

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



MEMOIRE DE MASTER

Spécialité: Eau, Environnement et Développement Durable.

Présenté par :

M. Nour El Islem Abdellah NEFOUCI

**BIOREMEDIATION D'UN SITE POLLUE PAR LES
HYDROCARBURES : ESSAIS D'APPLICATION
D'UN BIOSURFACTANT**

Encadreur :

Dr. Kamel EDOUAOUDA, Université de Blida 1

Co-encadreur :

M. Billel ZENATI, CNRDPA

Septembre 2015

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mon idéal, mon exemple, l'être le plus généreux, mon très cher père, Qu'ALLAH tout puissant nous le garde.

A ma chère mère qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mes sœurs et mes frères qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.

A mes ami(e)s :

Madjid, Hamou, Meriem, Oussama, Zakaria et Souad.

Nour El Islem Abdellah

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Je remercie **M. BADIS Abdelmalek** Professeur à l'université de Blida 1, de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Je remercie spécialement mon promoteur **Dr Eddouaouda Kamel**, maitre de conférences (B) à l'université de Blida 1 pour sa disponibilité, ses précieuses remarques et sa compréhension.

Je remercie très chaleureusement mon Co-promoteur **M.ZENATI Billel** attaché de recherche au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture CNRDPA qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour. Je lui exprime ma gratitude de m'avoir dirigé, encouragé et surtout aidé afin de réaliser ce travail.

Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont contribué à ma formation, en particulier **Pr. BOURAS Omar** je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour l'attention et les conseils qu'il m'a prodigué et je tiens également a exprimé mes vifs remerciements à **Pr. AOUABED Ali** pour sa disponibilité tout au long des trois dernière années de mon cursus universitaire.

Mes vifs remerciements vont, également, à **M.KESSI Mehena** responsable de laboratoire d'analyse chimique (URD) au sien de l'entreprise de rénovation de matériels aéronautiques (ERMA) pour son aides et surtout pour sa gentillesse.

Je remercie également le groupe SONATRACH en particulier **M. SMAIL Salim** chef de service d'exploitation du module « 0 » pour m'avoir accueilli au sin de son équipe durant mon stage à Hassi R'mel, **M.ZIDAN** du service HSE pour son aide à l'obtention

des échantillons de sol et **Dr. KHODJA Mohamed** pour sa disponibilité et son aide à la caractérisation de notre échantillon de sol.

Je remercie les techniciens du laboratoire de recherche (laboratoire des Plantes Aromatiques et Médicinales) du département Agronomie de nous avoir analysé l'échantillon de biosurfactant par IRTF.

Je touche aussi par mes remerciements tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail.

ملخص

إستخدمت السلالة البكتيرية المعزولة من الرواسب البحرية الملوثة بالنفط لإنتاج مفاعل سطحي بيولوجي. هذا الأخير تمت دراسة ملامحه ومن ثم إستعماله في معالجة تربة ملوثة بالهيدروكربونات النفطية (ناحية حاسي الرمل), كما تم إستعمال هذا المفاعل السطحي البيولوجي في إذابة النفط الخام في البيئة البحرية.

النتائج المحصل عليها خلال إنتاج المفاعل السطحي البيولوجي أظهرت أن مردود الإنتاج الإجمالي مقدر ب (4.93 g.L^{-1}), يمتاز المفاعل ب CMC 787 mg.L^{-1} تمكنه من تخفيض التوتر السطحي للماء إلى غاية 31.6 mN.m^{-1} . مميزات المفاعل السطحي المحصل عليها من خلال ال IRFT أظهرت أن المفاعل المعزول هو عبارة عن غليكو ليبيد. أظهرت نتائج تطبيق المفاعل السطحي أن معدل إسترجاع الهيدروكربونات الموجودة في التربة قدر بحوالي 11% مقابل 13% من طرف التوين 80, يتميز المفاعل البيولوجي بفعالية مماثلة للمفاعل الكيميائي (27% و 28% على التوالي) في إذابة النفط الخام في مياه البحر. في الأخير يتميز المفاعل البيولوجي بالانتقائية تجاه الألكانات (C_{12} , C_{27}).

الكلمات المفتاحية:

هيدروكربونات, بكتيريا بحرية, مفاعلات السطحية البيولوجية, الإنتاج, المعالجة

ABSTRACT

In this work, biosurfactant named HF644 resulting from a bacterial strain marines was produced characterized and applies in re-remediation of a soil contaminated by hydrocarbons (area of Hassi R'mel) and the solubilization of crude oil in sea water.

The results got from the production of biosurfactant give a total output of 4.93 g.L^{-1} . CMC is 787 mg.L^{-1} and allows reduction of the TS of 31.6 mN.m^{-1} . It's characterization by FTIR shows that it's probably a glycolipidic nature. The application of the HF644 in the soil washing reveals a rate of re-mobilization of 11% compared with 13% with chemical surfactant (Tween80), the solubilization of oil in sea water indicates effectiveness close the two surfactant HF644 and Tween80 (27% and 28% respectively).

Finally, the HF644 has a notable selectivity opposite to the n-alkanes ($n\text{-C}_{12}$ $n\text{-C}_{27}$).

Keywords:

Biosurfactant, marine bacterium, production, characterization, hydrocarbons, remediation.

RESUME

Dans ce travail, un biosurfactant, nommé HF644 issu d'une souche bactérienne marine Sdk644 cultivée sur l'huile de friture a été produit, caractérisé et met en application dans la remobilisation d'un sol contaminé par les hydrocarbures (région de Hassi R'mel) et la solubilisation du pétrole brut dans l'eau de mer.

Les résultats obtenus pour la production du biosurfactant donnent un rendement total de $4,93 \text{ g.L}^{-1}$. Sa CMC est de 787 mg.L^{-1} et permet une réduction de la TS de $31,6 \text{ mN.m}^{-1}$. Sa caractérisation par IRTF montre qu'il est probablement de nature glycolipidique.

L'application du HF644 dans le lavage du sol contaminé par les hydrocarbures, révèle un taux de remobilisation de 11 % contre 13 % avec un surfactant chimique (Tween 80). La solubilisation du pétrole dans l'eau de mer indique une efficacité proche des deux surfactants HF644 et Tween 80 (27 et 28 % respectivement). Finalement, il a été constaté que le HF644 a une sélectivité notable vis-à-vis les n-alcanes ($n\text{-C}_{12}$ à $n\text{-C}_{27}$).

Mots clés :

Biosurfactant, bactérie marine, production, caractérisation, hydrocarbures, remédiation.

REMERCIEMENTS

RESUME

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE 1 : PARTIE THEORIQUE

1.1	Les hydrocarbures	14
1.1.1	Définition	14
1.1.2	Propriétés physicochimiques	16
1.1.2.1	La solubilité	16
1.1.2.2	La densité	17
1.1.2.3	La stabilité.....	17
1.1.2.4	La polarité	17
1.1.2.5	La volatilité.....	17
1.1.2.6	La viscosité	17
1.1.3	Toxicité des hydrocarbures.....	18
1.2	Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....	18
1.2.1	Milieu marin	18
1.2.1.1	Evolution primaire.....	18
1.2.1.2	Evolution secondaire	20
1.2.2	Sols	20
1.3	Les biosurfactants	22
1.3.1	Définition	22
1.3.2	Classification	22
1.3.2.1	Glycolipides :.....	22
1.3.2.2	Lipopeptides et lipoprotéines.....	23
1.3.2.3	Phospholipides et Acides gras	23
1.3.2.4	Les biosurfactants polymères	23
1.3.2.5	Les biosurfactants particulières	23
1.3.3	Microorganismes producteurs de biosurfactant.....	23
1.3.4	Récupération de biosurfactant	24
1.3.5	Propriétés de biosurfactant.....	25
1.3.5.1	Activité à l'interface (et à la surface).....	25
1.3.5.2	Concentration micellaire critique (CMC)	25
1.3.5.3	Biodégradabilité.....	26
1.3.5.4	Toxicité	26
1.3.6	Domaine d'applications des biosurfactants	27
1.3.7	Remédiation des hydrocarbures par l'utilisation des biosurfactants.....	28
1.3.7.1	Cas des sols.....	28

