

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Chimie Industrielle

**ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES
PÉTROLIERS PAR DES BACTÉRIES MARINES : APPLICATION EN
TRAITEMENT DES EAUX DE MER CONTAMINÉES PAR LE
PÉTROLE**

Par

Billal ZENATI

Devant le jury composé de :

| | | |
|--------------|---|--------------------|
| O. BOURAS | Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1 | Président |
| M. ABOUSEOUD | Professeur, Université Yahia Farès de Médéa | Examineur |
| S. FERHAT | MCA, Université Yahia Farès de Médéa | Examinatrice |
| S. ALLOUACHE | MCA, ENSSMAL | Examinatrice |
| H. LARIBI | MCA, Université Saad Dahlab Blida 1 | Examinatrice |
| A. BADIS | Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1 | Directeur de thèse |

Blida, Décembre 2018

الملخص

تهدف هذه الأطروحة لدراسة قدرات تحلل الهيدروكربونات بواسطة بكتيريا بحرية منتقاة قصد تفعيلها في المعالجة الحيوية لمياه البحر الملوثة بالنفط الخام.

تم عزل خمسة عشر (15) سلالة بكتيرية قادرة على استخدام النفط كمصدر وحيد للكربون والطاقة. أُلحقت أحسن سلالة بكتيرية فعالة في التحلل الحيوي للنفط وإنتاج مُخفض توترسطح حيوي، سُفرت بـ skd44، بالنوع *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* وهذا بالاعتماد على تحليل الجين المشفر لـ ARNr 16S بنسبة تشابه تقدر بـ 97.44%. سُجل نمو مثالي لهذه السلالة البكتيرية على النفط الخام في وسط ملحي بتركيز 23 غ/ل، درجة حموضة معتدلة إلى قلوية قليلا ونسبة بترول تقدر بـ 5% (حجم/حجم). كشف تحليل الألكانات الخطية للبتترول (بتركيز 1%، حجم/حجم) عن نسبة تفكك عالية (83.68%) بواسطة السلالة Sdk644. هذه السلالة قادرة أيضا على تفكيك الهيكساديكان (41%) والتيتراكوسان (11%) بتركيز 1 غ/ل وكذلك البيران (38%) والأنتراسان (31%) بتركيز 100 مغ/ل في مدة تحضين قدرت بـ 20 يوم.

فيما يخص إنتاج مخفض توتر السطح الحيوي للسلالة Sdk644، أفادت النتائج عن فعالية مثلى وذلك باستعمال الزيت المقلي (2%، وزن/حجم)، كلوريد الأمونيوم كمصدر أزوتي، نسبة كربون إلى أزوت مقدرة بـ 50، pH بقيمة 5، تركيز ملحي يساوي 23 غ/ل ومدة تحضين تصل إلى ثلاثة أيام. أنتج في هذه الظروف المثالية 4.93 غ/ل من مخفض السطح الحيوي "HF644". هذا الأخير له تركيز مذيلي حرج = 787 ملغ/ل ويخفض التوتر السطحي إلى 31 من/م. يمتاز "HF644" باستقرار عالي في درجات حرارة بين -18 إلى 121 درجة مئوية، نسبة حموضة تمتد من 2 إلى 10 وتركيز ملحي يتراوح بين 0 و 200 غ/ل.

أثبتت الدراسة أن مخفض توترالسطح الحيوي "HF644" غير سام على يرقات الأرتيميا، كما أنه يمتاز بقوة جيدة في تذويب البترول الملوث لماء البحر مقارنة بمخفض السطح الاصطناعي "Tween 80" (يفوقه بمرتين). في الأخير، كشفت تجارب المعالجة الحيوية أن التحفيز الحيوي للسلالة Sdk644 بالـ "HF644" يعطي أقصى قدر من التحلل الحيوي للنفط مقارنة بالمنشطات المغذية وكذا المكروفلورة الأصلية لماء البحر.

الكلمات المفتاحية: النفط الخام – البكتيريا البحرية – المعالجة الحيوية – التحلل الحيوي – مخفض توتر السطح الحيوي – ماء البحر – السمية.

Résumé

L'objectif de ce présent travail s'articule autour de l'étude des capacités de dégradation des hydrocarbures par des bactéries marines ainsi que la production de biosurfactants pour une mise en application en bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole.

Quinze (15) souches bactériennes aptes à utiliser le pétrole comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolées. La meilleure souche « SdK644 » dans la dégradation du pétrole et la production de biosurfactant est affiliée au *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* par analyse du gène codant de l'ARNr 16S, avec une similarité de 97,44%. En utilisant le pétrole comme source unique de carbone et d'énergie, *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 pousse avec une teneur de sel (NaCl) optimale de 23 g/L (m/v), un pH neutre-alkalin et une concentration du pétrole de 5% (v/v). Une dégradation significative des *n*-alcanes du pétrole (à 1%, v/v) a été obtenue après 21 jours d'incubation (83,68% de dégradation). La souche SdK644 est aussi capable de dégrader 41% d'hexadécane et 11% de tétracosane à 1 g/L, de même que le pyrène (38%) et l'antracène (31%) à 100 mg/L après 20 jours d'incubation.

Une production maximale de biosurfactant par cette souche a été obtenue avec l'huile de friture comme source de carbone (2%, m/v), le NH₄Cl comme source d'azote, un rapport C/N de 50, un pH de 5, une salinité de 23 g/L NaCl et un temps d'incubation de 3 jours. Dans ces conditions, une quantité de 4,93 g/L du biosurfactant «HF644» est produite. Le HF644 a une concentration micellaire critique de 787 mg/L et réduit la tension de surface jusqu'à 31 mN/m. Il est stable dans une large gamme de température (-18–121 °C), de pH (2–10) et de salinité (0–200 g/L NaCl).

Le biosurfactant HF644 est considéré comme non-toxique *vis-à-vis* l'*Artemia* et possède un bon pouvoir solubilisant du pétrole dans l'eau de mer par rapport au surfactant Tween 80 (2 fois plus élevé). Enfin, les expériences de bioremédiation ont révélé que la biostimulation de la souche SdK644 avec HF644 donne une dégradation maximale du pétrole par rapport aux stimulants nutritifs et à la microflore indigène de l'eau de mer.

Mots clés : Pétrole brut – Bactéries marines – Biorémediation – Biodégradation Biosurfactant – Eau de mer – Toxicité.

Abstract

The aim of this work is to study the hydrocarbon degradation capacities of marine bacteria as well as the production of biosurfactants for bioremediation purpose of crude oil contaminated seawater.

Fifteen (15) bacterial strains able to utilize crude oil as sole carbon and energy source and produce biosurfactants were successfully isolated. Based on these results, an isolate designed as strain Sdk644 was selected. It was very closely related to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* with 16S rRNA gene sequence similarity of 97.44 %. Strain Sdk644 could grow on crude oil up to 5% (v/v) in neutral-alkaline conditions and with optimal NaCl concentration of 23 g/L. This strain degraded 83.68% of n-alkanes in crude oil (1%, v/v) over a period of 21 days. Sdk644 strain also mineralized hexadecane (41%) and tetracosane (11%) at initial concentration of 1 g/L, as well as 100 mg/L of pyrene (38%) and anthracene (31%) after 20 days of incubation.

High production efficiency of biosurfactant from Sdk644 was achieved after 3 days of incubation, using waste frying oil (2%, w/v), NH₄Cl as nitrogen source, C/N ratio of 50, pH 7.0 and NaCl concentration 23 g/L. The yield of biosurfactant "HF644" obtained was 4.93 g/L. HF644 agent decrease surface tension at 31 mN/m, with critical micelle concentration of 787 mg/L. The biosurfactant activity was stable over a wide range of temperature (-18–121 °C), pH (2–10) and salinity (0–200 g/L).

Toxicity bioessai of HF644 biosurfactant showed no significant lethality against *Artemia* nauplii. Moreover, the results demonstrated that HF644 biosurfactant was 2 times greater than that of a synthetic surfactant Tween 80 in crude oil solubilization. Finally, bioremediation experiments showed that combination of HF644 biosurfactant with Sdk644 inoculum leads to maximal crude oil removal in comparison with inorganic nutrient stimulants and seawater indigenous microflora.

Keywords: Crude oil – marine bacteria – Bioremediation – Biodegradation – Biosurfactant – Seawater – Toxicity.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord nous remercions Allah (Dieu) de nous avoir donné les efforts pour arriver à ce stade du succès et de nous orienter vers la lumière de la science et du savoir.

Ce présent travail, initié en 2012, a été réalisé conjointement au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA), le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie, le Laboratoire de Microbiologie et de Biochimie, Département de Génie des Procédés, Université Saad Dahlab Blida1 et, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de BioMolécules (LCSN-BioM), Université Saad Dahlab Blida1. Une partie de ce travail est financée dans le cadre d'un projet de type CNEPRU (Comité National d'Evaluation et de Programmation de la Recherche Universitaire) Contrat N° A16N01UN090120150019.

Je tiens à remercier Monsieur BADIS Abdelmalek, Professeur à l'Université Saad Dahlab Blida1, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur BOURAS Omar, Professeur à l'Université Saad Dahlab Blida1, de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être président du jury de cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, merci à Monsieur ABOUSEOUD Mahmoud, professeur à l'Université Yahia Ferès de Médéa, Madame FERHAT Samira, Maître des Conférences (A) à l'Université Yahia Ferès de Médéa, Madame ALLOUACHE Souhila, Maître des Conférences (A) à l'École Nationale Supérieure des Sciences de Mer et de l'Aménagement du Littoral ainsi que Madame LARIBI Hassiba, Maître des Conférences (A) à l'Université Saad Dahlab Blida1.

Je suis très reconnaissant à Monsieur KACHER Mohamed, ex-Directeur du CNRDPA et au Directeur actuel Monsieur ANNANE Rachid pour m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans les meilleures conditions possibles.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur Prof. SAYADI Sami, Directeur du Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) et Directeur Général du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire (LBPE) et m'avoir donné la chance de bénéficier d'une formation sur les techniques d'isolement des bactéries anaérobies tout au début de mon stage. Que Monsieur Prof. CHAMKHA Mohamed, Professeur au Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) et responsable du Projet «Bioremédiation», trouve ici le témoignage de mes sincères gratitude.

Je remercie également les personnes qui ont contribué scientifiquement à cette thèse. Je pense en particulier à mon frère tunisien Dr CHEBBI Alif, avec qui j'ai partagé l'un de mes meilleurs souvenirs à Sfax, je le remercie pour autant de choses : son aide dans l'identification phylogénétique de la souche SdK644, la prise en charge de l'analyse des quelques échantillons du pétrole par CG-SM suite à mon retour en Algérie et les discussions scientifiques que nous avons eu ensemble. Je pense aussi à notre ami tunisien Dr JOUADI Bassem pour son aide précieuse en améliorant la qualité de mon article de recherche. Je tiens à remercier également ma collègue dans l'équipe de recherche Dr MESBIAIH Fatma-Zohra pour les longs débats s'entretenir sur des thématiques comme biosurfactants et biodégradation des hydrocarbures. Je remercie aussi Prof. BOUTOUMI Hocine pour son aide précieuse dans l'interprétation de spectres Infra-Rouge des biosurfactants et l'identification des composés aliphatiques du pétrole par CG-SM. Il m'est impossible d'oublier mon frère Dr EDDOUAOUA Kamel pour le temps qu'il a consacré à la lecture de ma thèse.

Enfin, je remercie tous mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les moments difficiles, je cite tout particulièrement M. INAL Ahmed, M. KOURDALI Sidali, M. MEKNACHI Abdellah, M. BEN YAHIA Abdelwaheb, M. CHEBEL Fateh, M. BOUZEFFOUR Fatih et KELKAL Mahfoud.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| RESUME | 1 |
| REMERCIEMENTS | 4 |
| TABLE DES MATIERES | 6 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX | 12 |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE | 17 |
| 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 20 |
| 1.1. Contamination du milieu marin par les hydrocarbures pétroliers | 20 |
| 1.1.1. Composition du pétrole | 20 |
| 1.1.1.1. Hydrocarbures aliphatiques | 21 |
| 1.1.1.2. Hydrocarbures aromatiques | 21 |
| 1.1.1.3. Résines | 21 |
| 1.1.1.4. Asphaltènes | 22 |
| 1.1.2. Propriétés toxicologiques des hydrocarbures pétroliers | 24 |
| 1.1.3. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin | 24 |
| 1.1.3.1. Etalement | 26 |
| 1.1.3.2. Evaporation | 26 |
| 1.1.3.3. Dispersion | 26 |
| 1.1.3.4. Emulsification | 27 |
| 1.1.3.5. Dissolution | 27 |
| 1.1.3.6. Oxydation photochimique | 28 |
| 1.1.3.7. Sédimentation | 28 |
| 1.1.3.8. Biodégradation | 28 |
| 1.1.4. Microorganismes marins hydrocarbonoclastes | 29 |
| 1.2. Métabolisme de la biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers | 31 |
| 1.2.1. Concept général | 31 |
| 1.2.2. Voies métaboliques de dégradation | 32 |
| 1.2.2.1. Biodégradation des n-alcanes | 35 |
| 1.2.2.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques | 37 |
| 1.2.2.3. Biodégradation des alcanes cycliques et des alcènes | 39 |
| 1.2.3. Gènes impliqués dans la biodégradation | 39 |
| 1.2.4. Facteurs influençant sur la biodégradation des hydrocarbures pétroliers | 40 |

| | |
|---|----|
| 1.2.5. Mécanismes d'accèsion aux hydrocarbures pétroliers | 43 |
| 1.2.5.1. Adhésion bactérienne aux hydrocarbures | 44 |
| 1.2.5.2. Emulsification de la phase huileuse | 44 |
| 1.3. Stratégies de bioremédiation des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin | 45 |
| 1.3.1. Enrichissement en nutriments (Biostimulation) | 45 |
| 1.3.2. Ensemencement avec des microorganismes (Bioaugmentation) | 47 |
| 1.4. Biosurfactants | 49 |
| 1.4.1. Généralités sur les surfactants | 49 |
| 1.4.2. Définition des biosurfactants | 51 |
| 1.4.3. Classification des biosurfactants | 52 |
| 1.4.3.1. Glycolipides | 54 |
| 1.4.3.2. Lipopeptides et lipoprotéines | 54 |
| 1.4.3.3. Acides gras et phospholipides | 55 |
| 1.4.3.4. Biosurfactants polymériques | 55 |
| 1.4.3.5. Biosurfactants particuliers | 56 |
| 1.4.4. Biosurfactants, bioémulsifiants de microorganismes marins | 57 |
| 1.4.5. Production des biosurfactants | 58 |
| 1.4.6. Rôle physiologique des biosurfactants | 62 |
| 1.4.6.1. Adhésion | 63 |
| 1.4.6.2. Emulsification | 63 |
| 1.4.6.3. Biodisponibilité et désorption | 63 |
| 1.4.5.4. Stratégies de défense | 64 |
| 1.5. Ecotoxicologie | 64 |
| 1.5.1. Définition de l'écotoxicologie | 64 |
| 1.5.2. Evaluation des effets toxiques des contaminants | 65 |
| 1.5.2.1. Toxicité aiguë | 65 |
| 1.5.2.2. Toxicité chronique | 65 |
| 1.5.3. Méthodes statistiques d'estimation de la toxicité | 66 |
| 1.5.3.1. Transformation de probit | 66 |

| | |
|---|----|
| 1.5.3.2. Autres méthodes | 68 |
| 1.5.4. <i>Artemia</i> en écotoxicité | 68 |
| 1.5.4.1. Généralités sur l' <i>Artemia</i> | 68 |
| 1.5.4.2. Caractérisation des espèces d' <i>Artemia</i> | 68 |
| 1.5.4.3. Avantage d'utilisation de l' <i>Artemia</i> dans les bioessais de toxicité | 70 |
| 1.5.4.4. Sensibilité des bioessais de toxicité basé sur l' <i>Artemia</i> | 70 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 72 |
| 2.1. Echantillonnage | 72 |
| 2.1.1. Site de prélèvement | 72 |
| 2.1.2. Prélèvement des échantillons | 72 |
| 2.2. Isolement et criblage des isolats bactériens marins hydrocarbonoclastes | 73 |
| 2.1. Milieux de culture | 73 |
| 2.2.2. Isolement et purification des isolats | 74 |
| 2.2.3. Conservation des isolats purifiés | 75 |
| 2.2.3.1. Conservation à court terme | 75 |
| 2.2.3.2. Conservation à long terme | 75 |
| 2.2.3. Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes | 75 |
| 2.3. Caractérisation de la souche performante | 76 |
| 2.3.1. Caractérisation phénotypique | 76 |
| 2.3.1.1. Etude morphologique | 76 |
| 2.3.1.2. Coloration de Gram | 77 |
| 2.3.1.3. Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance | 78 |
| 2.3.3.4. Test biochimique de l'oxydase | 78 |
| 2.3.3.5. Test biochimique de la catalase | 78 |
| 2.3.2. Caractérisation phylogénétique | 78 |
| 2.4. Etude de la biodégradation des hydrocarbures | 79 |
| 2.4.1. Etude de la biodégradation du pétrole | 79 |
| 2.4.2. Etude de la biodégradation des hydrocarbures modèles | 80 |
| 2.4.2.1. Préparation des hydrocarbures | 80 |
| 2.4.2.2. Biodégradation des hydrocarbures | 81 |
| 2.5. Production et caractérisation de biosurfactant | 82 |
| 2.5.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants | 82 |

| | |
|--|----|
| 2.5.2. Evaluation de la production de biosurfactant | 82 |
| 2.5.3. Optimisation de la production de biosurfactant | 83 |
| 2.5.3.1. Choix de meilleur substrat carboné "déchet" | 84 |
| 2.5.3.2. Influence de la source d'azote | 84 |
| 2.5.3.3. Influence du rapport C/N | 84 |
| 2.5.3.4. Influence du pH | 85 |
| 2.5.3.5. Influence de la salinité | 85 |
| 2.5.4. Cinétique de production du biosurfactant | 85 |
| 2.5.5. Extraction et purification partielle du biosurfactant | 85 |
| 2.5.6. Caractérisation du biosurfactant | 86 |
| 2.5.6.1. Concentration micellaire critique | 86 |
| 2.5.6.2. Pouvoir émulsifiant | 86 |
| 2.5.6.3. Stabilité du biosurfactant | 86 |
| 2.5.6.4. Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF | 87 |
| 2.6. Etude de la toxicité du biosurfactant, du pétrole et fractions pétrolières vis-à-vis l' <i>Artemia</i> | 87 |
| 2.6.1. Déroulement des essais | 88 |
| 2.6.2. Matériel testé | 88 |
| 2.6.2.1. Toxique de référence | 88 |
| 2.6.2.2. Surfactant Tween 80 | 89 |
| 2.6.2.3. Biosurfactant HF644 | 89 |
| 2.6.2.4. Pétrole brut et ses fractions majoritaires | 89 |
| 2.6.2.4.1. Pétrole brut | 89 |
| 2.6.2.4.2. Fractions du pétrole | 89 |
| 2.6.3. Détermination de la CL50 et traitement statistique des résultats | 90 |
| 3.7. Bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole | 90 |
| 3.7.1. Essai de solubilisation du pétrole | 90 |
| 3.7.2. Essais de bioremédiation | 91 |
| 3.7.2.1. Réalisation des expériences | 91 |
| 3.7.2.2. Paramètres de suivi | 91 |
| 3.7.2.2.1. Croissance bactérienne | 91 |
| 3.7.2.2.2. Dosage du pétrole résiduel | 92 |
| 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS | 93 |

| | |
|--|-----|
| 3.1. Biodégradation des hydrocarbures par les hydrocarbonoclastes marins | 93 |
| 3.1.1. Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes | 93 |
| 3.1.2. Caractérisation de la souche SdK644 | 95 |
| 3.1.2.1. Effet de la salinité sur la croissance de la souche SdK644 | 95 |
| 3.1.2.2. Affiliation phylogénétique de la souche SdK644 | 96 |
| 3.1.3. Etude de la biodégradation des hydrocarbures par la souche SdK644 | 97 |
| 3.1.3.1. Etude de la biodégradation du pétrole brut | 97 |
| 3.1.3.1.1. Effet des facteurs environnementaux sur la cinétique de croissance | 97 |
| 3.1.3.1.2. Biodégradation des n-alcanes présents dans le pétrole brut | 101 |
| 3.1.3.2. Etude de la biodégradation des hydrocarbures modèles | 104 |
| 3.1.3.2.1. Biodégradation des n-alcanes | 104 |
| 3.1.3.2.2. Biodégradation des HAP | 108 |
| 3.1.4. Conclusion | 115 |
| 3.2. Production et caractérisation de biosurfactant | 116 |
| 3.2.1. Criblage des souches productrices des biosurfactants | 116 |
| 3.2.2. Optimisation de la production de biosurfactant | 117 |
| 3.2.2.1. Influence de la source de carbone : utilisation des substrats déchets | 117 |
| 3.2.2.2. Influence de la nature de la source d'azote | 121 |
| 3.2.2.3. Influence du rapport C/N | 124 |
| 3.2.2.4. Influence du pH initial du milieu | 126 |
| 3.2.2.5. Influence de la salinité | 128 |
| 3.2.3. Cinétique de production du biosurfactant | 130 |
| 3.2.4. Extraction et purification partielle du biosurfactant | 132 |
| 3.2.5. Propriétés du biosurfactant HF644 | 134 |
| 3.2.5.1. Concentration micellaire critique | 134 |
| 3.2.5.2. Pouvoir émulsifiant du biosurfactant | 135 |
| 3.2.5.3. Stabilité du biosurfactant | 135 |
| 3.2.6. Caractérisation structurelle du biosurfactant HF644 par IRTF | 139 |
| 3.2.7. Conclusion | 140 |
| 3.3. Etude écotoxicologique sur l' <i>Artemia</i> | 141 |
| 3.3.1. Suivi de l'éclosion des cystes et développement des nauplius | 141 |
| 3.3.2. Toxicité des substances testées vis-à-vis l' <i>Artemia</i> | 142 |
| 3.3.2.1. Qualité physico-chimique de l'eau de dilution | 143 |
| 3.3.2.2. Validité des bioessais | 143 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2.3. Toxicité du surfactant Tween 80 | 144 |
| 3.3.2.4. Toxicité du biosurfactant HF644 | 144 |
| 3.3.2.5. Toxicité du pétrole brut et sa fraction aliphatique | 146 |
| 3.4. Bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole | 149 |
| 3.4.1. Pouvoir solubilisant du biosurfactant HF644 | 149 |
| 3.4.2. Essai de bioremédiation | 152 |
| 3.4.3. Conclusion | 155 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 157 |
| APPENDICES | 161 |
| A Liste des symboles et des abréviations | 161 |
| B Etapes d'éclosion des cystes d' <i>Artemia</i> | 162 |
| C Fractionnement du pétrole brut | 165 |
| D Propriétés physico-chimiques des quatre HAP étudiées | 167 |
| RÉFÉRENCES | 168 |

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Figure 1.1 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut | 23 |
| Figure 1.2 : Devenir du pétrole dans le milieu marin | 25 |
| Figure 1.3 : Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydrocarbonoclastes marines | 30 |
| Figure 1.4 : Aperçu schématique des voies potentielles d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes | 34 |
| Figure 1.5 : Les trois voies périphériques possibles de dégradation aérobie des n-alcane par les microorganismes | 36 |
| Figure 1 : Biodégradation aérobie du catéchol | 38 |
| Figure 1.7 : Représentation schématique d'un surfactant, sous forme d'un monomère et en micelle | 50 |
| Figure 1.8 : Structure chimique de quelques glycolipides | 54 |
| Figure 1.9 : Structure d'une surfactine produite par <i>Bacillus subtilis</i> | 55 |
| Figure 1.10 : Structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d' <i>Acinetobacter</i> | 56 |
| Figure 1.11 : Nauplius d' <i>A. franciscana</i> | 69 |
| Figure 2.1 : Localisation du site d'échantillonnage du port de Khemisti | 72 |
| Figure 2.2 : Présentation de la station et prélèvement des échantillons au niveau du port de Khemisti | 73 |
| Figure 2.3 : Test de mobilité des bactéries | 77 |
| Figure 2.4 : Test de déplacement de pétrole | 83 |
| Figure 2.5 : Test de l'indice d'émulsification | 83 |
| Figure 3.1 : Aspect visuel de la biodégradation du pétrole | 95 |
| Figure 3.2 : Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation | 95 |

| | |
|---|-----|
| Figure 3.3 : Détermination de la gamme de concentration optimale en NaCl de croissance de la souche SdK644 | 96 |
| Figure 3.4 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644 | 97 |
| Figure 3.5 : Effets du : (a) pH, (b) salinité du milieu et (c) concentration du pétrole brut sur la croissance de la souche SdK644 | 98 |
| Figure 3.6 : Taux de croissance maximal de la souche SdK644 sous l'effet du : (a) pH, (b) salinité du milieu et (c) concentration du pétrole | 100 |
| Figure 3.7 : Cinétique de biodégradation des <i>n</i> -alcanes du pétrole par la souche SdK644 | 101 |
| Figure 3.8 : Effet de la concentration du pétrole sur la biodégradation des <i>n</i> -alcanes | 103 |
| Figure 3.9 : Cinétiques de croissance de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur l'hexadécane et le tétracosane pour une concentration de 1 g/L | 104 |
| Figure 3.10 : Cinétiques de croissance de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur les HAP pour une concentration de 100 mg/L | 108 |
| Figure 3.11 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur le pyrène | 110 |
| Figure 3.12 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur l'antracène | 110 |
| Figure 3.13 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur le naphthalène | 111 |
| Figure 3.14 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 sur le phénanthrène | 111 |
| Figure 3.15 : Aspect visuel du pyrène (a) dans l'échantillon témoin, (b) après 20 jours de culture avec la souche SdK644 | 113 |
| Figure 3.16 : Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes selon le pouvoir à produire des biosurfactants à partir de l'huile d'olive | 116 |
| Figure 3.17 : Influence de la nature de la source de carbone sur la cinétique de croissance de la souche SdK644 | 119 |
| Figure 3.18 : Influence de la nature de la source de carbone sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et du pH de culture (courbes) | 120 |
| Figure 3.19 : Influence de la nature de la source d'azote sur la cinétique de croissance de la souche SdK644 | 122 |

| | |
|--|-----|
| Figure 3.20 : Influence de la nature de la source d'azote sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et le pH du milieu (courbe) | 122 |
| Figure 3.21 : Influence du rapport C/N sur la cinétique de croissance de la souche SdK644 | 125 |
| Figure 3.22 : Influence du rapport C/N sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et du pH de milieu (courbe) | 125 |
| Figure 3.23 : Influence du pH initial du milieu sur la cinétique de croissance de la souche SdK644 | 127 |
| Figure 3.24 : Influence du pH initial du milieu sur l'activité de surface de biosurfactant de la souche SdK644 (DDP et TS) et le pH de milieu à la fin de l'expérience | 127 |
| Figure 3.25 : Influence de la salinité sur les cinétiques de croissance de la souche SdK644 | 129 |
| Figure 3.26 : Influence de la salinité sur l'activité de surface de biosurfactant de la souche SdK644 (DDP et TS) et le pH de milieu à la fin de l'expérience | 129 |
| Figure 3.27 : Cinétique de croissance et de production du biosurfactant par <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 | 131 |
| Figure 3.28 : Activité de surface maximale du biosurfactant HF644 produit par <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SdK644 à partir de l'huile de friture | 133 |
| Figure 3.29 : Aspect textural du biosurfactant HF644 | 133 |
| Figure 3.30 : Evolution de la TS en fonction de la concentration du biosurfactant HF644 et détermination de la CMC | 134 |
| Figure 3.31 : Pouvoir émulsifiant du biosurfactant HF644 vis-à-vis différents substrats hydrophobes | 135 |
| Figure 3.32 : Stabilité du biosurfactant HF644 sous l'effet de (a) : Température, (b) : pH et (c) : salinité | 136 |
| Figure 3.33 : Spectre IRTF du biosurfactant HF644 | 139 |
| Figure 3.34 : Étapes d'éclosion des cystes d' <i>Artemia franciscana</i> observées au grossissement GX10 | 142 |
| Figure 3.35 : Evolution de la mortalité des nauplius d' <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration du pétrole brut | 147 |
| Figure 3.36 : Evolution de la mortalité des nauplius d' <i>A. franciscana</i> en fonction de la concentration de la fraction aliphatique | 148 |

| | |
|---|-----|
| Figure 3.37 : Chromatogramme du pétrole brut avec identification des composés aliphatiques | 149 |
| Figure 3.38 : Effet des surfactants sur la dispersion du pétrole brut dans l'eau de mer (a) Avant traitement, (b) Après traitement | 150 |
| Figure 3.39 : Effet des surfactants sur la solubilisation des hydrocarbures individuels saturés du pétrole | 150 |
| Figure 3.40 : Effet global des surfactants sur la solubilisation des composés aliphatiques du pétrole | 152 |
| Figure 3.41 : Cinétiques de croissance microbienne dans les différentes expériences de bioremédiation | 153 |
| Figure 3.42 : Résultats gravimétriques de la biodégradation du pétrole brut suite aux différentes stratégies de bioremédiation | 155 |
| Tableau 1.1 : Enzymes impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers | 40 |
| Tableau 1.2 : Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface | 53 |
| Tableau 1.3 : Utilisation des substrats bruts et déchets pour la production de biosurfactants par diverses souches microbiennes | 59 |
| Tableau 1.4 : Méthodes de récupération des biosurfactants | 61 |
| Tableaux 3.1 : Croissance microbienne et activité de surface des souches bactériennes cultivées dans le MM-PB après 10 jours d'incubation | 94 |
| Tableau 3.2 : Réduction de la TS au cours de la dégradation de l'hexadécane et du tétracosane par la souche SdK644 | 106 |
| Tableau 3.3 : Réduction de la TS au cours de dégradation du pyrène, de l'anthracène, du naphthalène et du phénanthrène par la souche SdK644 | 112 |
| Tableau 3.4 : Effet de la concentration du Tween 80 sur les nauplius d' <i>A. franciscana</i> | 144 |
| Table 3.5 : Effet de la concentration du biosurfactant HF64 et du surfactant SDS sur la mortalité d' <i>A. franciscana</i> | 146 |

Tableau 3.6 : Croissance maximale, taux de croissance spécifique et dénombrement de la flore bactérienne dans chaque expérience de bioremédiation

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Au sens strict, un mélange extrêmement complexe d'une grande variété d'hydrocarbures de masse moléculaire faible ou élevée signifie du pétrole ou du pétrole brut. Les produits à base de pétrole sont la principale source d'énergie pour l'industrie pétrochimique et la vie quotidienne. Des fuites et des déversements accidentels se produisent régulièrement pendant l'exploration, la production, le raffinage, le transport et le stockage du pétrole et de ses produits. Par conséquent, l'un des problèmes environnementaux majeurs d'aujourd'hui est la pollution hydrocarbonée, résultante, dans la majorité des cas, des activités industrielles pétrochimiques. La pollution par les hydrocarbures a été discutée comme le principal défi crucial dans les écosystèmes aquatiques, vu le caractère toxique des composés pétroliers, qu'ils appartiennent à la famille des produits cancérigènes et neurotoxiques et qui menace toute les formes de la vie [1, 2].

Le flux total des hydrocarbures pétroliers entrant en mers à travers les différentes sources est de l'ordre de 1.300.000 tonnes par an. Seuls les suintements naturels (fuites) représentent 47%, alors que les activités liées à la consommation de produits pétroliers s'estiment à 38%. Ajoutant à cela, lors du transport de produits pétroliers, les déversements accidentels et les rejets opérationnels survenant par navires pétroliers contribuent à 12% du flux total rejeté, suivis de loin par les procédés d'extraction (3%) [3].

Le pétrole brut est un mélange hétérogène d'hydrocarbures qui comprend plus de 17.000 composés organiques [4]. Il est composé principalement d'alcanes, de cycloalcanes et d'aromatiques. De faibles quantités de résines (composés azotés, soufrés et oxygénés) et une fraction asphaltique (partiellement oxygénée et fortement condensée) existent également dans le pétrole brut avec des taux variables selon sa nature, qu'il soit léger ou lourd [5, 6].

Par rapport aux procédés thermiques et chimiques, la bioremédiation est la technologie prometteuse pour le traitement des sites contaminés par les hydrocarbures, du fait qu'elle est moins onéreuse et conduit à une minéralisation complète des composés [7, 8]. La bioremédiation repose essentiellement sur la

biodégradation et/ou la biotransformation des produits pétroliers par des agents biologiques (par exemple des microorganismes et/ou des bio-tensions actifs). Elle mènera à une minéralisation totale des contaminants organiques en dioxyde de carbone, eau, composés inorganiques et protéines cellulaires ou transforme les contaminants organiques complexes en d'autres composés organiques plus simples.

Les microorganismes dégradant les hydrocarbures ou *hydrocarbonoclastes* sont ubiquitaires dans les sols et l'eau [3, 9, 10]. La cinétique de biodégradation du pétrole brut en milieu marin est limitée par de nombreux facteurs tels que la composition et la concentration du pétrole brut, la température, l'oxygène, la concentration des nutriments, la salinité, le pH et la présence et la densité des microorganismes [9]. Les hydrocarbures pétroliers ont une biodisponibilité limitée car ils sont pour la plupart insolubles dans l'eau [11]. L'application de tensioactifs synthétiques ou biologiques peut favoriser cette disponibilité, en réduisant les tensions interfaciales entre les deux phases immiscibles, ce qui augmente la surface spécifique des marées noires et donc améliore la solubilité apparente des hydrocarbures.

L'utilisation des bio-tensions actifs (communément appelés biosurfactants) est plus avantageuse par rapport à leurs homologues synthétiques, en raison de leur faible toxicité, leur biodégradabilité et leur efficacité à des températures, pH (acides/bases) et salinités extrêmes [12]. L'inconvénient majeur d'une production à grande échelle des biosurfactants se manifeste par les faibles rendements et les coûts de production assez élevés [13]. Pour cela, l'utilisation de substrats renouvelables et de déchets permet une diminution de 10 à 30% du coût total de la production [14]. Ainsi, le présent travail de recherche s'articule autour de cette problématique de « bioremédiation des environnements marins contaminés par les hydrocarbures pétroliers ». Il vise comme objectifs :

- L'isolement de microorganismes hydrocarbonoclastes à partir des sites marins contaminés par les hydrocarbures ;
- L'étude de leurs potentialités biodégradatives *vis-à-vis* différents types d'hydrocarbures (pétrole, alcanes, hydrocarbures aromatiques polycycliques) ;

- La recherche de biosurfactants de ces microorganismes, leur production et leur mise en application comme dispersants des nappes de pétrole ;
- L'étude écotoxicologique de cet agent dispersant ainsi que le pétrole, en utilisant un organisme marin modèle ;
- Le traitement de la pollution pétrolière de l'eau de mer en exploitant le pouvoir remédiant de ces hydrocarbonoclastes et de leurs biosurfactants.

Le présent document se subdivise en trois chapitres. Le premier chapitre comporte une synthèse bibliographique portant sur le statut de la pollution pétrolière en milieu marin, les mécanismes de biodégradation des hydrocarbures, la production et les propriétés et le rôle des biosurfactants, les stratégies de bioremédiation des hydrocarbures dans le milieu marin et quelques notions en écotoxicologie et l'utilisation de l'*Artemia* comme animal modèle exprimant la réponse des organismes marins à l'effet des toxiques. Le deuxième chapitre expose la démarche expérimentale qui a mené à l'isolement et à l'étude des potentialités biodégradatives des bactéries hydrocarbonoclastes, aux protocoles suivis pour produire et étudier les propriétés des biosurfactants, à la description des bioessais de toxicité sur l'*Artemia* ainsi que les traitements de bioremédiation qui sont envisagés. Le troisième chapitre présente et discute les résultats de la biodégradation des hydrocarbures, de la production et la caractérisation des biosurfactants et de la bioremédiation de l'eau de mer contaminé par le pétrole et de la toxicité des agents de traitement utilisés. Ce travail se termine par une conclusion générale, où les principaux résultats obtenus sont exposés et les éventuelles perspectives pour les futurs travaux sont indiquées ; suivie par une bibliographie complète de cette rédaction exposée en détails. Enfin, trois annexes ont été attachées au document. Le premier décrit les étapes d'éclosion des cysts d'*Artemia*. Le deuxième détaille le protocole de fractionnement du pétrole et le troisième énumère les propriétés physicochimiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques étudiées.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Contamination du milieu marin par les hydrocarbures pétroliers

1.1.1. Composition du pétrole

Le pétrole se produit par la décomposition thermique précédée par une activité microbologique intense sur la matière organique (plancton, végétaux, animaux, etc.) enfouie profondément sur des dizaines de millions d'années. Le pétrole brut (pétrole brut naturel), une fois extrait du sous-sol, est transporté vers les raffineries où il subit une distillation pour produire divers produits [15, 16].

Le pétrole, en latin "petroleum" qui signifie «huile de roche», se présente sous la forme d'un liquide sombre, collant et visqueux [17]. C'est un mélange de plusieurs hydrocarbures pétroliers, constitués de proportions variables de carbone et d'hydrogène. Cependant, ils contiennent également de l'azote, du soufre et de l'oxygène en quantité variables [18, 19]. Le pétrole brut peut être classé comme pétrole léger, moyen ou lourd en fonction des proportions relatives des constituants de haut poids moléculaire présents dans sa composition [16]. La composition du pétrole brut peut varier selon l'emplacement et l'âge d'un champ pétrolifère ainsi que la profondeur du puits pétrolier. Environ 85% des composés de tous les types du pétrole brut peuvent être classés comme: (a) base d'asphalte, (b) base de paraffine et/ou (c) base mixte [16, 20].

Le pétrole brut est classé en quatre grandes fractions : **(a)** saturées (aliphatiques), **(b)** aromatiques, **(c)** résines et **(d)** asphaltènes (figure 1.1).

Les composés saturés sont définis comme des hydrocarbures sans doubles liaisons et représentent le pourcentage le plus élevé de constituants du pétrole brut. Ils sont classés en fonction de leurs structures chimiques en alcanes (paraffines) et cycloalcanes [21]. Les hydrocarbures aromatiques ont un ou plusieurs noyaux aromatiques habituellement substitués par différents groupes alkyles [22]. Par rapport aux fractions saturées et aromatiques, les résines et les asphaltènes

contiennent des composés polaires non hydrocarbonés. Les résines et les asphaltènes ont des structures chimiques très complexes et pour la plupart sont inconnues, avec l'addition de nombreux atomes d'azote, de soufre et d'oxygène [18, 23].

Chaque composé a un comportement chimique unique qui affecte sa biodégradabilité [24]. Dans l'arrangement structural des quatre classes principales du pétrole brut, les composés saturés constituent la couche qui se trouve en haut du pétrole. Alors que les asphaltènes sont des composés de masse moléculaire élevée, constituent la partie la plus sédimentée [16].

1.1.1.1. Hydrocarbures aliphatiques

Les hydrocarbures aliphatiques sont constitués de composés saturés, à chaîne ouverte linéaire ou ramifiée, tels que les n-alcanes (paraffines), les iso-alcanes, les cycloalcanes (naphtènes), les terpènes et les stéranes [25]. Selon leur poids moléculaire, les n-alcanes sont divisés en quatre groupes : **(a)** alcanes gazeux, **(b)** hydrocarbures aliphatiques de faible masse moléculaire (C8-C16), **(c)** hydrocarbures aliphatiques de poids moléculaire moyen (C17-C28), et **(d)** les hydrocarbures aliphatiques à haut poids moléculaire (> C28) [21].

1.1.1.2. Hydrocarbures aromatiques

Les composés aromatiques sont des molécules hydrocarbonées cycliques. Ils sont principalement divisés en : **(a)** hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM) à savoir : BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes) [24, 26] et **(b)** hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [18]. Les HAP contiennent plus d'un cycle benzénique. Ceux qui sont constitués de deux ou trois noyaux benzéniques, comme le naphtalène (à deux cycles), le phénanthrène et l'anthracène (à trois cycles), sont considérés comme de faibles poids moléculaire ou HAP légers [27]. Les HAP composés de quatre noyaux et plus, tels que le pyrène et le chrysène (à quatre noyaux), le benzo [k] fluoranthène et le benzo [a] pyrène (à cinq noyaux) sont appelés HAP lourds ou de poids moléculaire élevé [24, 26, 28].

1.1.1.3. Résines

Les résines contiennent des structures aromatiques (plus de 6 cycles) à longue chaîne alkyle, tels que pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxydes et

amides. Ces composés sont associés à plusieurs hétéroatomes comme : azote, soufre, oxygène, et métaux traces (Ni, V, Fe). Les résines sont des solides amorphes, parfaitement dissoutes dans les huiles, le n-heptane et le n-pentane [15, 16, 29]. Elles sont structurellement similaires aux molécules tensio-actives du pétrole brut et agissent comme des agents peptisants [16].

1.1.1.4. Asphaltènes

Les asphaltènes comme les résines, contiennent de nombreux groupes fonctionnels polaires (phénols, acides gras, esters, cétones, porphyrines) [16, 30]. Ce sont des solides bruns foncés, gros et complexes qui sont dispersées de manière colloïdale dans les acides gras saturés et les composés aromatiques [15, 29]. Ils sont solubles dans les hydrocarbures aromatiques légers tels que le benzène et le toluène [31]. Les asphaltènes sont des composés visqueux de haut poids moléculaire, composés de groupements polycycliques, substitués de manière variable par des groupements alkyles, ce qui contribue à leur résistance à la biodégradation [18]. Le caractère peptisant des résines fait maintenir les asphaltènes en suspension, favorisant ainsi la stabilité du pétrole brut [18, 31].

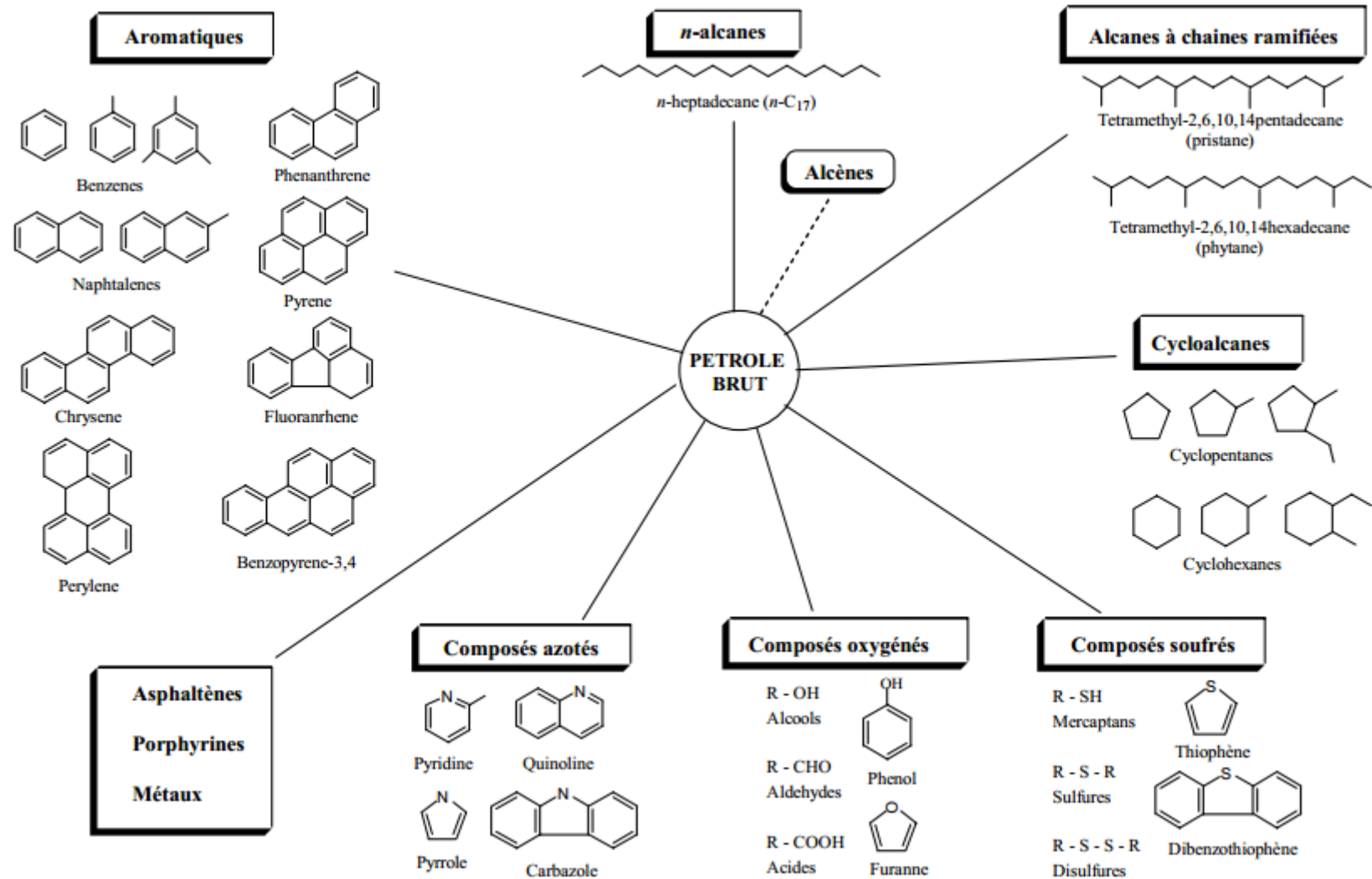


Figure 1.1 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut [32].

1.1.2. Propriétés toxicologiques des hydrocarbures pétroliers

Les rejets d'hydrocarbures par déversements et fuites des réservoirs souterrains, vapeurs, puits de pétrole et sites de raffineries de pétrole abandonnés causent la contamination des sols, des eaux souterraines et des océans. De nombreux constituants du pétrole brut sont récalcitrants et hautement toxiques en raison de la présence de composés hémotoxiques, cancérogènes et tératogènes tels que les BTEX et les HAP [16]. En général, les composés aromatiques sont plus toxiques que les composés aliphatiques, et les molécules de petites tailles sont plus toxiques que celles de grosses tailles dans la même famille [33]. Les effets aigus ou chroniques ainsi que les effets directs/indirects des hydrocarbures pétroliers sont largement rapportés dans la littérature [16]. L'étouffement, l'anoxie, la croissance ralentie, les perturbations des réactions métaboliques et le déséquilibre hormonal dans les formes de vie sont notés comme des effets directs/indirects [16]. La mortalité par nécrose aiguë, l'hypothermie, l'étouffement, la noyade et l'ingestion des composés toxiques pendant le lissage (des oiseaux par exemple) sont l'un des impacts à court terme [16, 34]. Les impacts à long terme comprennent les anomalies du développement des animaux marins, telles que la réduction des mâchoires, le manque de pigmentation et le crâne non fusionné [16]. Les composés organiques volatils (COV) du pétrole brut sont extrêmement nocifs pour l'être humain [24, 35]. Les constituants du pétrole brut (plus spécifiquement les HAP) ont le potentiel d'induire des tumeurs malignes qui affectent principalement la peau et les autres tissus épithéliaux, car ils ont une grande affinité pour le centre nucléophile des macromolécules comme l'ARN, la protéine et l'ADN [16].

1.1.3. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin

Quand le pétrole est déversé dans la mer, il s'étale à la surface de l'eau, où il se soumet à de nombreuses modifications, ce qui change sa composition avec le temps. Ce processus est appelé altération ou vieillissement, et est principalement dû à [33, 36]:

- l'évaporation des fractions de faible poids moléculaire,
- la dissolution des composés hydrosolubles,
- l'émulsification, la dispersion,
- la sédimentation,
- l'oxydation photochimique,

- la biodégradation.

En règle générale, chaque processus peut être classé dans l'une des deux catégories chronologiques en fonction du moment où son effet est le plus significatif :

- Stade précoce d'un déversement : Etalement, évaporation, dispersion, émulsification et dissolution.
- Stade ultérieur d'un déversement : oxydation, sédimentation et biodégradation. Ce sont les processus à plus long terme qui détermineront le sort ultime du pétrole déversé.

La figure 1.2 représente le devenir d'un déversement typique du pétrole brut, montrant des changements dans l'importance relative du processus d'altération avec le temps (de plusieurs heures à plusieurs années). La largeur de la bande indique l'importance du processus [36].

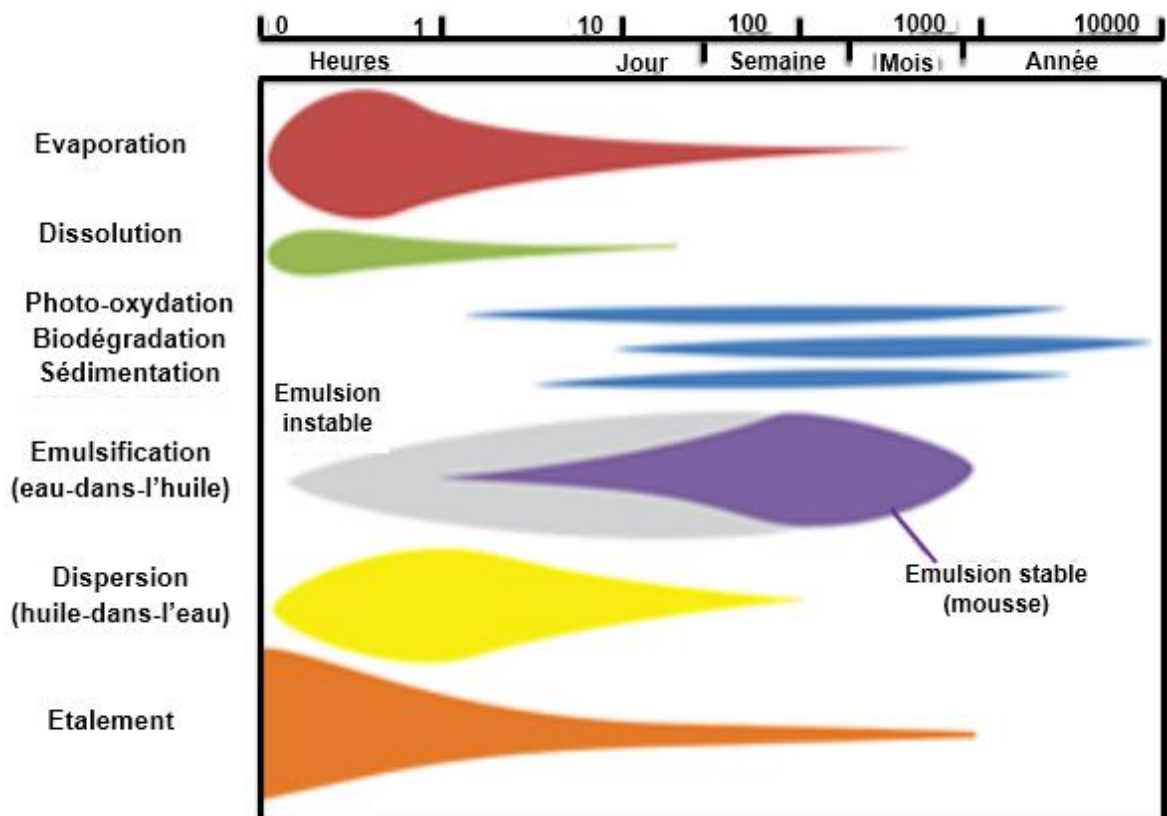


Figure 1.2 : Devenir du pétrole dans le milieu marin [36].

1.1.3.1. Etalement

L'étalement est le premier phénomène qui se produit suite à un déversement du pétrole en mer. La vitesse de l'étalement dépend en grande partie de la viscosité de l'huile (pétrole), qui à son tour dépend à la fois de la composition du pétrole et de la température ambiante. Les pétroles fluides à faible viscosité s'étalent plus rapidement que ceux à viscosité élevée. À basse température, un pétrole aura tendance à être plus visqueux qu'à température plus élevée, car la viscosité est inversement proportionnelle à la température.

L'étalement est rarement uniforme et de ce fait, l'épaisseur du pétrole flottant est caractéristique. Au bout de quelques heures, la nappe commence généralement à se disperser en raison de l'action des vents, des vagues et de la turbulence de l'eau, et forme souvent des bandes étroites ou des andains parallèles à la direction du vent [36].

1.1.3.2. Evaporation

Le taux et la vitesse d'évaporation dépendent de la volatilité du pétrole. Dans les climats tempérés, les composés pétroliers ayant un point d'ébullition inférieur à 200 °C, tendent à s'évaporer dans les premières 24 heures [36]. Durant les 24 à 48 premières heures qui suivent un déversement, l'évaporation constitue le principal agent de disparition du pétrole. Quelques jours après le déversement, les hydrocarbures les plus légers (< C15), moyens (C15-C20) et lourds (> C25) sont éliminés par cette voie jusqu'à 75, 40 et 10% respectivement, et par la suite ils peuvent conduire à une pollution de l'atmosphère [37]. Le taux d'évaporation peut augmenter si le pétrole continue à s'étaler, en raison de l'augmentation de la surface de la marée noire [36].

1.1.3.3. Dispersion

Les vagues et les turbulences peuvent entraîner la dispersion partielle ou totale d'une nappe de pétrole en gouttelettes de tailles variables. Les petites gouttelettes resteront en suspension dans l'eau de mer tandis que les plus grosses auront tendance à remonter à la surface, où ils peuvent ensuite reconstituer la nappe ou s'étaler pour former une couche très mince.

Les gouttelettes du pétrole dispersées ont une surface spécifique plus grande par rapport au pétrole réparti à la surface. Ceci stimule d'autres processus naturels à se produire tels que la dissolution, la biodégradation et la sédimentation.

La vitesse de dispersion dépend en grande partie de la nature du pétrole et de l'état de la mer. La dispersion se produit rapidement pour un pétrole léger, de faible viscosité et si la mer est très agitée [36].

Généralement, après un déversement excessif, la nappe du pétrole est parfois traitée avec un dispersant. Ce dernier émulsifie le pétrole en réduisant la tension interfaciale entre celui-ci et l'eau de mer. On prétend que le traitement par un dispersant améliore la biodégradation du pétrole. Cependant, les résultats de ce traitement sont controversés [38].

1.1.3.4. Emulsification

L'émulsification modifie considérablement les propriétés et les caractères du pétrole déversé. Lorsque les conditions d'agitation sont suffisantes et en présence des composés ayant des propriétés tensioactives (comme les asphaltènes), deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée «mousse au chocolat », et huile-dans-eau [39]. Les émulsions eau-dans-huile contiennent entre 60 et 80% d'eau sous forme de gouttelettes de 1 à 20 μm , provoquant une augmentation du volume du pétrole de départ de 3 à 4 fois [36, 40]. Leur densité est généralement supérieure à celle du pétrole d'origine (1,03 comparée à 0,8–0,95). Après évaporation des fractions légères, des résidus lourds du pétrole peuvent s'agréger afin de former des boules de goudron dont le diamètre varie de la taille microscopique à plusieurs millimètres [33].

