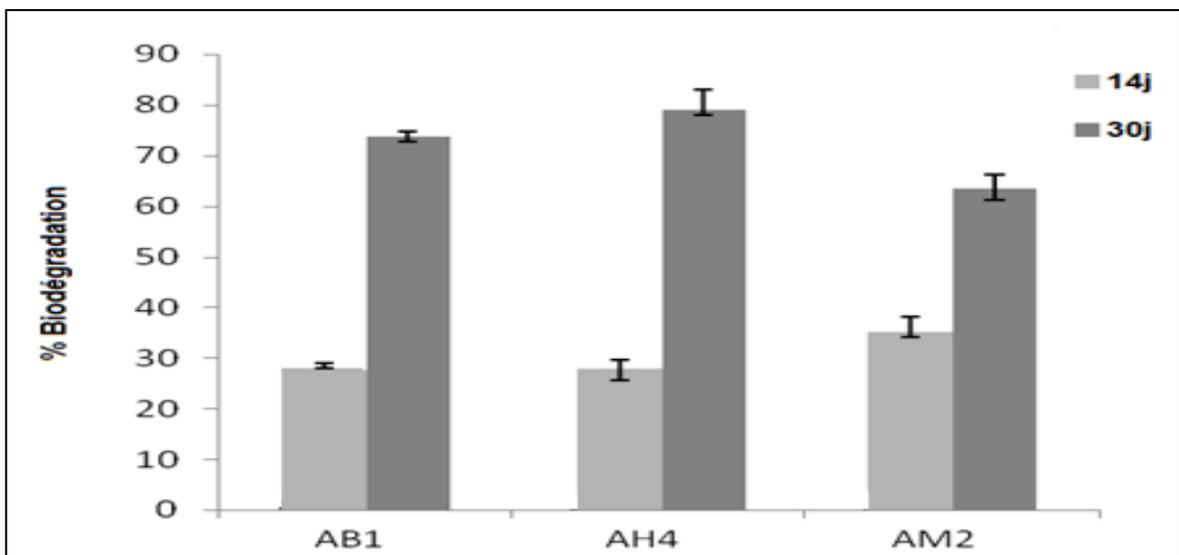


Figure 3.7 : Comparaison de la moyenne des pourcentages de tous les n-alcanes (n-C₁₁ à n-C₃₀) entre *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 après 14 et 30 jours d'incubation (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

Généralement, dans un mélange d'hydrocarbures (pétrole brut), les n-alcanes sont les premiers à être biodégradé. Cependant, leur dégradation

dépend de la longueur de chaîne. Les composés dont le nombre d'atome de carbone est inférieur à 10 sont les plus difficilement biodégradables, au-delà, ils sont considérés comme facilement biodégradables [26].

RADWAN *et al.* [212] ont isolé des souches de *Streptomyces* sp. strains (KCC26, KCC28, KCC30, KCC42) à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut. Ces souches sont capables de dégrader le n-hexadécane (n-C₁₆ à 2%, v : v) avec un taux d'élimination variant de 28 à 38% après 6 h d'incubation. Egalement, BARABAS *et al.* [213, 214] ont trouvé que *Streptomyces griseoflavus*, *Streptomyces parvus* et *Streptomyces plicatus*, isolées à partir de certains gisements pétroliers, sont capables de dégrader complètement le n-hexadécane (n-C₁₆ à 2%, v : v) et le n-octadécane (n-C₁₈ à 2%, v : v).

La souche *Streptomyces* sp. strain ERI-CPDA-1, isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole, a montré une croissance très importante sur le pétrole, le kérosène et le diesel. Elle est capable de dégrader 98,25% de diesel (0,1%, v : v) après 7 jours d'incubation à 30 °C [6].

En outre, une étude était portée sur la dégradation des n-alcanes par Lo PICCOLO *et al.* [215] d'où les résultats obtenus ont révélé que la souche d'actinomycètes *Gordonia* sp. strain SoCg pouvait croître sur une large gamme des n-alcanes (n-C₁₂ à n-C₃₆), le taux d'élimination était aux alentours de 79%. En utilisant une culture mixte de *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016 et *Rhodococcus aetherivorans* IFP 2017, les travaux DE AUFFRET *et al.* [216] ont montré que ces souches étaient efficaces pour la dégradation des n-C₁₆ (98,1 à 100%).

Geobacillus sp. strain SH-1, une bactérie thermophile isolée à 70 °C, a dégradé 70% des n-C₁₅ et n-C₁₈ pendant 5 jours d'incubation [217]. Les souches *Geobacillus pallidus* XS2 et XS3 ont montré une dégradation marquée de pétrole brut (500 mg.l⁻¹), le taux d'élimination était aux alentours de 87% après 20 jours d'incubation [218]. En utilisant une souche fongique *Pestalotiopsis* sp. strain NG007, le taux de dégradation des n-alcanes (n-C₁₂ à n-C₂₀) varie de 80 à 100% [219].

En conclusion, nos résultats obtenus, sur la dégradation du pétrole brut par les trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2), isolées localement à partir des sols de surface de la plaine de la Mitidja, concordent avec ceux des

travaux antérieurs. Ces souches ont montré donc des potentialités intéressantes à dégrader la fraction aliphatique présente dans le pétrole brut, ce qui indique qu'elles peuvent posséder des capacités de biodégradation meilleures *in situ*.

Compte-tenu de ces potentialités dégradatives importantes sur le pétrole brut, nous nous sommes incités à approfondir les recherches sur la dégradation d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (cas du naphthalène et du phénanthrène).

3.1.4 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques

L'efficacité de la dégradation des HAP dépend des facteurs biotiques et abiotiques qui sont variables selon certains paramètres, tels que le type de microorganisme, le pH, la disponibilité des nutriments et la source du carbone (polluants). A cet effet, nous nous sommes intéressés à l'étude des facteurs influençant la biodégradation des HAP à savoir: la souche, la concentration et le type du polluant.

3.1.4.1 Etude de la biodégradation du naphthalène

Les résultats de la variation du pH et de la TS au cours de la biodégradation du naphthalène sont présentés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Variation du pH et de la TS au cours de la dégradation du naphthalène par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7.2, 150 tr.min⁻¹ et durée d'incubation de 0 à 12 jours).

Paramètres	32 mg.l ⁻¹ du naphthalène			100 mg.l ⁻¹ du naphthalène		
	AB1	AH4	AM2	AB1	AH4	AM2
pH	7,13 à 6,84	7,13 à 6,82	7,24 à 6,9	7,2 à 6,76	7,2 à 6,6	7,21 à 6,7
TS (mN.m ⁻¹)	72,2 à 68	72,4 à 67	71 à 57	72,6 à 45,89	72 à 46,6	71,89 à 47,78

Les résultats obtenus montrent une légère diminution de pH du milieu contenant 100 mg.l⁻¹ de naphthalène par rapport à 32 mg.l⁻¹. La valeur finale de pH était de 6,76; 6,6 et 6,7 pour AB1, AH4 et AM2, respectivement. Cette diminution

de pH est traduite par la formation de sous produits de la biodégradation du naphthalène ayant un caractère acide [3, 204].

Nous avons également constaté une diminution de la TS pour la concentration de 100 mg.l^{-1} par rapport à 32 mg.l^{-1} du naphthalène. Par exemple, les valeurs de la TS étaient de 45,89; 46,9 et $47,78 \text{ mN.m}^{-1}$ pour AB1, AH4 et AM2, respectivement à la fin de l'incubation. Ceci est traduit par une synthèse des agents activés (biosurfactants) améliorant ainsi la biodisponibilité du contaminant.

L'étude des spectres de milieu de dégradation, à différents intervalles de temps par un balayage en longueur d'onde de l'UV-Vis, nous a permis de suivre les variations de l'intensité de la bande caractéristique du naphthalène (figure 3.8).

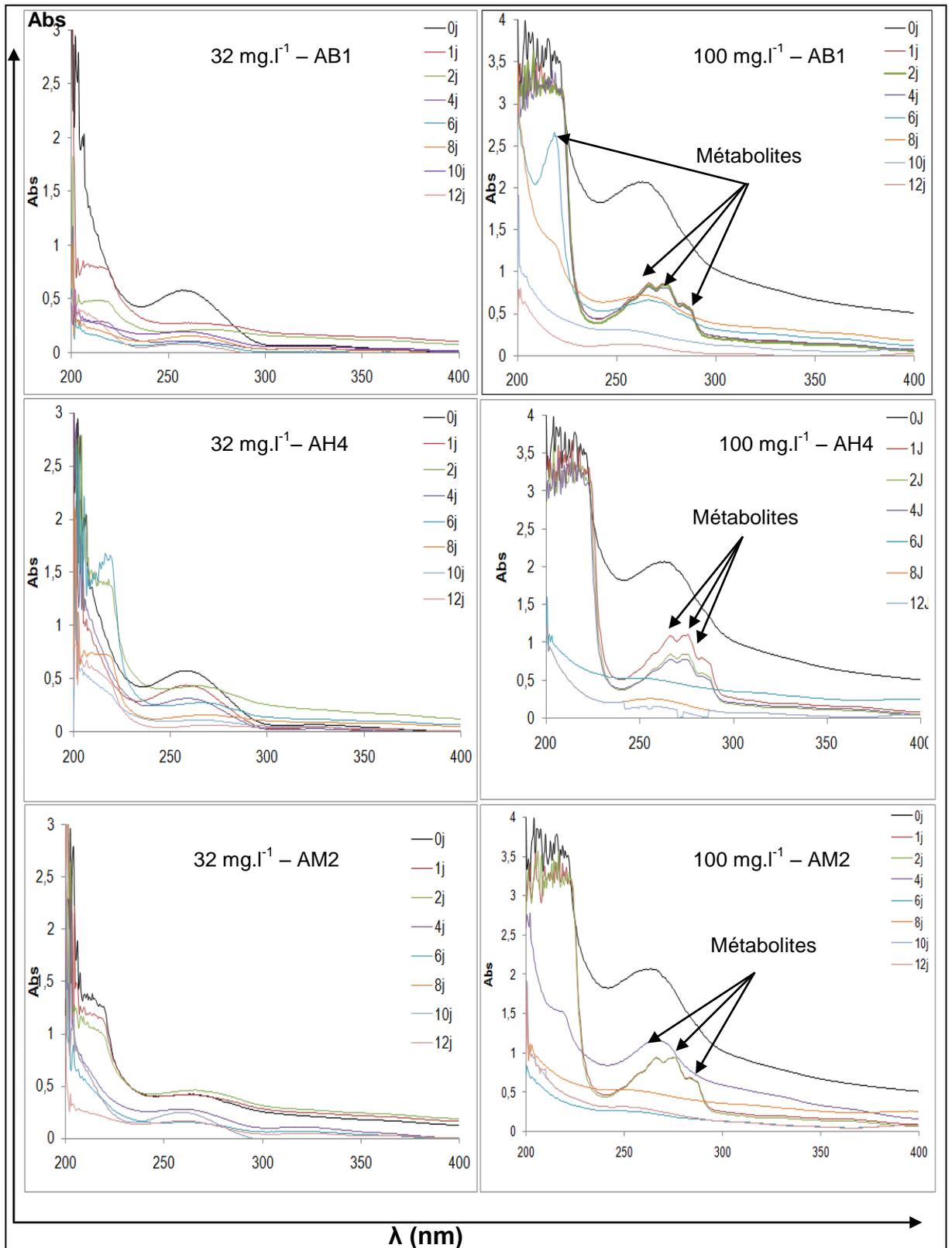


Figure 3.8 : Spectres d'absorption de l'UV-Vis du naphthalène au cours de la dégradation par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

D'après la figure 3.8, nous avons remarqué une bande d'absorbance du naphthalène entre 250 et 300 nm obtenue au temps zéro (la bande du naphthalène seul). L'intensité de cette bande diminue pendant l'incubation avec les souches AB1, AH4 et AM2 témoignant qu'une fraction importante en naphthalène à 100 mg.l⁻¹ a été dégradée par rapport à celle à 32 mg.l⁻¹. La faible dégradation du naphthalène est probablement due à l'indisponibilité du substrat.

A titre d'exemple, au bout du deuxième jour de la dégradation du naphthalène à 100 mg.l⁻¹ nous avons constaté que :

- Quatre pics majoritaires sont formés : 295,5; 261; 251 et 211,5 nm, pour la souche AB1.
- Trois nouveaux pics formés pour AH4 : 268; 276,5 et 285,5 nm.
- Trois pics majoritaires sont formés: 260; 269,5 et 293,5 nm chez la souche AM2.

Les pics formés sont associés à la formation de plusieurs métabolites présentant des maxima à différentes longueurs d'ondes. La diminution de l'intensité des pics est en fonction du temps confirmant la dégradation du naphthalène et de ses métabolites [27].

Les résultats de la cinétique de la biodégradation du naphthalène, suivies par UV-Vis à 254 nm après extraction avec l'acétate d'éthyle (figure 3.9), ont montré que :

- A 32 mg.l⁻¹, la biodégradation est ralentit, d'où les pourcentages étaient de 61,34; 60,87 et 60,53% chez AH4, AB1 et AM2, respectivement à la fin de l'incubation (12 jours).
- A 100 mg.l⁻¹, la biodégradation est bonne d'où les pourcentages étaient de 87,43; 84,13 et 83,04%, respectivement pour AH4, AM2 et AB1.
- La biodégradation du naphthalène à 100 mg.l⁻¹ est plus rapide que celle à 32 mg.l⁻¹ pour les trois souches.

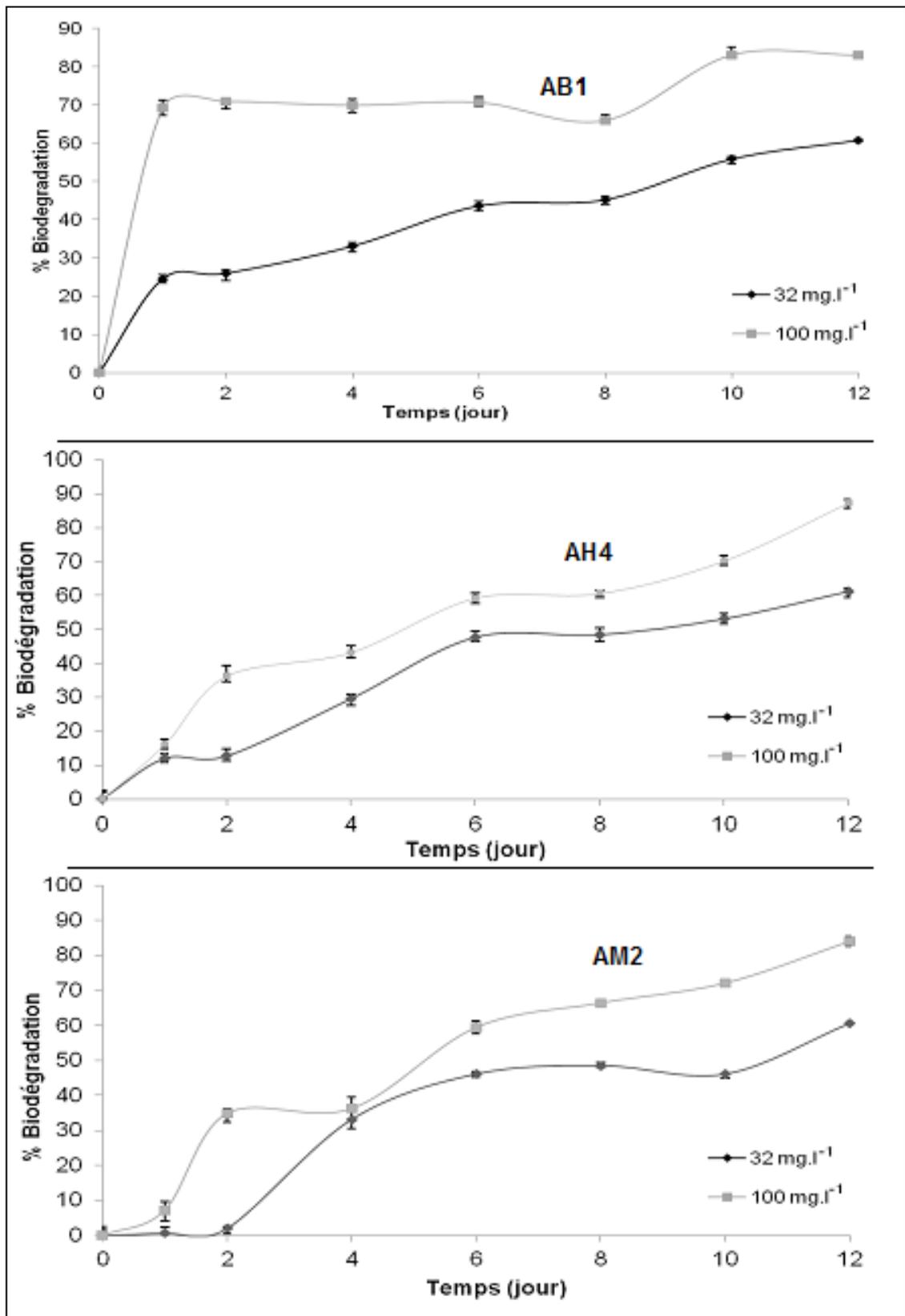


Figure 3.9 : Dégradation du naphthalène sous l'effet de la concentration (32 et 100 mg.l⁻¹) par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

La concentration de 100 mg.l^{-1} était choisie pour suivre la cinétique et la présence de sous produits de dégradation vue les meilleurs taux de dégradation révélés avec UV-Vis.

En comparant les spectres HPLC d'un échantillon du naphthalène issu d'une culture témoin (ensemencé par une biomasse autoclavée) avec celle contenant le naphthalène en présence de la souche vivante, nous remarquons des taux de dégradation élevés de 85,23; 82,36 et 81,03% avec AH4, AB1 et AM2, respectivement (figure 3.10-a).

Egalement, nous avons observé l'apparition de nouveaux pics du temps de rétention révèlent la formation de sous produits (figure 3.10-b) :

- Au temps zéro, deux temps de rétention apparus (5,987 min pour l'échantillon naphthalène témoin et 1,752 min pour le solvant).
- Après 6 jours avec la souche AB1, la surface de pic du naphthalène est presque 2/3 de témoin signifiant qu'une quantité du naphthalène a été dégradée. L'apparition de nouveaux pics ($t_{R1}= 3,323 \text{ min}$, $t_{R2}= 6,352 \text{ min}$, $t_{R3}= 11,985 \text{ min}$, $t_{R4}= 12,231 \text{ min}$, $t_{R5}= 15,632 \text{ min}$ et $t_{R6}= 16,235 \text{ min}$) représentent les sous produits de la biodégradation du naphthalène.
- Après 12 jours avec la souche AH4, nous avons remarqué une diminution importante de la surface de pic du naphthalène et une formation des sous produits par la présence de nouveaux pics ($t_{R1}= 0,706 \text{ min}$, $t_{R1}= 1,6 \text{ min}$, $t_{R3}= 2,976 \text{ min}$ et $t_{R4}= 3,401 \text{ min}$).
- Après 12 jours avec la souche AM2, la surface de pic du naphthalène est moins importante par rapport à ceux de la souche AH4 et une formation de sous produits par la présence de nouveaux pics ($t_{R1}= 3,325 \text{ min}$, $t_{R2}= 6,231 \text{ min}$, $t_{R3}= 7,230 \text{ min}$ et $t_{R4}= 7,653 \text{ min}$).

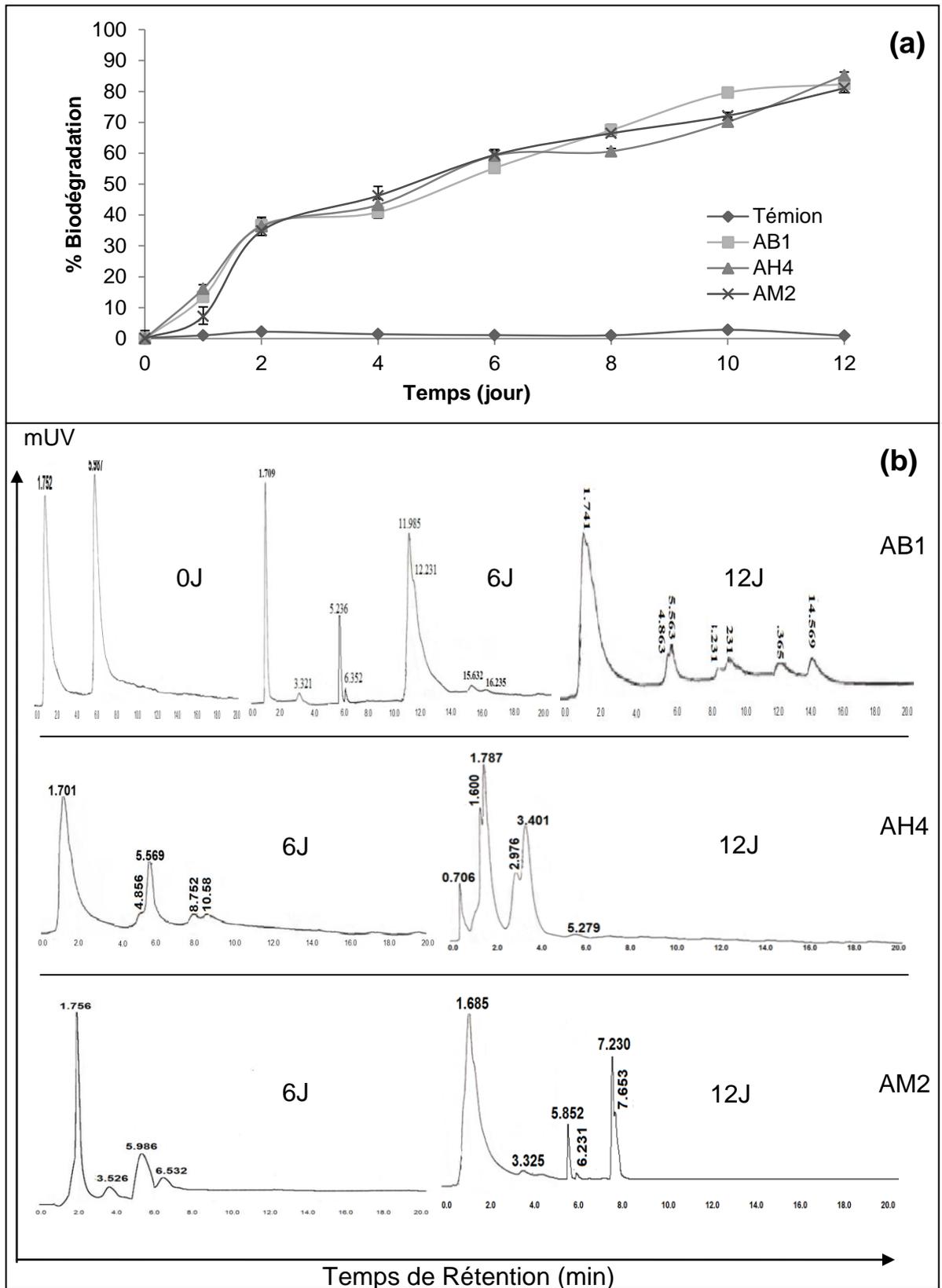


Figure 3. 10 : Spectres HPLC de la dégradation du naphthalène (100 mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 (30°C , $\text{pH} = 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

3.1.4.2 Etude de la biodégradation du phénanthrène

Le tableau ci-dessous (3.3) montre les résultats de la variation du pH et de la TS au cours de la biodégradation du phénanthrène.

Tableau 3.3 : Variation du pH et de la TS au cours de la dégradation du phénanthrène par les trois souches de streptomycètes (30 °C, pH= 7.2, 150 tr.min⁻¹ et durée d'incubation de 0 à 12 jours).

Paramètres	1,4 mg.l ⁻¹ du phénanthrène			100 mg.l ⁻¹ du phénanthrène		
	AB1	AH4	AM2	AB1	AH4	AM2
pH	7,2 à 6,84	7,2 à 6,86	7,13 à 6,74	7,2 à 6,41	7,18 à 6,61	7,13 à 6,55
TS (mN.m ⁻¹)	72 à 68,84	72,6 à 61,89	73 à 68,55	71 à 40,1	72 à 45,89	71 à 45,12

Une faible diminution du pH à 1,4 mg.l⁻¹ (6,84; 6,86 et 6,74 avec AB1, AH4 et AM2, respectivement) qu'à 100 mg.l⁻¹ (6,41; 6,61 et 6,55 avec AB1, AH4 et AM2, respectivement). Cette diminution du pH semble être due à la présence des sous produits de caractère acide tels que l'acide phtalique et l'acide benzoïque [198, 204].

Une réduction de la TS a été observée pour la concentration 100 mg.l⁻¹ qu'à 1,4 mg.l⁻¹. Les valeurs de la TS étaient 40,1; 45,89 et 45,12 mN.m⁻¹ chez AB1, AH4 et AM2, respectivement. Cette diminution de la TS révèle une production de biosurfactants provoquant une solubilisation du phénanthrène en milieu de culture.

L'évolution de la biodégradation du phénanthrène, à différents intervalles de temps, a été estimée par un balayage en longueur d'onde de l'UV-Vis et les résultats sont présentés sur la figure 3.11.

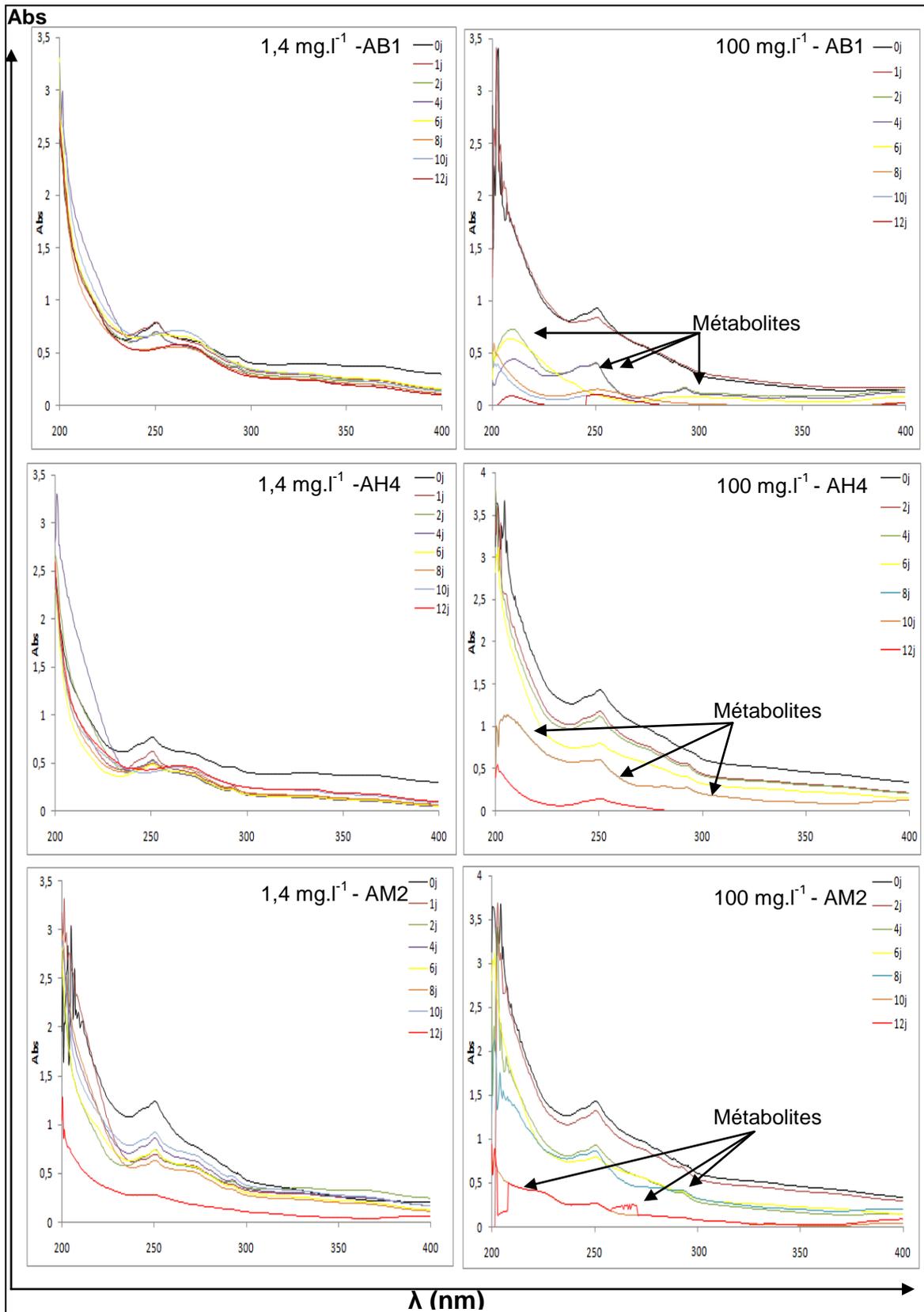


Figure 3.11 : Spectres d'absorption UV-Vis du phénanthrène au cours de la dégradation par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

Les spectres UV-Vis montrent:

- Une bande caractéristique autour de 250 à 280 nm attribuée à l'absorbance du phénanthrène au temps zéro.
- Une diminution importante de l'intensité du phénanthrène à 100 mg.l⁻¹ par rapport à celle à 1,4 mg.l⁻¹ au cours du temps, ceci confirme une dégradation meilleure du phénanthrène à 100 mg.l⁻¹ qu'à 1,4 mg.l⁻¹.
- Quatre nouveaux pics majoritaires se sont formés au bout de 4^{ème} jours (211,5; 245; 251 et 295,5 nm) chez la souche AB1.
- Trois nouveaux pics majoritaires se sont formés au bout de 10^{ème} jours (210, 246 et 294 nm) chez la souche AH4.
- Trois nouveaux pics majoritaires se sont formés au bout de 12^{ème} jours (210,5; 252,5 et 270,5 nm) chez la souche AM2.

La présence de nouveaux pics explique la présence des sous produits de la dégradation du phénanthrène par les trois souches de streptomycètes.

Les résultats de la cinétique de la biodégradation du phénanthrène révélés par UV-Vis à 252 nm après extraction avec l'acétate d'éthyle (figure 3.12) montrent:

- Une bonne efficacité de dégradation de 100 que 1,4 mg.l⁻¹ du phénanthrène par AB1 (97,5%), AM2 (93,55%) et AH4 (93%).
- Une bonne dégradation de 1,4 mg.l⁻¹ (77,12%) par AM2 par rapport aux AB1 (23,57%) et AH4 (40%).
- Une rapidité importante de la dégradation de 100 mg.l⁻¹ chez les trois souches.
- Une activité différente entre les trois souches dans dégradation du phénanthrène.

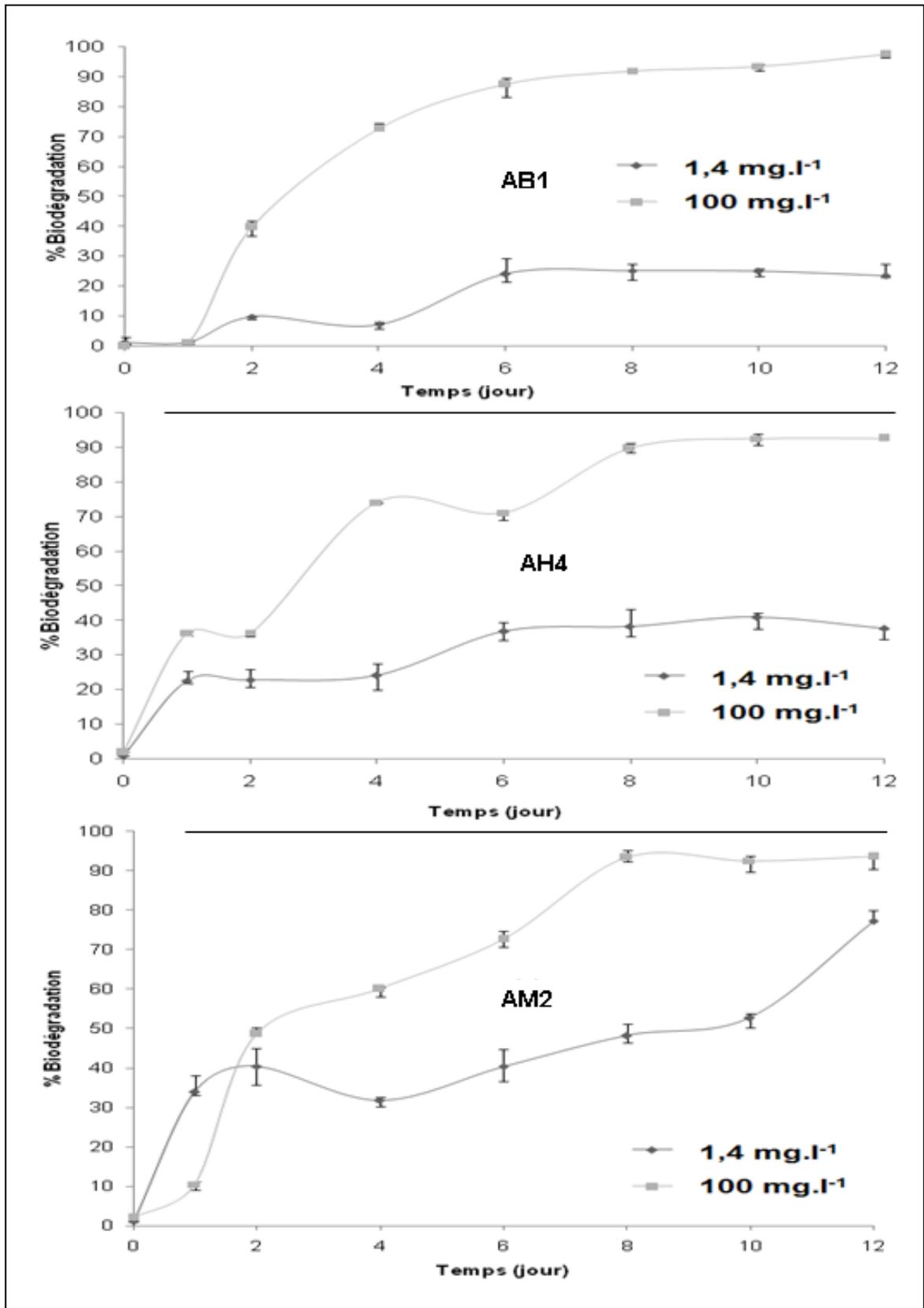


Figure 3.12 : Dégradation du phénanthrène sous l'effet de la concentration (1,4 et 100 mg.l⁻¹) par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

Les cinétiques de dégradation du phénanthrène à 100 mg.l^{-1} par AB1, AH4 et AM2 ont été aussi confirmées par HPLC et sont présentées sur la figure 3.13 (a et b).

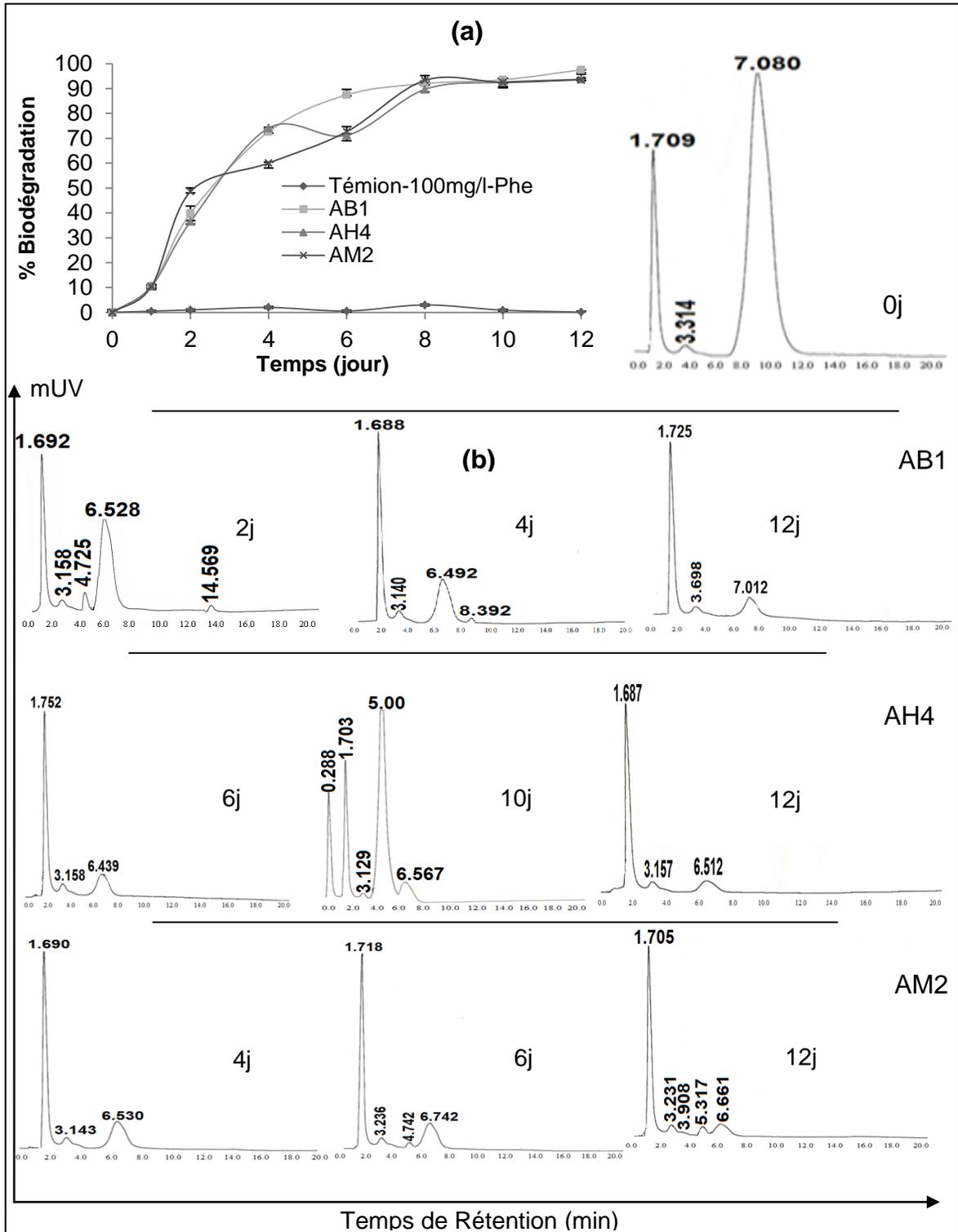


Figure 3.13 : Spectres HPLC de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 ($30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

Les résultats de la cinétique obtenus (figure 3.12-a) ont révélé une bonne élimination de 100 mg.l⁻¹ du phénanthrène: 98,52; 93,71 et 93,55% par AB1, AH4 et AM2, respectivement après 12 jours d'incubation.