1.3.7.2 Milieux aquatiques	29
----------------------------------	----

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

2.1 Production de biosurfactant.....	32
2.1.1 Origine de la souche bactérienne SdK644	Erreur ! Signet non défini.
2.1.2 Conditions de culture	32
2.1.3 Milieu de production	33
2.1.4 Extraction et purification partielle du biosurfactant.....	33
2.2 Caractérisation du biosurfactant.....	33
2.2.1 Concentration micellaire critique	33
2.2.2 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF	34
2.3 Remédiation des hydrocarbures par l'utilisation de biosurfactant.....	34
2.3.1 Remobilisation d'un sol contaminé par les hydrocarbures.....	34
2.3.1.1 Analyses physico-chimiques et microbiologiques d'échantillon de sol contaminé	35
2.3.1.2 Énumération de la flore mésophile aérobie totale du sol	37
2.3.1.3 Dosage des hydrocarbures	38
2.3.1.4 Test de remobilisation	39
2.3.2 Solubilisation du pétrole dans l'eau de mer.....	40

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Production de biosurfactant.....	41
3.1.1 Extraction et purification	41
3.2 Caractérisation du biosurfactant.....	43
3.2.1 Concentration micellaire critique CMC	43
3.2.2 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF	45
3.3 Bioremédiation des hydrocarbures par l'utilisation du biosurfactant HF644	47
3.3.1 Remobilisation des hydrocarbures du sol	48
3.3.1.1 Analyses physico-chimiques et microbiologique de l'échantillon de sol contaminé	48
3.3.1.2 Test de remobilisation	52
3.3.2 Solubilisation du pétrole dans l'eau de mer.....	58
CONCLUSION GENERALE	64

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Intervalles de distillation des coupes pétrolières.	15
Figure 1.2	Différents processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol.	21
Figure 1.3	Représentation d'une molécule de biosurfactant.	22
Figure 1.4	Représentation schématique d'une micelle de surfactant.	26
Figure 2.1	Photos montrant l'échantillonnage d'un sédiment marin pollué par les hydrocarbures.	32
Figure 2.2	Photos montrant l'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures du CTH (région Hassi R'mel).	34
Figure 3.1	Photos montrant la production de biosurfactant par la souche Sdk644 dans le milieu minimum avec l'huile de friture comme source de carbone.	41
Figure 3.2	Photos montrant le test de déplacement de huile de biosurfactant HF644.	41
Figure 3.3	Évolution de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant HF644 et détermination de sa CMC.	44
Figure 3.4	Spectre d'IRFT de biosurfactant HF644.	46
Figure 3.5	Résultat de l'analyse granulométriques de l'échantillon SCTH.	48
Figure 3.6	Chromatogramme d'échantillon SCTH.	51
Figure 3.7	Photos montrant l'aspect des hydrocarbures pétroliers mobilisés du sol. (a) avant traitement, (b) après traitement.	52
Figure 3.8	Distribution des n-alcanes mobilisés sous l'effet des surfactants appliqués.	53
Figure 3.9	Quantification gravimétrique des TPH mobilisés par les surfactants étudiés.	56
Figure 3.10	Potos montrant l'aspect du pétrole brut solubilisé dans l'eau de mer. (a) avant traitement, (b) après traitement.	58
Figure 3.11	Chromatogramme d'échantillon du pétrole brut stérile.	59
Figure 3.12	Solubilité relative du pétrole brut en présence des surfactants.	60
Figure 3.13	Distribution des n-alcanes solubilisés après traitement par les surfactants HF644 et Tween 80.	60
Figure 3.14	Quantification gravimétrique des TPH solubilisés par les surfactants étudiés.	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Familles d'hydrocarbures aliphatiques.	16
Tableau 1.2	Classification des biosurfactant et microorganismes producteurs.	24
Tableau 1.3	Toxicité des biosurfactants comparée à celle des surfactants chimiques.	27
Tableau 1.4	Utilisations potentielles des biosurfactants.	28
Tableau 2.1	Appareillages utilisés et leurs objectifs.	31
Tableau 2.2	Présentation de l'échantillon du sol (SCTH).	35
Tableau 3.1	Propriétés physico-chimiques du surfactant Tween 80.	48
Tableau 3.2	Caractéristiques minéralogique et texture d'échantillon SCTH.	48
Tableau 3.3	Propriétés physico-chimiques et microbiologiques d'échantillon SCTH.	50

LISTE DES ABREVIATIONS

CE	Conductivité électrique
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse
CMC	Concentration micellaire critique
CTH	Centre de Traitement des Huiles Hassi R'mel
DCM	Dichlorométhane
EMHF644	Eau de mer traitée avec le biosurfactant HF644
HF644	Biosurfactant produit de la souche Sdk644
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCS	Hydrocarbures
IRTF	Infrarouge à Transmission de Fourier
Kow	Coefficient de partage eau/octanol
LB	Milieu Luria Bertani
MM	Milieu minimum
SCTH	Sol de Centre de Traitement des Huile
SHF644	Sol traité avec le biosurfactant HF644
TEM	Témoin eau de mer
TEMTween80	Témoin d'eau de mer traité avec le Tween80
TI	Tension inter-faciale
TPH	Hydrocarbure pétrolier totaux
TS	Tension de surface
TSED	Témoin du sol traité avec l'eau distillé
TSTween80	Témoin du sol traité avec le Tween 80

INTRODUCTION GENERALE

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes aussi bien marins que continentaux. La qualité des sols peut également en être altérée.

Les effets dévastateurs de l'industrialisation pétrolière et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors des accidents (fuite de pétrole, naufrages des pétroliers, ...etc.) ou en cas de rejets ou de déversements volontaires, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles [1].

Par ailleurs, le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les hydrocarbures est l'atteinte des nappes phréatiques affectant ainsi la qualité des eaux [2].

L'élimination des hydrocarbures pose de sérieux problèmes, les voies physiques et chimiques restent très limitées du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement [3]. La bioremédiation des sites contaminés est aujourd'hui reconnue comme une action complémentaire indispensable aux voies physico-chimiques pour la dégradation ultime des hydrocarbures. Elle reste la solution la plus efficace, la plus demandée car la mieux maîtrisée et la moins coûteuse.

C'est dans ce contexte que s'insère notre travail, qui consiste en une contribution à la remédiation des sites pollués par les hydrocarbures. Plus précisément, l'utilisation de tension actif biologique ou Biosurfactant pour améliorer la récupération et la biodégradation des produits pétroliers. Deux cas ont été étudiés, représentant ainsi deux matrices différentes ; le cas d'un sol de la région sud d'Algérie (Hassi R'mel) sévèrement contaminé par des hydrocarbures pétroliers et le cas du pétrole étalé dans l'eau de mer.

La présente étude s'organise en trois chapitres. Le premier est une partie théorique où nous exposons les données relatives à la description des hydrocarbures, leur devenir dans l'environnement et en fin notre attention se portera sur les biosurfactants : classification, propriétés et applications.

Dans le second chapitre, nous définissons la méthodologie adoptée pour la réalisation de différentes expérimentations.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus concernant :

- La production et la caractérisation de biosurfactant synthétisé par la souche bactérienne.
- L'application du biosurfactant de notre souche bactérienne dans le lavage d'un sol contaminé par les hydrocarbures et la solubilisation du pétrole dans l'eau de mer.

Enfin, une conclusion générale met en valeur l'ensemble des résultats obtenus.

1. PARTIE THEORIQUE

1.1 Les hydrocarbures

1.1.1 Définition

Les hydrocarbures ou huiles minérales selon AFNOR X 31410, regroupent différents produits pétroliers (pétrole brut, kérosène, essence, gasoil, lubrifiant, huiles à moteurs). On peut employer aussi le terme d'hydrocarbures paraffiniques.

Cette famille comprend principalement des alcanes (hydrocarbures aliphatiques) constitués des chaînes linéaires ou ramifiées comprenant au minimum cinq atomes de carbone, caractérisés par un point d'ébullition compris dans l'intervalle 35 °C – 490 °C.

Elle contient en proportion parfois significative des hydrocarbures aliphatiques cycliques (cyclanes), des hydrocarbures aromatiques monocycliques (benzène, toluène, xylène...) ou polycycliques (HAP : ex. benzo (a) pyrène).

On définit les hydrocarbures des familles de dérivés en fonction de leur utilisation ; ces familles sont basées sur des coupes de raffinage pétrolier ; il est possible de préciser le nombre d'atomes des molécules des composants.

La **Figure 1.1** et le **Tableau 1.1**, présentent respectivement la diversité des produits tirés du pétrole classés en fonction de leur intervalle de distillation et du nombre moyen d'atomes de carbone qui les composent et en fonction de leur utilisation.

Au laboratoire, ils sont généralement dosés globalement (indice hydrocarbures totaux ou TPH en anglais). Un mélange universel composé de toluène (25 %), iso-octane (37,5%) et hexadécane (37,5 %) est utilisé comme étalon pour leur quantification [4].