1.1.3.5. Dissolution

Les composés pétroliers hydrosolubles peuvent dissoudre rapidement dans la colonne d'eau en cas d'un pétrole dispersé [36]. Les composés les plus solubles dans l'eau de mer sont les hydrocarbures aromatiques légers tels que le benzène et le toluène. Cependant, ces composés sont également les premiers éliminés par l'évaporation, un processus de 10 à 1000 fois plus rapide que la dissolution. La plupart des pétroles bruts et tous les fuel-lourds contiennent, relativement de faibles proportions de ces composés, ce qui fait que la dissolution est l'un des processus les moins significatifs [36].

1.1.3.6. Oxydation photochimique

Sous l'effet de la lumière solaire, le pétrole déversé en mer est soumis à une modification photochimique. Certains travaux ont suggéré que les composés pétroliers sont sujets à une polymérisation induite par la lumière, tandis que d'autres ont évoqué leur photodégradation [33]. Une augmentation de la fraction polaire et une diminution de la fraction aromatique ont été également observées. Les composés aliphatiques sont photo-chimiquement inertes. Cependant, ils peuvent être dégradés par oxydation photosensibilisée. Les composés pétroliers aromatiques ou polaires et de l'antraquinone présents dans l'eau de mer peuvent provoquer la dégradation des n-alcanes en alcènes terminaux (une double liaison carbone-carbone en position 1) et en composés carbonylés de faible poids moléculaire [41].

Les composés hydrosolubles du pétrole exercent un effet toxique sur les organismes marins. L'irradiation solaire affecte la toxicité d'un pétrole : les nappes de pétrole deviennent moins toxiques en raison de la perte d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, mais la toxicité de la fraction hydrosoluble augmente à mesure que sa concentration augmente [42].

1.1.3.7. Sédimentation

Très peu de pétroles coulent dans l'environnement marin. Lorsqu'un pétrole flottant se rapproche de la côte, une sédimentation peut se produire. En effet, une fois que tous les composés légers se sont évaporés et que la nappe pétrolière a été altérée en mer, la densité de certains pétroles devient proche à celle de l'eau de mer. On assiste parfois à une combinaison entre les pétroles (flottants, submergés ou dispersés) avec des sédiments en suspension. Cela arrive particulièrement dans les eaux peu profondes. Si la contamination est forte, des «tapis de goudron» denses peuvent se former sur le fond marin près du rivage. De plus, si le pétrole est brûlé volontairement (brûlage *in situ*) après avoir été déversé, les résidus qui se forment parfois, peuvent être suffisamment denses pour couler [36].

1.1.3.8. Biodégradation

L'eau de mer contient un large éventail de microorganismes qui utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ils peuvent dégrader partiellement ou complètement les pétroles en composés hydrosolubles ou en

dioxyde de carbone et en eau. La biodégradation est considérée comme l'étape ultime dans l'élimination des hydrocarbures de l'environnement marin. Elle sera traitée en détail dans les paragraphes suivants.

1.1.4. Microorganismes marins hydrocarbonoclastes

Le pétrole, une source riche de carbone et d'énergie, très abondant en environnement marin permet la croissance de nombreux microorganismes. Ces microorganismes s'adaptent avec le temps et exercent des capacités métaboliques spécifiques afin d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie [43].

Plus de 100 genres et 200 espèces de microorganismes dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers ont été recensées (bactéries, champignons, microalgues, etc.). On compte dans cette diversité microbienne : 79 genres de bactéries, 9 genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons et 19 genres de microalgues [44].

En milieu marin, les bactéries constituent le groupe prédominant de la communauté microbienne qui dégrade les hydrocarbures [45, 46]. Il est plus intéressant de noter que, au contraire des dégradeurs d'hydrocarbures terrestres, généralement métaboliquement versatiles et utilisent une large batterie de substrats, leurs homologues marins sont pour la plupart, hautement spécialisés, utilisateurs obligatoires d'hydrocarbures, dites "bactéries hydrocarbonoclastes obligatoires" (Obligate Hydrocarbonoclastic Bacteria, OHCBs) [47]. La plupart des bactéries hydrocarbonoclastes appartiennent aux γ -protéobactéries. On peut citer quelques genres majoritaires parmi les 79 récemment répertoriés : *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus*, *Oleispira*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* et *Vibrio* [47, 48] (figure 1.3).

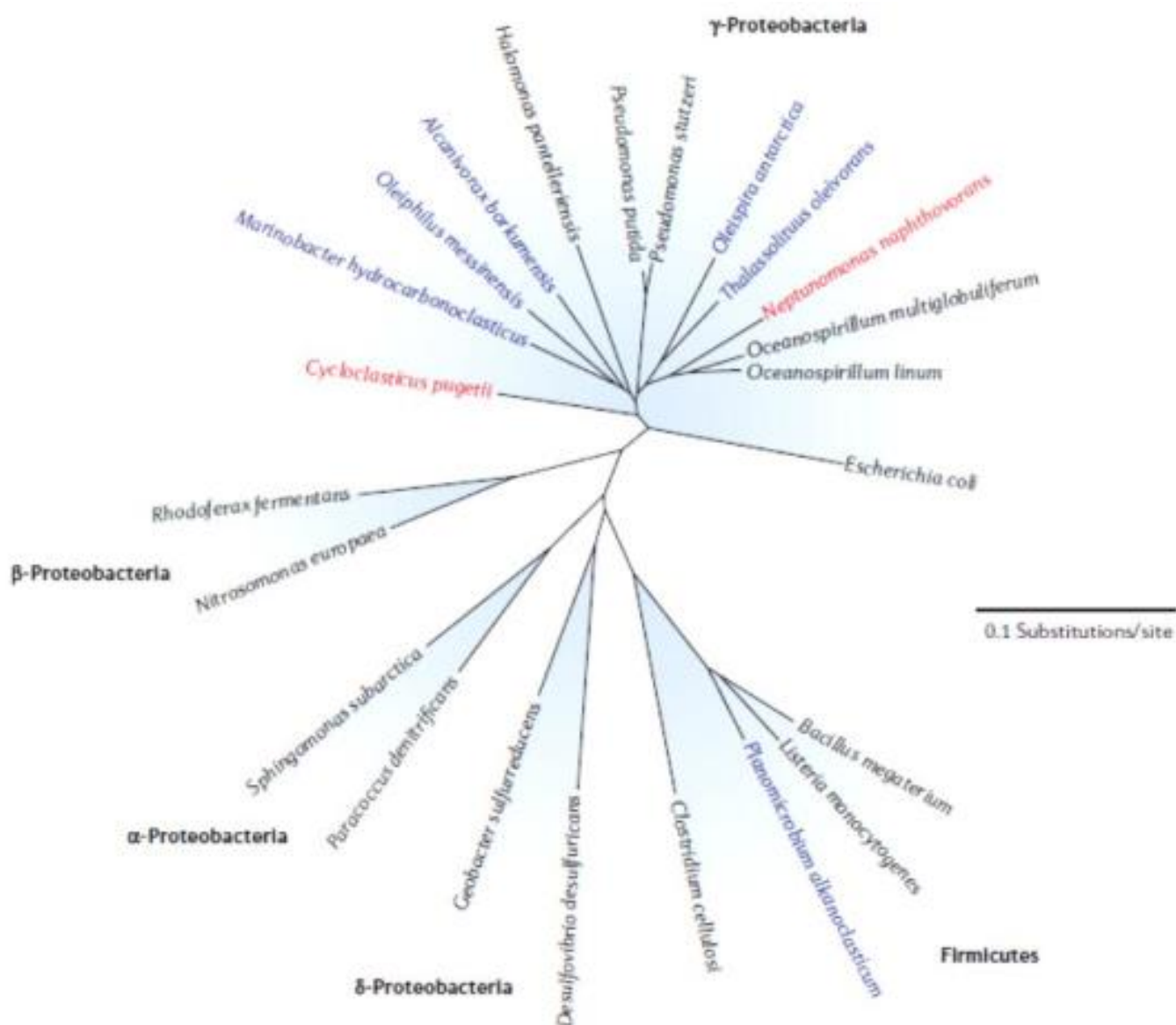


Figure 1.3 : Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydrocarbonoclastes marines. En bleu, les microorganismes qui dégradent les hydrocarbures saturés, en rouge, ceux qui dégradent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et en noir les bactéries non-dégradantes [49].

Ces bactéries indigènes sont présentes à de faibles niveaux ou indétectables avant la pollution, mais elles deviennent les espèces les plus dominantes après un déversement pétrolier [16, 20, 47]. Bien que le pétrole soit composé de centaines voire de milliers de molécules différentes, chaque genre bactérien n'est capable, toutefois, de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures [49]. Par exemple, les espèces appartenant au genre d'*Alcanivorax* se développent sur les *n*-alcane et les alcanes ramifiés, alors qu'ils ne peuvent pas croître sur les sucres ou acides aminés comme sources de carbone. Les espèces de *Cycloclasticus* croissent sur les hydrocarbures aromatiques, le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène, alors que les espèces du genre *Oleispira* se développent sur les hydrocarbures aliphatiques, les alcoles et les alcanates [23, 47, 50]. La biodégradation complète d'un pétrole n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures [51]. Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans un environnement pollué [49].

1.2. Métabolisme de la biodégradation aérobie des hydrocarbures pétroliers

1.2.1. Concept général

La biodégradation est le processus par lequel les microorganismes (bactéries, champignons, microalgues) modifient la structure chimique d'un composé en produits métaboliques naturels, entraînant sa conversion en eau, en dioxyde de carbone et/ou méthane et en biomasse cellulaire [52].

La biodégradation d'un polluant implique des étapes séquentielles utilisant différentes enzymes [21]. Les hydrocarbures peuvent être sélectivement métabolisés par une souche individuelle de microorganisme ou un consortium de souches microbiennes appartenant à des genres identiques ou différents [19, 53]. Cependant, il a été démontré que les consortiums sont plus efficaces que les cultures individuelles pour métaboliser/dégrader des groupements complets d'hydrocarbures [16]. Il a été rapporté que les *n*-alcane sont dégradés préférentiellement par rapport aux HAP par les microorganismes [54, 55]. Cela

pourrait être dû à la disponibilité de composés d'hydrocarbures pétroliers (source unique de carbone et d'énergie) soumis à la décomposition bactérienne, à l'adaptation des dégradeurs d'hydrocarbures aux environnements pollués et à la présence d'enzymes qui contribuent aux diverses voies de biodégradation [53, 56, 57]. Dans la majorité des cas, les enzymes de dégradation sont codées sur des plasmides. Une exception est faite en ce qui concerne les espèces d'*Acinetobacter* dont les systèmes de dégradation des hydrocarbures sont situés sur le chromosome [58, 59]. Divers plasmides sont impliqués dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers tels que Q15, OCT, TOL, NAH7, pND140 et pND160 avec présence des gènes *alkA*, *alkM*, *alkB*, *theA*, *LadA*, *assA1* et *assA2* et *nahA-M* [16].

Les composés simples du pétrole brut peuvent être dégradés par une grande variété de bactéries. Cependant, très peu d'espèces ont la capacité de dégrader des composés complexes (HAP, résines et asphaltènes). La dégradation des hydrocarbures pétroliers peut être assurée par un système enzymatique spécifique [30, 54]. L'attaque initiale est généralement réalisée par divers mécanismes : **(a)** adhésion des cellules microbiennes aux substrats et **(b)** production de biosurfactants/bioémulsifiants [46, 60, 61]. Le pétrole brut est un mélange d'hydrocarbures simples et complexes qui sont dégradés par plusieurs microorganismes indigènes, chacun capable de décomposer un groupe spécifique de molécules [16].

1.2.2. Voies métaboliques de dégradation

Les microorganismes catabolisent les hydrocarbures pétroliers pour obtenir de l'énergie et produire de la biomasse cellulaire [45]. La figure 1.4 représente un aperçu schématique des voies d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes hydrocarbonoclastes. Il y a trois façons possibles d'utiliser les hydrocarbures pétroliers : **(a)** phototrophe anoxygène ; **(b)** chimiotrophe, aérobie et **(c)** chimiotrophe anaérobie (figure 1.4).

La dégradation des hydrocarbures pétroliers par des espèces bactériennes a été largement étudiée et différentes voies métaboliques ont été élucidées [21, 27, 45, 62]. Le catabolisme des hydrocarbures a longtemps été considéré comme un processus strictement aérobie, bien que l'élimination des hydrocarbures pétroliers en anaérobiose soit possible. Cependant, le taux de dégradation est beaucoup plus

faible, puisque la majorité des microorganismes nécessitent de l'oxygène moléculaire pour entamer l'attaque initiale des substrats hydrocarbonés [43, 58]. Diverses réactions à savoir : l'oxydation, la réduction, l'hydroxylation et la déshydrogénation sont courantes pour les voies aérobies et anaérobies de la biodégradation des hydrocarbures [21, 27]. La biodégradation peut être caractérisée par une augmentation de l'abondance relative des fractions polaires ainsi que par la perte d'hydrocarbures saturés et aromatiques [16].

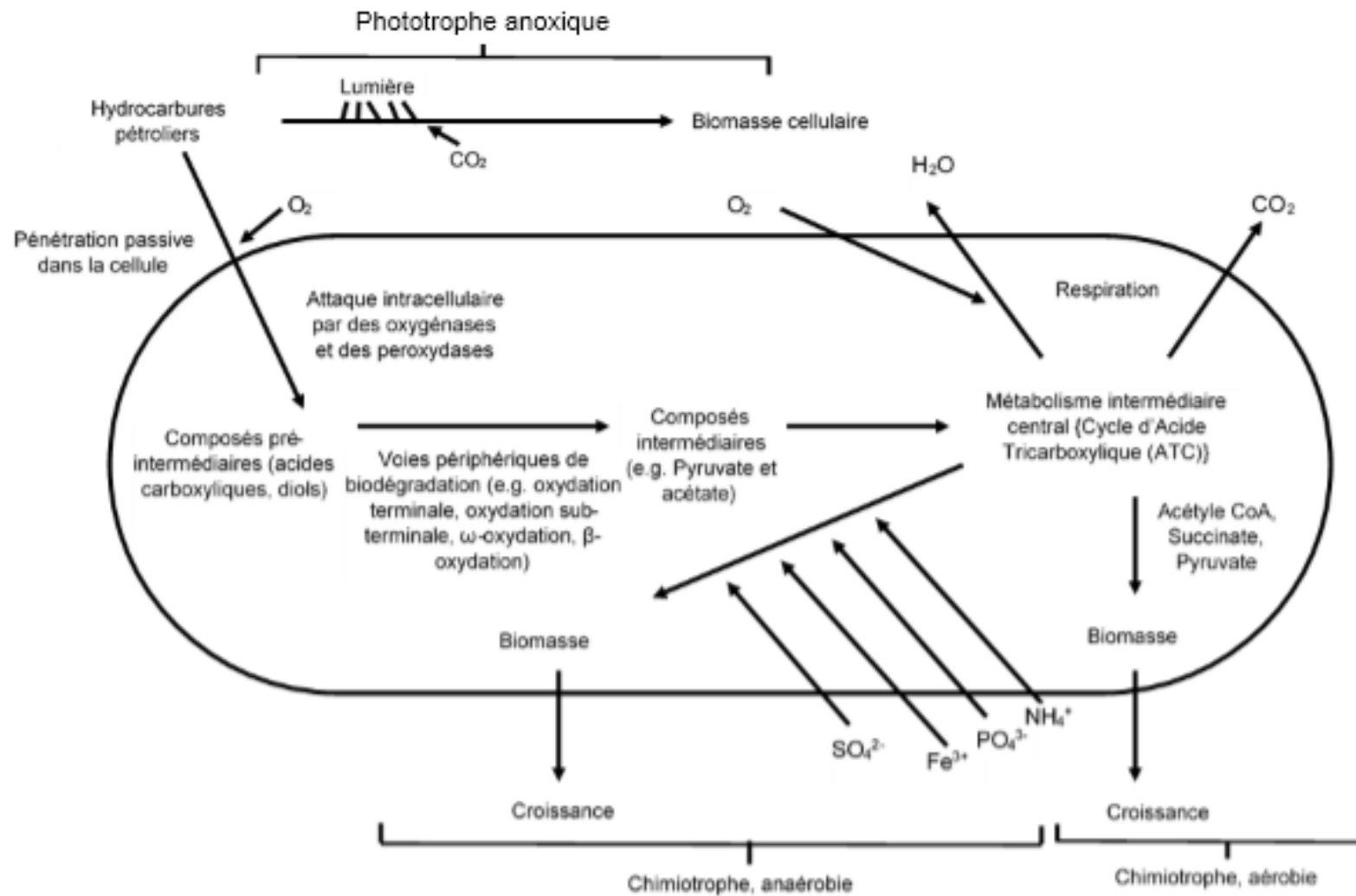


Figure 1.4 : Aperçu schématique des voies potentielles d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes [16].

1.2.2.1. Biodégradation des n-alcanes

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être dégradés par diverses voies telles que l'oxydation mono-terminale, l'oxydation subterminale, la ω -oxydation et la β -oxydation [21]. Les voies périphériques possibles pour la biodégradation aérobie des n-alcanes sont illustrées par la figure 1.5. Les voies communes de dégradation des n-alcanes incluent une attaque initiale par oxydation du groupe méthyle, entraînant la formation d'un alcool, qui est ensuite déshydrogéné en aldéhyde, puis en acide carboxylique correspondant, qui peut ensuite être métabolisé par la voie de la β -oxydation des acides gras [21, 30].

Les alcanes sont généralement dégradés par oxydation mono-terminale [59]. Dans cette voie, l'oxydation est débutée au niveau du méthyle terminal, pour former un alcool primaire par introduction d'oxygène moléculaire [16, 21]. L'alcool primaire formé est ensuite oxydé en aldéhyde puis en acide gras. Cette étape est suivie de la β -oxydation qui entraîne la formation et l'élimination de l'acétyl coenzyme-A par laquelle l'acide gras est réduit en composés à deux atomes de carbone [16, 30].

Dans la voie di-terminale, l'oxydation des deux extrémités de la molécule d'alcane se fait par ω -hydroxylation (la position ω représente le groupe méthyle terminal) des acides gras, puis transformé en acide dicarboxylique pour procéder ensuite par la β -oxydation [21]. Lors de l'oxydation sub-terminale, les alcanes sont oxydés en alcool secondaire, puis en cétone et ester correspondants. L'ester est ensuite hydrolysé en alcool puis en acide gras [63].

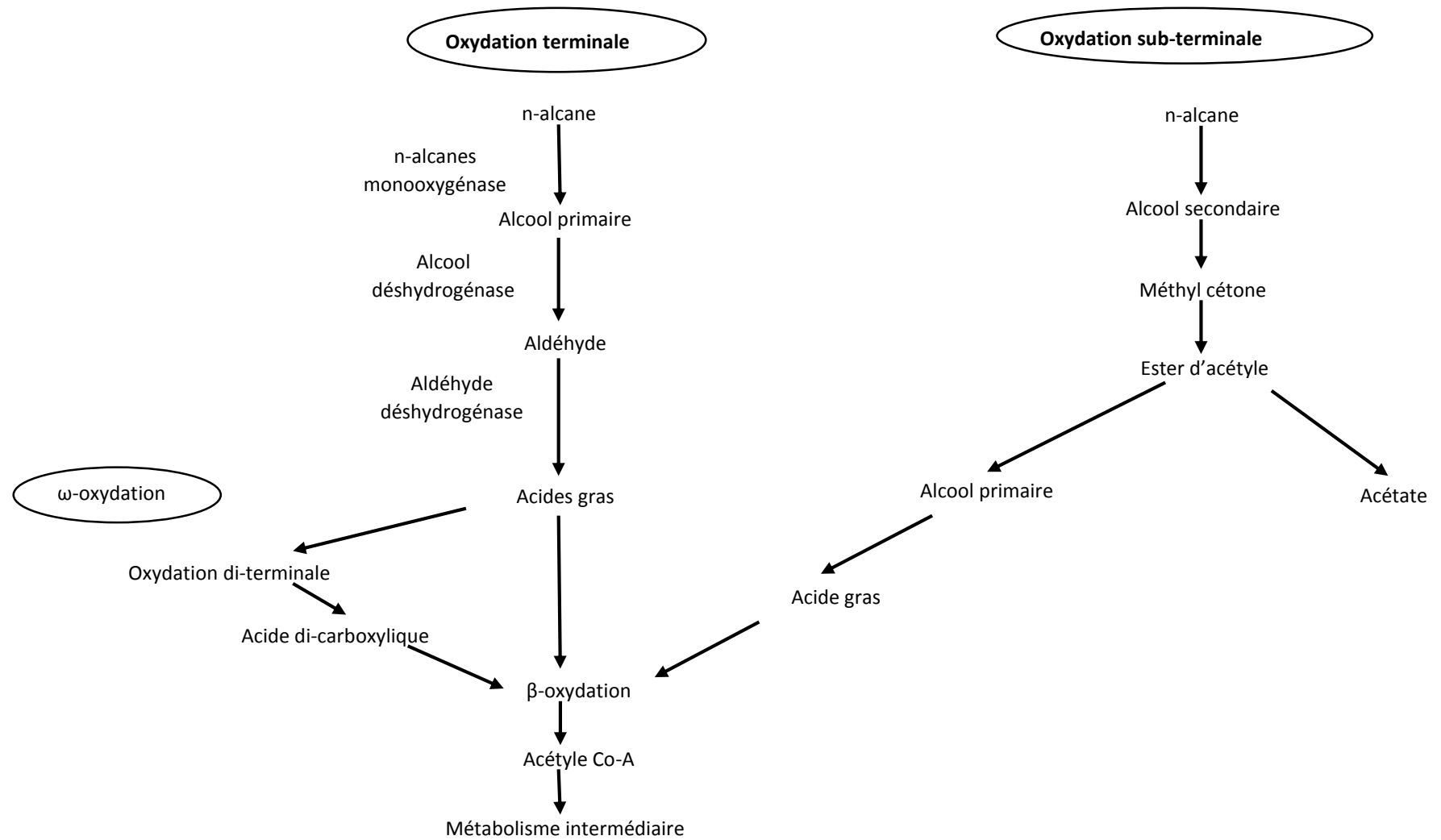


Figure 1.5 : Les trois voies périphériques possibles de dégradation aérobie des *n*-alcane par les microorganismes [16].

1.2.2.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAP sont plus difficiles à dégrader par rapport aux alcanes. Ils présentent des effets dévastateurs sur l'environnement et les formes de vie, et sont classés comme polluants prioritaires dans les processus de bioremédiation [59].

Les voies biochimiques communes pour la dégradation bactérienne des HAP tels que le naphthalène [64], le phénanthrène [65], l'anthracène et le pyrène [66, 67] sont proposées.

La dégradation aérobie des HAP commence généralement par l'action d'une dioxygénase (addition de deux atomes d'oxygène) qui «attaque» un des noyaux aromatiques et incorpore deux atomes d'oxygène pour former un *cis*-dihydrodiol. Celui-ci est ensuite déshydraté en catéchol, qui est un intermédiaire central de la biodégradation aérobie des composés aromatiques et à partir duquel peut avoir lieu l'ouverture du noyau aromatique. Le clivage (la rupture) est dit *ortho* ou intradiol lorsque la coupure se fait au niveau de la liaison entre deux atomes de carbone adjacents portant le groupement hydroxyle, grâce à une catéchol 1,2-dioxygénase (figure 1.6). Le clivage est dit *meta* ou extradiol lorsque la coupure se fait entre deux atomes de carbone dont un seul porte un groupement hydroxyle (le deuxième est non substitué) et cette réaction est catalysée par une catéchol 2,3-dioxygénase. La dégradation ne s'arrête pas à ce stade. Les produits respectifs 3-oxoadipate (voie *ortho*) et 4-hydroxy-2-oxapentanoate (voie *meta*) sont transformés en produits du métabolisme intermédiaire : succinate et acétate (voie *ortho*) ou pyruvate et acétaldéhyde (voie *meta*). Le carbone benzénique est alors introduit dans le cycle de Krebs [68, 69].

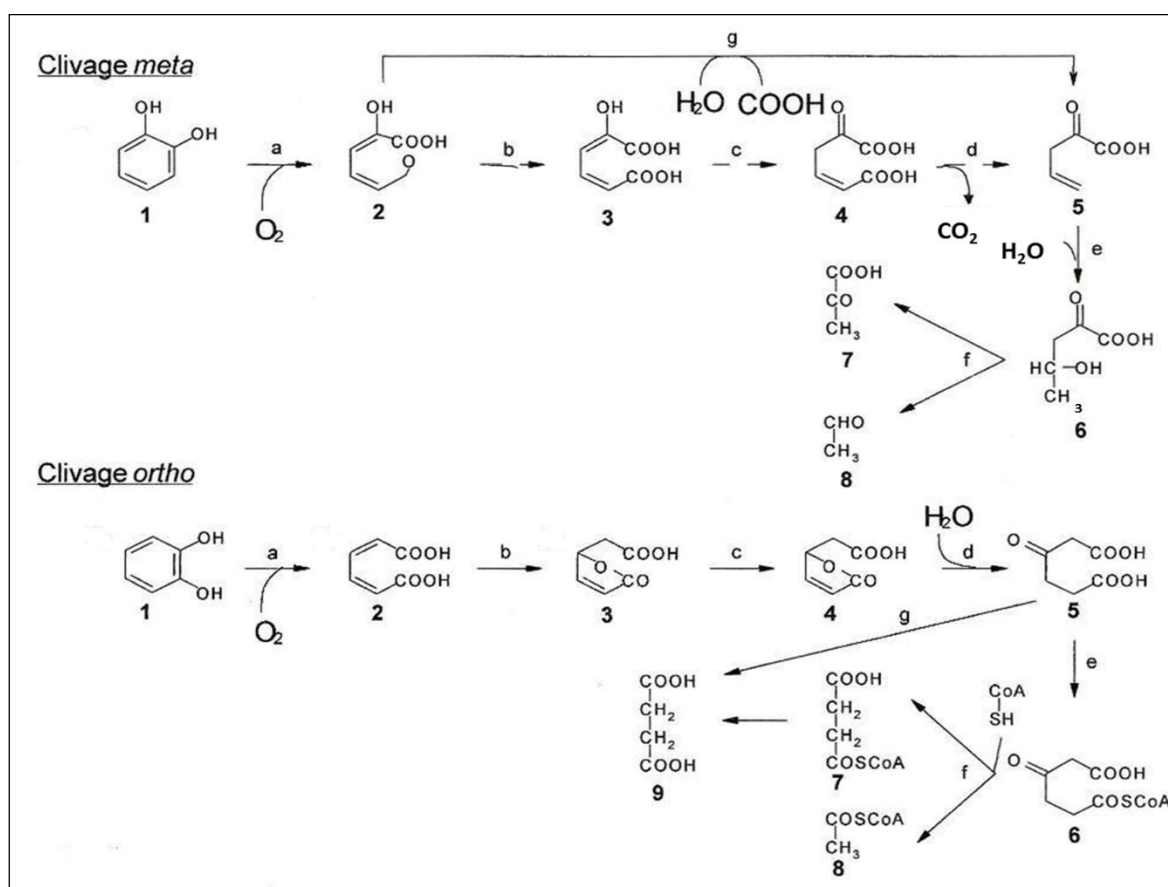


Figure 2 : Biodégradation aérobie du catéchol. Clivage meta : *Intermédiaires*: 2: 2-hydroxymuconate semi aldéhyde; 3: 4-oxalocronate; 4: 2-oxo-hex-3-ène-1,6-dionate; 5: 2-oxopent-4-énoate; 6: 4-hydroxy-2-oxovalérate; 7: pyruvate; 8: acétaldéhyde; *Enzymes*: (a) Catéchol 2,3-dioxygénase; (b) 2-hydroxymuconate semialdéhyde déshydrogénase; (c) 4-oxalocronate isomérise; (d) 4-oxalocronate décarboxylase; (e) 2-oxopent-4-énoate hydratase; (f) 4-hydroxy-2-oxovalérate aldolase; (g) 2-hydroxymuconate semialdéhyde hydrolase. Clivage ortho : *Intermédiaires*: 2: 3-carboxymuconate; 3: 3-carboxymuconolactone; 4: 3-oxoadipate énon lactone; 5: 3-oxoadipate; 6: 3-oxodipyl-CoA; 7: succinyl-CoA; 8: acétyl-CoA; 9: succinate; *Enzymes*: (a) Catéchol 1,2-dioxygénase; (b) cycloisomérase; (c) muconolactone isomérise; (d) 3-oxoadipate énon lactone hydrolase (e) 3-oxoadipate: succinyl-CoA transférase; (f) 3-oxodipyl-CoA-thiolase; (g) 3-oxoadipate: succinyl-CoA transférase [70].

1.2.2.3. Biodégradation des alcanes cycliques et des alcènes

Plusieurs types d'hydrocarbures cycliques tels que le cyclopentane, le méthyl-cyclopentane et le cyclohexane sont largement présents dans les pétroles bruts et certains produits pétroliers [21].

Les alcanes cycliques sont convertis en alcools cycliques puis déshydrogénés en cétones par un système oxydase. Le cétone formé est transformé en lactone par un système mono-oxygénase, qui est finalement ouvert par une hydrolase de lactone [21]. Deux systèmes d'oxygénase ne se trouvent presque jamais dans la même bactérie, ce qui rend difficile l'isolement des cultures pures capables de dégrader les cycloalcanes [21, 71]. Les alcènes peuvent être attaqués par : **(a)** oxygénase terminale, **(b)** oxygénase subterminale, **(c)** oxydation à travers une double liaison à l'époxyde correspondant et **(d)** oxydation à travers une double liaison au diol correspondant [72].

1.2.3. Gènes impliqués dans la biodégradation

L'attaque intracellulaire initiale des polluants organiques est un processus oxydatif. Les oxygénases et les peroxydases catalysent l'activation ainsi que l'incorporation d'oxygène. Les voies de dégradation périphériques convertissent étape par étape, les polluants organiques en intermédiaires du métabolisme intermédiaire central, c'est-à-dire le cycle de l'acide tricarboxylique [21]. La synthèse de la biomasse cellulaire se produit à partir des métabolites précurseurs centraux tels que le succinate, l'acétyl-CoA et le pyruvate (figure 1.4). La voie de la gluconéogenèse donne lieu à la synthèse des sucres (glucose) nécessaires à la biosynthèse des molécules et à la croissance [30]. Diverses voies de dégradation et des gènes cataboliques pour la biodégradation de chaque groupe d'hydrocarbures ont été rapportés dans la littérature [54, 62]. Selon la longueur de la chaîne et le type de l'hydrocarbure pétrolier, différentes enzymes sont nécessaires pour introduire de l'oxygène dans le substrat afin de commencer la biodégradation. Des détails sur les enzymes impliquées dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers sont présentés dans le tableau 1.1. Le gène *alkB* pour l'alcane monooxygénase, le gène *xylE* pour le catéchol dioxygénase et le gène *nahAc* pour le naphthalène dioxygénase sont des gènes majeurs impliqués dans la dégradation microbienne des polluants hydrocarbonés [16]. Ainsi, la capacité de

diverses espèces de levures à utiliser des n-alcanes et d'autres hydrocarbures aliphatiques en tant que source unique de carbone et d'énergie est due à l'existence de multiples formes microsomaux du cytochrome P450 [30].

La diversité des systèmes alcanes-oxygénases, chez les procaryotes et les eucaryotes participe activement à la dégradation des alcanes dans des conditions aérobies. Les enzymes du cytochrome P450, les alcanes hydroxylases membranaires intégrales (alkB), les monooxygénases méthaniques hydrosolubles et les monooxygénases de méthane contenant du cuivre ont été discutées par VAN BEILEN ET FUNHOFF [73].

Tableau 1.1 : Enzymes impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

| Enzyme | Composé hydrocarboné | Nom de microorganisme |
|--|--|--|
| Monooxygénases de méthane solubles et particulières | Alcanes C1-C8, alcanes (halogènes) C1-C5, alcènes, cycloalcanes. | <i>Methylocystis, Methylomonas, Methylocella, Methylobacter, Methylococcus, Geobacillus hermodenitrificans, Methylomirabilis oxyfera</i> |
| Hydroxylases d'alcanes lié à l'AlkB | Alcanes C5-C16, alkyl benzène, cycloalcanes, acides gras | <i>Pseudomonas, Burkholderia, Rhodococcus, Mycobacterium</i> |
| P450 des eucaryotes (CYP52) | Alcanes C10-C16, acides gras | <i>Candida maltose, Candida tropicalis, Yarrowia lipolytica</i> |
| Système oxygénases des bactéries P450 (CY153) | Alcanes C5-C16, cycloalcanes | <i>Acinetobacter, Caulobacter, Mycobacterium</i> |
| Dioxygénases | Alcanes C10-C30 | <i>Acinetobacter sp.</i> |

1.2.4. Facteurs influençant sur la biodégradation des hydrocarbures pétroliers

Les taux de biodégradation en milieux aquatiques sont influencés par de nombreux facteurs comme :

1) Les caractéristiques des polluants à savoir : la disponibilité, le type et la longueur de chaîne des hydrocarbures, la dispersion dans la phase aqueuse et la volatilisation [18]. Les propriétés physicochimiques et la biodisponibilité des

hydrocarbures jouent un rôle très important dans la réussite de la biorémediation [16]. La biodisponibilité peut être définie comme la quantité d'une substance accessible aux microorganismes [74]. Il a été rapporté que le même composé dans différents polluants peut être dégradé à différents degrés par les mêmes microorganismes/consortiums, en raison de la biodisponibilité d'un composé particulier et non de sa structure chimique [19, 75]. Différents agents sont également sécrétés par les microorganismes hydrocarbonoclastes à savoir : les gaz, les biosurfactants, les biopolymères, les solvants et les acides. La synthèse de ces agents améliore davantage la bioremédiation des hydrocarbures pétroliers [45, 74]. Parmi tous ces produits, les biosurfactants sont les molécules les plus étudiées du fait de leur rôle essentiel dans l'amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures [76, 77].

ATLAS [20] a signalé que la dégradation des hydrocarbures pétroliers dépend de sa composition. L'ordre décroissant de la biodégradabilité est comme suit : alcanes linéaires > alcanes ramifiés > composés aromatiques alkylés de faibles poids moléculaire > composés monoaromatiques > alcanes cycliques > polyaromatiques >> asphaltènes [20, 45].

2) Microorganismes, voies métaboliques cellulaires et les divers changements structuraux cellulaires [16]. La capacité de biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, d'une boue huileuse en milieu liquide par un consortium bactérien hétérogène et cinq cultures bactériennes pures dégradeurs du pétrole, a été étudiée et comparée. Le consortium bactérien hétérogène a démontré de meilleurs résultats par rapport aux souches pures, avec une excellente capacité de dégradation. Les fractions aliphatiques et aromatiques ont été réduites respectivement à 90,7% et 51,8%, par le consortium bactérien [78].

3) Les conditions environnementales telles que le pH, la température, la salinité ; la disponibilité de l'oxygène et des facteurs nutritionnels à savoir : sources de carbone et d'azote et d'autres nutriments [18, 19, 53, 56]. Les hydrocarbures pétroliers peuvent être biodégradés dans des conditions extrêmes de températures (inférieures à 0 °C et supérieures à 80 °C) [43]. Toutefois, les taux de biodégradation diminuent significativement avec la diminution de la température.

Les taux de dégradation optimale se situés entre 30–40 °C, 20–30 °C et 15–20 °C respectivement dans les sols, les environnements marins et l'eau douce [79]. AISLABIE ET AL. [80] et OKOH [81] ont signalé que les températures élevées augmentent la solubilité des hydrocarbures, et diminuent ainsi la viscosité et transfèrent les n-alcanes à longue chaîne de la phase solide à la phase aqueuse. QIN ET AL. [82] ont suggéré que la salinité a une influence majeure sur le processus de bioremédiation et de la biodégradation, et qu'elle affecte également la croissance et la diversité microbiennes. BERTRAND ET AL. [83] ont rapporté que les faibles et les fortes salinités réduisent la dégradation des hydrocarbures pétroliers par un consortium microbien marin enrichi sur le pétrole. Cependant, l'effet du sel dépend un peu plus de la nature de l'hydrocarbure dans le milieu (mélange de composés individuels ou issu d'un brut). Les fractions du brut semblent plus affectées par les variations de la salinité par rapport au mélange des composés individuels [83]. THAMER ET AL. [57] ont signalé que la salinité et les températures élevées entravent la croissance microbienne et les produits de synthèse (biosurfactants, etc.). Toutefois, la salinité a une influence négative sur l'activité de certaines enzymes clés impliquées dans le processus de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes terrestres [84].

La plupart des bactéries hétérotrophes préfèrent de croître dans un pH neutre à alcalin. HAMBRICK ET AL. [85] ont trouvé que la minéralisation du naphthalène et de l'octadécane est possible à un pH de 6,5. Ce taux augmente préférentiellement lorsque le pH augmente de 6,5 à 8,0 pour l'octadécane, alors qu'il reste inchangé dans le cas du naphthalène. THAVASI ET AL. [86] ont constaté que la biodégradation maximale du pétrole brut par *Pseudomonas aeruginosa* s'est déroulée à un pH de 8,0.

La concentration d'oxygène a été déterminée comme variable limitant la dégradation des hydrocarbures pétrolier dans l'environnement [87]. Certaines études ont indiqué que la dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes est presque négligeable [88]. De plus, les taux de biodégradation relevés sont très faibles [43]. L'oxydation de substrats par les oxygénases dans le catabolisme des hydrocarbures est considérée comme une étape importante dans le processus de biodégradation [79].

La pression est corrélée négativement avec le taux de biodégradation des hydrocarbures en milieux océaniques [89]. COLWELL ET WALKER [90] ont suggéré que le pétrole qui atteint l'environnement océanique est très lentement dégradé par les populations microbiennes et, par conséquent, certaines fractions récalcitrantes du pétrole pourraient persister parfois pendant une dizaine d'années.

Les microorganismes nécessitent des éléments autres que le carbone pour la croissance. Les concentrations de ces éléments dans les milieux marins ; principalement les nitrates (NO_3^-), les phosphates (PO_4^{3-}) et le fer (Fe) peuvent limiter le taux de biodégradation des hydrocarbures. Il est indispensable de disposer d'une quantité suffisante de ces nutriments limitant lorsque de grandes quantités d'hydrocarbures sont rejetées dans le milieu marin, afin de maîtriser les taux de biodégradation et donc d'éviter la persistance des dommages environnementaux sur le milieu récepteur [43]. LEAHY ET COLWELL [45] ont rapporté que les hydrocarbures pétroliers, riches en carbone et en énergie, ne contiennent pas de concentrations significatives d'autres nutriments (tels que l'azote et le phosphore) nécessaires à la croissance microbienne. Les rapports carbone/azote/phosphore/potassium (C/N/P/K) sont ajustés par l'addition de l'urée, des phosphates, des engrais NPK, des sels d'ammonium et de phosphate [46, 53]. En contrepartie, des concentrations excessives en nutriments peuvent également inhiber l'activité de biodégradation [91]. Plusieurs auteurs ont signalé les effets négatifs des niveaux élevés de NPK sur la biodégradation des hydrocarbures [92, 93].

Il est important de prendre en considération tous ces facteurs avant de choisir une méthode donnée de remédiation.

1.2.5. Mécanismes d'accès aux hydrocarbures pétroliers

La biodégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers exige l'intervention d'un système d'oxygénases membranaire afin d'initier l'étape d'oxydation d'un tel composé. Ceci exige, systématiquement, un contact direct entre le microorganisme et la phase hydrocarbonée. Deux stratégies biologiques pour améliorer ce contact ont été proposées : les mécanismes d'adhésion et l'émulsification de l'hydrocarbure [46, 61].

1.2.5.1. Adhésion bactérienne aux hydrocarbures

Afin de comprendre les propriétés particulières de la surface cellulaire des bactéries qui leurs permettent de se développer sur les hydrocarbures, il est nécessaire de considérer la dynamique de la dégradation du pétrole dans les milieux naturels. À la suite d'un déversement d'hydrocarbures en mer, les hydrocarbures remontent à la surface et entrent en contact avec l'air. Certains d'entre eux de faible poids moléculaire se volatilisent ; le reste est métabolisé relativement d'une manière rapide par des microorganismes qui absorbent les hydrocarbures solubles. Ces bactéries n'adhèrent pas aux pétroles à cause de leur faible hydrophobicité de surface. L'étape suivante de la dégradation implique des microorganismes ayant une forte hydrophobicité cellulaire, qui peuvent adhérer aux hydrocarbures résiduels de haut poids moléculaire. L'adhésion est due aux fimbriae hydrophobes, aux fibrilles, aux lipides, aux protéines de la membrane externe et à certaines molécules de faible surface cellulaire, telles que la gramicidine S et la prodigiosine. Les capsules bactériennes et d'autres exopolysaccharides anioniques semblent inhiber l'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures [46, 61].

1.2.5.2. Emulsification de la phase huileuse

Les bactéries hydrocarbonoclastes produisent souvent des biosurfactants. Ceux-ci peuvent être divisés en molécules de faible poids moléculaire qui réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciales, et en polymères de haut poids moléculaire qui se lient étroitement aux surfaces. Certains biosurfactants améliorent la croissance des bactéries sur des substrats hydrophobes en augmentant leur biodisponibilité, vraisemblablement en augmentant leur surface spécifique, en les désorbant des surfaces (auxquelles ils étaient piégés) et en augmentant leur solubilité apparente à travers un partitionnement dans le corps des micelles [46, 94, 95]. Les bioémulsifiants jouent également un rôle important dans la régulation de l'attachement-détachement des microorganismes aux et des surfaces des gouttelettes hydrocarbonées [46, 61]. Par ailleurs, les biosurfactants exhibent une forte activité biologique, en particulier au niveau de la membrane cellulaire. Ces modifications conduisent à l'amélioration de l'hydrophobicité de surface ou au changement de la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui augmente le taux de la biodégradation [96]. L'ajout de surfactants chimiques, comme c'était le cas

lors de l'éruption de Deepwater Horizon en 2010, peut avoir des effets négatifs. Plus de 700.000 gallons du dispersant Corexit ont été appliqués directement à la tête des puits. Deux années après le déversement, des études ont montré que le Corexit a augmenté la toxicité du pétrole de 52 fois [46].

1.3. Stratégies de bioremédiation des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin

La bioremédiation, est l'utilisation de consortium de microorganismes ou d'enzymes pour dégrader et désintoxiquer les contaminants de l'environnement [97].

Les technologies de bioremédiation répondant aux déversements d'hydrocarbures en milieu marin, peuvent être divisées en deux catégories distinctes :

- Enrichissement en nutriments (Biostimulation).
- Ensemencement avec des microorganismes (Bioaugmentation).

1.3.1. Enrichissement en nutriments (Biostimulation)

Actuellement, de nombreux scientifiques considèrent l'enrichissement en nutriments comme la plus convenable approche dans le cas du déversement d'hydrocarbures dans laquelle la bioremédiation pourrait être appropriée. Cette approche implique l'ajout de nutriments qui limitent le taux de biodégradation à un site de déversement [98]. La raison derrière cette approche est que les microorganismes hydrocarbonoclastes sont généralement abondants dans les environnements marins et bien adaptés pour résister aux stress environnementaux locaux. Cependant, lorsque le pétrole est déversé en grande quantité, la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures est limitée en raison du manque de nutriments. L'ajout d'azote, de phosphore et d'autres nutriments vise à surmonter ces déficits et à permettre la biodégradation du pétrole à une cadence optimale [89].

Généralement, la bioremédiation des environnements marins réussirait en respectant un rapport C/N/P molaire de 100/10/1 [8]. Trois types de nutriments sont utilisés comme biostimulants de remédiation des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin :

- **Les nutriments inorganiques solubles dans l'eau** : ce sont des sels minéraux comme KNO_3 , NaNO_3 , NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgNH_4PO_4 ,

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ et divers fertilisants inorganiques (par exemple, l'engrais N/P 23:2 utilisé lors du déversement de l'Exxon Valdez, 1989). Typiquement, ils sont appliqués sur le terrain en pulvérisant des solutions nutritives aqueuses ou en étalant des granules secs. Cette approche a permis d'améliorer la biodégradation du pétrole dans de nombreux essais *in-situ*, y compris dans des environnements arctiques [8, 99]. Cependant, le problème qui se pose c'est le lavage facile de ces éléments sous l'action des vagues et des marées dans les environnements marins non abrités ou les rivages à forte dynamique, et qui doivent donc faire l'objet d'application répétées [8].

- **Les fertilisants à libération lente** : L'utilisation de ce type d'engrais est l'une des approches les plus utilisées pour prévenir les problèmes de lavage, et pour fournir des sels nutritifs de manière continue dans les zones pollués. Ces fertilisants comportent typiquement des nutriments inorganiques sous forme solide recouverts d'un composé hydrophobe comme la paraffine ou l'huile végétale. Le plus connu de ces fertilisants est le Customblen (mélange de phosphate de calcium, de nitrate d'ammonium, de phosphate d'ammonium recouvert d'une huile végétale) [8].
- **Les fertilisants oléophiles** : Une autre stratégie pour surmonter le problème de la dilution rapide des nutriments solubles dans l'eau contenant de l'azote et du phosphore, est l'utilisation des biostimulants oléophiles. L'application de N et P sous forme oléophile est considérée comme une méthode efficace, du fait que les additifs oléophiles restent dissouts dans la phase huileuse. Donc, ils sont disponibles à l'interface huile-eau ou huile-sédiment et par la suite, elle conduit à l'amélioration de la croissance bactérienne et le métabolisme [8]. Le fertilisant oléophile le plus connu est l'Inipol EAP22, une microémulsion contenant l'urée (source de N), le phosphate de lauryle (source de P), le 2-butoxy-1-éthanol en tant que tensioactif, et l'acide oléique pour conférer au mélange son caractère hydrophobe. Ce fertilisant a été utilisé avec succès pour la bioremédiation d'hydrocarbures pétroliers sur les côtes du détroit de Prince William, Alaska [100, 101].

À ce jour, environ 110 miles de la baie du Prince-William (la côte sud de l'Alaska) ont été traités avec des nutriments et un programme de surveillance a été établi [89]. Sans recherches supplémentaires, il est toutefois prématuré de conclure que

l'enrichissement avec des nutriments sera efficace dans toutes les conditions ou sera toujours plus efficace que d'autres approches de bioremédiation, d'autres technologies de lutte contre les déversements ou simplement l'atténuation naturelle [89]. Peu d'analyses détaillées et de données de performance sont seulement disponibles pour les différentes circonstances. D'après une synthèse effectuée durant 90 jours par ROSENBERG ET RON [102] en analysant la moyenne des résultats d'une étude sur l'efficacité de l'Inipol EAP22 dans la remédiation des côtes du golfe de l'Alaska et du détroit Prince William par rapport au control (zones auto-nettoyées par les hydrocarbonoclastes autochtones), Inipol EAP22 a pu éliminer 75% du pétrole résiduel contre 50% dans le control. Cependant, l'analyse statistique des résultats (avec un niveau de signification p de 0,05) n'a pas révélée une différence significative entre les deux traitements. Le fertilisant semble accélérer la cinétique de dégradation durant les premières semaines. Il s'ensuit toutefois une libération rapide de l'urée sous l'effet de la marée. De même, une équipe japonaise (MAKI ET AL.) [103] a étudié l'effet de trois fertilisants à libération lente sur la remédiation du sable contaminé par le pétrole dans une zone intertidale par rapport à une seule population (indigène) adaptée, comme témoin. L'expérience a duré 3 mois. Les chercheurs ont conclu que l'efficacité des fertilisants est supérieure au control jusqu'à la sixième semaine. Au-delà, aucune différence significative n'est observée. Les deux exemples exposés plus haut, dévoilent le problème de stabilité de N et P dans les formulations des fertilisants après les premières semaines suite aux conditions océaniques régnantes dans un environnement contaminé.

1.3.2. Ensemencement avec des microorganismes (Bioaugmentation)

L'ensemencement (appelé aussi inoculation) est l'addition des microorganismes à un environnement pollué pour améliorer le taux de biodégradation. L'inoculum peut être un mélange de microorganismes non indigènes provenant de divers environnements pollués, sélectionnés et cultivés spécialement pour leurs caractéristiques de dégradation, ou il peut s'agir d'un mélange d'hydrocarbonoclastes choisies sur le site à réhabiliter et à cultiver en laboratoire ou en bioréacteurs sur site [89]. Des nutriments accompagnent généralement la culture de semence microbienne. L'ajout des microorganismes exogènes à un site de déversement est justifié par le fait que les populations microbiennes indigènes ne peuvent pas inclure toute la diversité ou la densité des

hydrocarbonoclastes nécessaires à oxyder efficacement les nombreux composés d'un déversement hydrocarboné.

L'utilité d'introduire des microorganismes non indigènes dans les environnements marins est encore en cours d'évaluation.

A quelques exceptions près, la communauté scientifique n'était pas satisfaite quant à l'application de la bioaugmentation. Aucune étude contrôlée n'ont pas été menées dans de tels environnements, donc aucune donnée n'est disponible pour évaluer l'efficacité de cette approche. De nombreux scientifiques s'interrogent sur la nécessité d'ajouter des microorganismes à un site de déversement, car la plupart des régions contiennent suffisamment d'hydrocarbonoclastes et, dans la plupart des milieux, la biodégradation est surtout limitée par le manque des nutriments [104]. Les microorganismes exogènes introduits, devraient non seulement mieux dégrader les hydrocarbures pétroliers que ceux indigènes, mais ils devraient également être compétitifs contre une population mixte d'organismes indigènes bien adaptée à leur environnement. Ils devraient faire face aux conditions physiques (telles que la température locale de l'eau, la chimie et la salinité) et à la prédation par d'autres espèces, facteurs auxquels les organismes indigènes sont susceptibles d'être bien adaptés [105]. ATLAS [106] a examiné les critères que doit respecter un ensemencement allochtone, notamment :

- la capacité de dégrader la plupart des composés pétroliers,
- la stabilité génétique,
- la viabilité pendant le stockage,
- la croissance rapide après stockage,
- une croissance rapide et une activité enzymatique maximale,
- la capacité à concurrencer les microorganismes indigènes,
- la non-pathogénicité,
- l'incapacité de produire des métabolites toxiques.

Les microorganismes allochtones peuvent être les plus appropriés pour les situations où les organismes autochtones soit se développent lentement, soit incapables de dégrader un hydrocarbure particulier. Les composés pétroliers difficiles à être dégradés par les populations microbiennes locales, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont un exemple. Dans ce cas, des

hydrocarbonoclastes adaptées pourraient être des candidats appropriés pour l'ensemencement [107]. RON ET ROSENBERG [46] suggèrent la bioaugmentation avec des souches adaptées de *Cycloclasticus* pour traiter des HAP toxiques en cas d'un déversement pétrolier près des côtes. Dans d'autres cas, si un gain du temps s'oppose ; il peut être utile d'ensemencer une culture constituée d'organismes indigènes [108]. Par conséquent, les problèmes potentiels d'adaptation environnementale des organismes non indigènes pourraient être évités.

NIKOLOPOULOU ET AL. [109] suggèrent d'introduire des microorganismes hydrocarbonoclastes indigènes plutôt que d'autres qui sont étrangères à l'environnement contaminé en combinaison avec des nutriments, comme meilleure stratégie de remédiation.

L'ensemencement peut être très approprié dans des environnements où les conditions sont plus ou moins contrôlées. Dans tel cas, il faudrait envisager le bon choix des bactéries, d'une méthode d'application et d'une ingénierie de site appropriées. Des dispositions devraient être prises pour maintenir les cellules en mouillage et en contact avec la phase huileuse ; pour les protéger de l'excès de la lumière ultraviolette ; pour fournir des nutriments adéquats ; et pour contrôler la température, le pH et la salinité [89].

Les tentatives d'ensemencements des environnements aquatiques contaminés par les hydrocarbures ont abouti à des résultats controversés [45]. En effet, TAGGER ET AL. [110] n'ont observé aucune augmentation du taux de biodégradation du pétrole dans l'eau de mer inoculée avec un consortium bactérien dégradeur du pétrole. En présence d'un fertilisant oléophile, HOROWITZ ET ATLAS [111] ont noté une diminution notable du pétrole dans l'eau de mer dans un système à écoulement ouvert, lorsque des bactéries enrichies sur l'octadécane comme seule source de carbone sont utilisées.

1.4. Biosurfactants

1.4.1. Généralités sur les surfactants

Les surfactants (du terme anglais '**Surface Active Agents** ') sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (tête) et d'une partie hydrophobe non polaire (queue) (figure 1.7). Ils agissent préférentiellement à

l'interface entre deux phases fluides telles que l'interface air/eau ou huile/eau. Cette propriété permet aux surfactants d'être capables de réduire les tensions de surface et interfaciales et les rendre ainsi un excellent agent détergent, émulsifiant, dispersant et moussant [112].

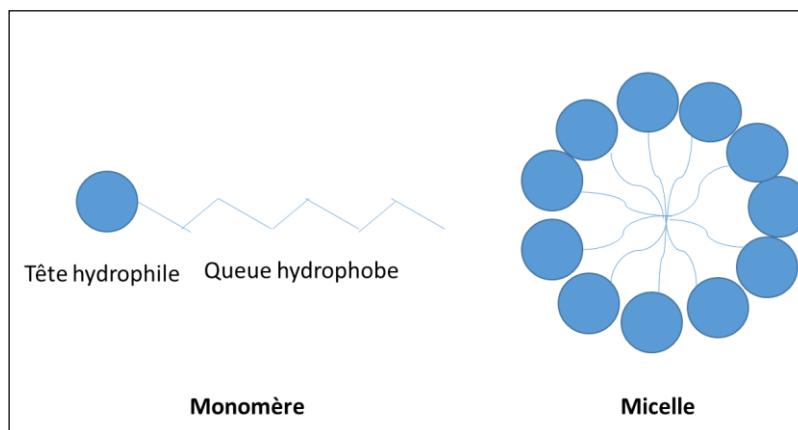


Figure 1.7 : Représentation schématique d'un surfactant, sous forme d'un monomère et en micelle.

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

Les agrégats micellaires créent un noyau hydrophobe moins polaire dans lequel sont logés les contaminants (figure 1.7). Par conséquent, la solubilisation des contaminants est nettement augmentée [113].

Le classement le plus couramment utilisé des surfactants est basé sur la nature de la tête hydrophile et selon lequel on distingue quatre grandes classes :

- 1) les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- 2) les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- 3) les non ioniques, sans charge ;

- 4) les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre [114].

La partie hydrophobe des surfactants est constituée d'une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée de 8 à 18 atomes de carbone [115]. Elle influence sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre d'atomes de carbone ou son degré de ramification [114].

Le degré de ramification, la position du groupement hydrophile et la longueur de la chaîne hydrocarbonée sont autant des paramètres importants dans la spécification des propriétés physicochimiques des surfactants [115].

Dans la plupart des cas, les surfactants synthétiques, provenant des industries pétrochimiques et oléo-chimiques [116], sont des structures monomériques incluant les quatre groupes de charge cités ci-dessus [117]. Ils sont utilisés extensivement à grande échelle dans l'industrie, en particulier dans le domaine de détergence et dans le nettoyage des surfaces [116].

1.4.2. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles produites par des microorganismes (bactéries, champignons et levure) avec une activité particulière de surface élevée et une capacité d'émulsifiante importante [76, 95, 118].