Egalement, l'étude des spectres HPLC (figure 3.13-b) a montré que :

- La diminution du temps de rétention (tR0= 7,08 min de témoin) du phénanthrène implique l'efficacité de la dégradation de cet HAP par les souches.
- La présence de nouveaux pics du temps de rétention confirme la présence de sous produits qui sont formés au cours de la dégradation du phénanthrène.
- La disparition du temps de rétention implique la transformation de ces métabolites en d'autres composés.

A titre d'exemple, le tableau 3.4 résume les temps de rétention (apparition /disparition) au cours de la dégradation du phénanthrène par AB1.

Tableau 3.4 : Temps de rétention (apparition/disparition) au cours de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l⁻¹) par la souche AB1.

Temps de rétention (min)	
2 jours d'incubation	4 jours d'incubation
tR1=3,158 min (apparition)	tR1=3,14 min (stable)
tR2=4,725 min (apparition)	tR2=4,725 min (disparition)
tR3=14,569 min (apparition)	tR3=14,569 min (disparition)
	tR4=8,392 min (apparition)

3.1.5 Étude comparative de l'action des streptomycètes sur le naphtalène et le phénanthrène

La figure ci-dessous (3.14) montre les cinétiques de la dégradation, révélées par HPLC, des HAP (naphtalène et phénanthrène) à 100 mg.l⁻¹ par les trois souches.

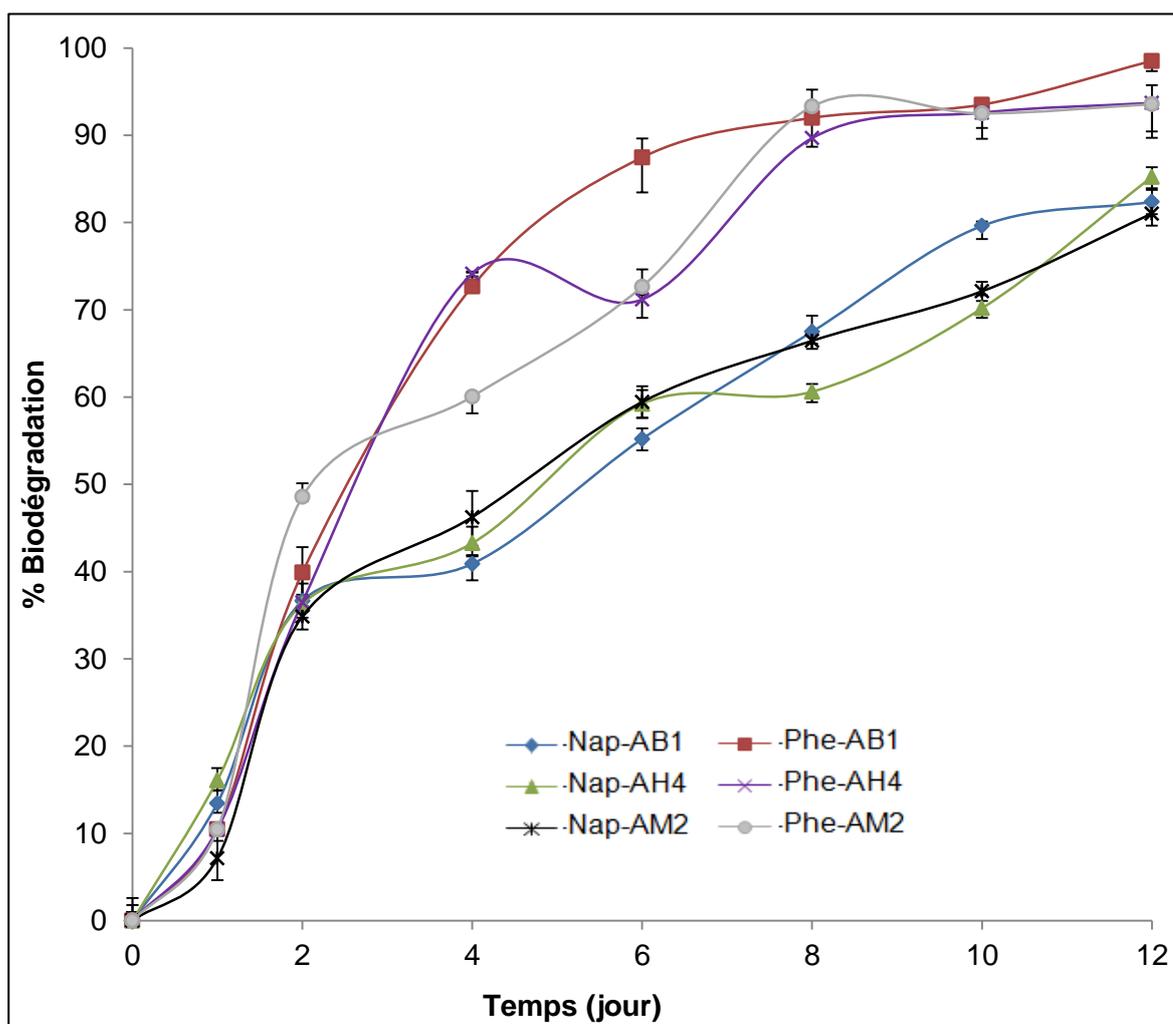


Figure 3. 14 : Cinétique de dégradation du naphthalène (100 mg.l^{-1}) et phénanthrène (100 mg.l^{-1}) par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

La cinétique de dégradation du naphthalène et du phénanthrène montre que les trois souches possèdent un pouvoir dégradatif remarquable (figure 3.14). Une efficacité élevée pour les trois souches vis-à-vis le phénanthrène (98,52%; 93,17% et 92,55%) comparativement au naphthalène (82,36%; 85,23% et 81,03%) pour AB1, AH4 et AM2, respectivement.

Les résultats recueillis dans le tableau 3.5 montrent que les souches AB1, AH4 et AM2 sont très actives dans la dégradation de deux HAP et sont productrices de biosurfactants.

Tableau 3.5 : Etude comparative de la dégradation des HAP par les trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) à 12 jours d'incubation.

	Naphtalène			Phénanthrène		
	pH	TS	% D	pH	TS	% D
AB1	6,79	49,89	82,36	6,41	40,1	98,52
AH4	6,61	45,89	85,23	6,61	45,62	93,71
AM2	6,72	47,78	81,03	6,55	45,12	92,55

Au cours de dégradation des naphtalène et phénanthrène par les trois souches, le pH du milieu de culture diminue progressivement et cela est du à la production de sous produits. Ces résultats sont similaires à ceux observés par CHEN *et al.* [5] et par WU *et al.* [204]. L'augmentation de l'acidité est plus probablement associée à la production de métabolites acides tels que l'acide benzoïque et l'acide phtalique [5, 204, 220].

Les valeurs de la TS au cours de la dégradation (45,89 – 49,89 mN.m⁻¹ et 40,1– 45,62 mN.m⁻¹ pour le naphtalène et le phénanthrène, respectivement) confirment la production de biosurfactants. Plusieurs chercheurs ont rapporté que la production de biosurfactants par les microorganismes hydrocarbonoclastes est une étape essentielle dans la dégradation des composés hydrophobes (HAP). Les résultats de MNIF [27] ont montré la solubilisation et la dégradation du phénanthrène (200 mg.l⁻¹) par un consortium PHMM d'où la TS du milieu de dégradation diminue de 59 à 34,7 mN.m⁻¹. Les souches de *Novosphingobium* sp. strain PCY, *Ralstonia* sp. strain BPH, *Microbacterium* sp. strain BPW, *Alcaligenes* sp. strain SSK1B et *Achromobacter* sp. strain SSK4, isolées par WONGWONGSEE *et al.* [221] à partir des sédiments contaminés artificiellement par les hydrocarbures, ont permis la dégradation du phénanthrène à 100 mg.l⁻¹ (50 – 76%, après 14 jours d'incubation) et la TS varie entre 48 et 54 mN.m⁻¹. Par contre ces mêmes souches capables de réduire la TS au cours de la dégradation de pétrole entre 29 à 34 mN.m⁻¹. De plus, REDDY *et al.* [222] ont confirmé que la production du biosurfactant par *Brevibacillus* sp. strain PDM-3 au cours de la biodégradation du phénanthrène.

En revanche, les résultats obtenus par nos souches ont montré que les concentrations initiales en naphthalène à 32 mg.l^{-1} et en phénanthrène à $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ ne sont pas toxiques mais elles provoquent un retard en biodégradation des HAP. Ce retard peut être dû à la faible concentration du substrat (polluant) qui influe sur la disponibilité et donc un faible contact entre la souche et le substrat [5].

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par LIN *et al.* [5] (à 100 mg.l^{-1} du naphthalène, 98,08% avec *Bacillus fusiformis* BFN après 3 jours d'incubation), PRABHU et PHALE [223] (100 à 1000 mg.l^{-1} du phénanthrène, une minéralisation presque totale par *Pseudomonas sp.* strain PP2), ZHAO *et al.* [13] (à 250 mg.l^{-1} du phénanthrène, 96% par *Pseudomonas stutzeri* ZP2 durant 6 jours d'incubation), ZHAO *et al.* [191] (à 250 mg.l^{-1} du phénanthrène, 82,2% par une culture mixte de *Bacillus subtilis* BUM et *Pseudomonas aeruginosa* P-CG3 après 30 jours d'incubation), MNIF [27] (à 200 mg.l^{-1} du phénanthrène, 98% au bout du 10^{ème} jour par un consortium PHMM) et PATHAK *et al.* [224] (à 100 mg.l^{-1} du naphthalène, 97% par *Pseudomonas sp.* strain HOB1 après 24 h d'incubation).

Egalement, DJEFAL-KERRAR *et al.* [225] ont montré que la souche *Rhodococcus erythropolis* B4 dégrade efficacement les deux HAP (naphthalène et anthracène) à forte concentration et que le taux de dégradation dépend de la concentration initiale en HAP. Les meilleurs taux de dégradation ont été obtenus à 1000 et 1500 mg.l^{-1} pour le naphthalène, où 99,46 et 82,02%, respectivement ont été atteints après 5 jours d'incubation. Pour l'anthracène, ils ont révélé deux taux de dégradation maximum de 87 et 69% en présence de 700 et 1000 mg.l^{-1} respectivement après 11 jours d'incubation. La forte dégradation des HAP à des concentrations élevées est due à la formation de force importante qui facilite le transfert de masse du naphthalène ou du phénanthrène entre la phase aqueuse et la phase solide [225, 226] et favorise la production de biosurfactants par les microorganismes. Par contre MORASCH *et al.* [227] ont montré que l'augmentation de la concentration du substrat peut entraîner des effets toxiques sur la croissance des microorganismes. Ainsi que des métabolites toxiques peuvent s'accumuler dans le milieu de croissance.

Nos souches ont des capacités meilleures à dégrader le phénanthrène que le naphthalène. Ces résultats sont similaires à ceux observés par WONGWONGSEE *et al.* [221] avec la souche *Ralstonia sp.* strain BPH qui

dégrade plus efficacement le phénanthrène que le naphthalène. Cependant, *Streptomyces* sp. strain ERI-CPDA-1 dégrade 99,14% du naphthalène et seulement 17,5% du phénanthrène pendant de 7 jours d'incubation. Cela suggère que l'isolat ERI- CPDA- 1 pouvait survivre et dégradait rapidement le naphthalène que le phénanthrène à des concentrations variant entre 100 et 1000 mg.l⁻¹ [6]. MAHANTY *et al.* [228] ont montré que *Mycobacterium frederiksbergense* dégrade bien le pyrène (88,5%) que le naphthalène (66,8%) à une concentration initial de 50 mg.l⁻¹.

La différence de la biodégradation du naphthalène et du phénanthrène entre les streptomycètes peut être due à la différence dans les gènes codants des voies cataboliques de ces deux HAP [221].

En conclusion, nos résultats montrent que les trois souches locales de streptomycètes peuvent modifier ou développer de nouvelles stratégies métaboliques afin de s'adapter au milieu contaminé par les composés hydrophobes. Par ailleurs, la dégradation du naphthalène et du phénanthrène produit de nouveaux pics (détectés par HPLC et par UV-Vis) au cours de la dégradation de ces HAP. A cet effet, dans la section 3.2 qui suit nous allons étudier et discuter la production des métabolites intermédiaires de la dégradation du naphthalène et du phénanthrène par ces trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2).

3.2 IDENTIFICATION DES INTERMEDIARES METABOLIQUES ISSUS DE LA DEGRADATION DU NAPHTALENE ET DU PHENANTHRENE PAR LES TROIS SOUCHES DE STREPTOMYCETES

3.2.1 Introduction

Les expériences précédentes ont montré l'efficacité de la dégradation du naphthalène et du phénanthrène par les streptomycètes (AB1, AH4 et AM2), ceci nous a permis d'étudier les sous produits de cette dégradation sous culture contrôlée (T °C, pH et agitation). Afin de détecter ces métabolites, nous avons procédé par les analyses UV-Vis, FTIR et CG-SM.

La figure 3.15 montre un changement de couleur du transparent avec le témoin au jaune foncé et/ou marron dans le cas du naphthalène et au jaune claire dans le cas du phénanthrène. Cette variation de couleur semble être due à l'accumulation des métabolites intermédiaires principalement le catéchol et l'acide phtalique [204, 229].

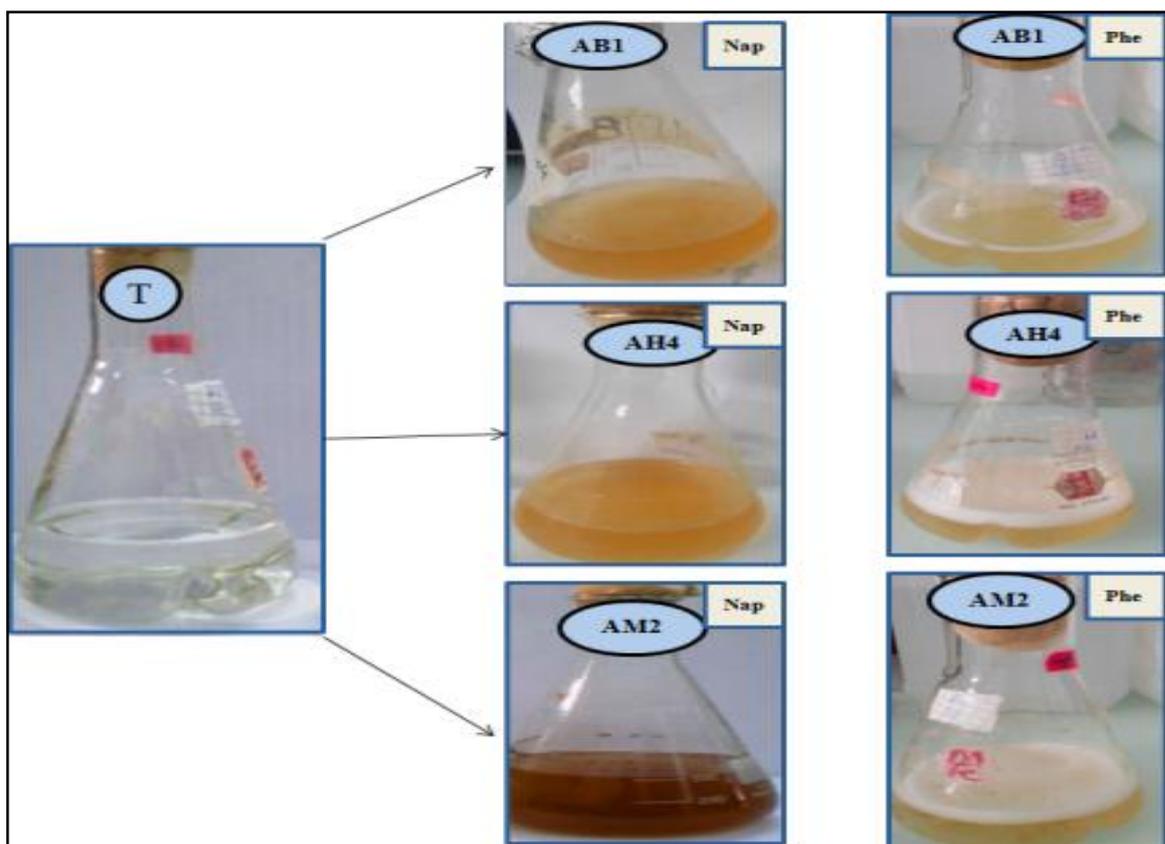


Figure 3.15 : Dégradation du naphthalène (Nap) et du phénanthrène (Phe) par *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2 (100 mg.l^{-1} , $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

3.2.2 Métabolites issus de la dégradation aérobie du naphtalène

Les spectres UV-Vis de la fraction simple (T-Nap : (d)) et des fractions acides (FA) et neutres (FN) en fin d'incubation (12 jours) sont présentés sur la figure 3.16 (a, b, c et d).

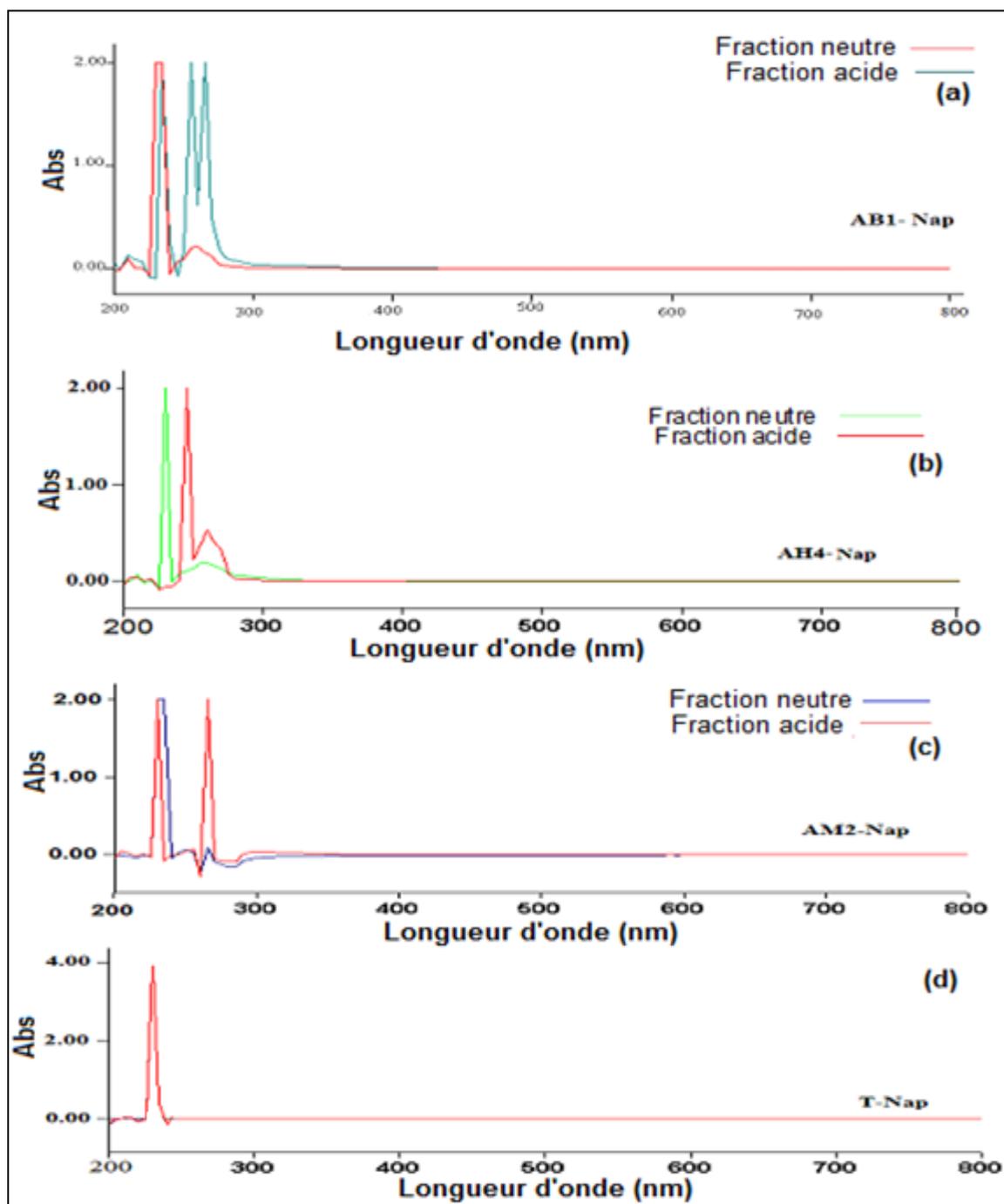


Figure 3.16 : Spectre UV-Vis des fractions intermédiaires des cultures sur le naphtalène (100 mg.l^{-1} , 12 jours d'incubation, $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$ et 150 tr.min^{-1}). (a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4, (c) *Streptomyces* sp. AM2 et (d): fraction simple (T-Nap).

Le spectre de la fraction simple (T-Nap) est caractérisé par une seule absorbance autour de 227 nm, ce maximum de longueur d'onde est dû à la présence de la double liaison aromatique (C=C) du naphthalène.

Les nouveaux pics d'absorbances par l'UV-Vis des fractions acides et neutres chez AB1, AH4 et AM2 par rapport au T-Nap sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Longueurs d'onde d'absorption par UV-Vis pour les fractions acides et neutres de dégradation du naphthalène chez les trois souches comparées à la fraction simple.

Souches	Longueur d'onde (nm)	
	Fraction neutre	Fraction acide
AB1	265	278
	232,5	262,5
		237,5
AH4	225,5	253,5
		263
AM2	264	264
	237	231
T- naphthalène	227	

Ces pics confirment la présence des métabolites, qui sont formés entre la gamme d'absorption de 232,5 à 278 nm pour AB1, de 225,5 à 263 nm pour AH4 et de 231 à 264 nm pour AM2.

En se basant sur la littérature [204, 230, 231, 232, 233], nous pouvons dire que la bande d'absorption autour de 260 nm est attribuée à la transition n- π du cycle aromatique du système π conjugué. Les bandes d'absorption entre 220 et 265 nm (autour de 230 et de 250 nm) portent des caractéristiques d'absorption du cycle aromatique et du benzène. L'absorption autour de 270 à 300 nm est affectée à la transition n - π^* des dérivés carbonyles pour les aldéhydes et les cétones et

l'absorption autour de 205 à 230 nm pour les esters et les acides. L'absorbance autour de 210 à 270 nm est attribuée à la transition π - π^* des composés phénoliques.

HADIBARATA *et al.* [234] ont rapporté que le spectre UV-Vis de la dégradation du naphthalène par la souche fongique *Armillaria* sp. strain F022 montre deux pics d'absorbance à 220 et à 273 nm, qui correspondent à l'acide benzoïque.

Les résultats de trois fractions (FN, FA et FS), suivies par IRTF, sont présentés sur les figures 3.17, 3.18 et 3.19.

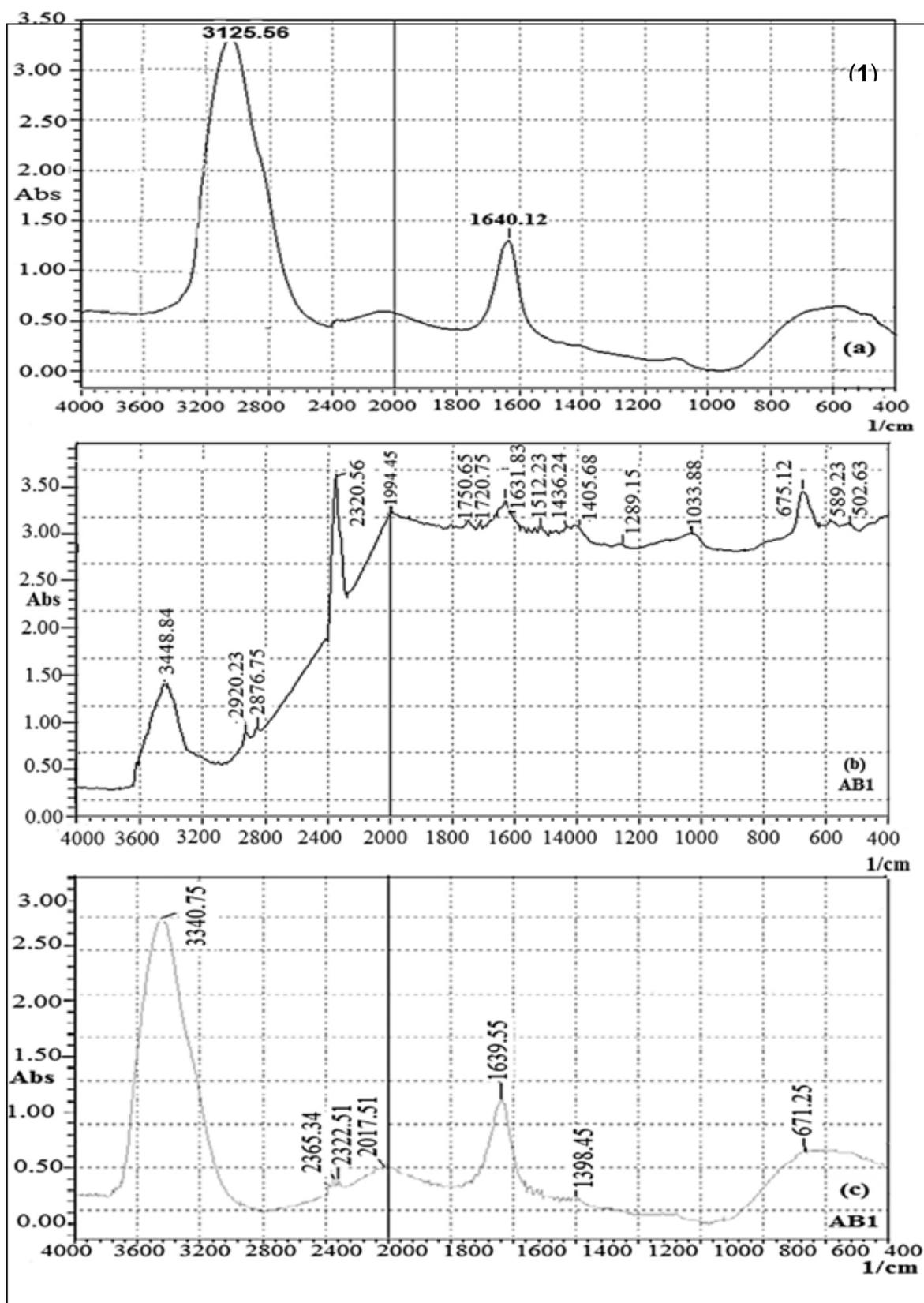


Figure 3.17 : SpectresIRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphthalène par *Streptomyces* sp AB1 (100 $mg.l^{-1}$, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 $tr.min^{-1}$). (a) fraction simple, (b) fraction neutre et (c) fraction acide.

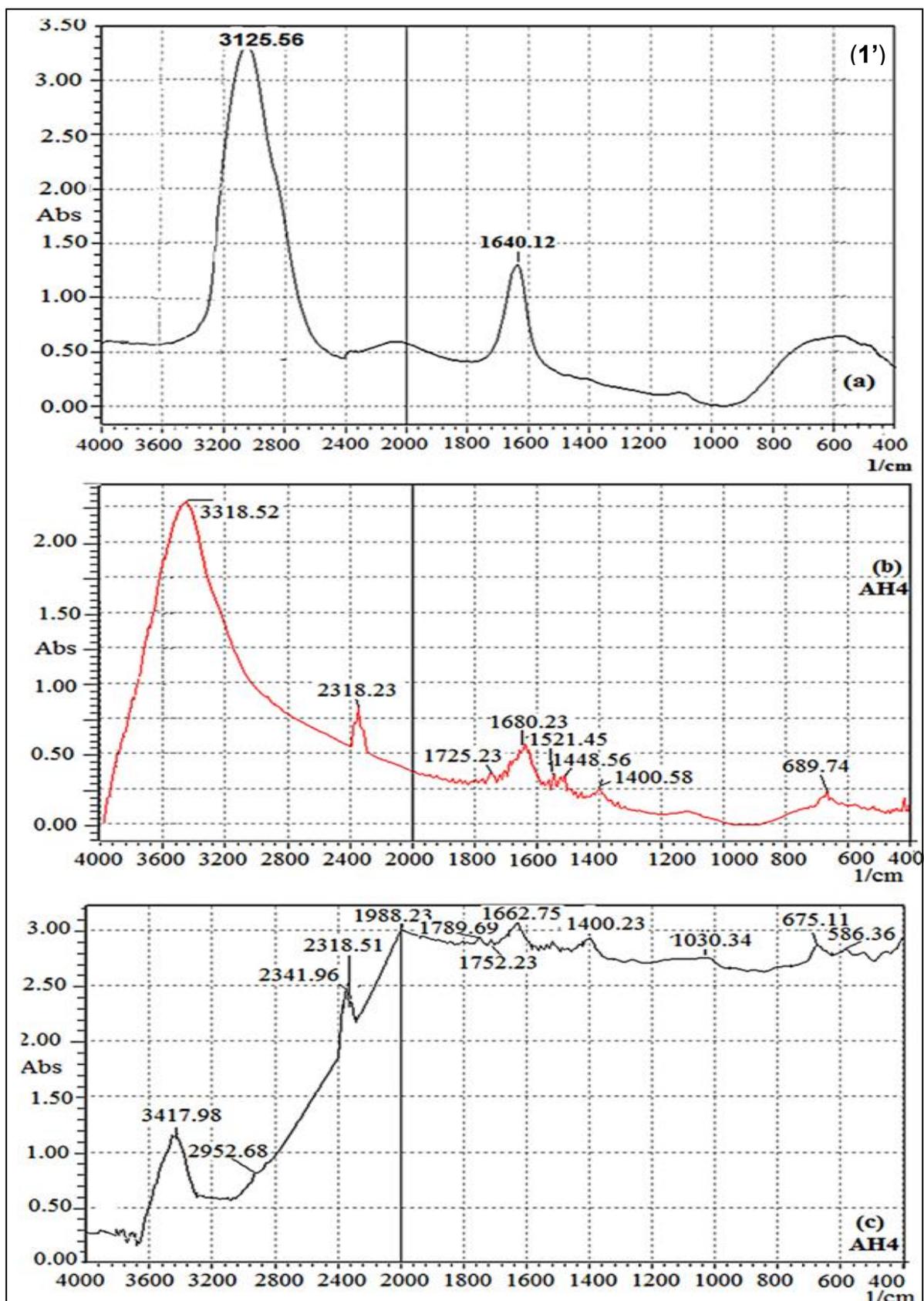


Figure 3.18 : Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphthalène par *Streptomyces* sp AH4 (100 mg.l⁻¹, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) fraction simple, (b) fraction neutre et (c) fraction acide.

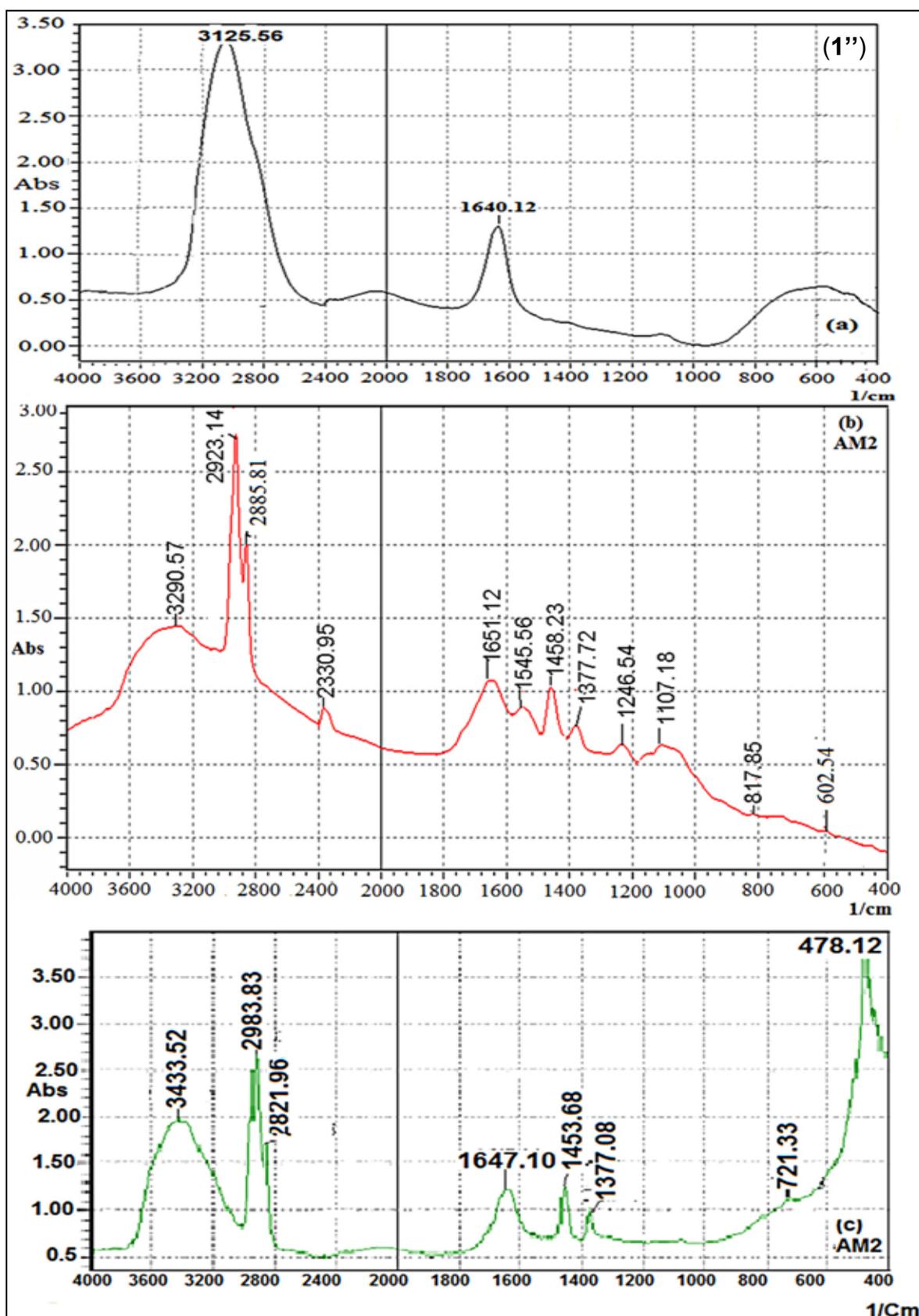


Figure 3.19 : Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le naphtalène par *Streptomyces* sp AM2 (100 mg.l⁻¹, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) fraction simple, (b) fraction neutre et (c) fraction acide.

Après interprétation de ces spectres nous pouvons dire que :

- Pour la fraction simple (Témoin naphthalène: (a)), les bandes comprises entre 3000–3300 cm^{-1} , 1500–1650 cm^{-1} et 600–800 cm^{-1} , sont dues respectivement aux vibrations d'élongation des liaisons -C-H, C=C et à la déformation caractéristique des noyaux aromatiques porteurs des H adjacents sur le noyau aromatique [27, 204, 230, 231, 232, 233].
- Pour les fractions acide et neutre, la figure 3.17, 3.18 et 3.19 (b-AB1, c-AB1, b-AH4, c-AH4 b-AM2 et c-AM2) montre les nouvelles et larges bandes d'absorption apparaissant entre 2800–2960, 1800–2500, 1670–1740, 1390–1440 et 1030–1250 cm^{-1} et qui sont attribuées respectivement, aux vibrations des liaisons de C-H aliphatiques de C≡C des groupes méthoxy $\text{CH}_3\text{-O}$, du groupe C=O carboxylique et/ou aldéhyde, C-OH à l'étirement du groupe aromatique ou carboxylique, à la liaison C-O ou à la déformation OH [27, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237]. Les bandes d'absorption qui apparaissent entre 3200–3600 cm^{-1} se rapportent à l'élongation des liaisons de vibration hydroxyle (OH) [27, 204, 227, 230, 231, 232, 233]. Ces résultats obtenus suggèrent que le noyau aromatique et le groupe carbonyle existant dans la FN et la FA n'est obtenu qu'après la dégradation causée par les trois souches (AB1, AH4 et AM2).
- Le spectre de la FN chez AB1 est presque similaire à celui de FA de la souche AH4. Il est de même pour la FA de la souche AB1 et pour la FN de la souche AH4. Par contre, les deux fractions de la souche AM2 sont caractérisées par une forte absorbance autour de 2820 cm^{-1} qui due à la présence de $\text{CH}_3\text{-O}$ aromatique ou à la liaison aliphatique C-H.

En revanche, en comparaison avec les résultats du IRTF des fractions acides et neutres avec le naphthalène (fraction simple) qu'indiquent qu'il y a une différence lors de la dégradation du naphthalène par les trois souches (AB1, AH4 et AM2) et qu'il y a une formation des acides carboxyliques ou aldéhydes fixés sur un noyau aromatique d'une part et, des composés phénoliques d'autre part. En plus des méthodes analytiques précitées et utilisées pour étudier les métabolites de dégradation, l'utilisation de CG-SM présente un intérêt particulier pour ce genre d'étude afin de déterminer quelques structures des intermédiaires métaboliques issus lors de la dégradation du naphthalène (100 mg.l^{-1}) par AB1, AH4 et AM2.

Les chromatogrammes CG-SM obtenus ont révélé la présence de plusieurs sous produits dont les pics correspondants sont présentés sur la figure 3.20.