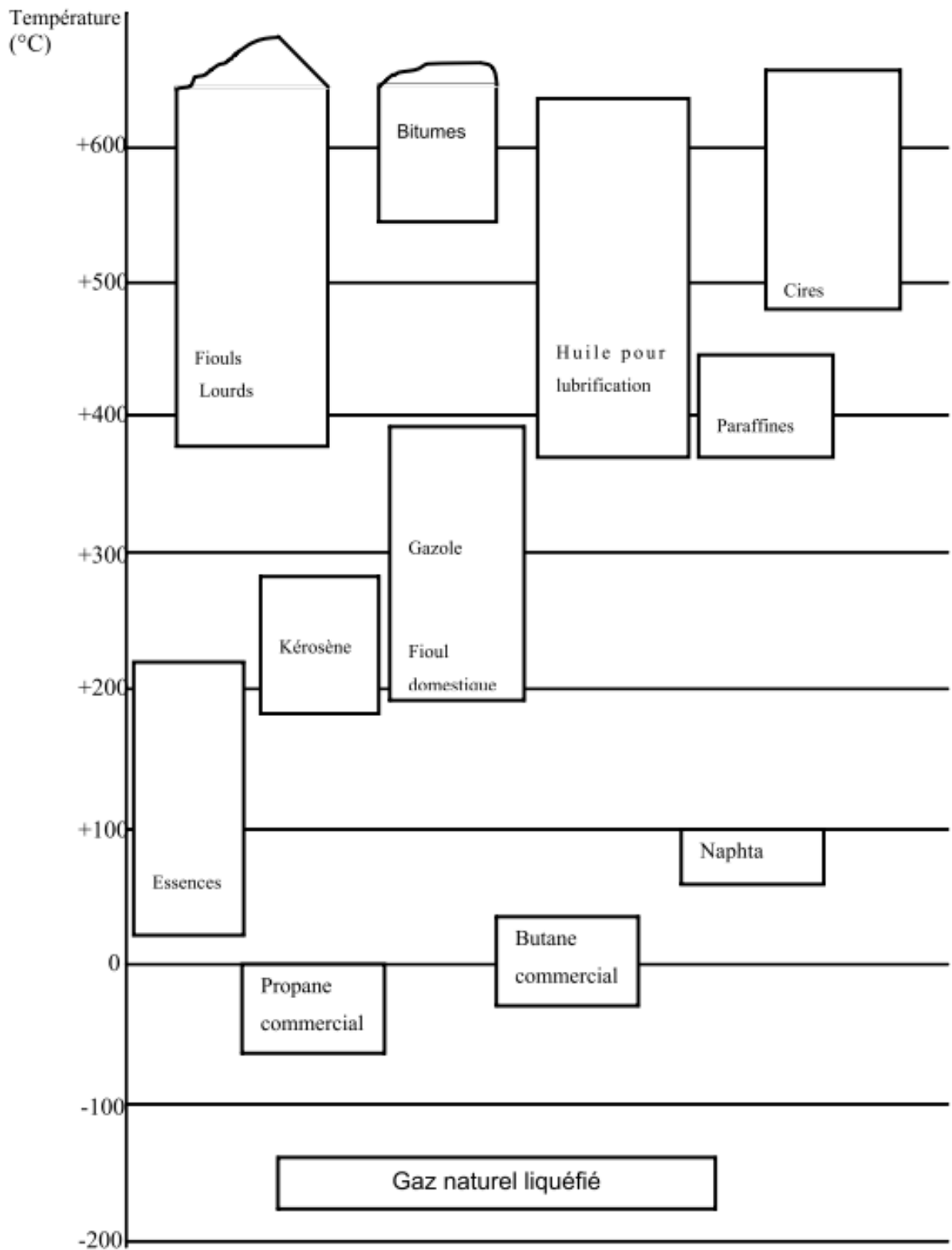


Figure 1.1 : Intervalles de distillation des coupes pétrolières [5].

Tableau 1.1 : Familles d'hydrocarbures aliphatiques [6].

Nombre de carbones	Volatil	Nom	Utilisation actuelle
C ₁	Gaz	Méthane	Gazier : distribué (chauffage, énergie, chimie)
C ₂	Gaz	Ethane	Gazier : distribué (chauffage, énergie, chimie)
C ₃	Gaz	Propane	GPL
C ₄	Gaz	Butane	GPL
C ₅ - C ₇	Oui	Naphtas	Pétrochimie
C ₅ - C ₁₀ (*)	Liquide	Essence	Carbonate, chauffage
C ₉ - C ₂₀	Liquide	Kérosène gasoil	Carbonate, chauffage
C ₁₂ - C ₂₆ (*)	Liquide	Huiles	lubrifiants
C ₁₄ - C ₂₆	Non	Gasoils lourds	Chauffage, production électrique moteurs industriels
C ₂₀ - C ₄₀ (**)	Non	Goudron	Revêtement routiers et couverture, étanchéité protection

(*) : (Présence d'aromatique) - (**): (Présence de HAP).

1.1.2 Propriétés physicochimiques

La connaissance des propriétés physico-chimiques du polluant est indispensable pour évaluer l'impact potentiel des composés dans l'environnement. Elles nous permettent de mieux prévoir leur répartition, ainsi que leur comportement dans les différents compartiments de l'environnement [7, 8]. Les principales propriétés visées pour les hydrocarbures sont : la solubilité dans l'eau, la densité, la stabilité, la polarité/hydrophobicité, la volatilité et la viscosité.

1.1.2.1 La solubilité

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est variable mais jamais élevée. On note des valeurs de 3 à 30 mg.L⁻¹ (C₅-C₇), qui chutent (0,07 mg.L⁻¹ sur C₉, jusqu'à 0,007 mg.L⁻¹ sur C₁₂) [6]. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est importants de noter que ces hydrocarbures solubles sont

parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore [9].

1.1.2.2 La densité

La densité des hydrocarbures varie avec la longueur des chaînes carbonées. Les hydrocarbures légers (C_5 à C_{26}) sont moins denses que l'eau, ce qui leur permet de flotter sur la surface de l'eau. Au contraire, les fiouls lourds et les goudrons ont une densité supérieure à l'eau [6].

1.1.2.3 La stabilité

La stabilité des hydrocarbures est assez élevée, leur dégradation dans l'environnement, sous l'effet de la lumière et des bactéries est étant lente.

1.1.2.4 La polarité

La polarité est directement reliée au coefficient de partage n-octanol/eau (K_{ow}) qui est le rapport de concentration à l'équilibre d'un composé entre une phase eau et une phase n-octanol. Cet indice reflète l'affinité d'un polluant pour la matière organique, il influe sur sa biodisponibilité et son pouvoir de bioaccumulation. Un composé est dit apolaire si $\log K_{ow} > 4$. Les hydrocarbures aliphatiques sont généralement peu polaire ($\log K_{ow}$ de l'ordre de 3,5 à 5).

1.1.2.5 La volatilité

La volatilité d'un composé organique est définie par sa tension de vapeur à 20 °C. Il existe une relation entre la tension de vapeur et le point d'ébullition d'un composé organique : plus sa tension de vapeur est faible, plus son point d'ébullition est élevé. Pour des raisons pratiques, la classification de la volatilité s'exprime sur la base des points d'ébullition des composés à une pression de 1010 hPa. La plupart des hydrocarbures légers (C_5 à C_{12}) sont volatils (point d'ébullition de 40 à 200 °C), les plus lourds (C_{12} à C_{26}) sont volatils ou semi volatils (point d'ébullition de 200 à 300 °C). Il faut noter que les molécules ramifiées sont plus volatiles que les linéaires [10].

1.1.2.6 La viscosité

La viscosité influe sur la vitesse de déplacement d'un contaminant : plus la viscosité est élevée, plus le déplacement sera lent. Les hydrocarbures légers (C_5 à C_{10}) ont une viscosité inférieure à 1 (0,2 à 0,9), les plus lourds (C_{12} à C_{26}) ont viscosité qui croit avec la masse (de 1 à 6) [6].

1.1.3 Toxicité des hydrocarbures

La toxicité des hydrocarbures pétroliers dépend de leur solubilité et biodisponibilité, on suppose que la fraction soluble dans l'eau est la plus nocive pour l'environnement car elle est directement disponible pour l'absorption par les organismes.