En termes de propriétés de surface, un efficient biosurfactant diminue la tension de surface entre l'eau et l'air de 72 à 35 mN/m et les tensions interfaciales entre l'eau et l'hexadécane de 40 à 1 mN/m [119].

Les biosurfactants, existent rarement en tant que composés cationiques (sauf ceux qui contiennent un groupe amine), mais souvent comme molécules anioniques ou non ioniques [76]. Ils ont l'avantage d'être moins ou non toxiques et biodégradables. Leur problème majeur réside dans leur coût de production assez élevé. L'orientation actuelle vers une industrie durable qui respecte l'environnement exige le retour à des biosurfactants afin de remplacer quelques surfactants chimiques [116].

1.4.3. Classification des biosurfactants

Outre le classement commun des surfactants selon la nature du groupement hydrophile, les biosurfactants sont différenciés essentiellement par leur composition biochimique et leur origine microbienne [12, 76, 120].

Du point de vue structural, ils sont constitués d'une partie hydrophile qui peut inclure un acide carboxylique, alcool, acide aminé ou peptide cationique ou anionique, ou un saccharide (mono, di ou poly) attachée à une partie hydrophobe constituée d'une chaîne d'hydrocarbures ou d'acides gras saturés ou insaturés [12, 121, 122]. Il ressort de cette configuration, cinq classes majeures : les glycolipides, les lipopeptides et lipoprotéines, les phospholipides et les acides gras, les surfactants polymériques et les surfactants particuliers [12].

Les biosurfactants sont ainsi classés en deux catégories : agents de surface à faible poids moléculaire (glycolipides, lipopeptides et les phospholipides) généralement appelés biosurfactants, et bioémulsifiants qui sont des polymères à haut poids moléculaire [122, 123]. Les biosurfactants réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciales, tandis que les bioémulsifiants sont plus efficaces dans la formation des émulsions stables, sans diminuer suffisamment la tension de surface [124].

Une variété de microorganismes est capable de produire des biosurfactants de diverses compositions chimiques (tableau 1.3). Leur nature et quantité produite dépendent du type du microorganisme produisant un tel biosurfactant [122].

Les biosurfactants les plus étudiés sont les glycolipides et les lipopeptides [125]. Toutefois, c'est la classe des biosurfactants glycolipidiques qui a attiré une attention très particulière ces dernières années dans le secteur industriel [116].

Tableau 1.2 : Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface [12].

| Biosurfactant | Microorganismes | Tension de surface (mN/m) |
|--|--|----------------------------------|
| Glycolipides | | |
| Rhamnolipides | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 29 |
| | <i>Pseudomonas sp.</i> | 25–30 |
| Trehalolipides | <i>Rhodococcus erythropolis</i> | 32–36 |
| | <i>Nocardiaerythropolis</i> | 30 |
| | <i>Mycobacterium sp.</i> | 38 |
| Sophorolipides | <i>Torulopsis. Bombicola</i> | 33 |
| | <i>Torulopsis. Apicola</i> | 30 |
| | <i>Torulopsis. Petrophilum</i> | |
| Mannosylerythritollipides (MELs) | <i>Pseudozyma churashimaensis</i> ¹ | 29,2 |
| | <i>Pseudozyma hubeiensis</i> ² | |
| Lipopeptides et lipoprotéines | | |
| Peptide-lipide | <i>Bacilluslicheniformis</i> | 27 |
| Serrawettine | <i>Serratiamarcescens</i> | 28–33 |
| Viscosine | <i>Pseudomonasfluorescens</i> | 26,5 |
| Surfactine | <i>Bacillus subtilis</i> | 27–32 |
| Subtilisine | <i>Bacillus subtilis</i> | |
| Acides gras et phospholipides | | |
| Acidesgras | <i>Corynebacteriumlepus</i> | 30 |
| Phospholipides | <i>Thiobacillusthiooxidans</i> | |
| Biosurfactants polymériques | | |
| Emulsan | <i>Acinetobactercalcoaceticus</i> | |
| Biodispersan | <i>Acinetobactercalcoaceticus</i> | |
| Mannan-lipide-protéine | <i>Candida tropicalis</i> | |
| Liposan | <i>Candidalipolytica</i> | |
| Carbohydrate-protein-lipid | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 27 |
| Protein PA | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
| Biosurfactants particulaire | | |
| Les vésiculesdes cellules microbiennes | <i>Acinetobactercalcoaceticus</i> | |
| Cellules entières | <i>Variété de bactéries</i> | |

¹ [126] ; ² [127].

1.4.3.1. Glycolipides

Les glycolipides représentent le groupe le plus important et le plus étudié des biosurfactants produits [95, 128]. Les glycolipides résultent de la combinaison d'un mono, di, tri ou tétra saccharide (glucose, mannose, galactose, rhamnose) avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxy-aliphatique [112]. Les rhamnolipides, les sophorolipides et les mannosylerythritol-lipides sont les glycolipides les plus étudiés [95, 128]. Les rhamnolipides sont produits abondamment par *Pseudomonas aeruginosa* et les voies de leur biosynthèse sont bien élucidées [129]. Les sophorolipides et les mannosylerythritol-lipides (MEL) sont intéressantes en raison du rendement élevé obtenu (>100 g/L) par diverses espèces de levures qui les synthétisent [116, 126, 127]. La figure 1.8 représente les structures de quelques glycolipides.

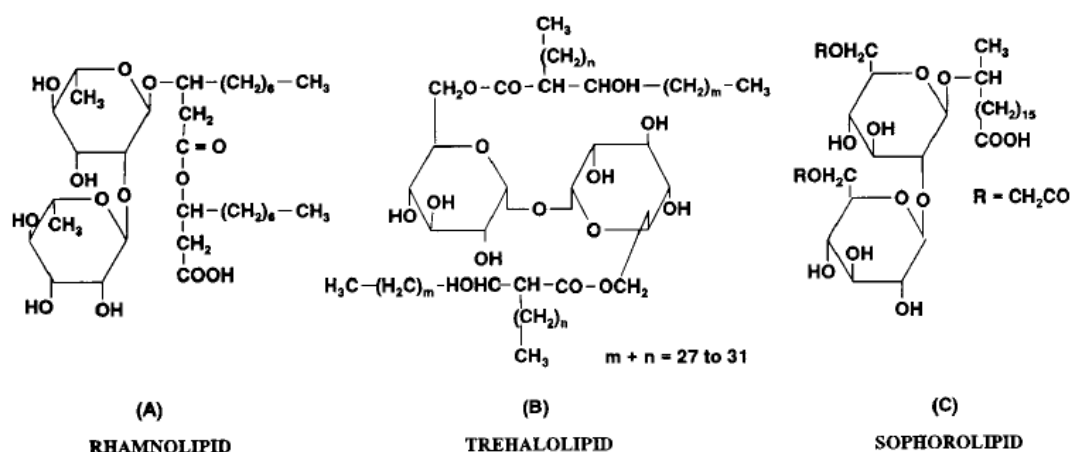


Figure 1.8 : Structure chimique de quelques glycolipides [12].

1.4.3.2. Lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides peuvent être linéaires ou cycliques, en se basant sur la topologie de la chaîne peptidique [130]. Les biosurfactants de nature lipopetidique sont divisés en quatre familles: les surfactines, les iturines, les fengycines et les plipastatines et les lichenysines [112, 131].

Les surfactines sont la famille la plus importante dans cette classe [12, 112]. Ce sont des lipopeptides cycliques (figure 1.9) produites notamment par *Bacillus subtilis* avec une activité de surface puissante. La surfactine synthétisée par *Bacillus*

subtilis ATCC 21332 réduit la tension de surface de 72 à 27,9 mN/m avec une CMC de 0,017 g/L [112].

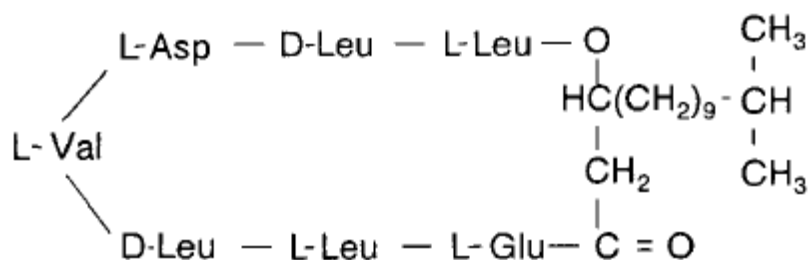


Figure 1.9 : Structure d'une surfactine produite par *Bacillus subtilis* [12].

1.4.3.3. Acides gras et phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupements d'alcool et phosphate et de chaîne lipidique [132]. Ils sont classés en deux groupes : glycérophospholipides et glycopospholipides [133]. Tandis que les biosurfactants d'acides gras sont composés de chaînes hydrocarbonées d'acides gras saturés entre C12 et C14 et acides gras complexes portant les groupements d'hydroxyles et des alkyles ramifiées [112].

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de phospholipides durant leur croissance sur les n-alcane [12]. De telles biosurfactants exhibent une bonne activité de surface [12, 112]. Il a été montré que les souches *Arthrobacter* AK-19 et *P. aeruginosa* cultivées respectivement sur l'hexadécane et l'huile d'olive, accumulent jusqu'à 40 et 80 % (m/m) de lipides [12, 112].

1.4.3.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymériques sont des hétéro-polysaccharides poly-anioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines [134]. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevé, qui présentent une viscosité élevée et une bonne résistance à la traction et au cisaillement [112]. Des exemples des différentes familles des biosurfactants polymériques comprennent : Emulsan, Biodispersan, Alasan, Liposan et Manno-protéine [112].

L'Emulsan est le biopolymère le plus étudié [95], sa structure est illustrée dans la figure 1.10.

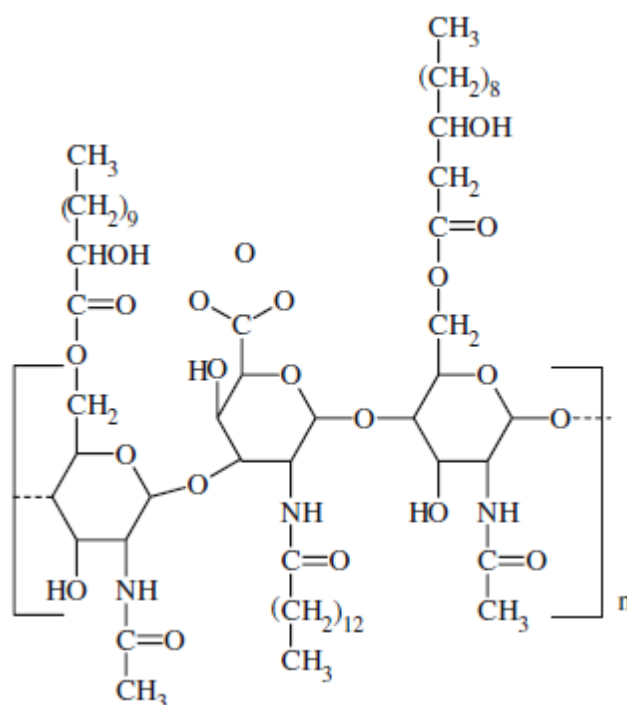


Figure 1.10 : Structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d'*Acinetobacter* [95].

Une variété des microorganismes peut produire des polymères à poids moléculaire élevé [95]. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1 produit un Emulsan RAG 1, un agent puissant émulsifiant des hydrocarbures. Bidespersan est un autre agent dispersant produit par la souche *Acinetobacter calcoaceticus* A2. L'alsan fait référence à la souche *Acinetobacter radioresistens* KA-53, un biosurfactant anionique hétéropolysaccharide-protéine contenant l'alanine. Liposan est un bioémulsifiant extracellulaire synthétisé par *Candida lipolytica*. Des grandes quantités d'un Manno-protéine sont produites par l'espèce fongique *Saccharomyces cerevisiae* [95].

1.4.3.5. Biosurfactants particuliers

Quelques exemples de biosurfactants particuliers sont des vésicules membranaires extracellulaires. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures par formation de microémulsions [12]. L'accumulation des vésicules membranaires extracellulaires, d'un diamètre de 20-50 nm et une densité spécifique de 1,158 g/cm², a été rapportée chez les cellules de la bactérie *Acinetobacter* sp. HO1-N.

Les vésicules ainsi purifiées sont composées de protéines, phospholipides et lipopolysaccharides [12, 112].

1.4.4. Biosurfactants, bioémulsifiants de microorganismes marins

La diversité floristique et faunistique du milieu marin constitue l'habitat le plus riche du globe terrestre en produits naturels. Les microorganismes marins développent des capacités métaboliques et physiologiques uniques qui leur permettent de s'adapter aux conditions extrêmes des environnements marins. En plus, ces microorganismes peuvent produire de nouveaux métabolites qui ne sont pas toujours sécrétés par leurs homologues terrestres. Les caractéristiques du milieu marin offrent des possibilités énormes à la synthèse de nouvelles molécules telles que les biosurfactants/bioémulsifiants et d'autres produits ayant une valeur économique importante.

Les microorganismes marins producteurs des biosurfactants/bioémulsifiants et qui sont rapportés dans la littérature incluent : *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* et levures [135].

Dans la classe des glycolipides, un glucose-lipide a été produit par la bactérie *Alcaligenes* sp. Ce biosurfactant inhibe la croissance des micro-algues et micro-flagelles [136]. Un tréhalose tétra ester anionique a été produit par la souche bactérienne *Arthrobacter* sp. EK 1. Le biosurfactant ainsi obtenu réduit efficacement les tensions interfaciales avec une activité émulsifiante importante [137]. *Alcanivorax borkumensis* a été rapportée à produire un surfactant puissant composé du glucose lié à quatre chaînes d'acides 3-hydroxydécanoïque [135]. La souche bactérienne marine *Halomonas lutea* C2SS100, isolée à partir d'une eau de production d'un champ pétrolifère off-shore produit un biosurfactant (un lipopeptide ou glycolipopeptide) efficace dans la remobilisation des hydrocarbures [118].

Dans la classe des biosurfactants lipopeptidiques, plusieurs types de lipopeptides cycliques sont synthétisés par diverses espèces du genre *Bacillus*. Un lipopeptide synthétisé par la souche *Bacillus licheniformis* BAS50 réduit la tension de surface de l'eau de 72 à 28 mN/m, associée à une bonne activité antimicrobienne [135]. THAVASI ET AL. [138] ont rapporté la production d'un lipopeptide par *Azotobacter chroococcum*. Le biosurfactant obtenu est capable d'émulsifier une

variété d'hydrocarbures (lubrifiants, carburants et HAP). La souche *Myroides* SM1 synthétise un mélange de phospholipides et d'acides gras, et il est considéré comme un agent de surface très actif [135].

Une variété de microorganismes marins synthétise des bioémulsifiants à poids moléculaire élevé. Des souches appartenant au genre *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Myroides*, *Halomonas*, *Candida*, *Streptomyces*, *Antarctobacter* et *Marinobacter* ont été rapportées à cause de leurs activités à produire des émulsions très stables avec des substrats hydrophobes [135]. La souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1 qui produit le fameux Emulsan RAG 1 a été isolée de la mer méditerranéenne. De même, la souche *A. calcoaceticus* A2 produit un biodispersant, qui est un bon dispersant des composés hydrophobes. *Pseudomonas nautica* synthétise un polymère extracellulaire composé de protéine, hydrate de carbone et lipide. Les *Streptomyces* sont connues pour produire des bioémulsifiants constitués de protéines et de polysaccharides. *Candida lipolytica* est la levure la plus citée dans la littérature, elle produit des bioémulsifiants de lipides, hydrate de carbone et protéine [135].

1.4.5. Production des biosurfactants

L'inconvénient majeur des biosurfactants par rapport à leurs homologues chimiques est leur coût de production assez élevé. Plusieurs facteurs doivent être considérés afin de présenter des biosurfactants sur le marché pouvant concurrencer quelques surfactants chimiques. Le développement d'un bioprocédé efficace passe par :

- Le bon choix des composants du milieu de production et l'optimisation des conditions de culture pour augmenter le rendement et diminuer le coût ;
- L'utilisation d'une technique efficace d'extraction du produit (biosurfactant) pour une récupération optimale [14, 95, 116].

L'utilisation des substrats nutritionnels économiques conduit à une diminution de 10 à 30% du coût total de la production [14, 139]. Une variété de matières premières et de substrats recyclés tels que les huiles végétales, les déchets d'huiles, les substances à base d'amidon, le lactosérum et les déchets de distillation, sont communément employés comme substrats pour la culture des microorganismes producteurs (tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Utilisation des substrats bruts et déchets pour la production de biosurfactants par diverses souches microbiennes [14].

| Substrat | Type de biosurfactant | Microorganisme producteur | Rendement de production (g/L) |
|---|-------------------------------|--|-------------------------------|
| Huile de colza | Rhamnolipides | Espèces de <i>Pseudomonas</i> DSM 2874 | 45 |
| Huile de Babassu | Sophorolipides | <i>Candida lipolytica</i> IA 1055 | - |
| Huile de maïs turque | Sophorolipides | <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 | 400 |
| Huile de tournesol et de soja | Rhamnolipide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129 | 4,31/2,98 |
| Huile de tournesol | Lipopeptide | <i>Serratia marcescens</i> | - |
| Huile de soja | Lipides de Mannosylerythritol | <i>Candida</i> sp. SY16 | 95 |
| Huiles de friture usagées (d'olive et de tournesol) | Rhamnolipide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044 | 2,7 |
| Déchets de soja | Rhamnolipide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI | 11,72 |
| Eaux acides déchets de l'huile de tournesol | Rhamnolipide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI | 16 |
| Déchets de raffinerie d'huile | Glycolilipides | <i>Candida antarctica</i> et/ou <i>Candida apicola</i> | 10,5/13,4 |
| Déchets de raffinerie de l'huile de soja | Rhamnolipides | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10 | 9,5 |
| Lactosérum et déchets de distillerie de lait | Rhamnolipide | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2 | 0,92 |
| Effluents de traitement de la pomme de terre | Lipopeptide | <i>Bacillus subtilis</i> | - |
| Eaux usées de farine de manioc | Lipopeptide | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 et <i>Bacillus subtilis</i> LB5a | 2,2-3 |

Plusieurs facteurs (comme la source de carbone, d'azote, le fer, le magnésium, le rapport C/N, C/P, C/Fe ou C/Mg) ont été rapportés pour leur influence sur la quantité, la composition et les propriétés des biosurfactants [14, 122].

La nature du substrat carboné influence sur le type, la quantité et la qualité du biosurfactant [140]. Des sources de carbone solubles telles que le glycérol, le glucose, le mannitol et l'éthanol ont été utilisées avec succès pour la synthèse de rhamnolipide par *Pseudomonas* sp. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles comme l'hexadécane et l'huile d'olive [12]. MATA-SANDOVAL ET AL. [141] ont rapporté que les huiles végétales sont considérées comme des substrats fournissant des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'elles sont utilisées comme seule source de carbone en présence de certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Différentes sources d'azotes sont utilisées par les microorganismes producteurs de biosurfactant (peptone, l'extrait de levure, urée, le sulfate d'ammonium, le nitrate de sodium, le chlorure d'ammonium, etc.) [122]. Le choix de la meilleure source dépendra de la souche microbienne productrice de [12]. La production des biosurfactants est souvent possible quand l'azote s'épuise du milieu, c.-à-d., durant la phase stationnaire de la croissance [122]. À titre d'exemple, une meilleure production a été obtenue avec la souche *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 et *Ustilagomaydis* sp. suite à la limitation de cet élément [14]. GUERRA-SANTOS ET AL. [142] ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé aucune production pour des rapports inférieurs à 11/1, où l'azote n'est pas limitant.

D'autres facteurs comme le pH, la salinité, la température et l'agitation affectent également le rendement et les caractéristiques du biosurfactant produit [12, 122, 143].

L'utilisation d'une méthode statistique appropriée pour l'optimisation des facteurs influençant sur la production des biosurfactant améliorerait ainsi l'efficacité du procédé [14, 95]. En effet, MUTALIK ET AL. [144] ont utilisé le plan de surface

(*surface response methodology*) pour améliorer significativement le rendement, lors de la production de biosurfactant par *Rhodococcus* sp. MTCC2574 cultivée sur l'hexadécane, de 3,2 à 10,9 g/L. De même, en utilisant la souche *Gordonia* sp. BS29 pour produire des glycolipides, FRANZETTI ET AL. [145] ont réussi à augmenter le taux de production 5 fois plus en suivant la même stratégie.

Le procédé d'extraction et de purification de biosurfactant représente 60 % du coût total de production [14]. Les techniques de récupération des biosurfactants les plus courantes sont la précipitation, l'extraction par solvant et la purification chromatographique. L'extraction d'un biosurfactant de faible poids moléculaire implique normalement une étape de précipitation combinée à l'utilisation des différents solvants organiques selon l'hydrophobicité et la valeur du balance hydrophile-lipophile (HLB) de biosurfactants [95] (Tableau 1.4).

Les rhamnolipides sont généralement précipités par acidification et extraits à l'aide d'acétate d'éthyle, l'extraction des sophorolipides est normalement effectuée avec de l'hexane. Tandis que pour les trehalolipides, le solvant approprié est un mélange de chloroforme/méthanol. Le méthanol est également utilisé comme solvant pour l'extraction des lipopeptides, après une précipitation par acidification [146]. Les biosurfactants de haut poids moléculaire sont généralement extraits du bouillon de culture par précipitation avec le sulfate d'ammonium et purification par dialyse. D'autres techniques comprennent une lyophilisation suivie par une précipitation à l'éthanol ou l'acétone (à froid) ou l'extraction par le mélange chloroforme/méthanol [147].

Tableau 1.4 : Méthodes de récupération des biosurfactants.

| Méthode utilisée | Propriétés des biosurfactants responsables de la séparation | Installation requise | Avantages |
|------------------------------------|--|-----------------------------|--|
| Précipitation acide | BS devient insolubles à des pH acides (2 à 3) | Aucune | Faible coût, efficace pour la récupération des BS bruts |
| Extraction par solvants organiques | BS sont solubles dans ceux-ci à cause de la présence de la partie hydrophobe | Aucune | Efficace dans la récupération des BS bruts et partiellement purifiés, réutilisables (solvants) |

| | | | |
|---|--|--|--|
| Précipitation avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Relargage de polymères ou protéines riches en BS | Aucune | Efficace dans l'isolement de certains types de BS polymériques |
| Centrifugation | Les BS insolubles se précipitent sous l'action de la force centrifugeuse | Centrifugeuse | Réutilisable, efficace pour la récupération des BS bruts |
| Fractionnement de la mousse | BS à cause de son activité de surface, forme et partitionne en mousse | Un bioréacteur de design spécial qui facilite la récupération de la mousse lors de la fermentation | Utile dans les précédés de récupération en continu, haute pureté du produit |
| Ultrafiltration membranaire | BS forment des micelles au-delà de son CMC, qui sera piégé par membrane de polymères | Unité d'ultrafiltration avec une membrane de polymère poreuse | Rapide, récupération en une seule étape, niveau élevé de pureté |
| Adsorption en résines de polystyrène | Adsorption de BS sur membrane de polymères et désorption avec solvants organiques | Résines de polystyrène garnies en colonne | Rapide, récupération en une seule étape, niveau élevé de pureté, réutilisable |
| Adsorption sur charbon actif | BS adsorbé sur charbon actif et désorbé avec solvants organiques | Aucune, pourrait être ajouté au bouillon de culture ou filtré sur colonne | BS très pures, non coûteux, réutilisé, récupération de BS à partir des cultures en continu |
| Chromatographe d'échange ionique | BS chargé est lié à la résine échangeuse et élués par un tampon adéquat | Résine échangeuse d'ions remplie en colonne | Haute pureté, réutilisée, récupération rapide |
| Extraction par éthyl-tertio-butyl-éther (ETBE) | BS sont solubles dans ETBE à cause de la présence de l'extrémité hydrophobe | Aucun | Moins toxique que les solvants organiques conventionnels, réutilisable, de faible coût |

1.4.6. Rôle physiologique des biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par une variété de microorganismes, par sécrétion en tant qu'agents extracellulaires ou rattachés à la membrane cellulaire, principalement durant leur croissance sur des substrats insolubles dans l'eau. Le rôle physiologique des biosurfactants aux microorganismes producteurs n'est pas encore bien compris [12]. Les fonctions naturelles des biosurfactants ; proposées ou prouvées dans la littérature incluent : l'adhésion, l'émulsification, l'amélioration de la biodisponibilité et la désorption et les stratégies de défense [12, 124, 148].

1.4.6.1. Adhésion

L'adhésion est un mécanisme physiologique pour la croissance et la survie des cellules microbiennes dans les milieux naturels. Un cas particulier de l'adhésion est la croissance des bactéries sur les hydrocarbures insolubles dans l'eau, elle constitue l'un des principaux processus du transfert bactérien [148]. Etant donné que les enzymes nécessaires à l'oxydation des hydrocarbures se trouvent sur la membrane cellulaire, le microorganisme doit donc, d'abord entrer en contact avec son substrat. Dans certaines situations, on assiste à la formation d'un biofilm dû à la sécrétion du biosurfactant, qui permet à certains microorganismes d'attacher à certaines surfaces et inhiber d'autres [148]. Un autre cas est la modification de l'hydrophobicité cellulaire des microorganismes selon la nécessité. Les microorganismes augmentent ou diminuent leur hydrophobicité cellulaire en exposant respectivement à l'extérieur ou à l'intérieur de la partie hydrophobe des biosurfactants liés à la membrane cellulaire [124]. Par exemple, les cellules de *Acinetobacter lwoffii* RAG-1 se trouvaient attachées directement aux gouttelettes de pétrole durant la phase exponentielle de croissance (une forte hydrophobicité cellulaire) jusqu'à la dégradation des fractions assimilables de l'hydrocarbure. Il s'en suit que les cellules bactériennes ont besoin de se déplacer vers une autre gouttelette fraîche pour leur besoin métabolique. Dans ce cas-là, la souche RAG-1 libère sa capsule composée d'un bioémulsifiant (Emulsan) qui détache les cellules de la gouttelette épuisée, tout en formant un biofilm hydrophile autour de laquelle pour empêcher l'attachement à nouveau sur la gouttelette épuisée [61, 124].

1.4.6.2. Emulsification

Comme il a été rapporté dans la section 1.2.5.2, les microorganismes hydrocarbonoclastes produisent des biosurfactants/bioémulsifiants qui leur permettent de se développer sur des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau ; en augmentant la surface de contact entre les gouttelettes de l'huile et ceux-ci.

1.4.6.3. Biodisponibilité et désorption

Le problème majeur des composés hydrophobes de haut poids moléculaire est leur faible solubilité dans l'eau qui augmente leur adsorption aux surfaces, et qui limite leur disponibilité aux microorganismes dégradeurs. Les biosurfactants pourraient améliorer cette disponibilité en les désorbant des surfaces et en

augmentant leur solubilité apparente [148]. Les biosurfactants qui possèdent une excellente activité de surface sont très efficaces dans la mobilisation des composés hydrophobes adsorbés sur les surfaces. Une propriété importante des surfactants est la formation des micelles au-delà de la concentration micellaire critique (CMC). Les micelles permettent aux biosurfactants d'augmenter la solubilité apparente des composés hydrophobes en les incorporant dans leurs corps, ce qui facilite ensuite leur dégradation microbienne [148, 149]. La désorption est ainsi avantageuse aux microorganismes dans le cas où les conditions deviennent défavorables (par exemple accumulation des toxines ou déplétion des nutriments). A ce stade, la désorption permet aux microorganismes d'expulser de son habitat et aller chercher d'autres endroits plus favorables [12, 148].

1.4.6.4. Stratégies de défense

Les microorganismes sécrètent des biosurfactants pour survivre dans leurs habitats naturels afin de se protéger d'autres microbes [12, 148].

1.5. Ecotoxicologie

1.5.1. Définition de l'écotoxicologie

RAMADE [150] a défini l'écotoxicologie comme étant : « la science qui étudie les polluants dans les écosystèmes ». L'écotoxicologie étudie donc la contamination de l'environnement, le comportement et les effets des polluants ainsi que les conséquences écologiques importantes qui en découlent à des échelles spatiales et temporelles, incluant celles propres aux cycles biogéochimiques et aux processus écologiques fondamentaux (productivité biologique, recyclage des nutriments sur les successions écologiques).

A l'opposé de l'écotoxicologie, la toxicologie de l'environnement se fonde sur des recherches effectuées le plus souvent aux niveaux plus inférieurs de l'organisation biologique, depuis la molécule jusqu'à la cellule, l'organe et au mieux l'individu isolé représentant souvent les entités biologiques les plus complexes faisant l'objet de l'étude de la toxicologie [150].

Il revient donc à déterminer le niveau à lequel l'étude est focalisée. Si l'objectif de la détermination de la toxicité d'une substance est fixé à son effet sur

un individu isolé ou une partie de celui-ci, sans tenir compte des interactions avec les autres individus formant la population, la communauté ou l'écosystème dans son ensemble, on s'intéresse dans ce cas à une investigation propre à la toxicologie de l'environnement. Dans le cas inverse, on parle du domaine de l'écotoxicologie.

1.5.2. Evaluation des effets toxiques des contaminants

L'évaluation des effets toxiques potentiels des contaminants vis-à-vis des organismes tests, est basée sur la réalisation d'essais de toxicité au laboratoire.

L'objectif d'un bioessai est de détecter, dans des conditions expérimentales précises, l'écotoxicité potentielle d'une substance chimique ou de tout autre échantillon vis-à-vis des organismes vivants.

Ces essais permettent de déterminer les concentrations induisant 10, 20, ..., 50 voire 100% d'effet recherché ainsi que la plus forte concentration n'induisant pas d'effet délétère, et ceci en fonction de la durée d'exposition [151]. Selon la concentration administrée d'une substance donnée et la durée d'exposition, on distingue deux types de toxicité :

1.5.2.1. Toxicité aiguë

Ce sont des essais à court terme (de quelques minutes ou heures à quelques jours en fonction du cycle de vie de l'organisme), après exposition à une seule forte dose de la substance. Ces essais permettent d'établir une relation entre la concentration d'exposition et l'intensité de l'effet, généralement exprimée par la DL50 (Dose Létale) ou la CE50 (Concentration Effective), pour lesquelles les effets sont observés pour 50 % des individus testés [151].

1.5.2.2. Toxicité chronique

Ces tests permettent de déterminer la toxicité chronique (à moyen ou à long termes) vis-à-vis de l'organisme testé. La durée d'exposition, correspondant en moyenne à 10% de la vie de l'organisme, doit intégrer plusieurs stades de son cycle de vie pouvant inclure la reproduction. Les essais à moyen et à long termes permettent de déterminer une concentration expérimentale (CSEO= Concentration Sans Effet Observé) en dessous de laquelle aucun effet toxique ne peut être observé [152].

1.5.3. Méthodes statistiques d'estimation de la toxicité

Dans les essais écotoxicologiques, la réponse ou l'effet d'une substance sur un individu est de type binaire, c.-à-d., soit elle présente un effet ou soit elle ne présente pas (par exemple, mort ou vivant, fécondé ou non, etc.), appelés les tests de toxicité quantique ou binomiale [153, 154]. Dans les expériences quantiques, des groupes d'organismes (de préférence de même nombre) sont exposés à une série croissante de concentration d'un polluant, ce qui engendre (après une durée d'exposition fixe) des réponses résultantes de l'effet de la substance polluante.

La réponse est généralement exprimée par la mortalité, qui est évaluée, habituellement dans les expériences quantiques par la concentration létale médiane (CL50), c.-à-d, la concentration qui tue 50% de la population exposée. C'est une estimation de la concentration qui n'affecterait que l'organisme « typique » ou moyen ; un paramètre de toxicité possédant une certaine validité.

Le choix d'une méthode pour l'estimation de la CL50 est déterminé par le nombre d'effets dans une série quantique. Autrement dit, combien d'effets nuls (qui cause 0% de mortalité), à 100% ou partiel (entre 0 et 100% de mortalité) qu'on a pour une gamme de concentration. Suite à cela, nous appliquerons l'une des méthodes suivantes :

1.5.3.1. Transformation de probit

La relation entre la dose (en échelle logarithmique) et la mortalité (en pourcentage) donne une courbe sous forme sigmoïde (forme S) qui rend l'estimation de la CL50 sujette à une forte erreur. La transformation de probit permet pour une distribution de données qui suit une loi normale (dont pratiquement la majorité des phénomènes biologiques obéissent à cette distribution), de rendre la courbe sigmoïde à une droite dont l'équation s'écrit [150, 155] :

$$Y = 5 + (x - \mu)/\sigma$$

Où Y représente les unités de probabilité normales ou probits, x est la dose (en valeur logarithmique), μ est la moyenne de la dose (la série) et σ est l'écartype.

Avant le développement des logiciels informatiques qui permettent le tracé direct des données et déduire les paramètres de toxicité (comme CL50), des tables

donnant la transformation des pourcentages de mortalité en probit pour chaque concentration correspondante ont été élaborées. De cette façon, on tracera une fonction linéaire de la forme : $Y = b + a \log C$, dont on pourra déduire les paramètres de toxicité et sa limite de confiance [155].

L'intervalle de confiance renseigne sur la variation d'un essai particulier. Il est plus étroit à la CL50 et il s'élargit aux taux supérieurs et inférieurs de l'effet. Un rapport de 1,3 entre la CL50 et la limite de confiance représente un intervalle de confiance étroit et une bonne précision, tandis qu'un rapport variant entre 1,5 et 1,8 est courant ou acceptable [154].

Il est préférable de joindre avec les paramètres de toxicité, la valeur de Khi-deux qui exprime la qualité de l'ajustement, c.-à-d., la coïncidence entre les données expérimentales et celles exceptées par le modèle.

L'application de la transformation de probit est valide pour des données ayant une distribution normale. Ainsi, il est nécessaire que les données doivent renfermer au moins deux mortalités entre 0 et 100% pour appliquer le modèle [154]. Enfin, il est nécessaire avant de déterminer la CL50 de corriger la mortalité naturelle dans l'essai témoin. Celle-ci ne doit pas dépasser 10% ($\leq 10\%$) pour considérer un bioessai est valide. ABOTT [156] a proposé la correction suivante :

$$P = \frac{(P^* - C)}{(1 - C)}$$

Où :

P est la proportion corrigée d'organismes manifestant l'effet (la mortalité) ; P^* est la proportion observée d'organismes manifestant l'effet ; C : est la proportion d'organismes témoins manifestant l'effet.

Le taux de mortalité s'exprime en proportion et non pas en pourcentage, par ex. 3 organismes sur 10 ont subi l'effet, c'est donc 0,3.

1.5.3.2. Autres méthodes

La méthode de Spearman-Kärber est une méthode alternative en cas où les résultats ne se prêtent pas à l'analyse par la méthode de probit. Cette méthode exige des effets partiel, nul et à 100 %. Quand la méthode Spearman-Kärber donne des résultats douteux ou lorsqu'elle ne possède que des effets nul et à 100%, la méthode binomiale est utilisée [154].

1.5.4. *Artemia* en écotoxicité

1.5.4.1. Généralités sur l'*Artemia*

Connu sous le nom de petite crevette des marais salants, l'*Artemia* est un petit crustacé phyllopode, aquatique d'une taille qui ne dépasse pas 30 mm (la majorité entre 12 et 18 mm) [157, 158]. Ce crustacé est caractérisé par une forte tolérance aux variations de la salinité (5-250 g/L) et de la température (6-35°C), L'*Artemia* est un organisme filtrant non sélectif de phytoplancton, de bactéries et de levures. Il a un cycle de vie très court, une fécondité élevée et il peut être obtenu, facilement à partir de l'éclosion de cystes (œufs) [158, 159]. Par conséquent, les espèces d'*Artemia* constituent l'un des précieux organismes disponibles pour les études écotoxicologiques, offrant une manipulation facile, une efficacité et un rapport coût-bénéfice élevé, compte tenu des pratiques de routine au laboratoire [157, 159]. L'*Artemia* peut être utilisé dans les essais de toxicité de court à long terme, pour le criblage des composés bioactifs dans les produits naturels, la détection de la toxicité aquatique des micro-algues et des cyanobactéries, la toxicité des produits chimiques anthropogéniques et récemment les nanoparticules [159, 160].

1.5.4.2. Caractérisation des espèces d'*Artemia*

Le genre *Artemia* est un complexe d'espèces et de sous-espèces qui se ressemblent, définies par le critère de l'isolement reproductif [161]. Le statut taxonomique du genre *Artemia* est le suivant :

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Sous-embranchement : *Crustacea*, Brünnich, 1772

Classe : *Branchiopoda*, Latreille, 1817

Sous-classe : *Sarsostraca*, Tasch, 1969

Ordre : *Anostraca*, Sars, 1867

Famille : *Artemiidae*, Grochowski, 1896

Genre : *Artemia*, Leach, 1819.

Il appartient à ce genre les espèces suivantes : *A. salina*, *monica*, *urmiana*, *franciscana*, *persimilis*, *sinica*, *tibetiana*, *Artemia sp.* (Pilla et Beardmore 1994) et les populations parthénogénétiques de l'Europe, l'Asie, l'Afrique et l'Australie [157, 161].

La larve des nauplius d'*Artemia* est rose ou plutôt auburn (bronzé), sa taille est d'environ 0,4 mm. Son corps est composé d'une tête et d'un thorax court (Figure 1.11). Sur la tête, il se trouve un œil médian sombre, rouge ou noir et deux paires d'antennes. La deuxième paire est utilisée pour nager et se nourrir, tandis que la première paire est un organe sensoriel [157]. *Artemia franciscana* est résistante au stress osmotique élevé des environnements hypersalins.



Figure 1.11 : Nauplius d'*A. franciscana*.

Ses nauplius boivent de l'eau et sécrètent des ions Na^+ et Cl^- . Les adultes ingèrent de l'eau par la bouche et l'anus. La capacité d'ingérer de l'eau, contenant également des bactéries et des débris, est développée au deuxième stade de maturité. Les larves éclosent généralement après 20 à 48 heures de développement

embryonnaire et atteignent leur taille terminale au bout de 8 à 10 jours, au cours desquelles elles subissent environ 17 mues [157].

1.5.4.3. Avantage d'utilisation de l'*Artemia* dans les bioessais de toxicité

Les bioessais sur l'*Artemia* sont intéressants pour différentes raisons, notamment [160, 162] :

- 1- Les cystes sont disponibles sur le marché mondial, ce qui permet de réaliser les tests chaque fois avec le même matériel d'origine et sans aucun problème d'approvisionnement.
- 2- Le maintien indéfiniment dans le laboratoire sous sa forme de cystes, facilement à éclore.
- 3- Un nombre élevé d'organismes d'essai ayant exactement le même âge et les mêmes conditions physiologiques peut être facilement obtenu pour commencer les tests.
- 4- Le test est rapide, simple et réalisé à faible coût.
- 5- Il nécessite un petit volume d'échantillon et permet de passer plusieurs échantillons à la fois (le kit commercialisé Artoxkit M).
- 6- Il est conforme aux directives d'éthique animale dans de nombreux pays.

1.5.4.4. Sensibilité des bioessais de toxicité basé sur l'*Artemia*

Les tests de toxicité sur l'*Artemia* se font avec des nauplius de deuxième-troisième stade. C'est le stade de maturité le plus sensible à l'effet des contaminants [163, 164].

En dépit de l'utilisation massive et des avantages offerts par l'*Artemia* dans les essais d'écotoxicité, il s'est aligné cependant, à certaines critiques résultant principalement de la faible sensibilité aux toxiques par rapport à d'autres organismes pris dans les mêmes conditions expérimentales [157, 164].

Dans le même ordre, les crustacés *Streptocephalus rubricaudatus* et *S. texanus* sont considérés plus sensibles par rapport à l'*Artemia*, de même que l'oursin *Echinome tralucunter* et l'huitre *Crassostre arhizophorae* [164]. Des espèces de microalgues comme *Selenastrum capricornutum* et *Dunaliellater tiolecta* sont aussi plus sensibles par rapport à l'*Artemia* comme il a été signalé par GAGGI ET AL. [165]. GUERRA [166] a rapporté que *A. salina* est l'organisme le

moins affecté par les composés phénoliques d'effluents industriels par rapport au crustacé *Daphnia magna* et par rapport à la bactérie marine *Vibrio fisheri* approvisionné en kit commercial (Microtox®) et le rotifère *Brachionus plicatilis* commercialisé en kit (RotoxKit M®). *A. franciscana* est l'espèce la moins sensible testée dans cette famille selon NUNES ET AL. [164]. De l'autre côté, il a été montré que *Artemia* est plus sensible par rapport aux crustacés *Daphnia similis* et *Ceriodaphnia dubia* au médicament niclosamide [164]. La sensibilité de l'*Artemia* dans les essais de toxicité des biosurfactants par rapport à d'autres organismes a été rapportée dans la littérature. SUN ET AL. [167] ont révélé que *A. salina* est le moins sensible à l'effet d'un sophorolipide produit par *Candida bombicola* ATCC22214 (une CL50 de 600 mg/L) par rapport au crustacé *Calanus sinicus*. Cependant, l'*Artemia* était plus sensible par rapport au bivalve *Mytilus edulis* où des concentrations supérieures n'en causées aucune mortalité après 24 h d'exposition. Un biosurfactant brut produit par *Pseudomonas cepacia* sur des huiles végétales usagées a montré une sensibilité supérieure *vis-à-vis Artemia salina* par rapport aux graines de chou (*Brassica oleracea*) exposées pendant 5 jours [168]. SILVA ET AL. [169] ont abouti au même constat quant à l'effet d'un rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 sur le glycérol. SANTOS ET AL. [170] ont révélé qu'une concentration de 0,08% conduisait à 100% de mortalité des larves d'*A. salina* après 24 h d'exposition, alors que la même concentration n'a provoqué aucune mortalité au mollusque bivalve *Anomalocardia brasiliana* après 96 h d'exposition à un biosurfactant produit par *Candida lipolytica*.

Il est clair d'après cette revue que l'*Artemia* est plus sensible à l'effet des biosurfactants par rapport aux bivalves ou par rapport aux graines de chou largement utilisés dans les essais de toxicité. Par contre, d'autres organismes comme la Daphnie, les microalgues ou la bactérie marine *Vibrio fisheri* ont montré une sensibilité élevée (globalement) en comparaison avec l'*Artemia*. Il est toutefois recommandé par APHA d'utiliser l'*Artemia* et les bivalves dans les essais de toxicité à court terme des dispersants des pétroles en milieu marin [170].

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Echantillonnage

2.1.1. Site de prélèvement

Le site retenu pour l'isolement des bactéries hydrocarbonoclastes aptes à croître dans des conditions de salinité proches à celles de l'eau de mer est le port de pêche de Khemisti (wilaya de Tipaza). Le choix de ce site est justifié par la forte contamination en produits pétroliers, essentiellement des huiles de vidange et de carburants, ce qui augmente la probabilité d'existence de ce type de microorganismes. La figure 2.1 montre la localisation du site.

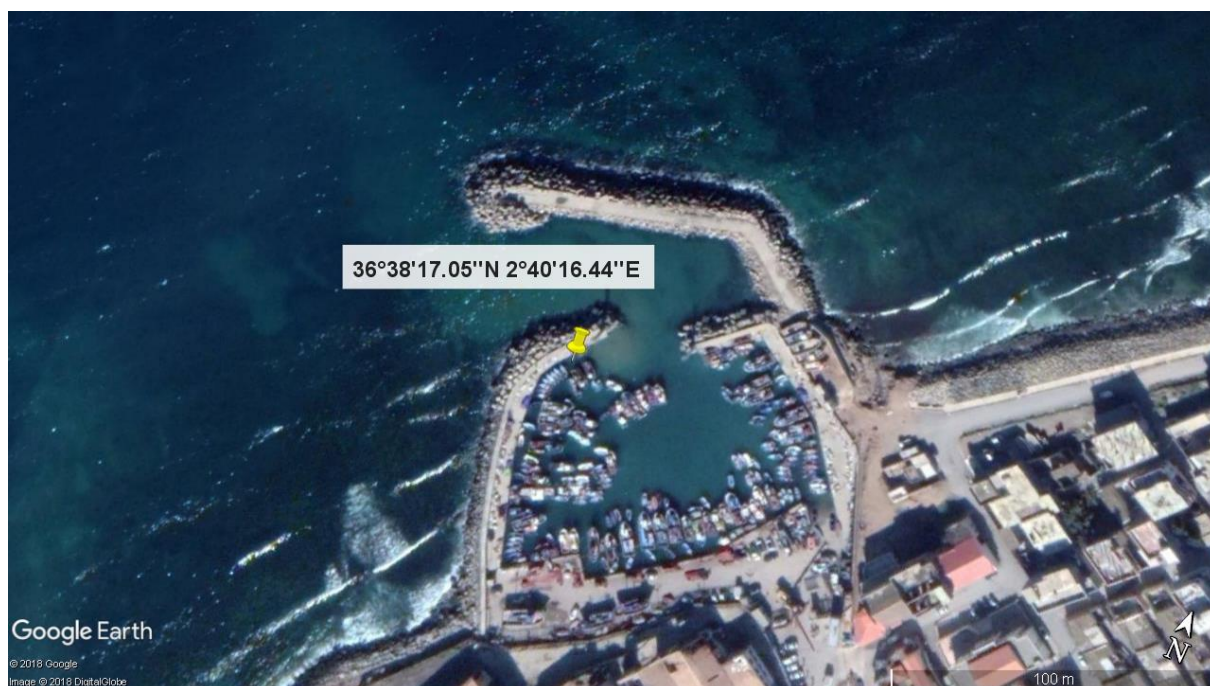


Figure 2.1 : Localisation du site d'échantillonnage du port de Khemisti.

2.1.2. Prélèvement des échantillons

Le prélèvement a été réalisé sur la couche superficielle du sédiment comme le montre la figure 2.2. Le sédiment a été prélevé dans des récipients en polypropylène stérile. Le transport des échantillons jusqu'au laboratoire a été effectué dans une enceinte thermostatée à +4 °C.



Figure 2.2 : Présentation de la station et prélèvement des échantillons au niveau du port de Khemisti.

2.2. Isolement et criblage des isolats bactériens marins hydrocarbonoclastes

2.1. Milieux de culture

Différents milieux sont préparés pour l'isolement, le criblage et la biodégradation des hydrocarbures. Leurs compositions sont indiquées comme suit :

- Milieu EMN : Eau de Mer Naturelle : une eau de mer prélevée d'un endroit non contaminé, d'une salinité de 36 ‰ préfiltrée sur papier filtrée ordinaire (20 μm de porosité).
- Ch-EMN-PB : Chitine- Eau de Mer Naturelle-Pétrole Brut : 4 g Chitine, 18 g agar, 1L EMN. Le milieu est réparti dans des boites de Pétri, puis laisser se solidifier. Par la suite, 1mL de pétrole brut est étalé à la surface des boites.
- Milieu EMN-PB : Eau de Mer Naturelle-Pétrole Brut : 18 g agar, 1L EMN et 1mL de PB.
- Milieu LB : Luria Bertani : 10 g peptone, 5 g extrait de levure, 23 g NaCl dans 1L d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec une solution de la soude caustique (NaOH, 1 mol/L). Pour la préparation de LB solide, 18 g d'agar sont ajoutées au milieu.
- MM : Milieu Minimum (g/L d'eau distillée) : NaCl (23), NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05). Le milieu est supplémenté de 1mL d'une solution des éléments traces métallique (ETM) (mg/L d'eau distillée) [171] : $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1500), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (190), $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100), ZnCl_2 (70), H_3BO_3 (6), $\text{Ma}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36) et HCl à 35% (6,7 mL). Le pH du milieu est ajusté à

7,0 ± 0,2 avec une solution de soude caustique (NaOH, 1M). Afin d'éviter la précipitation des sels après autoclavage, une solution mère de chlorure de calcium est préparée séparément, puis ajoutée au MM dans des conditions aseptiques.

Les milieux de culture, l'eau de mer naturelle, la solution de chlorure de calcium et le pétrole brut (rempli dans des flacons fermés hermétiquement) ont été stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min [172, 173].

2.2.2. Isolement et purification des isolats

Afin de sélectionner les populations bactériennes aptes à dégrader les hydrocarbures pétroliers, nous avons utilisé la méthode d'enrichissement, qui consiste à inoculer le consortium microbien du sédiment dans le milieu EMN dont le pétrole brut est la seule source de carbone et d'énergie. Des repiquages successifs ont été réalisés périodiquement. A la fin de cette étape, un volume de la suspension est étalé sur milieu gélosé (Ch-EMN-PB) en surface des boîtes de Pétri. Le protocole est détaillé comme suit :

Une quantité de 5 g de sédiment, prélevée à l'aide d'une spatule stérile, est ajoutée dans un volume de 100 mL d'EMN. Le contenu est agité au vortex pendant 2 min pour libérer le consortium bactérien du sédiment. Le PB est additionné au milieu à raison de 1% (v/v). Le milieu de culture est incubé à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min. Un témoin contenant de l'eau de mer et de pétrole est ainsi préparé. Trois repiquages successifs de la suspension microbienne à raison de 3% (v/v) ont été effectués chaque deux jours dans un milieu EMN-PB renouvelé. A la fin de cette étape, des dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁶) sont préparées à partir de 1 mL d'inoculum de la suspension microbienne. Un volume de 0,2 mL de chaque dilution est étalé sur la surface du milieu Ch-EMN-PB. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant trois jours. Les colonies obtenues font l'objet de purification par repiques successives sur milieux LB et EMN-PB solides, jusqu'à l'obtention des isolats purs. La purification est confirmée par observation microscopique (G:40×10). Dans ce cas, un fragment de colonies d'isolats est déposé sur lame mouillée avec quelques gouttes d'eau physiologique stérile (0,9% NaCl). Ensuite, on recouvre la

suspension avec une lamelle et on vérifie la présence d'une seule forme de cellules des isolats.

2.2.3. Conservation des isolats purifiés

2.2.3.1. Conservation à court terme

A l'aide d'une anse stérile, les tubes à vis contenant le milieu LB solide incliné sont ensemencés en stries par fragment de colonies des isolats purifiés. Les tubes sont incubés à 30 °C jusqu'au développement des colonies bactériennes (48 h), puis conservés à +4 °C.

2.2.3.2. Conservation à long terme

Une suspension bactérienne en phase exponentielle est mélangé au glycérol stérile à raison de 25 % afin d'empêcher la rupture des membranes cellulaires. Le mélange (glycérol/suspensions bactériennes) est homogénéisé au vortex. Ensuite, il est conservé à une température de -80 °C [123].

2.2.3. Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

Les isolats bactériens purifiés sont sujettes à une étape de criblage de leur pouvoir à utiliser le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie. Chaque isolat est, donc, cultivé dans le MM-PB. L'indice d'évaluation de l'activité métabolique sur le milieu contenant le pétrole est la croissance microbienne, estimée par mesure de la densité microbienne du trouble microbien à 600 nm. Le deuxième paramètre de suivi de l'utilisation du pétrole par les isolats bactériens est la mesure de la tension de surface (TS). Sachant que la sécrétion d'agents de surface par les microorganismes améliore l'accession au substrat hydrophobe, ce qui est facilement détecté par une diminution de la TS du milieu [174].

Dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de MM, une préculture bactérienne est inoculée à raison de 2% (v/v). Ensuite, un volume de 1 mL de PB est ajouté. Les erlenmeyers sont incubés à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 10 jours [175].

Mesure de la DO : Un volume de 2 mL de culture est prélevé régulièrement (chaque deux jours) dans des tubes eppendorfs stériles. Afin d'éviter une surestimation de

la DO, résultat de l'absorption des particules de pétrole, le bouillon est centrifugé à une vitesse de 10000 tr/min pendant 10 min. Le culot bactérien est récupéré puis remis dans une solution physiologique (NaCl à 9 g/L), vortexé pendant de 2 min avant de prendre la mesure de la DO à 600 nm [176].

Mesure de la TS : Un volume de 15 mL du bouillon est prélevé chaque trois jours. Il subit ensuite une centrifugation à une vitesse de 8000 tr/min pendant 20 min. La TS du surnageant de culture récupéré (qui constitue l'agent de surface extracellulaire) est mesurée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389) [149].

Après cette étape de criblage, la meilleure souche bactérienne ayant une croissance maximale sur le pétrole est retenue pour la suite du travail.

2.3. Caractérisation de la souche performante

2.3.1. Caractérisation phénotypique

2.3.1.1. Etude morphologique

La description macromorphologique de la souche (forme, relief, taille de la colonie, aspect de surface, des contours, transparence, consistance et couleur) s'effectue visuellement.

Les caractéristiques micromorphologiques (forme de la cellule, mode de regroupement, présence de spores et mobilité) sont directement observées au microscope optique (Gx40 et Gx100), après dépôt d'une goutte d'une culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, entre lame et lamelle. L'huile à immersion est utilisée avec le Gx100. Pour la mobilité de la souche, il faut surtout ne pas confondre entre le mouvement des cellules entraîné par le liquide (mouvement Brownien) dirigé en une seule direction et le mouvement propre des cellules s'effectue dans tous les sens. Par conséquent, un test confirmatif de la mobilité est réalisé sur tubes Mannitol-agar.

Test de mobilité : L'ensemencement de la souche est réalisé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur sur milieu Mannitol-Mobilité. L'incubation se fait à la température optimale (30 °C) de croissance de la souche étudiée pendant 24 h, afin de permettre à la bactérie de synthétiser les flagelles nécessaires à son

déplacement (figure 2.3). Si les bactéries sont mobiles, elles se disperseront à partir de la piqûre d'ensemencement créant un trouble dans le milieu sous forme d'arbre, sinon la bactérie est immobile.

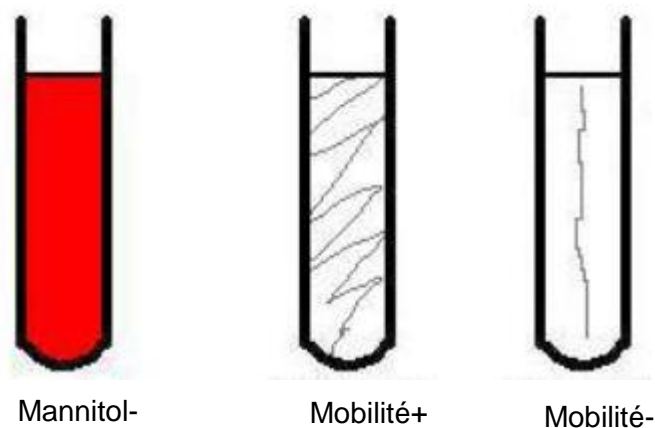


Figure 2.3 : Test de mobilité des bactéries.