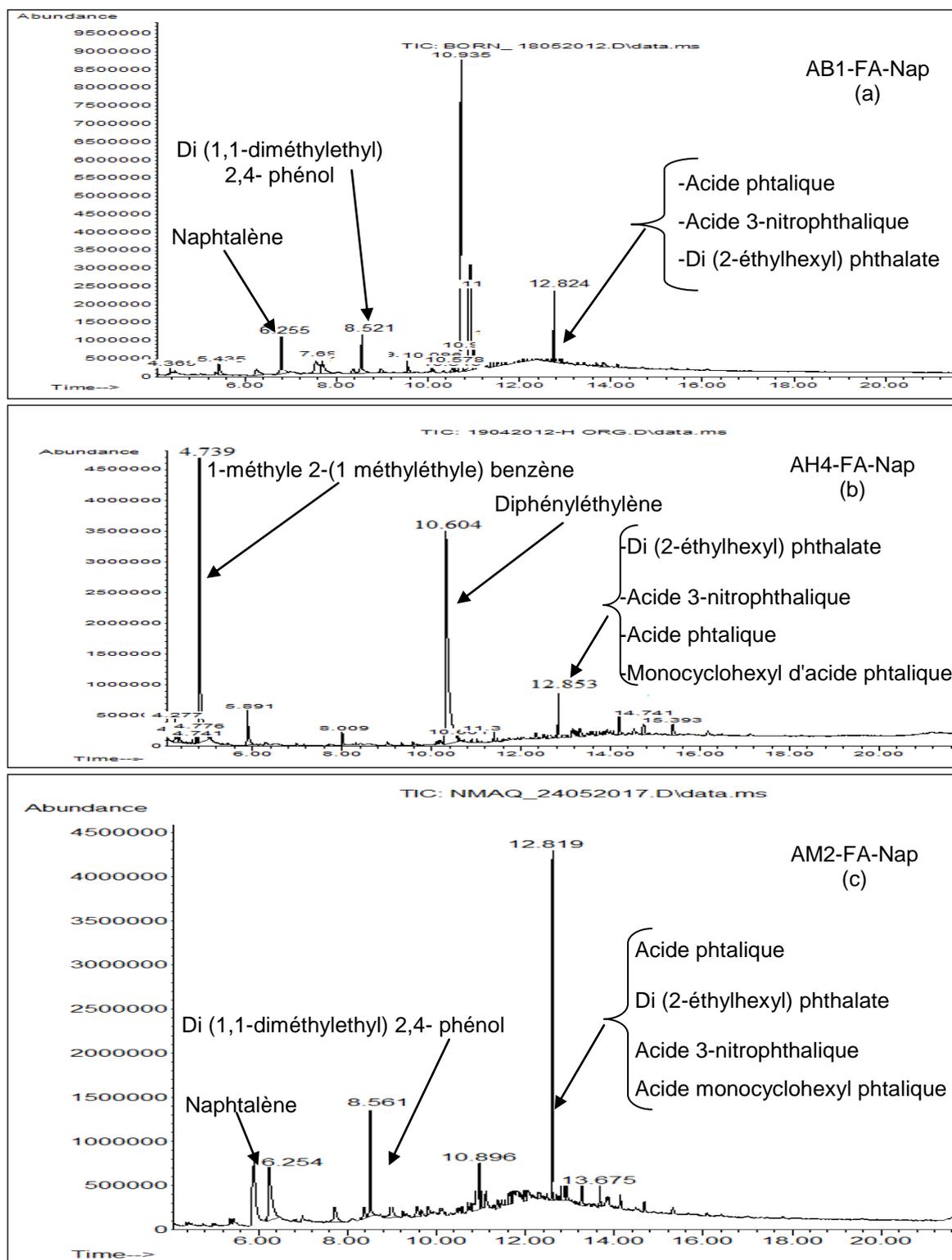


Figure 3.20 : Chromatogramme CG-SM des métabolites de dégradation du naphtalène (100 mg.l^{-1} , $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$ et 150 tr.min^{-1}). (a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4 et (c) *Streptomyces* sp. AM2.

Les résultats de la CG-SM montrent la présence d'un pic correspondant au naphthalène (à 6,250 et à 6,255 min) qui représente le naphthalène résiduel non dégradé.

La présence de di(2-éthylhexyl) phthalate (12,824; 12,853 et 12,819 min) est probablement due à la réaction de l'acide phtalique avec l'acétate d'éthyle utilisé pour l'extraction ou ce composé est considéré comme un métabolite de dégradation du naphthalène [238] par les souches de streptomycètes.

Nous avons remarqué que les métabolites de dégradation du naphthalène par nos souches sont des composés présentant un cycle benzénique tels que l'acide 3-nitrophthalique (12,824 min pour AB1, 12,853 min pour AH4 et 12,819 min pour AM2). Le même temps de rétention a été signalé pour l'acide phtalique et l'acide monocyclohexyl phtalique chez les trois souche, le 1-méthyle 2-(1-méthyléthyle) benzène (4,739 min pour AH4) et le di(1,1-diméthyléthyle) 2,4-phénol (8,521 min pour AB1 et 8561 min pour AM2) qui semblent être les sous produits de la dégradation du naphthalène dont l'un des cycles s'est ouvert par l'action de plusieurs enzymes inductibles.

Nous remarquons la présence des intermédiaires connus tel que l'acide phtalique dont ce dernier est considéré comme un sous produit principal de la biodégradation des HAP [5, 236, 237]. Il semble aussi que la première étape de dégradation du naphthalène par nos souches est catalysée par l'enzyme «naphthalène mono-dioxygénase». Sachant que plusieurs chercheurs ont rapporté que les enzymes dioxygénase et monooxygénase sont des principaux oxydants des HAP [5, 236, 237]. Cependant, d'autres intermédiaires rares qui ont été trouvés avec nos souches pour la première fois tels que le 1-méthyle 2-(1-méthyléthyle) benzène, et di (1,1-diméthyléthyle) 2,4-phénol.

LIN *et al.* [5] ont rapporté l'acide benzoïque et l'acide phtalique comme métabolites de la dégradation du naphthalène par la souche *Bacillus fusiformis*. BUBINAS *et al.* [236] ont détecté quatre métabolites de dégradation du naphthalène par la souche *Geobacillus* sp. G27 à savoir: l'acide phtalique, le 1-naphtol, le 2-naphtol et l'acide protocatéchique. *Bacillus thermoleovorans* transforme le naphthalène vers le 2,3-dihydroxy naphthalène, l'acide 2-carboxycinnamique, l'acide phtalique et l'acide benzoïque [237].

Il est à noter que l'acide benzoïque n'a pas été détecté parmi les métabolites de la dégradation du naphthalène par les trois souches (AB1, AH4 et AM2), malgré que cet acide peut être formé par la décarboxylation de l'acide phtalique [5, 237].

SRIDHAR *et al.* [239] ont rapporté que le catabolisme du naphthalène par *Streptomyces griseus* donne le 4-hydroxy-1-tétralone, ce dernier est produit par la transformation du 1-naphtol et 1-tétralone. Egalement, en utilisant *Nocardia otitidiscaviarum* TSH1 [238] et *Streptomyces setonii* [240], la dégradation du naphthalène conduit à la formation de l'acide cinnamique. Balachandran *et al.* [6] ont détecté le catéchol sous l'action de *Streptomyces* sp. strain IRA-CPDA-1 sur le naphthalène.

D'après nos résultats, l'acide phtalique peut être transformé en composés phénoliques. ANNWEILER *et al.* [237] et CERNIGLIA [241] ont signalé que les sous produits phénoliques sont produits par l'action de l'enzyme dioxygénases et peroxydase. Ces enzymes transforment les HAP en oxydes d'arènes, qui sont ensuite soit hydratés pour former des *trans-dihydrodiols*, soit réarrangés de manière non-enzymatique pour former des composés phénoliques [237, 241].

3.2.3 Métabolites issus de la dégradation aérobie du phénanthrène

Les spectres UV-Vis des fractions acides et neutres montrent la formation des métabolites issus de la dégradation du phénanthrène après 12 jours d'incubation par rapport au témoin phénanthrène (fraction simple : (d)) comme étant indiqué dans la figure 3.21 (a, b, c et d).

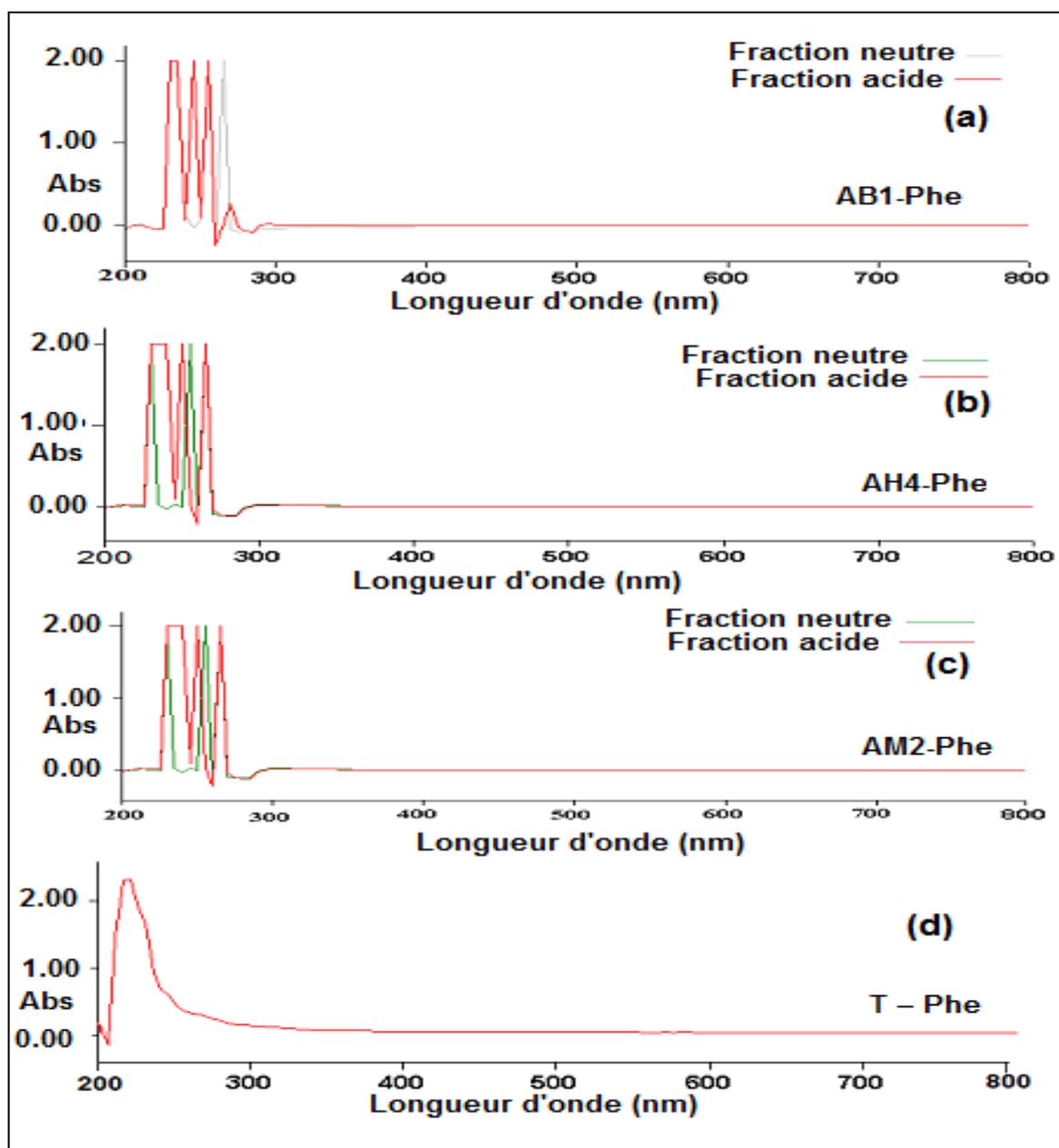


Figure 3.21 : Spectres UV-Vis des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène (100 mg.l^{-1} , 12 jours d'incubation, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}). (a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4, (c) *Streptomyces* sp. AM2 et (d) fraction simple (T- Phe).

Ces spectres UV-Vis montrent de forts pics d'absorption qui apparaissent entre la gamme de longueur d'onde de 220 à 270 nm. Il est à noter que ces spectres de la fraction neutre et/ou acide sont différents en comparaison à ceux du naphthalène. Ceci pourrait s'expliquer par la structure chimique ou par les voies de dégradation spécifiques de chaque composé.

Le tableau 3.7 résume les longueurs d'onde d'absorption UV-Vis pour les fractions FA et FN et la fraction simple (T-Phe).

Tableau 3.7 : Longueurs d'onde d'absorption par UV-Vis pour les fractions acides et neutres de dégradation du phénanthrène chez les trois souches comparées à la fraction simple.

Souche	Longueur d'onde (nm)	
	Fraction neutre	Fraction acide
AB1	227	228
	258	250
	263	258
		268
AH4	229	225 à 240
	254	250
	263	268
AM2	229	225 à 250
	255	253
	267	267
T- phénanthrène	220	

D'après les spectres UV-Vis et le tableau des fractions (FA, FN et FS) du phénanthrène, nous avons remarqué que:

- Le pic d'absorbance du phénanthrène apparaît autour de 220 nm, ce maximum de longueur d'onde est dû à la présence de la double liaison aromatique (C=C) du phénanthrène.

- Les longueurs d'ondes d'absorbance de la FN sont : a) 227, 258 et 263 nm pour AB1, b) 229, 254 et 263 nm pour AH4 et c) 229, 255 et 267 nm pour AM2.
- Les longueurs d'ondes d'absorbance de la FA sont : a) 228, 250; 258 et 268 nm pour AB1, b) 250, 265 nm et la bande d'absorbance entre 225 à 240 nm pour AH4 et c) 253, 267 nm et la bande d'absorbance entre 225 à 250 nm pour AM2.

Ces valeurs des longueurs maximales d'absorbances des deux fractions par UV-Vis ont permis de conclure que :

- La bande d'absorbance autour de 260 nm est attribuée à la transition $n-\pi^*$ du cycle aromatique [204, 230].
- La bande d'absorbance entre 220 et 270 nm est caractéristique d'adsorption du cycle aromatique, ainsi que l'absorption autour 270 nm est affectée à la transition $n-\pi^*$ du groupe carbonyle [204, 242].
- La bande d'absorbance des composés phénoliques est dans la région 210 à 270 nm qui est due à un transfert de charge intramoléculaire $\pi-\pi^*$ [242].

D'après WU *et al.* [204], les fractions (acide et neutre) des métabolites de dégradation du phénanthrène par la souche bactérienne *Flavobacteria* sp. strain FCN2 ont permis de détecter trois bandes d'absorbance: une autour de 260 nm, l'autre entre 275 et 293 nm et la dernière entre 334 et 349 nm.

Les groupements fonctionnels du spectre IRTF, présents dans les extraits des intermédiaires issus de la dégradation du phénanthrène après 12 jours d'incubation (fractions acide et neutre) ainsi que la fraction simple, sont présentés sur les figures suivantes (3.22, 3.23 et 3.24):

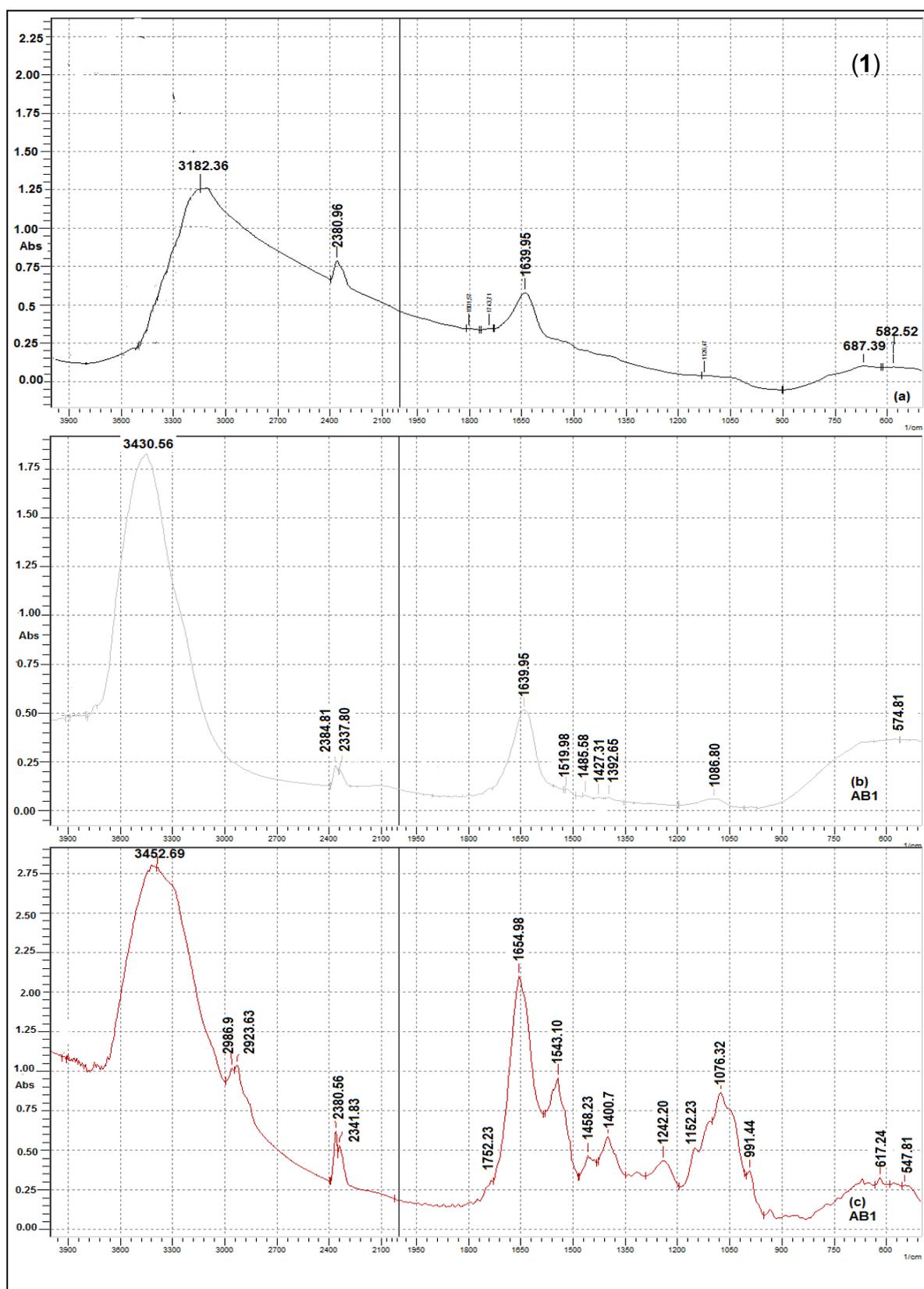


Figure 3.22 : Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par *Streptomyces* sp. AB1 (100 mg.l⁻¹, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) Fraction simple, (b) Fraction neutre et (c) Fraction acide.

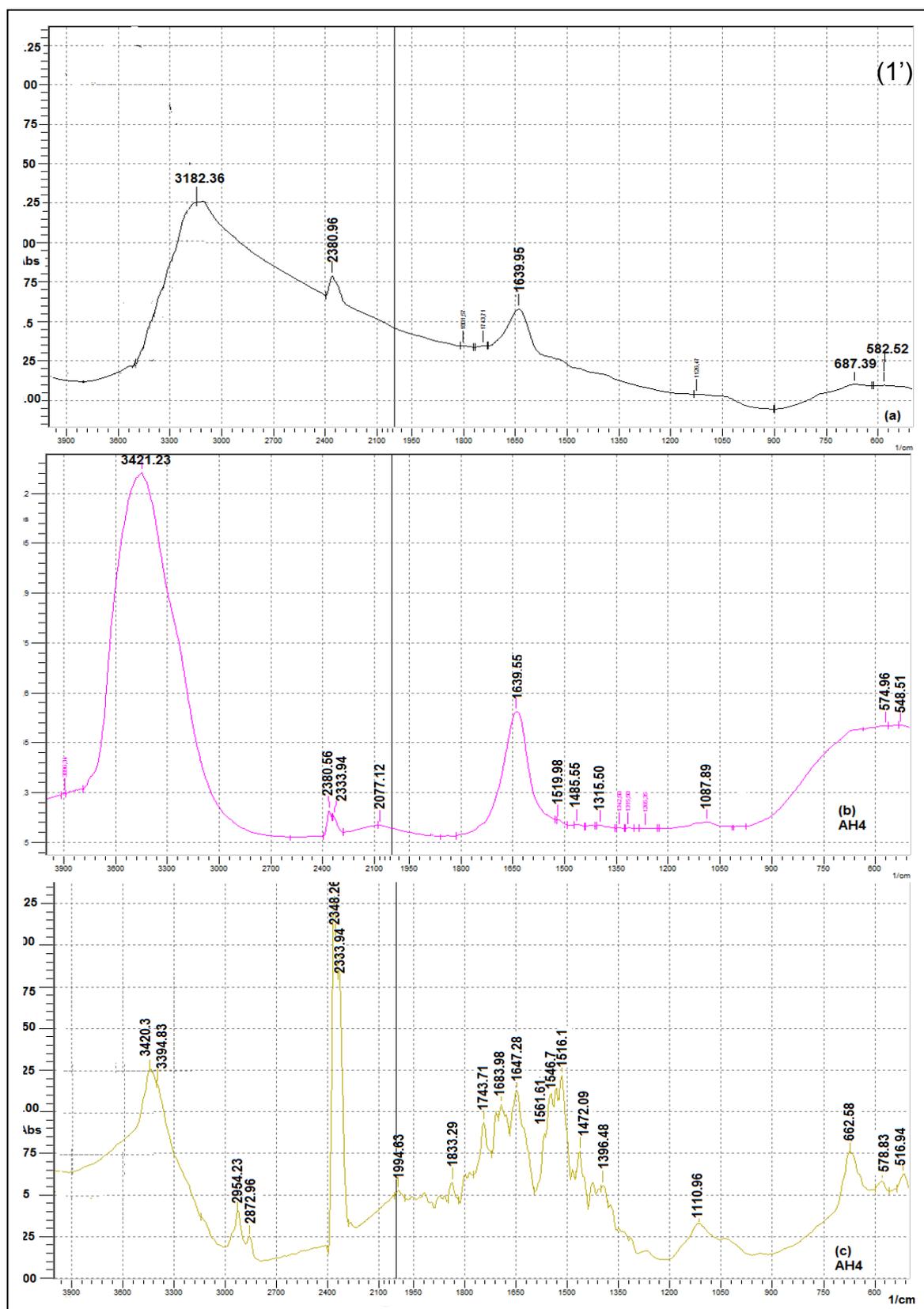


Figure 3.23 : Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par *Streptomyces* sp. AH4 (100 mg.l⁻¹, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) Fraction simple, (b) Fraction neutre et (c) Fraction acide.

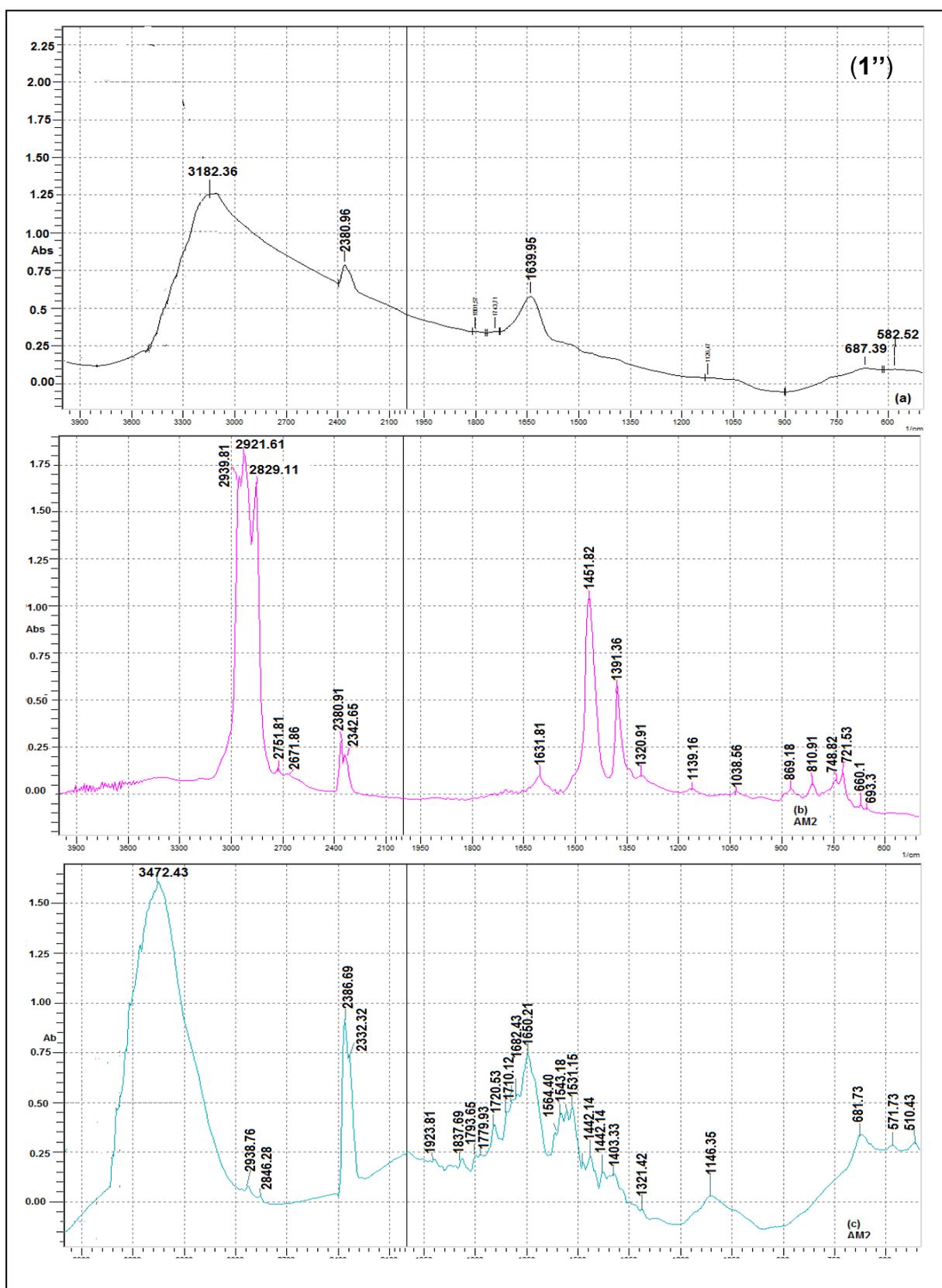


Figure 3.24 : Spectres IRTF des fractions intermédiaires à partir des cultures sur le phénanthrène par *Streptomyces* sp. AM2 (100 mg.l⁻¹, 12 jours d'incubation, 30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) Fraction simple, (b) Fraction neutre et (c) Fraction acide.

Les résultats des spectres IRTF des fractions (FS, FA et FN) montrent que :

- La FS (a) montre l'élongation de la liaison C-H aromatique qui apparaît entre 3000–3300 cm^{-1} , les vibrations de C=C aromatique et le squelette du noyau benzène qui apparaît à 1639,96 cm^{-1} et respectivement entre 600–800 cm^{-1} [204, 242].
- Les FA chez les trois souches montrent l'apparition de nouvelles bandes d'absorption qui sont différentes par rapport à la fraction simple:
 - a) La bande entre 3300–3600 cm^{-1} correspond à la présence de liaison de type O-H d'alcool [230, 233, 242].
 - b) La bande entre 2850–2980 cm^{-1} due à la présence du proton (H) et de la liaison C-H [23, 225, 235].
 - c) La bande entre 1800–2500 cm^{-1} due à la présence des liaisons C≡C ou C=O [23, 232, 233].
 - d) La bande entre 1400 et 1650 cm^{-1} correspond au pic de vibration squelette du noyau benzénique et de la liaison C=C aromatique [23, 232, 233, 242].
 - e) Les bandes entre 1670–1740 cm^{-1} et entre 1030–1250 cm^{-1} , montrent qu'un groupe carboxyle (C=O) existait dans la FA ou la liaison C-O-R (alcool et éther). Ainsi que la bande entre 1390–1440 cm^{-1} qui est due au étirement C-OH du groupement carboxyle ou aromatique et enfin l'apparition de la bande entre 1030 – 1250 cm^{-1} qui correspond au étirement C=O ou à la déformation OH [204, 230, 231, 232, 233, 242].

Les spectres IRTF des métabolites de la FN et de la FS sont presque identiques chez AB1 et AH4, ces deux dernières ont été caractérisées par une FN presque identique. Même remarque a été constatée pour la FN chez AH4 et AM2. En effet, chez AM2, la nouvelle absorbance à 2751,81 et à 2671,86 cm^{-1} est due à la présence d'OH d'acide carboxylique ou à la =C-H d'aldéhyde [231, 232, 233, 242]. La forte absorbance entre 675-900 cm^{-1} est due à la déformation angulaire de C-H du cycle aromatique chez AB1, AH4 et AM2 [204].

Les chromatogrammes de la CG-SM des métabolites de la dégradation du phénanthrène par les trois souches (AB1, AH4 et AM2) sont présentés sur la figure 3.25.

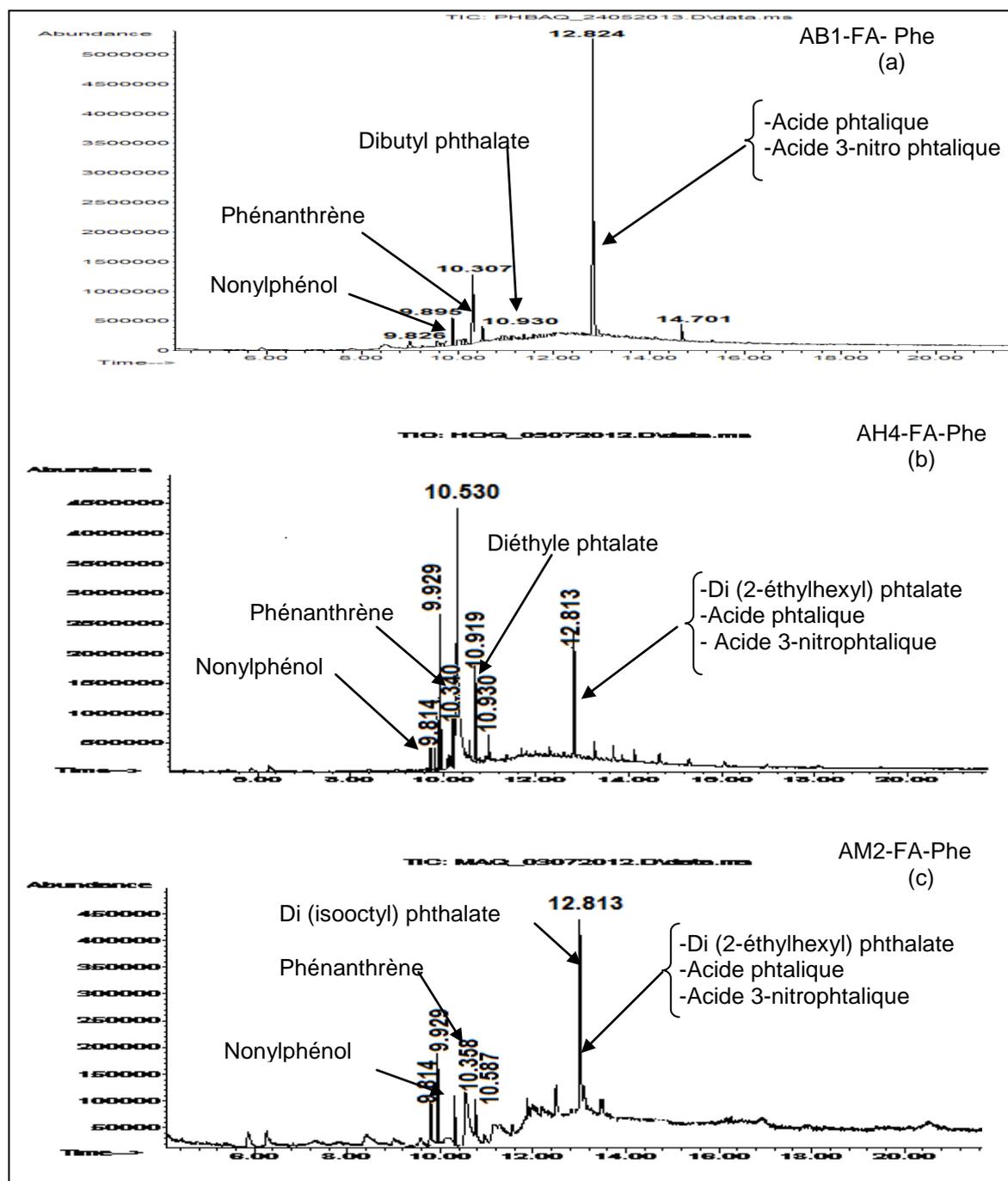


Figure 3.25 : Chromatogramme CG-SM des métabolites de la dégradation du phénanthrène (100 mg.l^{-1} , 30°C , $\text{pH} = 7,2$ et 150 tr.min^{-1}). (a) : souche *Streptomyces* sp. AB1, (b) : souche *Streptomyces* sp. AH4 et (c) : souche *Streptomyces* sp. AM2.

Les chromatogrammes obtenus de la CG-SM, intermédiaires de la dégradation du phénanthrène par AB1, AH4 et AM2, montrent que :

- La présence d'un pic correspondant au phénanthrène (temps de rétention 10,307 min pour AB1, 10,347 min pour AH4 et 10,358 min pour AM2), qui peut être attribué aux pourcentages du phénanthrène résiduel non utilisé par les souches AB1, AH4 et AM2.
- La présence de l'acide phtalique, de l'acide 3-nitrophtalique et di (2-éthylhexyl) phthalate. Ces composés ont été également détectés dans l'échantillon de culture sur le naphthalène chez les trois souches.
- La présence des composés phénoliques chez les trois souches à savoir le nonylphénol.
- La présence de dibutyl phthalate chez AB1 (10,930 min), de diéthyl phthalate chez AH4 (10,919 min) et de diisooctyl phthalate chez AM2 (12,813 min).

Nos résultats sont similaires à ceux de PATEL *et al.* [235] qui ont détecté l'acide phtalique et le di (2-éthylhexyl) phthalate au cours de la dégradation du phénanthrène par la souche *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2. Ils ont. De plus, JING *et al.* [243] ont isolé un consortium bactérien composé de deux souches (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus arlettae*) à partir des eaux salines (50 g.l⁻¹), ce consortium métabolise le phénanthrène vers l'acide phtalique et le 2-méthyle-5-(1-méthylethyl) phénol. ROBIN *et al.* [244], ont isolé *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 qui métabolise le phénanthrène *via* la voie de l'acide phtalique. Cette voie a été déjà observée par MOODY *et al.* [93] chez la souche *Staphylococcus* sp. PN/Y qui transforme le phénanthrène vers l'acide phtalique, l'acide diphénique ainsi que 1-hydroxy-2-naphtoïque [96]. Egalement, la dégradation du phénanthrène par *Nocardioide* sp. strain KP7 a conduit à la formation de l'acide phtalique [245]. Par ailleurs, *Streptomyces flavovirens* [246] et deux champignons *Pleurotus ostreatus* [247] et *Cyclothyrium* sp. strain [248] métabolisent le phénanthrène vers *cis*-9,10-phénanthrène dihydrodiol.

D'autre part, KEUM *et al.* [249], ont rapporté que le 2-acide hydroxy-1-naphtoïque et l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque sont des métabolites de dégradation

du phénanthrène par la souche *Sinorhizobium* sp. De même, BALASHOVA *et al.* [250] ont rapporté la présence de l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque et de l'acide 2-hydroxy-1-naphtoïque, ces deux dernières sont les principaux métabolites de dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas* sp. strain et *Burkholderia* sp. strain. Par contre les métabolites de la biodégradation du phénanthrène par *Sphingomonas* sp. strain GY2B sont: l'acide salicylique, le 1-naphtol, et le 1-hydroxy-2-naphtoïque [251].

Nous concluons donc que le naphtalène et le phénanthrène sont métabolisés principalement en composés plus simples *via* la voie de l'acide phtalique et les composés phénoliques par les trois souches de streptomycètes isolées localement. Sachant que le mécanisme de dégradation du naphtalène est presque similaire à celui décrit pour le phénanthrène. Plusieurs microorganismes oxydent le naphtalène et le phénanthrène en acide phtalique, après clivage par une réaction catalysée par une mono et dioxygénase. Peu d'études qui montrent donc la formation des composés phénoliques au cours de la biodégradation du naphtalène et du phénanthrène [237, 241].

3.3 PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET APPLICATION ENVIRONNEMENTALE

3.3.1 Introduction

Nos souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) sont aptes à dégrader les acides humiques [19, 20, 21,22, 23], le pétrole brut et les composés aromatiques tels que le naphthalène et le phénanthrène. Dans cette partie de l'étude, nous nous sommes donc intéressés à la sélection de la souche performante productrice de biosurfactant et le choix de la source de carbone et déterminer les caractéristiques de biosurfactant afin d'envisager une application environnementale adéquate.

3.3.2 Production de biosurfactants

La production du biosurfactant a été aussi suivie par l'activité hémolytique et l'indice d'émulsion (E24) (figure 3.26).

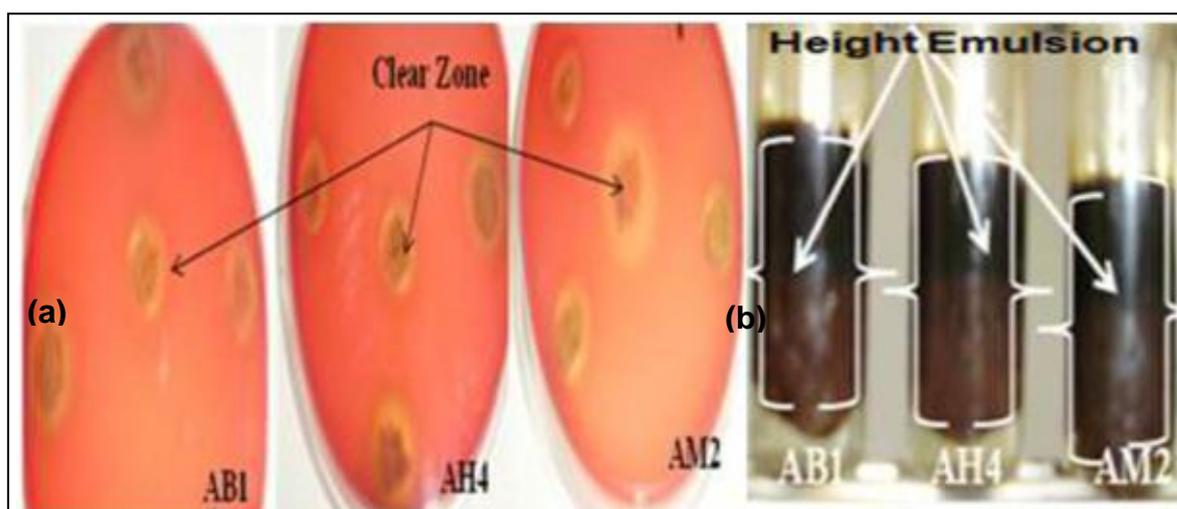


Figure 3.26 : Production de biosurfactants par les souches AB1, AH4 et AM2.