La toxicité des hydrocarbures varie d'une famille à une autre, ainsi qu'au sein de la même famille la toxicité varie d'un composé à un autre [11]. Les hydrocarbures aliphatiques sont moins toxiques par rapport aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Cependant, l'inhalation de n-alcanes de C₅ à C₈ est susceptible de provoquer une dépression du système nerveux central et une exposition au n-hexane et cyclohexane peut provoquer une perte de myéline ou une dégénérescence des axones. Les alcanes liquides (C₅ - C₁₆) sont des solvants de graisses [12]. Le contact cutané répété ou prolongé entraîne une irritation. Les cycloparaffines peuvent produire des effets toxiques par inhalation et ingestion, et ils ont une action irritante et dégraissante sur la peau. Généralement, les cycloparaffines sont des anesthésiques et des dépresseurs du système nerveux central, mais leur toxicité aiguë est faible et, du fait qu'ils sont presque complètement éliminés de l'organisme, le risque d'intoxication chronique est relativement peu important[12].

1.2 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

1.2.1 Milieu marin

Lorsqu'un produit pétrolier est déversé en mer, il est subit un grand nombre de modifications pouvant être classées en deux phases [13].

1.2.1.1 Evolution primaire

➤ **Étalement :**

L'étalement d'une nappe de pétrole est soumise, en effet, aux effets conjugués des conditions météorologiques et océanographiques, des caractéristiques du pétrole et du phénomène simultané d'évaporation des fractions légères[13].

➤ **Evaporation :**

Dans l'atmosphère des hydrocarbures volatils considérés comme les plus toxiques. Cette évaporation peut concerner quelques pour-cent des hydrocarbures en 24h et jusqu'à 50% en quelques semaines. Elle peut être totale pour les essences légères [14].

➤ **Solubilisation :**

Des hydrocarbures les plus solubles dans la masse d'eau : ce phénomène est d'une amplitude moindre que l'évaporation mais n'est pas négligeable [14].

➤ **Emulsification :**

Une partie des pétroles bruts et des carburants ont tendance à absorber des gouttelettes d'eau pour former une émulsion eau dans huile. Lorsqu'elle est stable. Cette émulsion se caractérise par une couleur variant entre le brun-rouge et l'orange souvent appelée « mousse au chocolat » en raison de sa consistance. La stabilité d'une émulsion dépend largement de la teneur de l'hydrocarbure en asphaltène : il faut au moins 0,5 % de cette substance pour que la nappe soit stable [15].

➤ **Sédimentation :**

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène a un impact très important sur la vie marine. Il détermine en fait la rémanence du pétrole dans les différents biotopes. La sédimentation pourrait concerner entre 10 à 40% du pétrole déversé [14].

➤ **Dispersion :**

Par l'action des vagues et de la turbulence, la nappe se décompose en fragments et en gouttelettes. Les fines restent en suspension alors que les plus grandes ont tendance à monter à la surface de l'eau reformant une nappe d'épaisseur très mince. A ce stade, la nappe a une surface plus grande qu'avant la dispersion, ce qui favorise d'autres processus naturels tels que la dissolution et la biodégradation. La vitesse de dispersion dépend, dans une large mesure, de la nature de pétrole déversé et de l'état de la mer [12].

1.2.1.2 Evolution secondaire

➤ **Photo-oxydation :**

L'exposition aux ultraviolets de la lumière solaire provoque l'oxydation des composés les plus polaires du pétrole. Cet effet accroît légèrement la solubilité dans l'eau et favorise la formation d'émulsion eau-dans-huile [16].

➤ **Biodégradation :**

L'eau de mer contient de nombreux micro-organismes qui peuvent utiliser les hydrocarbures comme source d'énergie. En cas de déversement d'hydrocarbures, la concentration locale de ces micro-organismes augmente rapidement. Les éléments les plus facilement biodégradables sont les alcanes normaux (paraffiniques). La biodégradation peut être lente, elle est limitée par divers facteurs tels que la température, l'oxygène disponible et la présence d'autres sources de nutriments tels que l'azote et le phosphates [16].

1.2.2 Sols

Le devenir des hydrocarbures dans les sols dépend d'un ensemble de processus responsables de la volatilisation, de l'immobilisation, de la mise en solution, du transport et des transformations chimiques et biochimiques des molécules. Ainsi, la mobilité des hydrocarbures dans les sols fait intervenir les phénomènes suivants : la solubilisation, la percolation, l'adsorption et la volatilisation. La **Figure 1.2** résume les différents mécanismes intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol [12].

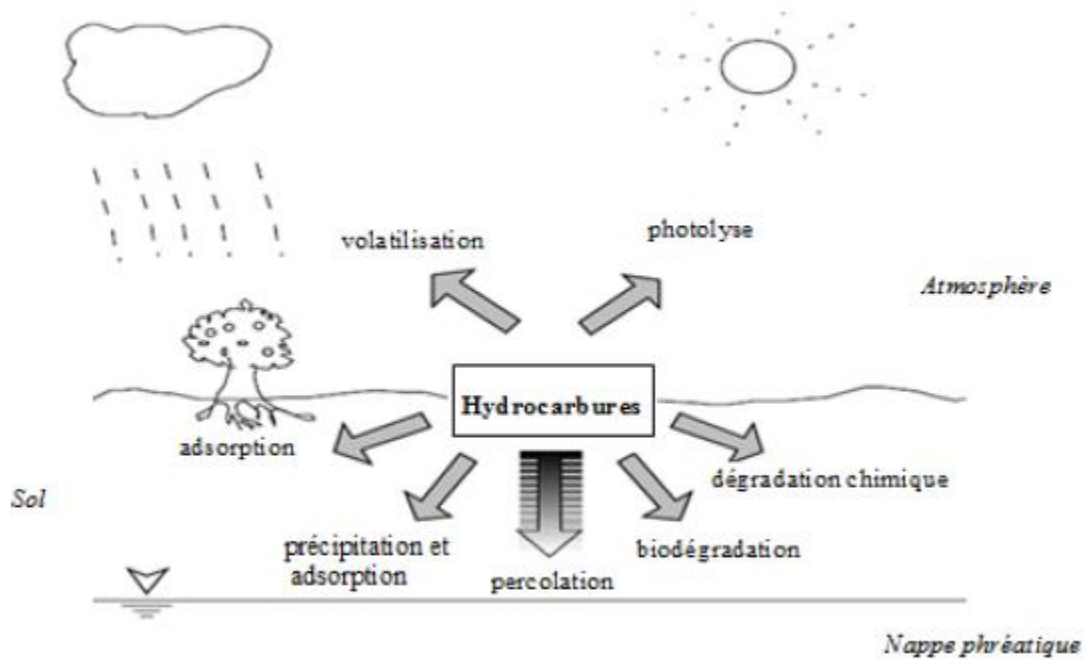


Figure 1.2 : Différents processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures dans le sol [17].

Le degré de pénétration des hydrocarbures est fonction de la nature et de la structure du sol, comme de la quantité et de la nature du produit déversé. Un produit de faible viscosité pénètre rapidement dans un sol sec et poreux et s'étale donc peu à la surface. Inversement, sur un sol saturé d'eau de type argileux, le produit s'étale largement d'autant plus que sa viscosité est relativement élevée.

Les déversements de pétrole dans l'environnement terrestre se caractérisent essentiellement par un mouvement vertical du pétrole dans le sol, L'infiltration empêche les pertes par évaporation des hydrocarbures volatils pouvant être toxiques pour les microorganismes. Les matières particulaires peuvent réduire, par l'adsorption, la toxicité des produits pétroliers. Cependant, l'absorption et l'adsorption des hydrocarbures par des substances humiques conduisent probablement à la formation des résidus persistants [12].

1.3 Les biosurfactants

1.3.1 Définition

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes des levures, bactéries et champignons de structures différentes. Il s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface. Les biosurfactants sont constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire **Figure 1.3** [18]. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [18].

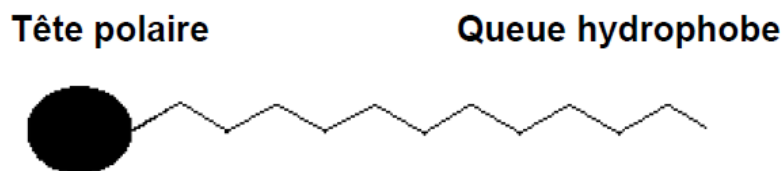


Figure 1.3: Représentation d'une molécule de biosurfactant.

1.3.2 Classification

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, nonionique et amphotères), les biosurfactants sont éventuellement classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

De point de vue structure, on distingue cinq types de biosurfactants qui sont les suivants :

1.3.2.1 Glycolipides :

Les glycolipides représentent le groupe le plus important et le plus étudié parmi les biosurfactants produits. 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 [19].