2.3.1.2. Coloration de Gram

Une goutte de culture de la souche bactérienne en phase exponentielle de croissance est déposée sur une lame propre et fixée par passage par une flamme d'un bec Bunsen. Par la suite, la lame est rincée avec du cristal violet (violet de Gentiane) pendant une minute. Une étape de lavage avec de l'eau de robinet est nécessaire avant l'ajout de la solution d'iode (Iugol). L'action de l'iode dure une minute et puis une étape de décoloration par rinçage de la lame avec une solution de décoloration «DecolorizerCounterstain 3Step GRAM SAFRANINSKit Sigma» pendant 20 à 50 secondes. La dernière étape est la coloration des cytoplasmes incolores avec la fuchsine pendant une minute. La lame est ensuite séchée à l'air sec avant l'observation au microscope. Si la coloration obtenue est bleue violette, le test est qualifié de Gram positif, s'elle est colorée en rose, c'est de Gram négatif. En effet, les bactéries Gram+ possèdent une paroi riche en acides téchoïques, composant qui empêche l'alcool (contenu dans la solution décolorante) d'emporter le violet de gentiane et celui-ci reste dans le cytoplasme. Les lipides en grande quantité chez les Gram négatifs favorisent l'entrée de l'agent décolorant et faire ressortir le complexe violet de gentiane-Iugol du cytoplasme et rendre la coloration rose (ou rouge) après addition de la fuchsine en dernière étape de la coloration de Gram.

2.3.1.3. Détermination des conditions optimales et des paramètres de croissance

Les conditions optimales de croissance de la souche bactérienne étudiée sont déterminées en mesurant la vitesse spécifique de croissance en fonction de la salinité. La vitesse spécifique maximale de croissance μ_{\max} (exprimée en h^{-1}) est la vitesse mesurée pendant la phase exponentielle de croissance. Elle est déterminée en traçant la courbe Log (DO à 600 nm) en fonction du temps. La pente de la partie linéaire du graphe correspond à la valeur de μ_{\max} [177, 178].

Effet de la concentration en NaCl sur la croissance

Afin d'étudier l'influence de la salinité sur la croissance de la souche performante, la vitesse maximale de croissance a été mesurée en fonction de différentes concentrations en NaCl (0, 10, 23, 30, 50, 100, 150 et 250 g/L).

2.1.3.4. Test biochimique de l'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence l'enzyme phénylène diamine oxydase. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N,N-diméthyl-*p*-phénylène diamine. Sur une lame propre et sèche, on dispose un disque de papier filtre ordinaire et on l'imbibe avec du réactif oxydase. A l'aide d'une pipette pasteur boutonné on écrase une colonie de germe de la souche sur ce papier. Le test est oxydase (+) si la bactérie prend une teinte rose, violette. Dans le cas contraire (pas de coloration) le test est négatif.

2.1.3.5. Test biochimique de la catalase

Sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée. À l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on ajoute l'inoculum bactérien d'une culture jeune, en phase exponentielle de croissance. L'apparition de bulles (dégagement gazeux de dioxygène), indique que le test est catalase (+). L'absence des bulles indique que le test est catalase (-). La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et dioxygène (O_2).

2.3.2. Caractérisation phylogénétique

Le gène codant pour l'ARNr 16S de la souche performante a été amplifié par la réaction en chaîne par polymérase en chaîne (PCR), en utilisant un système de PCR Stratagene (gradient Robocycler 96) avec de l'ADN polymérase GoTaq

(Promega, Madison, WI, USA). Les deux amorces universelles Fd1 et Rd1 (Fd1, 5' 'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Rd1, 5'-AAGGAGG-TGATCCAGCC-3 ') ont été utilisées pour obtenir un produit de PCR de taille suffisante en pb.

Un fragment d'environ 1500 pb du gène de l'ARNr 16S a été amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche, cloné dans le vecteur pGEM-T Easy et séquencé sur les deux brins pour établir un support supplémentaire afin d'identifier la souche. Les positions de la séquence et l'ambiguïté de l'alignement ont été omises dans une première étape. Les recherches de similitude entre la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et les séquences disponibles dans la banque de séquences d'ADNs (GenBank) se font par l'intermédiaire du programme BLAST disponible sur le site NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Dans notre cas, une analyse de distance basée sur 969 pb nucléotides non ambigus est effectuée en utilisant la méthode du NeighborJoining, avec correction de JUKES ET CANTOR [179]. L'arbre phylogénétique, ou dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche étudiée est généré en utilisant le logiciel Mega version version [180].

La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche performante est déposée dans les bases de données des nucléotides : GenBank/DDBJ/EMBL.

2.4. Etude de la biodégradation des hydrocarbures

2.4.1. Etude de la biodégradation du pétrole

Tout d'abord, l'effet des facteurs physicochimiques (salinité, pH et concentration du pétrole brut) sur la capacité de dégradation de la souche bactérienne a été évalué en mesurant la DO à 600 nm des cultures. La salinité a été étudiée tout en variant la concentration en NaCl (g/L) : 10, 23, 50 et 100. L'effet du pH a été testé pour la gamme suivante : 4, 5, 6, 7, 8 et 9. Alors que la concentration du pétrole a été examinée avec les concentrations : 1, 2, 3 et 5% (v/v). Les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de MM. Le pH est ajusté à 7. Après stérilisation du milieu, un inoculum de 2% d'une préculture de la souche a été ajouté au MM, de même que le PB à 1% (v/v). Les cultures sont incubées à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 13 jours. Un volume de 5 mL est prélevé régulièrement à différents temps (0, 3, 7 et 13 jours) pour la mesure de la DO.

Par la suite, une étude plus détaillée, sur la cinétique de dégradation du pétrole brut par cette souche ainsi que l'effet de la concentration du PB, a été évaluée par analyse GC-MS des n-alcanes présents dans les échantillons testés. Dans ce cas, les conditions opératoires sont : un pH du MM-PB de 7, une salinité de 23 g/L NaCl et un inoculum de 2% (v/v). Des témoins chimiques MM-PB (sans inoculation) ont été préparés dans les mêmes conditions afin d'évaluer les pertes abiotiques du pétrole brut. La cinétique de biodégradation du pétrole brut a été suivie sur une période de 21 jours. Trois concentrations de PB ont été examinées : 1, 2 et 5% (v/v). Le volume entier des erlenmeyers (50 mL) est sacrifié à chaque prélèvement. Le pétrole résiduel est extrait séquentiellement, deux fois, par un volume égal de dichlorométhane dans des ampoules à décanter. La phase organique a été desséchée sur du sulfate de sodium anhydre, concentrée à sec dans un Rotavap à 40 °C avant de passer à l'analyse CG-SM.

L'appareil utilisé pour l'analyse GC-MS est de type Agilent 19091S-433 avec une colonne capillaire HP-5 MS 5% phénylméthylsiloxane (température maximale de 325 °C, longueur nominale de 30,0 m, diamètre nominal de 250,00 µm, épaisseur nominale du film 0,25 µm, pression nominale initiale de 8,81 psi, débit initial de 1,0 ml/min et vitesse moyenne de 37 cm/s). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit total de 53,9 mL/min. La température initiale du four a été programmée à 70 °C pendant 2 min, augmentée à 230 °C avec un débit de 20 °C/min puis ré-augmentée à 300 °C avec un débit de 40 °C/min pendant 10 min. L'injection a été réalisée en mode *splitless* avec un volume injecté de 1 µL [175].

2.4.2. Etude de la biodégradation des hydrocarbures modèles

2.4.2.1. Préparation des hydrocarbures

Cette étude s'est concentrée sur six composés d'hydrocarbures : deux n-alcanes représentées par l'hexadécane (n-C₁₆H₃₄) et le tétracosane (n-C₂₄H₅₀) et quatre polyaromatiques qui sont le naphthalène (C₁₀H₈), le phénanthrène (C₁₄H₁₀), l'anthracène (C₁₄H₁₀) et le pyrène (C₁₆H₁₀).

Les quatre HAP (solides) ont été utilisés à une concentration de 100 mg/L. Tandis que les n-alcanes ont été utilisées avec une concentration de 1000 mg/L. Pour ce faire, une solution mère d'HAP de 10 g/L a été préparée dans l'acétate

d'éthyle. Ensuite, 1mL de cette solution a été ajouté à 100 mL de MM avant l'inoculation. Le milieu ainsi préparé est laissé sous la hotte pendant environ 3 h afin de permettre l'évaporation du solvant. Pour le tétracosane, une quantité de 100 mg a été ajoutée directement dans 100 mL de MM après inoculation. L'hexadécane a été stérilisé sur filtre seringue de 0,45 μm puis additionné à 100 mL de MM à raison de 0,129 % (v/v).

2.4.2.2. Biodégradation des hydrocarbures

Les cultures contenant les hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie (avec un inoculum de la souche performante de 2 %, v/v) sont maintenues en conditions agitées (150 tr/min) à 30 °C pendant 14 jours. Durant cette période, une mesure des paramètres suivants est réalisée régulièrement :

- Croissance bactérienne : mesure de la DO à 600 nm du trouble bactérien des cultures.

- Un balayage UV : afin de suivre l'évolution des composés aromatiques au cours de la dégradation des HAP, le surnageant a été analysé par balayage dans la région de 200 à 400 nm moyennant un spectrophotomètre UV-Visible (modèle Jasco V-630). Ceci 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 [181].

- Une mesure de la TS : l'abattement de la TS est mesuré comme moyen de détection des biosurfactants, sécrétés dans le milieu pour solubiliser les hydrocarbures. La mesure est réalisée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389).

Pour le dosage des hydrocarbures résiduels, le volume entier du milieu (50 mL) est extrait à volume égal avec de l'hexane. L'extraction est réalisée dans une ampoule à décanter. Le mélange est bien agité, laissé au repos pendant 15 min, puis la phase organique (la couche supérieure) est récupérée et desséchée avec du Na_2SO_4 anhydre. Enfin, les hydrocarbures (HAP et alcanes) sont analysés par CG-SM (QP5050 SHIMADZU), avec les conditions opératoires suivantes : Le gaz porteur, utilisé à un débit de 1 mL/min, est l'hélium. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de la température est comme suit : 2

min à 50 °C, puis la température augmente jusqu'à atteindre 280 °C à raison de 5 °C/min et se stabilise à cette température pendant 15 min. L'injection se fait en mode Split 1/52, le volume injecté est 1 µL.

2.5. Production et caractérisation de biosurfactant

2.5.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

La capacité productrice de treize souches bactériennes a été évaluée par mesure de la TS de surnageant des cultures dans le MM additionné d'huile d'olive. Ce substrat est considéré comme l'un des meilleures sources de carbone induisant la production de biosurfactant [182-184]. Les conditions de cultures sont : 100 mL de MM additionné de 1% (v/v) de l'huile d'olive et 2% de l'inoculum bactérien. L'huile d'olive a été stérilisée séparément sur filtre seringue de 0,45 µm puis ajoutée au milieu. Les cultures sont maintenues à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min. La production de biosurfactant a été suivie pendant 3 jours.

2.5.2. Evaluation de la production de biosurfactant

La détection de biosurfactant a été évaluée par : le test de déplacement de pétrole par la mesure de diamètre de déplacement du pétrole (DDP), mesure de la tension de surface (TS) et de l'activité émulsifiante par l'indice d'émulsification (E24).

Pratiquement, un volume bien déterminé de la culture bactérienne a été centrifugé à 3900 tr/min. Le surnageant ainsi récupéré a été filtré sur papier filtre ordinaire. Le volume de surnageant de culture utilisé dépendra de la technique de mesure employée.

Tension de surface : CF la section 2.2.3

Test de déplacement de pétrole :

Dans une boîte de Pétri d'un diamètre de 90 cm contenant 10 mL d'eau distillée, un volume de 20 µL de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau distillée. Ensuite, 10 µL du surnageant de culture est légèrement placé au centre de la couche de pétrole. Le diamètre (en cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes [185]. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante (figure 2.4).

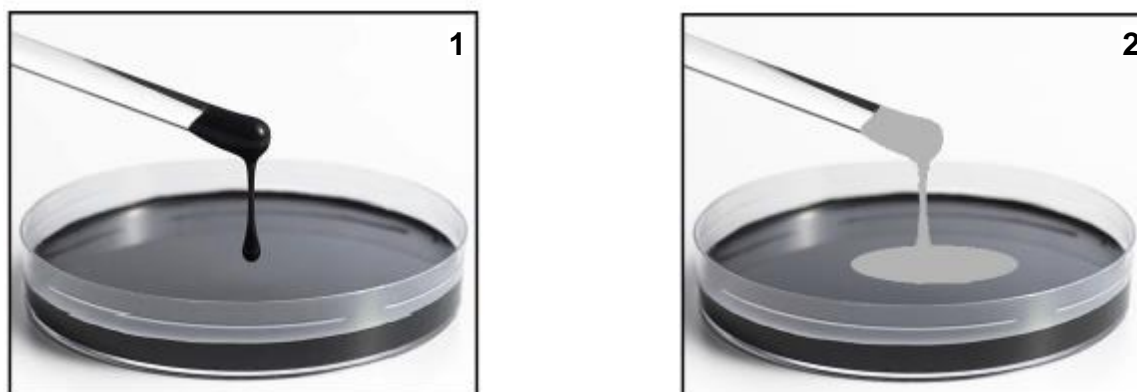


Figure 2.4 : Test de déplacement de pétrole. *Etape 1 : Couche huileuse de pétrole noir. Etape 2 : Effet de l'ajout de biosurfactant et formation d'un halo transparent mesuré en cm.*

Indice d'émulsification

Un volume de 4 mL de surnageant de culture est mélangé avec 4 mL de substrat hydrophobe (pétrole, gasoil, huile d'olive, etc...). Le mélange est ensuite agité au vortex pendant 2 min à vitesse maximale, puis laissé au repos pendant 24 h à l'obscurité avant de prendre la mesure.

L'activité émulsifiante ou l'indice d'émulsification (E24) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion (He) formée et la hauteur totale (Ht) du mélange [186, 187] (figure 2.5).

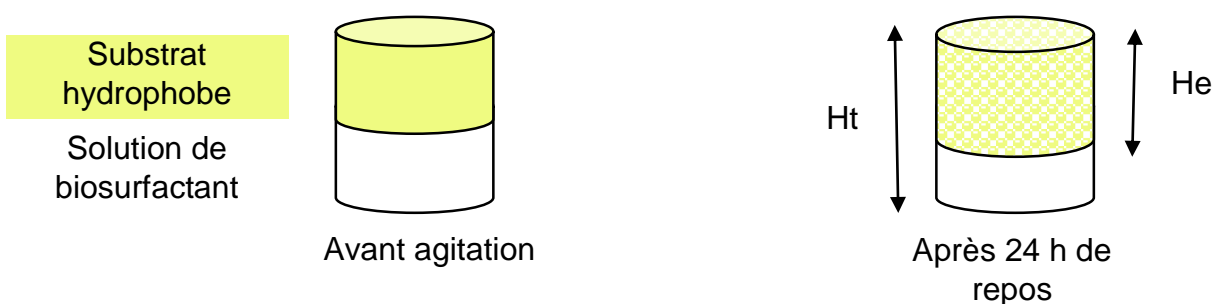


Figure 2.5 : Test de l'indice d'émulsification.

Il s'exprime en pourcentage par la formule suivante : $E24 (\%) = He/Ht \times 100$.

2.5.3. Optimisation de la production de biosurfactant

Cette partie a été réalisée avec une culture de la souche à fort potentiel de production de biosurfactant, sélectionnée après l'étape de criblage. L'optimisation

des facteurs consiste à varier les concentrations d'un facteur en gardant les autres fixes. Après avoir déterminé la valeur optimale du premier facteur, nous passons successivement à l'optimisation de la concentration des autres facteurs. En outre le suivi de l'activité de surface et émulsifiante du biosurfactant, nous avons suivi l'évolution du pH et la croissance bactérienne dans le milieu de production.

2.5.3.1. Choix de meilleur substrat carboné "déchet"

Six substrats carbonés, dont quatre sont déchets, ont été utilisés à savoir : la mélasse (Mé), l'huile de friture (HF), huile moteur usagée (HMU) et la margine (Ma). L'effet de ces substrats sur la synthèse de biosurfactant par la souche efficace a été comparé à celle en utilisant deux substrats carbonés couramment utilisés en production de biosurfactant, en l'occurrence, l'huile d'olive et le glucose. Ces derniers sont stérilisés sur un filtre seringue (0,45 et 0,22 μm respectivement), tandis que les autres substrats sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. Les substrats insolubles sont ajoutés au MM à raison de 2% (v/v), alors que les composés solubles (mélasse et glucose) sont additionnés à une concentration de 20 g/L. Le milieu de production a été incubé à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant trois jours.

2.5.3.2. Influence de la source d'azote

Cinq sources d'azote (utilisées à une concentration de 0,4 g/L) ont été évaluées avec la meilleure source de carbone. Il s'agit de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), de nitrate de potassium (KNO_3), de sulfate d'ammonium [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) et de l'urée [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$]. Ces composés ont été stérilisés séparément sur filtre seringue (0,45 μm).

2.5.3.3. Influence de rapport C/N

Les meilleures sources de carbone et d'azote ont été testées de façon à obtenir cinq rapports C/N (g substrat carboné/g substrat azoté) de 5, 10, 25, 40 et 50. Pour cela, la concentration de l'azote a été fixée à 0,4 g/L alors que la concentration de la source carbone a été variée.

2.5.3.4. Influence du pH

L'effet du pH sur la production de biosurfactant a été déterminé en faisant varier le pH initial du MM avec des solutions de 1 mol/L de HCl ou de NaOH. La gamme du pH testée est la suivante : 4, 5, 6, 7, 8 et 9.

2.5.3.5. Influence de la salinité

L'effet de la salinité a également été étudié. En effet, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au MM (avec les paramètres optimisés) à différentes concentrations : 0,5 ; 10 ; 23 ; 50 ; 100 g/L NaCl.

2.5.4. Cinétique de production du biosurfactant

La cinétique de production de biosurfactant de la souche productrice dans le MM (dans les conditions optimisées) a été suivie pendant sept jours. La réduction de la TS et la croissance bactérienne ont été suivies parallèlement afin de déterminer la phase de croissance adéquate pour la synthèse de biosurfactant.

2.5.5. Extraction et purification partielle du biosurfactant

Après trois jours de culture et lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le milieu (cela est vérifié par un examen rapide avec le test de déplacement de pétrole), le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 3900 tr/min pendant 30 min suivi par une filtration sur papier filtre ordinaire. Le surnageant correspondant au biosurfactant brut est partiellement purifié selon deux protocoles :

- Dans le premier protocole, nous avons tenté de précipiter le biosurfactant par acidification à pH 2 à l'aide d'une solution de HCl (6 mol/L), une conservation à froid à +4 °C pendant une nuit et une centrifugation à vitesse maximale de 3900 tr/min pendant 30 min [121].
- La deuxième méthode consiste à prendre tout le volume du surnageant et faire l'extraction, volume par volume deux fois, par un solvant faiblement polaire (l'acétate d'éthyle) dans une ampoule à décanter (la phase aqueuse de la première extraction est reprise dans une deuxième extraction par le solvant). La phase organique ainsi obtenue est déshydratée de l'eau par l'ajout du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄), qui absorbe les traces

d'humidité en formant un bloc solide. Le solvant d'extraction est éliminé par la suite par évaporation à 40 °C dans un système sous vide (un Rotavap). Le produit obtenu de cette étape est partiellement purifié par lyophilisation. L'opération consiste à congeler le biosurfactant à une température d'environ -18 °C pendant deux jours puis le lyophiliser à - 59 °C sous une pression de 0,0012 mbar [188].

Après cette étape, nous passons à produire le biosurfactant dans un erlenmeyer de 5 L avec un volume opérationnel de 2 L.

2.5.6. Caractérisation du biosurfactant

2.5.6.1. Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la méthode de dilution en mesurant la TS de chaque dilution, puis en traçant la courbe de la TS en fonction de la concentration de la solution du biosurfactant brut. La concentration du biosurfactant, au-delà de laquelle la tension de surface ne change pas, est définie comme étant la CMC.

2.5.6.2. Pouvoir émulsifiant

Afin d'évaluer le pouvoir d'émulsifiant (E24) du biosurfactant issu de la souche productrice, une solution de biosurfactant (1 g/L) a été testée contre sept substrats hydrophobes de différentes nature à savoir : le toluène, l'hexane, l'huile d'olive, l'huile végétale, le gasoil, l'essence et le pétrole brut.

2.5.6.3. Stabilité du biosurfactant

La stabilité du biosurfactant a été testée avec des solutions de biosurfactant à la CMC. Les paramètres affectant la stabilité de biosurfactant rapportés dans la littérature sont : la température, le pH et la salinité. Cette stabilité a été évaluée par le test de déplacement de pétrole.

➤ Effet de la température

La stabilité thermique est examinée par incubation des solutions de biosurfactants à différentes températures : 30, 50, 70, 100 °C pendant 1 h, à +4 °C et par congélation (-18 °C) pendant 24 h et par autoclavage à 121 °C pendant 20

min. L'activité tensioactive a été mesurée après que les solutions de biosurfactants atteignent la température ambiante.

➤ Effet du pH

L'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH initial de la solution du biosurfactant de 2 à 12 en utilisant des solutions 1 mol/L de HCl ou de NaOH.

➤ Effet de la salinité

Pour déterminer l'effet de la salinité, le NaCl a été ajouté aux solutions de biosurfactant afin d'obtenir les concentrations suivantes : 0, 20, 40, 70, 100, 150 et 200 g/L.

2.5.6.4. Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF

Le biosurfactant partiellement purifié a été analysé à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker-TENSOR 27. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés dans la région située entre 400 et 4000 cm^{-1} et enregistrés par un logiciel OPUS. Une goutte de biosurfactant est déposée au centre d'une pastille de bromure de potassium KBr de 1 à 2 mm d'épaisseur, préalablement préparée par compression d'une quantité d'environ 100 mg à une pression allant jusqu'à 7000 kg/cm^2 à l'aide d'une presse hydraulique.

Le spectre IRTF du biosurfactant brut a été enregistré par le logiciel OPUS en mode transmittance sous format « dx » pour permettre sa lecture par la suite avec un logiciel SPECAMP, 1.4.2, © 2012 – serge LAGIER, édition française.

2.6. Etude de la toxicité de biosurfactant, pétrole et fractions pétrolières vis-à-vis l'*Artemia*

Il s'agit d'un test de toxicité aiguë à court terme en utilisant des nauplius d'*Artemia* de deuxième stade. Les cystes d'*Artemia* ont été fournies par la société INVE Aquaculture Nutrition, USA, et les organismes éclos appartiennent à l'espèce *Artemia franciscana*. Les étapes d'élevage permettant d'obtenir des nauplius de deuxième génération d'*A. franciscana* sont élucidées en annexe 1.

Les bioessais ont été réalisés selon le protocole décrit par VANHAECKE ET AL. [162]

2.6.1. Déroulement des essais

Les différentes étapes sont résumées comme suit :

- 1) Préparation des solutions du toxique (matériel testé). Si la toxicité de produit est inconnue, un test préliminaire avec des concentrations décimales (ou pourcentages décimaux) est préférentiellement procédé, afin de déterminer la gamme de concentration dans laquelle est située la Concentration Létale médiane (CL50) (p. ex : 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ... mg/L, etc.);
- 2) Un volume de 10 mL de chaque solution est distribué sur boîtes de Pétri d'un diamètre de 60 mm dans laquelle 10 individus d'*Artemia* sont prises à l'aide d'une pipette Pasteur dans un volume minimale (près du col de la pipette Pasteur) ;
- 3) Triplicata pour chaque concentration de solution testée ainsi que du témoin approprié sont préparés ;
- 4) Les boîtes sont mises dans un incubateur à 25 °C à l'obscurité pendant 24 h ;
- 5) Après 24 h d'incubation, les nombres d'*Artemia* morts et totaux dans chaque boîte ont été déterminés. Le taux d'oxygène dans la dilution minimale qui tue 100% des individus, a également été mesuré. Ce taux ne doit pas être inférieur à 2 mg/L pour que le test soit considéré valide.

2.6.2. Matériel testé

2.6.2.1. Toxique de référence

Le toxique de référence est le surfactant synthétique Dodécylsulfate de sodium (SDS). Il sert comme un contrôle positif pour la validité de l'essai. Les concentrations testées (préconisé par VANHAECKE ET AL. [162]) sont les suivantes (mg/L) : 10 ; 13,5 ; 18 ; 24 et 32. La CL50 du SDS doit se situer entre 13,3 et 19,9 mg/L pour que le test soit valide.

2.6.2.2. Surfactant Tween 80

Un test préliminaire avec une solution mère de 20 g/L a été réalisé pour le surfactant Tween 80. Les dilutions décimales préparées sont : 1, 10, 100, 1000 et 10000 mg/L.

2.6.2.3. Biosurfactant

La gamme de concentration choisie s'étale des concentrations inférieures, égales et supérieures à la CMC du biosurfactant.

2.6.2.4. Pétrole brut et ses fractions majoritaires

2.6.2.4.1. Pétrole brut

Les tests sur l'*Artemia* étant réalisés avec des solutions aqueuses, le pétrole est cependant très peu soluble dans l'eau. Pour résoudre ce problème, le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été utilisé (possédant la propriété de solubiliser les composés polaires et apolaires) et connu de sa faible toxicité. D'après les tests effectués, le maximum de solubilité du pétrole dans ce solvant est 0,4 % (v/v). En effet, une série de dilution de pétrole dans 25 mL de DMSO a été préparée pour couvrir les concentrations (v/v) de 0,006; 0,016; 0,1; 0,2; 0,3 et 0,4%. À partir de chaque solution, un volume de 2 mL a été prélevé et complété à 20 mL d'eau de mer (soit 10 % en DMSO) pour obtenir les concentrations suivantes : 3 ; 7 ; 43 ; 85 ; 128 et 171 mg/L. Un témoin en triplicatas avec 10% DMSO seul a été préparé.

2.6.2.4.2. Fractions du pétrole

Le pétrole est composé principalement d'une fraction aliphatique, aromatique et polaire dont le pourcentage varie selon l'origine du pétrole brut. Le protocole de fractionnement de pétrole brut est cité dans l'annexe 2.

➤ Fraction aliphatique

À partir d'une solution mère de la fraction aliphatique (préparée dans le DMSO), nous avons prélevé 30 ; 160 ; 320 ; 950 ; 1590 et 2000 μ L à l'aide d'une microseringue de 200 μ L et complété à 25 mL avec de l'eau de mer pour obtenir les concentrations : 13 ; 70 ; 141 ; 418 ; 700 et 880 mg/L. Un témoin pour chaque

dilution a été préparé en parallèle, ce qui correspond à un ratio (DMSO/EMN) de 0,12 à 8 % (v/v).

D'après nos essais, la fraction aliphatique est mieux soluble dans le DMSO par rapport au pétrole et par rapport à la fraction aromatique. Des solutions mères de 11 à 14,5 g/L de la fraction aliphatique dans le DMSO ont été préparées avec succès.

➤ Fractions aromatique et polaire

La solubilité très faible des fractions aromatique et polaire dans le DMSO et dans l'eau de mer n'a pas permis leur utilisation dans les bioessais de toxicité sur l'*Artemia*.

2.6.3. Détermination de la CL50 et traitement statistique des résultats

Les résultats ont été calculés par analyse *probit* en utilisant le logiciel XSTAT, 2015 (version d'évaluation) et exprimés en Concentration Létale Médiane après 24 h d'exposition (CL50-24 h).

3.7. Bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole

3.7.1. Essai de solubilisation du pétrole

L'essai de solubilisation du pétrole brut a été réalisé en utilisant le milieu EMN. Une solution concentrée de biosurfactant a été ajoutée à l'eau de mer de manière à avoir sa CMC dans 50 mL de milieu. Le PB a ensuite été ajouté à une concentration de 1% (v/v). Un surfactant chimique (Tween 80) a été préparé dans les mêmes conditions et choisi comme témoin positif. Alors que le milieu EMN-PB (sans ajout de surfactants) est pris comme témoin négatif. Les échantillons ont été placés à l'obscurité à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 24 h. Les échantillons sont ensuite transférés dans des ampoules à décanter pendant 24 h pour permettre la séparation des phases [189]. Un volume de 30 mL a été recueilli à partir du fond en prenant soin de ne pas drainer la couche huileuse de pétrole. La phase aqueuse récupérée (contenant les hydrocarbures solubilisés) a été extraite deux fois (v/v) avec du dichlorométhane, desséchée sur Na₂SO₄, concentrée sous vide à 1mL et analysée par CG-SM selon les conditions suivantes : La température

initiale du four a été programmée à 50 °C pendant 2 min, augmentée jusqu'à 280 °C à 5°C/min et stabilisée à cette température pendant 15 min. Un échantillon de PB dilué directement dans le dichlorométhane a été analysé par CG-SM et aidera à identifier les n-alcanes présents dans le pétrole brut.

3.7.2. Essais de bioremédiation

3.7.2.1. Réalisation des expériences

Une série d'expériences a été menée pour étudier la biostimulation et la bioaugmentation de la flore autochtone (d'une eau de mer non stérile) et allochtone (représentée par un inoculum de la souche performante) dans l'eau de mer contaminée par le pétrole. L'essai s'est déroulé à température ambiante (entre 27 – 33 °C dans le jour) sous une agitation de 150 tr/min et pendant 38 jours. Les expériences sont résumées comme suit :

Expérience (1) : Contrôle négatif : 1% (v/v) PB + 200mL EMN.

Expérience (2) : Contrôle positif : 1% (v/v) PB + 200 mL EMN non stérile.

Expérience (3) : Bioaugmentation : 1% PB + 3% d'inoculum de la souche performante + 200 mL EMN.

Expérience (4) : Biostimulation avec nutriments : 1% PB + 0,1% (m/v) NH_4Cl + 0,1% (m/v) KH_2PO_4 + 0,1% (m/v) K_2HPO_4 + 3% d'inoculum de la souche + 200 mL EMN.

Expérience (5) : Biostimulation avec biosurfactant : 1% PB + (2 × CMC) biosurfactant + 3% d'inoculum de la souche + 200 mL EMN.

Chaque expérience est répétée en duplicata.

3.7.2.2. Paramètres de suivi

3.7.2.2.1. Croissance bactérienne

La croissance bactérienne a été contrôlée périodiquement par des mesures de la DO à 600 nm et par comptage de la microflore totale (CFU/mL) à la fin des expériences.

➤ Dénombrement de la flore bactérienne totale

Afin de connaître la densité bactérienne dans les différentes expériences, un dénombrement de la microflore bactérienne existante sur milieu LB solide a été réalisé.

À la fin des expériences, 1 mL de chaque échantillon est ajouté à 9 mL de l'eau physiologique stérile. Selon l'état de la croissance dans chaque expérience, des dilutions successives (peut aller jusqu'à 10^{-9}) ont été préparées. De chaque dilution, 0,2 mL de la suspension bactérienne est étalée sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu LB gélosé. Pour chaque dilution, deux boîtes de Pétri sontensemencées. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 h. Après cette période, les colonies développées et dénombrables (entre 15 et 300 colonies) sont prises en compte.

Le nombre de germes par mL est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des colonies dénombrables en tenant compte des facteurs de dilution :

$$N = n / (d \times v)$$

N : nombre des microorganismes en UFC/mL.

n : nombre des colonies dénombrées.

v : Volume prélevé (0,2 mL).

d: Dilution.

2.7.2.2.2. Dosage du pétrole résiduel

Après 38 jours d'incubation, le milieu de culture contenant le pétrole résiduel et son témoin sont soumis à l'extraction liquide-liquide par solvant (dichlorométhane). Pour cela, le volume entier de chaque erlenmeyer (50 mL) a été déversé dans une ampoule à décanter de 250 mL et subit une agitation manuelle pendant 10 min suivi d'une phase de repos de 15 min. L'extraction a été répétée deux fois et la phase organique combinée est déshydratée de l'eau par ajout du sulfate de sodium anhydre, puis séchée à une température ambiante sous la hotte. Le pétrole résiduel est pesé par la suite avec une balance analytique à 0,1 mg près [190].

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Biodégradation des hydrocarbures par les hydrocarbonoclastes marins

3.1.1. Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

Les sites contaminés (sol, sédiment, eau) par des substances xénobiotiques (hydrocarbures) contiennent une variété de microorganismes ayant un potentiel biodégradatif très élevé. Ces microorganismes peuvent être exploités dans plusieurs domaines notamment la bioremédiation. En effet, quinze (15) souches bactériennes aérobies ont été isolées à partir d'un sédiment contaminé par des hydrocarbures pétroliers (port de Khemisiti, W. Tipaza). Le criblage est basé sur l'appétit bactérienne à croître dans un milieu à base du pétrole comme unique source de carbone et d'énergie, comme le montre le tableau 3.1.

D'après les résultats obtenus, l'isolat SdK644 s'est révélé le meilleur et a manifesté par une bonne croissance sur le pétrole brut utilisé comme seule source de carbone et d'énergie (tableau 3.1 et figure 3.1). Cela s'est accompagné d'une réduction de la TS du milieu en dessous de 40 mN/m. A titre d'exemple, après 10 jours d'incubation les valeurs de la DO_{600nm} et de la TS sont respectivement 0,867 et 38 mN/m. Cela indique que cet isolat est un bon producteur de biosurfactant [191]. En outre, en comparaison avec les DO enregistrées au début de l'expérience, les résultats montrent que la plupart des isolats ont la capacité de croître sur le pétrole brut en tant que source unique de carbone et d'énergie, et permettent une réduction de la TS du milieu. En effet, la sécrétion des biosurfactants par les microorganismes hydrocarbonoclastes est l'un des mécanismes impliqués dans l'amélioration de l'accessibilité des hydrocarbures aux microorganismes [16]. ALI KHAN ET AL. [192] ont signalé que des souches bactériennes productrices de biosurfactant (*Pseudomonas poae* BA1, *Acinetobacter bouvetii* BP18, *Bacillus thuringiensis* BG3 et *Stenotrophomonas rhizophila* BG32) ont amélioré la dégradation de diesel de 16–28% par rapport à une souche non productrice (*Pseudomonas rhizosphaerae* BP3). Parmi les onze (11) souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées à partir des sédiments et de l'eau de mer, HASSANSHAHIAN ET AL. [193] ont trouvé que la valeur maximale de la DO (0,7)

est atteinte pour la souche performante, dans un milieu minéral supplémenté du pétrole brut à 1% (v/v). En outre, MNIF ET AL. [190] ont sélectionné huit (08) souches bactériennes aérobies, thermophiles et mésophiles (37 °C et 55 °C) et halotolérantes (10, 50 et 100 g/L NaCl) dégradant le pétrole brut (1%, v/v) après un criblage de quinze (15) isolats bactériens. Des résultats similaires à nos résultats, en ce qui concerne la croissance (DO à 600) et la réduction de la TS, ont été obtenus par ces auteurs. Les DO maximales affichées pour les souches mésophiles sont comprises entre 0,6 et 1,2 et les valeurs de la TS oscillent entre 35,9 et 41,2 mN/m.

Tableaux 3.1 : Croissance microbienne et activité de surface des souches bactériennes cultivées dans le MM-PB après 10 jours d'incubation.

| Isolat | Densité optique à 600 nm ^a | Tension de surface (mN/m) ^b |
|--------|---------------------------------------|--|
| SdK6 | 0,487(0,025) ^c ±0,01 | 50,4±5,0 |
| SdK25 | 0,444(0,065)±0,02 | 42,2±2,1 |
| SdK3 | 0,524(0,046)±0,02 | 42,1±2,5 |
| SdK7 | 0,568(0,065)±0,06 | 42,2±3,0 |
| SdKB | 0,385(0,055)±0,05 | 51,3±2,1 |
| SdKA | 0,649(0,083)±0,02 | 49,8±4,5 |
| SdK644 | 0,867(0,055)±0,08 | 38,0±0,4 |
| SdK22 | 0,477(0,034)±0,04 | 45,6±2,3 |
| SdK4 | 0,795(0,063)±0,02 | 48,9±2,4 |
| SdK1 | 0,438(0,037)±0,00 | 43,4±0,4 |
| SdK8 | 0,412(0,03)±0,04 | 49,2±1,0 |
| SdK51 | 0,551(0,051)±0,02 | 41,7±0,2 |
| SdK645 | 0,529(0,04)±0,02 | 41,0±0,6 |
| SdK641 | 0,448(0,035)±0,03 | 50,6±3,5 |
| SdK643 | 0,3869(0,041)±0,03 | 47,6±3,8 |

^a Classement de la croissance des isolats selon RAHMAN ET AL. [194]

0,21–0,4 : croissance faible, 0,41–0,6: croissance modérée,
0,61–0,80: croissance élevée, > 0,80: croissance excellente.

^bLa tension de surface du témoin MM : 53,1±2,2 mN/m.

^cDO_{600 nm} initiale des isolats.



Figure 3.1 : Aspect visuel de la biodégradation du pétrole.

3.1.2. Caractérisation de la souche SdK644

La souche SdK644 est isolée à partir d'un consortium microbien enrichi par le pétrole, en présence d'une eau de mer de salinité de 3,5% (m/m). Elle se présente sous la forme de coccobacilles. Sur boîtes de Pétri, les colonies ont la forme ronde régulière, d'une taille de 5 mm, plates, lisses, d'une consistance gluante, translucides et d'une coloration marron claire à sécrétion abondante (figure 3.2). La souche SdK644 est Gram (-), immobile, catalase (+) et oxydase (+).



Figure 3.2 : Forme des colonies de la souche SdK644 cultivée dans le milieu LB, après 48 h d'incubation.

3.1.2.1. Effet de la salinité sur la croissance de la souche SdK644

La souche SdK644 est classée comme halotolérante extrême du fait qu'elle croît entre 0 et 150 g/L en NaCl, avec un optimum qui se situe entre 10–30 g/L en NaCl (Figure 3.3).

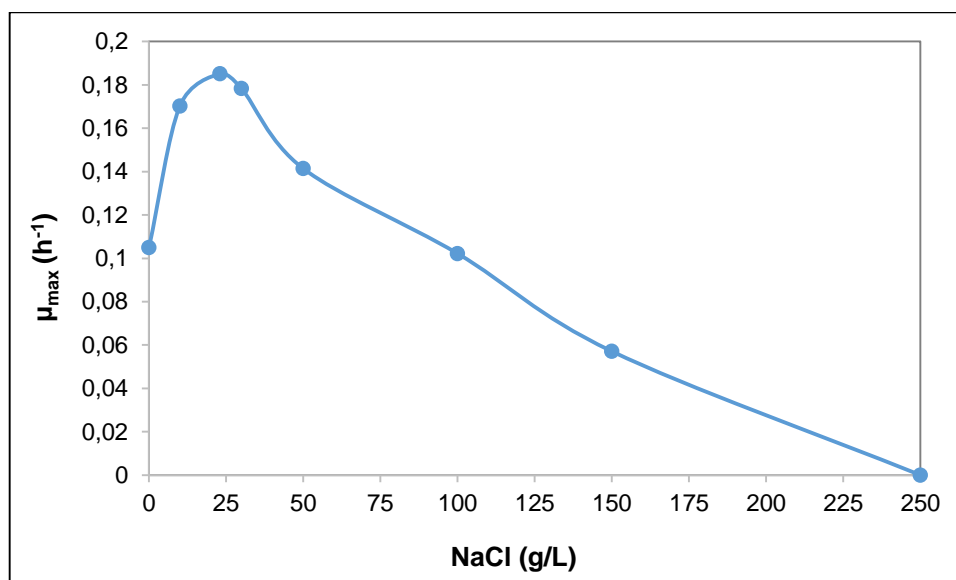


Figure 3.3 : Effet de la concentration en NaCl de croissance de la souche SdK644.

3.1.2.2. Affiliation phylogénétique de la souche SdK644

Un fragment d'environ 1500pb du gène de l'ARNr 16S a été amplifié à partir de l'ADN génomique de l'isolat, cloné dans le vecteur pGEM-T Easy et séquencé sur les deux brins pour établir un support supplémentaire pour l'identification de la souche SdK644.

La séquence du gène de l'ARNr 16S (968pb) obtenue a été soumise à une série d'analyses de recherche par le programme GenBank BLAST ayant permis d'établir une forte similitude avec celles de plusieurs souches cultivables de *Marinobacter* spp. Les valeurs de confiance pour les branches des arbres phylogénétiques ont été déterminées en utilisant des analyses bootstrap basées sur 1000 répliques [195]. L'analyse phylogénétique indique que la souche SdK644 est plus étroitement associée aux membres du genre *Marinobacter* et plus spécifiquement à l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus* [196], avec une similarité de séquence de 97,5% (avec la souche ATCC 49840T) (figure 3.4). Ce seuil est suffisamment élevé (>97%) pour l'affilier à *M. hydrocarbonoclasticus*, selon l'étude de STACKEBRANDT ET GOEBEL [197], qui est largement utilisée dans la classification des bactéries [198].

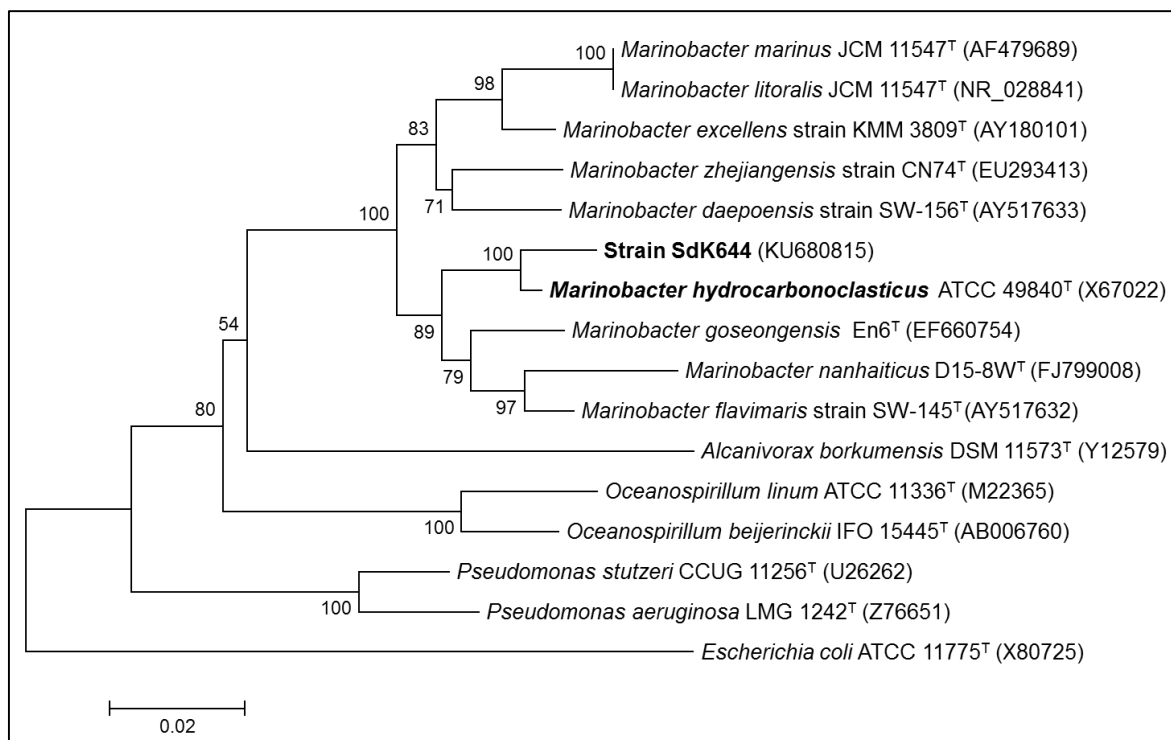


Figure 3.4 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644.

3.1.3. Etude de la biodégradation des hydrocarbures par la souche SdK644

3.1.3.1. Etude de la biodégradation du pétrole brut

3.1.3.1.1. Effet des facteurs environnementaux sur la cinétique de croissance

Comme le montrent les figures 3.5 (a, b et c), les résultats obtenus indiquent que l'activité cellulaire de la souche SdK644 sur le pétrole brut est influencée par plusieurs facteurs. Une croissance optimale de la souche SdK644 est obtenue à un pH neutre-alcalin (7–8), une salinité (NaCl) de 10 à 50 g/L en NaCl et une concentration du pétrole brut de 5% (v/v).

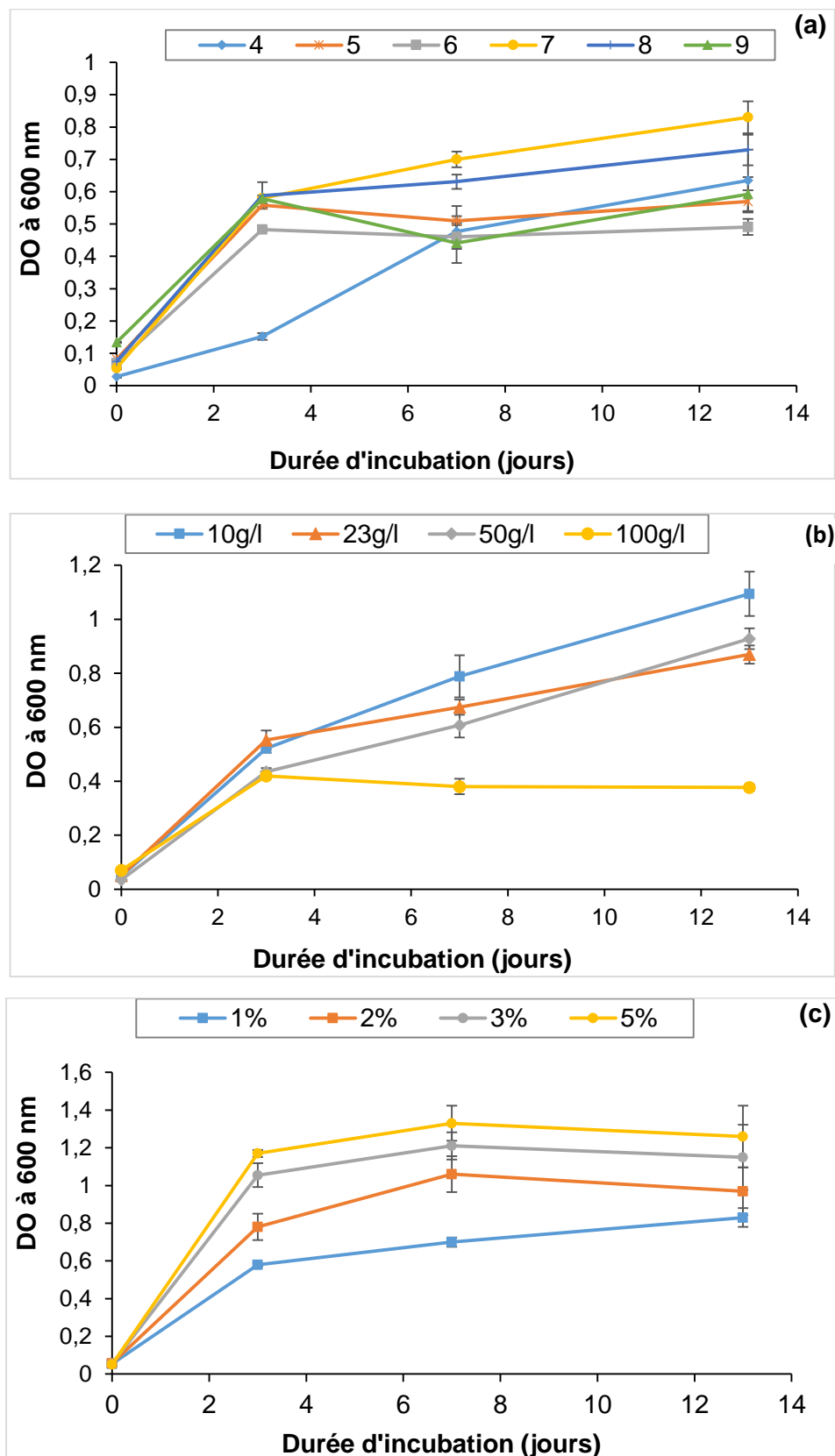


Figure 3.5 : Effets de : (a) pH, (b) salinité du milieu et (c) concentration du pétrole brut sur la croissance de la souche SdK644.

Les figures 3.6 (a, b et c) représentent le taux de croissance spécifique (μ_{\max}) de la phase logarithmique (apparente) influencée par les facteurs étudiés précédemment. D'après ces courbes, il ressort que le taux de croissance maximal est obtenu à un pH neutre, une salinité de 23–50g/L NaCl et une concentration en pétrole de 5%(v/v).

KUMARI ET AL. [199] ont trouvé que la croissance maximale des souches de *Pseudomonas* sp. BP10 et *Rhodococcus* sp. NJ2 est obtenue respectivement à : un pH 7 et 6 et une concentration du pétrole brut de 2 et 1% (m/v). De même, lorsque *Bacillus megaterium* a été cultivée dans un milieu minéral additionné du pétrole brut, les conditions optimales de croissance sont obtenues comme suit : à un pH = 8, une salinité de 3% NaCl (m/v) et une concentration de substrat de 2% (v/v) [138]. Ainsi, cette bactérie a toléré des concentrations en pétrole brut jusqu'à 4,5% [138].

La souche SdK644 a été isolée à partir d'un biotope marin caractérisé par des conditions de milieu neutre-alcalin et de salinité d'environ 3,5%. Néanmoins, la tolérance de la souche envers des concentrations élevées en pétrole (5%, v/v), peut s'expliquer par l'amélioration de la biodisponibilité du pétrole brut après avoir été solubilisé par le biosurfactant produit par cette souche.

SATHISHKUMAR ET AL. [200] ont montré qu'une augmentation de la concentration du pétrole brut de 1 à 12% entraîne une augmentation de la biomasse, et ceci pour les quatre souches bactériennes testées et de leur consortium. EDDOUAOUA [149] a trouvé que des souches mésophiles isolées à partir d'un sol sableux contaminé par le pétrole pouvaient croître sur des concentrations du pétrole jusqu'à 15% (v/v). A 30% la croissance des souches est sévèrement ralentie. Selon KAVITHA ET AL. [201], la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole est améliorée par l'action des enzymes lipolytiques qui transforment la phase huileuse en couche très mince, alors que les constituants aromatiques sont solubilisés par le biosurfactant sécrété dans le milieu.

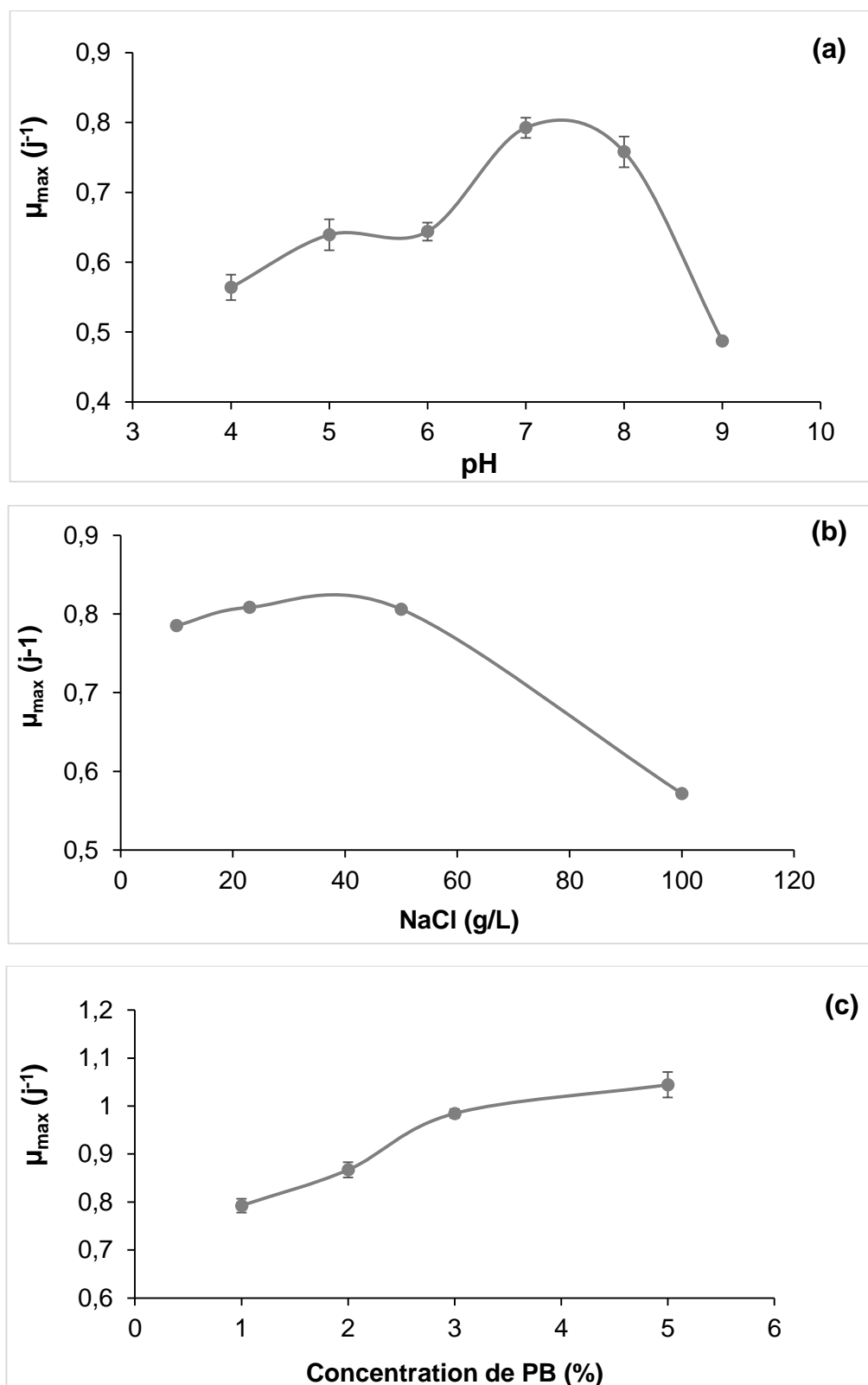


Figure 3.6 : Taux de croissance maximal de la souche SdK644 sous l'effet du : (a) pH, (b) salinité du milieu et (c) concentration du pétrole.

3.1.3.1.2. Biodégradation des n-alcanes présents dans le pétrole brut

Le profil CG-SM du pétrole brut a permis d'identifier la classe des n-alcanes de poids moléculaire intermédiaire (C12 à C26). Comme le montre la figure 3.7, la fraction aliphatique la plus légère (jusqu'à C19) du pétrole était significativement dégradée par la souche SdK644. Par exemple, après le 3^{ème} jour, le taux de dégradation de 6 n-alcanes : C12, C13, C14, C15, C16 et C18 a dépassé 56%. Après le 15^{ème} jour, un hydrocarbure a été éliminé complètement (C16), et neuf (9) composés (C13–C19, C23 et C25) ont été éliminés à plus de 70%. Les composés C12, C13, C14 et C17 ont été quasiment éliminés du milieu après 21 jours. Il est intéressant de noter que le C12 était complètement disparu par les pertes abiotiques dans le témoin après cette période. La biodégradation des n-alcanes a débuté très tôt, où après trois jours d'incubation, 48,29% des n-alcanes ont été éliminées. À la fin de l'expérience (21 jours), le taux de biodégradation de la fraction aliphatique a atteint 83,68% (figure 3.7).