(a) La zone claire autour des colonies sur gélose au sang indique une hémolyse des globules. (b) Indice de l'émulsion (E24) en utilisant le pétrole brut comme substrat.

Ces deux tests ont confirmé la production du biosurfactant chez les trois souches. Une zone claire a été observé autour de la colonie confirmant le test positive de l'activité hémolytique [164, 165]. La production de biosurfactant a été démontré aussi par l'augmentation de l'indice d'émulsion (E24) avec le pétrole brut (75,83; 78,71 et 86,66% avec AB1, AH4 et AM2, respectivement).

3.3.3 Sélection de la souche performante et la source de carbone

Trois sources de carbone (1%, v : v) ont été utilisées: huile d'olive, huile de soja et gasoil. La sélection de la source de carbone et le temps optimum de production ont été réalisés par les mesures de la TS et le diamètre de déplacement du pétrole brut (DDP).

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 3.27 et 3.28.

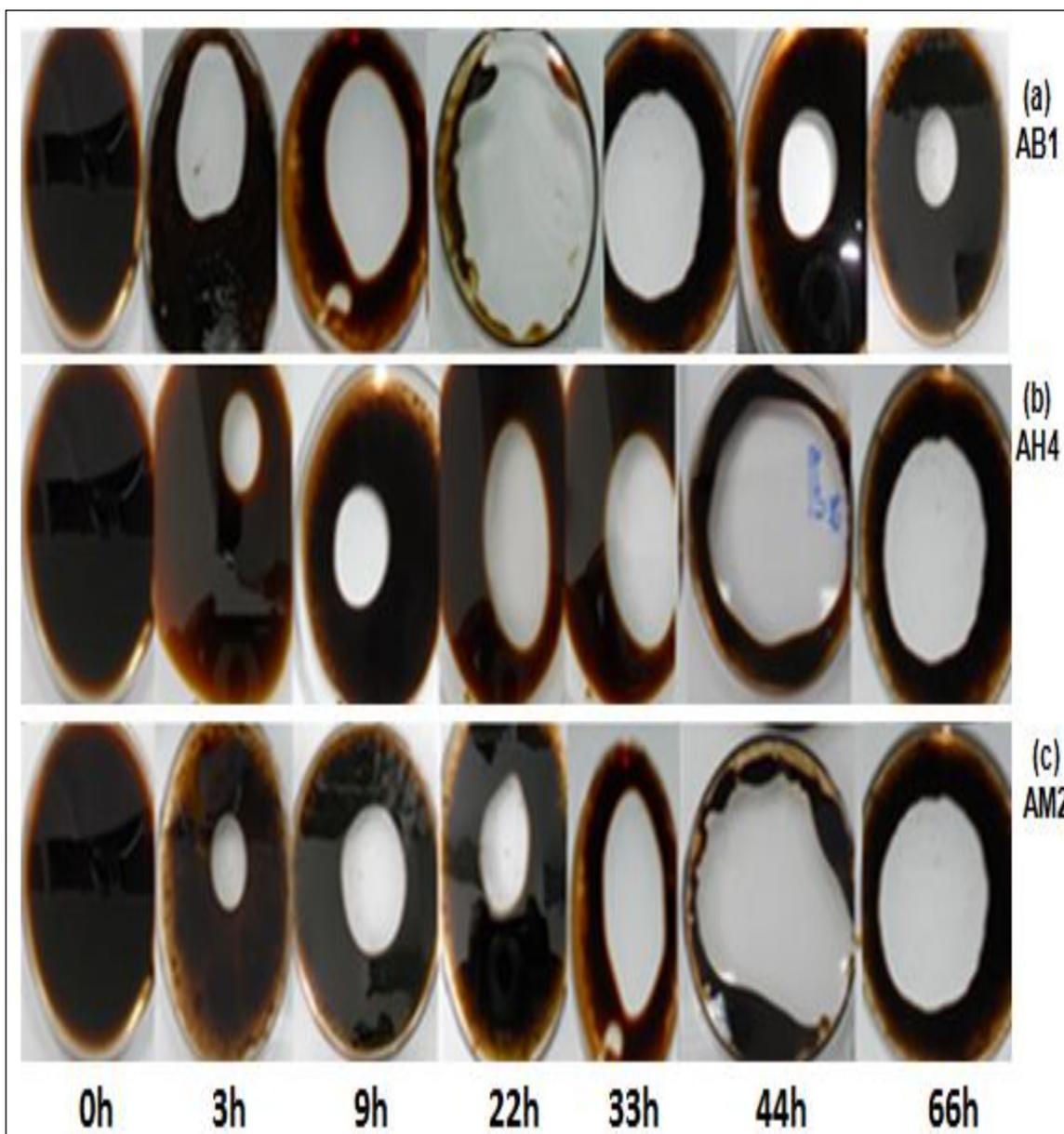


Figure 3.27 : Evolution du diamètre de déplacement de pétrole brut (DDP) au cours de temps. (a) *Streptomyces* sp. AB1 avec l'huile d'olive, (b) *Streptomyces* sp. AH4 avec l'huile de soja et (c) *Streptomyces* sp. AM2 avec l'huile de soja.

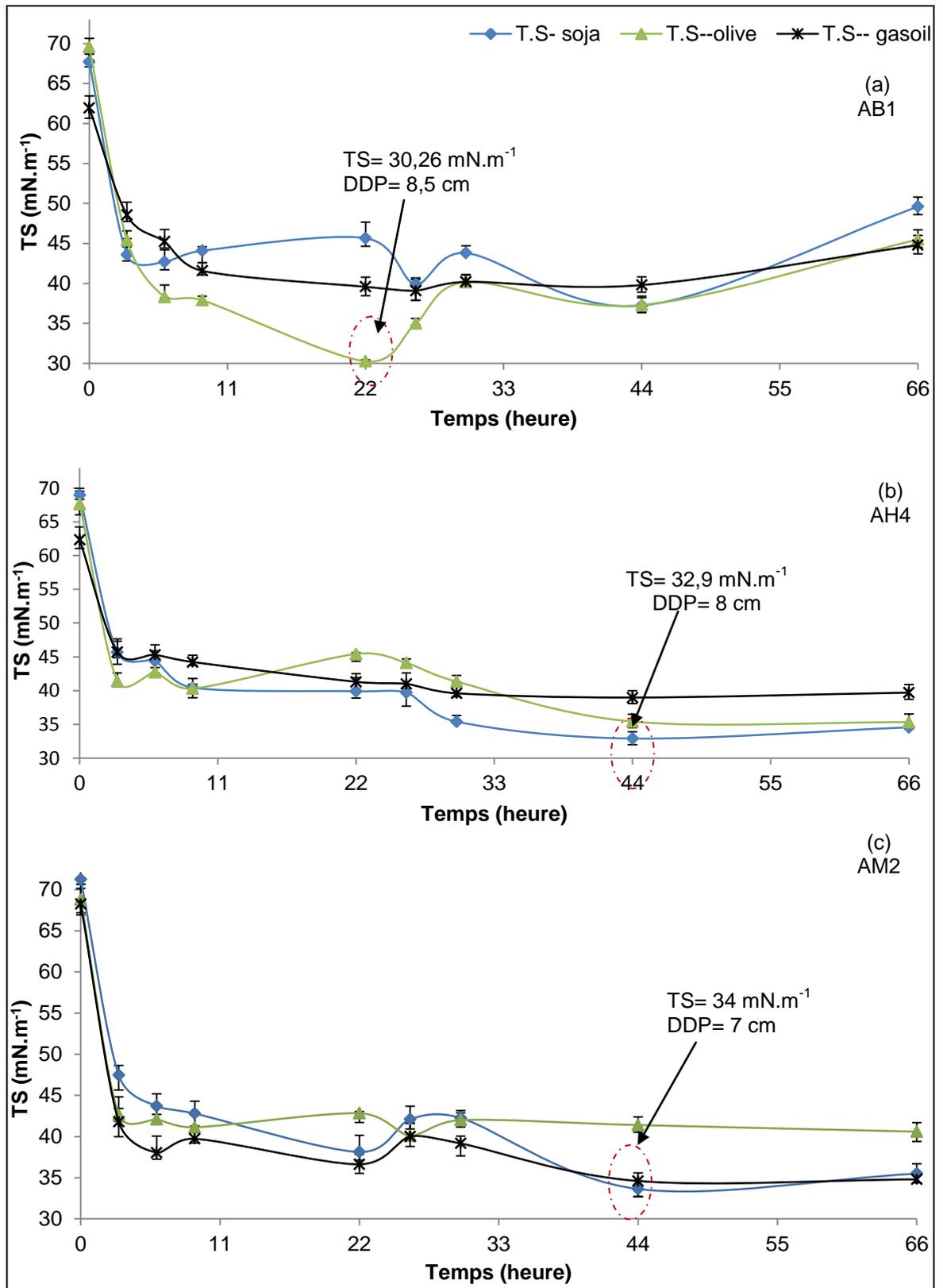


Figure 3.28 : Sélection de la source du carbone et le temps de production du biosurfactant par: (a) *Streptomyces* sp. AB1, (b) *Streptomyces* sp. AH4 et (c) *Streptomyces* sp. AM2 (30 °C, pH= 7.2, et 150 tr.min⁻¹).

Nous remarquons qu'en présence de la souche AB1, l'huile d'olive présente une meilleure production de biosurfactant qui s'exprime par une réduction importante de la TS (30,26 mN.m⁻¹), un diamètre maximum de déplacement du pétrole brut (8,5 cm) et un temps minimum d'incubation (22 h). Cependant, l'huile de soja représente la meilleure source de carbone chez la souche AH4 (32,9 mN.m⁻¹ en 44 h et 8 cm) et l'huile de soja et le gasoil étaient les bonnes sources de carbone de production chez AM2 (34 mN.m⁻¹ en 44 h et 7 cm).

La souche AB1 a été retenue comme souche performante pour la poursuite du travail sur la production, la caractérisation et l'application environnementale de ce biosurfactant.

Toutes les études portant sur la production de biosurfactants montrent, après la sélection du microorganisme producteur, l'importance du choix de la source de carbone que ce soit un hydrocarbure, un glucide, une huile, etc. [131, 144, 252, 253, 255]. Cette source joue un rôle déterminant dans le taux de production et la nature de biosurfactant synthétisé. Plusieurs substrats ont été utilisés pour la production de biosurfactant: l'hexadécane [157], l'huile d'olive [144, 253, 254], l'huile de tournesol résiduelle de friture [255] et le gasoil et le pétrole [131].

3.3.4 Séparation et purification du biosurfactant

La récupération du biosurfactant issu de la souche AB1 (Bio-AB1) se fait après l'extraction et le séchage, donne un rendement de 0,45 g de biosurfactant pour 1 g d'huile d'olive. Le précipité (biosurfactant brut) obtenu est un liquide très lourd (comme l'huile) soluble dans l'eau, le chloroforme et le méthanol, il est de couleur jaune-marron.

La figure ci-dessous 3.29 montre la purification du biosurfactant sur la colonne C18. L'activité tensioactive des fractions collectées des biosurfactants F1 à F44 ont été suivie par la mesure du DDP et l'absorbance à 280 nm.

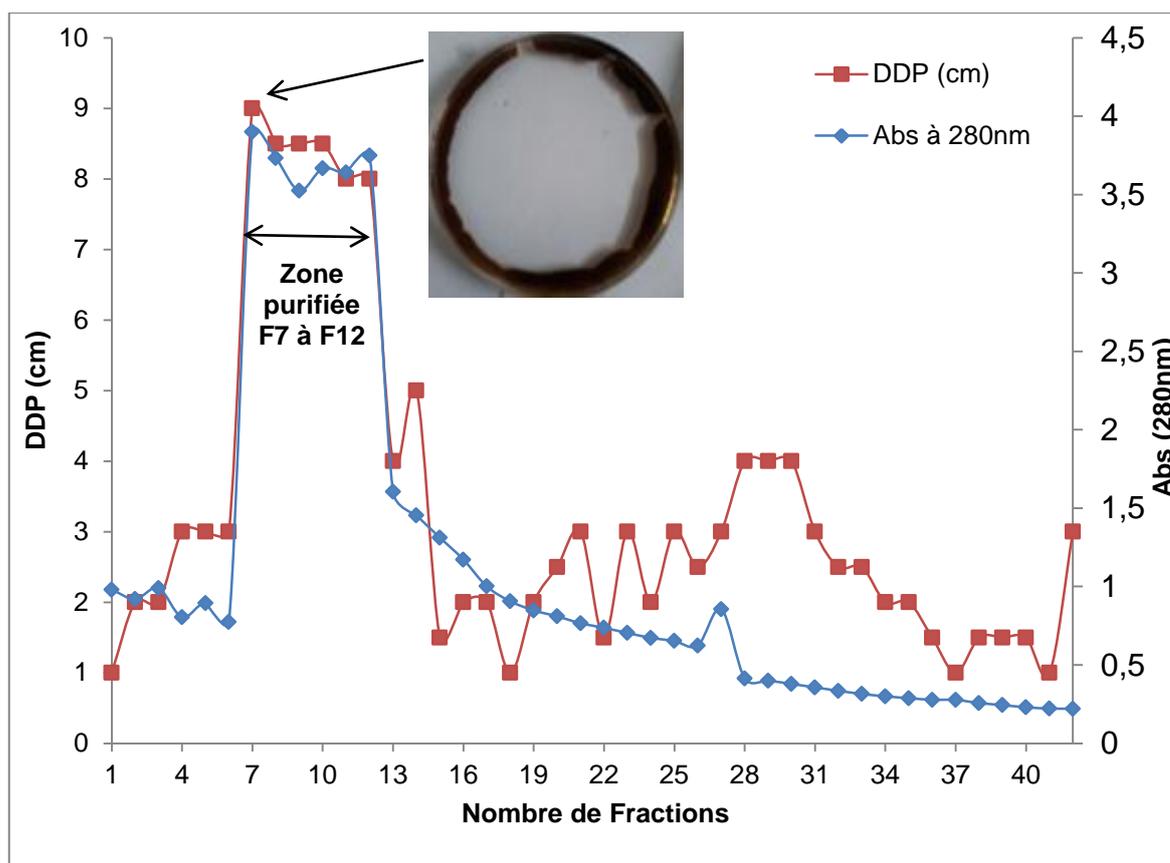


Figure 3.29 : Conditions optimales retenues pour purifier le biosurfactant en chromatographie sur colonne C18.

Les fractions F7 à F12, présentant le maximum d'activité du DDP (8 à 9 cm) et l'absorbance à 280 nm (Abs de 3,7 à 3,9) sont regroupées pour former le biosurfactant purifié.

3.3.5 Caractérisation physicochimiques et antimicrobienne du biosurfactant

3.3.5. 1 Caractérisations physicochimiques

3.3.5.1.1 Détermination de la concentration micellaire critique

Les tensions de surface ont été déterminées pour différentes concentrations de biosurfactant (2,5 à 1000 mg.l⁻¹). A partir d'une certaine concentration, la TS demeure constante, la solution est saturée en biosurfactant et des micelles se forment. Cette concentration seuil est appelée Concentration Micellaire Critique (CMC).

Les résultats expérimentaux montrent que l'activité de la TS est inversement proportionnelle à la concentration du biosurfactant pour des valeurs

inférieures à 125 mg.l^{-1} , au-delà, la TS garde une valeur presque constante (30 à 31 mN.m^{-1}). L'évolution de la TS en fonction de la concentration du biosurfactant brut est illustrée dans la figure 3.30.

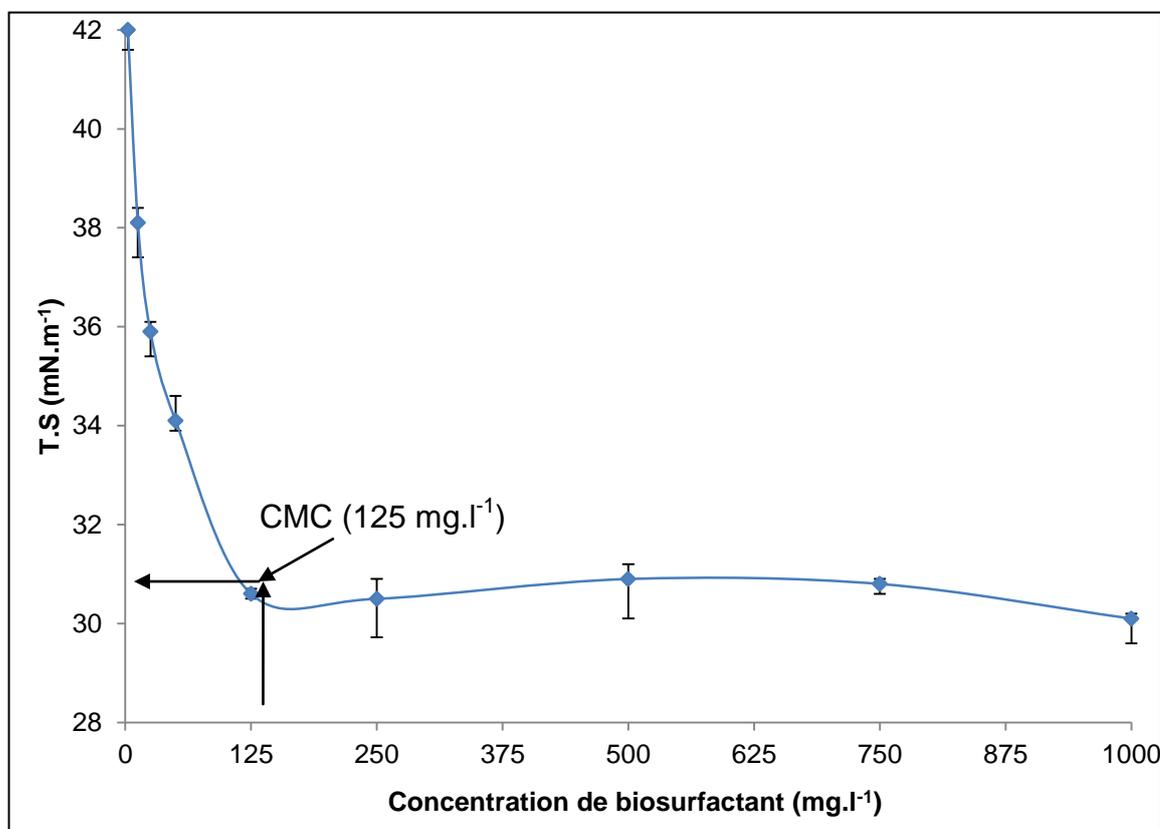


Figure 3.30 : Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche AB1.

La valeur de la CMC du biosurfactant de la souche AB1 est de 125 mg.l^{-1} . Cette valeur est considérée comme très intéressante et même économique par rapport à celles des tensioactifs chimiques [243, 256, 257] et de certains biosurfactants [144, 157, 163, 253, 258, 259].

Le biosurfactant de la souche *Streptomyces tendae* Tuë 901/8c est capable de réduire la TS jusqu'à 30 mN.m^{-1} , il a également une CMC de 36 mg.l^{-1} [167]. Ainsi, la souche *Streptomyces* sp. strain S1 isolée par KOKARE et al [165] produit un biosurfactant montrant une CMC égale à 300 mg.l^{-1} et une réduction de la TS jusqu'à 42 mN.m^{-1} .

BORDOLOI et KONWAR [258] ont isolé une souche de *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7815 productrice de biosurfactant. Ce dernier est capable de réduire la tension de surface jusqu'à 35 mN.m^{-1} avec une CMC égale à 100 mg.l^{-1} .

Malgré la réduction importante de la TS (25 mN.m^{-1}), WATTANAPHON et al. [259] ont trouvé que le biosurfactant (nature glycolipide) produit par *Burkholderia cenocepacia* BSP3 a une CMC de 316 mg.l^{-1} , il est aussi très efficace dans la bioremédiation des sols contaminés par les pesticides. En plus, la CMC du biosurfactant (nature lipopeptique) de la souche *Staphylococcus* sp. strain 1E est de 750 mg.l^{-1} , il peut réduire la TS jusqu'à $25,9 \text{ mN.m}^{-1}$ [144]. FERHAT et al. [157] ont isolé deux souches productrices de biosurfactants, les valeurs de la CMC sont de 1000 et 2000 mg.l^{-1} pour *Ochrobactrium* sp. strain 1C et *Brevibacterium* sp. strain 7G, respectivement. La souche *Pseudomonas fluorescens* utilise l'huile d'olive comme une meilleure source de production du biosurfactant où la CMC est égale à 290 mg.l^{-1} avec une réduction de la TS jusqu'à 32 mN.m^{-1} [253].

3.3.5.1.2 Activité émulsifiante

Les résultats obtenus montrent que l'E24 est fonction du type de liquide hydrophobe: un maximum d'émulsification est obtenu avec le pétrole brut (E24= 100%). Ceci met clairement en évidence l'intérêt d'utiliser ce biosurfactant dans le domaine environnemental dans la dispersion des nappes de pétrole en milieu marin et dans le domaine industriel. De plus, l'activité E24 est moins importante en utilisant l'huile d'olive (E24= 7,14%), l'huile de soja (E24= 9,32%), le gasoil (E24= 5,2%) et l'essence (E24= 14,44%). Cependant, en présence du toluène et de l'hexadécane, l'activité E24 est nulle (figure 3.27). Ce qui nous amène à conclure que l'émulsification des substances hydrophobes dépend fortement de la nature de biosurfactant. Donc, le biosurfactant de la souche *Streptomyces* sp. AB1 est capable de former des émulsions très stables avec le pétrole brut.

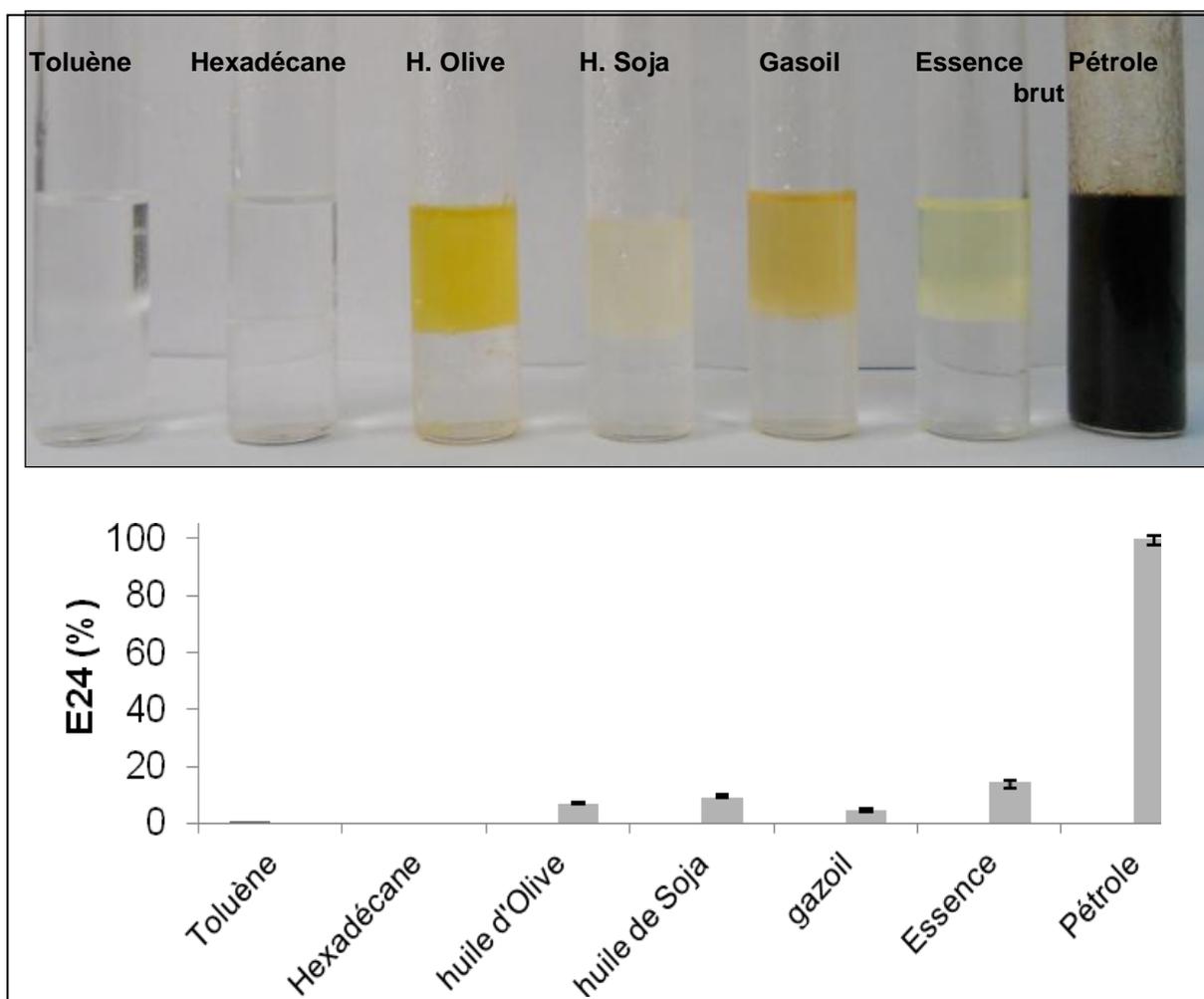


Figure 3.31 : Activité émulsifiante de biosurfactant de la souche AB1.

KUMARI *et al.* [260] ont signalé que le pétrole brut présente des émulsions plus stables en présence des biosurfactants issus des souches *Pseudomonas* sp. strain BP10 et *Rhodococcus* sp. strain NJ2. Le biosurfactant de la souche *Bacillus methylotrophicus* USTB était un bon émulsifiant contre le pétrole brut (E24= 78%) [149].

Par contre, le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis* sp. strain B4 présente un meilleur émulsifiant avec l'huile d'olive, l'indice d'émulsion était de 80% [162]. Le biosurfactant de *Pseudomonas* sp. strain 2B forme une bonne émulsion avec le benzène (E24= 84%) [261]. La souche *Streptomyces* sp. strain B3 a produit un biosurfactant capable de former des émulsions stables avec le pétrole brut, le xylène, l'hexadécane, l'octadécane et le diesel (E24 entre 70 et 85%) [164].

3.3.5.1.3 Stabilité thermique

Les résultats obtenus (figure 3.32) montrent que le Bio-AB1 (à CMC) est stable pour des températures inférieures ou égale 70 °C. En effet, le biosurfactant conserve les mêmes valeurs de la TS et de l'activité E24 avec le pétrole brut dans une gamme de température allant de 4 à 70 °C. Au-delà, le biosurfactant perd ses propriétés tensioactives par l'augmentation de la TS. Par exemple, à 100 °C, les valeurs de la TS et de l'activité E24 sont respectivement 40 mN.m⁻¹ et 85%. Par rapport aux travaux antérieurs [162, 164, 165], le Bio-AB1 présente une stabilité thermique intéressante à haute température (70 °C).

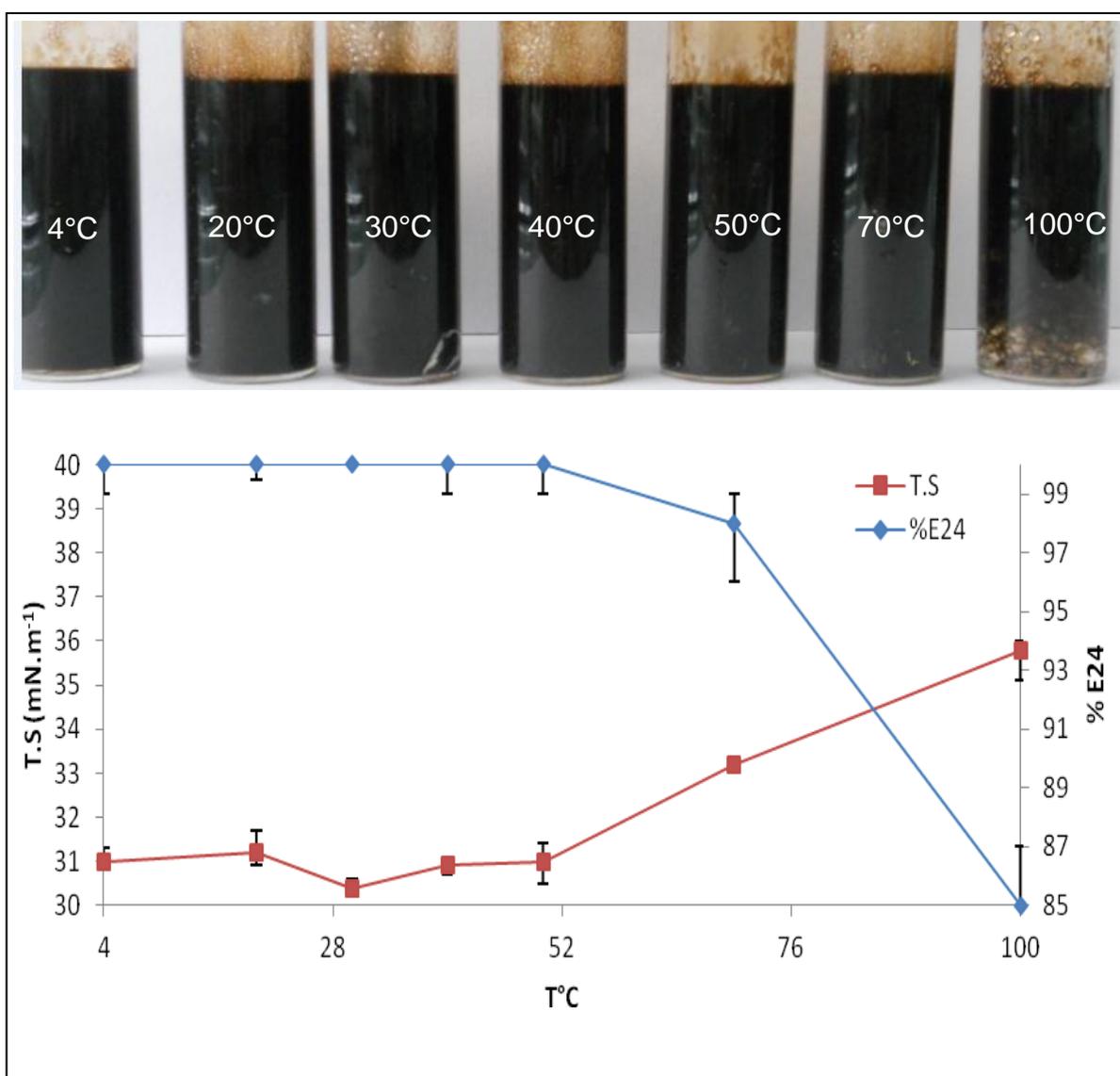


Figure 3.32 : Effets de la température d'incubation (24h) sur le biosurfactant (à CMC) produit par la souche AB1.

Des résultats similaires ont été trouvés par KIRAN *et al.* [122] pour un biosurfactant produit par *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 et par KHOPADE *et al.* [162], pour un biosurfactant produit par *Nocardiopsis* sp. strain B4. Par contre, le biosurfactant issu de la souche *Streptomyces* sp. strain B3 a montré une stabilité thermique inférieure à 45°C [164]. Ainsi que, la souche *Streptomyces* sp. strain S1 isolée par KOKARE *et al.* [165] produit un biosurfactant montrant une faible stabilité thermique (inférieure à 40 °C).

Par conséquent, les résultats obtenus sur la stabilité thermique permettront la possibilité d'appliquer ce biosurfactant (Bio-AB1) dans la récupération du pétrole et dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [162, 164, 262].

3.3.5.1.4 Stabilité chimique

3.3.5.1.4.1 Effet de la salinité

Les résultats représentés sur la figure 3.33 révèlent que la TS et l'activité E24 restent stables jusqu'à 30 g.l⁻¹ de NaCl (TS= 30,3 mN.m⁻¹ et E24= 100%). En augmentant la salinité, la stabilité du biosurfactant diminue (à 100 g.l⁻¹ de NaCl: TS= 33,7 mN.m⁻¹ et E24= 65,3%). Nous remarquons qu'il n'y a pas de corrélation entre la TS et l'E24. Par exemple, à 300 g.l⁻¹ de NaCl (TS= 35,3 mN.m⁻¹ et E24= 1%).

Selon DESAI et BANA [127], des concentrations supérieures à 20 g.l⁻¹ en NaCl sont suffisantes pour inhiber les tensioactifs chimiques. KHOPADE *et al.* [162] ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Nocardiopsis* sp. strain B4 pouvait former des émulsions stables jusqu'à 80 g.l⁻¹ de NaCl. De même, le biosurfactant produit par la souche *Streptomyces* sp. strain B3 est stable à 60 g.l⁻¹ de NaCl (E24 à 80%) [164]. Par ailleurs, certains travaux ont montré que les biosurfactants peuvent supporter des concentrations en sel allant jusqu'à 300 g.l⁻¹ de NaCl [144, 263].

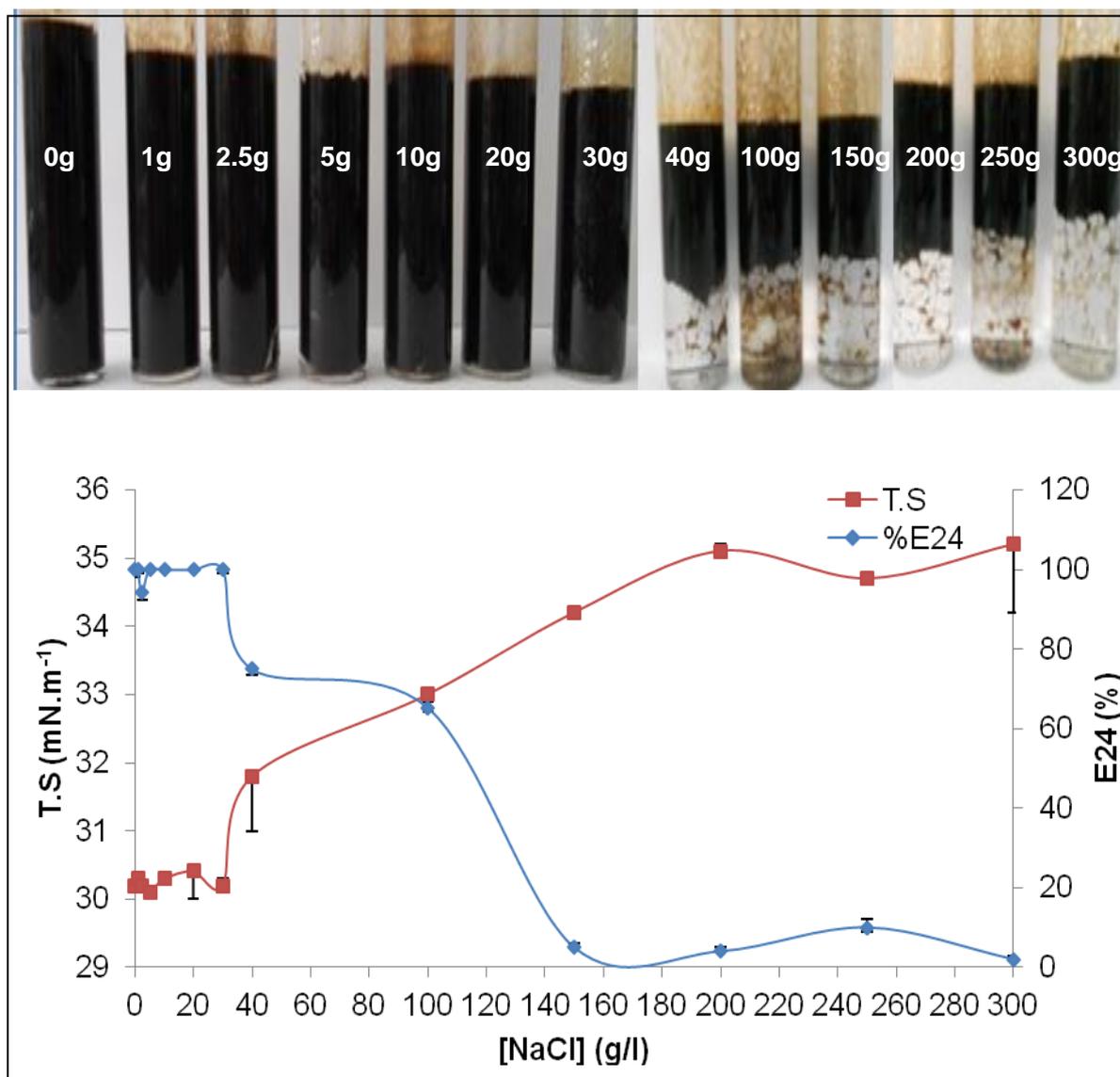


Figure 3.33 : Effet de la variation de salinité en NaCl sur la stabilité chimique de biosurfactant de la souche AB1 (temps d'incubation 24 h).

3.3.5.1.4.2 Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur la stabilité de biosurfactant montrent que le Bio-AB1 est très stable dans les milieux acides et basiques. Dans une gamme de pH variant entre 2 et 11, les valeurs de la TS sont presque constantes (31 à 30 mN.m⁻¹) (figure 3.34).