1.3.2.2 Lipopeptides et lipoprotéines

C'est une association de peptides liés à différentes chaînes d'acides gras [20, 21]. Les biosurfactants de nature lipopéptidique sont divisés en quatre familles: les surfactines, les iturines, les fengycines et les plipastatines et les lichénysines. Les surfactines sont la famille la plus importante dans cette classe. Ce sont des lipopeptides cycliques produites par *Bacillus Subtilis* avec une puissante activité de surface.

1.3.2.3 Phospholipides et Acides gras

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphore et de chaîne lipidique. Ils sont classés en deux groupes : glycérophospholipides et glycérophospholipides. Tandis que les biosurfactants d'acides gras sont composés de chaînes hydrocarbonées d'acides gras saturés entre C₁₂ et C₁₄ et acides gras complexes qui contiennent des groupements hydroxyles et des alkyles ramifiées [22].

1.3.2.4 Les biosurfactants polymères

Les biosurfactants polymériques sont des hétéro-polysaccharides poly-anioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevé. À titre d'exemples : Emulsan, Biodispersan, Alasan, Liposan et Manno-protéine. L'emulsan est le biopolymère le plus étudié [23].

1.3.2.5 Les biosurfactants particuliers

Quelques exemples de biosurfactants particuliers sont les vésicules membranaires extracellulaires des cellules microbiennes. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures par formation de microémulsions [20].

1.3.3 Microorganismes producteurs de biosurfactant

Une variété des microorganismes notamment les bactéries, sont capables de produire des biosurfactants de diverse composition chimique. Leur nature et la quantité produite dépendent du type de microorganisme.

Les biosurfactants les plus étudiés sont les glycolipides et les lipopeptides. Toutefois, c'est la classe des biosurfactants glycolipidiques qui a visé une attention toute particulière dans le secteur industriel aux dernières années [21].

Tableau 1.2 : Classification des biosurfactants et microorganismes producteurs [24].

Biosurfactants		Microorganismes
Glycolipides	Rhamnolipids	<i>Nocardioides</i> sp. (Vasileva-Tonkova and Geshevaa, 2005)
	Sophorolipids	<i>Candida</i> sp. (Hirata et al., 2009)
	Trehalose lipids	<i>Rhodococcus</i> sp. (Lang and Philip, 1998)
Lipopeptides et lipoprotéines	Fengycin	<i>Bacillus</i> sp. (Vanittanakom et al., 1986)
	Arthrofactin	<i>Arthrobacter</i> sp. (Morikawa et al., 1993)
Phospholipides et Acides gras	Sels de bile	<i>Myroides</i> sp. (Maneerat et al., 2005)
	Acides gras	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. (Rehm and Reiff, 1981)
	phosphatidylethanolamine	<i>Rhodococcus</i> sp. (Kretschmer et al., 1982)
Les biosurfactants polymères	Alasan	<i>Acinetobacter</i> sp. (Navon-Venezia et al. 1995)
	bioemulsan BS29	<i>Gordonia</i> sp. (Franzetta et al., 2009)
Les biosurfactants particuliers	cellules entières	<i>Yarrowia</i> sp. (Zinjarde and Pant, 2002)
	Vésicules	<i>Serratia</i> sp. (Matsuyama et al., 1986)

1.3.4 Récupération de biosurfactant

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules).

En séparant des biosurfactants du milieu dans lequel ils sont produit, le chercheur est chanceux que les agents tensio-actifs aient en général des propriétés physico-chimiques uniques qui les distinguent de la rangée d'autres molécules qui pourraient être trouvées en solution, parmi ces propriétés est leur amphipathique (quelques secteurs de la molécule sont hydrophobes, alors que d'autres sont hydrophiles) [25].

Si le pH et la concentration ionique conviennent, les molécules tensio-actives se déplaceront aux interfaces de phase où une phase est plus hydrophobe que l'autre. Cette propriété de séparation de phase forme la base sur laquelle plusieurs des méthodes sont fondés [25].

Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants comme le chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant.

1.3.5 Propriétés de biosurfactant

Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes de température, de pH et de la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques, ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes.

1.3.5.1 Activité à l'interface (et à la surface)

L'efficacité d'un biosurfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension de surface, un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS) de l'eau de 72 à 35 mN.m⁻¹ et la tension interfaciale (TI) eau/hexadécane de 40 à 1 mN.m⁻¹. Le biosurfactant produit par *B. subtilis*, diminue la TS de l'eau jusqu'à 25 mN.m⁻¹ et la TI (eau/hexadécane) atteindra une valeur de 1 mN.m⁻¹. Ainsi, le biosurfactant rhamnolipide de *P. aeruginosa* réduit la TS et les TI à 26 mN.m⁻¹ et au-dessous de 1 mN.m⁻¹ respectivement [12].

1.3.5.2 Concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [26]. Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des

micelles. En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau **Figure 1.4** [19].

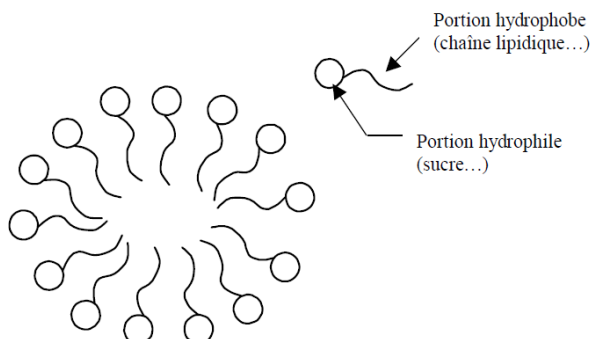


Figure 1.4: Représentation schématique d'une micelle de surfactant.

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN.m^{-1} en solution aqueuse). Pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques, leur efficacité est donc meilleure. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 mg.L^{-1} [1].

1.3.5.3 Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables et particulièrement adaptés pour les applications environnementales telles que la bioremédiation des sites contaminés.

1.3.5.4 Toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux [19].

Il est à noter que la toxicité dépend de la structure des surfactants et non pas de leur origine. En général, la toxicité est corrélée avec la chaîne grasse hydrophobe de surfactant ; plus la chaîne grasse est longue, plus l'hydrophobicité est élevée et par suite le tensioactif est plus toxique [12].

Le **Tableau 1.3** donne un aperçu sur la toxicité des biosurfactants par rapport aux surfactants chimiques.

Tableau 1.3: Toxicité des biosurfactants comparée à celle des surfactants chimiques [27].

Origines	Surfactants	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
Biologique	Glycolipide de <i>Rhodococcus ruber</i> AC 235	650
	Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>	49
	Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	286
Chimique	Finasol OSR-5	7
	Corexit 9597	5
	Inipol EAP 22	0,004

CE₅₀ : La concentration efficace pour laquelle les effets sont observés pour 50 % des individus testés.

1.3.6 Domaine d'applications des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes, c'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique [1].

Tableau 1.4 : Utilisations potentielles des biosurfactants [28].

Fonction	Application
Emulsifiant et dispersant. Solubilisant et microémulsions. Agent mouillant et pénétrant. Détergent.	Cosmétiques, peintures. Pharmaceutique, articles de toilette. Pharmaceutique, industrie textile, peinture. Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie.
Agent moussant.	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais.
Agent épaississant. Agent séquestrant des métaux. Aide à la croissance bactérienne.	Peintures. Minerais. Traitement d'huiles usagées pour boues de STEP, fermentation.
Dé-émulsifiant. Agent réducteur de viscosité. Dispersant.	Traitement de déchets. Transport par pipeline. Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau.
Récupération de ressources.	Récupération assistée de pétrole.

1.3.7 Remédiation des hydrocarbures par l'utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants ont plusieurs avantages par rapport aux agents tensio-actifs chimiques, tels que leur faible toxicité, leur biodégradabilité, une meilleure compatibilité environnementale, leur sélectivité élevée et leur activité spécifique aux températures extrêmes, pH et salinité, et la capacité d'être synthétisé de la matière de base renouvelable, c'est pour ces raisons que l'application environnementale des biosurfactant est devenue plus intéressante.

1.3.7.1 Cas des sols

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

L'utilisation des biosurfactants dans la dégradation des hydrocarbures a donné des résultats variables. Dans le travail de **Lindley et Heydemann (1986) 29**], l'extrait

extracellulaire des acides gras et des phospholipides (principalement l'acide dodécanoïque et de la phosphatidylcholine) a amélioré le taux de dégradation des alcanes de 30%. Cet extrait produit par une souche fongique de *Cladosporium resinae*.