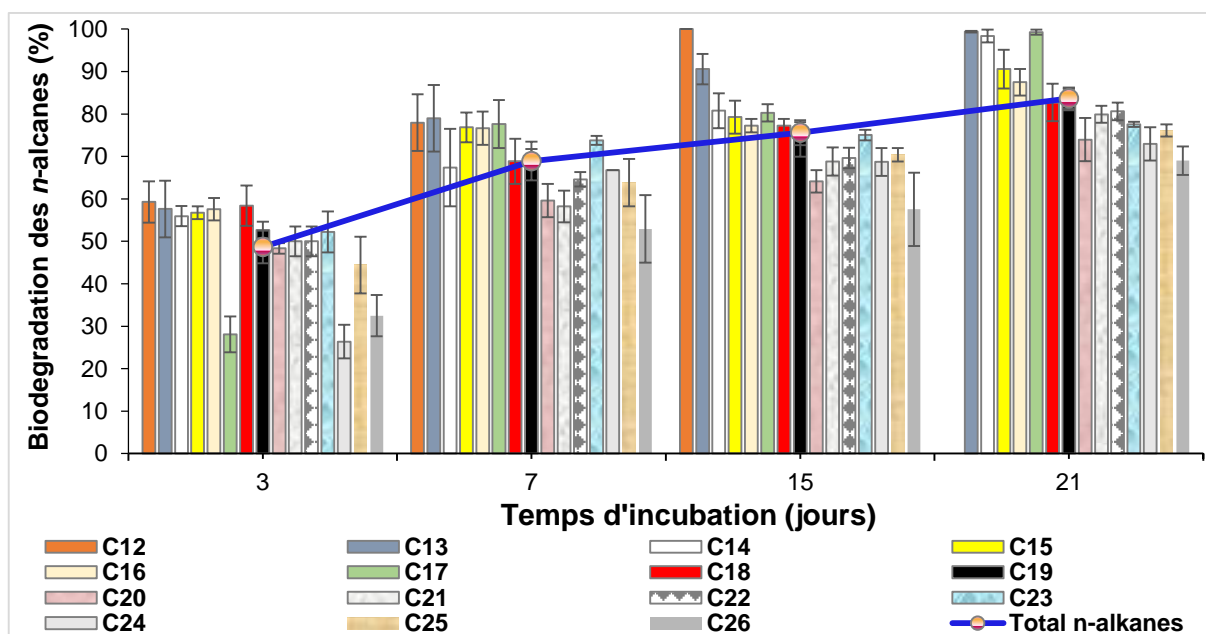


Figure 3.7 : Cinétique de biodégradation des n-alcanes du pétrole par la souche SdK644.

HASSANSHAHIAN ET AL. [193] ont examiné la biodégradation du pétrole brut par onze (11) souches hydrocarbonoclastes moyennant la CG-SM. Ils ont montré que les n-alcanes de la chaîne moyenne (C12–C18) sont fortement

dégradés par rapport à la chaîne aliphatique longue (C19–C25). Après une semaine d'incubation à 30 °C, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* BS (la plus performante dans leur collection) a conduit à une élimination de 73,76% de la fraction aliphatique C9–C25 du pétrole brut (1%) [193]. De même, LI ET AL. [202] ont révélé que les n-alcanes à chaîne courte (C10–C17) du pétrole brut sont fortement dégradés (90,68%) par rapport aux n-alcanes à chaîne longue (C18–C30) (77,38%) et aux aliphatiques lourdes (41,41% pour C31–C38) en présence de la souche *Rhodococcus* sp. JZX-01.

De plus, SHARMA ET PANT [203] ont signalé qu'une dégradation de 50% de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, m/v) contenue dans l'eau de mer additionnée de l'azote (35 mmole/L) sous forme d'urée et de phosphore (0,1 mmole/L) sous forme de hydrogénophosphate de potassium, par une souche marine de *Rhodococcus* sp., est obtenue après 3 jours d'incubation. En outre, CHAMKHA ET AL. [204] ont abouti à une dégradation de 44% et 75% seulement des n-alcanes (C13–C30), dans un milieu de base contenant le pétrole brut (1%, v/v), en utilisant la souche *Klebsiella oxytoca* BSC5, après respectivement 20 et 45 jours d'incubation. MEHDI ET GITI [205] ont signalé qu'une dégradation maximale (83%) par la souche de *Pseudomonas* en présence de 2,5% du pétrole brut, est obtenue. Les auteurs ont montré une corrélation positive et étroite entre l'activité d'émulsifiante, l'adhésion des cellules aux hydrocarbures et le taux de croissance des isolats.

L'effet de la concentration du pétrole brut sur la biodégradation par la souche SdK644 a également été testé. À mesure que la concentration du pétrole augmente, le taux d'élimination des n-alcanes totaux diminue (figure 3.8). Pour une concentration de 5% (v/v) de pétrole brut, le degré de consommation de la fraction aliphatique est significativement réduit (24,33%).

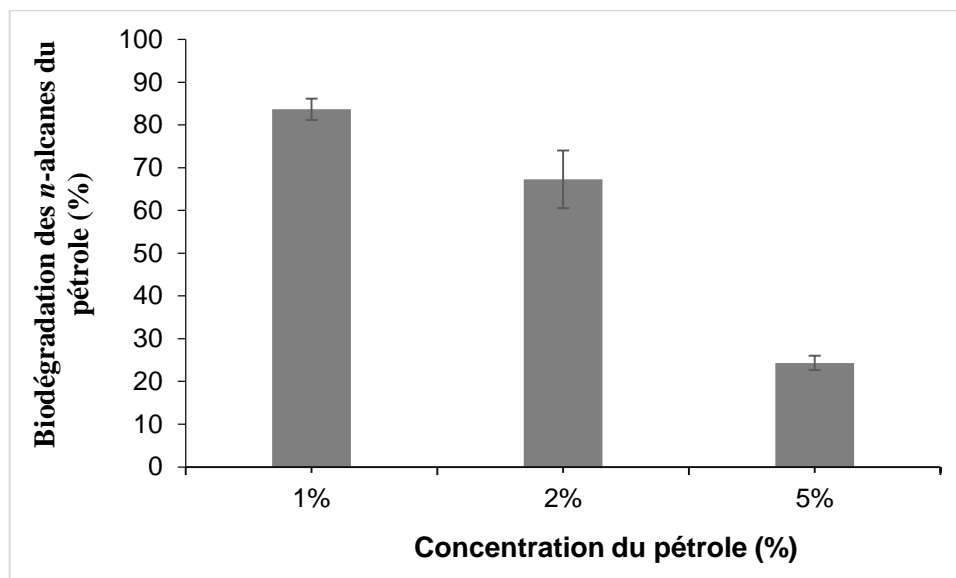


Figure 3.8 : Effet de la concentration du pétrole sur la biodégradation des *n*-alcane.

Des résultats similaires ont été obtenus par SATHISHKUMAR ET AL. [200], où l'augmentation de la concentration du pétrole brut (1, 3, 6, 9 et 12%) a affecté négativement sa dégradation. Egalement, les travaux de BAYAT ET AL. [206] ont montré des résultats similaires, lorsque la concentration du pétrole brut est augmentée de 2,5 à 5,5%, sa dégradation chute de 80 % à 10 %. La biodégradation du pétrole brut est inversement proportionnelle à sa concentration initiale [200]. Ceci est semblé être due à l'effet inhibiteur des concentrations élevées du pétrole conduisant à un apport insuffisant en oxygène dans le milieu, qui résulte de l'épaisseur de la nappe du pétrole et du manque des nutriments essentiels comme l'azote et le phosphore [202]. Les souches bactériennes marines de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sont bien connues par leur capacité métabolique à croître et à minéraliser les hydrocarbures aliphatiques dans des conditions salines [196, 207]. HUU ET AL. [208] ont abouti à une minéralisation de 41% de la fraction saturée du pétrole (5%, v/v) par l'utilisation de la souche *Marinobacter aquaeolei* VT8^T.

La biodégradation de la fraction aliphatique est très intéressante du fait qu'elle constitue la fraction majoritaire du pétrole brut [203]. Le métabolisme de dégradation aérobie des *n*-alcane a lieu en présence de systèmes enzymatiques chez les bactéries dégradant les hydrocarbures [209]. Le plus connu, qui est considéré comme un biomarqueur fonctionnel pour la communauté bactérienne, est

le gène alcane monooxygénase (AlkB) [203]. Il appartient au genre *Marinobacter* parmi d'autres genres bactériens [210]. De tel enzyme joue un rôle important dans l'oxydation initiale des alcanes inertes en alcools primaires [210, 211].

3.1.3.2. Etude de la biodégradation des hydrocarbures modèles

3.1.3.2.1. Biodégradation des n-alcanes

Deux hydrocarbures aliphatiques saturés linéaires (n-alcanes) sont utilisés comme modèles afin d'évaluer leur dégradation par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 individuellement.

L'hexadécane ($C_{16}H_{34}$) est un hydrocarbure liquide de faible solubilité (moins de $0,9 \times 10^{-6}$ mg/L) [212]. Il est considéré comme un hydrocarbure facilement biodégradable, abondant dans la fraction aliphatique du pétrole et constitue l'un des composés majeurs du gasoil [213]. Plusieurs auteurs ont utilisé l'hexadécane comme modèle de la contamination des sites par le gasoil [214-216]. Le tétracosane ($C_{24}H_{50}$) est un composé solide appartenant aux n-alcanes de longue chaîne qui sont considérés comme des composés difficilement biodégradables à cause de leur hydrophobicité élevée [216]. L'utilisation de ces deux alcanes linéaires comme seule source de carbone et d'énergie a été suivie par la croissance bactérienne (DO à 600 nm) pendant 14 jours (Figure 3.9).

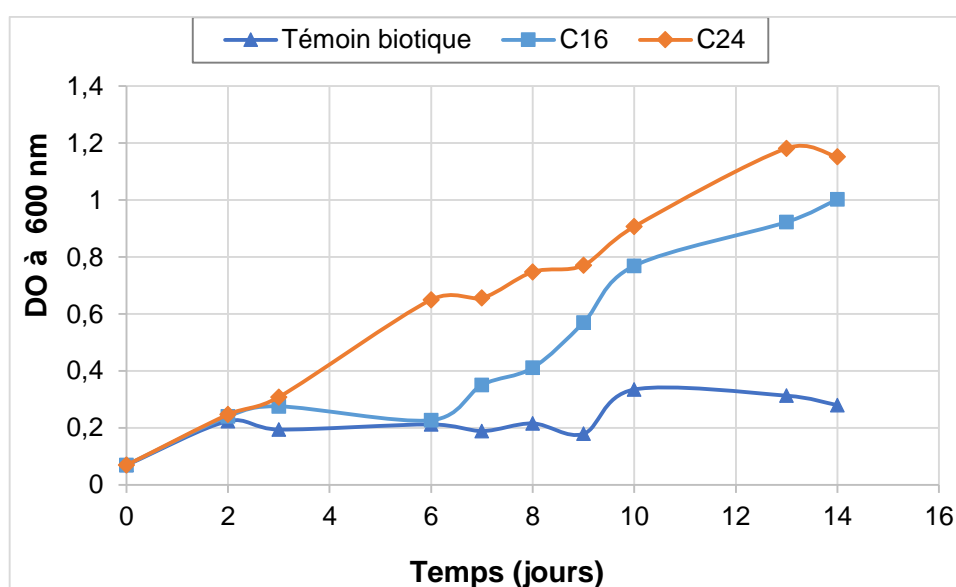


Figure 3.9 : Cinétiques de croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur l'hexadécane et le tétracosane pour une concentration de 1 g/L.

D'après ces résultats, il est remarquable que la souche SdK644 se développe bien sur les deux alcanes. Le tétracosane stimule la croissance plus rapidement que l'hexadécane. Ceci est traduit par une phase de latence de six (06) jours pour ce dernier contrairement au tétracosane. Les vitesses maximales (μ_{\max}) de croissance des deux substrats C16 et C24 sont respectivement 0,1272 et 0,1553 j⁻¹.

Le ralentissement de la croissance durant les six premiers jours nous laisse de penser que la souche SdK644 ne tolère pas de concentrations relativement élevées de ce substrat. Après 6 jours d'incubation, une quantité de C16 est perdue par les processus abiotiques (notamment l'évaporation). ZAMPOLLI ET AL. [177] ont constaté une perte abiotique de l'ordre de 25%, en utilisant les mêmes composés (C16 et C24) pour une concentration de 1 g/L, incubés à 30 °C pendant 3 jours.

Dans les mêmes conditions, la capacité de biodégradation de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur les deux substrats, est évaluée au bout de 20 jours par rapport aux témoins abiotiques de chaque composé. Les résultats de CG-SM ont donné un taux de 41 et 11%, respectivement pour le C16 et le C24. Les pertes abiotiques des deux hydrocarbures étaient très proches. Ce constat confirme que les hydrocarbures aliphatiques de longues chaînes sont difficilement dégradables par rapport à ceux de courtes chaînes. La biodégradation des n-alcanes semble être inversement corrélée à la longueur de chaîne hydrocarbonée comme elle a été rapportée par plusieurs auteurs [177, 217, 218].

Le faible taux de dégradation de C24 en mésentente avec la bonne croissance sur ce substrat, est probablement dû à l'utilisation des métabolites de dégradation produits par la souche SdK644.

RIVET ET AL. [219] ont examiné la biodégradation de l'hexadécane par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 dans des conditions similaires (température, salinité et concentration du substrat). Le taux de dégradation était 10, 32 et 40% après respectivement 2, 7 et 15 jours. Au-delà de cette durée, la souche ne peut pas utiliser le C16.

ROCHA ET AL. [220] ont étudié la biodégradation des n-alcanes de chaînes courtes et moyennes (C7–C19) par la souche *P. aeruginosa* ATCC 55925 pour une concentration de 0,5% (v/v). Les alcanes C7–C11 ont été disparus totalement après une courte période (05 jours) dans les témoins abiotiques. Après 20 jours d'incubation à 28 °C, les taux de biodégradation de C12, C13, C14, C15, C16, C17 et C19 étaient respectivement 23, 64, 70, 41, 39, 51 et 0%.

XIA ET AL. [221] ont constaté que la biodégradation des n-alcanes C12, C22, C32 et C40 par *Pseudomonas* sp. WJ6 est proportionnelle à la longueur de chaînes. Les pourcentages de dégradation relevés après 20 jours d'incubation sont respectivement 46,65%, 42,62%, 31,69% et 23,62%.

De l'autre côté, des taux de dégradation supérieurs ont été signalés par certains auteurs. En effet, CHEN ET AL. [222] ont obtenu une excellente dégradation (de l'ordre de 90%) pour le C14, C15 et C16 à une concentration de 1 g/L, en utilisant la souche *Dietzia* sp. CN-3 isolée à partir d'un sédiment marin contaminé par le pétrole. Le C26 a été toutefois très faiblement dégradé (54,2 %). LIU ET AL. [214] ont abouti à une minéralisation complète de C14, C16, C18 (0,5 g/L) par *P. aeruginosa* SJTD-1 au bout de 100 h, contrairement aux C20, C22 et C24 qui ont été partiellement utilisés.

La réduction de la tension de surface a été aussi suivie durant la dégradation de C16 et C24, en indiquant la production des biosurfactants comme moyen facilitant la consommation de ces substrats. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Réduction de la TS au cours de la dégradation de l'hexadécane et du tétracosane par la souche SdK644.

| Substrat ou milieu | TS après 8 jours | TS après 20 jours |
|--------------------|------------------|-------------------|
| Hexadécane | 50 ± 1,1 | 42,3 ± 0,9 |
| Tétracosane | 48,1± 0,1 | 47,5± 0,5 |
| MM seul | 54 ± 0,1 | |

Il a été remarqué une réduction importante de la TS au cours de la biodégradation de C16 par rapport au C24 en concordance avec les taux de biodégradation relevés.

Les biosurfactants extracellulaires produits par les microorganismes jouent un rôle important dans l'amélioration de la biodégradation des substances hydrophobes (n-alcanes). Ils augmentent la surface interfaciale de ces composés hydrophobes en abaissant la tension de surface. Donc, ils permettent une pseudo-solubilisation par un partage dans le corps des micelles, et ils augmentent l'hydrophobicité de la surface cellulaire pour un contact direct avec les grosses gouttelettes [213, 223-225].

Plusieurs auteurs ont montré l'effet positif des biosurfactants dans la minéralisation des n-alcanes utilisés séparément ou en mélange [220, 225, 226]. L'hexadécane est souvent utilisé comme modèle dans ce contexte [213, 223, 224, 227]. MISHRA ET SINGH [219] ont constaté que la biodégradation de l'hexadécane par *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, *Rhodococcus* sp. NJ2 et *Ochrobactrum intermedium* P2 est améliorée par la production de biosurfactant (diminution de la tension de surface du milieu de culture). LIU ET AL. [209] ont montré que les biosurfactants, sécrétés lors de la dégradation de l'hexadécane par *Pseudomonas* sp. B1 et *Acinetobacter junii* B2, ont deux modes d'action différents. Le premier est un biosurfactant attaché à la cellule de la souche B1 pour améliorer son hydrophobicité cellulaire, ce qui permet une adhésion directe avec les grosses gouttelettes de C16. Tandis que le deuxième est un biosurfactant sécrété dans le milieu par la souche B2, et ceci afin d'augmenter la pseudo-solubilisation de l'hexadécane. Selon LIU ET AL. [220], la pseudo-solubilisation peut avoir lieu non seulement à des concentrations supérieures à la CMC, mais aussi à celles inférieures à la CMC. Les mêmes auteurs ont mis au point « la biocompatibilité des biosurfactants » et son influence sur la biodégradation de l'hexadécane. En effet, quand un rhamnolipide est ajouté au milieu inoculé par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (une souche ainsi productrice de rhamnolipide), la biodisponibilité de C16 est améliorée par pseudo-solubilisation. Dans ce cas, l'hexadécane est transféré par les micelles du rhamnolipide jusqu'à la paroi cellulaire. L'agrégat « micelle-C16 » est fusionné en contact avec la paroi cellulaire, ce qui permet la délivrance de l'hexadécane à l'intérieur et la libération de la micelle dans le milieu.

Avec la souche *Pseudomonas putida* CICC (qui ne produit pas de rhamnolipide), la micelle transportant du C16 est traitée comme corps étranger. A l'interface de la paroi cellulaire, *Pseudomonas putida* CICC dégrade d'abord une partie de la micelle pour accéder ensuite à l'hexadécane, ce qui diminue le taux de dégradation du C16 par cette souche.

3.1.3.2.2. Biodégradation des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent un groupe de polluants prioritaires dans l'environnement à cause de leur toxicité, leur cancérogénicité, leur tératogénicité ainsi que leur récalcitrance [228]. Du fait de leur faible solubilité dans l'eau et leur forte hydrophobicité, les HAP (notamment ceux possédant quatre ou cinq noyaux benzéniques) résistent à la dégradation par les microorganismes [229].

Dans ce travail, quatre (04) HAP ont été utilisés dans les expériences de biodégradation par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644, qui sont le naphthalène C₁₀H₈, le phénanthrène C₁₄H₁₀, l'anthracène C₁₄H₁₀ (composés de faibles poids moléculaire) et le pyrène C₁₆H₁₀ (constituant de haut poids moléculaire). Les propriétés de ces quatre HAP sont données en annexe 3. Chaque HAP est utilisé comme source unique de carbone et d'énergie à une concentration de 100 mg/L. La figure 3.10 présente les cinétiques de croissance sur les quatre HAP étudiés.

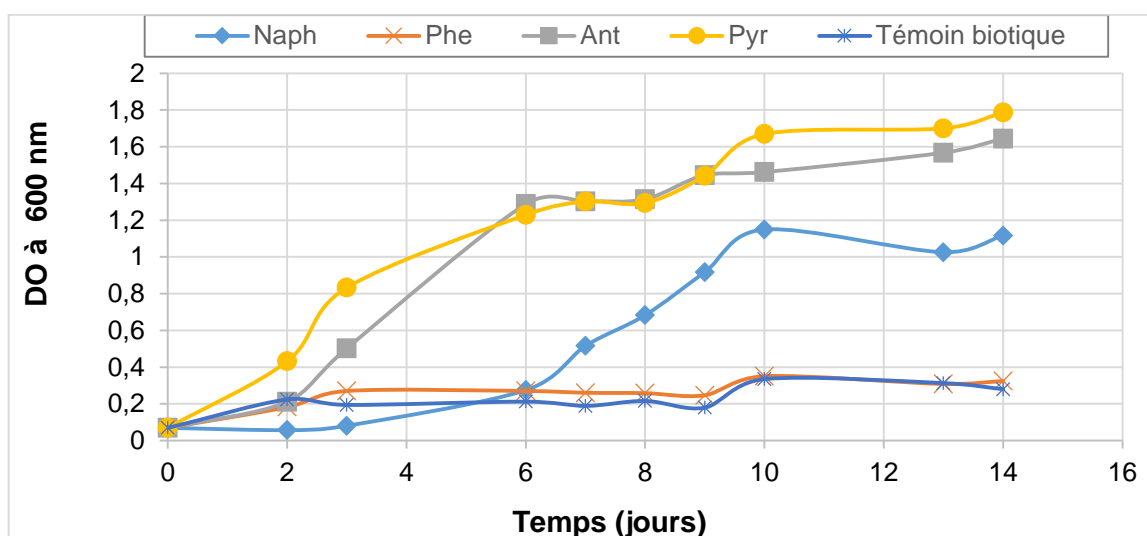


Figure 3.10 : Cinétiques de croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur les HAP pour une concentration de 100 mg/L.

Les courbes de croissance montrent que la souche SdK644 utilise les HAP différemment. Une bonne croissance est obtenue avec le pyrène, sans nécessité d'une adaptation au substrat. La souche SdK644 utilise aussi l'antracène après une petite période de latence de 2 jours. La croissance sur le naphthalène n'est stimulée cependant, qu'après six jours d'incubation, où une croissance modérée par rapport au pyrène et à l'antracène est observée. Enfin, il semblerait que *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 est phénanthrène négative. Les vitesses spécifiques de croissance du pyrène, de l'antracène et du naphthalène sont respectivement 0,3659 ; 0,2124 et 0,1712 j⁻¹.

L'utilisation retardée du naphthalène est probablement due au seuil de concentration tolérée par la souche SdK644. En effet, le naphthalène est le composé le plus volatile et le moins hydrophobe (Log Kow= 3,5, voir annexe 3) des HAP. Après six jours d'incubation à 30 °C, une partie non négligeable est dissipée par évaporation. Ceci a été démontré dans une expérience antérieure où 95% du naphthalène est éliminée dans l'essai témoin (une concentration initiale de 200 mg/L) pendant sept (07) jours. Il se peut donc que la souche SdK644 ne métaboliserait que les faibles concentrations de ce substrat. De ce fait, nous recommandons que l'étude de la biodégradation des composés volatiles comme le naphthalène doive être effectuée dans des récipients hermétiques (Par ex. tubes à essai) afin de minimiser les pertes abiotiques. En effet, HEDLUND ET AL. [230] ont pu récupérer 80 à 100% du naphthalène dans le témoin (préparé dans des tubes à essai de 15 mL) après une semaine d'incubation.

En parallèle aux courbes de croissance, nous avons effectué un balayage de la longueur d'onde dans le domaine ultraviolet afin de constater d'éventuels changements pourront être survenus lors de la biodégradation des HAP. Les résultats obtenus pour les quatre HAP sont montrés dans les figures 3.11–3.14.

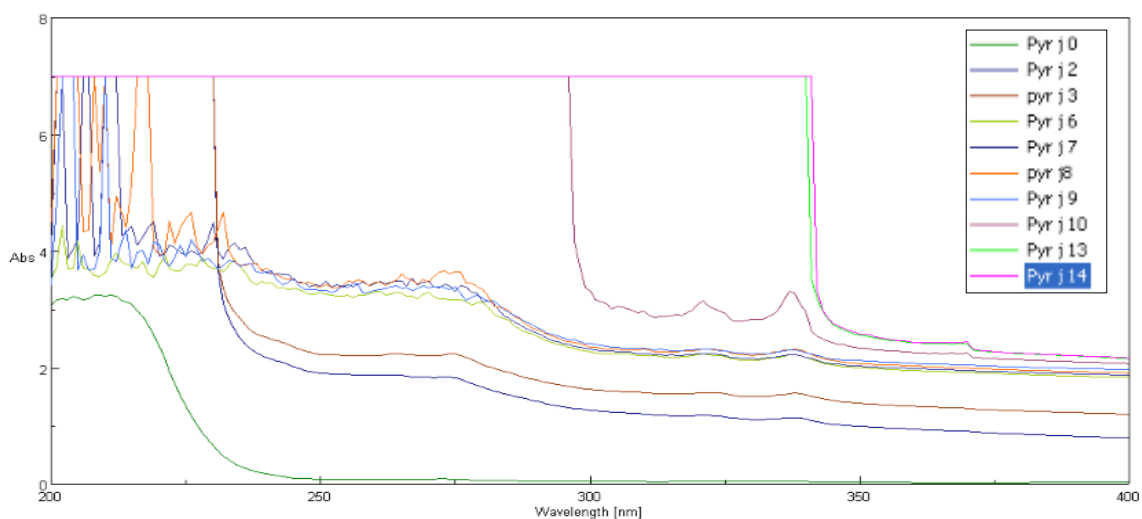


Figure 3.11 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur le pyrène.

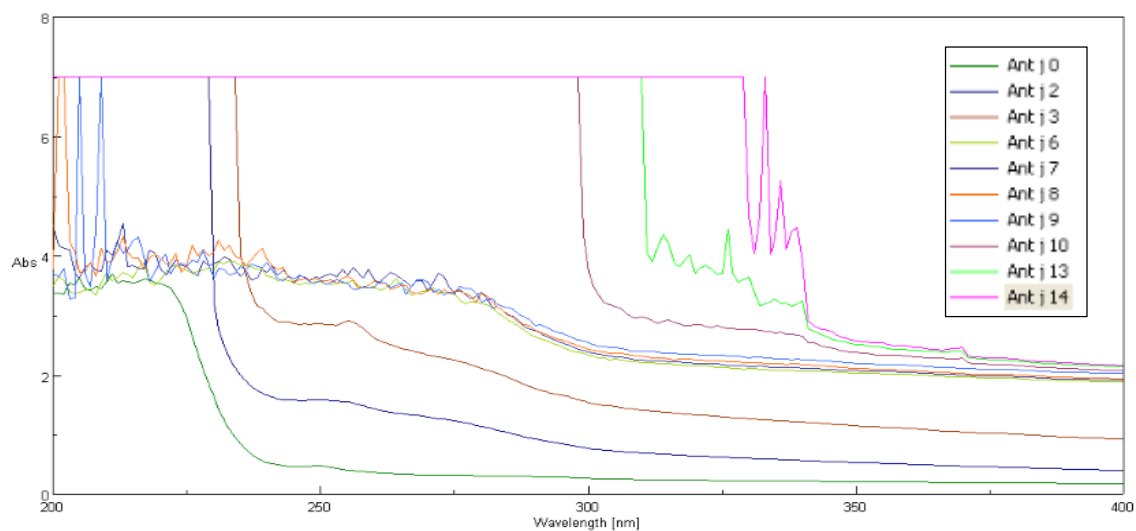


Figure 3.12 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur l'anthracène.

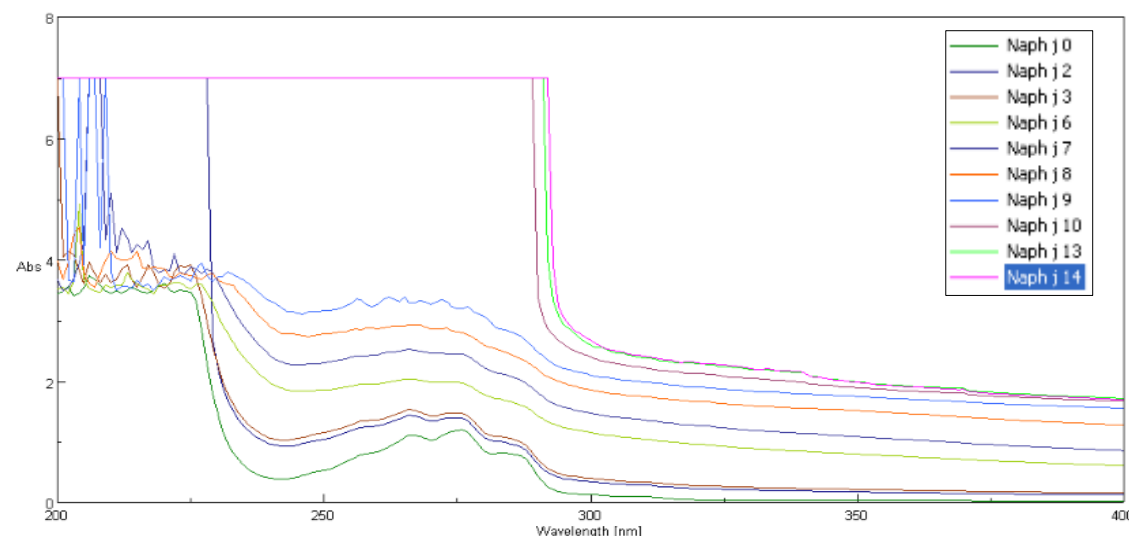


Figure 3.13 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur le naphthalène.

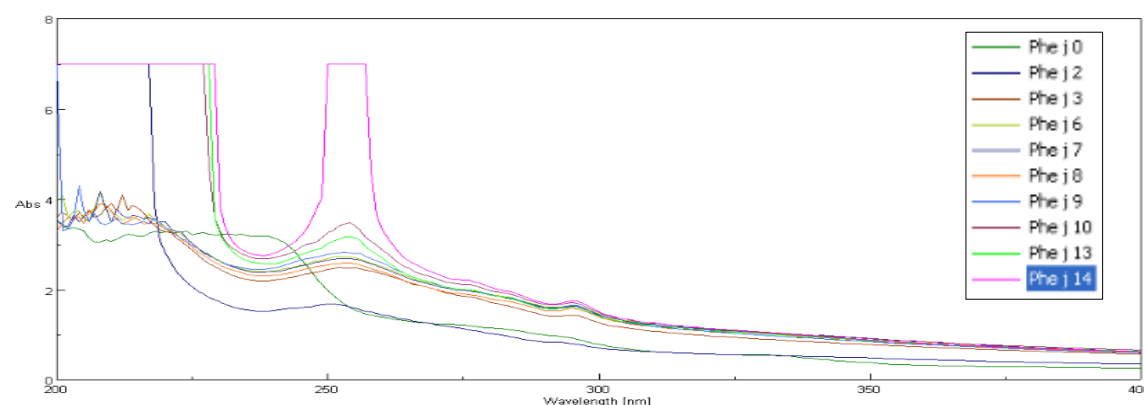


Figure 3.14 : Spectres d'absorption UV du surnageant de culture de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 sur le phénanthrène.

L'ordre croissant de la solubilité des HAP est le suivant (mg/L) (annexe 3): l'anthracène (0,045), le pyrène (0,132), le phenanthrène (1,1) puis le naphthalène (31). Ce qui se traduit par une intensité de spectres très faible à t_0 (quelques minutes après l'inoculation et l'ajout des HAP) pour les HAP les moins solubles (anthracène et le pyrène). Concernant le naphthalène, le spectre t_0 visualise clairement le maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 275 nm.

A partir du deuxième jours, la solubilisation du pyrène et de l'anthracène est améliorée (en particulier le pyrène), probablement en raison d'une sécrétion de biosurfactant seul ou combiné à la solubilisation physique. Par conséquent, le pic

d'absorption caractéristique du pyrène ($\lambda_{\max} = 273 \text{ nm}$) commence à apparaître le 2^{ème} jour, et celui de l'anthracène ($\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$) en 3^{ème} jour, sans apparition d'autres pics. Des changements effectifs dans les spectres du pyrène et de l'anthracène apparaissent à partir du 6^{ème} jour jusqu'au 14^{ème} jour, témoignant ainsi de la production de métabolites de dégradation, telle qu'il est suggérée par DAS ET MUKHERJEE [55] et FERRADJI [181]. En ce qui concerne le naphthalène, l'intensité de ses spectres est pratiquement similaire jusqu'au sixième jour en concomitance à la cinétique de croissance. Des modifications douteuses de la métabolisation du naphthalène ne percevraient qu'au dixième jour. Pour le phénanthrène, considéré comme le substrat le moins assimilé par la souche SdK644, de faibles changements sont survenus dans ses spectres d'absorption durant toute la période de culture.

Le dosage du pyrène et de l'anthracène par CG-SM dans des expériences séparées de biodégradation, maintenues pendant 20 jours d'incubation, a donné un taux d'élimination respectivement de 38 et 31%, ce qui confirme l'utilisation de ces deux HAP par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644.

Le processus de biodégradation des HAP est facilité par la sécrétion des biosurfactants, permettant ainsi d'augmenter la surface spécifique des substrats et améliorer la solubilité apparente *via* une incorporation des composés hydrophobes à l'intérieur des micelles, ou encore, modifier l'hydrophobicité des cellules pour une adhésion directe avec les HAP [231-233].

Les résultats de suivi de la réduction de la TS au cours de la dégradation des quatre HAP sont indiqués dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Réduction de la TS au cours de dégradation du pyrène, de l'anthracène, du naphthalène et du phénanthrène par la souche SdK644.

| Substrat ou milieu | TS après 8 jours | TS après 20 jours |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Pyrène | 47,5 ± 0,1 | 39,5 ± 0,6 |
| Anthracène | 50,5 ± 0,2 | 45,6 ± 0,3 |
| Naphthalène | 53 ± 0,7 | 52,5 ± 0,4 |
| Phénanthrène | 54,4 ± 0,5 | 50,5 ± 0,2 |
| MM seul | 54 ± 0,1 | |

Une réduction importante de la TS est enregistrée dans le cas du pyrène par rapport aux autres HAP. Un bon biosurfactant réduit la TS à une valeur ≤ 40 mN/m [234]. Le pyrène constitue donc le bon substrat stimulant la sécrétion de biosurfactant. Ceci, a amélioré la biodégradation de ce composé en augmentant sa surface spécifique et sa solubilité apparente, et en formant une émulsion stable [95]. La figure 3.15 visualise l'effet du biosurfactant produit lors de la dégradation du pyrène par la souche SdK644.

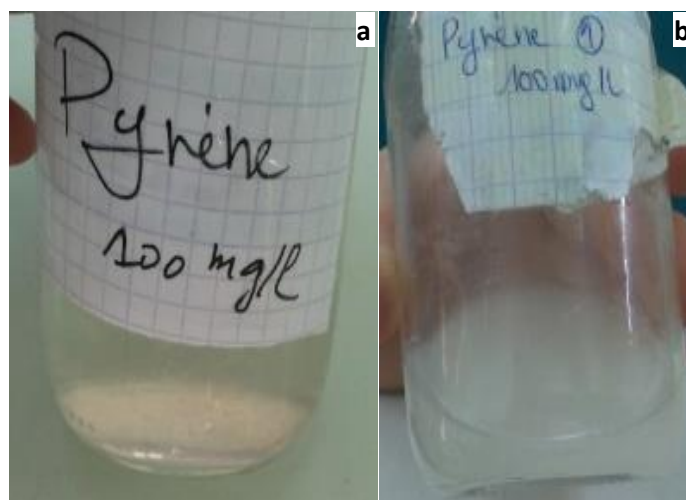


Figure 3.15 : Aspect visuel du pyrène (a) dans l'échantillon témoin, (b) après 20 jours de culture avec la souche SdK644.

L'antracène a ainsi stimulé la réduction de la TS avec une ampleur moins importante par rapport au pyrène mais plus importante par rapport au phénanthrène. Le naphthalène a provoqué la plus faible réduction de la TS en dépit d'une bonne croissance. Ceci est probablement dû à la toxicité de fortes concentrations du naphthalène sur la souche SdK644 d'une part, et d'autre part à la solubilisation physique du naphthalène résiduel. NWINYI ET AMUND [235] ont signalé une faible utilisation du naphthalène (une concentration initiale de 123 mg/L) par *Lysinibacillus* sp. FB1 et *Lysinibacillus fusiformis* FB3 incubées à 30 °C pendant 14 jours à cause de son effet toxique. HEDLUND ET AL. [230] ont rapporté que la souche *Marinobacter* sp. NCE312 minéralise complètement le naphthalène (5 mg/L), mais elle est incapable de métaboliser le phénanthrène (1 mg/L).

Généralement, les HAP de faible poids moléculaire sont considérés plus facilement biodégradables par rapport aux HAP de haut poids moléculaire [229, 233]. Toutefois, les microorganismes montrent des capacités dégradatives

spécifiques vis-à-vis aux HAP. La souche thermotolérante 1C est capable de métaboliser l'antracène et le naphthalène à une concentration initiale de 100 mg/L, mais elle est incapable d'utiliser le phénanthrène [236]. La souche bactérienne nommée FB2 a utilisé 97% de naphthalène à 117 mg/L durant une période de 14 jours, tandis que les souches FB1 et FB3 ont métabolisé respectivement 6,18 et 11,36% seulement de ce composé. Pour l'antracène, les trois souches étaient incapables de le consommer à une concentration de 100 mg/L pendant 21 jours. A une teneur plus faible (23 mg/L), les souches FB1 et FB2 ont montré des taux de dégradation très proches (87–88%), alors que la souche FB3 n'a utilisé que 58%. Le pyrène à 103 mg/L a été dégradé de l'ordre de 6,39%, 8,72% et 0,53% respectivement pour les souches FB1, FB2 et FB3 durant une période de 21 jours [235]. FERRADJI [181] a signalé que les souches de streptomycètes (AB1, AH4 et AM2) dégradent mieux le phénanthrène par rapport au naphthalène.

Un taux de dégradation élevé du pyrène à une concentration initiale de 100 mg/L est atteint ($92,2 \pm 5,6\%$) avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* RS1 incubée à 30 °C pendant 7 jours [237]. KUMARI ET AL. [238] ont abouti à un taux de dégradation de 55% de ce HAP (100 mg/L) en incubant la souche *Stenotrophomonas* sp. IITR87 à 30 °C pendant 25 jours. Cette souche utilise aussi le phénanthrène mais elle est incapable de métaboliser l'antracène. Une souche *Achromobacter* sp. HZ01, isolée à partir de l'eau de mer contaminée par le pétrole a dégradé 29,8, 50,6 et 38,4% respectivement de l'antracène, du phénanthrène et du pyrène, pour une concentration initiale de 100 mg/L et à une incubation réalisée à 28°C durant 30 jours [229]. En plus, la souche *Rhodococcus* sp. P14, isolée à partir des sédiments contaminés par le pétrole brut a dégradé 34% de pyrène et 43% de phénanthrène (50 mg/L) pendant 30 jours [228]. A une concentration de 400 mg/L, seulement 15,2% et 14,6% respectivement du phénanthrène et du pyrène ont été éliminés par la souche *Dietzia* sp. CN-3 pendant 12 jours [222]. A cette concentration (400 mg/L), la souche RS1 a pu utiliser 77,8% du pyrène pendant 14 jours [237]. ZHANG ET AL. [216] ont rapporté que le phénanthrène (40 mg/L) est complètement dégradé pendant 7 jours par la souche *P. aeruginosa* DQ8, tandis qu'une dégradation partielle du pyrène (34,5%) est achevée après 12 jours d'incubation à 30 °C.

3.1.4. Conclusion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la recherche des microorganismes dotés de capacités biodégradatives des hydrocarbures d'un sédiment portuaire contaminé par ce type de xénobiotiques. Quinze (15) isolats pouvant croître sur le pétrole comme seule source de carbone et d'énergie, ont été sélectionnés durant l'étape de criblage. La meilleure souche bactérienne hydrocarbonoclaste retenue, nommé SdK644, a été identifiée *via* l'analyse phylogénétique du gène codant de l'ARNr 16S et affiliée au genre *Marinobacter* avec une similarité de 97,5% avec la souche type *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840T. Ce taux inférieur à 98,65% indique que la souche SdK644 représente une nouvelle espèce et que l'hybridation ADN-ADN est nécessaire. De plus, cette souche est caractérisée par son caractère très halotolérant (0–150 g/L NaCl) avec un optimum de salinité de 10–30 g/L. Elle croît bien sur le pétrole à des concentrations de 5% (v/v) et des salinités et pH respectivement de 23–50 g/L NaCl et 7–8 pour une concentration de pétrole de 1%. Comme leurs homologues du genre *Marinobacter*, la souche SdK644 possède un potentiel de dégradation important des n-alcanes du pétrole (83,68%), notamment, ceux de moyenne chaîne aliphatique (C12–C17). La biodégradation du pétrole est améliorée du fait de la production de biosurfactant, permettant une baisse de la TS au-dessous de 40 mN/m (38 mN/m). La souche SdK644 a ainsi montré une capacité de dégradation intéressante en face des hydrocarbures pétroliers modèles à des concentrations relativement élevés, en l'occurrence l'hexadécane (41% à 1 g/L), le pyrène (38% à 100 mg/L), l'anthracène (31% à 100 mg/L) et le tétracosane (11% à 1 g/L). Le métabolisme de dégradation de ces hydrocarbures individuels est toujours facilité par la sécrétion de biosurfactant dans le milieu. Enfin, il est important de noter que le travail présenté ne permet de tirer que des conclusions partielles sur les capacités réelles de dégradation des hydrocarbures par cette souche ainsi que les mécanismes impliqués. Il est souhaitable dans d'éventuels futurs travaux d'investir l'effet d'autres facteurs pouvant améliorer la dégradation des hydrocarbures, tels que l'effet de co-substrat (glucose, lactate, etc.), le co-métabolisme (interactions HAP–HAP ou HAP–alcanes), la concentration de l'hydrocarbure étudié, de même que la compréhension des mécanismes de dégradation comme le test d'enzymes (AlkB, P450, lipase) et les mécanismes

d'accès aux hydrocarbures (TS, activité émulsifiante et hydrophobicité de surface cellulaire).

3.2. Production et caractérisation de biosurfactant

3.2.1. Criblage des souches productrices des biosurfactants

Treize (13) souches bactériennes de la collection des hydrocarbonoclastes marines, criblées dans le cadre de ce présent travail, ont été testées afin d'évaluer leurs pouvoirs à produire des biosurfactants. L'huile d'olive a été choisie comme source de carbone, elle est considérée parmi les meilleurs substrats d'induction de biosurfactants [182, 239]. Les résultats de ce criblage sont représentés dans la figure 3.16.

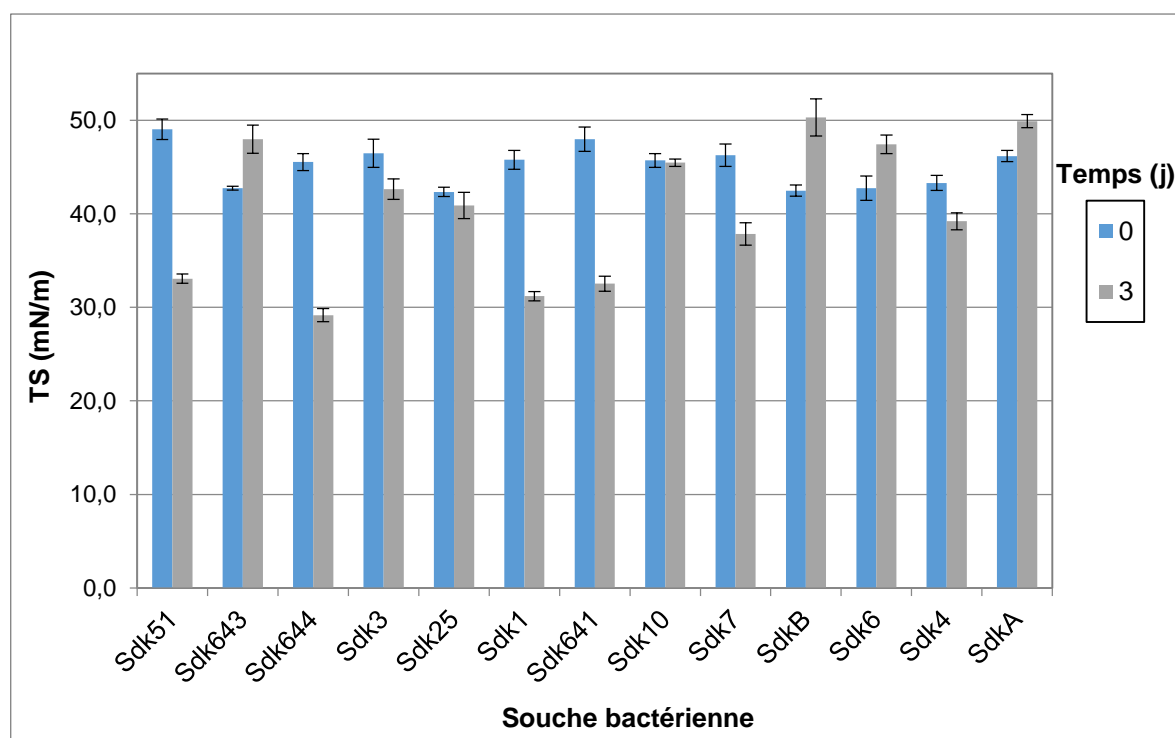


Figure 3.16 : Criblage des souches bactériennes hydrocarbonoclastes selon le pouvoir à produire des biosurfactants à partir de l'huile d'olive.

Les résultats obtenus montrent que six (06) souches sont considérées comme productrices de biosurfactants, puisqu'elles ont réduit la tension de surface (TS) du milieu au-dessous de 40 mN/m. Cependant, les souches Sdk51, Sdk641, Sdk1 et Sdk644 présentent une activité de surface très marquée, traduit par une

réduction de la TS jusqu'à des valeurs inférieures à 34 mN/m. La meilleure souche dans cette collection est SdK644, qui a réduit la TS de 45,5 à 29,2 mN/m. D'ailleurs, cette souche a été retenue aussi à cause de son pouvoir dégradatif du pétrole. EDDOUAOUA [149] a fait le criblage de neuf (09) souches bactériennes mésophiles dans un milieu LB avec 1% (v/v) de l'huile d'olive comme source de carbone, en se basant sur le test de déplacement du pétrole. Une souche (très performante dans la dégradation des hydrocarbures) a montré une activité de surface très marquée (diamètre du halo-claire du pétrole de 7,3 cm). Chiewpattanakul [240] a testé l'activité de surface de 102 microorganismes (levures et bactéries) dans un milieu à base de sels avec 4% (v/v) de l'huile de palme, en utilisant le test de l'effondrement de la goutte (*Drop collapsing test*) associé avec l'indice d'émulsification (E24). Un (01) isolat (identifié comme levure) a donné un effondrement de la goutte (d'huile minéral) et un indice d'émulsification les plus élevés (E24 = 41,38% contre le kérosène).

3.2.2. Optimisation de la production de biosurfactant

Afin d'obtenir de meilleurs rendements, nous avons étudié les principaux facteurs affectant la production des biosurfactants : sources de carbone et d'azote, rapport C/N, pH et salinité.

3.2.2.1. Influence de la source de carbone : utilisation des substrats déchets

Outre l'effet de la nature de la source de carbone sur la quantité et la qualité du biosurfactant produit, le choix des substrats carbonés recyclés et à faible coût est un facteur clé pour la réussite de production à grande échelle.

Dans cette optique, quatre substrats déchets ont été retenues : la margine, la mélasse, l'huile de friture et l'huile de moteur usagée. Deux substrats carbonés additionnels ont été testés : l'huile d'olive et le glucose. Ce sont parmi les sources de carbone conventionnelles les plus utilisées. L'huile d'olive est l'un des meilleurs substrats hydrophobes induisant la production de biosurfactants, comme il a été rapporté dans la littérature [121, 183, 241]. De plus, c'est notre substrat de référence qui a provoqué une diminution de la tension de surface du surnageant de culture jusqu'à 29 mN/m. De même, le glucose est l'un des meilleures sources de carbone solubles employées dans la production de biosurfactants [242-244].

Quant aux sources déchets, la mélasse est un sous-produit de l'industrie de fabrication du sucre de canne et de betterave. C'est une source très riche en carbone. Les valeurs moyennes des constituants de la mélasse de canne (75% de la matière sèche) sont : 48–56% (saccharose), 9–12% (matière organique non sucrée), 2,5% (protéine), 1,5–5,0% (potassium), 0,4–0,8% (calcium), 0,06% (Magnésium), 0,06–2% (phosphore), 1,0–3,0 mg/kg (biotine ou vitamine B8), 15–55 mg/kg (acide pantothénique ou vitamine B5), 2500–6000 mg/kg (inositol) et 1,8 mg/kg (thiamine ou vitamine B1) [122, 139]. En raison de sa teneur élevée en sucres, la mélasse constitue un bon substrat pour la production des biosurfactants telle qu'elle est montrée par plusieurs études [245, 246].

La margine résulte du processus d'extraction de l'huile d'olive. C'est un rejet liquide de couleur marron très intense avec une odeur forte d'acide et des teneurs en carbone très élevées (DCO jusqu'à 220 g/L). La margine contient des substances toxiques tels que les polyphénols, ce qui rend sa consommation inapproprié. Par contre, sa richesse en divers composés (sucres, composés azotés, acides organiques et huiles résiduelles) stimule bien la croissance microbienne [122]. Vu la production énorme de l'huile d'olive dans les pays méditerranéens (98% de la production mondiale), des volumes importants du rejet des margines sont produits. Par conséquent, la margine est considérée comme la source la plus économique disponible qui pourrait être utilisée dans la production de biosurfactants. MERCADE ET AL. [247] ont constaté que l'utilisation de la margine pour la synthèse d'un rhamnolipide par la souche *Pseudomonas sp.* JAMM a conduit à une réduction de la charge polluante (exprimée en DCO), et à une diminution de 55% des phénols totaux.

L'huile de friture et les huiles résiduelles de cuisson sont parmi les déchets à prix bas, les plus riches en nutriments [139]. Des quantités importantes des huiles végétales rejetées sont générées par les restaurants partout dans le monde. Les états unis seule produit 100 milliard litres de rejet d'huile par semaine [248]. Après son utilisation, la composition chimique de l'huile de friture est changée. Elle peut contenir plus de 30% de composés polaires selon l'origine de l'huile, le type de la friture et le nombre de cycle de la friture [249]. La composition en acides gras change aussi. En effet, HABA ET AL. [250] ont trouvé que dans le cas de l'huile de

friture d'origine tournesol, le contenu en acide linoléique a diminué de 62,2 à 0,28%, alors que l'acide stéarique a augmenté de 2,2 à 24,7%. De même, le contenu en acide oléique a augmenté de 25,1 à 55,6%. La composition de l'huile de friture a révélé l'apparition de l'acide linoléique (0,8%) et la fraction d'acides gras à longue de chaîne C_{10} (4,08%). Comparativement aux huiles végétales (huile de soja, de maïs, de tournesol, etc.), peu de travaux ont été publiés sur l'utilisation des huiles de friture dans la production de biosurfactants [250-252].

L'huile de moteur usagée est l'huile drainée des moteurs de véhicules après une certaine période de son utilisation. Elle devient contaminée, et une fois ses propriétés sont altérées, elle ne peut continuer à remplir sa tâche convenablement. Cette huile est composée d'un mélange altéré d'hydrocarbures pétroliers (où la fraction légère est évaporée) beaucoup moins cher par rapport à d'autres hydrocarbures utilisés comme substrats pour la production des biosurfactants (pétrole brut, gasoil, hexadécane). THAVASI ET AL. [138] et THAVASI ET AL. [253] ont pu utiliser l'huile de moteur usagée pour la synthèse d'un glycolipide par *Bacillus megaterium* et d'un lipopeptide par *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos résultats relatifs à la croissance microbienne sont présentés dans la figure 3.17 et ceux du déplacement de pétrole et du pH sont portés dans la figure 3.18.

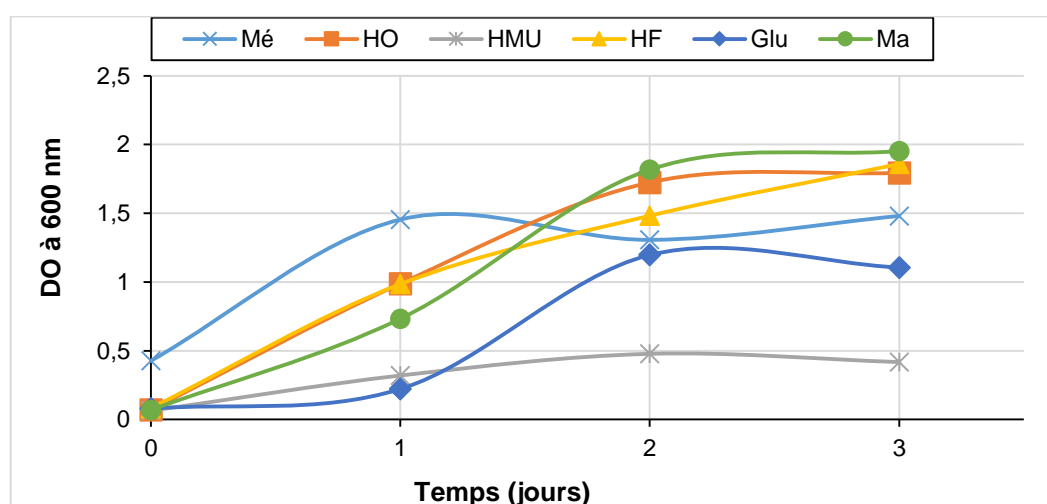


Figure 3.17 : Influence de la nature de la source de carbone sur la cinétique de croissance de la souche SdK644. Mé : Mélasse, HO :huile d'olive, Huile de moteur usagée, HF : huile de friture, Glu : glucose et Ma : Margine.

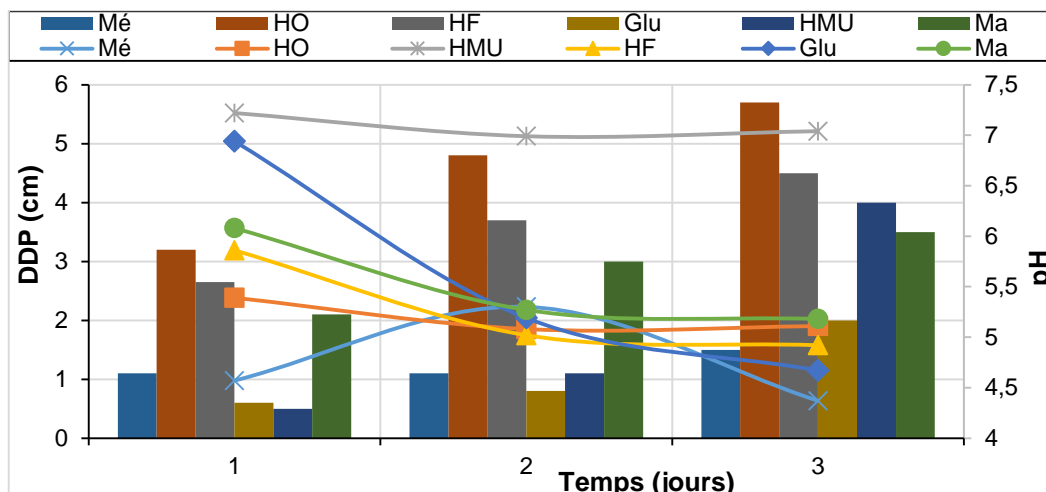


Figure 3.18 : Influence de la nature de la source de carbone sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et du pH de culture (courbes).