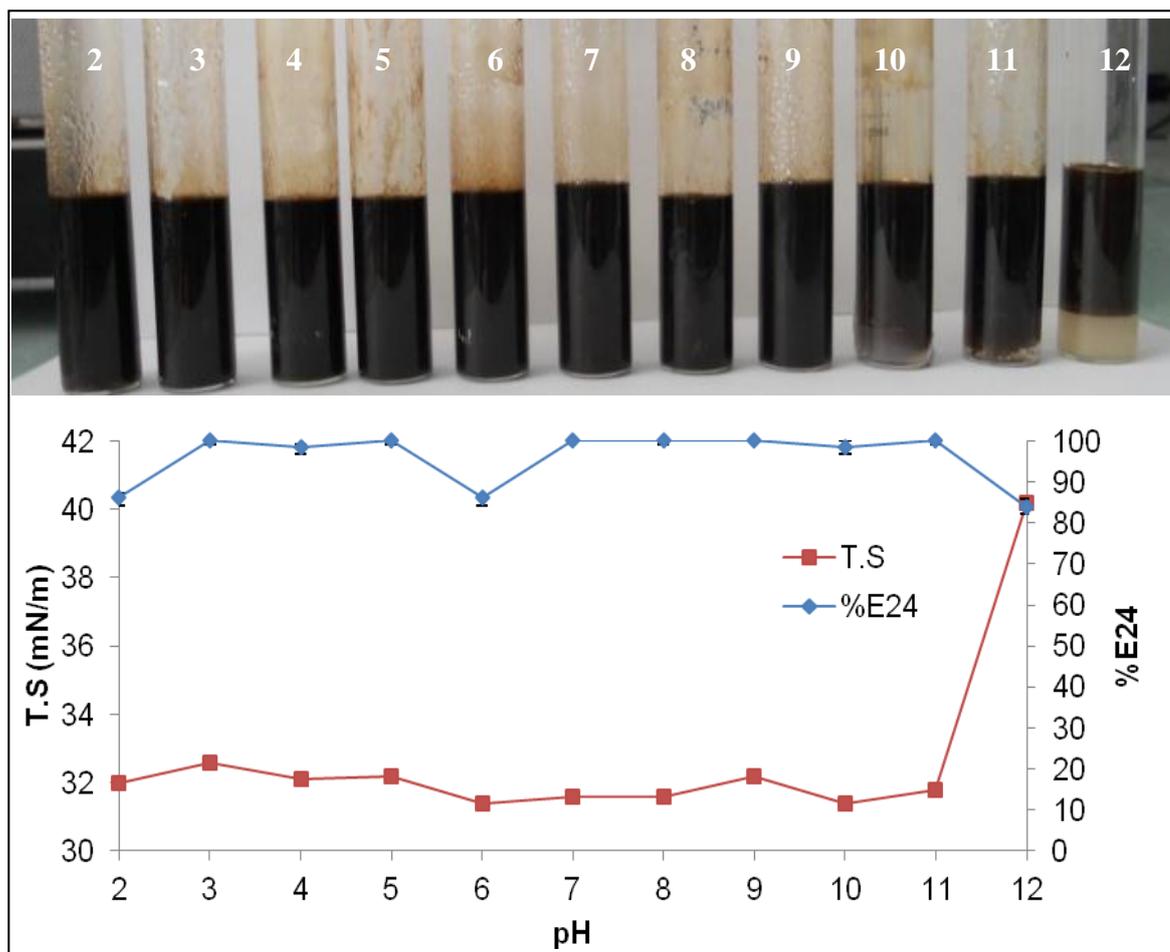


Figure 3.34 : Effet de la variation de pH sur la stabilité chimique de biosurfactant de la souche AB1 (temps d'incubation 24 h).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des travaux antérieurs [144, 262, 263]. Ces auteurs ont trouvé que le pH [1- 12] n'affecte pas la stabilité de certains biosurfactants. Par contre, d'autres travaux ont montré l'instabilité du biosurfactant sous l'effet du pH dans une large gamme (acides – basiques). Le biosurfactant produit par la souche *Nocardioopsis* sp. strain B4 est stable qu'en milieux basiques (8 à 12) [162]. Du même, le biosurfactant produit par la souche *Streptomyces* sp. strain B3 montre une stabilité uniquement en milieu alcalin (8 à 12) [164]. Egalement, HADDAD *et al.* [264] ont trouvé qu'un pH acide (pH 3 et 4) influe sur l'activité de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* HOB2. D'autres travaux ont signalé la stabilité dans les milieux acides, APARNA *et al.* [261] ont isolé une nouvelle souche de *Pseudomonas* sp. strain 2B productrice de biosurfactant, ce dernier présente une très bonne stabilité en milieu acide (2 à 6).

3.3.5.1.5 Activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche AB1 déterminée contre cinq (05) bactéries et une (01) levure sont représentés dans la figure 3.35.

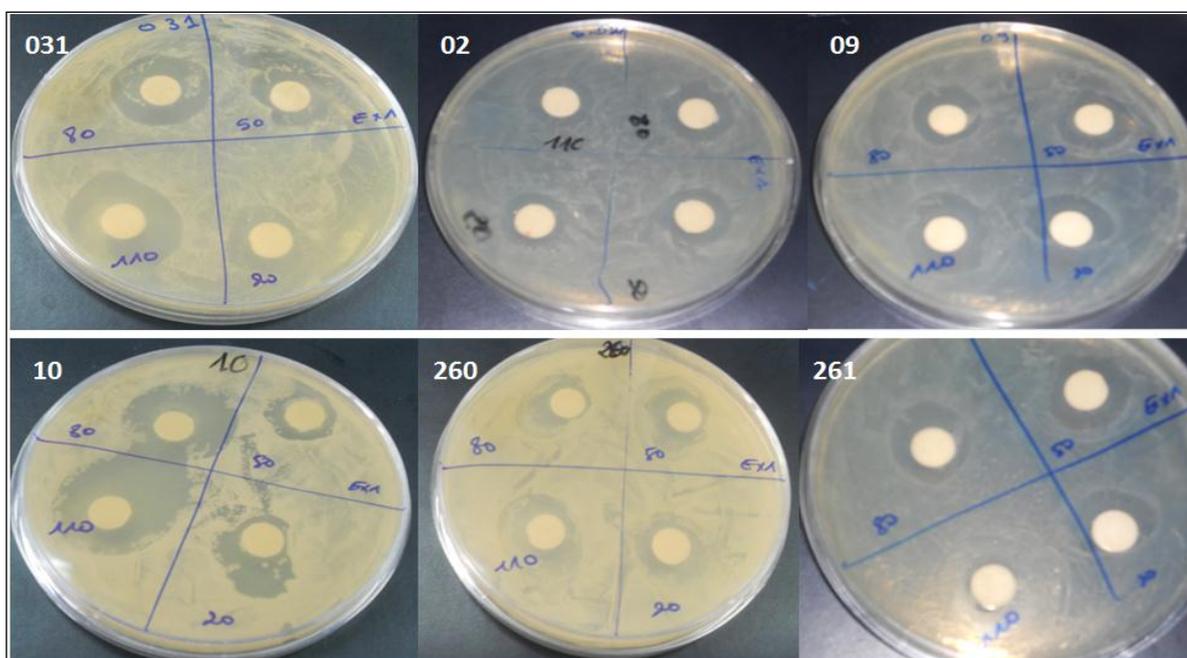


Figure 3.35 : Activité antimicrobienne de l'extrait du biosurfactant de la souche AB1. 031 : *Candida albicans* ATCC 10231. 02 : *Escherichia coli* ATCC 10536. 09 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. 10 : *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. 260 : *Salmonella enterica* CIP 8039. 261 : *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

La quantité minimale inhibitrice (QMI) est mentionnée dans le tableau (3.8).

Tableau 3.8 : Quantité minimale inhibitrice du Bio-AB1.

Microorganismes pathogènes	Bio-AB1 ($\mu\text{l.ml}^{-1}$) QMI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	0,4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	0,4
<i>Salmonella enterica</i> CIP 8039	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	0,4
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1

L'activité antimicrobienne du Bio-AB1 testé contre des souches bactériennes Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*) et Gram+ (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et une souche de levure (*Candida albicans*) montrent que :

- La QMI de l'activité bactérienne allant de 0,4 à 1 $\mu\text{l. ml}^{-1}$.
- La QMI de l'activité antifongique égale à 1 $\mu\text{l. ml}^{-1}$.
- La QMI la plus faible (0,4 $\mu\text{l. ml}^{-1}$) était très efficace contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.

Les multiples applications des biosurfactants ont fait l'objet d'intenses recherches dans les domaines thérapeutiques. Certains lipopeptides et glycolipides sont d'excellents agents antibactériens, antifongiques et antiviraux [265]. Parmi les microorganismes producteurs de biosurfactants antimicrobiens, nous pouvons citer: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas ssp.*, *Candida antarctica* et *Candida lipolytica* UCP 0988 [151, 265, 266, 267, 268].

A propos de l'activité antimicrobienne, des résultats similaires obtenus par KHOPADE *et al.* [164] ayant montrés que le biosurfactant produit par la souche *Streptomyces sp.* strain B3 est caractérisé par une activité antibactérienne contre les microorganismes pathogènes à savoir: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et *Candida albicans*. EDDOUAOUA *et al.* [144] ont montré que le biosurfactant (nature lipopeptidique), isolé à partir de la souche *Staphylococcus sp.* strain 1E, est identifiée comme un antimicrobien très efficace (les valeurs de CMI variant de 1,68 à 13,5 mg. ml^{-1}).

Plusieurs chercheurs ont rapporté que la nature du biosurfactant influe directement sur l'activité antimicrobienne. TSUGE *et al.* [266] ont montré qu'un biosurfactant de nature lipopeptidique a une activité antimicrobienne plus efficace que la surfactine et la streptofactine. BECHARD *et al.* [265] ont extrait un biosurfactant de nature lipopeptidique à partir de l'espèce *Bacillus subtilis* qui est efficace contre les champignons et les bactéries Gram⁻. Cependant, le biosurfactant de nature glycolipide a une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram⁻ et Gram⁺ [162, 267].

3.3.6 Etude structurale

3.3.6.1 Analyse IRATR du biosurfactant

L'étude du spectre IRATR de la fraction purifiée F7 sur colonne C18 (figure 3.36) a révélé que:

- La bande située autour de $3239,23 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux vibrations des liaisons de type OH (alcool) [242].
- Les deux valeurs obtenues à $2922,42$ et à $2852,98 \text{ cm}^{-1}$ ont révélé la présence des liaisons de type C-CH, C-CH₂ et C-CH₃ [160, 242].
- Les deux valeurs affichées à $1708,59$ et à $1647,05 \text{ cm}^{-1}$ sont liées aux vibrations de C=O de groupements carbonyles (C=O de carboxyle) [160, 164].
- La valeur située autour de $1457,4 \text{ cm}^{-1}$ attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O confirmant la présence des liaisons formées entre les atomes de carbone et les groupes hydroxyles dans les structures chimiques de la partie glycoside [157].
- La valeur significative située à $1412,95 \text{ cm}^{-1}$ correspond aux vibrations d'élongation des liaisons de -CH₃ [157, 230, 242].
- La bande située entre 1000 à 1260 cm^{-1} est due à la présence intense d'élongation de C-O d'alcool [164, 230, 231].
- La bande située entre $1141,7$ et $1047,28 \text{ cm}^{-1}$ est due aux vibrations des liaisons C-O-C dans les esters [164, 231].
- La bande située autour $874,44$ et $927,11 \text{ cm}^{-1}$ est affectée aux vibrations des liaisons O-H dans les acides carboxyliques [231].

Le Bio-AB1, constitué d'environ $26,82 \text{ mg.l}^{-1}$ de glucides (milligramme équivalent du glucose) selon le dosage colorimétrique (photo du test en annexe 3) et les interprétations du spectre IRATR, est fort probablement appartient aux glycolipides [164, 269].

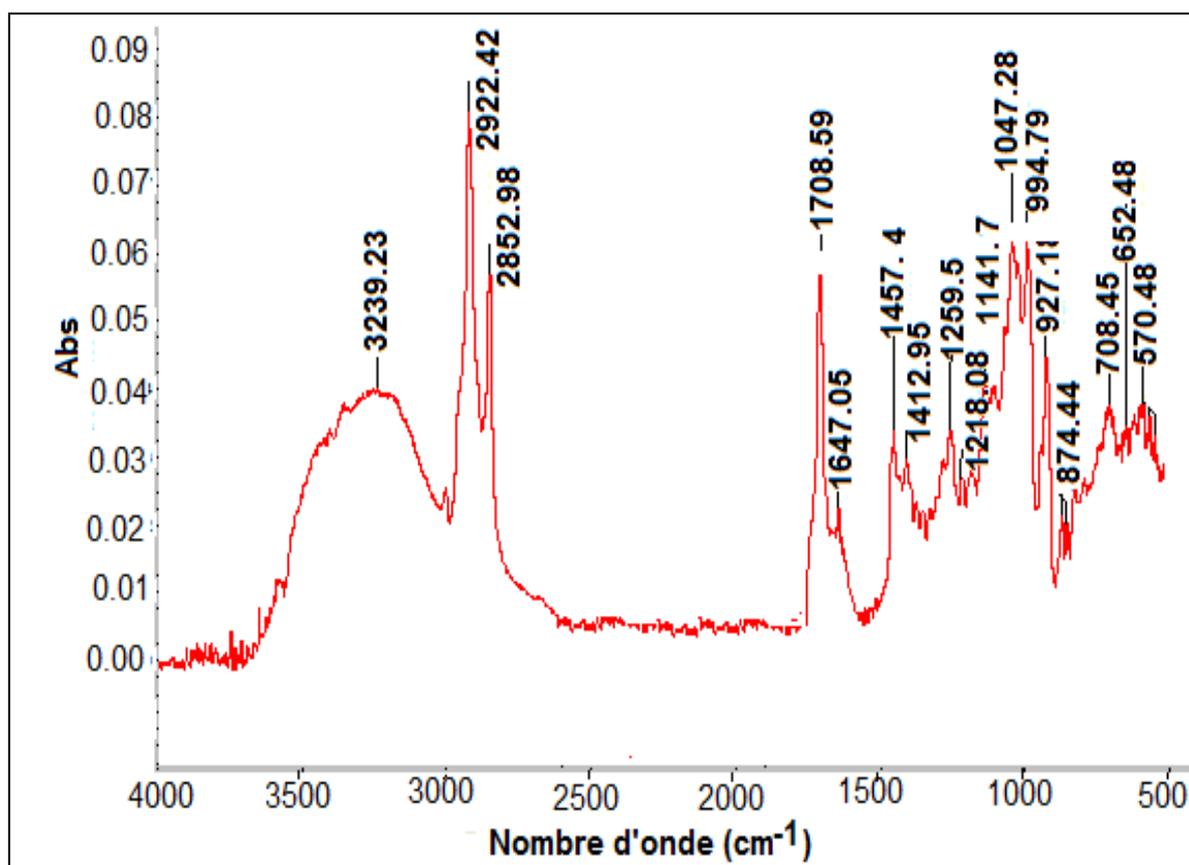


Figure 3.36 : Spectre de IRATR de biosurfactant de la souche AB1 (fraction 7).

3.3.6.3 Analyse par LC-MS

Les résultats de l'analyse LC-MS de la fraction F7 sont présentés sur la figure 3.37-a.

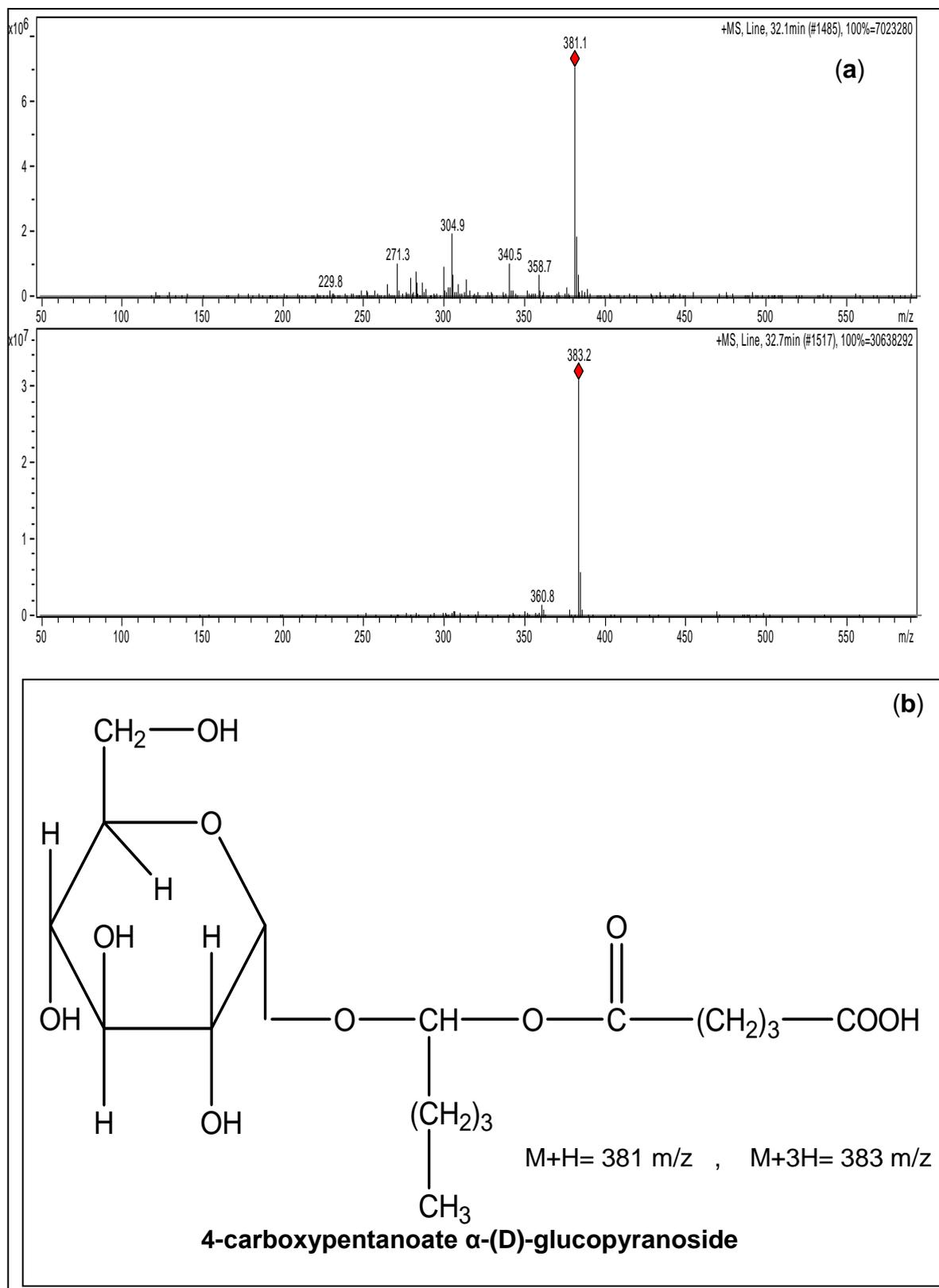


Figure 3.37 : Analyse LC-MS de biosurfactant de la souche AB1 (fraction 7).

L'étude de spectre LC-MS a montré la présence de deux pics de masse : pic 1 ($M + H$ à $m/z = 381,1$) et pic 2 ($M + 3 H$ à $m/z = 383,2$). Et en se basant sur le test de glucides, l'analyse IRATR et les fragmentations de masse et la structure de base de la fraction 7 et en comparaison avec les structures publiées, nous pouvons proposer une structure préliminaire de Bio-AB1.

La fragmentation de la molécule proposée (figure 3.37-b) nous a permis de confirmer la présence de sous fragments apparues dans le spectre LC-MS comme suit :

- La perte de COOH ($M+H+Na-COOH$) conduit au pic correspond à m/z 359 (358,7).
- La molécule à m/z 359 sera fragmentée pour former m/z 341 (340,5) par la perte d'une molécule d'eau ($M+H+Na-COOH-H_2O$).
- La molécule de base monorhamnolipide perd deux autres molécules d'eau afin de former m/z 305 (304,9) ($M+H+Na -COOH-3H_2O$).
- Le pic à m/z 271,3 sera formé par l'élimination de COOH, CH_3 et $4H_2O$.
- Le pic à m/z 229,8 est probablement formé par l'élimination de $CO(CH_2)_3COOH$ et deux molécules d'eau.

Néanmoins, une purification supplémentaire doit être réalisée à l'avenir par analyse structurale par RMN et la détermination avec exactitude de la structure de ce biosurfactant produit par la souche locale *Streptomyces* sp. AB1.

3.3.7 Applications environnementales du biosurfactant

3.3.7.1 Solubilisation des HAP

Le taux de solubilité des HAP, provoqué par le Bio-AB1, peut être exprimé en terme de rapport de Sw/Sw^* où Sw et Sw^* qui représente l'absorbance des HAP (du naphthalène ou du phénanthrène) dans une solution de biosurfactant à CMC (125 mg.l^{-1}) et dans l'eau distillée à 254 nm pour le naphthalène et 252 nm pour le phénanthrène.

Les résultats de la solubilisation des HAP sont présentés sur la figure ci-dessous (3.38).

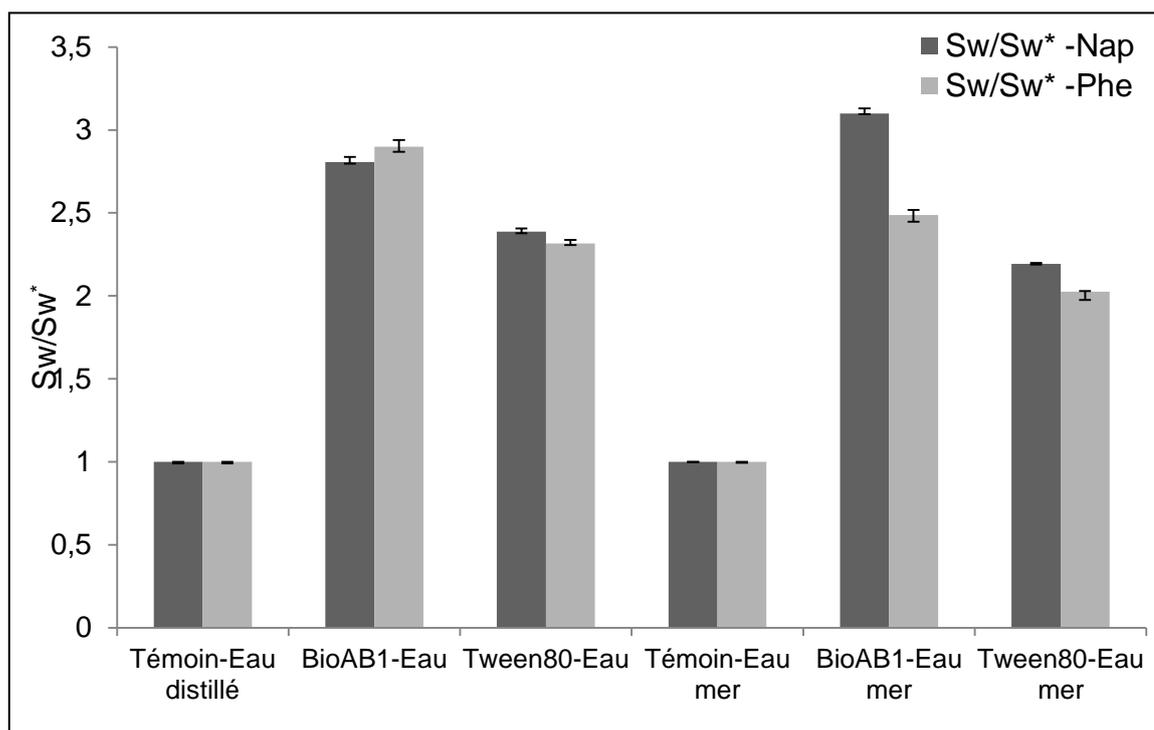


Figure 3.38 : Effets de biosurfactant produit par la souche AB1 (Bio-AB1) et Tween 80 sur la solubilisation du naphtalène (100 mg.l^{-1}) et du phénanthrène (100 mg.l^{-1}) dans l'eau douce et dans l'eau de mer.

Les résultats obtenus de la solubilisation des HAP dans l'eau douce montrent clairement l'effet de Bio-AB1 sur la solubilité des HAP. Ce dernier a augmenté de 2,8 et de 2,9 fois la solubilité du naphtalène et du phénanthrène, respectivement par rapport au contrôle (eau distillée). Par contre, l'utilisation de Tween 80 a donné un rapport de Sw/Sw^* égal à 2,38 et à 2,3 fois pour le naphtalène et le phénanthrène, respectivement.

Dans l'eau de mer, les rapports de Sw/Sw^* sont de 3,1 et de 2,49 fois, respectivement pour le naphtalène et le phénanthrène en présence de Bio-AB1. Cependant, le Tween 80 a donné des rapports de Sw/Sw^* égal à 2,19 et à 2,05 pour le naphtalène et le phénanthrène, respectivement, par rapport au contrôle (eau de mer). A titre comparatif, la solubilisation des HAP par le Bio-AB1 est significative par rapport au Tween 80.

Le biosurfactant testé a un effet très évident sur la solubilisation du naphtalène et du phénanthrène dans l'eau douce et dans l'eau de mer.

3.3.7.2 Remobilisation du pétrole

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.39.

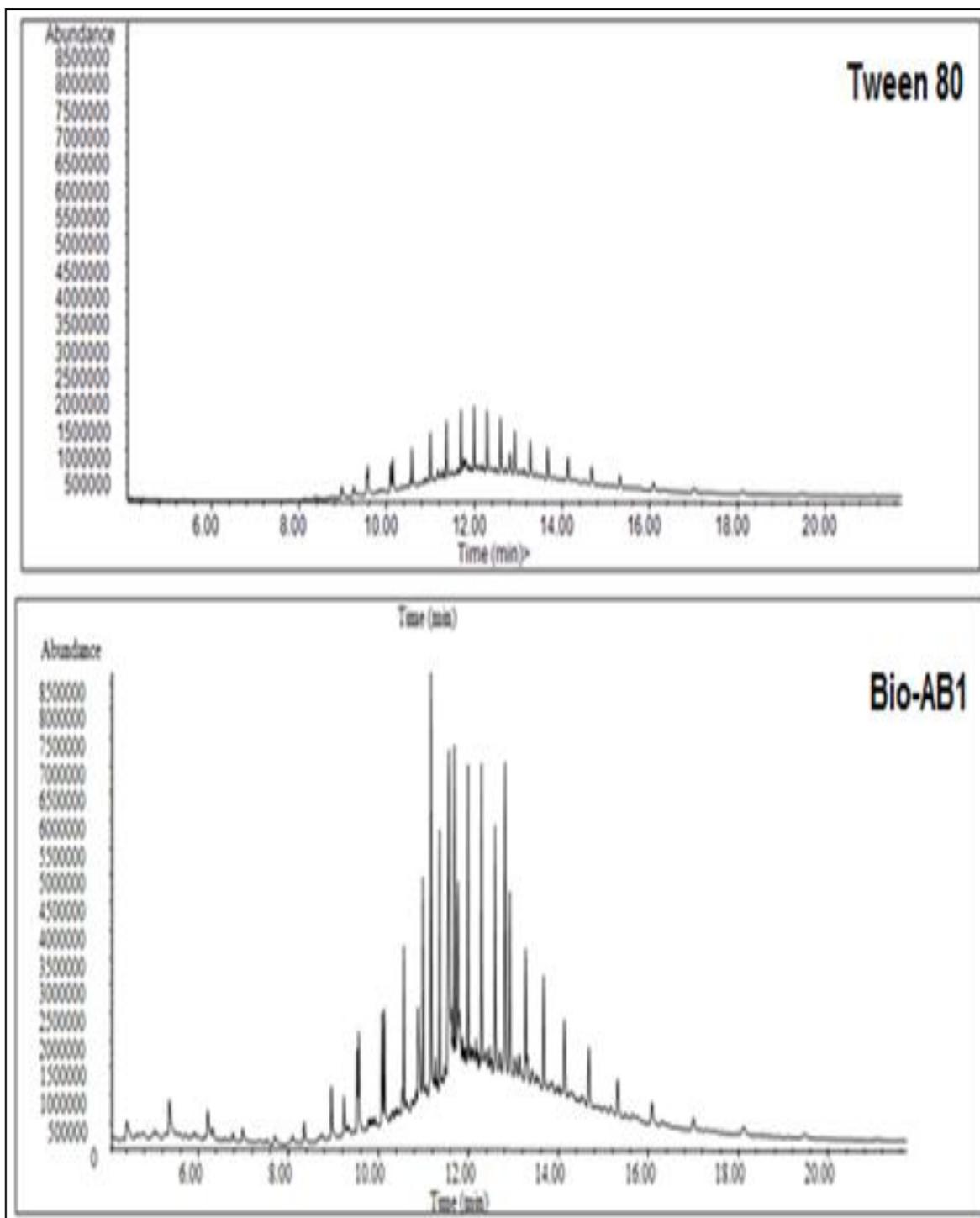


Figure 3.39 : Spectres CG-SM de la remobilisation du pétrole (hydrocarbures) par le Bio-AB1.

Le Bio-AB1 a montré une efficacité de remobilisation du pétrole (1,26 fois) par rapport à l'utilisation du Tween 80. Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser ce Bio-AB1 dans la remobilisation du pétrole (hydrocarbures) à partir d'un sol contaminé.

Afin de valider l'efficacité des tensioactifs d'origine biologique dans la bioremédiation des sites contaminés aux hydrocarbures, il est nécessaire de comparer les rendements obtenus avec ceux de leurs homologues chimiques [270, 271]. A cet égard, l'utilisation de ce biosurfactant dans le domaine environnemental est certainement prometteuse. Toutefois, la solubilisation des HAP (du naphtalène et du phénanthrène) et la remobilisation des hydrocarbures en solution de Bio-AB1 et de Tween 80 était variable selon les conditions d'application. MNIF *et al.* [270] ont isolé un biosurfactant (bioC2SS100 à CMC égale 150 mg.l^{-1}) produit par *Halomonas* sp. strain C2SS100. Ce bioC2SS100 a montré que la solubilisation du phénanthrène (250 mg.l^{-1}) en présence de 100 g.l^{-1} NaCl, le Sw/Sw^* est de 15 fois et presque zéro, respectivement, à 37 et à 55 °C. EDDOUAOUDA *et al.* [144] ont révélé un taux de solubilité du phénanthrène (250 mg.l^{-1}) de 20 fois par rapport au contrôle (eau distillée) provoqué par le biosurfactant de concentration 1000 mg.l^{-1} produit par la souche *Staphylococcus* sp. strain 1E, sachant que la CMC égale à 750 mg.l^{-1} .

Ces auteurs ont montré la solubilisation du phénanthrène (250 mg.l^{-1}) est meilleure lorsque la concentration du biosurfactant est supérieure à la CMC. De plus, BORDAS et LAFRANCE [271] ont montré que presque 0 fois de la mobilisation du pyrène à partir d'un sol sableux après l'injection de la solution de biosurfactants (rhamnolipides) à CMC égale 100 mg.l^{-1} produit par la souche *Pseudomonas aeruginosa*. Pour une solution de biosurfactants de concentration 2500 mg.l^{-1} , 80 fois sa solubilité dans l'eau pure a été obtenue. Deux biosurfactants MTCC7815 et MTCC7818 (500 mg.l^{-1}) récupèrent 41 et 26 mg.l^{-1} du pyrène (concentration initiale de 60 mg.l^{-1}), respectivement [258].

URUM *et al.* [272] ont étudié l'efficacité de la bioremédiation du pétrole brut à partir d'un sol contaminé sous l'effet des biosurfactants. Ils ont montré 44 et 27% d'élimination du pétrole, respectivement, par rhamnolipide et par saponine naturelles.

De même, le biosurfactant de la souche *Staphylococcus* sp. strain 1E a montré une efficacité de remobilisation des hydrocarbures de 1,3 fois supérieure au surfactant chimique (Tween 80) [144]

LAI *et al.* [273] ont étudié la capacité de la remobilisation de pétrole à partir du sol par deux biosurfactants (rhamnolipide et surfactine) et de deux surfactants chimiques (Tween 80 et Triton X-100). Ils ont montré que le pourcentage de récupération du pétrole avec les biosurfactants était 23 et 14%, respectivement avec rhamnolipide, surfactine et sont efficace que les surfactants chimiques (6 et 4%, respectivement, avec Triton X-100 et Tween 80).

FRANZETTI *et al.* [274] ont évalué l'application de biosurfactant produit par *Gordonia* sp. strain BS29 dans la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. Les résultats ont montré que 33% des hydrocarbures ont été récupérés par le biosurfactant (mélange entre rhamnolipides et bioémulsants) produit par cette souche d'actinomycètes.

Une expérience de la remobilisation sur une colonne de sable faite par PEREIRA *et al.* ils ont indiqué que le biosurfactant permet de mobiliser 76% du pétrole dans 2 heures [275].

En conclusion, la production des biosurfactants dépend de plusieurs paramètres entre autres la nature de substrat et le type de microorganisme. Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sites contaminés par des substances hydrophobes. Dans notre cas, les streptomycètes ont été isolés à partir d'un sol très riche en acides humiques. Ces derniers sont connus par leur faible solubilité. Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible.

L'analyse en glucide, l'IRATR et la LC-SM montrent que le biosurfactant Bio-AB1 est de nature glycolipidique. L'étude des propriétés physicochimiques et antimicrobiennes montre que ce biosurfactant peut être utilisé dans des milieux salins (30 g.l⁻¹) ou acido-basiques (pH égal 2 à 11), son activité antimicrobienne est également intéressante pour des applications médicales et industrielles (pharmaceutique, cosmétique et alimentaire). Par ailleurs, la solubilisation des

HAP et la remobilisation des hydrocarbures (sol contaminé par le pétrole brut) sont des facteurs confirmant que ce biosurfactant est un produit très intéressant de point de vue application environnementale, notamment, dans la dépollution des sites contaminés par les hydrocarbures par rapport aux surfactants chimiques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le monde, le risque d'une contamination des zones aquatiques, des nappes aquifères et des sols par les hydrocarbures est un constat réel d'où la résolution de ces problèmes environnementaux est devenue une nécessité prioritaire. Dans cette même orientation, l'application des microorganismes (en particulier des bactéries) en bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures est rendue de grand intérêt. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à étudier les efficacités des souches de streptomycètes à dégrader les hydrocarbures et production de biosurfactants. Ces souches isolées localement ont de bonnes potentialités de dégradation des acides humiques et productrices des enzymes extracellulaires (peroxydases et protéases).

Dans cette approche, nous a amené à étudier la capacité des trois souches appartenant aux espèces *Streptomyces* sp. AB1, *Streptomyces* sp. AH4 et *Streptomyces* sp. AM2, à dégrader le pétrole brut, le naphtalène et le phénanthrène. La mise en évidence de sous produits de dégradation de deux HAP, la production de biosurfactant par une souche sélectionnée et la mise en œuvre la remobilisation de pétrole brut et de la solubilisation des HAP sont aussi envisagées.

1. Biodégradation du pétrole brut et des HAP:

- Les trois souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) dégradent les *n*-alcanes (*n*-C₁₁ à *n*- C₃₀) de pétrole brut et les deux HAP (naphtalène et phénanthrène). Les trois souches dégradent mieux la concentration de 100 mg.l⁻¹ (plus que la solubilité) du naphtalène et du phénanthrène et atteignent le maximum;
- La souche AH4 dégrade mieux le pétrole brut (80,96% après 30 jours d'incubation) comparativement aux autres souches (AB1=76,65%, AM2=67,94%);
- La souche AH4 dégrade mieux le naphtalène (85,23%) que les deux autres souches (AB1= 82,36%, AM2= 81,03%);

- La souche AB1 (98,52) dégrade mieux le phénanthrène que les autres souches (AH4= 93,71%, AM2=93,55%);
- Ces trois souches dégradent mieux les concentrations les plus élevées (plus que leur solubilité).

2. Métabolites des la biodégradation des HAP:

Les métabolites de dégradation du naphtalène et du phénanthrène chez les trois souches empreintent essentiellement la voie de l'acide phtalique et les composés phénoliques.

3. Production, caractérisation et application environnementale de biosurfactant:

- Le biosurfactant Bio-AB1 a une stabilité intéressante *vis-à-vis*:
 - L'augmentation de la température (4 à 70 °C);
 - La salinité (0 à 30 g.l⁻¹ de NaCl);
 - Le pH (2 à 11).
- Ce biosurfactant se caractérise par:
 - Un pouvoir émulsifiant à 100% avec le pétrole brut;
 - CMC égale à 125 mg.l⁻¹;
 - Activité antimicrobienne très efficace.
- Les analyses biochimiques (test des glucides), IRATR et LC-MS ont révélé que le Bio-AB1 est de nature glycolipide avec une masse moléculaire de 380 uma.

Finalement, les résultats de l'application de la solubilisation des HAP (naphtalène et phénanthrène) et la remobilisation du pétrole brut en utilisant le Bio-AB1 et le Tween 80 prouvent clairement son efficacité d'où l'importance de l'utiliser en biotraitement.

En guise de perspectives, nous envisagerons poursuivre les recherches sur:

- L'élargissement de l'étude sur la biodégradabilité des autres HAP (purs ou mixtes);

- L'étude de la dégradation des HAP par un consortium contenant les trois souches de streptomycètes;
- L'étude des mécanismes réactionnels de la biodégradation des HAP et déterminer les enzymes responsables;
- L'optimisation de la production des biosurfactants en raison de leurs avantages et de leurs utilisations dans les domaines industriels et environnementaux;
- La purification et la détermination structurale de Bio-AB1 (RMN ou autres outils d'analytiques plus poussés).

APPENDICE

A Liste des symboles et abreviations

CG-SM	: chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse
CMC	: concentration micellaire critique
DCM	: dichlorométhane
DDP	: diamètre du déplacement du pétrole brut
E24	: activité émulsifiante (indice d'émulsion)
FA	: fraction acide
FN	: fraction neutre
HPLC	: chromatographie en phase liquide à haute performance
IRTF	: spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
IRATR	: spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ISP9	: international streptomycetes project 9
KBr	: bromure de potassium
LC-MS	: chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LB	: milieu Luria Bertani
MEB	: microscope électronique à balayage
MM	: milieu minimum
Nap	: naphthalène
Phe	: phénanthrène
QMI	: quantité minimale inhibitrice
TS	: tension de surface
UV-Vis	UV-Visible
mN.m ⁻¹	: milli newton par mètre
mUV	: milli ultra volts
tr.min ⁻¹	: tourne par minute
sp	: espèce n'a pas été identifiée avec plus de précision
tR	: temps de rétention

B Propriétés physicochimiques des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA

Tableau 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: Solubilité dans l'eau distillée 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

C Techniques d'isolement, identification phénotypique et génotypique des souches AB1, AH4 et AM2

○ Présentation de site de prélèvement

Au total, trois échantillons du sol ont été prélevés à partir du sol de surface (10- 20 premiers centimètres situés en dessous de la litière). Ces échantillons correspondent aux trois différents types du sol de la Mitidja (sols humides à Boufarik, sols rouges méditerranéens à Hadjout et vertisols à Meftah). L'échantillonnage a été effectué au cours du mois de Novembre 2006 [18, 19]. Les caractéristiques des sols sont indiquées ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques propriétés des sites utilisés pour isoler les actinomycètes.