Berg et al. (1990) [30], ont utilisé un biosurfactant (nommé UG2), produit par *Pseudomonas aeruginosa*, pour la remobilisation des hydrocarbures. De plus, ce biosurfactant a été utilisé dans la solubilisation de l'hexachlorobiphényle (un pesticide). Ce qui a entraîné une remobilisation de 31% de composé dans la phase aqueuse, ce biosurfactant était environ 3 fois plus efficace par rapport au ligninesulfonate de sodium (surfactant chimique)[19, 29].

1.3.7.2 Milieux aquatiques

Le déversement d'huile dans la mer est un problème majeur, cela peut détruire des littoraux. La flaque d'*Amoco Cadis* du Côté de la Bretagne (France) en 1978 et la flaque d'*Exxon Valdez* près de *Prince William Sound* (États-Unis d'Amérique) en 1989 sont des exemples significatifs de contamination littorale.

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

Egalement, les microorganismes telluriques qui produisent les biosurfactants peuvent être utiles dans le milieu aquatique. **Reddy et al. (2009) [31]** ont signalé qu'une amélioration de la solubilisation spécifique des hydrocarbures pendant la croissance d'un procaryote donne un bon rendement de biodégradation. Il a été conclu que la solubilisation des hydrocarbures est un mécanisme important dans la biodégradation microbienne de ce dernier.

Les biosurfactants peuvent être utile pour des flaques d'huile puisqu'ils pourraient être moins toxiques et persistant que les agents tensio-actifs synthétiques. **Chakrabarty (1985) [32]** ont prouvé qu'un émulsifiant produit par *Pseudomonas aeruginosa* SB30 a pu disperser l'huile dans l'amende gouttelettes ce qui pourraient augmenter la biodégradation. **Shafeeq et al. (1989) [33]** ont prouvé que des biosurfactants ont été produits pendant la

biodégradation d'un mélange d'hydrocarbure par le *Pseudomonas aeruginosa* S8. **Chhatre et al. (1996) [34]** ont trouvé que quatre isolats bactériens du pétrole brut pouvaient dégrader 70% de celui-ci. Un de ces isolats ont produit un rhamnolipide biosurfactant ce qui a améliorée la biodégradation du pétrole par le phénomène d'émulsification [19, 35].

2. MATERIELS ET METHODES

Le présente travail est scindé en trois grandes partie, il s’agissait en premier lieu de produire le biosurfactant HFSdK644, l’extraire et le purifié partiellement. Le produit ainsi obtenu est passé par une étape d’identification afin d’en savoir sur la nature de sa structure et ses propriétés selon les moyens disponibles. Le dernier volet (qui est le cœur de travail) est réservé à l’application du biosurfactant dans l’environnement, précisément ; la remobilisation ou la lixiviation des hydrocarbures dans le sol par l’ajout de notre biosurfactant (*soil washing test*) et la solubilisation du pétrole dans l’eau de mer par le biosurfactant pour augmenter sa biodisponibilité (*Biosurfactant-enhanced oil bioremediation*). Pour chaque partie traitée, nous décrivons le protocole suivi et ses détails correspondants.

Tout d’abord, le **Tableau 2.1** récapitule les appareillages utilisés et leurs objectifs.

Tableau 2.1: Appareillages utilisés et leurs objectifs.

Type	Objectif
Shaker Wise Cube (<i>Fuzzy Control System</i>) Incubateur (<i>memmert</i>) Autoclave (<i>AESULAP</i>) Centrifugeuse (<i>SIGMA 2-6E</i>) Rotavap (<i>LABOROTA 4001</i>) Lyophilisateur Multi paramètre (pH conductivité TDS <i>CRISON MM40</i>) Diffractomètre (<i>PANalytical: XPERT-PRO</i>)	Production, extraction et purification du biosurfactant. Caractérisation du sol contaminé par les hydrocarbures
Tensiomètre (<i>KRUSS</i>) IRFT (<i>Bruker-TENSOR 27</i>)	Détermination de la concentration micellaire critique (CMC), Caractérisation structurelle préliminaire du biosurfactant
CG/MS (<i>QP5050A SHIMADZU</i>)	Quantification des n-alcanes solubilisés par le biosurfactant dans le sol et l’eau de mer.

2.1 Production de biosurfactant

2.1.1 Origine de la souche bactérienne Sdk644

L'isolement, la purification et la sélection de la souche Sdk644 a été réalisée antérieurement (Zenati, *Travaux de thèse de doctorat non encore soutenus*). Le site d'isolement est représenté par un port de pêche fortement contaminé par des produits pétroliers. La matrice prélevée est le sédiment. L'isolement a permis d'obtenir une dizaine de souches bactériennes, qui sont par la suite criblées dans leur pouvoir à produire de biosurfactants. La souche bactérienne Sdk644 était la meilleure dans la collection.



Figure 2.1: Photos montrant l'échantillonnage d'un sédiment marin pollué par les hydrocarbures.

2.1.2 Conditions de culture

La production de biosurfactant de la souche Sdk644 a été réalisée après l'optimisation des principaux facteurs pouvant influencer la production.

Les conditions de culture se résument comme suit :

La source de carbone est l'huile de friture, la source d'azote est le NH_4Cl , un rapport C/N de 50 (g huile friture/ g NH_4Cl), un pH du milieu de 5, une salinité de 23 g NaCl/L et un temps de culture de 3 jours [21].

2.1.3 Milieu de production

Le milieu de production est un milieu minimum (MM) dont la composition est la suivante : (g.L⁻¹ d'eau distillée) : 23 NaCl ; 0,4 NH₄Cl ; 0,3 KH₂PO₄ ; 0,3 K₂HPO₄ ; 0,33 MgCl₂ ; 0,05 CaCl₂ ; 0,1 extrait de levure et 1 ml des éléments traces métalliques (composition en annexe). Le milieu est distribué dans un erlenmeyer de 5 litres avec un volume opérationnel de 2 litres et stérilisé à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 min. Le MM est inoculé à raison de 2 % par une préculture d'une nuit de la souche SdK644 cultivée dans milieu Luria Bertani (LB) modifié (composition en annexe).

2.1.4 Extraction et purification partielle du biosurfactant

Après que nous atteindrons le temps optimal où l'activité de biosurfactant est maximale dans le surnageant (cela est vérifié par le test de déplacement de pétrole selon le protocole cité par **Benali (2015) [21]**), le surnageant est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de rotation 3900 tr/min pendant 30 minutes suivie par une filtration sur papier filtre ordinaire. Le filtrat correspond au biosurfactant brut est extrait deux fois (v/v) par l'acétate d'éthyle. La phase organique est desséchée par le Na₂SO₄ qui absorbe toutes traces d'humidité. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un rotavapeur à une température de 40 °C.

Le produit ainsi obtenu (liquide visqueux d'une couleur jaune ressemblant à l'aspect du miel) est purifié partiellement par lyophilisation. L'opération consiste à congeler le biosurfactant à une température d'environ - 20 °C pendant 2 jours puis le lyophiliser à une pression de 0,0012 mbar et une température de -59 °C.

2.2 Caractérisation du biosurfactant

2.2.1 Concentration micellaire critique

La concentration micellaire critique (CMC) est un paramètre important lors de l'évaluation de l'activité des biosurfactants. La CMC est déterminée par la variation de la concentration de biosurfactant (mg.L⁻¹) en fonction de la tension de surface (mN.m⁻¹). La plus faible valeur de la tension de surface au-delà, aucun effet n'est observé sur l'activité de surface à la CMC.

A partir d'une solution mère de biosurfactant ($6,3 \text{ g.L}^{-1}$), différentes concentrations ont été préparées par dilution variant de $3,15$ à 6300 mg.L^{-1} . La concentration micellaire critique (CMC) a été déterminée par la mesure de la tension de surface des solutions de biosurfactant. L'augmentation de la concentration de biosurfactant entraîne une diminution de la tension de surface jusqu'à une concentration appelée concentration micellaire critique (CMC), au-delà de laquelle la tension de surface demeure constante **Benali (2015) [21]**.

2.2.2 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF

Le biosurfactant partiellement purifié a été analysé à l'aide d'un spectrophotomètre Infrarouge à Transmission 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.