D'après ces résultats, l'huile d'olive et l'huile de friture présentent des meilleures sources pour la production de biosurfactant. Une activité de surface importante a été enregistrée ; un diamètre de déplacement de pétrole (DDP) égal à 5,7 et 4,5 cm pour l'huile d'olive et l'huile de friture, respectivement. La margine et l'huile de moteur usagée ont aussi montré une activité relativement élevée (DDP de 3,5 et 4 cm respectivement). En revanche, la mélasse et le glucose étant les plus faibles en termes d'activité de surface (DDP inférieur à 2 cm). En ce qui concerne la croissance microbienne sur les dits substrats, il paraît que la souche SdK644 se développe très bien sur toutes les sources de carbone à l'exception de l'huile de moteur usagée où une faible croissance a été constatée. En outre, nous avons constaté une diminution notable du pH causée par les huiles végétales et les sucres. Des résultats similaires de la diminution du pH ont été rapportés par SADOUK ET AL. [254] et ABOUSEOUD ET AL. [183], en utilisant respectivement l'huile de friture à base de tournesol et l'huile d'olive. Ceci, est probablement dû à la production d'acides gras à partir des huiles végétales et des métabolites de nature acide à partir des sucres [183]. Les résultats obtenus corroborent avec les nombreux travaux publiés relatifs à la production de biosurfactants par des substrats hydrophobes [122]. EDDOUAOU DA ET AL. [184] ont trouvé que l'huile d'olive est la meilleure source de carbone suivie respectivement par l'huile végétale, l'hexadécane et le pétrole. De même, ABOUSEOUD ET AL. [183] ont remarqué une réduction de la tension de surface similaire avec l'huile d'olive, le glucose et

l'hexadécane, alors que l'activité émulsifiante demeure la plus élevée avec l'huile d'olive. Egalement, KHOPADE ET AL. [121] ont testé dix (10) substrats carbonés : huile d'olive, hexadécane, galactose, glucose, amidon, mannitol, saccharose, tréhalose, maltose et fructose. L'huile d'olive a conduit à une réduction de TS la plus importante (30 mN/m) et un indice d'émulsification le plus élevé (80%). Les huiles végétales demeurent les meilleurs substrats d'induction de la production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* [128, 141, 252]. Toutefois, selon FERHAT [255], l'hexadécane est trouvé comme étant la bonne source de carbone suivi respectivement par le pétrole, l'huile d'olive et le glucose. La raison derrière laquelle les huiles végétales (raffinées ou déchets) représentent la bonne source de carbone est qu'elles sont riches en acides gras. Les bactéries utilisant les huiles végétales (fraîches ou usagées) comme source de carbone, possèdent une activité lipasique qui leur permet de les décomposer en acides gras et en glycérol. Ces derniers sont utilisés par la suite dans la synthèse de biosurfactants [256]. NITSCHKE ET AL. [257] et PANTAZAKI ET AL. [256] ont rapporté que la fraction insaturée des acides gras dans les huiles végétales (source de carbone) est responsable de la structure insaturée des rhamnolipides synthétisées.

Par contre, les hydrocarbures se sont révélés moins biodégradables que les huiles végétales, conduisant à une faible croissance cellulaire et, par conséquent, à une moindre production des biosurfactants [258].

D'après WADEKAR ET AL. [252] et HABA ET AL. [250], la composition des acides gras contenus dans les huiles de friture (de tournesol) change notamment par rapport aux teneurs d'acide linoléique, qui diminuent durant la friture. Ceci est expliqué par une forte tendance que l'acide linoléique forme des peroxydes à cause de la présence de deux double liaisons (position ω -6 et ω -9) par rapport à d'autres acides gras, contenant qu'une seule double liaison (acide oléique : position ω -9) ou ne renfermant aucune liaison (acide palmitique et acide stéarique) [252].

3.2.2.2. Influence de la nature de la source d'azote

Des sources d'azote de différentes natures ont été employées dans la production de biosurfactants. Il s'agit du chlorure d'ammonium, du sulfate d'ammonium, du nitrate d'ammonium, du nitrate de potassium et de l'urée comme

source d'azote organique. La source d'azote a été supplémentée dans le MM à raison de 0,4 g/L avec 1% (m/v) de l'huile de friture. L'influence de la nature de la source d'azote sur la croissance microbienne, le pH et la production de biosurfactant est montrée dans les figures 3.19 et 3.20.

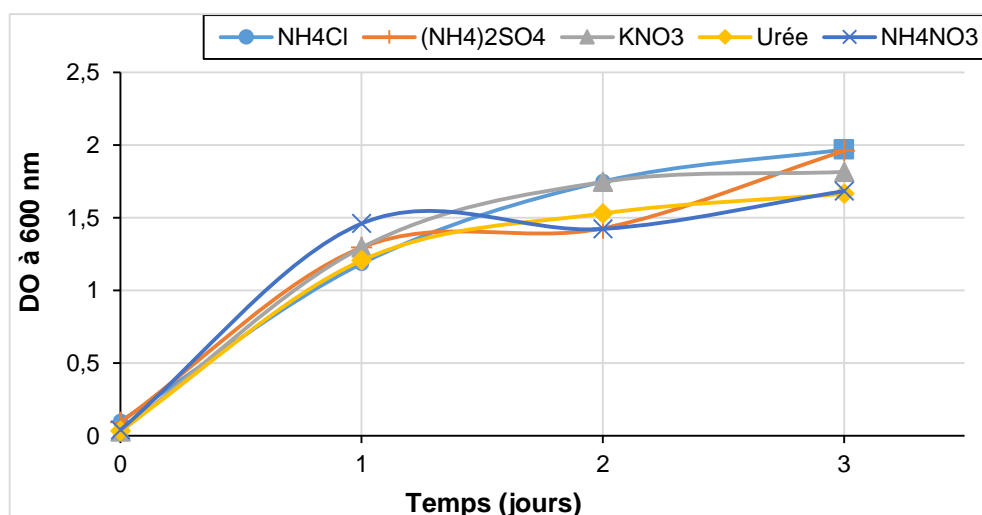


Figure 3.19 : Influence de la nature de la source d'azote sur la cinétique de croissance de la souche SdK644.

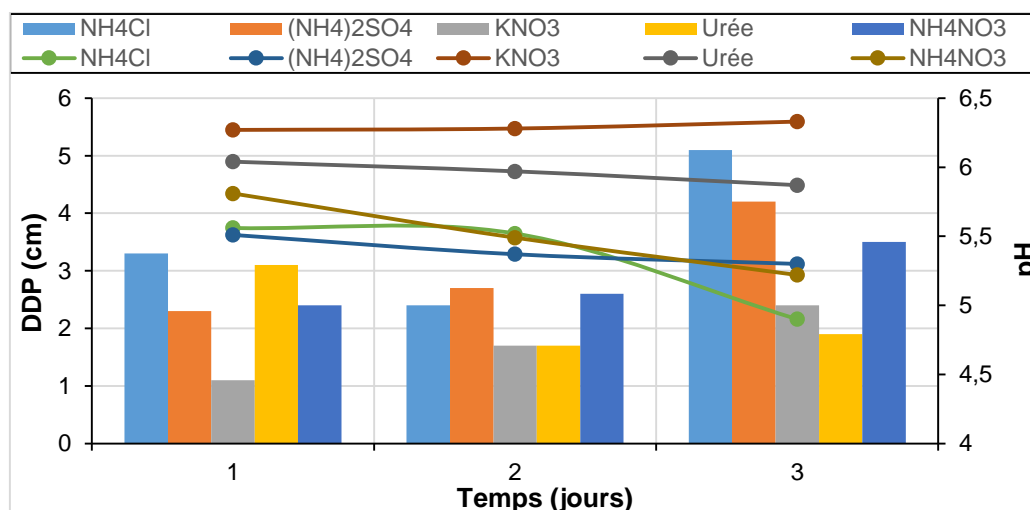


Figure 3.20 : Influence de la nature de la source d'azote sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et le pH du milieu (courbe).

D'après la figure 3.19, nous remarquons que toutes les sources d'azote ont un effet positif sur la croissance microbienne. Ces résultats sont cohérents avec de nombreux travaux publiés. En effet, LOTFABAD ET AL. [242] ont constaté que NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urée, extrait de levure et peptone stimulent la

croissance microbienne. Egalement, SAIKIA ET AL. [259] ont obtenu une bonne croissance avec NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et KNO_3 . Toutefois, la réduction maximale de la TS a été obtenue avec KNO_3 et NaNO_3 . KHOPADE ET AL. [121] ont constaté le NH_4Cl stimule bien l'anabolisme microbien sans être la meilleure source de la production de biosurfactants. Cependant, ABOUSEOUD ET AL. [183] ont signalé une croissance très faible avec NH_4Cl (Biomasse de 1 g/L) par rapport à NaNO_3 (Biomasse de 3,3 g/L) et NH_4NO_3 (Biomasse de 2,2 g/L). La meilleure source en production de biosurfactants était le NH_4NO_3 .

D'après ces résultats, Il semblerait que la croissance microbienne influencée par les différentes sources d'azote est indépendante de la production de biosurfactants.

Considérons l'activité de surface du biosurfactant produit (surnageant de culture) en rapport avec la nature de la source d'azote testée, nous constatons quels sont les sels d'ammonium (NH_4Cl suivi par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) qui peuvent être considérés comme meilleure source d'azote. L'urée a donné une activité de surface la plus faible. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices : par exemple, la production de biosurfactant par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates [260]. Le NH_4Cl est la source d'azote préférable pour la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 [196]. A l'exception de l'urée, CHIEWPATTANAKUL [240] a trouvé que NH_4Cl , HNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et NH_4NO_3 induisent la production de biosurfactant par la souche fongique *Exophiala dermatitidis* SK80. La meilleure source était NH_4NO_3 . LOTFABAD ET AL. [242] ont testé sept (07) sources d'azote de différentes natures (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urée, extrait de levure et peptone). Le NaNO_3 était la meilleure source en termes de la réduction de la tension de surface et la quantité de biosurfactant produite. Les autres sources ont une influence comparable à l'exception de la peptone où la plus faible concentration de biosurfactant a été détectée. SAIMMAI ET AL. [261] ont étudié l'effet de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 , extrait de viande, glutamate monosodium, peptone et extrait de levure sur la production de biosurfactant, par la bactérie *Leucobacter Komagatae* isolée à partir d'un sédiment limongrove, dans un milieu de production à 30 g/L NaCl. La meilleure source était

le glutamate monosodique (une réduction de TS de 45,09 mN/m et un rendement en biosurfactant de 4,02 g/L).

KHOPADE ET AL. [121] ont obtenu une réduction de la TS la plus faible avec la phénylalanine comme source d'azote. Le NH_4Cl stimule la croissance microbienne sans abaisser significativement la tension de surface du fait de la diminution du pH du milieu. ABOUSEOUD ET AL. [183] ont abouti au même constat quant à la diminution du pH avec le chlorure d'ammonium. Dans notre cas, nous avons constaté une diminution significative similaire du pH du milieu en présence de NH_4Cl comparativement aux NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urée et KNO_3 (4,9 ; 5,22 ; 5,3 ; 5,87 et 6,33 respectivement) sans pour autant affecter la production de biosurfactant. Nous pouvons conclure de ça que notre biosurfactant est stable dans cet intervalle de pH.

Le chlorure d'ammonium est choisi comme étant la source d'azote optimale en production de biosurfactant dans la suite du travail.

3.2.2.3. Influence du rapport C/N

Un autre facteur qui a aussi une influence significative sur la production des biosurfactants est le rapport quantitatif C/N. Son importance est rapportée par plusieurs travaux antérieurs. Ce rapport traduit par fois la concentration optimale de la source de carbone par rapport à une concentration fixe de la source d'azote [183, 261, 262].

Les résultats de la cinétique de croissance, du test de déplacement du pétrole et du pH sont portés sur les figures 3.21 et 3.22.

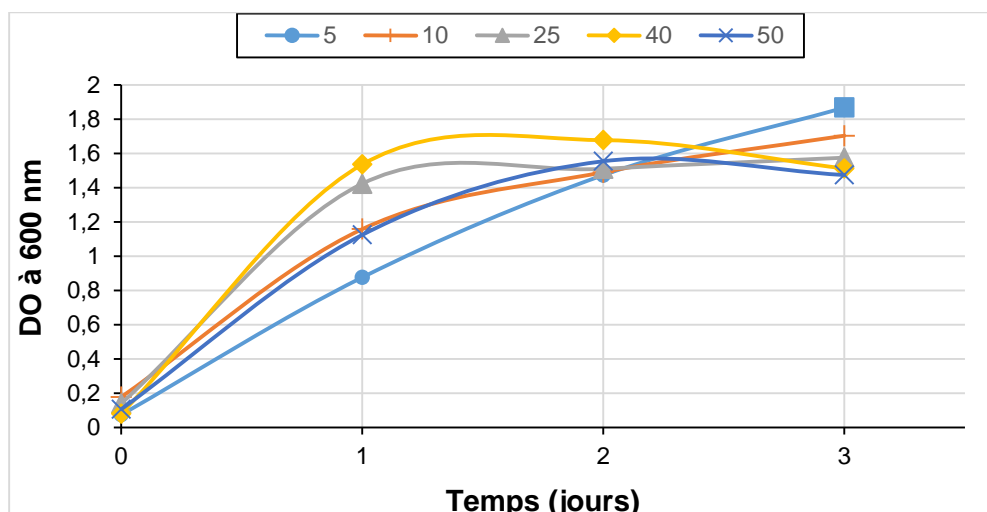


Figure 3.21 : Influence du rapport C/N sur la cinétique de croissance de la souche SdK644.

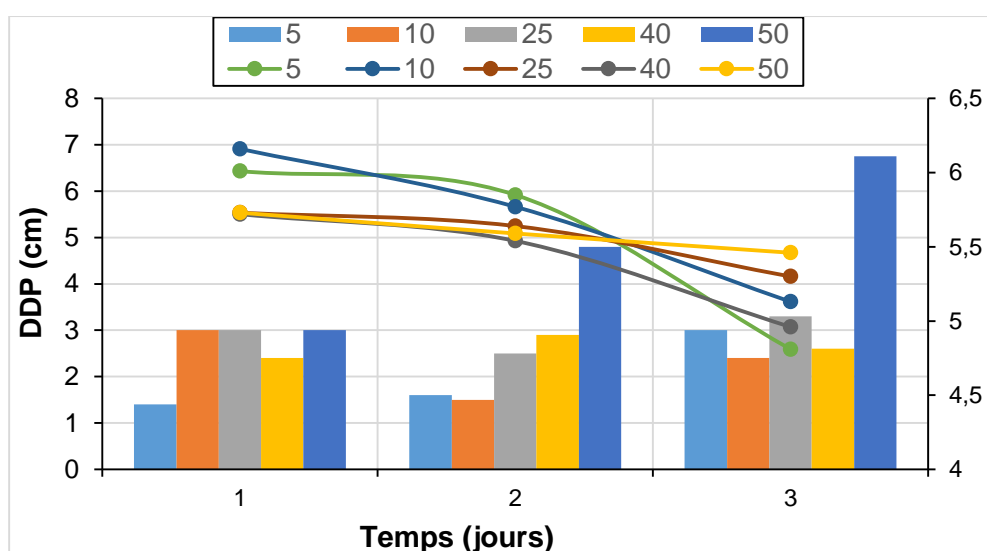


Figure 3.22 : Influence du rapport C/N sur l'activité de surface du biosurfactant (DDP présenté en Histogramme) et du pH de milieu (courbe).

Il ressort de la figure 3.21 que les rapports C/N adoptés affecteraient peu les cinétiques de croissance, des rapports C/N élevés affaiblissent le développement cellulaire. LOTFABAD ET AL. [242] ont remarqué que des rapports C/N allant de 10 à 30 donnent un taux de croissance maximal, alors qu'ils chutent rapidement au-delà d'un rapport de 30. Cependant, SAIMMAI ET AL. [261] ont constaté que pour une augmentation du rapport C/N de 10 à 50, la croissance microbienne a diminué de 80%. Les résultats du test déplacement de pétrole (figure 3.22) montrent qu'un rapport C/N de 50 donne une meilleure activité de surface (DDP = 6,75 cm). Quant

aux variations du pH, il semble que les rapports C/N affecteraient peu sa diminution dans le milieu. De nombreux travaux ont montré que la synthèse des biosurfactants se produit lorsque l'azote est en concentration limitée dans le milieu ou lorsque le carbone est en excès. Chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* PA1 cultivée sur le glycérol, Santa Anna et al. [262] ont étudié l'effet de rapport de C/N en le variant de 10/1 à 120/1. Ils ont trouvé que le taux de production de biosurfactant augmente jusqu'à ce que le rapport C/N atteigne une valeur 60/1. BENINCASA ET ACCORSINI [263] ont inoculé la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI dans un milieu contenant 3% (v/v) d'un déchet des raffineries de l'huile de tournesol comme source de carbone et NaNO_3 comme source d'azote. Ils ont remarqué que pour une augmentation de la concentration de l'azote dans le milieu de 4 à 7 g/L (un rapport C/N de 8/1 et de 4,6/1 respectivement), le taux de rhamnolipide synthétisé diminue significativement de 0,22 à 0,14. HABA ET AL. [250] ont utilisé la souche *Pseudomonas* 47T2 avec 4% (m/v) de l'huile de friture et NaNO_3 à différents rapports C/N (m/m) : 5,7 ; 8 ; 10 et 13,3. En termes de croissance, la biomasse diminue rapidement en augmentant le rapport C/N. Le maximum de biosurfactant (exprimé par le taux de rhamnose) est achevé avec un rapport C/N de 8. Des rapports supérieurs ont influé négativement sur la production de biosurfactant.

ZHU ET AL. [264] ont trouvé que l'accroissement de la concentration de l'huile de friture de 1 à 4%, dans un milieu minéral contenant 4 g/L NaNO_3 , augmente la quantité de rhamnolipide synthétisé par la souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M.

SYLDATK ET AL. [265] ont montré que la limitation de l'azote dans le milieu augmente la production de biosurfactant.

Dans ce qui suit, un rapport C/N de 50 a été choisi pour l'étude de l'effet du reste des facteurs à optimiser.

3.2.2.4. Influence du pH initial du milieu

L'influence de l'acidité ou de l'alcalinité initiale du milieu sur la production de biosurfactant a été étudiée en faisant varier le pH du milieu de 4 à 9. Les figures 3.23, 3.24 présentent la cinétique de croissance et l'évolution du pH, du DDP et de la TS au troisième jour d'incubation influencées par le pH initial du milieu.

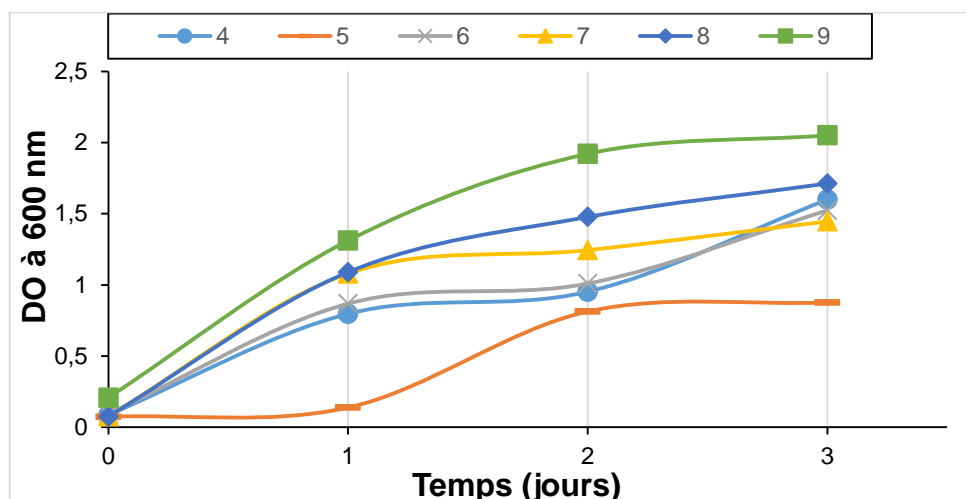


Figure 3.23 : Influence du pH initial du milieu sur la cinétique de croissance de la souche SdK644.

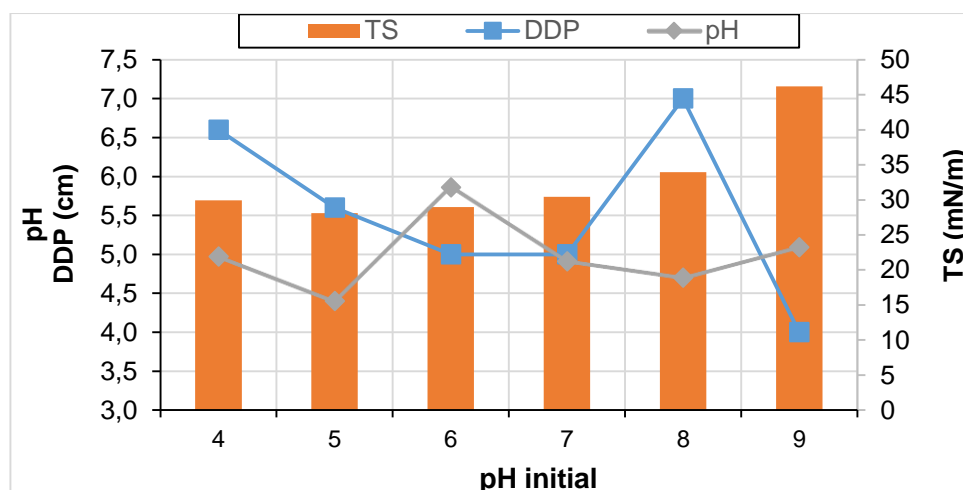


Figure 3.24 : Influence du pH initial du milieu sur l'activité de surface de biosurfactant de la souche SdK644 (DDP et TS) et le pH de milieu à la fin de l'expérience.

Les résultats présentés dans les deux figures 3.23 et 3.24, montrent que le pH initial du MM affecte directement la croissance et l'activité de surface du biosurfactant produit. Bien que nous ayons constaté une chute du pH à partir du premier jour (y compris pour des pH initiaux alcalins) à des valeurs proches de 5, la souche SdK644 se comporte différemment. D'un côté, elle croît bien dans des conditions initiales alcalines qu'acides. D'un autre côté, la production de biosurfactant est meilleure à des pH initiaux acides à neutre (4–7).

BEDNARSKI ET AL. [266] ont signalé que la levure *Candida apicola* peut diminuer le pH jusqu'à 2 (pH initial de 5,5) lorsqu'elle est cultivée sur le glucose (40

g/L). Un ajustement du pH à 5,5 améliore significativement la production de sophorolipide produit par cette souche bactérienne. Chaque microorganisme produit son biosurfactant dans un intervalle de pH spécifique [267, 268]. Par conséquent, une étude complémentaire de l'effet du pH initial, en utilisant des solutions tampons à différents pH est recommandée afin d'améliorer la production de biosurfactant.

Selon les travaux de GUERRA-SANTOS ET AL. [142], la production maximale obtenue de rhamnolipide se situe dans une gamme de pH de 6 à 6,5, un pH supérieur à 7 a diminué la production. Toutefois, le biosurfactant issu de l'Actinobactérie marine *Nocardioopsis* sp. B4 a réduit efficacement la tension de surface à pH 7. Des valeurs supérieures ou inférieures à pH=7, remontent la tension de surface [121]. En revanche, LOTFABAD ET AL. [242] ont obtenu une production maximale de biosurfactant pour des pH 8 et 9 (TS de 29 et 27 mN/m respectivement). La tension de surface chute rapidement pour des pH de 5 et 6 (TS de 68 et 37 mN/m respectivement). YIN ET AL. [188] ont remarqué que la tension de surface demeure stable dans toute la gamme de pH allant de 6 à 10 en utilisant la souche *Pseudomonas aeruginosa* S6.

L'optimum de pH, choisi dans la production de biosurfactant par la souche SdK644, est celui de 5.

3.2.2.5. Influence de la salinité

L'effet de la salinité du milieu a été étudié en faisant varier la concentration du chlorure de sodium (NaCl) comme suit : 0,5 ; 10 ; 23 ; 50 ; 100 et 150 g/L. Les figures 3.25 et 3.26 présentent les cinétiques de croissance et l'évolution du pH, du DDP et de la TS au troisième jour d'incubation en fonction de la salinité du milieu.

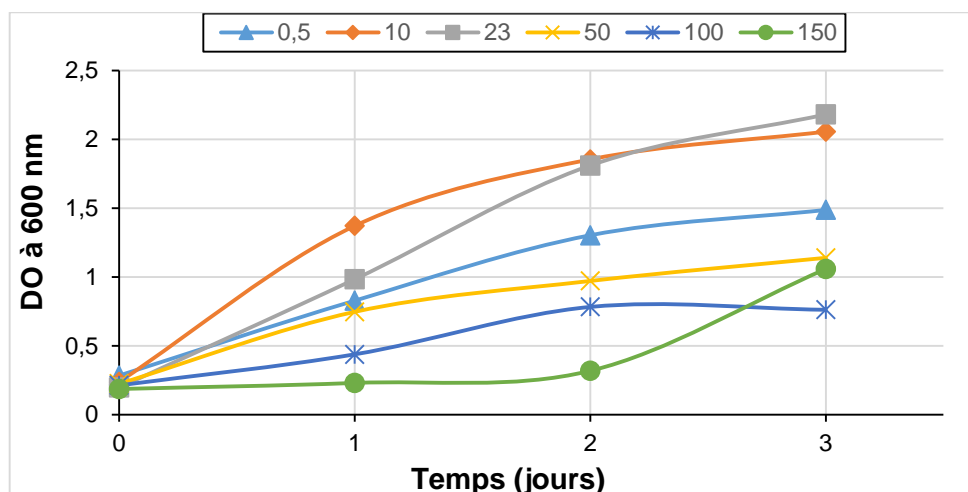


Figure 3.25 : Influence de la salinité sur les cinétiques de croissance de la souche SdK644.

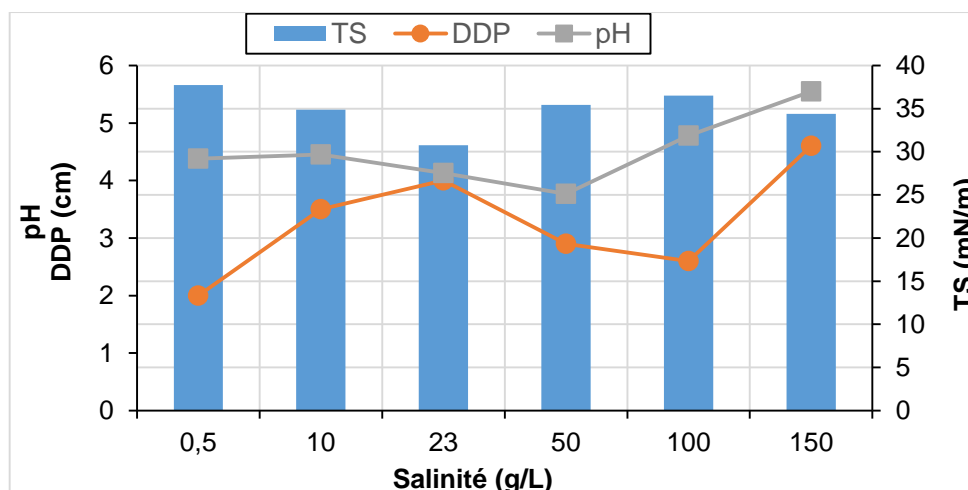


Figure 3.26 : Influence de la salinité sur l'activité de surface de biosurfactant de la souche SdK644 (DDP et TS) et le pH de milieu à la fin de l'expérience.

La figure 3.25 montre que la croissance microbienne de la souche SdK644 est optimale pour les deux salinités 10 et 23 g/L. Une bonne croissance est observée dans la gamme de salinité allant de 0,5 à 50 g/L. Les fortes salinités (100 et 150 g/L) ralentissent la croissance cellulaire. A titre indicatif, la phase de latence dure deux jours à une concentration en sel de 150 g/L, la biomasse évolue très lentement (DO = 0,2–0,3). Une fois la souche SdK644 s'est adaptée à des concentrations élevées (150 g/L), une bonne croissance est enregistrée au 3^{ème} jour (DO = 1). Ces résultats confirment le caractère halotolérant de la souche SdK644. Les résultats de la production de biosurfactant (figure 3.26) révèlent une importante

activité de surface pour toute la gamme de salinité étudiée (y compris les fortes salinités). L'optimum de la salinité est de 23 g/L NaCl (TS = 30,77 mN/m, DDP = 4 cm). Cependant, une légère augmentation du pH est observée à des salinités élevées (supérieures à 50 g/L).

Plusieurs souches halophiles ont été rapportées comme potentiellement productrices de biosurfactants. Par exemple, celles appartenant aux genres *Halomonas* et *Marinobacter*. La souche *Halomonas* sp. ANT3b est capable de produire un glycolipide dans un milieu de base contenant 24 g/L de NaCl et 2% (v/v) d'hexadécane utilisé comme source de carbone [269]. RADDADI ET AL. [270] ont isolé 43 souches bactériennes (*Halomonas* spp. et *Marinobacter* spp.) à partir des sédiments portuaires. Les souches ont été ensemencées dans un milieu salin (30 g/L NaCl) avec le glucose à 10 g/L ou l'huile de soja (2%, v/v) comme source de carbone. Vingt-six (26) souches de la collection dont leurs biosurfactants ont formé une émulsion stable (E24 > 50%) avec l'hexane et le toluène. KEBBOUCHE-GANA Et Al. [271] ont sélectionné deux souches archéobactériennes *Halovivax* sp. A21 et *Haloarcula* sp. D21, qui sont capables de produire de biosurfactants dans un milieu très salin (125 g/L de NaCl et 160 g/L de MgCl₂). GANDHIMATHI ET AL. [272] ont étudié l'influence de la salinité sur la synthèse de biosurfactant par l'actinobactérie marine *Nocardioopsis alba* MSA10. La production était maximale à une salinité de 10 g/L de NaCl. Des salinités supérieures (jusqu'à 35 g/L NaCl) réduisent l'activité de surface du biosurfactant. THAVASI ET AL. [138] ont abouti à une production maximale de biosurfactant pour une salinité de 30 g/L de NaCl, par *Bacillus megaterium* isolée à partir d'une eau de mer.

3.2.3. Cinétique de production du biosurfactant

Afin de déterminer la relation entre la croissance microbienne et la production de biosurfactant et d'optimiser le temps de production, des mesures de la DO à 600 nm et de la TS ont été effectuées. Les conditions opératoires optimales sont : 100 mL de MM, 2% (m/v) de HF, 0,4 g/L NH₄Cl, C/N = 50, un pH de 5 et une salinité de 23 g/L. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 3.27.

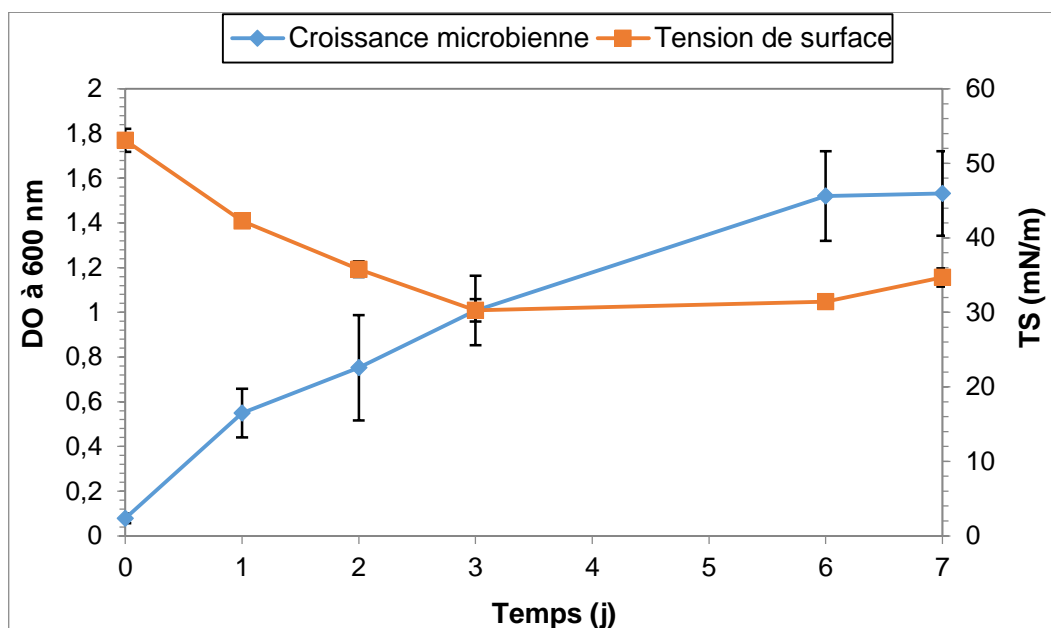


Figure 3.27 : Cinétique de croissance et de production du biosurfactant par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644.

Les résultats obtenus montrent que la TS du surnageant décroît rapidement avec le temps pour atteindre une valeur minimale de 30,29 mN/m au bout du 3^{ème} jour, puis elle augmente légèrement jusqu'au dernier jour. D'autre part, la production de biosurfactant était maximale durant la phase de croissance exponentielle (3^{ème} – 6^{ème} jour). Au 7^{ème} jour, une faible perte en activité de surface (TS = 34,68 mN/m) a été enregistrée, donc c'est le début (à partir de 6^{ème} jour) de la phase stationnaire. Ce comportement indique que la production de biosurfactant dépend de la phase de croissance microbienne [12].

L'augmentation de la TS après le 6^{ème} jour montre que la biosynthèse du biosurfactant est arrêtée. Ceci est probablement dû à la formation des métabolites secondaires et à l'adsorption des molécules du biosurfactant à l'interface eau-huile [183]. Ces résultats indiquent que la biosynthèse du biosurfactant à partir de l'huile de friture se produit essentiellement durant la phase exponentielle de croissance, en suggérant que le biosurfactant est produit comme métabolite primaire liée à la cinétique de croissance [121].

De nombreux cas de production de biosurfactant comme métabolite primaire (indépendamment de la nature de la source de carbone inductrice) ont été listés dans la littérature. La souche *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895ensemencée

sur l'huile d'olive produit un biosurfactant associé à la cinétique de croissance [183]. KHOPA DE ET AL. [121] ont également rapporté la production d'un biosurfactant comme métabolite primaire quand la souche marine *Nocardiopsis* sp. B4 est inoculée sur l'huile d'olive. De même pour la souche halotolérante *Planococcus* utilisée en présence de l'hexadécane [273] et les souches *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 et *Pseudomonas taiwanensis* L1011 cultivées respectivement sur le glycérol et le D-mannitol [274].

D'autres travaux ont aussi rapporté la synthèse de biosurfactant comme métabolite secondaire. HABA ET AL. [250] ont constaté qu'un rhamnolipide, issu de *Pseudomonas* 44T1 en présence de l'huile de friture, est produit en grande quantité durant la phase stationnaire de croissance. SANTOS ET AL. [170] ont abouti à une production maximale de biosurfactant durant la phase stationnaire en cultivant la levure *Candida lipolytica* dans un milieu contenant les graisses animales et de la liqueur de maïs. Un rhamnolipide produit par la souche *Burkholderia thailandensis* E264 inoculée sur le glycérol est synthétisé en tant que métabolite secondaire [275].

3.2.4. Extraction et purification partielle du biosurfactant

Après trois (03) jours d'incubation, l'activité du biosurfactant « HF644 » était maximale (DDP maximal), le milieu change sa couleur (couleur du lait) et la couche huileuse a été émulsionnée avec la phase eau (figure 3.28).

Après extraction et purification partielle du HF644 à l'aide de l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu un liquide visqueux d'une couleur marron ressemblant à l'aspect du miel (figure 3. 29).

Le rendement total d'extraction (après la première et la deuxième extraction) pour le HF644 était de 4,93 g/L. Cela, donne un rendement de conversion (par rapport à l'huile de friture ; la source de carbone) de 0,25 g HF644/g HF, donc un taux de conversion de 25%. Un rendement proche (0,34 g de biosurfactant/g d'huile de friture) a été obtenu par la souche 47T2 de *Pseudomonas aeruginosa* [250].



Figure 3.28 : Activité de surface maximale du biosurfactant HF644 produit par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 à partir de l'huile de friture.



Figure 3.29 : Aspect textural du biosurfactant HF644.

WADEKAR ET AL. [252] ont obtenu un rendement de 2,8 g/L avec l'huile de friture à 5% (m/v) dans un milieu minéral de baseensemencé avec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Quant à ZHU ET AL. [264], ils ont utilisé une souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M pour aboutir à la production d'un biosurfactant de type rhamnolipide, un rendement de 12,47 g/L a été enregistré. Dans les mêmes conditions, le rendement de production a augmenté de 20 g/L en utilisant un bioréacteur de 50 litres. DE LIMA ET AL. [276] ont obtenu un rendement de 3,3 g/L avec l'huile de friture de soja à une concentration de 22 g/L en présence d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PACL cultivée dans un bioréacteur de 10 litre. EDDOUAOU DA ET AL. [184] ont trouvé un rendement de 2,1 g/L de biosurfactant

avec l'huile d'olive comme source inductrice de carbone (1%, v/v) dans un milieu riche LB.

3.2.5. Propriétés du biosurfactant HF644

3.2.5.1. Concentration micellaire critique

Comme le montre la figure 3.30, la TS est inversement proportionnelle à la concentration en biosurfactant pour des valeurs inférieures à 787 mg/L. Au-delà, aucune diminution significative n'est observée. Cela, donne une valeur de CMC de 787 mg/L et une TS minimale de 31,6 mN/m. La CMC de notre biosurfactant est relativement élevée par rapport aux CMC des biosurfactants, généralement comprises entre 1 et 200 mg/L [76]. Néanmoins, cette valeur est inférieure aux CMC de certains tensioactifs chimiques tels que le dodécylsulfate de sodium (SDS) (CMC allant de 2307 à 2596 mg/L avec une ST de 35 mN/m) [277, 278]. Des résultats comparables ont été obtenus pour un biosurfactant produit par *Staphylococcus* sp. 1E (CMC = 750 mg/L, ST = 25,9 mN/m) [184]. De plus, le biosurfactant produit par notre souche SdK644 présente une CMC inférieure à celles rapportées par FERHAT ET AL. [279] et GUDIÑA ET AL. [280] (1500 mg/L et 2500 mg/L, respectivement).

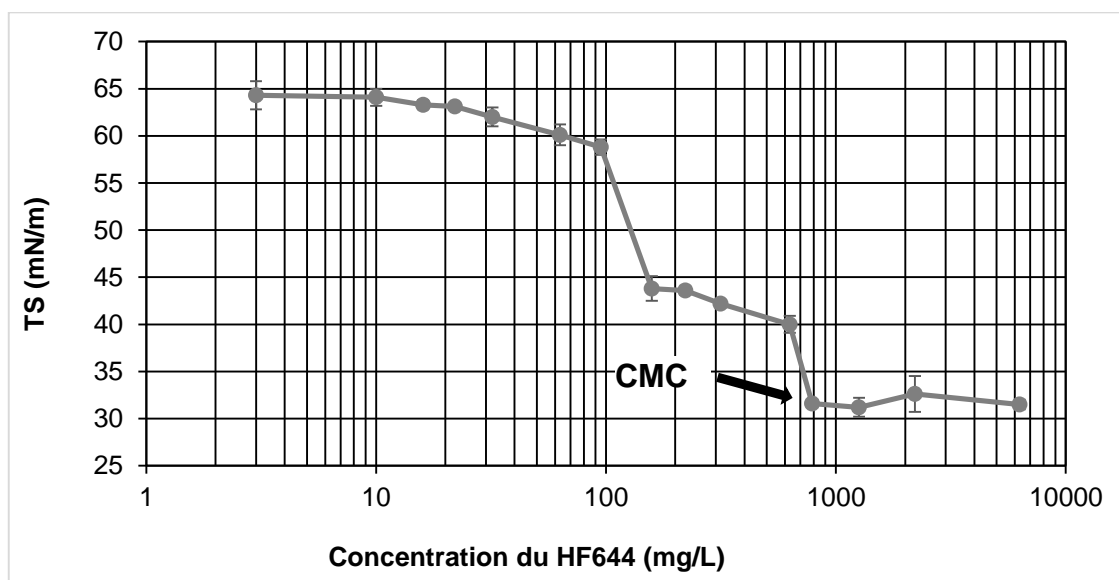


Figure 3.30 : Evolution de la TS en fonction de la concentration du biosurfactant HF644 et détermination de la CMC.

3.2.5.2. Pouvoir émulsifiant du biosurfactant HF644

Le biosurfactant HF644 possède un bon pouvoir émulsifiant contre l'huile d'olive (E24 = 73%), suivi par l'essence (E24 = 48%), le pétrole (E24 = 40%) et un faible pouvoir émulsifiant *vis-à-vis* le diesel et l'huile végétale (17 et 19%, respectivement). Le toluène et l'hexane n'ont pas été émulsionnés (figure 3.31).

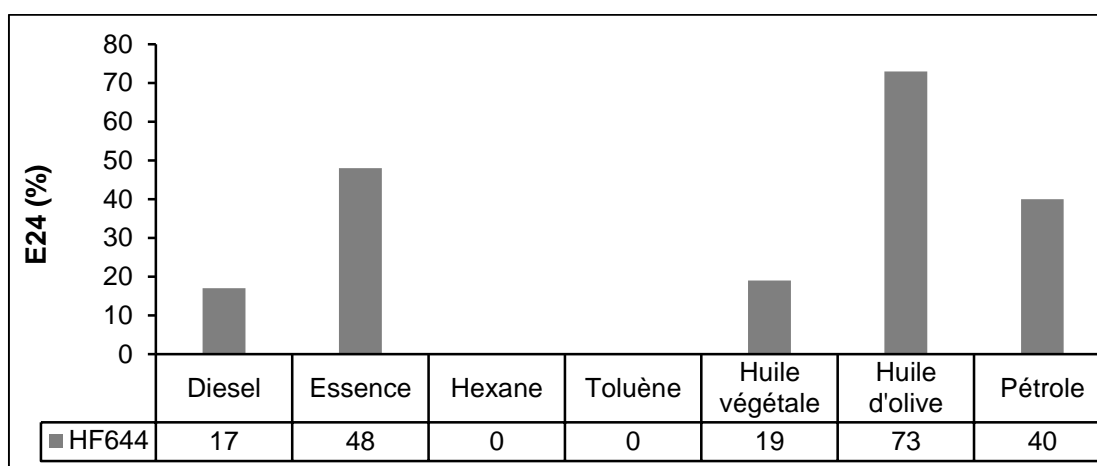


Figure 3.31 : Pouvoir émulsifiant du biosurfactant HF644 vis-à-vis différents substrats hydrophobes.

FERRADJI [181] a trouvé une émulsification importante avec le pétrole comme substrat hydrophobe (E24 de 100%). Cependant, cette activité était très faible avec 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%). En revanche, le biosurfactant produit par la souche *Nocardioopsis* sp. B4 présente un meilleur pouvoir émulsifiant avec l'huile d'olive. L'indice d'émulsion était de 80% [121]. MNIF [118] a indiqué que la souche marine *Pseudomonas aeruginosa* C450R a une activité émulsifiante maximale vis-à-vis le pétrole, une bonne activité contre les huiles végétales (E24 de plus de 50%). Cependant, quand des hydrocarbures individuels sont employés (toluène, octane), le pouvoir émulsifiant du rhamnolipide de la souche C450R devient très faible.

3.2.5.3. Stabilité du biosurfactant HF644

Les effets de la température, du pH et de la salinité sur la stabilité du biosurfactant HF644 sont illustrés dans les figures 3.32 (a, b et c).

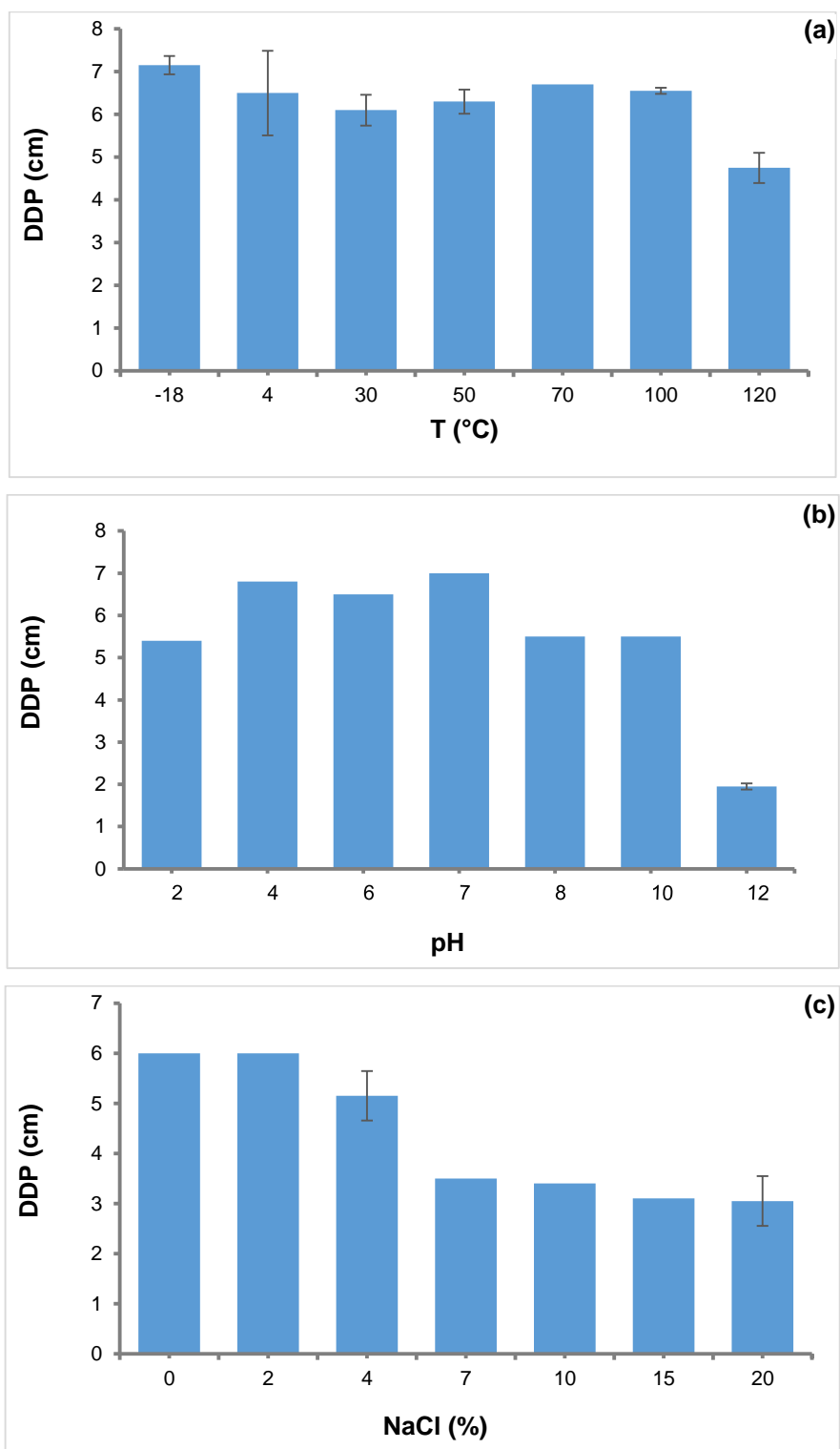


Figure 3.32 : Stabilité du biosurfactant HF644 sous l'effet de (a) : Température, (b) : pH et (c) : salinité.

Les résultats obtenus concernant l'effet de la température (figure 3.32.a) montrent que le biosurfactant HF644 est stable dans la gamme de température étudiée. L'autoclavage à une température de 120 °C pendant 20 min a légèrement réduit l'activité de surface de notre produit (DDP = 4,75 cm). À une température d'environ -18 °C (congélation), le HF644 garde son activité de surface (DDP = 7,15 cm). Par conséquent, la congélation du produit pour une éventuelle purification par lyophilisation est possible.

Les résultats obtenus sur la stabilité thermique de notre biosurfactant sont satisfaisants. Le HF644 est plus stable par rapport au Bio-AB1 synthétisé par la souche *Streptomyces* sp. AB1. Ce dernier est stable à des températures comprises entre 4 et 50 °C, au-delà il perd son activité et à 100 °C le produit devient instable [181]. KHOPADE ET AL. [121] ont obtenu un biosurfactant plus stable thermiquement. En effet, ce biosurfactant, synthétisé par *Nocardiopsis* sp. B4 cultivée sur l'huile d'olive, est stable dans une gamme de température allant de 30 à 100°C. EDDOUAOUUDA [149] a trouvé que le biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus* sp. 1E est stable en augmentant la température de 4 jusqu'à 55°C. Pour des températures supérieures à 70°C, le biosurfactant est instable thermiquement.

Des résultats similaires à nos résultats, sont trouvés par SAIMMAI ET AL. [261], un biosurfactant produit par une souche marine *Inquilius limosus* KB3, montre une bonne stabilité dans toute la gamme de température allant de 4 à 120 °C.

La bonne stabilité du biosurfactant HF644 à des températures élevées le rend très utile dans les applications industrielles : agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique où les produits sont stérilisés par chauffage [121]. Ainsi, la stabilité de notre produit à 4 °C permet son conservation au froid.

Pour l'influence du pH (figure 3.32.b), nous remarquons que le biosurfactant HF644 est très stable dans les milieux acides et basiques. Le HF644 garde sa stabilité dans un large intervalle de pH allant de 2 à 10. À pH 12, l'activité de surface de notre produit chute rapidement.

Le biosurfactant obtenu dans les travaux de FERRADJI [181] possède une stabilité aux variations de pH similaire à celle obtenue dans notre travail. Son produit, le Bio-AB1 est stable à des pH compris entre 2 à 11. À pH 12, le produit est instable. De même, EDDOUAOUA [149] a trouvé que le biosurfactant produit par la souche 1E est stable dans toute la gamme de pH allant de 2 à 12. En revanche, HADDAD ET AL. [281] ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN/m. À un pH = 3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN/m) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide. KHOPADE ET AL. [121] ont trouvé que le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis* sp. B4 est stable en milieux basiques (8 à 12), mais il est moins stable en milieux acides (pH < 7). Des résultats similaires ont été rapportés par BEZZA ET CHIRWA [282], qui ont constaté que le lipopeptide produit par *Bacillus subtilis* CN2 est stable dans l'intervalle de pH de 5 et 13. À des pH inférieurs à 5, la stabilité du biosurfactant est considérablement réduite suite à la précipitation du produit. La précipitation des biosurfactants à des pH acides a été ainsi mise en évidence par ABOUSEOUD ET AL. [183]. La résistance du biosurfactant HF644 à des pH acides a été constatée lors de l'extraction de ce dernier du milieu de production. La méthode par précipitation acide est inappropriée à la récupération de notre produit. Les variations du pH et de la salinité influent sur la stabilité des biosurfactants par modification de la taille et la forme des micelles formées [283].

Quant à l'effet de la salinité (figure 3.32.c), l'activité tensioactive de notre biosurfactant étant maximale (DDP = 5,15–6 cm) jusqu'à une salinité de 40 g/L. Au-delà, l'activité diminue à des valeurs de DDP moyennes (3,05–3,5 cm), sans qu'elle ait atténué du fait des forts teneurs en sel.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par FERRADJI [181], le biosurfactant Bio-AB1 est stable à des salinités allant jusqu'à 30 g/L. Des concentrations supérieures diminuent la TS et l'E24. Par contre, KHOPADE ET AL. [121] ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Nocardiopsis* sp. B4 a pu former des émulsions stables jusqu'à 80 g/L de NaCl. Néanmoins, certains travaux ont montré que les biosurfactants peuvent tolérer des concentrations en sel allant jusqu'à 300 g/L de NaCl [270, 284].

Comme le montre la figure 3.32.c, l'activité de surface du biosurfactant HF644 reste stable jusqu'à 20% de NaCl (DDP = 3 cm). Le biosurfactant HF644 n'a pas été précipité dans des solutions de chlorure de sodium (jusqu'à 20%). D'après FERHAT [255], cette tolérance aux forces ioniques offre aux biosurfactants plus d'efficacité dans les industries pétrolières dont la plupart pratiquent en conditions de salinité très élevée.

3.2.6. Caractérisation structurale du biosurfactant HF644 par IRTF

Le spectre IR des groupements fonctionnels caractéristiques du biosurfactant HF644 est présenté dans la figure 3.33.

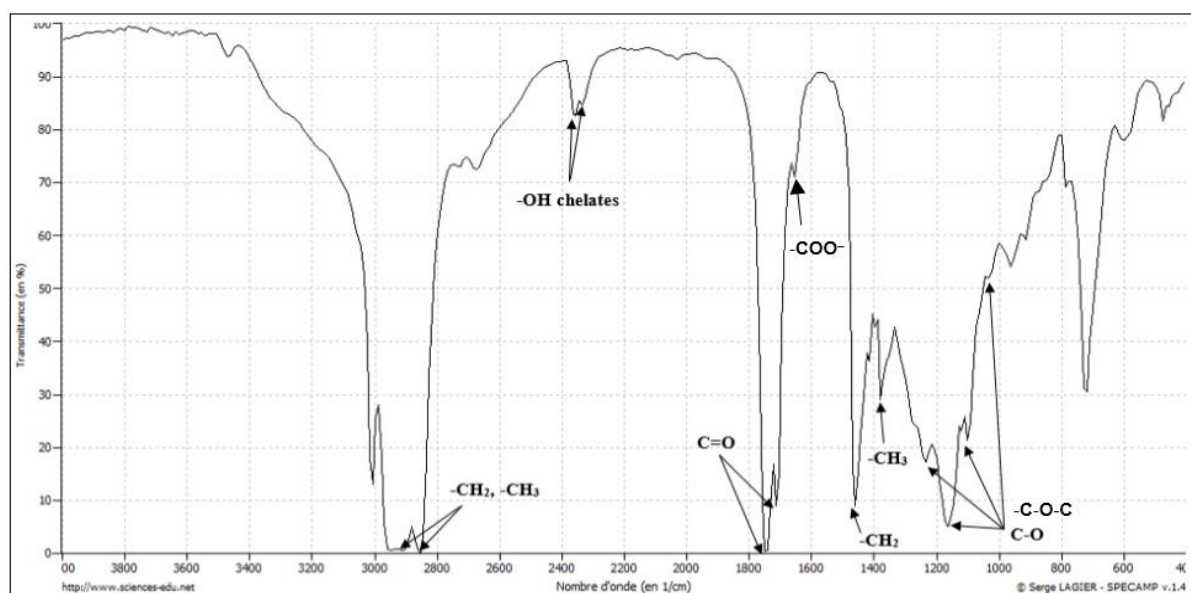


Figure 3.33 : Spectre IRTF du biosurfactant HF644.