Sites	Profondeur du sol (cm)	Humidité (%)	Matière organique (%)	Texture	Classification des sols
Boufarik	10	21- 50	1- 65	Argile	humide
Hadjout	10	17-25	2-37	Argile	rouge de Méditerranée
Meftah	10	22- 05	3- 06	Sity	Vertisole

○ Isolement d'actinomycètes

Les actinomycètes ont été isolés sur milieu ISP2 solide (on dissout : 4 g Extrait de levure (Panreac) et 10 g d'extrait de malte (Panreac) et 4g du glucose dans un litre de l'eau distille. On ajuster le pH de la solution à 7,2 avec HCl 0,1N et on ajouter 20 g d'Agar bactériologie en agitant bien la solution. Enfin, on stérilise la solution préparée pendant 20 min à 120°C dans l'autoclave.

Le milieu, additionné à 500 µg.l⁻¹ d'actidione pour éliminer la croissance des champignons, contient la chitine qui limite la croissance des bactéries. Il est enrichi par 0,5% (p : v) d'acide humique synthétique (AHS) pour l'isolement sélectif des souches adaptées à la dégradation d'AHS. 19 isolats d'actinomycètes obtenus sont répartis comme suit: 6 de Boufarik, 8 de Hadjout et 5 de Meftah [19, 20, 21].

Permi ces isolats 3 souches d'actinomycètes de genre de *Streptomyces* etaient performantes à dégrader une macromolécule polyaromatique tel que les acides humiques sur le milieu de culture liquide à base de sels minéraux. Le milieu minimum (MM), sa composition (g.l⁻¹) est : (NH₄)₂SO₄ (Merck) : 2,84 g, KH₂PO₄ (Fluka) : 2,38 g, K₂HPO₄ 3H₂O (Prolabo) : 5,65 g, MgSO₄ 7H₂O (Fluka) : 1 g, et 1 ml de la solution d'oligo-éléments (0,64 g CuSO₄ 5H₂O (Prolabo), 0,11g FeSO₄ 7H₂O (Merck), 0,79 g MnCl₂ 4H₂O (Fluka), 0,15 g ZnSO₄ 7H₂O (Prolabo), dans un litre de l'eau distillé). Le pH est ajusté à 7,2. Après la stérilisation du milieu à 120 °C pendant 20 min, 5% (m : v) d'AHs et 1g de glucose ont été ajouté au milieu de culture comme unique source de carbone et d'énergie. L'AHs a été stérilisé par microfiltration (0,45µm).

○ Identification d'actinomycètes

Les actinomycètes ont été identifiées par les méthodes de biotypage (API ZYM) et le séquençage d'ARN 16S. Les souches isolées appartiennent aux espèces *Streptomyces* sp. strain AB1 (code AB1: GU43467), *Streptomyces* sp. strain AH4 (code AH4: GU43474) et *Streptomyces* sp. strain AM2 (code AM2:GU434673) [15, 16, 17, 18, 19].

Les souches pures ont été repiquées sur milieu ISP9 solide (on dissout : 10 g Glucose (Merck), 2,84 g (NH₄)₂SO₄ (Merck), 2,38 g KH₂PO₄ (Fluka), 5,65 g K₂HPO₄ 3H₂O (Prolabo), 1 g MgSO₄ 7H₂O (Fluka) et 1ml d'une solution contenant (g /L) : 0,64 g CuSO₄ 5H₂O (Prolabo), 0,11g FeSO₄ 7H₂O (Merck), 0,79 g MnCl₂ 4H₂O (Fluka), 0,15 g ZnSO₄ 7H₂O (Prolabo), dans un litre de l'eau distillé. Les souches sont purifiées et conservées à 4 °C, pendant chaque mois, nous repiquons nos souches.

Les observations macroscopiques et microscopiques du mycélium, l'identification phénotypique et génotypique pour la souche AB1 de Boufarik, la souche AH4 de Hadjout et la souche AM2 de Meftah sont présentées sur les figures 1 et 2.

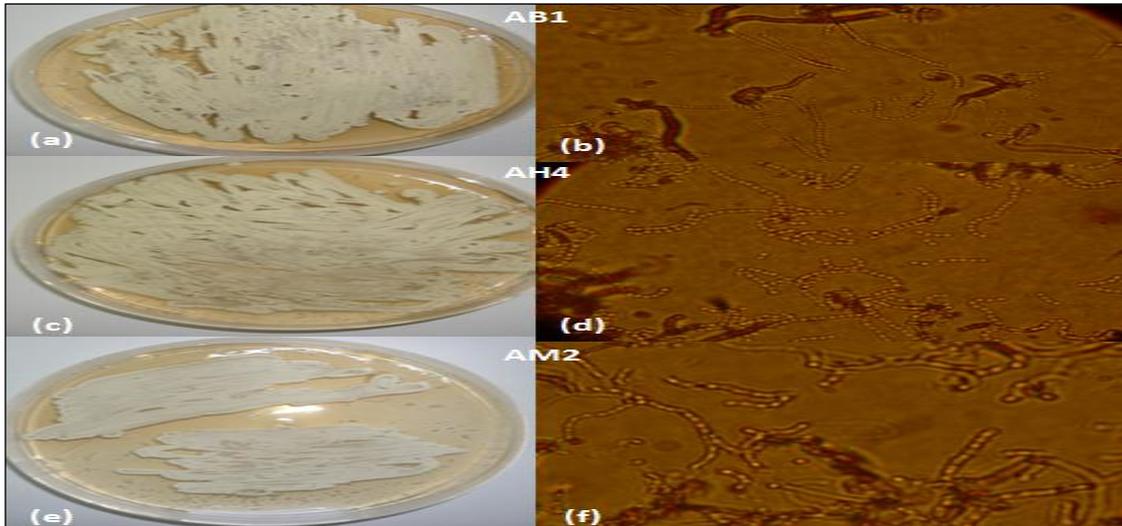


Figure 1 : Observations macroscopiques et microscopique du mycélium de la souche AB1, AH4 et AM2. Photos (a), (c) et (e) : Mycélium aérien. Photos (b), (d) et (f) : Spores exogènes.

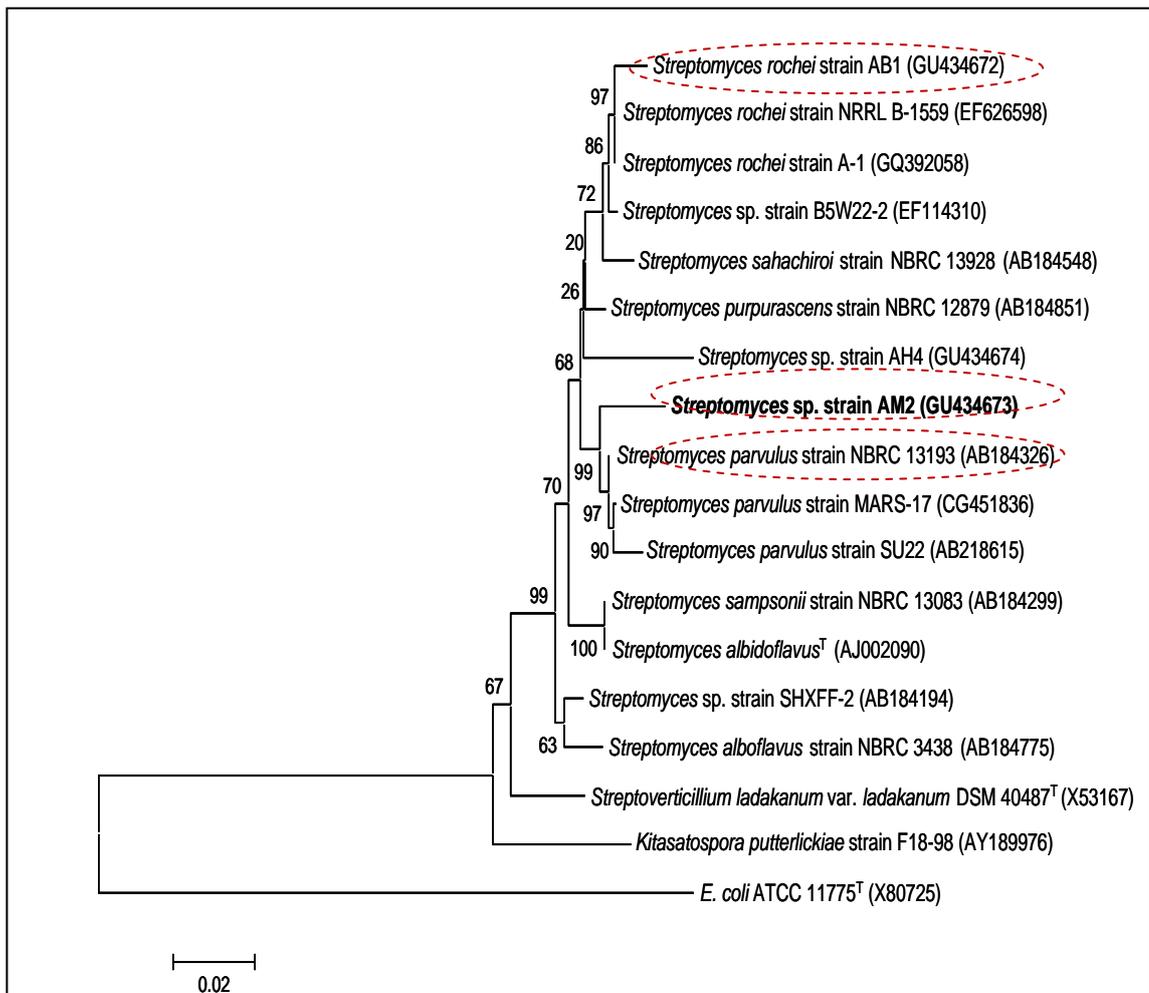


Figure 2 : Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche AB1, de la souche AH4 et de la souche AM2 avec la banque de données GenBank BLAST.

D Courbe d'étalonnage

○ Par l'UV-Visible

➤ Du naphthalène à 254 nm

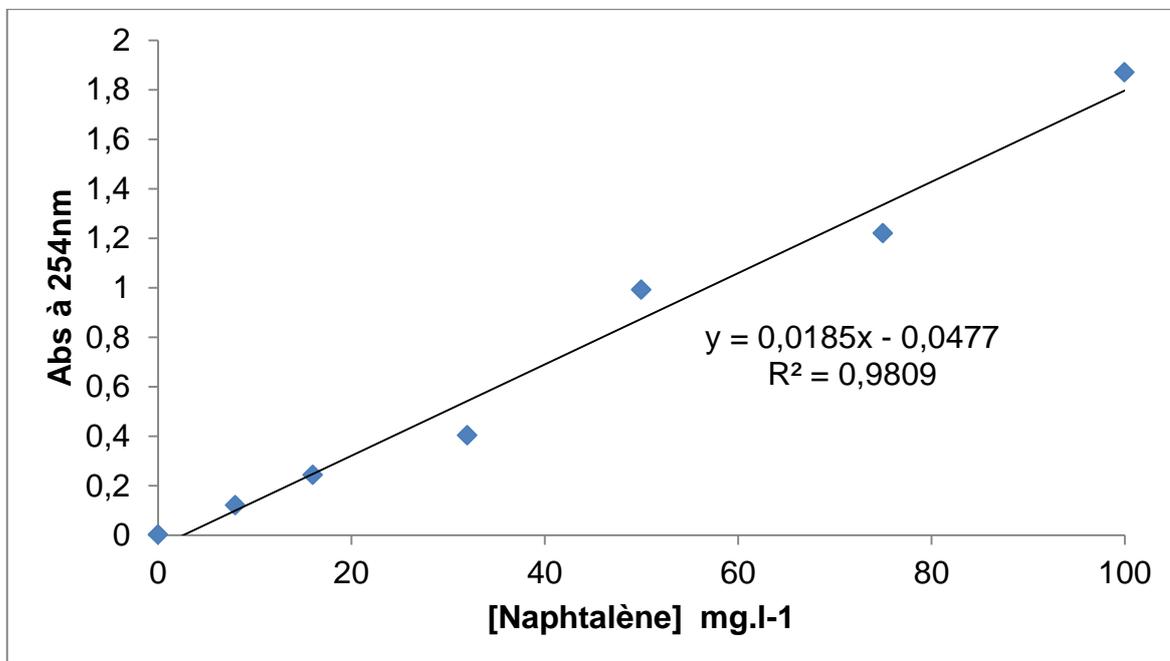


Figure 3 : Courbe d'étalonnage du naphthalène 100 mg.l⁻¹ par l'UV-Vis à 254nm.

➤ Du phénanthrène à 252 nm

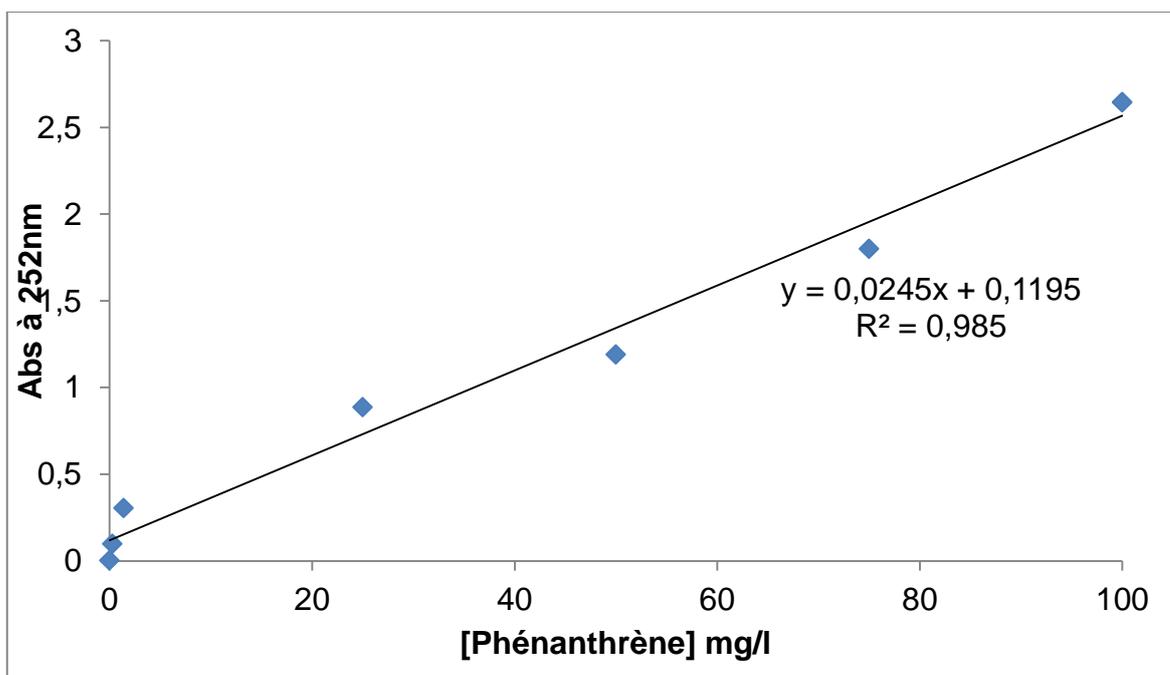
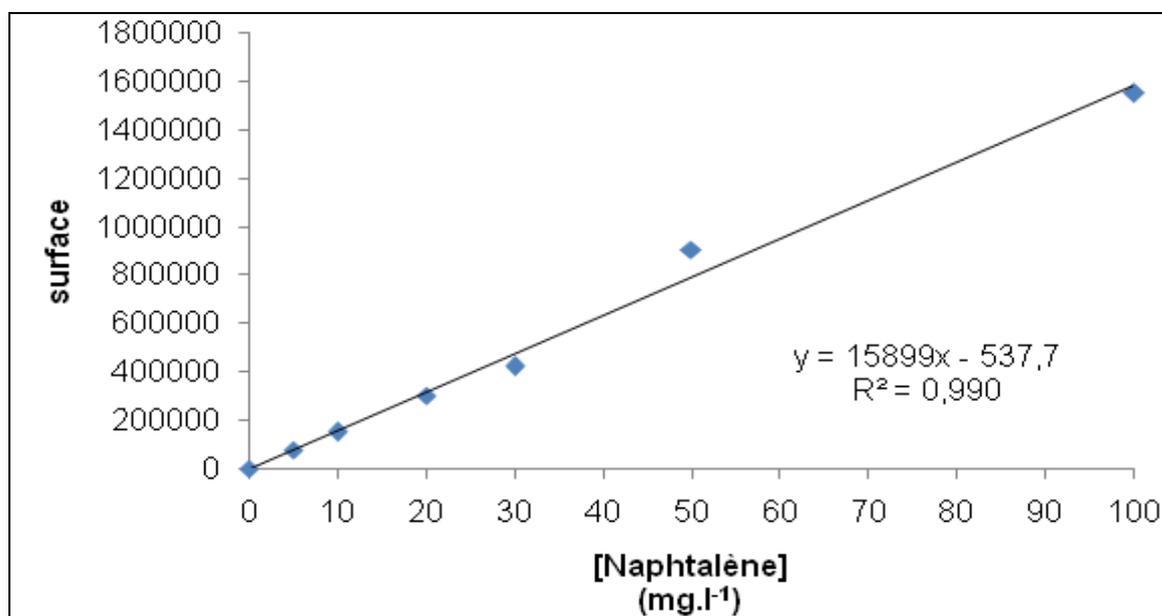
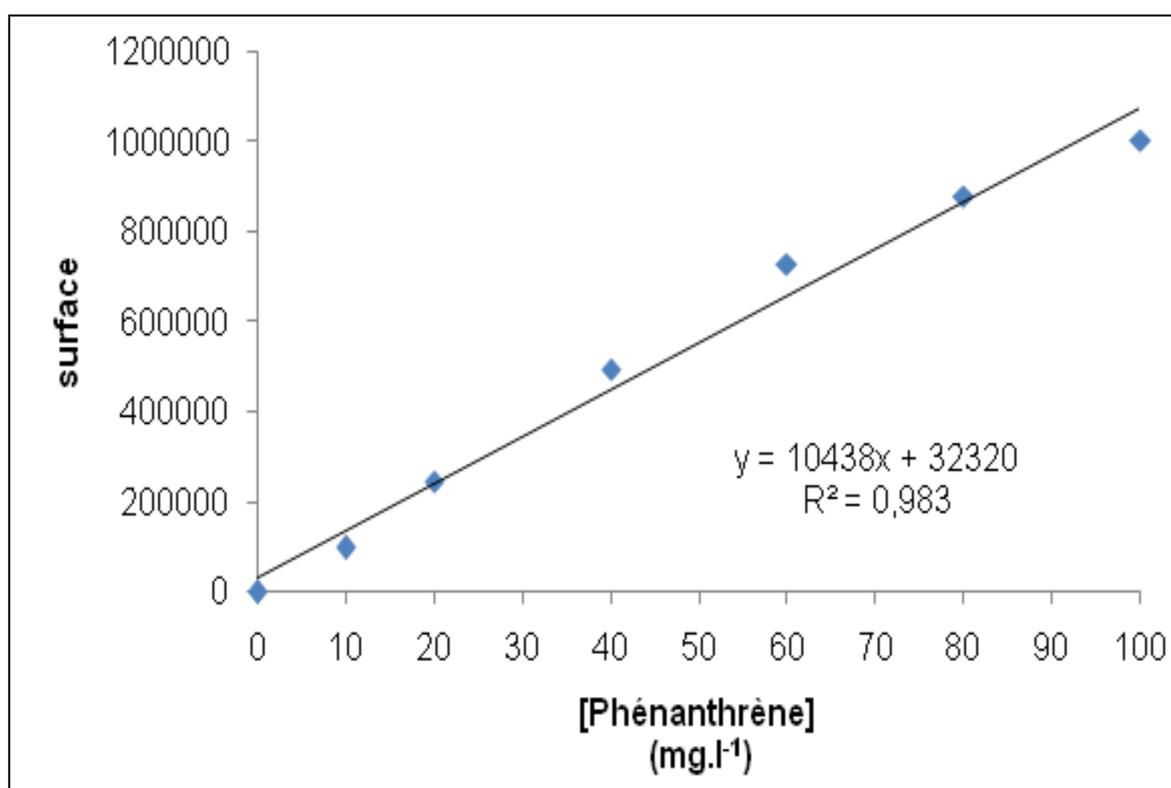


Figure 4 : Courbe d'étalonnage du phénanthrène 100 mg.l⁻¹ par l'UV-Vis à 252nm.

○ Par l'HPLC➤ NaphtalèneFigure 5 : Courbe d'étalonnage du naphtalène 100 mg.l⁻¹ par l'HPLC à 254nm.➤ PhénanthrèneFigure 6 : Courbe d'étalonnage du phénanthrène 100 mg.l⁻¹ par l'HPLC à 252nm.

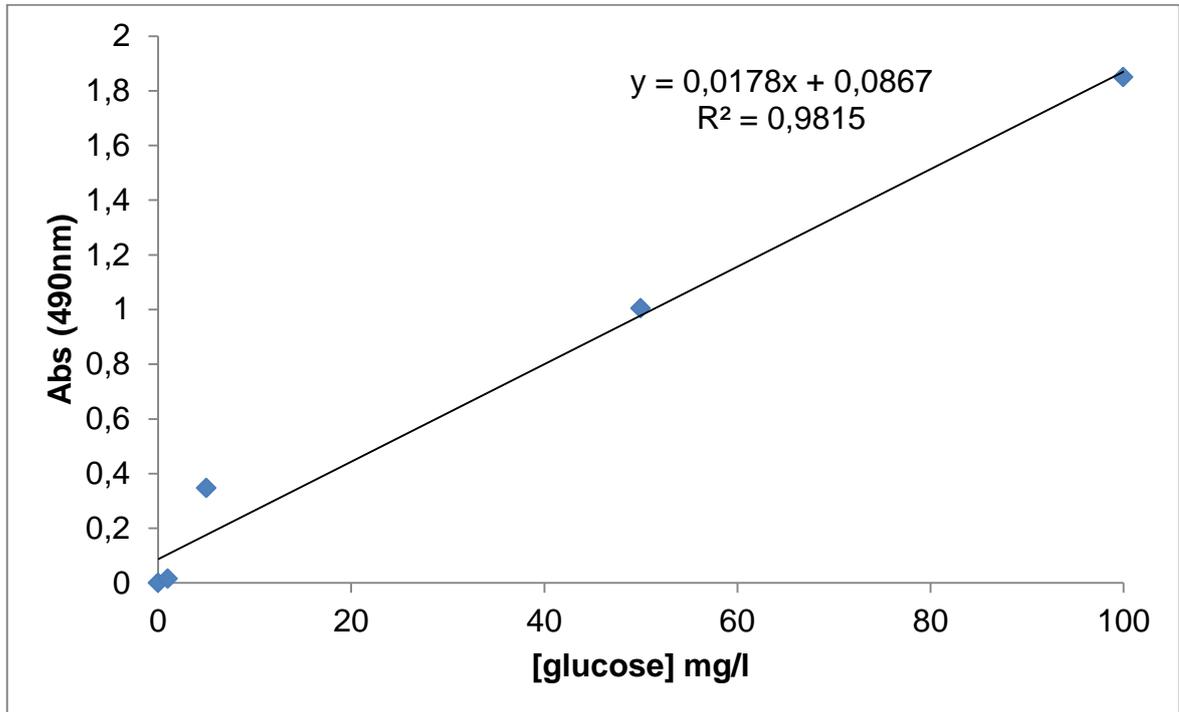
➤ Glucose

Figure 7 : Courbe d'étalonnage du glucose.

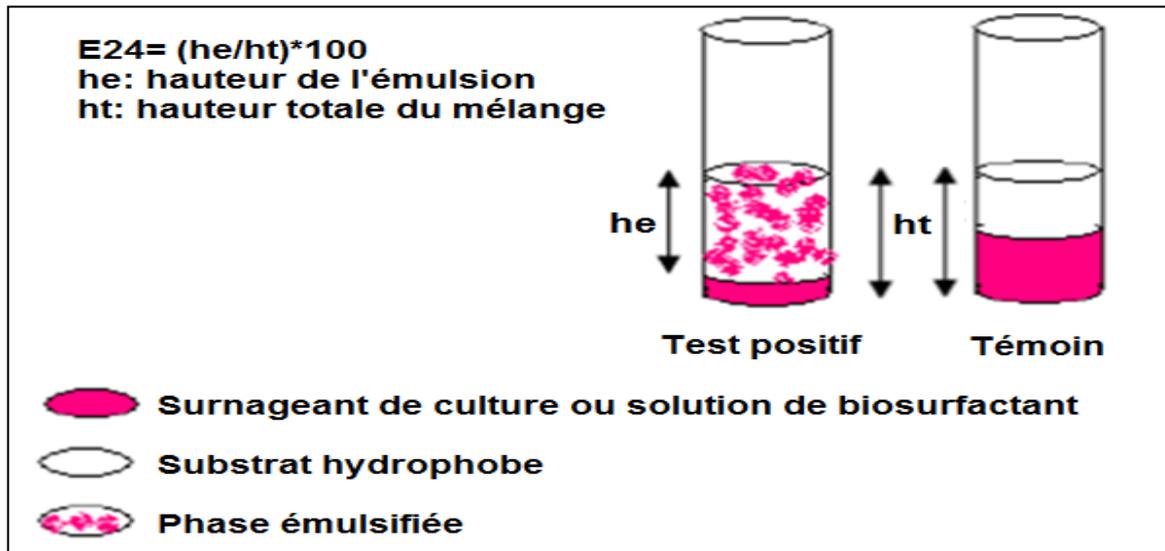
E Teste d'emulsion

Figure 8 : Schéma récapitulatif du test d'émulsion (E24).

F Milieux

- Solution tampon à pH= 7,2 : 17,39 ml de Na_2HPO_4 (0,2M) et 2,61 ml de l'acide citrique (0,1M).
- Milieu LB (g.l^{-1}) : 10 peptone, 5 extrait de levure, 5 NaCl, pH 7,2.
- Milieu extrait de malt : 10g.l^{-1} de l'extrait de malt.

G Spectres de CG-SM de la biodégradation de pétrole brut

o Par AB1

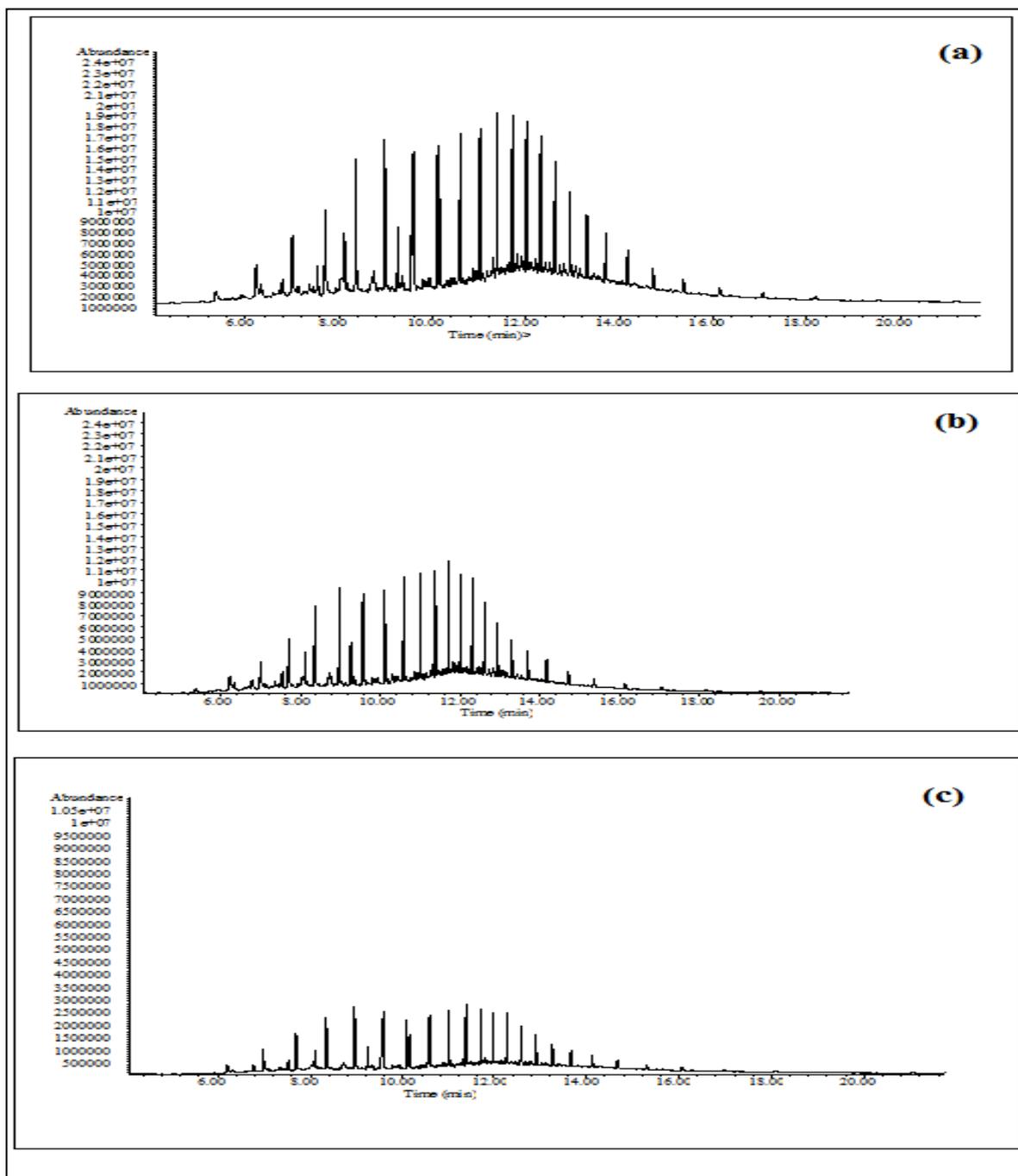


Figure 10 : Spectres CG-MS de la dégradation du pétrole brut (1%, v : v) par *Streptomyces* sp. AB1 (30 °C, pH 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) : Témoin chimique, (b) : après 14 jours d'incubation et (c) : après 30 jours d'incubation.

○ Par AH

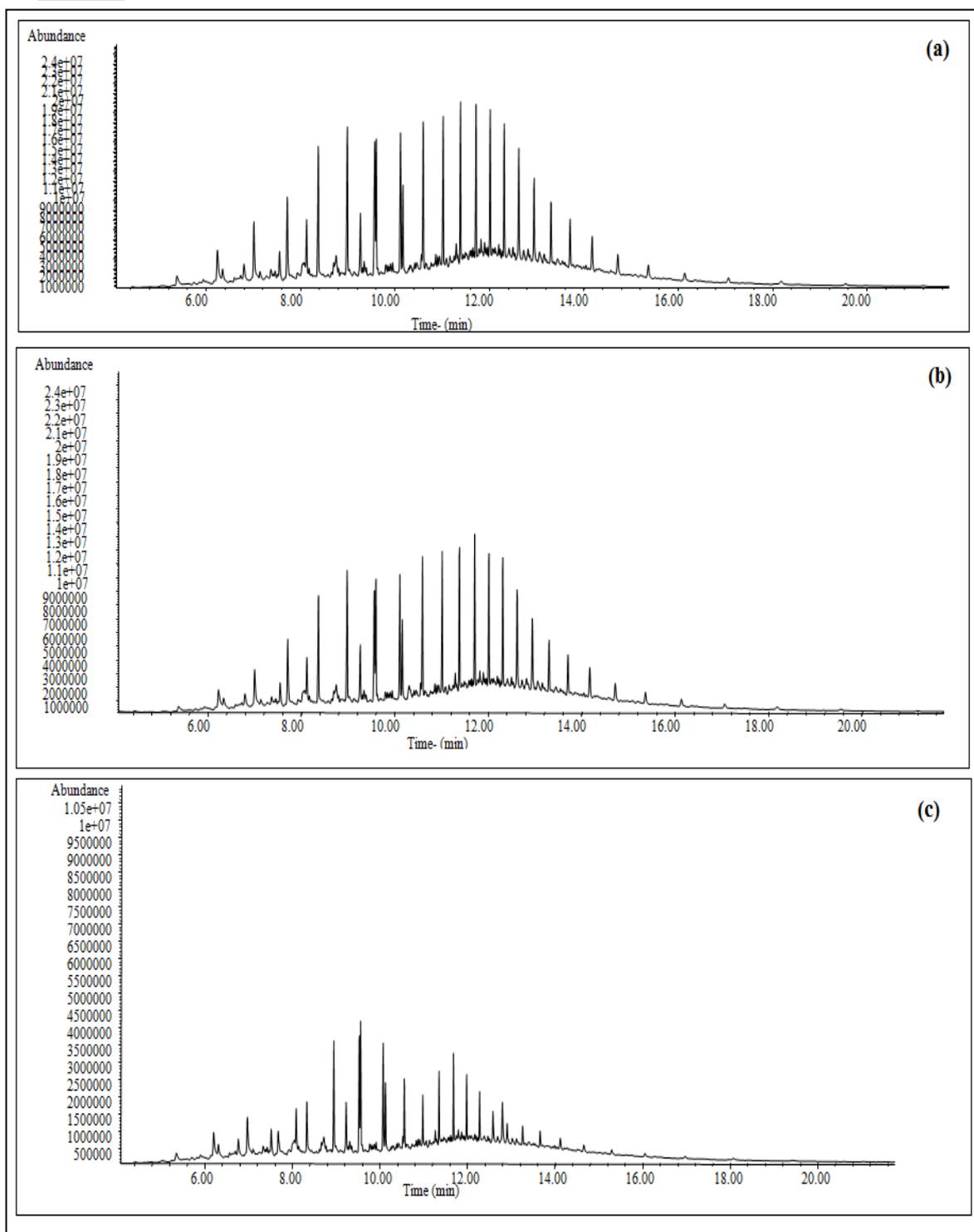


Figure 11 : Spectres CG-SM de la dégradation du pétrole brut (1%, v : v) par *Streptomyces* sp. AH4 (30°C, pH 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) : Témoin chimique, (b) : après 14 jours d'incubation et (c) : après 30 jours d'incubation.

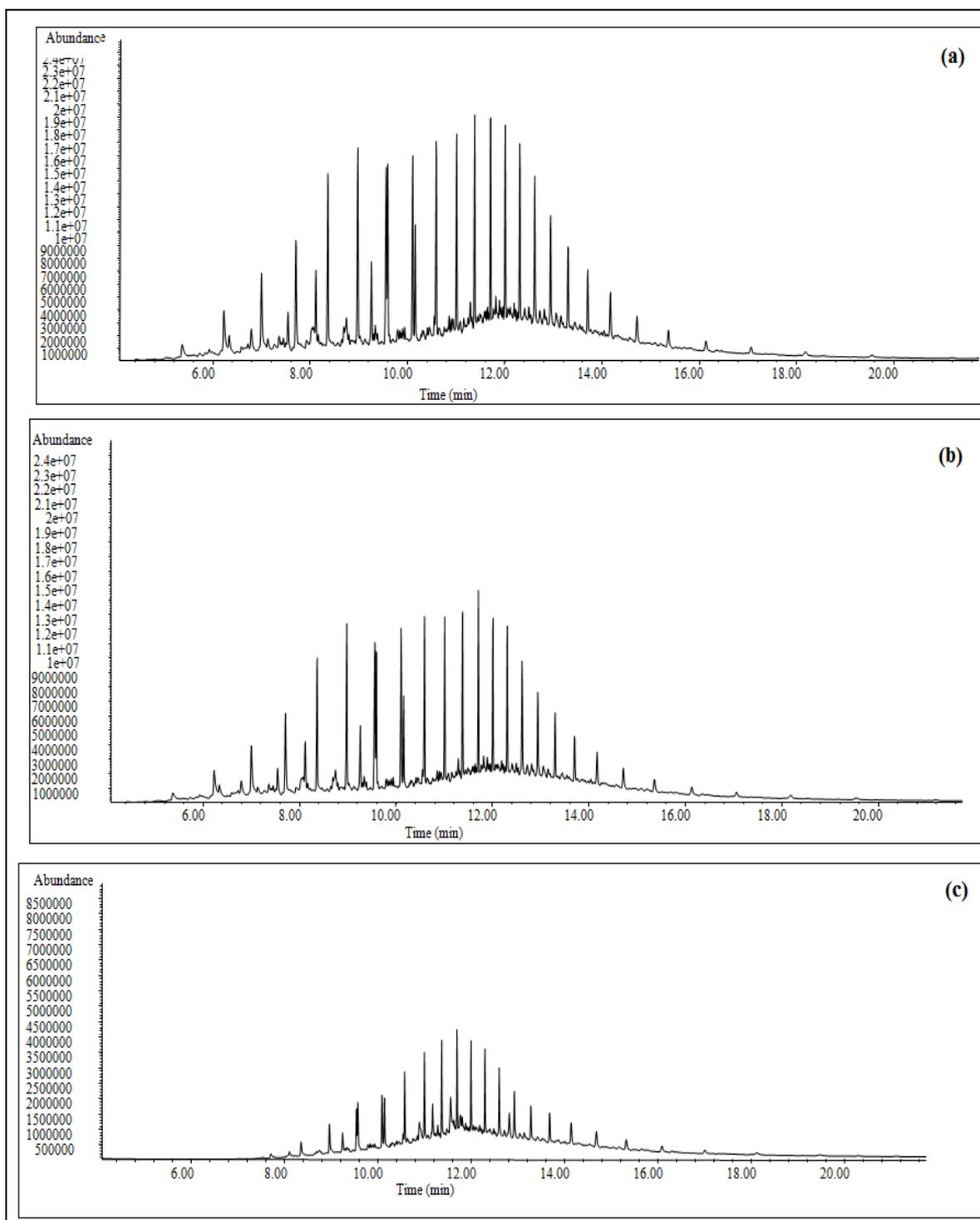
○ Par AM2

Figure 12 : Spectres CG-SM de la dégradation du pétrole brut (1%, v : v) par *Streptomyces* sp. AM2 (30°C, pH 7,2 et 150 tr.min⁻¹). (a) : Témoin chimique, (b) : après 14 jours d'incubation et (c) : après 30 jours d'incubation.