2.3 Remédiation des hydrocarbures par l'utilisation de biosurfactant

2.3.1 Remobilisation d'un sol contaminé par les hydrocarbures

L'échantillonnage a été effectué en mai d'avril 2015. Pour cela, 500 g de chaque échantillon a été prélevé, introduit dans récipient stérile et conservé au réfrigérateur ($+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Le borbier sélectionné est relatif à un Centre de Traitement des Huiles CTH (Hassi R'mel) **Figure 2.2**.



Figure 2.2: Photos montrant d'échantillonnage du sol contaminé par les hydrocarbures du CTH (région Hassi R'mel).

Tableau 2.2: Présentation de l'échantillon du sol (SCTH).

Echantillon	CTH
Température de l'air	22 °C
Profondeur	0-20 cm
Aspect	Sable fortement contaminé

2.3.1.1 Analyses physico-chimiques et microbiologiques d'échantillon de sol contaminé

Plusieurs paramètres physico-chimiques caractérisant le sol contaminé ont été déterminés : Les hydrocarbures totaux, la minéralogie, la granulométrie, Conductivité, Salinité et le pH.

L'échantillon du sol est séché à l'air (ou à l'étuve à 40 °C) avant l'analyse.

- **Analyse minéralogique**

Les échantillons solides finement broyés, sont montés sur des portes échantillons adéquats, puis soumis à un faisceau des rayons X pour être diffractés par les plans réticulaires des phases cristallines présentes ; En effet, il existe une relation entre l'angle du faisceau diffracté et la distance réticulaire séparant les plans d'atomes au sein d'un réseau cristallin ; Celle-ci est régie par :

La loi de Bragg $n\lambda = 2d\sin\theta$ (où λ =longueur d'onde en angströms, d = distance réticulaire en angströms, θ = angle de diffraction ou de réflexion en degrés et n = ordre de diffraction).

Les diffractogrammes ainsi obtenus, à l'aide d'un diffractomètre à rayons X, sont interprétés. Les positions et les intensités des pics observés sont comparés aux fichiers de référence PDF-ICDD (Powder Diffraction File - International Center for Diffraction Data) pour l'identification des phases minéralogiques présentes. Eventuellement l'utilisation de RIR (Reference Intensity Ratio) inclus dans le logiciel HighScore Plus du fichier PDF-ICDD permet l'estimation semi quantitative des phases correspondantes détectées quand celle-ci est requise et/ou possible.

Conditions d'analyses

L'analyse de la roche totale (minéraux non argileux) et de la fraction fine (argiles) :
Diffractomètre PANalytical: XPERT-PRO, tube radiogène céramique à anticathode de cuivre, puissance du générateur à RX: 40 mA, 45 kV

Logiciel pour l'acquisition des données: DataCollector de PANalytical

Logiciel pour traitement des données: HighScore Plus de PANalytical

Longueur d'onde CuK α [Å]: 1,5418

Angle de départ [$^{\circ}$ 2Th.]: 2,0000

Angle final [$^{\circ}$ 2Th.]: 70,0000

Taille du pas [$^{\circ}$ 2Th.]: 0,0167

Temps du pas [s]: 85.725

Vitesse de balayage [$^{\circ}$ /s] : 0.024757.

- **Granulométrie**

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

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

Nous nous reportons aux recommandations de la norme française NF X 11.507 pour effectuer les analyses granulométriques dans les meilleures conditions à savoir :

- Tamiser le sol successivement sur les tamis et noter la masse retenue sur chaque tamis.
- Calculer, à partir de ces résultats, la masse du sol qui a traversé chaque tamis et l'exprimer en pourcentage.

- **Détermination de la salinité**

La détermination de la salinité d'un sol est basée sur le principe de l'extraction d'un électrolyte dont on mesure la concentration en éléments dissous par la mesure de la conductivité. La relation approximative entre les teneurs en sels et la conductivité est :
Conductivité en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ = 640 mg de sel/L.

La Conductivité électrique a été mesurée sur un extrait aqueux de sol (1/5 p/v) moyennant un conductimètre à électrode de type Consort C831. Elle est effectuée après une demi-heure d'agitation et 5 min de repos.

- **Mesure du pH**

Le pH a été mesuré sur une suspension de sol dans de l'eau distillée (1/2,5 p/v). La mesure a été effectuée après 2 h de stabilisation à température ambiante à l'aide d'un multi paramètre de type *CRISON MM40*.

2.3.1.2 Énumération de la flore mésophile aérobie totale du sol

Pour isoler et dénombrer la flore autochtone de sol, il fallut passer d'abord par une étape de mise en suspension pour extraire les microorganismes fixés dans le sol. La méthode adoptée pour l'isolement est la méthode de dilution et d'ensemencement en profondeur sur boîtes de pétri.

- ***Isolement***

10 g de sol est ajouté à 90 ml de TSE dans des conditions aseptiques. La suspension est ensuite agitée au vortex à vitesse maximale pendant 2 min. le surnageant obtenu constitue la solution mère qui sera diluée successivement dans des tubes contenant 9 ml de TSE et 1 ml de la solution mère ou du tube précédent ensemencé. Le nombre de dilution effectué est fonction de la charge bactérienne du sol. Dans notre cas, nous avons arrivé jusqu'à 10^{-4} .

- ***Dénombrement***

1 ml de chaque dilution (y compris de la solution mère) est étalée uniformément sur le fond des boîtes de pétri, en conditions stériles (devant un bec bunsen). Pour chaque dilution, deux replicats sont à effectuer. En parallèle, des flacons de gélose (PCA) est gelé au bain marie puis refroidi à une température d'environ 50 °C (lorsque nous pourrons les

toucher sans senti d'une forte chaleur). Le gélosé PCA est versée alors sur les boites ensemencées.

Après 48 h d'incubation à une température de 37 °C, les colonies formées sont dénombrées par le biais d'un compteur numérique.

2.3.1.3 Dosage des hydrocarbures

Le séchage de sol c'est fait à l'étuve à une température de 50 °C pendant 3 jours. La méthode d'extraction des hydrocarbures contenus dans le sol est la suivante.

- **Extraction par ultrasons**

L'outil utilisé pour effectuer l'extraction, dont les étapes citées ci-dessous, est un ultrason de modèle Elmasonic X-tra 30H.

Peser précisément 5 g de sol séché et le transférer dans un flacon en verre, ajouter alors 50 ml de dichlorométhane et mettre le flacon dans un bain d'eau distillée contenue dans la cuve de l'ultrason, l'ultrason est réglé de telle manière à obtenir une durée d'agitation de 30 minutes. Le contenu du flacon est ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre ordinaire. Le filtrat récupéré est déshydraté par le Na₂SO₄ puis transféré dans une fiole jaugée de 50 ml et complété au trait de jauge avec le dichlorométhane.

Mettre à la fin l'extrait dans un flacon en verre brun et le conservé à une température de + 4 °C.

- **Mesure gravimétrique des hydrocarbures totaux (TPH)**

L'extrait d'hydrocarbures solubilisés dans le dichlorométhane est transféré dans des flacons en verre brun tarés. Le solvant est ensuite évaporé totalement à l'aide du rotavapeur et la masse des hydrocarbures totaux résultante est pesée par la suite. La quantité trouvée est rapportée à la masse du sol extraite par le dichlorométhane. La concentration des hydrocarbures totaux est exprimée en mg.Kg⁻¹ de sol sec.

- **Analyse par CG-SM**

Principe

Le principe de spectrométrie de masse est le suivant : Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique. L'ion

ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques, puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

Appareillage

- Chromatographe (phase gazeuse) : QP5050 SHIMADZU
- Colonne capillaire : type (L= 30 m, DI= 0,25 mm, e= 0,25 μm)
- Ordinateur : Marque *hp* (Windows Xp 2007)

Conditions opératoires

Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml.min⁻¹. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de 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 1/50, le volume injecté est 1 μl .

2.3.1.4 Test de remobilisation

L'objectif dans cette application est de mettre en évidence le rôle de biosurfactant dans la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. En effet, 10 g de sol, contaminé par le pétrole brut préalablement stérilisé par autoclavage, ont été ajoutés à une solution de biosurfactant de volume de 100 ml à la CMC (787 mg.L⁻¹). Par suite, le mélange a été mis sous agitation de 200 tr/min à une température de 30 °C pendant 24 h, le surnageant contenant les hydrocarbures a été récupéré par centrifugation puis par filtration.

Les hydrocarbures ont été ensuite extraits deux fois par le dichlorométhane, puis l'extrait a été évaporé à sec au rotavapeur et réajusté à 1 ml avec le même solvant.