L'analyse par IRTF du biosurfactant HF644 a montré un profil relativement similaire des biosurfactants glycolipidiques, et ceci est dû à la présence des groupements fonctionnels suivants :

- Groupements alkyles ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$) des chaînes aliphatiques des acides gras, du fait de l'apparition des bandes très intenses dans la région $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ (vibrations d'élongation) et des pics pointés à 1460 et 1380 cm^{-1} (vibrations de déformation) [183, 253, 256, 285].
- Groupement carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) des esters et acides carboxyliques, visualisés par les pics situés à 1750 et 1714 cm^{-1} respectivement [183, 252, 256,

286]. Ainsi, le pic observé à 1655 cm^{-1} est dû aux vibrations d'élongation de l'ion carboxylate (COO^-) [129, 256, 259, 287].

- Les pics affichés entre 1300 et 1000 cm^{-1} (1236 , 1164 , 1119 , 1101 et 1035 cm^{-1}) sont attribués aux vibrations d'élongation des liaisons C–O et C–O–C affirmant la présence d'hydrates de carbone dans la structure du biosurfactant HF644 [285, 286, 288, 289].
- L'absence des pics à 3422 , 3246 et 1552 cm^{-1} confirme l'inexistence des groupements N-H dans la structure du HF644 [129, 253].

3.2.7. Conclusion

Les sites contaminés par les hydrocarbures constituent un réservoir pour l'isolement de microorganismes hydrocarbonoclastes pouvant produire de biosurfactants. Ces derniers facilitent l'utilisation des hydrocarbures de la couche huileuse en les émulsifiant en fines gouttelettes et/ou en les solubilisant dans la phase aqueuse *via* leurs structures micellaires. Les substrats hydrophobes sont considérés donc comme des meilleures sources stimulant une large production de biosurfactants. Celles ayant un caractère biodégradable provoquent une bonne croissance microbienne ce qui augmente davantage le rendement de production. La souche SdK644 produit un biosurfactant qui réduit la tension de surface du milieu à 38 mN/m en utilisant le pétrole comme source de carbone. En substituant le pétrole par l'huile d'olive (substrat facilement biodégradable) la production de biosurfactant est nettement améliorée. La TS descend à une valeur de $29,2\text{ mN/m}$.

Dans un souci général de minimiser le coût de production du produit présenté, une démarche à suivre consiste à utiliser des substrats déchets et à optimiser les principaux facteurs influençant la production. Quatre substrats ont été testés : la margine, l'huile de friture, la mélasse et l'huile de moteur usagée. Il a été montré que les substrats hydrophobes donnent une activité de surface maximale par rapport à la mélasse (source de saccharose). Le DDP relevé du 3^{ème} jour d'incubation est de $4,5$; 4 ; $3,5$ et $1,5\text{ cm}$ respectivement pour l'huile de friture, l'huile de moteur usagée, la margine et la mélasse. Néanmoins, la croissance de la souche SdK644 est mieux stimulée par les huiles végétales et les sucres que le HMU. Mais cela est associé avec une diminution de pH du milieu à $4-5$ du fait de la production de métabolites acides. Le NH_4Cl a été distinguée comme la meilleure source d'azote

dans la production de biosurfactant (DDP de 5,1 cm), en utilisant l'huile de friture comme source de carbone. Bien que le chlorure d'ammonium contribue à la diminution du pH, il constitue la meilleure source pour les espèces *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. La combinaison de la source de carbone et d'azote à un rapport C/N de 50 améliore davantage l'activité de surface du biosurfactant (DDP de 6,75 cm). Le pH initial du milieu et la salinité optimale de production de biosurfactant sont respectivement de 5 et 23 g/L de NaCl. Par ailleurs, le suivi de la cinétique de croissance et de production de biosurfactant par la souche SdK644 a indiqué une production maximale durant la phase exponentielle de croissance (3^{ème} jour), suggérant sa synthèse en tant que métabolite primaire.

Dans les conditions optimales, 2 L de bouillon de culture est servie pour extraire l'agent extracellulaire (nommé HF644) produit par la souche SdK644. Un rendement de production de 4,93 g/L est obtenu. Le produit HF644 a une CMC de 787 mg/L et possède une bonne activité émulsifiante vis-à-vis l'huile d'olive suivi par l'essence et le pétrole (E24 de 73, 43 et 40% respectivement). Le HF644 est très stable thermiquement. Sa résistance s'étale des températures négatives (congélation) aux températures de l'autoclavage (121 °C). Il résiste aussi aux fluctuations de pH (2–10) et aux variations de la salinité (0–200 g/L NaCl) avec un optimum entre 0–40 g/L de NaCl. L'analyse structurale par IRTF du HF644 montre un profil similaire aux biosurfactants glycolipidiques.

3.3. Etude écotoxicologique sur l'*Artemia*

3.3.1. Suivi de l'éclosion des cystes et développement des nauplius

Les étapes qui procèdent l'obtention des nauplius stade II-III ont été suivies par une observation microscopique photonique avant et après 24–48 h de l'éclosion. Différentes formes morphologiques ont été prises : cystes non éclos, juste à l'éclosion et après éclosion et développement jusqu'au stade II-III (figure 3.34).

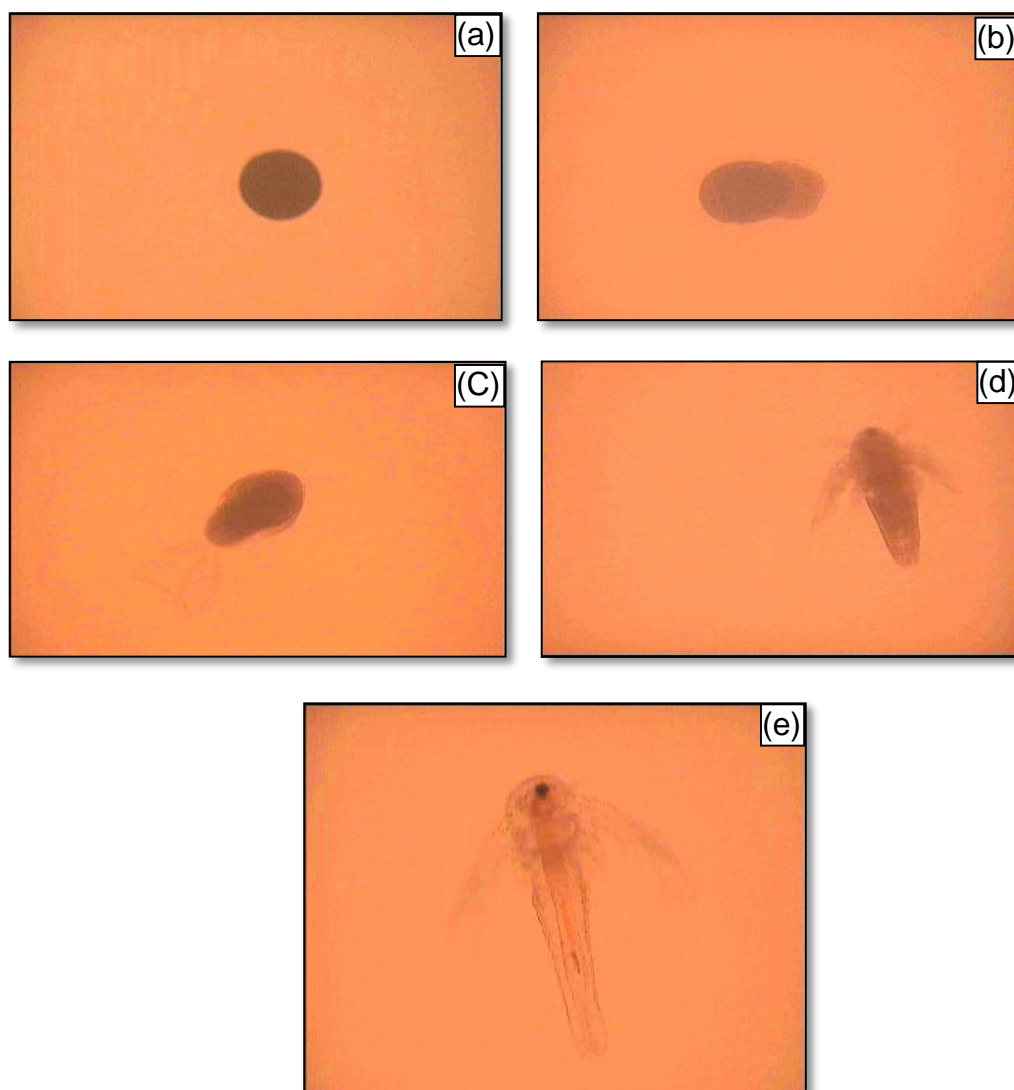


Figure 3.34 : Étapes d'éclosion des cystes d'*Artemia franciscana* observées au grossissement GX10. (a) Cystes d'*Artemia*, (b) prés-nauplius stade 1, (c) prés-nauplius stade 2, (d) nauplius stade I et (e) nauplius stade II-III.

3.3.2. Toxicité des substances testées vis-à-vis l'*Artemia*

L'*Artemia* est considéré comme organisme modèle dans les études écotoxicologiques en milieu marin. Les substances testées sont choisies en relation avec le contexte global de l'étude, en l'occurrence : la remédiation de l'environnement marin contaminé par le pétrole. En effet, la partie suivante traitera le pouvoir solubilisant du biosurfactant HF644 et du surfactant Tween 80 en présence du pétrole, ainsi que l'incorporation du HF644 dans la bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole. Par voie de conséquence, nous allons tester au préalable la toxicité de ces agents (HF644 et Tween 80) et le polluant (le pétrole

et sa fraction aliphatique). Ce dernier est très faiblement soluble dans l'eau. Seule la fraction soluble qui affectera les organismes du milieu marin. Un protocole standard a été élaboré pour préparer cette fraction (nommée fraction adaptée à l'eau, *Water Accommodated Fraction WAF*) utilisée dans la détermination de la toxicité aquatique [290]. Vu que la préparation de cette fraction est un peu fastidieux et nécessitera de volumes importants de pétrole et de solvants d'extraction, nous avons la remplacé avec une fraction solubilisée dans un solvant aprotique faiblement toxique : le diméthylsulfoxyde (DMSO) [291].

Le surfactant SDS a été utilisé comme toxique de référence pour confirmer la validité des essais, sa toxicité sur l'*Artemia* est bien connue, quelle que soit son origine.

3.3.2.1. Qualité physico-chimique de l'eau de dilution

La qualité de l'eau de dilution joue un rôle très important dans les essais écotoxicologique sur l'*Artemia*. Une eau faible en oligo-éléments essentiels à la croissance de l'*Artemia* donne des mauvais résultats, comme dans le cas de l'eau de mer artificielle que nous avons utilisé dans un test préliminaire. Cette eau ne contient que l'ion bicarbonate, le magnésium et le sodium, ce qui a donné un rendement d'éclosion très faible. Cette eau a été remplacée par une eau de mer naturelle d'un endroit non pollué et dans les caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

- ✓ pH=8,23.
- ✓ Salinité=35,8 g/Kg.
- ✓ Conductivité = 54,4 mS/cm.
- ✓ Oxygène dissous = 101,3%.

Ces valeurs (après aération de l'eau pendant 24 h) sont conformes aux exigences sur la qualité des eaux de dilutions proposées par VANHAECKE ET AL. [162].

3.3.2.2. Validité des bioessais

A chaque bioessai sur l'*Artemia* est associé un test sur le surfactant SDS afin de déterminer sa CL50. Un essai témoin est ainsi préparé en parallèle pour déterminer la mortalité naturelle. Un test est considéré valide si la CL50 du SDS est

située entre 13,3 et 19,9 mg/L et la mortalité dans l'essai témoin ne dépasse pas 10%.

3.3.2.3. Toxicité du surfactant Tween 80

Nous avons préparé des concentrations décimales à partir d'une solution mère de Tween 80 de 20 g/L. Le Tween 80 est très soluble dans l'eau contrairement au SDS. Les résultats de toxicité du Tween 80 sur l'*Artemia* sont présentés sur le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Effet de la concentration du Tween 80 sur les nauplius d'*A. franciscana*.

| Concentration de Tween 80 (mg/L) | Effectif | Morts |
|----------------------------------|----------|-------|
| 1 | 10 | 0 |
| 10 | 9 | 0 |
| 100 | 11 | 0 |
| 1000 | 11 | 1 |
| 10000 | 11 | 1 |

Les résultats du test préliminaire montrent que le Tween 80 est non toxique sur les nauplius d'*A. franciscana*. La mortalité à 10 g/L de Tween 80 est 9%. Afin de confirmer ce résultat, un essai en triplicata a été procédé avec la concentration la plus élevée (10 g/L). Les résultats ont donné un taux de mortalité de 4,55%. Le caractère non toxique de Tween 80 est donc confirmé.

Du fait de son caractère non toxique, le Tween 80 est largement utilisé dans le domaine agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique comme agent émulsifiant et dispersant [234, 292, 293].

3.3.2.4. Toxicité du biosurfactant HF644

Les concentrations du biosurfactant sont choisies pour couvrir toute la plage de concentration au-dessous et au-dessus de la CMC. Comme il est indiqué dans le tableau 3.5, à des concentrations de biosurfactant inférieures à la CMC, la mortalité des individus de l'*Artemia* est insignifiante. À des concentrations égales

ou supérieures à la CMC, la toxicité du biosurfactant ne dépasse pas une létalité de 50% (entre 20 et 33%).

Selon MEYER ET AL. [294], les substances bioactives ayant une CL50 supérieure à 500 mg/L sont classées comme non toxique. Par conséquent, le biosurfactant produit par *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 est considéré comme non toxique. Pour le surfactant SDS (utilisé comme contrôle positif), la CL50 (24h) et son intervalle de confiance (IC à 95%) calculés par XLSTAT est de 17,43 mg/L (14,81–20,64 mg/L). Aucune mortalité naturelle n'est signalée, ce qui indique la validité du bioessai.

La faibles toxicité (ou non toxicité) des biosurfactants a été rapportée dans la littérature. LUNA ET AL. [278] montrent que le biosurfactant produit par *Candida sphaerica* n'a aucun effet létal sur *A. salina*, même à une concentration égale deux fois de sa CMC. En outre, cette étude a révélé l'absence de phytotoxicité du biosurfactant lorsque les légumes *Brassicaoleracea*, *Solanumgilo*, *Lactucasativa* L. et *Brassicaoleracea* L. ont été utilisés. SANTOS ET AL. [170] montrent que le biosurfactant produit par *Candida lipolytica* UCP0988 n'a pas causé la mortalité des larves d'*A. salina* à des concentrations inférieures à la CMC. Mais, au-dessus de la CMC, une mortalité de 100% a été constatée. Selon les travaux de SILVA ET AL. [169], le biosurfactant produit par *P. aeruginosa* UCP0992 (CMC = 700 mg/L) a causé 100% et 50% de létalité à des concentrations de 700 mg/L et 525 mg/L respectivement, mais aucune mortalité des larves d'*A. salina* n'est révélée pour des concentrations inférieures à 350 mg/L. SUN ET AL. [167] ont rapporté une CL50 de 600 mg/L vis-à-vis *A. salina* pour un sophorolipide produit par *Candida bombicola* ATCC22214. DE FRANÇA ET AL. [295] ont trouvé une CL50 de 500 mg/L pour un biosurfactant dont la CMC est 25 mg/L produit par *Bacillus subtilis* ICA56.

Toutefois, EDWARDS ET AL. [296] ont signalé que la toxicité des biosurfactants vis-à-vis les larves de poisson *Menidia beryllina* et de crustacé *Mysidopsis bahia* est positionnée en intermédiaire des surfactants synthétiques. En effet, les auteurs ont testé la toxicité de six (06) biosurfactants et surfactants synthétiques utilisés comme dispersants du pétrole sur ces deux organismes modèles des milieux estuariennes. L'ordre de la toxicité (basée sur la valeur de la CL50 calculée) par rapport aux deux organismes est : Triton X-100 (surfactant

synthétique) > BioEM (Biosurfactant) > PES-51 (Biosurfactant) > Corexit 9500 (surfactant synthétique) > Emulsan (Biosurfactant) > PES-61 (surfactant synthétique).

Table 3.5 : Effet de la concentration du biosurfactant HF64 et du surfactant SDS sur la mortalité d'*A. franciscana*.

| Concentration de HF644 (mg/L) | Mortalité (%) ^a | Concentration du SDS (mg/l) ^b | Mortalité (%) ^a |
|-------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| 0 | 0,00 ± 0,00 | 0 | 0,00 ± 0,00 |
| 150 | 6,67 ± 3,33 | 10 | 10,00 ± 3,33 |
| 350 | 10,00 ± 5,77 | 13,5 | 23,33 ± 3,33 |
| 780 | 33,33 ± 3,33 | 18 | 36,37 ± 3,33 |
| 1000 | 20,00 ± 0,00 | 24 | 86,67 ± 3,33 |
| 1500 | 26,67 ± 3,33 | 32 | 100,00 ± 0,00 |
| 2000 | 26,67 ± 3,33 | | |

- ^aLes résultats sont exprimés en tant que la moyenne ± déviation standard de triplicatas indépendants.
- ^bLe surfactant SDS est utilisé comme control positif.

3.3.2.5. Toxicité du pétrole brut et sa fraction aliphatique

Le pétrole est constitué d'un mélange très complexe de composés organiques, principalement des hydrocarbures, et peut être caractérisé par le contenu relatif des fractions d'hydrocarbures **Saturés**, **Aromatiques**, **Résines** et **Asphaltènes** (analyse **SARA**). Les propriétés physico-chimiques d'un pétrole sont déterminées par les proportions de ces composants majeurs. Les hydrocarbures saturés (paraffines, iso-paraffines et naphènes) ont de faibles solubilité aqueuse et toxicité. La fraction aromatique est responsable de la toxicité aiguë du pétrole [297, 298]. Il arrive fréquemment, en environnements marins, le recours aux dispersants chimiques comme agents facilitant la bioremédiation des marées noires [296, 298, 299]. Par conséquent, les organismes marins pélagiques qui vivent dans la colonne d'eau sont potentiellement menacés sous l'effet des hydrocarbures dissouts ou solubilisés par ces agents dispersants [300, 301]. Dans ce contexte, la toxicité du

pétrole brut et sa fraction aliphatique obtenue après fractionnement du pétrole, a été évaluée vis-à-vis l'*Artemia*.

Les résultats de la toxicité du pétrole brut sur l'*Artemia* sont présentés sur la figure 3.35.

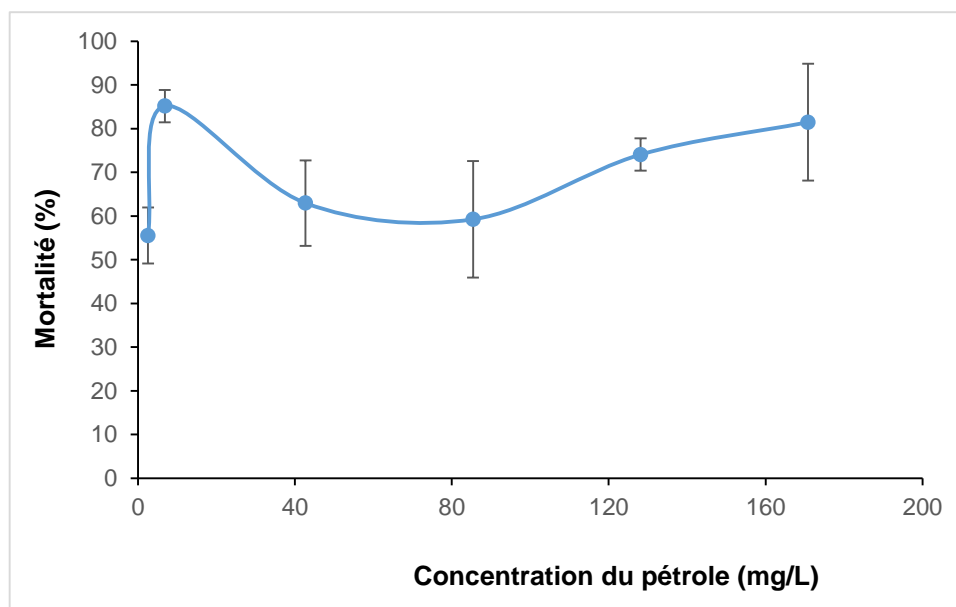


Figure 3.35 : Evolution de la mortalité des nauplius d'*A. franciscana* en fonction de la concentration du pétrole brut.

Les résultats expérimentaux montrent que le pétrole brut est très toxique sur les nauplius d'*A. franciscana*. Une concentration de 7 mg/L a provoqué une mortalité maximale de 85%. En outre, nous remarquons que la mortalité en fonction de la concentration montre un profil en pallier qui ne permet pas la détermination de la CL50 par XSTAT. Ce problème est probablement dû au seuil de solubilité du pétrole atteinte à cette concentration (7 mg/L).

Le témoin à 10% de DMSO a causé 10% de mortalité, ce qui assure la validité du bioessai. Par ailleurs, la CL50 du SDS est située dans l'intervalle de validation (15,87 mg/L, 15,98–22,66 mg/L).

Les résultats de toxicité de la fraction aliphatique sur l'*Artemia* sont présentés sur la figure 3.36.

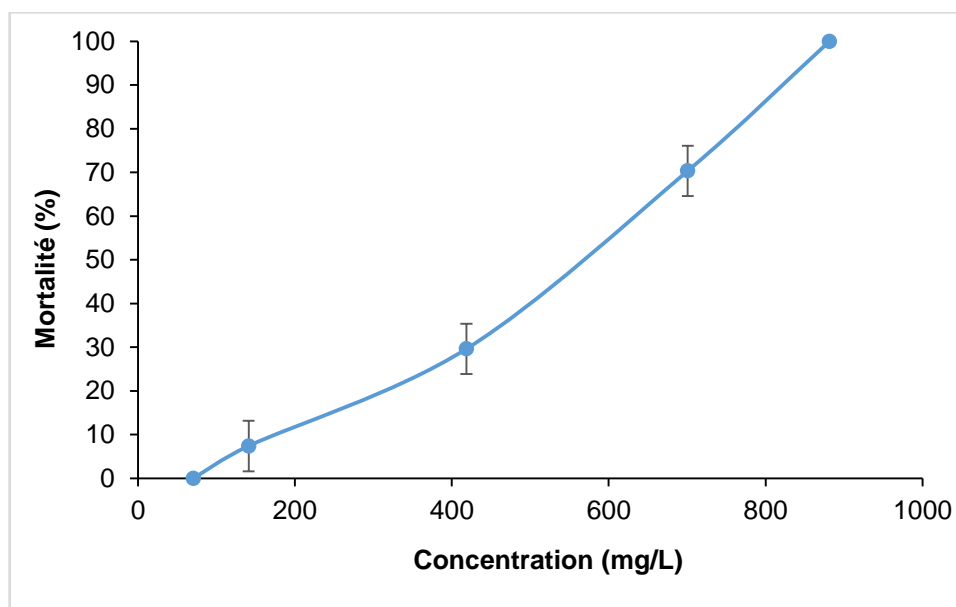


Figure 3.36 : Evolution de la mortalité des nauplius d'*A. franciscana* en fonction de la concentration de la fraction aliphatique.

Les résultats présentés sur cette figure montrent un profil croissant de la mortalité en fonction de la concentration de la fraction aliphatique. La CL50 de cette fraction est de 497,19 mg/L avec une limite de confiance de 382,29–572,23 mg/L.

Ainsi, nous remarquons que cette fraction est moins toxique par rapport au pétrole. À titre d'exemple, une concentration de 141 mg/L de la fraction aliphatique résulte d'une mortalité de 7% d'*A. franciscana*. Tandis que la plus faible concentration du pétrole (3 mg/L) a causé la mortalité de 56% d'individus d'*Artemia*. D'après les données du fractionnement du pétrole, la fraction aliphatique constitue 75,64% (m/m) de sa composition globale. La toxicité du pétrole est donc due aux autres fractions de ce brut.

RIAL ET AL. [291] ont trouvé que l'extrait DMSO de la fraction aliphatique du pétrole est moins toxique par rapport à celui de la fraction polaire et aromatique dans un test sur l'embryon d'oursin.

SAEKI ET AL. [77] ont trouvé une CL50 très faible d'un pétrole lourd (fraction WAF) contre les larves de *Menidia beryllina* et *Mysidopsis bahia*. Elle est égale à 5,56 mg/L (4,17–7,42) et 2,19 mg/L (2,03–2,36) respectivement pour les deux organismes. De même, MITCHELL ET HOLDWAY [300] ont rapporté la forte toxicité de la WAF du pétrole. La CL50 de cette fraction est de 0,9 mg/L contre un organisme

marin de la famille de Cnidaires (*Hydra viridissima*), considéré moins sensible par rapport à la *Daphnia magna*.

3.4. Bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole

3.4.1. Pouvoir solubilisant du biosurfactant HF644

La faible solubilité des hydrocarbures pétroliers limite leur biodisponibilité aux microorganismes et en conséquence, entrave leur absorption et leur métabolisme. L'utilisation des surfactants peut favoriser cette biodisponibilité en permettant l'accès des hydrocarbures aux microorganismes [302]. Dans ce contexte, le biosurfactant HF644 a été utilisé pour la solubilisation du pétrole brut dans l'eau de mer, en comparaison avec le surfactant synthétique Tween 80. L'eau de mer seule a été prise comme témoin.

Afin d'identifier les différents composés aliphatiques subissent à la solubilisation aux différents traitements, un échantillon du pétrole brut (directement dilués dans du dichlorométhane) a également été analysé par CG-SM (figure 3.37).

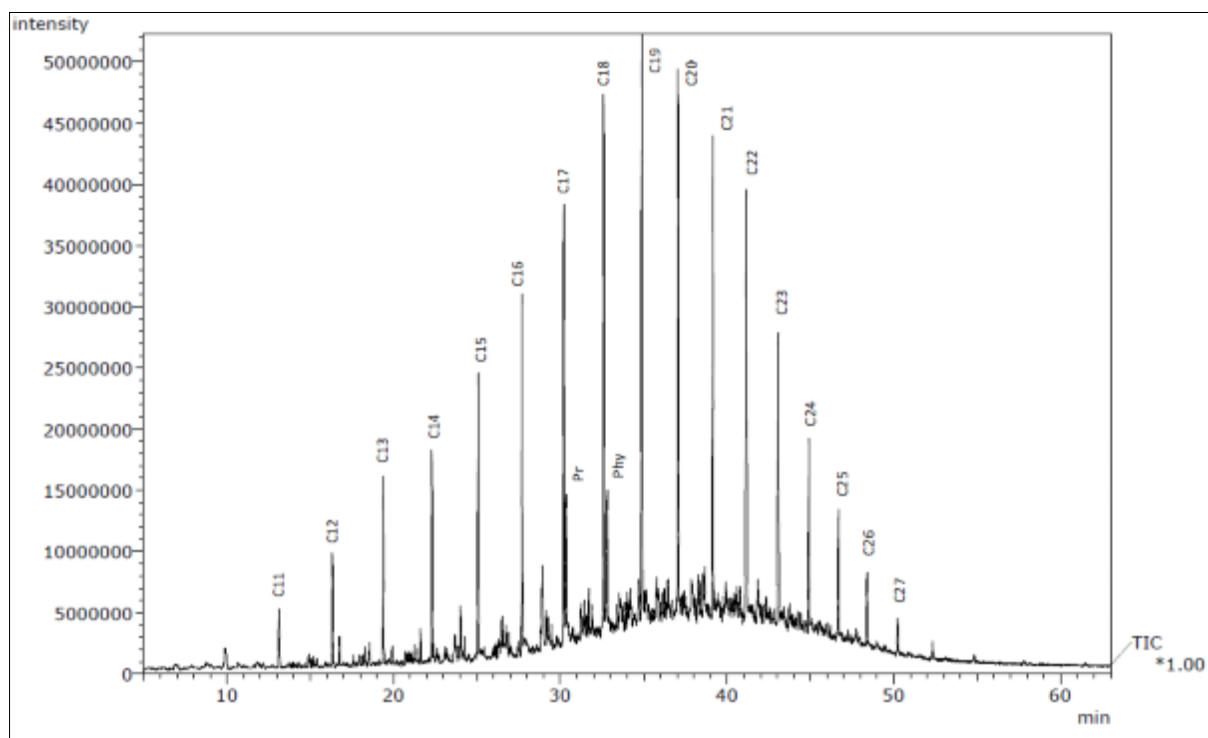


Figure 3.37 : Chromatogramme du pétrole brut avec identification des composés aliphatiques.

Le chromatogramme de l'échantillon du pétrole brut a montré l'abondance des n-alcanes à chaîne moyenne (de C11 à C27) et les deux biomarqueurs :

pristane (pentadécane, 2, 6, 10, 14-tétraméthyl) et phytane (hexadécane, 2, 6, 10, 14-tétraméthyle). La figure 3.38 montre l'aspect visuel du pétrole brut avant et après traitement avec les surfactants.

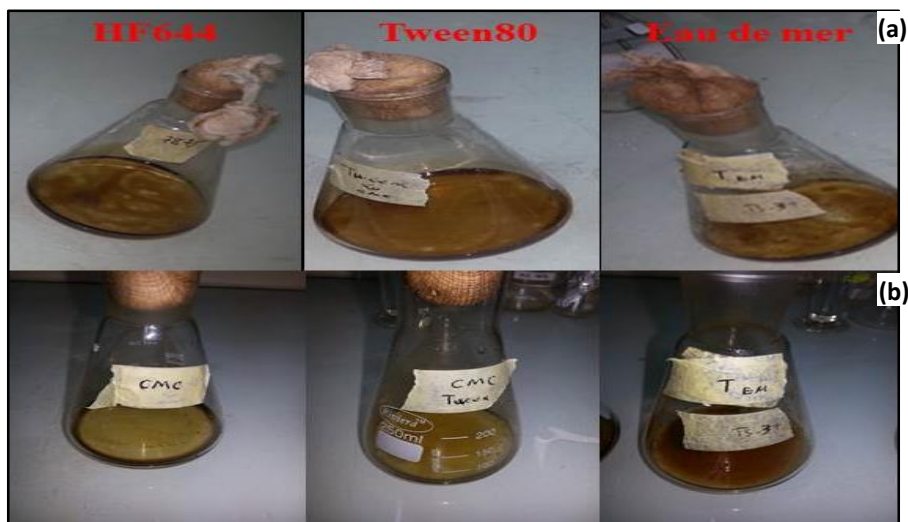


Figure 3.38 : Effet des surfactants sur la dispersion du pétrole brut dans l'eau de mer (a) Avant traitement, (b) Après traitement.

L'effet de chaque traitement (traitement par HF644 et par Tween 80), en comparaison avec le témoin de l'eau de mer sur la solubilisation des composés individuels saturés du pétrole, est présenté sur la figure 3.39.

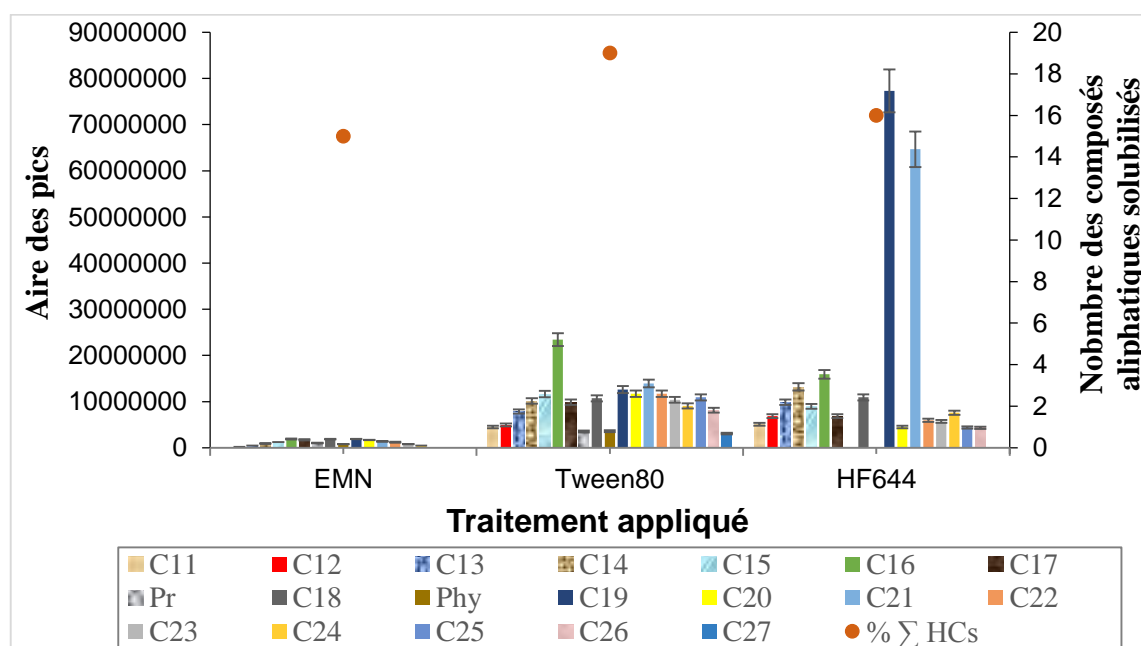


Figure 3.39 : Effet des surfactants sur la solubilisation des hydrocarbures individuels saturés du pétrole.

Le surfactant Tween 80 a permis de solubiliser la totalité des composés aliphatiques présents dans l'échantillon du pétrole brut (19 composés). Cependant, le biosurfactant HF644 est incapable de solubiliser le pristane, le phytane et le C27. Il est important de noter que l'eau de mer seule a permis la solubilisation de 15 composés saturés présents dans le pétrole brut, mais à des proportions très faible par rapport aux surfactants. De plus, le degré de la solubilisation de chaque composé varie d'un surfactant à l'autre. En effet, le biosurfactant HF644 a montré une solubilisation très intéressante contre les composés C19 et C21 ; Le Tween 80 est, toutefois, plus efficace dans la solubilisation du C16. Cette observation pourrait s'expliquer par un comportement sélectif des surfactants vis-à-vis des composés du pétrole brut. URUM ET AL. [303] ont étudié l'effet des surfactants sur l'élimination du pétrole brut d'un sol contaminé. Les auteurs révèlent que la saponine (un surfactant naturel) a éliminé des quantités considérables des n-alcanes C10–C15 par rapport aux SDS et rhamnolipide. Concernant les composés C16–C21, le rhamnolipide présentait la meilleure solubilisation par rapport au SDS. De plus, l'étude a examiné cette sélectivité vis-à-vis des hydrocarbures aromatiques et a montré que le rhamnolipide et la saponine sont plus efficaces pour éliminer les naphthalènes que le SDS. La saponine s'est révélée la meilleure pour l'élimination des phénanthrènes.

En outre, pour visualiser l'effet global de chaque traitement, nous avons calculé les surfaces moyennes des composés saturés, solubilisés suite à l'application de chaque dispersant (figure 3.40).

Les résultats montrent que le biosurfactant HF644 est le plus efficace dans la solubilisation du pétrole brut. Il est presque deux fois plus meilleur que le Tween 80 et 13 fois que l'eau de mer seule.

La solubilisation du pétrole brut est supposée se produire à des concentrations de surfactants supérieures à la CMC [304]. Cependant, ce fait n'est pas toujours le cas [189]. Dans un contexte similaire de la nôtre, URUM ET PEKDEMIR [189] ont étudié la solubilisation du pétrole brut par six (06) surfactants différents, ils ont trouvé que la plupart des surfactants ne pouvaient pas présenter de solubilisation micellaire car la solubilisation du pétrole brut diminue ou reste constante à des concentrations supérieures à leur CMC. SANTOS ET AL. [170] ont

rapporté de la littérature que des concentrations de biosurfactants légèrement au-dessus de la CMC donnaient de meilleurs résultats par rapport à celles dépassant largement la CMC. Ainsi, nous avons arrivé au même constat quant à l'utilisation du HF644 à une concentration de 1000 mg/L (supérieure à la CMC), où nous avons remarqué que le pouvoir solubilisant de notre biosurfactant diminue un peu (mais reste toujours supérieur à celui du Tween 80).

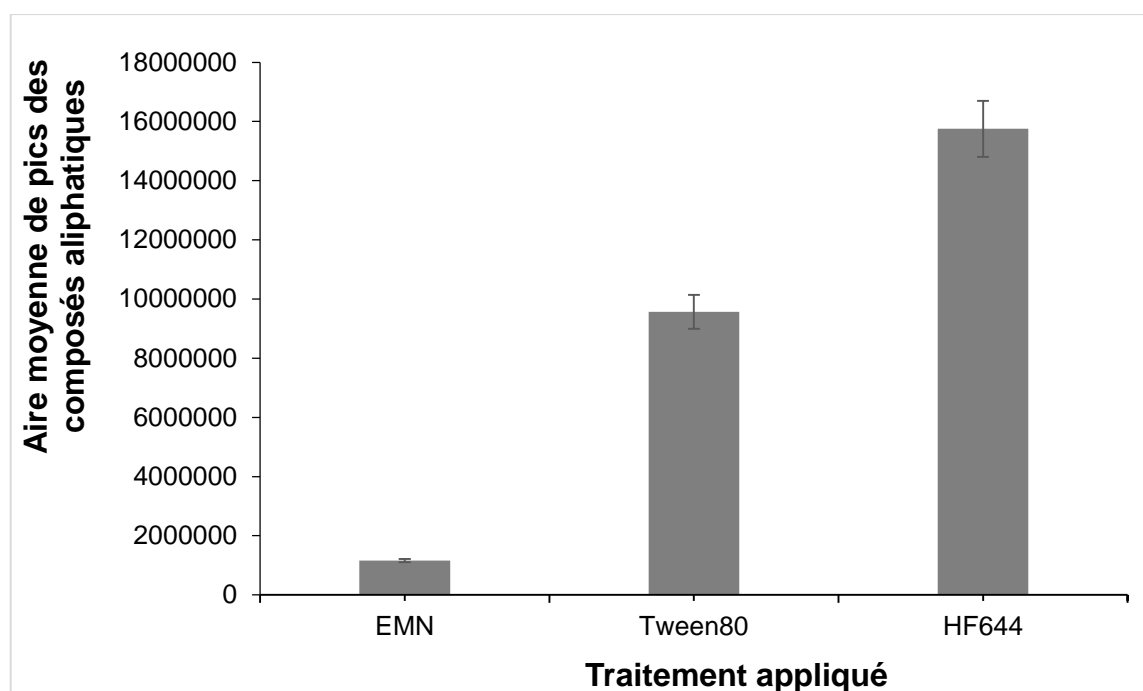


Figure 3.40 : Effet global des surfactants sur la solubilisation des composés aliphatiques du pétrole.

L'action positive des biosurfactants sur la solubilisation des hydrocarbures a été rapportée dans la littérature. BORDOLOI ET KONWAR [305] ont montré que l'addition de surfactant provenant de nombreuses souches de *Pseudomonas aeruginosa* améliore considérablement la solubilisation du pyrène, du fluorène, du phénanthrène et du pétrole brut. ZHONG ET AL. [306] ont constaté que la solubilisation de n-alcanes C10, C12, C14 et C16 est améliorée en présence d'un monorhamnolipide à des concentrations proche de sa CMC.

3.4.2. Essai de bioremédiation

L'effet du biosurfactant HF644 pour améliorer la biodégradation du pétrole contre un amendement avec des nutriments (sources d'azote et de phosphore) est

étudié par des expériences menées en laboratoire, avec une eau de mer contaminée par le pétrole brut. Le test examine également la potentialité de dégradation de la microflore indigène de l'eau de mer (atténuation naturelle) par rapport à l'inoculum bactérien de la souche SdK644 (bioaugmentation). Comme les montrent le tableau 3.6 et la figure 3.41, l'utilisation du biosurfactant et des nutriments conduisent à une très bonne croissance microbienne. L'apport du biosurfactant augmente rapidement la densité cellulaire par rapport aux stimulants nutritifs (μ_{\max} et DO_{\max} les plus élevés), probablement en raison de l'amélioration la disponibilité du pétrole et de l'utilisation de cette substance bioactive comme source secondaire de nutriments [170]. D'autre part, les résultats expérimentaux indiquent la faible croissance microbienne de la microflore indigène de l'eau de mer par rapport à l'inoculum bactérien de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644. A la fin des expériences, la concentration en cellules bactériennes exprimée en UFC/mL confirme les résultats de la croissance obtenus par des mesures de la DO.

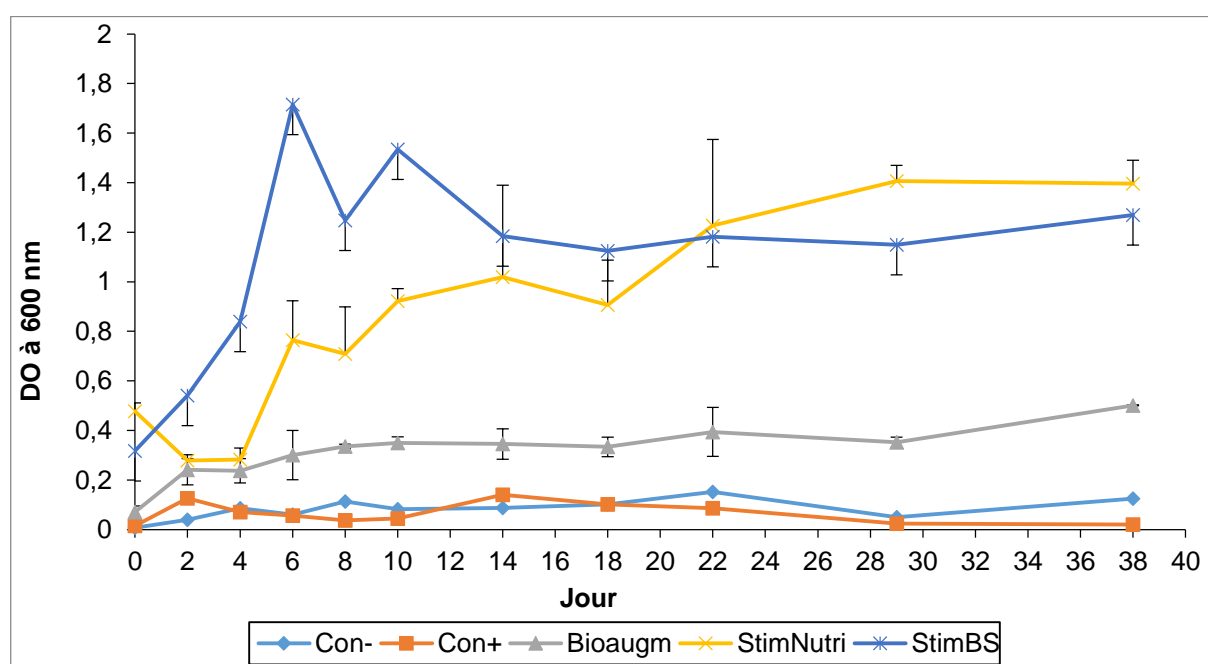


Figure 3.41 : Cinétiques de croissance microbienne dans les différentes expériences de bioremédiation.

Tableau 3.6 : Croissance maximale, taux de croissance spécifique et dénombrement de la flore bactérienne dans chaque expérience de bioremédiation.

| Expérience | Con- | Con+ | Bioaugm | StimNutri | StimBS |
|--|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| DO _{max} à 600 nm | 0,152 | 0,141 | 0,502 | 1,407 | 1,715 |
| μ _{max} (jour ⁻¹) | 0,023 | 0,056 | 0,085 | 0,241 | 0,438 |
| UFC/mL | 22×10 ³ | 7,6×10 ⁴ | 9,6×10 ⁷ | 4,4×10 ⁹ | 3,7×10 ⁸ |

Le taux de dégradation du pétrole brut par les différentes méthodes de traitement (figure 3.42) montre une élimination maximale du pétrole brut lorsque le biosurfactant est ajouté en tant que dispersant et agent stimulant. De façon surprenante, l'amendement des nutriments n'affecte pas positivement la dégradation en comparaison avec le traitement par inoculum de la souche SdK644. Alors que le contrôle positif (atténuation naturelle) a donné la plus faible consommation du pétrole brut des traitements biotiques. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par THAVASI ET AL. [307, 308] et SAEKI ET AL. [77] sur le rôle des biosurfactants dans la biodégradation assistée du pétrole brut vis-à-vis des fertilisants nutritifs. LAORRATTANASAK ET AL. [309] ont constaté que l'addition simultanée du biosurfactant de la souche *Gordonia westfalica* GY40, avec des cellules immobilisées de cette souche, a conduit aux meilleurs résultats par rapport au processus d'atténuation naturelle de l'eau de mer contaminée par le pétrole brut. GENTILI ET AL. [310] ont montré que l'atténuation naturelle n'a eu qu'une influence mineure sur la dégradation du pétrole dans l'eau de mer (essai en laboratoire). KUMARI ET AL. [238] ont constaté que l'ajout d'un rhamnolipide JBR-425 à un consortium bactérien améliore la biodégradation des HAP du pétrole brut jusqu'à 10%. SAJNA ET AL. [311] ont révélé que le biosurfactant de la levure *Pseudozyma* sp. NII 08165 a entraîné une amélioration d'environ 46% dans la dégradation des n-alcanes C10–C24 par *Pseudomonas putida*. SAEKI ET AL. [77] ont utilisé un biosurfactant (nommé JE1058BS) issu de la souche *Gordonia* sp. JE-1058 en tant qu'agent de bioremédiation contre un traitement avec des nutriments pour évaluer la biodégradabilité du pétrole brut par les bactéries marines indigènes de l'eau de mer. Au bout d'une période de 28 jours, la fraction aliphatique (n-C12 à n-C35, pristane et phytane) et aromatique traitées par JE1058BS ont été réduites respectivement de 93% et de 39%. Tandis que celles traitées par les nutriments ont

été réduites respectivement de 67% et 9%. PI ET AL. [211] ont trouvé que l'ajout d'un rhamnolipide, à un milieu minéral amendé du pétrole (0,2%, m/v) et inoculé par une culture de la souche *Pseudomonas* sp. LSH-7', améliorait la dégradation beaucoup mieux par rapport aux dispersants chimiques DOSS et GM-2. CHEN ET AL. [11] ont évalué l'effet de biosurfactant (Rhamnolipide) dans la bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole, en utilisant un consortium bactérien marin de quatre souches affiliées à *Ochrobactrum* sp. et *Brevibacillus* sp. Après 30 jours d'incubation à température ambiante (16–27 °C) en conditions statiques, les auteurs ont abouti à une dégradation du pétrole (hydrocarbures totaux) respectivement de 26,72% et 32,3% pour le traitement avec le consortium seul et amendé avec le biosurfactant.

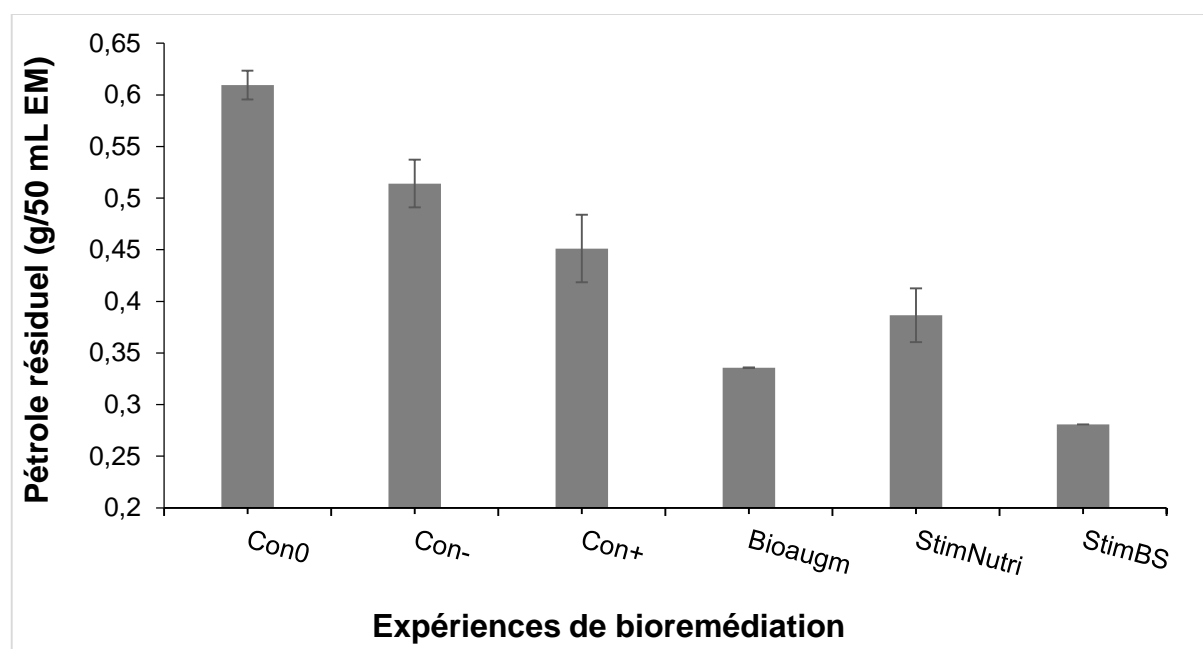


Figure 3.42 : Résultats gravimétriques de la biodégradation du pétrole brut suite aux différentes stratégies de bioremédiation. *Con0* représente la quantité du pétrole extrait initialement.

3.4.3. Conclusion

La bioremédiation du milieu marin contaminé par les hydrocarbures pétroliers repose sur la capacité biodégradative des microorganismes à décomposer ce type de polluants. Celle-ci est souvent limitée du fait d'un manque de nutriments essentiels (azote et phosphore), d'une faible disponibilité de ces composés hydrophobes et d'un problème d'adaptation microbien. Le recours aux dispersants

chimiques peut contribuer à accélérer le processus naturel de biodégradation, mais cela n'est pas toujours sans conséquence. La fraction dispersée du pétrole pourrait être plus toxique aux organismes marins que l'origine (pétrole seul). Dans ce contexte, elle vient cette partie du travail afin de tester le pouvoir dispersant du biosurfactant HF644 d'une part, et, à examiner la capacité biodégradative de la souche bactérienne marine hydrocarbonoclaste SdK644 et de son biosurfactant dans la bioremédiation de l'eau de mer contaminé par le pétrole, d'autre part.

Le pouvoir dispersant et solubilisant du HF644 est bien montré sur le pétrole. L'analyse CG-SM des hydrocarbures saturés, quantifiés à partir du pétrole solubilisé dans la phase aqueuse indique que le HF644 est 2 fois plus supérieur par rapport au surfactant non ionique Tween 80. Par la suite, un traitement d'une forte contamination de l'eau de mer par le pétrole (1% v/v = 8000 mg/L) selon différentes stratégies de bioremédiation a montré que :

- L'utilisation du biosurfactant HF644 comme biostimulant et biodispersant favorise la dégradation du pétrole par la souche SdK644 par rapport au stimulant nutritif (PB résiduel de 0,28 et 0,38 g/50 mL, respectivement).
- L'activité métabolique de la microflore indigène de l'eau de mer est faible comparativement à celle de la souche SdK644, ce qui encourage le maintien et la conservation d'un inoculum adapté de *M. hydrocarbonoclasticus* SdK644 prêt à employer, qui pourrait être utilisé en cas d'une pollution marine engendrée par le pétrole.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un premier lieu, nous avons isolé quinze souches bactériennes hydrocarbonoclastes marines à partir d'un sédiment prélevé d'un port de pêche contaminé par les hydrocarbures (port de Khemisti, W. de Tipaza). Ces souches s'ajoutent à la collection des bactéries hydrocarbonoclastes terrestres isolées par notre équipe de recherche qui travaille sur la biodégradation des hydrocarbures et la production de biosurfactants ainsi que l'étude des capacités métaboliques de ce type de microorganismes. Les activités de recherche dans notre laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioMol, Université de Blida 1), s'intéressent à l'exploration de la diversité microbienne dans d'autres matrices marines (éponges de mer, algues). Cette première partie relative au criblage des souches hydrocarbonoclastes nous a permis de se renseigner sur les capacités des souches isolées à utiliser le pétrole comme source unique de carbone et d'énergie. Une bonne croissance microbienne a été constatée pour la plupart des souches. Nous avons noté également une activité remarquable, particulièrement, pour la souche SdK644, bien développée sur le pétrole ($DO_{600} \text{ max} = 0,867$, $TS = 38 \text{ mN/m}$). Cette souche est sélectionnée et testée par la suite du travail sur l'étude de la biodégradation des hydrocarbures, la production de biosurfactant et la bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole.

La souche SdK644 a été identifiée par analyse phylogénétique et affiliée au genre *Marinobacter* avec une similarité de 97,5% de la souche type *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840T, en utilisant un seuil d'acceptabilité de 97%. Elle pourrait se classer comme nouvelle espèce en adoptant un seuil de 98,65%, récemment proposé. Dans ce cas, une hybridation ADN-ADN est nécessaire. Sachant que cette nouvelle souche tolère une forte variation de la salinité (0–150 g/L NaCl) et son optimum de sel est de 10–30 g/L.

Par la suite, une étude détaillée sur la biodégradation des hydrocarbures par cette souche bactérienne a été enchaînée. Le taux de biodégradation du pétrole diminue en fonction de sa concentration et de la longueur de la chaîne aliphatique. En effet, les alcanes normaux C12–C17 sont mieux dégradés par rapport à ceux de C18–C26. Un taux d'élimination de 83,68% de la fraction aliphatique est obtenu au

bout de 21 jours, dans un pH neutre, une salinité de 23 g/L NaCl et une concentration du substrat de 1% (v/v). Des concentrations élevées du pétrole (2 et 5%) ralentissent la biodégradation. *Marinobacter sp.* SdK644 est ainsi capable de métaboliser des composés hydrocarbonés modèles (n-alcanes et HAP) à des concentrations relativement élevées. L'hexadécane (C16) et le tétracosane (C24) à 1000 mg/L sont consommés respectivement à 41 et 11% après 20 jours d'incubation. Des taux de dégradation de 38 et 31% respectivement pour le pyrène (HAP lourd) et l'anthracène (3 noyaux benzéniques) à 100 mg/L ont été notés en parallèle. Cependant, la souche SdK644 métabolise de faibles concentrations du naphthalène et incapable d'utiliser le phénanthrène. Une proportionnalité entre la dégradation des hydrocarbures individuels et la production de biosurfactants par la souche SdK644 est ainsi mise en évidence. L'absorption de ces composés est due à la diminution des tensions interfaciales ce qui augmente leur solubilité apparente. Le pyrène et l'hexadécane induisent une diminution importante de la TS (39,5 et 42,3 mN/m, respectivement), par rapport aux autres hydrocarbures étudiés.