H Etude de la biodégradation du naphthalène

Tableau 2 : Variation du pH et de la TS au cours de la biodégradation du naphthalène (100 et 32 mg.l⁻¹) par les trois souches de streptomycètes.

100mg.l⁻¹ du naphthalène				
Temps (Jours)	Témion-pH	pH	Témion- T.S (mN.m ⁻¹)	T.S (mN.m ⁻¹)
AB1				
0	7,20	7,20	72,10	72,60
1	7,19	6,99	73,20	53,34
2	7,21	7,16	72,50	52,55
4	7,18	7,15	72,13	52,15
6	7,22	7,09	72,50	51,35
8	7,197	6,97	73,60	49,23
10	7,19	6,79	72,58	46,20
12	7,21	6,76	72,58	45,89
AH4				
0	7,20	7,18	72,10	72,00
1	7,19	6,88	73,20	53,20
2	7,21	6,84	72,50	52,94
4	7,18	6,76	72,13	53,34
6	7,22	6,78	72,50	53,20
8	7,19	6,68	73,60	53,12
10	7,19	6,67	72,58	53,09
12	7,21	6,61	72,58	46,90
AM2				
0	7,21	7,21	72,21	72,30
1	7,19	7,12	72,12	54,23
2	7,20	7,09	72,15	52,58
4	7,18	6,96	72,13	51,35
6	7,12	6,9	72,15	49,23
8	7,197	6,88	72,60	49,13
10	7,19	6,87	72,18	49,11
12	7,21	6,72	72,28	47,78

32mg.l⁻¹ du naphthaléne				
Temps (Jours)	Témion-pH	pH	Témion- T.S (mN.m ⁻¹)	T.S (mN.m ⁻¹)
AB1				
0	7,20	7,13	72,43	72,60
1	7,19	6,89	73,20	73,00
2	7,21	6,91	72,50	72,80
4	7,18	6,88	72,50	69,41
6	7,22	6,83	73,53	68,35
8	7,197	6,91	73,03	68,23
10	7,19	6,89	73,25	68,20
12	7,21	6,84	72,58	68,00
AH4				
0	7,20	7,13	72,43	72,60
1	7,19	6,89	73,2	73,00
2	7,21	6,81	72,5	72,80
4	7,18	6,85	72,5	69,41
6	7,22	6,93	73,53	67,35
8	7,197	6,81	73,03	67,23
10	7,19	6,89	73,25	67,20
12	7,21	6,84	72,58	67,00
AM2				
0	7,20	7,22	72,10	72,00
1	7,19	7,04	72,20	63,34
2	7,21	7,02	72,50	62,55
4	7,18	6,99	73,13	61,35
6	7,22	6,81	72,50	59,23
8	7,197	6,89	72,60	59,13
10	7,19	6,87	72,08	56,11
12	7,21	6,86	72,18	56,56

I Etude de la biodégradation du phénanthrène

Tableau 3 : Variation du pH et de la TS au cours de la biodégradation du phénanthrène (100 et 32 mg.l⁻¹) par les trois souches de streptomycètes.

100 mg.l⁻¹ du phénanthrène				
Temps (Jours)	Témion-pH	pH	Témion- T.S (mN.m ⁻¹)	T.S (mN.m ⁻¹)
AB1				
0	7,20	7,20	72,30	71,00
1	7,02	6,89	71,20	65,23
2	7,03	6,77	72,00	58,50
4	7,22	6,67	72,6	50,23
6	7,23	6,59	72,50	47,63
8	7,27	6,49	72,56	41,23
10	7,23	6,49	72,60	40,60
12	7,21	6,41	72,00	40,10
AH4				
0	7,20	7,18	72,10	72,00
1	7,19	6,88	73,20	53,20
2	7,21	6,84	72,50	52,94
4	7,18	6,76	72,13	53,34
6	7,22	6,78	72,50	53,20
8	7,197	6,68	73,60	50,12
10	7,19	6,67	72,58	47,09
12	7,21	6,61	72,58	45,89
AM2				
0	7,20	7,13	72,30	71,00
1	7,22	6,87	71,20	68,83
2	7,30	6,76	72,00	64,56
4	7,22	6,77	73,60	61,80
6	7,23	6,57	72,50	56,28
8	7,27	6,59	71,56	48,23
10	7,30	6,62	72,60	42,76
12	7,21	6,55	73,00	45,12

1,4 mg.l⁻¹ du phénanthrène				
Temps (Jours)	Témion-pH	pH	Témion- T.S (mN.m ⁻¹)	T.S (mN.m ⁻¹)
AB1				
0	7,20	7,20	72,30	72,00
1	7,22	7,10	71,20	70,00
2	7,30	6,99	72,00	69,90
4	7,22	6,87	73,60	68,87
6	7,23	6,89	72,50	67,90
8	7,27	6,99	71,56	67,84
10	7,30	6,89	72,60	68,98
12	7,21	6,84	73,00	68,84
AH4				
0	7,20	7,20	72,10	72,60
1	7,19	6,89	73,20	63,34
2	7,21	6,92	72,50	62,55
4	7,18	6,87	72,13	62,15
6	7,22	6,92	72,50	61,35
8	7,197	6,97	73,60	59,23
10	7,19	6,89	72,58	60,20
12	7,21	6,86	72,58	61,89
AM2				
0	7,10	7,13	72,20	73,00
1	7,20	6,93	72,22	68,23
2	7,21	6,83	72,30	68,56
4	7,30	6,81	72,22	65,06
6	7,20	6,67	72,23	62,65
8	7,20	6,73	72,27	63,30
10	7,20	6,65	73,30	68,5
12	7,25	6,64	72,21	68,55

J Spectres HPLC

- Naphtalène
 - Par AB1

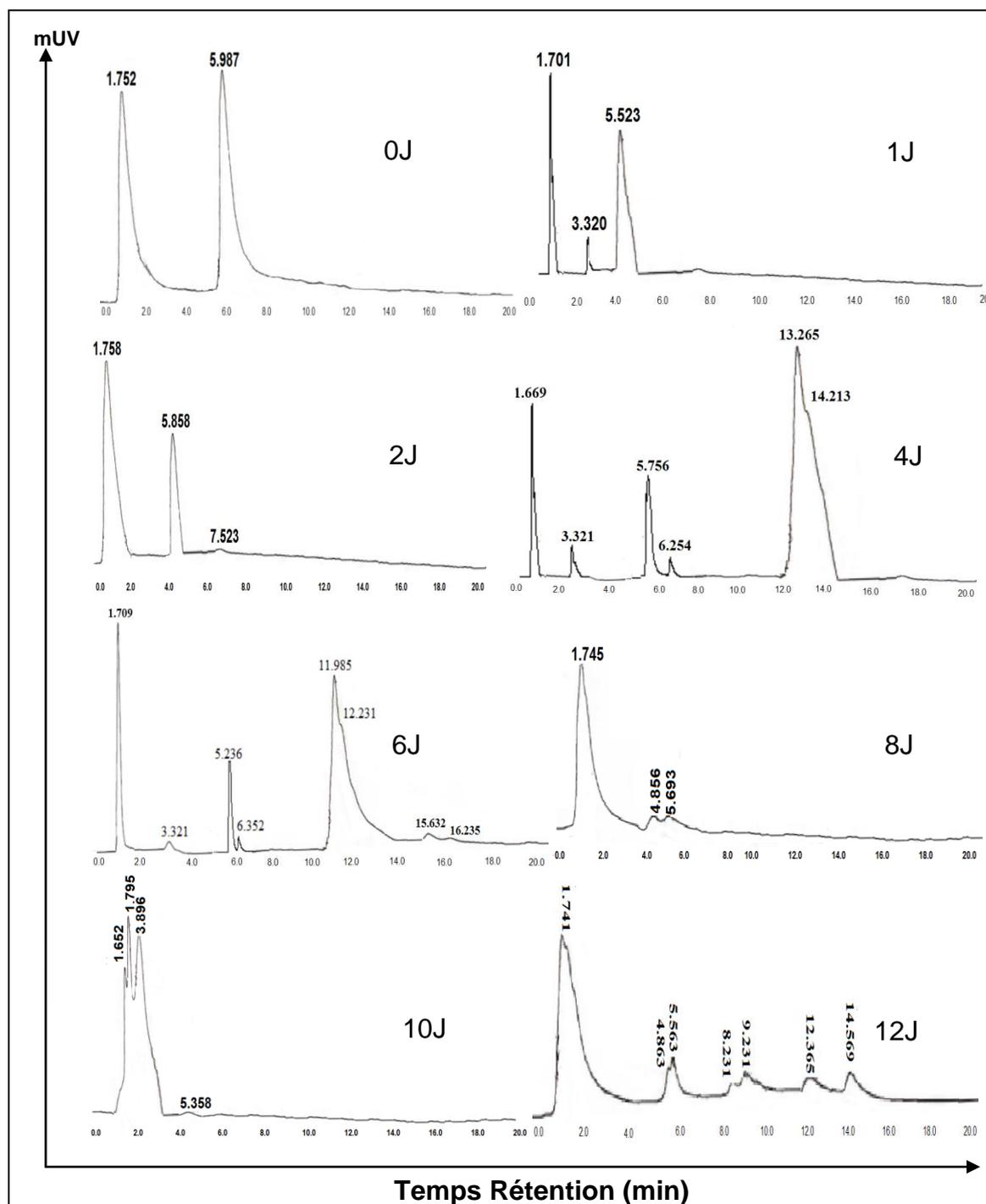


Figure 13 : Spectre HPLC de la dégradation du naphtalène (100mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AB1 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

➤ Par AH4

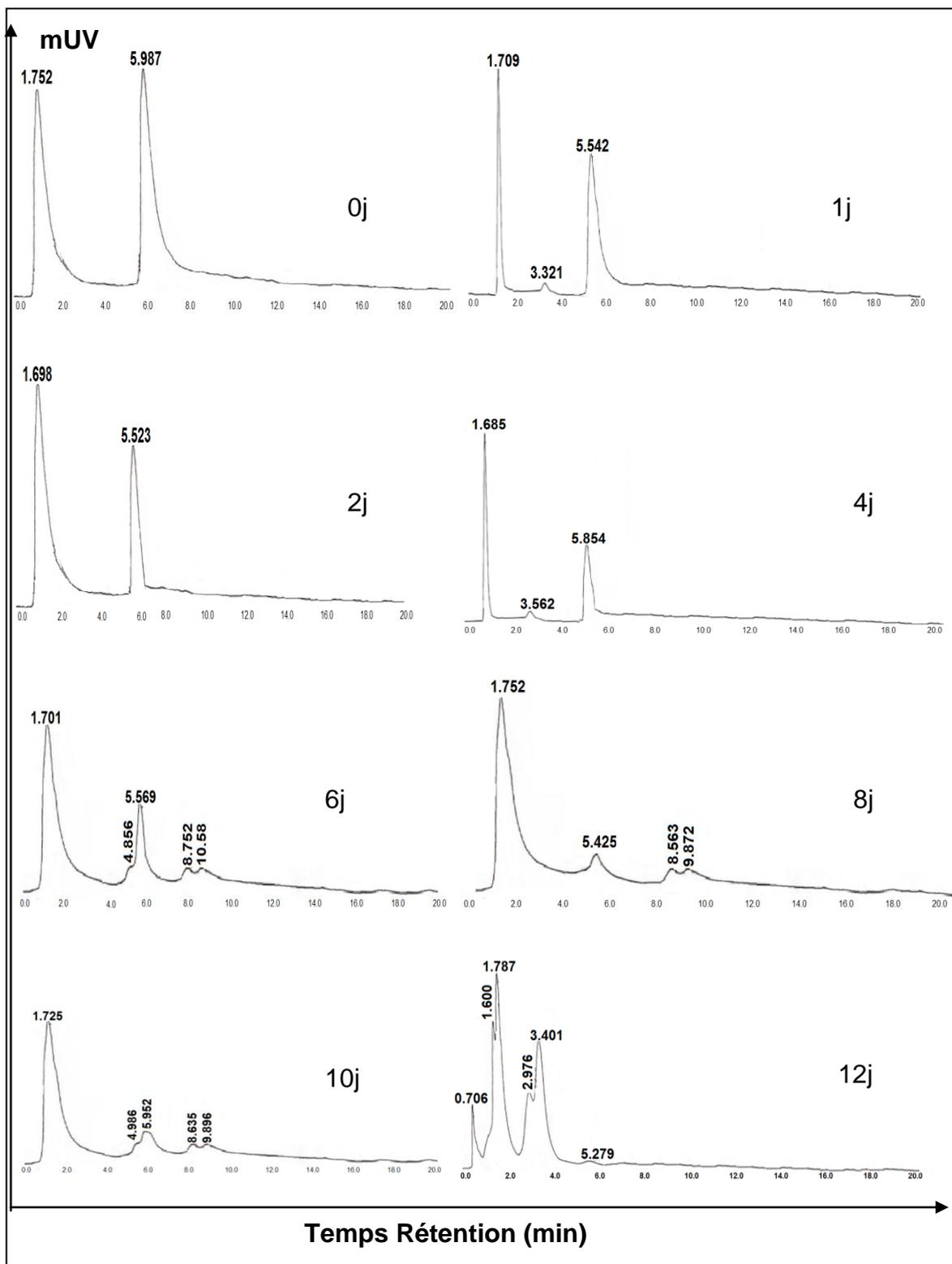


Figure 14 : Spectre HPLC de la dégradation du naphthalène (100mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AHA ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

➤ Par AM2

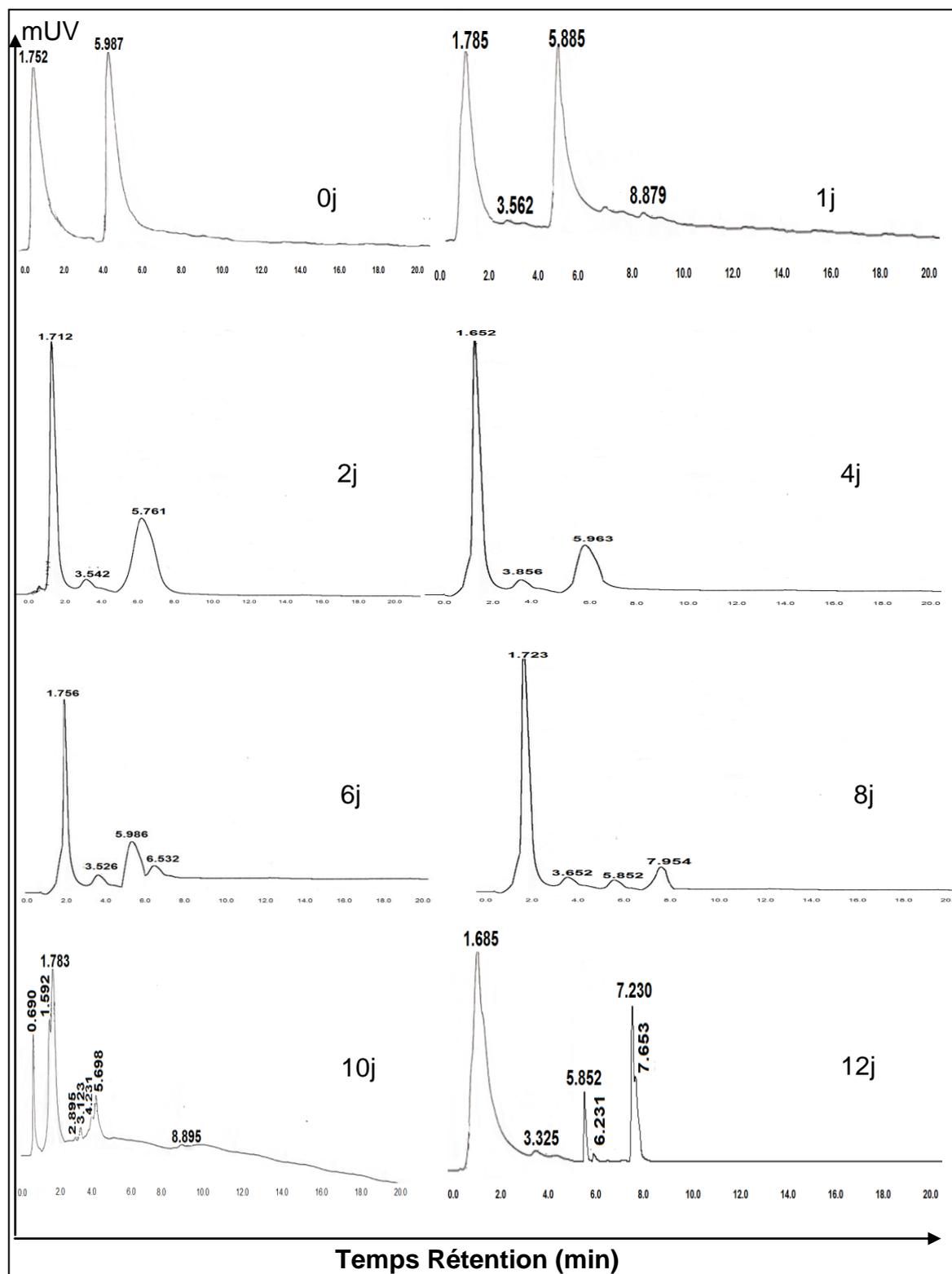


Figure 15 : Spectre HPLC de la dégradation du naphthalène (100mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AM2 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

- Phénanthrène
 - Par AB1

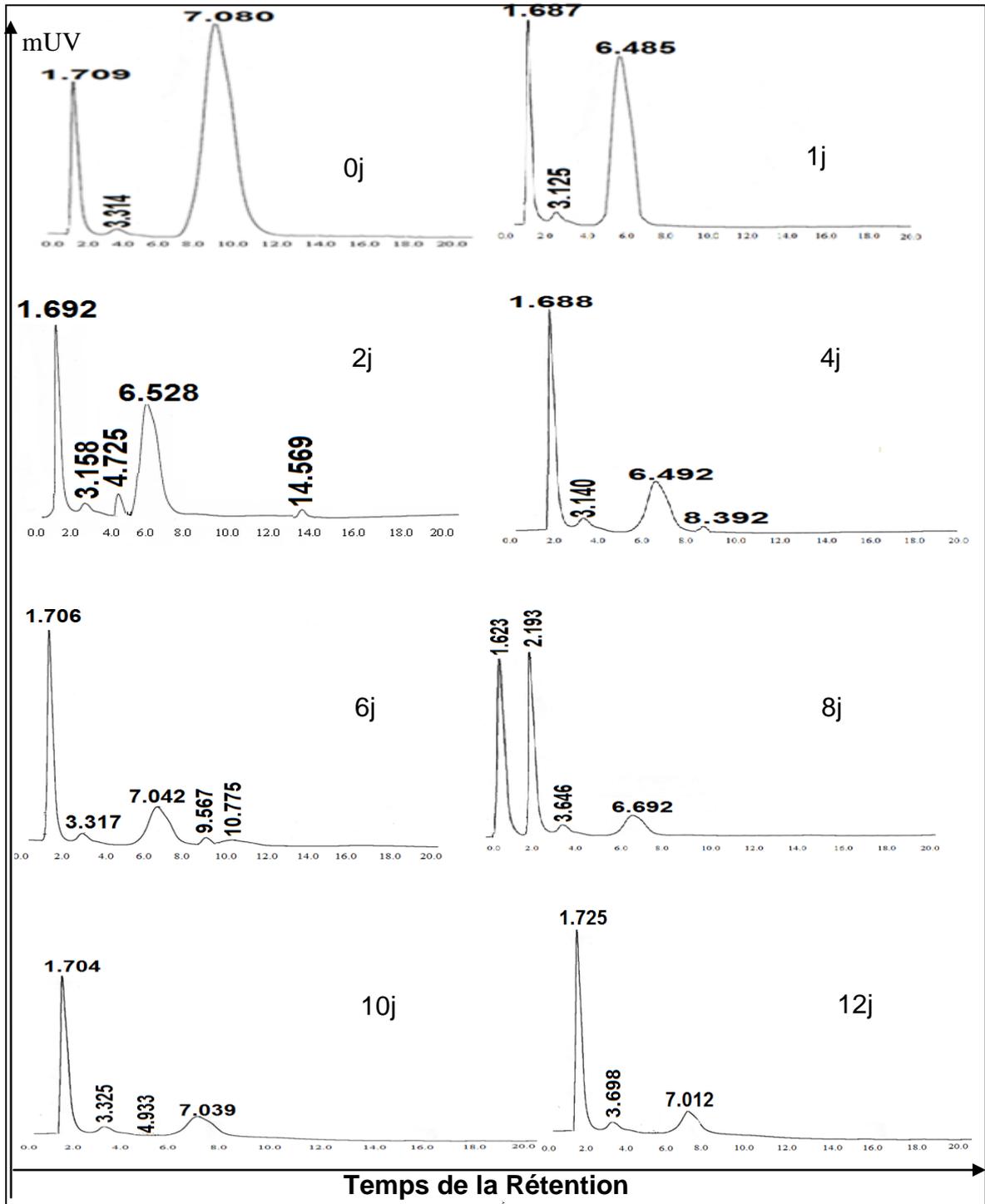


Figure 16 : Spectre HPLC de la dégradation du phénanthrène (100mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AB1 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

➤ Par AH4

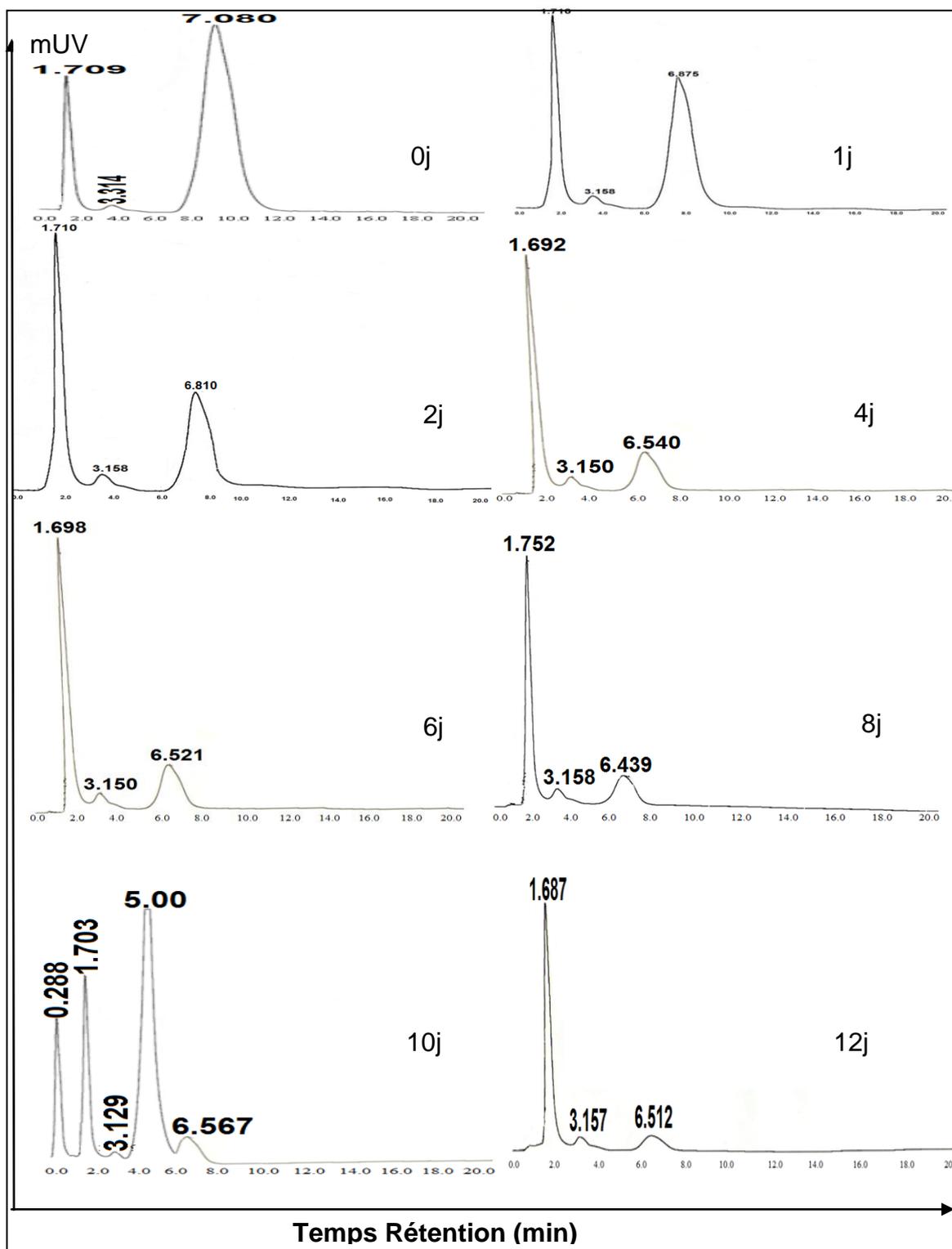


Figure 17 : Spectre HPLC de la dégradation du phénanthrène (100mg.l⁻¹) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AH4 (30 °C, pH= 7,2 et 150 tr.min⁻¹).

➤ Par AM2

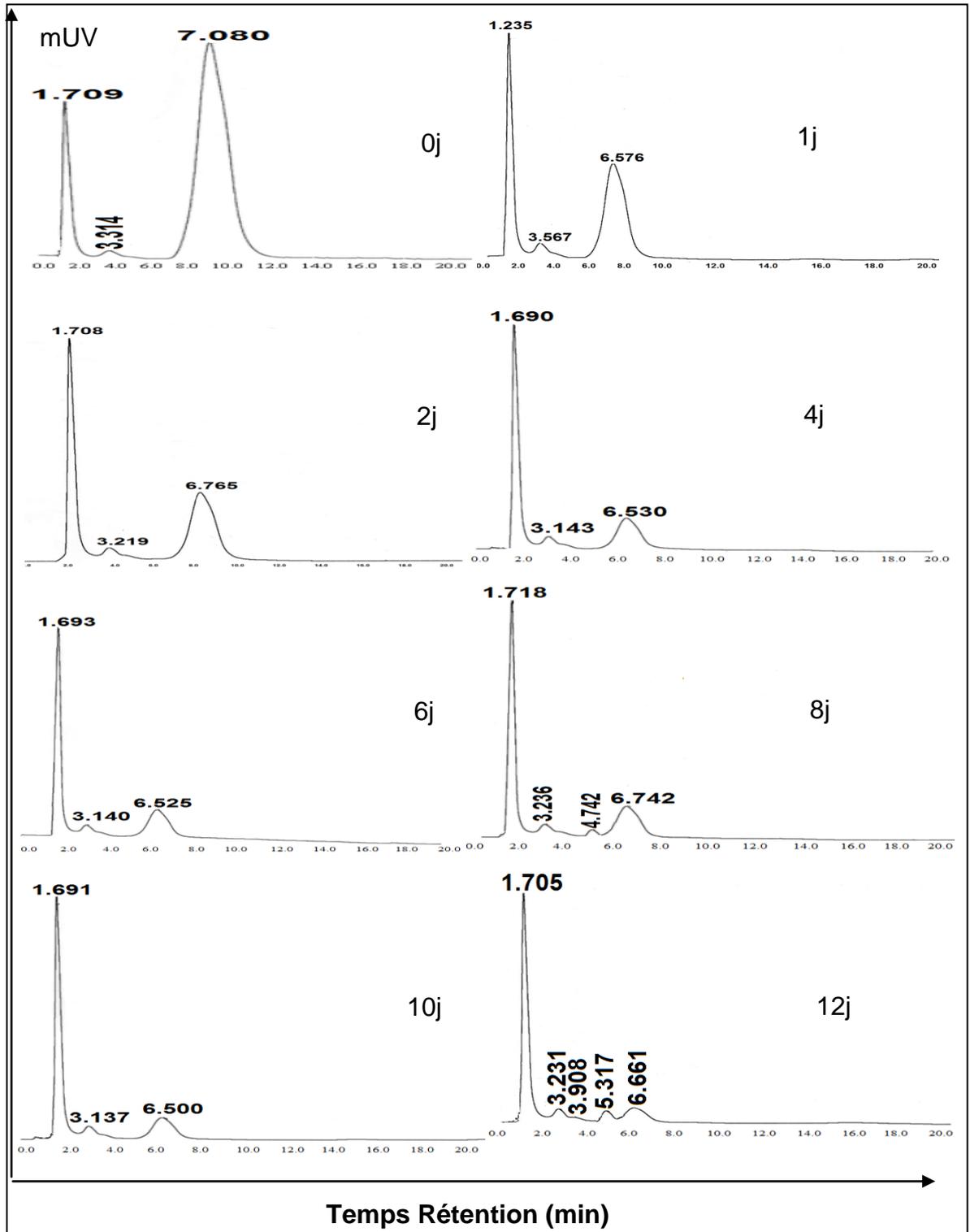


Figure 18 : Spectre HPLC de la dégradation du phénanthrène (100mg.l^{-1}) à différents temps d'incubation par *Streptomyces* sp. AM2 ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}= 7,2$ et 150 tr.min^{-1}).

REFERENCES

1. 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).
2. Grimes, S., "Pollutions marines par les hydrocarbures en Algérie: Risques, Ampleur, Impacts et réponses", Rapport, (2012).
3. Djefal, S., "Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les souches de *Rhodococcus* libres et immobilisées", Thèse de Doctorat, USTHB-Alger, (2008).
4. Haritash, A.K., Kaushik, C.P., "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review", Hazard Mater Journal, V.169, (2009), 1-15.
5. Lin, C., Gan, L., Chen, Z.L., "Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN)", Hazard Mater Journal, V.182, (2010), 771-777.
6. Balachandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., "Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil", Bioresource Technology Journal, V.112, (2012), 83–90.
7. Yang, S.Z., Jin, H.J., Wei, Z., He, R.X., Ji, Y.J., Li, X.M., Yu, S.P., "Bioremediation of oil spills in cold environments: a review", Pedosphere Journal, V.19, (2009), 371-381.
8. Alisi, C., Musella, R., Flavia Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., Rosa, A., "Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance", Science of the Total Environment Journal, V.407, (2009), 3024–3032.
9. Sprocati, A., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciallo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C., Cremisini C., "Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil", Process Biochemistry Journal, V.47, (2012), 1649–1655.
10. Zhang, X., Cheng, S., Zhu, C., Sun, S., "Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors", Pedosphere Journal, V.16, (2006), 555-565.
11. Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D., Jain, R.K., "Diversity biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons", In: Singh, S.N., Tripathi, R.D. (Eds.), Environmental Bioremediation Technologies. Springer, Berlin, (2007), 409-443.
12. Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., Clipson, N., "Microbial PAH degradation", Adv. Appl. Microbiol Journal, V.65, (2008), 27-66.
13. Zhao, H.P., Wu, Q.S., Wang, L., Zhao, X.T., Gao, H.W., "Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China", Hazard. Mater Journal, V.164, (2009), 863–869.

14. Zhao, H.P., Wang, L., Ren, J.R., Li, Z., Li, M., Gao, H.G., "Isolation and characterization of phenanthrene-degrading strains *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Tistrella* sp. ZP5", *Hazard. Mater Journal*, V.152, (2008),.1293-1300.
15. Yessicaa, G.P., Alejandroa, A., RONALDA, F.C., JOSÉA, A.J., ESPERANZAB, M.R., ROMERO, M., ESPERANZA, JESÚS SAMUEL, C.S., MA.REMEDIOS, M.L., ORMENO-ORRILLO, E., "Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a] pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium", *Appl. Soil Ecol Journal*, V.63, (2013), 105-111.
16. Pizzul, L., "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes", Thèse de Doctorat, Swedish, (2006).
17. Ensign, J.C., "Introduction to the Actinomycetes", Eds. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Springer-Verlag, New York, (1992), 811- 815.
18. Baniyadi, F., Shahidi, G.H., Karimirik, A., "In Vitro Petroleum decomposition by actinomycetes isolate d from petroleum contaminated soils", *Agric. Environ. Sci Journal*, V.6, (2009), 268-270.
19. Fodil, D., Badis, A., Jaouadi, B., ZARAÏ, N., FERRADJI, F.Z., BOUTOUMI, H., "Purification and characterization of two extracellular peroxidases from *Streptomyces* sp. strain AM2, a decolorizing actinomycetes responsible for the biodegradation of natural humic acids", *International Biodeterioration and Biodegradation Journal*, V.65, (2012), 470-478.
20. Fodil, D., Jaouadi, B., Badis, A., ZARAÏ, N., FERRADJI, F.Z., BEJAR, S., BOUTOUMI, H., "A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: purification and biochemical characterization", *Bioresour. Technol Journal*, V.111, (2011), 383-390.
21. Jaouadi, B., Badis, A., Fodil, D., Ferradji, F.Z., Rekik, H., ZARAÏ, N., BEJAR, S., "Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents», *Journal Bioresour. Technol*, V.101, (2010), pp.8361-8369.
22. Ferradji, F.Z., "Caractérisation et Biodégradation des Acides Humiques extraits à partir de différents types de sol de la Mitidja (Algérie): Sélection des souches microbiennes performantes et optimisation des conditions de culture", Mémoire de Magister, Université de Blida, (2008).
23. Badis, A., Ferradji, F.Z., Boucherit, A., Fodil, D., Boutoumi, H., "Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification", *Desalination Journal*, V.259, (2010), 216–222.
24. Vandecasteele, J. P., "Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques", Ed. E. Technip, Paris, In *Microbiologie Pétrolière*, (2005), 173-239.
25. Ri-He Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H., "Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons", *FEMS Microbiol Journal*, V. 32, (2008), 927–955.
26. Eddouaouda, K., "Etude du potentiel biodegradatif des souches bactériennes isolées 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).

27. Mnif, S., “Microbiologie de certains gisements pétroliers Tunisiens: Biodégradation des hydrocarbures, production de biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne moyennant la technique de la SSCP”, Thèse de Doctorat, Centre de Biotechnologie de Sfax, Université de Sfax, (2012).

28. Tissot, B.P., Welte, D.H., “Petroleum formation and occurrence”, Springer, Berlin, (1984).

29. Smith, M.R., “The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria”, *Biodegradation Journal*, V.1, (1990), 191-206.

30. Som, D., Dutta, C., Chatterjee, A., Mallick, D., Jana, T.K., Sen, S., “Studies on commuters'exposure to BTEX in passenger cars in Kolkata, India”, *Sc. Tot. Environ Journal*, V. 372, (2007), 426-432.

31. Seo, J.S.S., Keum, Y.S.K., Li, Q.X., “Bacterial degradation of aromatic compounds”, *International Environ Journal, Public Health*, V. 6, (2010), 278–309.

32. 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).

33. Terrat, S., “Nouveau design de sondes pour biopuces ADN fonctionnelles et caractérisation des capacités de biodégradation des communautés bactériennes de sols pollués par des hydrocarbures”, Thèse de Doctorat, Thaise Pascal, Auvergne, (2010).

34. Zhu, L., Chen, Y., Zhou, R., “Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and soil in drinking water resource of Zhejiang Province, China”, *Hazardous Materials Journal*, V. 150, (2008), 308–316.

35. Norini, M.P., “Ecodynamique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: influence de la rhizosphère et de la mycorhization”, Thèse de Doctorat, France, (2007).

36. Zenga, J., Lina, X., Zhanga, J., Li, X., “Isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-degrading *Mycobacterium* spp. and the degradation in soil”, *Hazardous Materials Journal*, V. 183, (2010), 718–723.

37. Amezcua-Allieri, M.A., Ávila-Chávez, a., Trejo, J., “Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil: A comparison between bioremoval and supercritical fluids extraction”, *Meléndez-Estrada Chemosphere Journal*, V. 86, (2012), 985–993.

38. Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N., Cherif, A., “Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential”, *New Biotechnology Journal*, (2013), 723-733.

39. Biache, C., "Evolution des composants organiques d'un sol de cokerie en contexte d'atténuation naturelle", Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, (2010).
40. Marie Le Dû-Lacoste, "hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition – genotoxicité", Thèse de Doctorat, Université Bordeaux 1, France, (2008).
41. Schiedek, D., Broeg, K., Barsiene, J., Lehtonen, K. K., Gercken, J., Pfeifer, S., Vuontisjarvi, H., Vuorinen, P. J., Dedonyte, V., Koehler, A., Balk, L., Schneider, R., "Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea", Marine Pollution Bulletin Journal, V. 53, (2006), 387-405.
42. Lipiatou, E., Albaiges., "Marine Chemistry", V.46, (1994), 153-164.
43. Scriban, R., "Biotechnologie: Restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques", Ed Lavoisi, 5^{ème} édition, (1999).
44. Cerniglia, C.E., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", Biodegradation Journal, V.3, (1992), 351-368.
45. Rand, G.M., Wells, P.G., McCarthy, L.S., "Introduction to aquatic toxicology", Rand, G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment, USA, Taylor & Francis, (1995), 3-67.
46. Journal officiel de la république Algérienne., "Loi relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable, n° 03-10 du 19 juillet (2003).
47. Journal officiel de la république Algérienne., "Loi relative à la protection de l'environnement dans le cadre du développement durable", n°06-141 du 19 Avril (2006).
48. Flotron, V., Delteil, C., Bermond, A., Camel, V., "Remediation of matrices contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons: Use of Fenton's Reagent Polycyclic Aromatic Compounds", International Society for Polycyclic Aromatic Compounds Journal, V. 24, (2003), 353-376.
49. Beltran, F.J., Encinar, J.M., Alonso, M.A., "Nitroaromatic hydrocarbon ozonation in water: Combined ozonation with hydrogen peroxide or UV radiation", Ind Engng Chem Res Journal, V.37, (1998), 32-40.
50. Little, C., Hopher, J.M., El Sharif, M., "The sono-degradation of phenanthrene in an aqueous environment", Ultrasonic Journal, V.40, (2002), 667-674.
51. Psillakis, E., Goula, G., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D., "Degradation of polycyclic hydrocarbons in aqueous solutions by ultrasonic irradiation", Hazard. Mat Journal, V.108, (2004), 95-102.
52. Taylor, E.J., Cook, B.B., Tarr, A.M., "Dissolved organic matter inhibition of sonochemical degradation of aqueous polycyclic aromatics hydrocarbons", Ultrasonic Sonochem Journal, V. 6, (1999), 175-183.
53. Haapea, P., Tuhkanen, T., "Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatmentn", Hazard. Mater Journal, V.136, (2006), 244-250.