La deuxième partie de cette étude consiste en la production, la récupération et l'étude des propriétés de biosurfactants des souches hyperproductrices. En utilisant l'huile d'olive comme source inductrice, quatre souches de la collection des hydrocarbonoclastes marines ont réduit la TS au-dessous de 35 mN/m. La souche SdK644 est retenue la meilleure (TS = 29,2 mN/m). La production de biosurfactant par la souche bactérienne SdK644 est encourageante en utilisant des substrats déchets (huile de friture "HF" et huile de moteur usagée "HMU"). Une activité de surface maximale du biosurfactant produit est obtenue en utilisant l'HF comme source de carbone, le NH₄Cl comme source d'azote, un rapport C/N de 50, un pH de 5 et une salinité de 23 g/L NaCl. Une diminution remarquable du pH (4–5) est notée dans ces conditions. Cette baisse du pH est due à la formation d'acides gras à partir des triglycérides de l'HF et de la libération de chlore à partir du NH₄Cl du milieu de culture. Le suivi de la cinétique de croissance et de production du biosurfactant de la souche SdK644 montre que cet agent extracellulaire est synthétisé en tant que métabolite primaire. Après trois (03) jours de culture, une concentration en biosurfactant "HF644" de 4,93 g/L est récupérée. Le "HF644" a une CMC de 887 mg/L, il émulsionne l'huile d'olive (E24=73%), l'essence (E24=43%) et le pétrole (E24=40%). De plus, le "HF644" est détenu d'une bonne

stabilité dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité. Il est insensible à la réfrigération (+4 °C) et la congélation (-18 °C) pendant 24 h, au chauffage à une température de 30, 50, 70 et 100 °C pendant 1 h et à l'autoclavage à 121 °C pendant 20 min. Egalement, le "HF644" garde son activité de surface dans une large gamme de pH (2–10) et des salinités de 0 à 200 g/L NaCl avec un optimum de 0–40 g/L. Cette propriété rend le biosurfactant "HF644" adéquat pour des applications en industries agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et pétrolières.

En troisième lieu, l'étude écotoxicologique vis-à-vis l'espèce aquatique modèle *Artemia franciscana* a révélé que le biosurfactant "HF644" est pratiquement non toxique. Une mortalité ne dépassant pas 30% a été notée à des concentrations au-dessus de sa CMC. De même, le Tween 80, un surfactant synthétique ne provoque pas une létalité significative (moins de 10%) à une concentration allant jusqu'à 10 g/L. De l'autre côté, une forte toxicité du pétrole (une mortalité de 56% pour une concentration de pétrole de 3 mg/L) a été enregistrée. Elle résulte de la toxicité des fractions autre que la fraction aliphatique, dont la CL50 est de 497,19 mg/L (382,29–572,23 mg/L).

Pour finir, deux essais de bioremédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole ont été effectués. L'essai de solubilisation du pétrole par le biosurfactant "HF644" montre que celui-ci est deux fois plus efficace par rapport au surfactant Tween 80, tel qu'il est dévoilé par analyse CG-SM de la fraction aliphatique. Dans les expériences de bioremédiation, la biostimulation de la souche SdK644 par le biosurfactant "HF644" a donné une élimination maximale du pétrole par rapport aux stimulants nutritifs (source de N et P). En outre, il semblerait que le traitement par bioaugmentation (inoculum de la souche SdK644) favorise la dégradation du pétrole par rapport à la microflore indigène de l'eau de mer (atténuation naturelle).

En guise de perspectives, nous recommandons de développer les points suivants :

- Compléter la caractérisation génotypique et aller loin dans l'identification phylogénétique de la souche SdK644 (hybridation ADN-ADN).
- Etudier les mécanismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures par la souche SdK644 (enzymes clés, hydrophobicité de la surface cellulaire,

solubilisation, émulsification) et les facteurs améliorant leur biodégradation (co-substrats, concentration de l'hydrocarbure, co-métabolisme, ...).

- Améliorer la production du biosurfactant "HF644" en utilisant des cellules immobilisées de la souche SdK644 dans différents supports matériels (alginates, agar, chitosane,...) et de bioréacteur de grande capacité.
- Purification et caractérisation structurelle du "HF644" (chromatographie par élution et sur couche mince, HPLC préparative, SM, CL-SM, CG-SM des acides gras, RMN).
- Etudier la toxicité du "HF644" vis-à-vis d'autres organismes comme les rotifères, les daphnies, ...et essayer d'obtenir et d'étudier la toxicité de la fraction *WAF* du pétrole et de la *WAF* dispersée par "HF644".
- Envisager d'autres applications du "HF644" comme dispersant et émulsifiant en industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et pétrolière.

APPENDICE

A liste des symboles et abréviations

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

ARN : Acide ribonucléique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

NPK : Azote, Phosphore, Potassium.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

MEL : Mannosylerythritol-lipides.

HLB : Balance hydrophile-lipophile.

CL50 : Concentration létale médiane.

IC : Intervalle de confiance.

EMN : Eau de mer naturelle.

PB : Pétrole brut.

LB : Luria Bertani (milieu).

MM : Milieu minimum.

m/m : Rapport masse/masse

v/v : Rapport volume/volume

TS : Tension de surface.

E24 : Indice d'émulsification.

DDP : Diamètre de déplacement du pétrole.

DO : Densité optique.

Mé : Mélasse.

HF : Huile de friture.

HMU : Huile de moteur usagée.

Ma : Margine.

IRTF : Infra-Rouge à Transformée de Fourier.

CG-SM : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de la Masse.

SDS : Dodécylsulfate de sodium.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

WAF : Fraction (du pétrole) adaptée à l'eau.

B Etapes d'éclosion des cystes d'*Artemia*

- Élevage de l'*Artemia*
 - Origine de l'*Artemia*

L'*Artemia* utilisée dans notre étude est disponibles au niveau de la division de recherche Aquaculture du CNRDPA. Il s'agit de cystes déshydratés (lyophilisés) conditionnés en boite par « INVE Aquaculture Nutrition, USA » (figure 1).



Figure 1 : Cystes de l'artémia près à utiliser.

- Préparation de l'eau de dilution

L'*Artémia* est un crustacé marin vit dans des conditions de salinités, oxygène, températures et pH bien contrôlées afin de réussir son maintien.

L'eau de dilution utilisée est soit une eau de mer artificielle dont la composition est (g/l d'eau distillée) : 32 NaCl ; 14 MgSO₄ et 0,2 NaHCO₃. Cette eau a été remplacée (pour son déficit en oligo-éléments indispensables à la croissance de l'artémia) par une eau de mer naturelle d'un endroit non pollué. Cette eau est aérée pendant 24 h afin de remonter le taux d'oxygène jusqu'à une valeur minimale de 90 % de saturation selon VANHAECKE ET AL. [162]. Ainsi, le pH de l'eau doit ajuster – si nécessaire – à $8 \pm 0,5$ selon les mêmes auteurs.

Les caractéristiques de notre eau de mer est la suivante :

- ✓ Salinité : 37 ‰ (ou g/Kg) ;
- ✓ O₂ : 101,2% de saturation ;
- ✓ pH : 7,8.

Avant que l'eau soit employée elle devrait de préférence être pré filtrée sur un filtre de 0,45 μm de porosité pour éliminer les déchets, les bactéries et les microalgues.

○ Éclosion et préparation des nauplius

Une quantité de 100 mg de cystes d'*Artemia* a été introduire dans une ampoule à décanté contenant 100 ml de l'eau de mer (l'eau de dilution). Les cystes d'*Artemia* sont maintenus en suspension et oxygénation à l'aide d'une aération douce fournie par un moteur d'air. De même, le montage est illuminé par des lampes latérales (Figure 2).



Figure 2 : Montage d'éclosion et préparation des nauplius d'*Artemia*.

Selon VANHAECKE ET AL. [162], les conditions optimales d'incubation des cystes sont les suivantes :

- ✓ Température : 25°C ;
- ✓ Intensité lumineuse minimale : 500 Lux ;
- ✓ Durée d'incubation : 18h jusqu'à 24h.

Après ce temps d'incubation, l'aération est arrêtée et les cystes sont laissés décantés pendant pas plus de 15min, ce qui pour but de faire séparer les œufs non éclos des nauplius du premier stade et des cystes vides (flottés à la surface de l'eau). Cette séparation est d'autant améliorée en exposant les nauplius à la lumière (à l'aide d'une torche) dans la zone intermédiaire de l'ampoule. Les cystes non éclos sont alors siphonnés par le robinet du bas et les nauplius sont récupérés dans un

tamis de moins de 150 μm de maille où ils subissent un rinçage avec de l'eau de mer fraîche. Cette opération a pour but d'éliminer les métabolites d'éclosion et le glycérol produit. Les nauplius sont récupérés dans un bac contenant une eau de mer fraîche. Après un court temps (environ 2 à 5 min) nous observons que les nauplius se concentrent aux coins du bac. Un nombre suffisant est alors transféré dans une autre ampoule contenant 200 ml d'eau de mer fraîche et incubés pendant exactement 24 h dans les mêmes conditions cités en haut. Durant ce temps, les nauplius du stade I sont transférés en stade II et certains en stade III.

C Fractionnement du pétrole brut

Afin de déterminer la composition de pétrole brut utilisé dans les expériences de bioremédiation et de tester la toxicité des fractions majoritaires, nous avons procédé à son fractionnement selon le protocole décrit par RIAL ET AL. [297] et SHI ET AL. [312]. Les différentes étapes sont résumées comme suit :

➤ Les asphaltènes (F1)

La fraction des asphaltènes a été obtenue après centrifugation d'un mélange pétrole/pentane de 1:100 (m/v). Les asphaltènes (précipités au fond) ont été filtrés sur coton placé au fond d'une ampoule à décanter. Le retenu est rincé par l'hexane jusqu'à ce que l'hexane devient incolore. L'hexane contenant les asphaltènes est évaporé dans un Rotavap et les asphaltènes sont pesés par la suite.

➤ Les fractions aliphatique, aromatique et polaire (maltènes)

La séparation des hydrocarbures aliphatique (F2), hydrocarbures aromatiques (F3) et des composés polaires (F4), a été réalisé selon les recommandations de RIAL ET AL. , Avec petites changements. Le fractionnement est basé sur la préparation d'une colonne chargée en gel de silice (0,063 – 0,2 mm) de 10 mm de diamètre, bouchée de son extrémité basse par un tampon de coton (figure 3). Le gel de silice est partialement activé au four à moufle à une T° 200 °C pendant 16 h puis par ajout de l'eau distillée à raison de 5 % (m/m). Ensuite la colonne est chargée par le filtrat du mélange précédent (maltènes). L'élution des composés (aliphatique, aromatique et polaire) est réalisée successivement par les volumes de solvants suivants : la fraction aliphatique (F2) est extraite avec un volume de 50 ml de pentane. La fraction aromatique (F3) est éluée avec un mélange de 100 ml de pentane/dichlorométhane (15:85, v/v) et enfin par 100 ml de dichlorométhane/méthanol (50:50, v/v) pour l'élution de la fraction polaire (F4). Les fractions sont ensuite évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif et récupérées dans des bécher pré-pesés.



Figure 3 : Prise photo du dispositif de fractionnement du pétrole brut.

D Propriétés physico-chimiques des quatre HAP étudiées

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des quatre HAP étudiées [313].

| HAP | Formule chimique | Masse molaire (g/mol) | Point de fusion (°C) | Pression de vapeur (P^s/Pa) | Solubilité dans l'eau (g/m³) | Log K_{ow} |
|--------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--|--|---------------------------|
| Naphtalène | C ₁₀ H ₈ | 128,171 | 80,26 | 10,4 | 31 | 3,37 |
| Phénanthrène | C ₁₄ H ₁₀ | 178,229 | 99,24 | 0,02 | 1,1 | 4,57 |
| Anthracène | C ₁₄ H ₁₀ | 178,229 | 215,76 | 0,001 | 0,045 | 4,54 |
| Pyrène | C ₁₆ H ₁₀ | 202,250 | 150,62 | 0,0006 | 0,132 | 5,18 |

RÉFÉRENCES

1. Zahed, M.A., et al., *Optimal conditions for bioremediation of oily seawater*. Bioresource Technology, 2010. **101**(24): p. 9455-9460.
2. Pintado-Herrera, M.G., et al., *Distribution, mass inventories, and ecological risk assessment of legacy and emerging contaminants in sediments from the Pearl River Estuary in China*. J Hazard Mater, 2017. **323**: p. 128-138.
3. Board, M., O.S. Board, and N.R. Council, *Oil in the sea III: inputs, fates, and effects*2003: national academies Press.
4. Brooijmans, R.J.W., M.I. Pastink, and R.J. Siezen, *Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew*. Microbial Biotechnology, 2009. **2**(6): p. 587-594.
5. Tyagi, M., M.M.R. da Fonseca, and C.C. de Carvalho, *Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes*. Biodegradation, 2011. **22**(2): p. 231-241.
6. Weng, N., et al., *Insight into unresolved complex mixtures of aromatic hydrocarbons in heavy oil via two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry analysis*. Journal of Chromatography A, 2015. **1398**: p. 94-107.
7. Perfumo, A., et al., *Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates*, in *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*2010, Springer. p. 1501-1512.
8. Nikolopoulou, M. and N. Kalogerakis, *Biostimulation strategies for enhanced bioremediation of marine oil spills including chronic pollution*, in *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*2010, Springer. p. 2521-2529.
9. Vandecasteele, J.-P. and G. Ourisson, *Microbiologie pétrolière (concepts, implications environnementales, applications industrielles)*. Publications de l'institut français du pétrole, 2005.
10. McGenity, T.J., et al., *Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions*. Aquatic Biosystems, 2012. **8**(1): p. 10.
11. Chen, Q., et al., *Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system*. Marine Pollution Bulletin, 2013. **71**(1-2): p. 269-275.
12. Desai, J.D. and I.M. Banat, *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiology and Molecular biology reviews, 1997. **61**(1): p. 47-64.
13. Marchant, R. and I.M. Banat, *Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(11): p. 558-565.
14. Mukherjee, S., P. Das, and R. Sen, *Towards commercial production of microbial surfactants*. Trends in Biotechnology, 2006. **24**(11): p. 509-515.
15. Speight, J.G., *The chemistry and technology of petroleum*2014: CRC press.
16. Varjani, S.J., *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons*. Bioresource Technology, 2017. **223**: p. 277-286.
17. Vieira, P., et al., *Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline*. J Hazard Mater, 2007. **140**(1-2): p. 52-59.
18. Chandra, S., et al., *Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon*. Annals of microbiology, 2013. **63**(2): p. 417-431.

19. Varjani, S.J., et al., *Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015. **103**: p. 116-124.
20. Atlas, R.M., *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. Microbiological reviews, 1981. **45**(1): p. 180.
21. Abbasian, F., et al., *A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria*. Vol. 176. 2015.
22. Meckenstock, R.U., et al., *Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2016. **26**(1-3): p. 92-118.
23. Harayama, S., Y. Kasai, and A. Hara, *Microbial communities in oil-contaminated seawater*. Current opinion in biotechnology, 2004. **15**(3): p. 205-214.
24. Costa, A.S., et al., *Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass*. Bioresource Technology, 2012. **105**: p. 31-39.
25. Rahman, K.S., et al., *Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients*. Bioresource Technology, 2003. **90**(2): p. 159-168.
26. Farhadian, M., et al., *In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review*. Bioresource Technology, 2008. **99**(13): p. 5296-5308.
27. Wilkes, H., et al., *Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2016. **26**(1-3): p. 138-151.
28. Macaulay, B.M. and D. Rees, *Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement*. Annals of Environmental Science, 2014. **8**: p. 9-37.
29. Balba, M., N. Al-Awadhi, and R. Al-Daher, *Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation*. Journal of microbiological methods, 1998. **32**(2): p. 155-164.
30. Das, N. and P. Chandran, *Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview*. Biotechnology research international, 2011. **2011**.
31. Parra-Barraza, H., et al., *The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions*☆. Fuel, 2003. **82**(8): p. 869-874.
32. Mohamed, S., *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes*. Variation en fonction de la source de carbone, 2004. **23**.
33. Harayama, S., et al., *Petroleum biodegradation in marine environments*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 1999. **1**(1): p. 63-70.
34. Desforges, J.-P.W., et al., *Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals*. Environ Int, 2016. **86**: p. 126-139.
35. Souza, E.C., T.C. Vessoni-Penna, and R.P. de Souza Oliveira, *Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **89**: p. 88-94.

36. Federation, T.I.T.O.P. *Fate of Oil Spills*. 2018; Available from: <https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/>.
37. Kanan, R., *Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin: Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques*, 2012, Bordeaux 1.
38. Tjessem, K., D. Pedersen, and A. Aaberg, *On the environmental fate of a dispersed Ekofisk crude oil in sea-immersed plastic columns*. *Water Research*, 1984. **18**(9): p. 1129-1136.
39. Council, N.R., *Oil in the sea: inputs, fates and effects*, 2003, National Academies Press, Washington, DC.
40. Fingas, M., *Water-in-oil emulsion formation: A review of physics and mathematical modelling*. *Spill Science & Technology Bulletin*, 1995. **2**(1): p. 55-59.
41. Ehrhardt, M. and R.R. Weber, *Formation of low molecular weight carbonyl compounds by sensitized photochemical decomposition of aliphatic hydrocarbons in seawater*. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 1991. **339**(10): p. 772-776.
42. Nicodem, D.E., et al., *Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills*. *Biogeochemistry*, 1997. **39**(2): p. 121-138.
43. Atlas, R.M. and T.C. Hazen, *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history*, 2011, ACS Publications.
44. Xue, J., et al., *Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review*. *Current microbiology*, 2015. **71**(2): p. 220-228.
45. Leahy, J.G. and R.R. Colwell, *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. *Microbiological reviews*, 1990. **54**(3): p. 305-315.
46. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Enhanced bioremediation of oil spills in the sea*. *Current opinion in biotechnology*, 2014. **27**: p. 191-194.
47. Yakimov, M.M., K.N. Timmis, and P.N. Golyshin, *Obligate oil-degrading marine bacteria*. *Current opinion in biotechnology*, 2007. **18**(3): p. 257-266.
48. Prince, R.C., *The microbiology of marine oil spill bioremediation*, in *Petroleum microbiology 2005*, American Society of Microbiology. p. 317-335.
49. Sauret, C., *Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière*, Thèse de Doctorat.
50. Dyksterhouse, S.E., et al., *Cycloclasticus pugetii gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995. **45**(1): p. 116-123.
51. Head, I.M., D.M. Jones, and W.F. Röling, *Marine microorganisms make a meal of oil*. *Nature Reviews Microbiology*, 2006. **4**(3): p. 173.
52. Müller, R.J., *Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing*. *Biopolymers Online: Biology• Chemistry• Biotechnology• Applications*, 2005. **10**.
53. Boopathy, R., *Factors limiting bioremediation technologies*. *Bioresource Technology*, 2000. **74**(1): p. 63-67.
54. Widdel, F. and R. Rabus, *Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons*. *Current opinion in biotechnology*, 2001. **12**(3): p. 259-276.

55. Das, K. and A.K. Mukherjee, *Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India*. Bioresource Technology, 2007. **98**(7): p. 1339-1345.
56. Atlas, R.M., *Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1991. **52**(2): p. 149-156.
57. Thamer, M., et al., *Biodegradation of Kirkuk light crude oil by Bacillus thuringiensis, Northern of Iraq*. Natural Science, 2013. **5**(07): p. 865.
58. Atlas, R.M., *Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation*. Marine Pollution Bulletin, 1995. **31**(4-12): p. 178-182.
59. Salleh, A.B., et al., *Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution*. 2003.
60. Banat, I.M., *Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review*. Bioresource Technology, 1995. **51**(1): p. 1-12.
61. Rosenberg, E., et al., *Petroleum bioremediation—a multiphase problem*. Biodegradation, 1992. **3**(2-3): p. 337-350.
62. Hendrickx, B., et al., *Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site*. Journal of microbiological methods, 2006. **64**(2): p. 250-265.
63. Rojo, F., *Degradation of alkanes by bacteria*. Environmental microbiology, 2009. **11**(10): p. 2477-2490.
64. Zeinali, M., M. Vossoughi, and S.K. Ardestani, *Naphthalene metabolism in Nocardia otitidiscaviarum strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism*. Chemosphere, 2008. **72**(6): p. 905-909.
65. Gao, S., et al., *Multiple degradation pathways of phenanthrene by Stenotrophomonas maltophilia C6*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **79**: p. 98-104.
66. Cui, C., et al., *Metabolic pathway for degradation of anthracene by halophilic Martelella sp. AD-3*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **89**: p. 67-73.
67. Lyu, Y., et al., *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Novosphingobium pentaromativorans US6-1*. PloS one, 2014. **9**(7): p. e101438.
68. Gibson, D.T. and R.E. Parales, *Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology*. Current opinion in biotechnology, 2000. **11**(3): p. 236-243.
69. Peng, R.-H., et al., *Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons*. FEMS microbiology reviews, 2008. **32**(6): p. 927-955.
70. Cao, B., K. Nagarajan, and K.-C. Loh, *Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **85**(2): p. 207-228.
71. Bartha, R., *Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation*. Microbial ecology, 1986. **12**(1): p. 155-172.
72. Watkinson, R.J. and P. Morgan, *Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms*, in *Physiology of Biodegradative Microorganisms* 1991, Springer. p. 79-92.

73. van Beilen, J.B. and E.G. Funhoff, *Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications*. Current opinion in biotechnology, 2005. **16**(3): p. 308-314.
74. Varjani, S., et al., *Screening and identification of biosurfactant (bioemulsifier) producing bacteria from crude oil contaminated sites of Gujarat, India*. Int J Inno Res Sci Eng Technol, 2014. **3**(2).
75. Sugiura, K., et al., *Physicochemical properties and biodegradability of crude oil*. Environmental Science & Technology, 1996. **31**(1): p. 45-51.
76. Mulligan, C.N., *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental Pollution, 2005. **133**(2): p. 183-198.
77. Saeki, H., et al., *Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by Gordonia sp. strain JE-1058*. Bioresource Technology, 2009. **100**(2): p. 572-577.
78. Cerqueira, V.S., et al., *Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures*. Bioresource Technology, 2011. **102**(23): p. 11003-11010.
79. Al-Hawash, A.B., et al., *Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq*. Biotechnology reports, 2018. **17**: p. 104-109.
80. Aislabie, J., D.J. Saul, and J.M. Foght, *Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils*. Extremophiles, 2006. **10**(3): p. 171-179.
81. Okoh, A.I., *Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants*. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 2006. **1**(2): p. 38-50.
82. Qin, G., D. Gong, and M.-Y. Fan, *Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **85**: p. 150-155.
83. Bertrand, J.-C., et al., *Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration*. Journal of experimental marine biology and ecology, 1993. **168**(1): p. 125-138.
84. Ebadi, A., et al., *Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing Pseudomonas aeruginosa consortium*. Journal of advanced research, 2017. **8**(6): p. 627-633.
85. Hambrick, G.A., R.D. DeLaune, and W. Patrick, *Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation*. Applied and Environmental Microbiology, 1980. **40**(2): p. 365-369.
86. Thavasi, R., et al., *Effect of salinity, temperature, pH and crude oil concentration on biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Environ. Sci, 2007. **1**(2): p. 51-57.
87. Von Wedel, R., et al., *Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California*. Water Science and Technology, 1988. **20**(11-12): p. 501-503.
88. Haritash, A. and C. Kaushik, *Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review*. J Hazard Mater, 2009. **169**(1-3): p. 1-15.
89. Hassanshahian, M. and S. Cappello, *Crude oil biodegradation in the marine environments*, in *Biodegradation-Engineering and Technology*2013, InTech.

90. Colwell, R.R., J.D. Walker, and J.J. Cooney, *Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment*. CRC critical reviews in microbiology, 1977. **5**(4): p. 423-445.
91. Chaillan, F., et al., *Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings*. Environmental Pollution, 2006. **144**(1): p. 255-265.
92. Oudot, J., F. Merlin, and P. Pinvidic, *Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments*. Marine Environmental Research, 1998. **45**(2): p. 113-125.
93. Chaîneau, C., et al., *Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil*. Soil Biology and Biochemistry, 2005. **37**(8): p. 1490-1497.
94. Ron, E.Z. and E. Rosenberg, *Biosurfactants and oil bioremediation*. Current opinion in biotechnology, 2002. **13**(3): p. 249-252.
95. Banat, I.M., et al., *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **87**(2): p. 427-444.
96. Ławniczak, Ł., R. Marecik, and Ł. Chrzanowski, *Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation*. Appl Microbiol Biotechnol, 2013. **97**(6): p. 2327-2339.
97. Juwarkar, A.A., S.K. Singh, and A. Mudhoo, *A comprehensive overview of elements in bioremediation*. Reviews in Environmental Science and bio/technology, 2010. **9**(3): p. 215-288.
98. Liu, C. and Z. Shao, *Alcanivorax dieselolei sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. **55**(3): p. 1181-1186.
99. Prince, R.C., et al., *Bioremediation of stranded oil on an Arctic shoreline*. Spill Science & Technology Bulletin, 2003. **8**(3): p. 303-312.
100. Swannell, R., K. Lee, and M. McDonagh, *Field evaluations of marine oil spill bioremediation*. Microbiological reviews, 1996. **60**(2): p. 342-365.
101. Zhu, X., et al., *Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands*. US Environmental Protection Agency, 2001.
102. Rosenberg, E. and E.Z. Ron, *Bioremediation of petroleum contamination*. Biotechnology Research Series, 1996. **6**: p. 100-124.
103. Maki, H., et al., *Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan*. Marine Pollution Bulletin, 2003. **47**(1-6): p. 74-77.
104. Ma, F., et al., *Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater*. Bioresource Technology, 2009. **100**(2): p. 597-602.
105. Palittapongarnpim, M., et al., *Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic*. Biodegradation, 1998. **9**(2): p. 83-90.
106. Atlas, R.M. and R.L. Raymond, *Stimulated petroleum biodegradation*. CRC critical reviews in microbiology, 1977. **5**(4): p. 371-386.
107. Márquez, M. and A. Ventosa, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus Gauthier et al. 1992 and Marinobacter aquaeolei Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. **55**(3): p. 1349-1351.

108. McKew, B.A., et al., *Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria*. Environmental microbiology, 2007. **9**(6): p. 1562-1571.
109. Nikolopoulou, M., N. Pasadakis, and N. Kalogerakis, *Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills*. Marine Pollution Bulletin, 2013. **72**(1): p. 165-173.
110. Tagger, S., et al., *Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system*. Marine Biology, 1983. **78**(1): p. 13-20.
111. Horowitz, A. and R. Atlas, *Microbial seeding to enhance petroleum hydrocarbon biodegradation in aquatic arctic ecosystems*. Biodeterioration. Pittman Publications Ltd., London, 1978: p. 15-20.
112. Mukherjee, A.K. and K. Das, *Microbial surfactants and their potential applications: an overview*, in *Biosurfactants2010*, Springer. p. 54-64.
113. Rouse, J.D., et al., *Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 1994. **24**(4): p. 325-370.
114. West, C.C. and J.H. Harwell, *Surfactants and subsurface remediation*. Environmental Science & Technology, 1992. **26**(12): p. 2324-2330.
115. Mehta, S., et al., *Biomimetic amphiphiles: Properties and potential use*, in *Biosurfactants2010*, Springer. p. 102-120.
116. Marchant, R. and I.M. Banat, *Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?* Biotechnology letters, 2012. **34**(9): p. 1597-1605.
117. Rebello, S., et al., *Surfactants: chemistry, toxicity and remediation*, in *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling2013*, Springer. p. 277-320.
118. 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*, in *Faculté des sciences de Sfax2012*, Université de Sfax, Tunisie. p. 169.
119. Soberón-Chávez, G. and R.M. Maier, *Biosurfactants: a general overview*, in *Biosurfactants2011*, Springer. p. 1-11.
120. Rosenberg, E., *Exploiting microbial growth on hydrocarbons—new markets*. Trends in Biotechnology, 1993. **11**(10): p. 419-424.
121. Khopade, A., et al., *Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiosis sp. B4*. Desalination, 2012. **285**: p. 198-204.
122. Saharan, B., R. Sahu, and D. Sharma, *A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives*. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 2011. **2011**(1): p. 1-14.
123. Franzetti, A., et al., *Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by Variovorax paradoxus 7bCT5*. Bioresource Technology, 2012. **108**: p. 245-251.
124. Franzetti, A., E. Tamburini, and I.M. Banat, *Applications of biological surface active compounds in remediation technologies*, in *Biosurfactants2010*, Springer. p. 121-134.
125. Derguine-Mecheri, L., et al., *Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic Cryptococcus strain YLF isolated from crude oil*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018. **162**: p. 712-724.

126. Morita, T., et al., *Isolation of Pseudozyma churashimaensis sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids*. Journal of bioscience and bioengineering, 2011. **112**(2): p. 137-144.
127. Konishi, M., et al., *Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by Pseudozyma hubeiensis SY62*. Journal of bioscience and bioengineering, 2011. **111**(6): p. 702-705.
128. Henkel, M., et al., *Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production*. Process Biochemistry, 2012. **47**(8): p. 1207-1219.
129. Varjani, S.J. and V.N. Upasani, *Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant*. Bioresource Technology, 2016. **221**: p. 510-516.
130. Ongena, M. and P. Jacques, *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol*. Trends in microbiology, 2008. **16**(3): p. 115-125.
131. Jacques, P., *Surfactin and other lipopeptides from Bacillus spp*, in *Biosurfactants2011*, Springer. p. 57-91.
132. Healy, M., C. Devine, and R. Murphy, *Microbial production of biosurfactants*. Resources, Conservation and Recycling, 1996. **18**(1-4): p. 41-57.
133. Zajic, J. and A. Mahomedy, *Biosurfactants: Intermediates in the biosynthesis of amphipathic molecules in microbes*. 1984.
134. Al-Araji, L., et al., *Microbial surfactant*. Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology, 2007. **15**(3): p. 99-105.
135. Satpute, S.K., et al., *Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms*. Biotechnology advances, 2010. **28**(4): p. 436-450.
136. Poremba, K., et al., *Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms*. Environmental Toxicology and Water Quality, 1991. **6**(2): p. 157-163.
137. Schulz, D., et al., *Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea*. Zeitschrift für Naturforschung C, 1991. **46**(3-4): p. 197-203.
138. Thavasi, R., et al., *Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from Bacillus megaterium using economically cheaper sources*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. **24**(7): p. 917-925.
139. Makkar, R. and S. Cameotra, *An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **58**(4): p. 428-434.
140. Raza, Z.A., et al., *Improved production of biosurfactant by a Pseudomonas aeruginosa mutant using vegetable oil refinery wastes*. Biodegradation, 2007. **18**(1): p. 115-121.
141. Mata-Sandoval, J.C., J. Karns, and A. Torrents, *High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on corn oil*. Journal of Chromatography A, 1999. **864**(2): p. 211-220.
142. Guerra-Santos, L.H., O. Käppeli, and A. Fiechter, *Dependence of Pseudomonas aeruginosa continuous culture biosurfactant production on*

- nutritional and environmental factors*. Appl Microbiol Biotechnol, 1986. **24**(6): p. 443-448.
143. Abu-Ruwaida, A., et al., *Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation*. Acta biotechnologica, 1991. **11**(4): p. 315-324.
 144. Mutalik, S.R., et al., *Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from Rhodococcus spp. MTCC 2574*. Bioresource Technology, 2008. **99**(16): p. 7875-7880.
 145. Franzetti, A., et al., *Potential applications of surface active compounds by Gordonia sp. strain BS29 in soil remediation technologies*. Chemosphere, 2009. **75**(6): p. 801-807.
 146. Smyth, T., et al., *Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids*, in *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*2010, Springer. p. 3705-3723.
 147. Smyth, T., et al., *Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants*, in *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*2010, Springer. p. 3687-3704.
 148. Cameotra, S.S., et al., *Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind*, in *Biosurfactants*2010, Springer. p. 261-280.
 149. Eddouaouda, K., *Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de Hassi Massoude contaminate par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio surfactant*, in *Département de Chimie industrielle*2012, Saad Dahleb-Blida. p. 194.
 150. Ramade, F., *Introduction à l'écotoxicologie*. 2007.
 151. Amara, A., *Evaluation de la toxicité de pesticides sur quatre niveaux trophiques marins: microalgues, échinoderme, bivalves et poisson*, 2012, Université de Bretagne occidentale-Brest.
 152. Triffault-Bouchet, G., *Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets-Application à des mâchefers d'IUOM et à des boues de dragage de canaux*, 2004, Chambéry.
 153. RHD, *Probit Analysis*, 1952, JSTOR.
 154. 1/RM/46, S., *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*, Mars 2005.
 155. Beiras, R., *Chapter 13 - Theory and Practice of Toxicology: Toxicity Testing*, in *Marine Pollution*, R. Beiras, Editor 2018, Elsevier. p. 215-232.
 156. Abbott, W.S., *A method of computing the effectiveness of an insecticide*. J. econ. Entomol, 1925. **18**(2): p. 265-267.
 157. Begum, G., *Ecotoxicology*2012: InTech.
 158. Ferra, C., *Aquaculture*2008.
 159. Oliveira, T.M.N. and C. Vaz, *Marine toxicology: Assays and perspectives for developing countries*, in *Bioassays*2018, Elsevier. p. 387-401.
 160. Hassan, S.H., et al., *Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors*. Environ Int, 2016. **92**: p. 106-118.
 161. Van Stappen, G., *Introduction, biology and ecology of Artemia*, in *Manual on the production and use of live food for aquaculture*1996, FAO. p. 79-106.
 162. Vanhaecke, P., et al., *Proposal for a short-term toxicity test with Artemia nauplii*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1981. **5**(3): p. 382-387.

163. Sorgeloos, P., C. Remiche-Van Der Wielen, and G. Persoone, *The use of Artemia nauplii for toxicity tests—a critical analysis*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1978. **2**(3-4): p. 249-255.
164. Nunes, B.S., et al., *Use of the genus Artemia in ecotoxicity testing*. Environmental Pollution, 2006. **144**(2): p. 453-462.
165. Gaggi, C., et al., *Toxicity and hazard ranking of s-triazine herbicides using microtox® two green algal species and a marine crustacean*. Environmental toxicology and chemistry, 1995. **14**(6): p. 1065-1069.
166. Guerra, R., *Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents*. Chemosphere, 2001. **44**(8): p. 1737-1747.
167. Sun, X., E. Kim, and S. Sun, *Laboratory study on the ecological impact of sophorolipid used for harmful algae elimination*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2010. **28**(6): p. 1240-1247.
168. e Silva, N.M.P.R., et al., *Screening of Pseudomonas species for biosurfactant production using low-cost substrates*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014. **3**(2): p. 132-139.
169. Silva, S., et al., *Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa UCP0992*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **79**(1): p. 174-183.
170. Santos, D.K.F., et al., *Biosurfactant production from Candida lipolytica in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent*. Process Biochemistry, 2017. **54**: p. 20-27.
171. Widdel, F. and N. Pfennig, *Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids*. Archives of microbiology, 1981. **129**(5): p. 395-400.
172. Zrafi-Nouira, I., et al., *Molecular diversity analysis and bacterial population dynamics of an adapted seawater microbiota during the degradation of Tunisian zarzatine oil*. Biodegradation, 2009. **20**(4): p. 467-486.
173. Belkaid, S., M.A. Ladjouzi, and S. Hamdani, *Effect of biofilm on naval steel corrosion in natural seawater*. Journal of Solid State Electrochemistry, 2011. **15**(3): p. 525-537.
174. Hassanshahian, M., M.S. Zeynalipour, and F.H. Musa, *Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance)*. Marine Pollution Bulletin, 2014. **82**(1-2): p. 39-44.
175. Mnif, S., M. Chamkha, and S. Sayadi, *Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **107**(3): p. 785-794.
176. Barathi, S. and N. Vasudevan, *Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas fluorescens isolated from a petroleum-contaminated soil*. Environ Int, 2001. **26**(5-6): p. 413-416.
177. Zampolli, J., et al., *Biodegradation of variable-chain-length n-alkanes in Rhodococcus opacus R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism*. AMB Express, 2014. **4**(1): p. 73.
178. Bouchez-Naïtali, M. and J.-P. Vandecasteele, *Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of Rhodococcus and Pseudomonas strains*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. **24**(9): p. 1901-1907.

179. Jukes, T.H. and C.R. Cantor, *Evolution of protein molecules*. Mammalian protein metabolism, 1969. **3**(21): p. 132.
180. Tamura, K., et al., *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Molecular biology and evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
181. Ferradji, F.-Z., *Etude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodépollution des eaux de mer*, in *Chimie industrielle* 2014, Université de Blida 1.
182. Chang, J.-S., et al., *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity*. Systematic and applied microbiology, 2005. **28**(2): p. 137-144.
183. Abouseoud, M., et al., *Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 2008. **223**(1-3): p. 143-151.
184. Eddouaouda, K., et al., *Characterization of a novel biosurfactant produced by Staphylococcus sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation*. J Basic Microbiol, 2012. **52**(4): p. 408-418.
185. Morikawa, M., et al., *A new lipopeptide biosurfactant produced by Arthrobacter sp. strain MIS38*. Journal of bacteriology, 1993. **175**(20): p. 6459-6466.
186. Francy, D., et al., *Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria*. Journal of Industrial Microbiology, 1991. **8**(4): p. 237-245.
187. Bodour, A.A., et al., *Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by Flavobacterium sp. strain MTN11*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(1): p. 114-120.
188. Yin, H., et al., *Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater*. Process Biochemistry, 2009. **44**(3): p. 302-308.
189. Urum, K. and T. Pekdemir, *Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing*. Chemosphere, 2004. **57**(9): p. 1139-1150.
190. Mnif, S., et al., *Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria*. Journal of Applied Microbiology, 2011. **111**(3): p. 525-536.
191. Willumsen, P.A. and U. Karlson, *Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers*. Biodegradation, 1996. **7**(5): p. 415-423.
192. Khan, A.H.A., et al., *Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation*. Ecological Engineering, 2017. **104**: p. 158-164.
193. Hassanshahian, M., G. Emtiazi, and S. Cappello, *Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea*. Marine Pollution Bulletin, 2012. **64**(1): p. 7-12.
194. Rahman, K., et al., *Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium*. Bioresource Technology, 2002. **85**(3): p. 257-261.
195. Felsenstein, J., *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. Evolution, 1985. **39**(4): p. 783-791.
196. Gauthier, J.P., H. Hammouri, and S. Othman, *A simple observer for nonlinear systems applications to bioreactors*. IEEE Transactions on automatic control, 1992. **37**(6): p. 875-880.

197. Stackebrandt, E. and B. Goebel, *Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994. **44**(4): p. 846-849.
198. Kim, M., et al., *Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014. **64**(2): p. 346-351.
199. Kumari, B., S.N. Singh, and D.P. Singh, *Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation*. Process Biochemistry, 2012. **47**(12): p. 2463-2471.
200. Sathishkumar, M., et al., *Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas*. CLEAN–Soil, Air, Water, 2008. **36**(1): p. 92-96.
201. Kavitha, S. and R. Parimalavalli, *Effect of processing methods on proximate composition of cereal and legume flours*. Journal of Human Nutrition and Food Science, 2014. **2**(4): p. 1051.
202. Li, C., et al., *Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain Rhodococcus sp. JZX-01*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013. **171**(7): p. 1715-1725.
203. Sharma, S. and A. Pant, *Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine Rhodococcus*. Biodegradation, 2000. **11**(5): p. 289-294.
204. Chamkha, M., et al., *Isolation and characterization of Klebsiella oxytoca strain degrading crude oil from a Tunisian off-shore oil field*. J Basic Microbiol, 2011. **51**(6): p. 580-589.
205. Mehdi, H. and E. Giti, *Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008. **62**(2): p. 170-178.
206. Bayat, Z., M. Hassanshahian, and M.A. Hesni, *Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf*. Marine Pollution Bulletin, 2015. **101**(1): p. 85-91.
207. Li, H., et al., *Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **76**: p. 49-57.
208. Huu, N.B., et al., *Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1999. **49**(2): p. 367-375.
209. Liu, H., et al., *Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014. **87**: p. 52-59.
210. Tanase, A.-M., et al., *Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **84**: p. 150-154.
211. Pi, Y., et al., *Degradation of crude oil and relationship with bacteria and enzymatic activities in laboratory testing*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016. **106**: p. 106-116.
212. Bernardez, L.A., *A rotating disk apparatus for assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons transferring from a non-aqueous phase*

- liquid to solutions of surfactant Brij 35*. Bioprocess and biosystems engineering, 2009. **32**(3): p. 415-424.
213. Liu, T., et al., *Biodegradation of n-hexadecane by bacterial strains B1 and B2 isolated from petroleum-contaminated soil*. Science China Chemistry, 2012. **55**(9): p. 1968-1975.
214. Bouchez Naïtali, M., et al., *Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake*. Journal of Applied Microbiology, 1999. **86**(3): p. 421-428.
215. Noordman, W.H., et al., *The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by Pseudomonas aeruginosa varies with substrate availability*. Journal of Biotechnology, 2002. **94**(2): p. 195-212.
216. Zhang, Z., et al., *Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8*. Bioresource Technology, 2011. **102**(5): p. 4111-4116.
217. Piccolo, L.L., et al., *Involvement of an alkane hydroxylase system of Gordonia sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. **77**(4): p. 1204-1213.
218. Liu, H., et al., *Characterization of the medium-and long-chain n-alkanes degrading Pseudomonas aeruginosa strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes*. PloS one, 2014. **9**(8): p. e105506.
219. Rivet, L., et al., *n-Alkane biodegradation by a marine bacterium in the presence of an oleophilic nutriment*. Biotechnology letters, 1993. **15**(6): p. 637-640.
220. Rocha, C.A., A.M. Pedregosa, and F. Laborda, *Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by Pseudomonas aeruginosa ATCC 55925*. AMB Express, 2011. **1**(1): p. 9.
221. Xia, W., et al., *Biosurfactant produced by novel Pseudomonas sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons*. J Hazard Mater, 2014. **276**: p. 489-498.
222. Chen, W., et al., *High efficiency degradation of alkanes and crude oil by a salt-tolerant bacterium Dietzia species CN-3*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2017. **118**: p. 110-118.
223. Mishra, S. and S. Singh, *Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes*. Bioresource Technology, 2012. **111**: p. 148-154.
224. Liu, Y., et al., *Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability: enhancement or reduction?* J Hazard Mater, 2017. **322**: p. 394-401.
225. Zhang, Y. and R.M. Miller, *Effect of a Pseudomonas rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(6): p. 2101-2106.
226. Hua, Z., et al., *Effects of biosurfactants produced by Candida antarctica on the biodegradation of petroleum compounds*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. **20**(1): p. 25-29.
227. Hassanshahian, M., et al., *Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances)*. Marine Pollution Bulletin, 2013. **73**(1): p. 300-305.
228. Song, X., et al., *Isolation, characterization of Rhodococcus sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and*

- aliphatic hydrocarbons*. Marine Pollution Bulletin, 2011. **62**(10): p. 2122-2128.
229. Deng, M.-C., et al., *Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium Achromobacter sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China*. Marine Pollution Bulletin, 2014. **83**(1): p. 79-86.
230. Hedlund, B.P., A.D. Geiselbrecht, and J.T. Staley, *Marinobacter strain NCE312 has a Pseudomonas-like naphthalene dioxygenase*. FEMS Microbiology Letters, 2001. **201**(1): p. 47-51.
231. Das, K. and A. Mukherjee, *Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability*. Journal of Applied Microbiology, 2007. **102**(1): p. 195-203.
232. Kumar, M., et al., *A halotolerant and thermotolerant Bacillus sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007. **23**(2): p. 211-220.
233. Tiwari, B., et al., *Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas sp.* Bioresource Technology, 2016. **216**: p. 1102-1105.
234. Gomes, A., A.L.R. Costa, and R.L. Cunha, *Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: Adsorption, interfacial rheology and emulsion features*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018. **164**: p. 272-280.
235. Nwinyi, O.C. and O.O. Amund, *Biodegradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by axenic bacterial species belonging to the genera Lysinibacillus and Paenibacillus*. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 2017. **41**(3): p. 577-587.
236. Mesbaiah, F.-Z., *Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et production de biosurfactants par des souches bactériennes thermophiles isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud*, in *Chimie industrielle 2015*, Blida 1.
237. Ghosh, I., J. Jasmine, and S. Mukherji, *Biodegradation of pyrene by a Pseudomonas aeruginosa strain RS1 isolated from refinery sludge*. Bioresource Technology, 2014. **166**: p. 548-558.
238. Kumari, S., et al., *Simultaneous biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by a Stenotrophomonas sp: characterization of nid genes and effect of surfactants on degradation*. Indian journal of microbiology, 2017. **57**(1): p. 60-67.
239. Taran, M., et al., *Surface active agent production from olive oil in high salt conditions and its process optimization*. Polish Journal of Chemical Technology, 2012. **14**(4): p. 30-34.
240. Chiewpattanakul, P., *Isolation and structure elucidation of biosurfactant from microorganism and its application model in drug delivery system*, 2010, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL.
241. Prieto, L., et al., *The production of rhamnolipid by a Pseudomonas aeruginosa strain isolated from a southern coastal zone in Brazil*. Chemosphere, 2008. **71**(9): p. 1781-1785.

242. Lotfabad, T.B., et al., *An efficient biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **69**(2): p. 183-193.
243. Marti, M., et al., *Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation*. Enzyme and microbial technology, 2014. **55**: p. 31-39.
244. Kiran, G.S., et al., *Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus Aspergillus ustus MSF3*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 250-256.
245. Patel, R.M. and A.J. Desai, *Surface-active properties of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa GS3*. J Basic Microbiol, 1997. **37**(4): p. 281-286.
246. Onbasli, D. and B. Aslim, *Biosurfactant production in sugar beet molasses by some Pseudomonas spp.* J Environ Biol, 2009. **30**(1): p. 161-163.
247. Mercade, M., et al., *Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production*. Bioresource Technology, 1993. **43**(1): p. 1-6.
248. Shah, V., M. Jurjevic, and D. Badia, *Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production*. Biotechnology progress, 2007. **23**(2): p. 512-515.
249. Kock, J., et al., *Used cooking oil: science tackles a potential health hazard*. South African journal of science, 1996. **92**(11): p. 513-514.
250. Haba, E., et al., *Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils*. Journal of Applied Microbiology, 2000. **88**(3): p. 379-387.
251. Luo, Z., et al., *Optimizing rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 grown on waste frying oil using response surface method and batch-fed fermentation*. Journal of Central South University, 2013. **20**(4): p. 1015-1021.
252. Wadekar, S., et al., *Microbial synthesis of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2012. **42**(3): p. 249-266.
253. Thavasi, R., et al., *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa from renewable resources*. Indian journal of microbiology, 2011. **51**(1): p. 30-36.
254. Sadouk, Z., H. Hacene, and A. Tazerouti, *Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a Rhodococcus strain*. Oil & Gas Science and Technology-Revues de l'IFP, 2008. **63**(6): p. 747-753.
255. Ferhat, S., *Production de biosurfactants par des souches de Brevibacterium et Ochrobacterum isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminées par le pétrole brut*, in Chimie industrielle 2012, Saad Dahleb Blida 1.
256. Pantazaki, A.A., et al., *Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by Thermus thermophilus HB8*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **88**(4): p. 939-951.
257. Nitschke, M., S.G. Costa, and J. Contiero, *Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **160**(7): p. 2066-2074.
258. Chayabutra, C., J. Wu, and L.K. Ju, *Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates*. Biotechnol Bioeng, 2001. **72**(1): p. 25-33.

259. Saikia, R.R., et al., *Isolation of biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production*. *Annals of microbiology*, 2012. **62**(2): p. 753-763.
260. Gabet, S., *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique*, 2004, Limoges.
261. Saimmai, A., S. Udomsilp, and S. Maneerat, *Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium Inquilinus limosus KB3 grown on low-cost raw materials*. *Annals of microbiology*, 2013. **63**(4): p. 1327-1339.
262. Santa Anna, L., et al., *Production of biosurfactants from Pseudomonas aeruginosa PA 1 isolated in oil environments*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2002. **19**(2): p. 159-166.
263. Benincasa, M. and F.R. Accorsini, *Pseudomonas aeruginosa LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate*. *Bioresource Technology*, 2008. **99**(9): p. 3843-3849.
264. Zhu, Y., et al., *Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using Pseudomonas aeruginosa zju. u1M*. *Journal of Zhejiang University-Science A*, 2007. **8**(9): p. 1514-1520.
265. Syldatk, C., et al., *Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of Pseudomonas species DSM 2874*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 1985. **40**(1-2): p. 61-67.
266. Bednarski, W., et al., *Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast*. *Bioresource Technology*, 2004. **95**(1): p. 15-18.
267. Campos, J.M., T.L. Stamford, and L.A. Sarubbo, *Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. **172**(6): p. 3234-3252.
268. Cunha, C., et al., *Serratia sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline*. *Process Biochemistry*, 2004. **39**(12): p. 2277-2282.
269. Pepi, M., et al., *An antarctic psychrotrophic bacterium Halomonas sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005. **53**(1): p. 157-166.
270. Raddadi, N., et al., *Marinobacter sp. from marine sediments produce highly stable surface-active agents for combatting marine oil spills*. *Microb Cell Fact*, 2017. **16**(1): p. 186.
271. Kebbouche-Gana, S., et al., *Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2009. **36**(5): p. 727-738.
272. Gandhimathi, R., et al., *Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes Nocardiosis alba MSA10*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2009. **32**(6): p. 825-835.
273. Ebrahimipour, G., et al., *Bioemulsification activity assessment of an indigenous strain of halotolerant Planococcus and partial characterization of produced biosurfactants*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014. **11**(5): p. 1379-1386.
274. Liu, C., et al., *Biosurfactant production from Pseudomonas taiwanensis L1011 and its application in accelerating the chemical and biological*

- decolorization of azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017. **145**: p. 8-15.
275. Elshikh, M., et al., *Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens*. *New biotechnology*, 2017. **36**: p. 26-36.
276. De Lima, C., et al., *Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa grown in residual soybean oil*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009. **152**(1): p. 156.
277. Bahri, M.A., et al., *Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by electron spin resonance*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006. **290**(1-3): p. 206-212.
278. Luna, J.M., et al., *Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by Candida sphaerica UCP0995 for application in the petroleum industry*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. **102**: p. 202-209.
279. Ferhat, S., et al., *Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011. **65**(8): p. 1182-1188.
280. Gudiña, E.J., et al., *Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20*. *Letters in applied microbiology*, 2010. **50**(4): p. 419-424.
281. Haddad, N.I., J. Wang, and B. Mu, *Identification of a biosurfactant producing strain: Bacillus subtilis HOB2*. *Protein and peptide letters*, 2009. **16**(1): p. 7-13.
282. Bezza, F.A. and E.M.N. Chirwa, *Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by Bacillus subtilis CN2*. *Biochemical engineering journal*, 2015. **101**: p. 168-178.
283. Knoblich, A., et al., *Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1995. **5**(1-2): p. 43-48.
284. Gudiña, E.J., et al., *Novel bioemulsifier produced by a Paenibacillus strain isolated from crude oil*. *Microb Cell Fact*, 2015. **14**(1): p. 14.
285. Pradhan, A.K., et al., *Inhibition of pathogenic bacterial biofilm by biosurfactant produced by Lysinibacillus fusiformis S9*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2014. **37**(2): p. 139-149.
286. Pornsunthorntawe, O., et al., *Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa SP4 isolated from petroleum-contaminated soil*. *Bioresource Technology*, 2008. **99**(6): p. 1589-1595.
287. Patowary, R., et al., *Utilization of paneer whey waste for cost-effective production of rhamnolipid biosurfactant*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016. **180**(3): p. 383-399.
288. Jain, R.M., et al., *Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation*. *International journal of biological macromolecules*, 2013. **62**: p. 52-58.

289. Lee, D.W., et al., *Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment*. Environmental Pollution, 2018. **241**: p. 254-264.
290. Singer, M., et al., *Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing*. Marine Pollution Bulletin, 2000. **40**(11): p. 1007-1016.
291. Rial, D., et al., *Toxicity of binary mixtures of oil fractions to sea urchin embryos*. J Hazard Mater, 2013. **263**: p. 431-440.
292. Weiszhar, Z., et al., *Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. **45**(4): p. 492-498.
293. Rocchio, J., et al., *A solvent-free lecithin-Tween 80 system for oil dispersion*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017. **533**: p. 218-223.
294. Meyer, B., et al., *Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*. Planta medica, 1982. **45**(05): p. 31-34.
295. de França, Í.W.L., et al., *Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils*. Catalysis Today, 2015. **255**: p. 10-15.
296. Edwards, K.R., J.E. Lepo, and M.A. Lewis, *Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species*. Marine Pollution Bulletin, 2003. **46**(10): p. 1309-1316.
297. Rial, D., et al., *Effects of simulated weathering on the toxicity of selected crude oils and their components to sea urchin embryos*. J Hazard Mater, 2013. **260**: p. 67-73.
298. Perrichon, P., et al., *Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (Danio rerio) embryo-larval bioassay with a multilevel approach*. Science of the Total Environment, 2016. **568**: p. 952-966.
299. Fucik, K.W., K.A. Carr, and B.J. Balcom, *Toxicity of oil and dispersed oil to the eggs and larvae of seven marine fish and invertebrates from the Gulf of Mexico*, in *The use of chemicals in oil spill response 1995*, ASTM International.
300. Mitchell, F.M. and D.A. Holdway, *The acute and chronic toxicity of the dispersants Corexit 9527 and 9500, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to Hydra viridissima (green hydra)*. Water Research, 2000. **34**(1): p. 343-348.
301. Echols, B., et al., *Acute aquatic toxicity studies of Gulf of Mexico water samples collected following the Deepwater Horizon incident (May 12, 2010 to December 11, 2010)*. Chemosphere, 2015. **120**: p. 131-137.
302. Mohanty, S., J. Jasmine, and S. Mukherji, *Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil*. BioMed research international, 2013. **2013**.
303. Urum, K., et al., *A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils*. Chemosphere, 2006. **62**(9): p. 1403-1410.
304. Whang, L.-M., et al., *Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil*. J Hazard Mater, 2008. **151**(1): p. 155-163.

305. Bordoloi, N. and B. Konwar, *Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons*. J Hazard Mater, 2009. **170**(1): p. 495-505.
306. Zhong, H., et al., *Aggregate-based sub-CMC solubilization of n-alkanes by monorhamnolipid biosurfactant*. New Journal of Chemistry, 2016. **40**(3): p. 2028-2035.
307. Thavasi, R., S. Jayalakshmi, and I.M. Banat, *Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of Bacillus megaterium, Corynebacterium kutscheri and Pseudomonas aeruginosa*. Bioresource Technology, 2011. **102**(2): p. 772-778.
308. Thavasi, R., S. Jayalakshmi, and I.M. Banat, *Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by Lactobacillus delbrueckii in biodegradation of crude oil*. Bioresource Technology, 2011. **102**(3): p. 3366-3372.
309. Laorrattanasak, S., et al., *Production and application of gordonia westfalica GY40 biosurfactant for remediation of fuel oil spill*. Water, Air, & Soil Pollution, 2016. **227**(9): p. 325.
310. Gentili, A.R., et al., *Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006. **57**(4): p. 222-228.
311. Sajna, K.V., et al., *Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from Pseudozyma sp. NII 08165 or its culture broth*. Bioresource Technology, 2015. **191**: p. 133-139.
312. Shi, Q., et al., *Characterization of heteroatom compounds in a crude oil and its saturates, aromatics, resins, and asphaltenes (SARA) and non-basic nitrogen fractions analyzed by negative-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*. Energy & Fuels, 2010. **24**(4): p. 2545-2553.
313. Rojo-Nieto, E. and J.A. Perales-Vargas-Machuca, *Microbial degradation of PAHs: organisms and environmental compartments*, in *Microbial Degradation of Xenobiotics* 2012, Springer. p. 263-290.