54. Yerushalmi, L., Nefil, S., Hausler, R., Guiot, S.R., "Removal of pyrene and benzo(a)pyrene from contaminated water by sequential and simultaneous ozonation and biotreatment", *Water Environ Journal*, V.11, (2006), 86-92.
55. Gabet, S., "Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique", Thèse de Doctorat, Limoges, (2004).
56. Liste, H., Alexander, M., "Plant-promoted pyrene degradation in soil", *Chemosphere Journal*, V. 40, (2000), 7-10.
57. Megharaj, M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R., "Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective", *International Environment Journal*, V.37, (2011), 1362–1375.
58. Margesin, R., Moertelmaier, C., Mair, J., "Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four *actinobacterial* strains", *International Biodeterioration and Biodegradation Journal*, (2012), 1-7.
59. Cerniglia, C.E., "Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation", *Ind. Microbiol. Biotechnol Journal*, V.19, (1997), 324-333.
60. Clemente, A.R., Anazawa, T.A., Durrant, L.R., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi", *Brazilian of Microbiology Journal*, V.32, (2001), 255-261.
61. Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Van Baalen, C., Gibson, D. T., "Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 ", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.58, n°4, (1992), 1351-1359.
62. Berthelin, J., Leyval, C. and Toutain, F., "Biologie des sols : rôle des organismes dans l'altération et l'humification", *Pédologie 2. Constituants et propriétés du sol*. M. Bonneau and B. Souchier. Paris, Masson, V.1, (1994), 43-237.
63. Warshawsky, D., Radike, M., Jayasimhulu, K., Cody, T., "Metabolism of benzo[a]pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*", *Biochemical and Biophysical Research Communications Journal*, V. 152, (1988), 540-544.
64. Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L., "Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review", *Environmental Science and Pollution Research Journal*, (2010), 1-6.
65. Westerberg, K., Elvang, A.M., Stackebrandt, E., Jansson, J.K., "*Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol", *International of Systematic and Evolutionary Microbiology Journal*, V. 50, (2000), 2083-2092.
66. Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P., "*Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.68, 5973–5980.

67. Bhadbhade, B.J., Sarnaik, S.S., Kanekar, P.P., "Bioremediation of an industrial effluent containing monocrotophos", *Current Microbiology Journal*, V.45, (2004), 346-349.
68. Sette, D., L., Costa, M., Marsaioli, L.A., Manfio, G.P., "Biodegradation of alachlor by soil *Streptomyces*", *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, V. 64, (2004), 712-717.
69. Whyte, L.G., Slagman, S.J., Pietrantonio, F., Bourbonniere, L., Koval, S.F., Lawrence, J.R., Inniss, W.E., Greer, C.W., "Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V. 65, (1999), 2961-2968.
70. Johnsen, A.R., Winding, A., Karlson, U., Roslev, P., "Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labeled cell lipids", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.68, (2002), 6106-6113.
71. Isken; S., de Bont, J. A., "Bacteria tolerant to organic solvents", *Extremophiles Journal*, V.3, (1998), 229-238.
72. Kallimanis, A., Frillingos, S., Drainas, C., Koukkou, A., "Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3", *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, V.76, (2007), 709-717.
73. Spormann, A.F., Widdel, F., "Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria", *Biodegradation Journal*, V.11, (2000), 85-105.
74. Widdel, F., Rabus R., "Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons", *Cur. Opin. Biotechnol Journal*, V.12, (2001), 259-276.
75. Fuchs, G., El Said, M.M., Alteaicbmidt, U., Koch, J., Lack, Am., Brackmann, R., Lochmeyer, C., Oswald, B., "Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds", *International Biochemistry of Microbial Degradation Journal*, (1994), 513-553.
76. Smith, R.L., "Determining the terminal electron-accepting reaction in the saturated subsurface", *Manual of environmental microbiology*, Ed.C.J.Hurst. ASM Press, Washington, (1997), 577-585.
77. Fuchs, B.M., Glöckner, F.O., Wulf, J., Amann, R., "Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes", *Appl. Environ. Microb Journal*, V.66, (2000), 3603- 3607.
78. Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., "Principles of microbial PAH-degradation in soil", *Environ. Pollut Journal*, V.133, (2005), 71-84.
79. Sabaou, N, Hacène, H., Bennadji, A., Bennadji, H., Bounaga, N., "Description quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne", *Microb Journal*, V.38, (1992), 1066-1073.
80. Cerniglia, C. E., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Biodegradation Journal*, V.3, (1992), 351-368.

81. Richnow, H. H., Eschenbach, A., Seifert, R., Wehrung, P., Albrecht, P., Michaelis W., "The use of ¹³C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soils", *Chemosphere Journal*, V.36, (1998), 2211– 2224.
82. Kastner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B., "Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil", *Appl. Environ. Microbiol Journal*, V.64, (1998), 359–362.
83. Goyal, A., Zylstra, K., "Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39", *Appl Environ Microbiol Journal*, V. 62, n°1, (1996), 230-236.
84. Habe, H., Omori, T., "Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal*, V.67, n°2, (2003), 225-243.
85. Singh, A., Ward, O.P., "Biodegradation and Bioremediation", *Soil Bio. Ser Journal*, V.2, (2004), 301-309.
86. Rothmel, R. K., Aldrich, T., Houghton, J. E., Coco, W. M., Ornston, L. N., Chakrabarty, A. M., "Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida* catR: a positive regulator of the catBC operon is a member of the LysR family", *Bacteriology Journal*, V.172, n°2, (1990), 922-931
87. Goyal, A. K., Zylstra, G. J., "Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*", *Industrial Microbiology and Biotechnology Journal*, V.19, (1997), 401-407.
88. Pinyakong, O., Habe, H., Omori, T., "The unique aromatic catabolic genes in *Sphingomonads* degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)", *General and Applied Microbiology Journal*, V.49, n°1, (2003), 1-19.
89. Alquati, C., Paracchini, M., Riccardi, C., Spicaglia, s., Bestetti, G., "Diversity of naphthalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil", *Annals of Microbiology Journal*, V.5, n°4, (2005), 237-242.
90. 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.
91. Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C., Jouanneau, Y., "Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases", *Bacteriology Journal*, V.185, n°13, (2003), 3828-3841.
92. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Hu, Y., Lee, S.-E., Li, Q. X., "Phenanthrene degradation in *Arthrobacter* sp. P1-1: Initial 1,2-, 3,4- and 9,10-dioxygenation, and meta- and orthocleavages of naphthalene-1,2-diol after its formation from naphthalene-1,2- dicarboxylic acid and hydroxyl naphthoic acids", *Journal Chemosphere*, V.65, (2006), 2388-2394.
93. Mallick, S., Chatterjee, S., Tapan, K., "A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2, 3-dioxo-5-(29-hydroxyphenyl)- pent-4-enoic acid. *Microbiology*", V.153, (2007), 2104–2115.

94. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Hu, Y., Lee, S.-E., Li, Q., "Degradation of phenanthrene by *Burkholderia* sp. C3: initial 1, 2- and 3,4-dioxygenation and meta- and orthocleavage of naphthalene-1,2-diol", *Biodegradation Journal*, V.18, n°1, (2007), 123-131.
95. Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q. X., "Bacterial Degradation of Aromatic Compounds", *International Environmental Research and Public Health Journal*, V.6, n°1, (2009), 278-309.
96. Stolz, A., "Molecular characteristics of xenobiotic-degrading *shingomonads*", *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, V.8, n°5, (2009), 793-811.
97. Kiyohara, H., Nagao K., "The Catabolism of Phenanthrene and Naphthalene by Bacteria", *General Microbiology Journal*, V.105, n°1, (1978), 69-75.
98. Cho, O., Choi, K.Y., Zylstra, G.J., Kim, Y.S., Kim, S.K., Lee, J.H., Sohn, H.Y., Kwon, G.S., Kim, Y.M., Kim, E., "Catabolic role of a three-component salicylate oxygenase from *Sphingomonas yanoikuyae* B1 in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation", *Biochem Biophys Res Commun Journal*, V.327, n°3, (2005), 656-662.
99. Peng, F., Liu, Z., Wang, L., Shao, Z., "An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C- 9 and its biosurfactants", *Appl. Microbiol Journal*, V.102, 1603-1611.
100. Pinyakong, O., Habe, H., Yoshida, T., Nojiri, H., Omori, T., "Identification of three novel salicylate 1-hydroxylases involved in the phenanthrene degradation of *Sphingobium* sp. strain P2", *Biochem Biophys Res Commun Journal*, V.301, n°2, (2003), 350-357.
101. Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., "Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that Degrades various polycyclic Aromatic hydrocarbons", *Appl Environ Microbiol Journal*, V.70, n°11, (2004), 6714-6725.
102. Leahy, J. G., Colwell R. R., "Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment", *Microbiol Rev Journal*, V.54, (1990), 305-315.
103. 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.
104. Röling, W.F.M., Head, I.M. and Larter, S.R., "The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects", *Research in Microbiology Journal*, V.154, (2003), 321-328.
105. Berthelin, J., Leyval, C., Toutain, F., "Biologie des sols : rôle des organismes dans l'altération et l'humification. Pédologie 2.Constituants et propriétés du sol", M. Bonneau and B. Souchier, Paris, Masson, (1994), 143-237.
106. Leahy J.G., Colwell R.R., "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment", *Microbiol. Rev Journal*, V.54, (1990), 305 - 315.
107. Kästner, M., Breuer-Jammali, M. and Mahro, B., "Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V. 64, n°1, (1998), 359-362.

108. Cerniglia C.E., "Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Adv. Appl. Microbiol Journal*, V. 30, (1984), 31 - 71.
109. Diaz M.P., Grigson S.J.W., Peppiatt C., and Burgess J.G., "Isolation and characterization of novel hydrocarbon degrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments", *Mar. Biotechnol Journal*, V.2, (2000), 522 - 532.
110. Ward, D.M., Brock, T.D., "Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments", *Appl Environ Microbiol Journal*, V.35, (1978), 353-359.
111. De Carvalho C.C.C.R., Fonseca M.M.R., "Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14", *FEMS Microbiol Ecol Journal*, V.51, (2005), 389 – 399.
112. Patel, V., Patel, J., Madamwar, D., "Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard", *Marine Pollution Bulletin Journal*, V.74, (2013), 199–207.
113. Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., Solanas, A. M., "Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.71, n°11, (2005), 7008-7018.
114. Carmichael L.M., Pfaender F.K., "The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils", *Biodegradation Journal*, V.8, (1997), 1 - 13.
115. McMillen S. J., Gray N.R., Kerr J. M., Requejo A. G., McDonald T.J., Douglas G. S., "Assessing Bioremediation of Crude Oil in Soils and Sludges", In: *Monitoring and Verification of Bioremediation*, Hinchee, R.E., G.S. Douglas and S.K. Ong (Eds.). Battelle Press, Columbus, Ohio, (1995), 1 - 9.
116. Yemashova N.A., Murygina V.P., Zhukov D.V., Zakharyantz A.A., Gladchenko M.A., Appanna V., Kalyuzhnyi S.V., "Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review". *Rev Environ Sci Biotechnol Journal*, V.6, (2007), 315 - 337.
117. Li X., Li P., Lin X., Zhang C., Li Q., Gong Z., "Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases", *Hazardous Materials Journal*, V.150, (2008), 21 - 26.
118. Fiechter, A., "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Biotechnol Journal*, V.10, (1992), 208-217.
119. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., "Potential commercial applications of microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biot Journal*, V.53, (2000), 495-508.
120. Gusmao, C.A.B., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., "Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant", *Microb. Biot Journal*, V.26, (2010), 1683-1692.
121. Vipulanandan, C., Ren, X., "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant", *Env. Eng Journal*, V.126, (2000), 629-634.

122. Kiran, S., Thomas, G., Selvin, J., "Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation", Colloid. Surface B. Biointerfaces Journal, V.78, (2010), 8-16.
123. Singh, A., Parmar, N., C.kuhad, R., "Soil biology: Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol", (Eds), Springer science, V. 28, (2011).
124. Mazaheri Assadi, M., Tabatabaee, M. S., "Biosurfactants and their Use in Upgrading Petroleum Vacuum Distillation Residue", Environ. Res Journal, V.4, n°4, (2010), 549-572.
125. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., "Complete genome sequence *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen", Nature Journal, V.406, n°6799, (2000), 959-964.
126. Ron, E.Z., Rosenberg, E., "Biosurfactants and oil remediation", Current Opinion in Biotechnology Journal, V.3, (2002), 249-252.
127. Desai, J.D., Banat, I.M., "Microbial production of surfactants and their commercial potential", Journal Microbiology and Molecular Biology Reviews, V.61, (1997), 47-64.
128. Meylheuc, T., Herry, J., Bello-Fontaine, M., "Les biosurfactants, des biomolécules à forte potentialité d'application", Sciences des Aliments Journal V.21, (2001), 591-649.
129. Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C., Gutnick, D.L., "Emulsifier of *Arthrobacter*: isolation and emulsifying properties", Appl Environ Microbiol Journal, V. 37, (1979), 402–408.
130. Zosim, Z.; Gutnick, D.L.; Rosenberg, E., "Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan", Biotechnol. Bioeng Journal, V.24, (1982), 281–292.
131. 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.
132. Mata-Sandoval, J.C., "The influence of rhamnolipids on the bioavailability of pesticides in contaminated soils", Ph.D. Thesis, Univ.Maryland, Collegepark, MD20742, USA, (2000).
133. Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechter A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors", Applied Microbiology and Biotechnology Journal, V.24, (1986), 443 – 448.
134. Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto and Khamis A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* Bacterium", World of Microbiology and Biotechnology Journal, V 7, (1991), 53 - 61.
135. Cooper D.G., Macdonald C.R., Duff J.P. and Kosaric N., "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and

metal cation additions”, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.42, (1981), 408 - 41.

136. Sahoo, S., Datta, S., Biswas, D., “Optimization of Culture Conditions for Biosurfactant Production from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1”, *Adv.Scientific Res Journal*, V.2, n°3, (2011), 32-36.

137. Akhavan Sepahy, A., Mazaheri-Assadi, M., Saggadian, V., Noohi, A., “Production of biosurfactant from Iranian oil fields by isolated *Bacilli*”, *Environ. Sci.Te, Journal*, V.1, (2005), 287-293.

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

139. Mulligan, C.N., “Environnemental applications for biosurfactants”, *Environ Poll Journal*, V.133, (2005), 183-98.

140. Christofi, N., Ivshina, I.B., “Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation”, *Appl. Microbiol Journal*, V.93, (2002), 915-29.

141. Mata-Sandoval, J.C., “The influence of rhamnolipids on the bioavailability of pesticides in contaminated soils”, *Thèse de Doctorat, Université Maryland, Collegepark, USA* (2000).

142. Wong, J.W.C., Fang, M., Zhao, Z. and Xing, B., “Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions”, *Environ. Qual. Journal*, V. 33, (2004), 2015 – 2025.

143. Pirog, T.P., Konon, T., Shevchuk, I.V., Bilets, A., “Identification of biosurfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMUb-7241 a hexadecane-glycerol mixture”, *Microbiology Journal*, V.81, n°5, (2012), 565-527.

144. Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Ben Younes, S., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M., Sayad, S., “Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation”, *Basic Microbiology Journal*, V.51, (2011), 1–11.

145. Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., Shen, Q., “Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3”, *Biotechnology Advances Journal*, V. 28, (2010), 635–643.

146. Tayebe, B., Lotfabada, H., Reza Ahmadkhanian, A., Roostaazada, R., Masoomi, F., S. Zahirib, H., Ahmadianb, G., Vali, H., A. Noghbi, K., “Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal*, V.81, (2010), 397–405.

147. Pansiripata, S., Pornsunthorntaweeta, O., Rujiravanita, R., Kitiyanana, B., Somboonthanate, P., Chavadeja, S., “Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio”, *Biochemical Engineering Journal*, V.49, (2010), 185–191.

148. Youssef, N., Simpson, D. R., Duncan, K. E., McInerney, M. J., Folmsbee, M., Fincher, T., Knapp, R. M., “In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* strain

Injected into a Limestone Petroleum Reservoir”, Applied and environmental microbiology Journal, V. 73, n°4, (2007), 1239–1247.

149. Chandankere, R., Yao, J., M.F. Choi, M., Masakorala, K., Chan, Y., “An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTB isolated from petroleum reservoir”, Biochemical Engineering Journal, V.74, (2013), 46– 53.

150. Ismail, W., Israa, S., Al-Rowaihi., Abdulmohsen, A., Al-Humam., Y. Hamza, R., Ashraf, M., El Nayal., Bououdina, M., “Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15”, International Biodeterioration and Biodegradation Journal, V. 84, (2013), 168-178.

151. Rufino, R., Luna J., Campos-Takaki, G., Ferreira, S., Sarubbo, L., “Application of the Biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the Remediation of Heavy Metals”, Chemical engineering transactions Journal, V. 27, (2012), 61-66.

152. Nayak, A., Vijaykumar, M.H, Karegoudar, T.B., “Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation”, International Biodeterioration and Biodegradation Journal, V. 63, (2009), 73–79.

153. Leticia.Colina, V., Fernanda.Castroa, M., Julia.Amorosoa, M., Beatriz.Villegasa, L., “Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium”, Hazardous Materials Journal, V. 261, (2013), 577– 583.

154. Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., Umar, S., “Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria”, International Biodeterioration and Biodegradation Journal, V. 81, (2013), 28-34.

155. Seghal.Kiran, G., Anto.Thomas, T., Selvin, J., Sabarathnam, B., Lipton, A.P., “Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture”, Bioresource Technology Journal, V.101, (2010), 2389–2396.

156. Gudiñna, E.J., A. Teixeira, J., R. Rodrigues, L., “Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracase*”, Colloids and Surfaces Biointerfaces Journal, V.76, (2010), 298–304.

157. Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherita, A., Mhiri, N., Moulai-Mostefa, N., Sayadi, S., “Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils”, International Biodeterioration and Biodegradation Journal, V.65, (2011), 1182-1188.

158. Schreiberova, O., Hedba´vna, P., Cˇ ejkova, A., Jirku, V., Masa´k, J., “Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants”, New Biotechnology Journal, V.30, n°1, (2012).

159. Pizzul, L., Castillo, M., Stenstrom, J., “Effect of rapeseed oil on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by *Rhodococcus*

wratislaviensis", International Biodeterioration and Biodegradation Journal, V. 59, (2007), 111–118.

160. Seghal Kiran, G., Thomas, T.A., Selvin, J., "Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation", Colloids and Surfaces Biointerfaces Journal, V. 78, (2010), 8–16.

161. Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A., Matsuda, H., "Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058", Bioresource Technology Journal, V. 100, (2009), 572–577.

162. Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C., "Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardioopsis* sp. B4", Desalination Journal, V. 285, (2012), 198–204.

163. Vasileva-Tonkova, E., Gesheva, V., "Glycolipids produced by *Antarctic Nocardiooides* sp. During growth on n-paraffin", Process Biochemistry Journal, V.40, (2005), 2387–2391.

164. Khopade A., Ren B., Liu X.Y., Mahadik K., Zhang L., Kokare C., "Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3", Colloid and Interface Science Journal, V.367, (2012), 311–318.

165. Kokare C.R., Kadam S.S., Mahadik K.R., Chopade B.A., "Studies of bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1", Biotechnology Journal, V.6, (2007), 78–84.

166. Deepika K., Kannabiran K., "Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan Soil", Pharmacology and Toxicology British Journal, V.1, n°1, (2010), 33-39.

167. Richter, M., Willey, J., SuëMmuth, R., Jung, G., Fiedler, H.P., "Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tuë 901/8c", FEMS Microbiology Letters Journal, V.163 (1998), 165-171.

168. Pore, J., "Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples", Editions Techniques et Industries des Corps Gras, (1992).

169. Haigh, S.D., "A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil", The Science of the Total environment, V.185 (1996), 161-170.

170. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A., "Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes", Langmuir Journal, V.17, n°5, (2001), 1367- 1371.

171. Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z., "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions", Environ. Sci. Technol. Journal, V.25, n°1, (1991), 127- 133.

172. Muthusamy, K, Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P., "Biosurfactants: properties, commercial production and application", Curr Sci Journal, V.94, (2008), 736–747.

173. Christofi, N., Ivshina, I.B., "A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation", *Applied Microbiology Journal*, V.93, (2002), 915-929.
174. Haba E, Pinazo A, Jauregui O, Espuny MJ, Infante MR, Manresa A., "Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044", *Biotechnol Bioeng Journal*, V.81(2003), 316–226.
175. Deschenes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J. P., Samson, R., "Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosotecontaminated soil", *Appl. Microbiol. Biotechnol Journal*, V.46, n°5, (1996), 638–646.
176. J.Joshi, S., Suthar, H., Kumar.Yadav, A., Hingurao, K., Nerurkar, A., "Occurrence of Biosurfactant Producing *Bacillus* spp. in Diverse Habitats Hindawi", Publishing Corporation ISRN Biotechnology Journal, (2013), 1-6.
177. W.Rey, M., Ramaiya, P., A. Nelson B., "Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* sp.," *Genome Biology Journal*, V. 5, (2004), 1–13.
178. T. Nguyen, T., A. Sabatini; D., "Characterization and Emulsification Properties of Rhamnolipid and Sophorolipid Biosurfactants and Their Applications", *Molecular Sciences Journal*, V.12, (2011), 1232-1244.
179. Besson, F., Peypoux, F., Michel, G. and Delcambe L., "Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*", *Antibiotics Journal*, V. 29, n°10, (1976), 1043 – 1049.
180. Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y., "Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*", *Harmful Algae Journal*, V.4, (2005), 433 – 443.
181. Kang, S.W.; Kim, Y.B.; Shin, J.D.; Kim, E.K., "Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid", *Appl. Biochem. Biotechnol Journal*, V.160, (2010), 780–790.
182. Pacwa-Pociniczak, M., A. Płaza G., Piotrowska-Seget, Z., Singh Cameotra, S., "Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances", *Molecular Sciences International Journal*, V.12, (2011), 633-654.
183. Lindley, N.D., Heydemann, M.T., "The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus *Cladosporium resinae*", *Appl Microbiol Biotechnol Journal*, V.23, n°5, (1986), 384-388.
184. Berg, G., Seech, A., Lee, H., Trevors, J., "Identification and characterization of bacterium with emulsifying activity", *Environmental Science and Health Journal*, V.7, (1990), 753–764.
185. Reddy, S.A., Chen, C.Y., Bake, S.C., Chen, C.C., Jean, J.S., Fan, C.W., "Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: a biosurfactant as stabilizing agent", *Mater. Lett Journal*, V.63, (2009), 1227–1230.
186. Bodour, A. A., Miller-Maier R. M., "Application of a Modified dropcollapsing Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-producing Microorganisms", *Microbiological Methods Journal*, V. 32, (1998), 273 - 280.

187. Ron, E.Z., Rosenberg, E., "Biosurfactants and oil remediation", *Curr. Opin. Biotechnol Journal*, V.3, (2002), 249-252.
188. Schippers, C., Gebner, K., Muller, T., Scheper, T., "Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture", *Biotechnology Journal*, V.83, (2000), 189–198.
189. K. Satpute, S., M. Banat, I., K. Dhakephalkar, P., G. Banpurkar, A., A. Chopade, B., "Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms", *Biotechnology Advances Journal*, V.28 (2010), 436–450.
190. Dean-Ross, D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., "Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species", *FEMS Microbiology Letters Journal*, V.204, (2001), 205–211.
191. Zhao, Z., Selvam, A., Woon-Chung Wong, J., "Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene", *Bioresource Technology Journal*, V. 102, (2011), 3999–4007.
192. Oberbremer, A., Muller-Hurtig, R., Wagner, F., "Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor", *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, V.32, (1990), 485–489.
193. Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P., "Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse", *Applied Microbiology Journal*, V.9, (1998), 147- 153.
194. Oskay M., Tamer A. U., Azeri C., "*Antibacterial* activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey", *Afric. Biotechnol Journal*, V.3, n°9, (2004), 441-446.
195. Grigorevski de Lima, A.L., Pires do Nascimento, R., Da Silva, Bon E.P., Coehlo, R.R.R., "*Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries", *Enzyme Microb Technol Journal*, V.3, (2005),.272-277.
196. Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V., "Molecular and industrial aspects of glucose isomerase", *Microbiol Rev Journal*, V.60, (1996), 280-300.
197. Benkiar A., Jaouadi, N., Badis, A., rebzani, F., Touioui, S., Rekik, H., Naili, B., Ferradji, F., Bejar, S., Jaouadi, B., "Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process", *Biodeterioration and Biodegradation Journal*, V. 83, (2013), 129-138.
198. Bossert I. D., Kosson D.S, "Methods for Mesuring Hydrocarbon Biodegradatioon in Soils", In *Manual of Environmental Microbiology Journal*, Eds: Hurst C.J. et al. ASM Press, (1997).
199. Pelmont J., "Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques", *Presses Universitaire de Grenoble* (1993).
200. Larnari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A, Germain, P., Seguin, E., Tillequin, F., "New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physiochemical properties and structure elucidation", *Antibiot Journal (Tokyo)*, V.55, (2002), 702-706.

201. Bouras, F., Mathieul N., Sabaou N., "Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis*", NRRL B-24137.
202. Rokem, J.S., Eliasson Lantz, A., Nielsen, J., "Systems biology of antibiotic production by microorganisms", *Nat Prod Rep Journal*, V.24, (2007), 1262-1287.
203. Lee, K., Park, J.W., Ahn, I.S., "Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7", *Hazardous Materials Journal*, V.105, (2003), 157–167.
204. Wu, M.L., Nie, M.Q., Wang, X.C., Su, J.M., Cao, W., "Analysis of phenanthrene biodegradation by using FTIR, UV and GC/MS", *Spectrochim. Acta Journal*, V.75, (2010), 1047-1050.
205. 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.
206. Sorkhoh, N. A., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Stretton, R. J., Radwan, S. S., "Crude Oil and Hydrocarbon-Degrading Strains of *Rhodococcus rhodochrous* Isolated from Soil Kuwait", *Marine Environments in Pollution Journal*, V. 65, (1990), 1-17.
207. Cooper, D. G., Goldenberg, B. G., "Surface active agents from two *Bacillus* species", *Appl. Environ. Microbiol Journal*, V.53, (1987), 224-229.
208. Hampayak, I., Cheeptham, N., Pathom-Aree, W., Leelaporn Leelapornpisid, P., Lumyong, S., "Isolation and identification of biosurfactant producing actinomycetes from soil", *Microbiology Journal*, V.3, n°7, (2008), 499-507.
209. Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., "Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants", *Journal International: Hostettmann, K. (Ed.), Methods in Plant Biochemistry. Academic Press, London, UK, (1991), 47–69.*
210. Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., Lalchev, Z., "Characterization of bacterial isolates from industrial wastewater according to probable modes of hexadecane uptake", *Microbiol Res Journal*, V.163, (2008), 481- 486.
211. Saadoun, I., "Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel", *Basic Microbiol Journal*, V.42, n°6, (2002), 422–430.
212. S.Radwan, S., Barabas, G., A.Sorkhoh, N., Damjanovich, S., Szabo, I., Szollosi, J., Matko, J., Penyige, A., Hirano, T., M. Szabo, I., "Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*", *FEMS Microbiology Letters Journal*, V.169, (1998), 87-94.
213. Barabas G.Y., Vargha G., Szabo I.M., Penyige A., Damjanovich S., Szollosi J., Matk J., Hirano T., Atyus A.M., "n-Alkane uptake and utilization by *Streptomyces* strains", *Antonie Van Leeuwenhoek*, V.79, (2001), 269–276.
214. Barabas G.Y., Vargha G., Szabo I.M., Penyige A., Szollosi J., Matk J., Damjanovich S., Hirano, T., "Hydrocarbon utilization by *Streptomyces* soil bacteria", *Applied Microbiology Journal*, V.2, (2002), 185–190.

215. Lo Piccolo, L., De Pasquale, C., Fodale, R., Maria Puglia, A., Quatrini, P., "Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. Strain Socg in degradation of solid n-alkanes", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V.77, n°4, (2011), 1204-1213.
216. Auffret, M., Labbe, D., Thouand, G., W. Greer, C., Fayolle-Guichard, F., "Degradation of a Mixture Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*", *Applied and Environmental Microbiology Journal*, V. 75, n°24, (2009), 7774–7782.
217. Zhang, J., Zhang, X., Liu, J., Li, R., Shen, B., "Isolation of a thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. SH-1, capable of degrading aliphatic hydrocarbons and naphthalene simultaneously, and identification of its naphthalene degrading pathway", *Bioresource Technology Journal*, V.124, (2012), 83–89.
218. Zheng, C., He, J., Wangc, Y., Wang, M., Huang, Z., "Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains", *Bioresource Technology Journal*, V.102, (2011), 9155–9161.
219. Heri Yuli Yanto, D., Tachibana, S., "Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007", *Biodeterioration and Biodegradation International Journal*, V.85, (2013), 438-450.
220. Li, J.L., Chen, B.H., "Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans*", *Hazar. Mat Journal*, V.162, (2009), 66-73.
221. Wongwongsee, W., Chareanpat, P., Pinyakong, O., "Abilities and genes for PAH biodegradation of bacteria isolated from mangrove sediments from the central of Thailand", *Marine Pollution Bulletin Journal*, V.74, (2013), 95–104.
222. Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G., Devi, P., "Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp", *Bioresource Technol Journal*, V. 101, (2010), 7980–7983
223. Prabhu, Y., Phale, S., "Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation", *Appl Microbiol Biotechnol Journal*, V.61, (2003), 342–351.
224. 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", *Hazardous Materials Journal*, V.166, n°2-3, (2009), 1466-1473.
225. Djefal-Kerrar, A., Gais S., Ouallouche K., Nacer Khodja A., Mahlous M., Hace`ne H., "Immobilization of *Rhodococcus erythropolis* B4 on radiation crosslinked poly(vinylpyrrolidone) hydrogel: Application to the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Journal*, V.265, (2007), 370–374.
226. Ayed, L., Chaieb, K., Cheref, A., Bakhrouf, A., "Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*", *Microbiol. Biotechnol Journal*, V.25, (2009), 705–711.

227. Morasch, B., Annweiler, E., Warthman, R.J., Meckenstock, R.U., "The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites, degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria", *Microbiol. Methods Journal*, V.44, (2001), 183– 191.
228. Mahanty, B., Pakshirajan, K., Venkata Dasu, V., "Batch biodegradation of PAHs in mixture by *Mycobacterium frederiksbergense*: analysis of main and interaction effects", *Clean Techn Environ Policy Journal*, V.12, (2010), 441–447.
229. Haller, H.D., Finn, R.K., "Biodegradation of 3-chlorobenzoate and formation of black color in the presence and absence of benzoate", *Journal Appl. Microbial. Biotechnol*, V.8, (1979), 191–205.
230. Zhang, H., "Modern Organic Spectra", Chemical industry press, Beijing, (2007).
231. Vollhardt., Schore., "Traité de chimie organique", Edition de boeck Université, 5 édition, Traduction de la 5^e édition américaine par Dpovere, P., (2009).
232. Skoog, D.A., Holler, F.J., "Principes d'analyse instrumentale", 5eme Edition. Américaine, DeBoeck S.A., Paris, (2003).
233. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., "Chimie analytique", 7^e Edition. Américaine, DeBoeck & Larcier, Paris, (2002).
234. Hadibarata, T., Rahim, A., Yusoff, M., Aris, A., Kristanti, A.R., "Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022", *Environmental Sciences Journal*, V.24, n°4, (2012), 728–732.
235. Patel, V., Cheturvedula, S., Madamwar, D., "Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India", *Hazardous Materials Journal*, V. 201, (2012), 43– 51.
236. Bubinas, A., Giedraitytė, G., Kalėdienė, L., Nivinskiene, O., Butkiene, R., "Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid", *Cent. Eur. Biol Journal*, V.3, n°1, (2008), 61-68.
237. Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W., Michaelis, W., "Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*", *Appl. Environ. Microbiol Journal*, V.6, (2000), 518–523.
238. Zeinali, M., Vossoughi, M., Sussan, K., "Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism", *Chemosphere Journal*, V.72, (2008), 905–909.
239. Sridhar, R., Gopishetty., Heinemann, j., Deshpande, M., Rosazza, J., "Aromatic oxidations by *Streptomyces griseus*: Biotransformations of naphthalene to 4-hydroxy-1-tetralone", *Enzyme and Microbial Technology Journal*, V.40, (2007), 1622–1626.
240. Sutherland, J.B., Crawford, D.L., Pometto, A.L., "Metabolism of cinnamic, pcoumaric and ferulic acids by *Streptomyces setonii*", *Microbiol Journal*, V.29, (1983), 1253– 1257.
241. Cerniglia, C.E., "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Curr. Opin. Biotechnol Journal*, V.4, (1993), 331-338.

242. Pretsh, E., Buhlmann, P., Bactertsches, L., "Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data: NMR, UV/Vis, MS, and IR", Springer, 4th, (2009).
243. Jing, C., Xin, S., Hui, Z., Yinbo, Q., "Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*", *Enzyme Microb Technol Journal*, V.39, (2006), 501–506.
244. Robin, L., Stingley, A., Ashraf, A., Khan, Carl E., Cerniglia, R., "Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1", *Biochemical and Biophysical Research Communications Journal*, V.322, (2004), 133–146.
245. Saito, A., Iwabuchi, T., Harayama, S., "A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioide* sp strain KP7: Expression in *Escherichia coli*", *Bacteriology Journal*, V. 182 n° 8, (2000), 2134-214.
246. B.Sutherland, J., P.Freeman, J., L. Selby, A., P.Fu P., W.Miller, D., E.Cerniglia., "Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens*", *Microbiology Journal*, V 154, (1990), 260-266.
247. Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P., P.Freeman, E.Cerniglia., "Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*", *Applied and environmental microbiology Journal*, (1996), 2547-2553.
248. Silva, M., Esposito, E., D.Moody, J., Canhos, V., E.Cerniglia., "Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp", *Chemosphere Journal*, V57, (2004), 943-952.
249. Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., Li, Q.X., "Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4", *Appl. Microbiol. Biotechnol Journal*, V.71, (2005), 935–941.
250. Balashova, NV., Koshelva, IA., Golovchenko, NP., Boronin, AM., "Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strain", *Process Biochem Journal*, V.35, (1999), 291–296.
251. Tao, X.Q., Lu, G.N., Dang, Z., Yang, C., Yi, X.Y., "A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils", *Process Biochemistry Journal*, V.42, (2007), 401–408.
252. Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S., "Simultaneous hydrocarbon degradation and biosurfactant production by oilfields selected bacteria", *Appl. Microbiol Journal*, V.111, (2011), 525-536.
253. Abouseoud, M. A. Yataghene, A. Amrane, R. Maachi "Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*", *Hazardous Materials Journal*, V.180 (2010), 131–136.
254. Chiewpattanakul, P., Phonnok, S., Durand, A., Marie, E., Thanomsub, B.W., "Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80", *Microbiol. Biotechnol Journal*, V.20, (2010), 1664-1671.

255. 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.
256. Pirollo, M.P.S., Mariano, AP., Lovaglio, RB., Costa, S., Walter, V., Hausmann, R., Contiero, J., "Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LB1 isolated from a hydrocarbon-contaminated site", Appl Microbiol Journal, V.105, (2008), 1484–1490.
257. Suk, W.S., Lim, H.J., Lee, S.J., "Compositional analysis and some properties of biosurfactant from *Pseudomonas* sp. SW1. Korea", Applied Microbiology and Biotechnology Journal, V.27, (1999), 41-45.
258. Bordoloi, N.K., Konwar, B.K., "Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons", Hazard Mater Journal, V.170, (2009), 495–505.
259. Wattanaphon, H.T., Kerdsin, A., Thammacharoen C., Sangvanich, P., Vangnai, A.S., "A biosurfactant from *Burholderia cenacepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization", Appl Microbiol Journal, V.105, (2008), 416–423.
260. Kumari, B., Singh, SN. Singh, D.P., "Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation", Process Biochemistry Journal, V.47, (2012), 2463–2471.
261. Aparna, A., Srinikethana, G., Smitha, H., "Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal, V.95, (2012), 23– 29.
262. Mulligan C.N., Gibbs B.F., "Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*", Appl. Environ. Microbiol Journal, V.55, (1989), 3016-3019.
263. Kebbouche-Gana, S., Gana, M.L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N.A., Penninckx, M., Hacene, H., "Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants", Microbiologie Biotechnology Journal, V.36, (2009), 727-738.
264. Haddad, N.I.A., Wang, J., Mu, B., "Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1", Ind. Microbiol Biotechnol Journal, V. 35, (2008), 1597-1604.
265. Bechard J., Eastwell K.C., Sholberg P.L., Mazza G. and Skura B., "Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*", Agric. Food Chem Journal, V.46, (1998), 5355 - 5361.
266. Tsuge, K., Ohata, Y., Shoda, M., Gene yerP, "Involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*", Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal, V.45, (2001), 3566-3573.
267. Rufinoa, R.D., Lunaa J.M., Sarubboa, L.A., Rodriguesb, L.R.M., Teixeira, J.A.C., Campos-Takaki, G.M., "Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal, V.84, (2011), 1–5.

268. Jara, A.M.A.T., Andrade, R.F.S., Campos-Takaki Galba, M., "Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journal*, V.101, (2013), 315–318.
269. Pornsunthorntawee, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M., Rujiravanit, R., "Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil", *Bioresource Technology Journal*, V.99, (2008), 1589–1595.
270. Mnif, S., Chamkhan, M., Labat, M., Sayadi, S., "Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria", *Microbiologie of Applied Journal*, V. 111, (2011), 525–536.
271. Bordas, F., Lafrance, P., "Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contaminé par le pyrène: Essais en colonnes de sol", *Technologie Journal*, V.31, n°8, (2001), 2211-2217.
272. Urum, K.; Grigson, S.; Pekdemir, T.; McMenamy, S., "A Comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils", *Chemosphere Journal*, V.62, (2006), 1403–1410.
273. Lai, C.C.; Huang, Y.C.; Wei, Y.H.; Chang, J.S., "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil", *Hazard Mater Journal*, V. 167, (2009), 609–614.
274. Franzetti, A.; Caredda, P.; Ruggeri, C.; Colla La, P.; Tamburini, E.; Papacchini, M.; Bestetti, G. "Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies", *Journal Chemosphere* V. 75, (2009), 801–807.
275. Pereira, J.F.B., J. Gudiña, E., Costa, R., Vitorino R., A. Teixeira, J., A.P. Coutinh, J., R. Rodrigues, L., "Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery Applications", *Fuel Journal*, V.111 (2013), 259–268.