L'analyse des hydrocarbures est réalisée par méthode gravimétrique et par CG/SM. Le Tween 80 (surfactant chimique) à sa CMC (15 mg.L⁻¹) a été utilisé comme témoin positif tandis que l'eau distillée a été utilisée comme témoins négatifs.

Dans la méthode gravimétrique, le pourcentage des hydrocarbures mobilisés du sol est exprimé par la formule :

$$TPH_{mobilisés} (\%) = 100 - TPH_{résiduels} (\%)$$

$$\text{Avec : } TPH_{résiduels} (\%) = (TPH_{initial\ sol} - TPH_{traitement}) / TPH_{initial}$$

$$\text{Et : } TPH_{traitement} (mg/kg) = \frac{TPH_{phase\ eau} (mg)}{masse\ du\ sol (kg)}$$

2.3.2 Solubilisation du pétrole dans l'eau de mer

L'essai de solubilisation est réalisé sur une eau de mer stérile. Une solution concentrée de biosurfactant HF644 est ajoutée à l'eau de mer de telle sorte à avoir la CMC dans 50 ml du milieu. Du pétrole stérile est ensuite ajouté à raison de 1 % (v/v). De la même manière, le Tween 80 est préparé à sa CMC dans 50 ml d'eau de mer, servant de témoin positif. Ainsi, un témoin négatif d'eau de mer et du pétrole est préparé parallèlement. L'essai est déroulé à une température de 30 °C, sous une agitation de 200 tr/min et à l'abri de la lumière pendant 24 h.

L'échantillon est ensuite transférés dans une ampoule à décantées. Un volume de 30 ml est recueilli au bas de la colonne en prenant soins de ne pas prélevée la phase du pétrole. La phase aqueuse récupérée (qui contient les hydrocarbures solubilisés) est extrait deux fois (v/v) par le dichlorométhane, desséchée sur Na₂SO₄ et subit les mêmes étapes de celui de l'échantillon du sol.

Le calcul du pourcentage des TPH solubilisés dans l'eau de mer se fait de manière citée auparavant :

$$TPH_{solubilisés} (\%) = 100 - TPH_{résiduels} (\%)$$

$$\text{Avec : } TPH_{résiduels} (\%) = (TPH_{initial\ pétrole} - TPH_{traitement}) / TPH_{initial\ pétrole}$$

TPH_{initial pétrole} (g) est la masse du pétrole (0,5 ml du pétrole dans 50 ml d'eau de mer) extrait par le dichlorométhane (v/v).

TPH_{traitements} (g) est la masse du pétrole solubilisée dans 30 ml d'eau de mer, extrait par le DCM (v/v) et reporté à 50 ml.

Un échantillon de pétrole dilué dans le dichlorométhane est analysé par CG-SM dans les mêmes conditions. Il permet d'identifier tous les n-alcanes extrait par le dichlorométhane.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Production de biosurfactant

3.1.1 Extraction et purification

Après trois jours d'incubation dans les conditions optimales, la synthèse du biosurfactant par la souche SdK644 achève son maximum. Le milieu prend alors une couleur blanche **Figure 3.1**.



Figure 3.1 : Photos montrant la production de biosurfactant par la souche Sdk644 dans le milieu minimum avec l'huile de friture comme source de carbone.

Un test de déplacement de pétrole le confirme, le surnageant de culture a permis d'expulser le pétrole jusqu'aux bords de la boîte de pétri par réduction des tensions interfaciales régnant entre l'eau distillée et celui-ci, comme l'indiquait sur la photo de la **Figure 3.2**.

À partir de ce moment, nous procédons à la récupération et la purification de l'agent tension actif HF644.

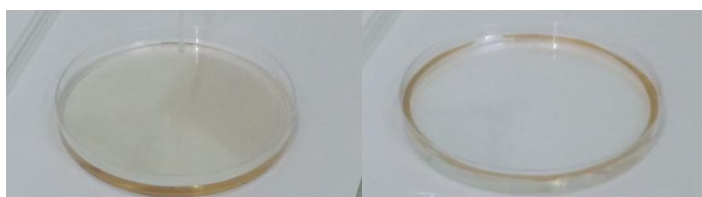


Figure 3.2: Photos montrant le test de déplacement de huile de biosurfactant HF644.

Après extraction et purification partielle du biosurfactant HF644 à l'aide de l'acétate d'éthyle, nous avons obtenu un liquide visqueux d'une couleur jaune similaire à l'aspect du miel. Le rendement total d'extraction (après la première et la deuxième extraction) est de $4,93 \text{ g.L}^{-1}$. Cela donne un rendement de conversion (par rapport à l'huile de friture) de $0,25 \text{ g HF644/g HF}$, donc un taux de conversion de 25 %.

Ce taux est relativement faible et cela est constaté lors de l'extraction du produit, où une couche huile reste flottée au-dessus du liquide. **Ferradji (2015) [19]** a trouvé un taux de conversion de $0,45 \text{ g.g}^{-1}$ en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone à raison de 1 % avec une souche de *Streptomyces* sp. AB1. **Haba et al. (2000) [36]** ont obtenu un taux de conversion similaire ($0,34 \text{ g.g}^{-1}$) avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 en utilisant la même source de carbone que la nôtre. **Farhat et al. (2011) [37]** ont trouvé un rendement de production de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ pour une souche *Brevibacterium* sp. 7G et $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ pour une souche *Ochrobactrum* sp. 1C en utilisant 2 % (v/v) de l'hexadécane comme source de carbone. **Edouaouda et al. (2012) [38]** ont trouvé un rendement de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source inductrice de carbone (1 % v/v) dans un milieu riche LB.

L'utilisation des substrats renouvelables et bon marché permet une réduction de coût de production allant jusqu'à 30 % [39]. L'huile de friture et d'autres huiles végétales usagées ont été employées dans la production des biosurfactants par différentes souches microbiennes. Les rendements obtenus varient d'une expérience à l'autre selon la souche microbienne productrice, la concentration de source de carbone, la composition et la richesse du milieu de production et les conditions de culture. **Wadekar et al. (2012) [40]** ont obtenu un rendement de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$ avec l'huile de friture à 5 % (m/v) en présence de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 cultivée dans un milieu minéral de base.

Haba et al. (2000) [36] ont abouti à un rendement de $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ d'un rhamnolipide synthétisé par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 47T2. **Zhu et al. (2007) [41]** ont trouvé un rendement de $12,47 \text{ g.L}^{-1}$ d'un rhamnolipide produit par une souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. Dans les mêmes conditions, le rendement de production a augmenté à 20 g.L^{-1} en utilisant un bioréacteur de 50 litres. **de Lima et al. (2009) [42]** ont obtenu un rendement de $3,3 \text{ g.L}^{-1}$ avec l'huile de friture de soja à une concentration de 22 g.L^{-1} et une souche de *Pseudomonas aeruginosa* PACL cultivé dans un bioréacteur de 10 litre. **De Gusmão et al. (2010) [43]** ont pu achever à un rendement de $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ avec une souche de levure *Candida glabrata* UCP1002 cultivée avec 5 % (m/v) de graisses végétales utilisées.

Le rendement de production obtenu avec notre souche bactérienne Sdk644 (4,93 g.L⁻¹) est très acceptable par rapport aux rendements obtenus cités dans la littérature. Une étude plus approfondie sur l'optimisation des conditions de production et le procédé d'extraction (choix d'autre solvant par exemple) pourrait donner des concentrations en biosurfactant plus grandes.

3.2 Caractérisation du biosurfactant

3.2.1 Concentration micellaire critique CMC

La valeur de la concentration micellaire critique dépend de plusieurs paramètres : la longueur de chaîne hydrocarbonée (partie hydrophobe), la nature de la tête hydrophile, la température, la salinité et le pH [12].

Afin de déterminer la concentration micellaire critique (CMC) de biosurfactant, différentes concentrations en biosurfactant (3,15 à 6300 g.L⁻¹) ont été préparées pour mesurer les tensions de surface correspondantes. Les résultats expérimentaux montrent que la tension de surface est inversement proportionnelle à la concentration de biosurfactant en dessous d'une valeur seuil de 787 mg.L⁻¹, au-delà, la tension de surface garde une valeur presque constante (31,6 mN.m⁻¹). L'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration de biosurfactant est illustrée dans la **Figure 3.3**.

La détermination de la CMC des (bio)surfactants est importante pour plusieurs applications, tels que la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures et l'amélioration de la biodégradation des environnements contaminés. En effet, les mécanismes d'action des (bio)-surfactants, mises en jeu sont étroitement lié à la valeur de la CMC (en dessous ou au-dessus de cette valeur).

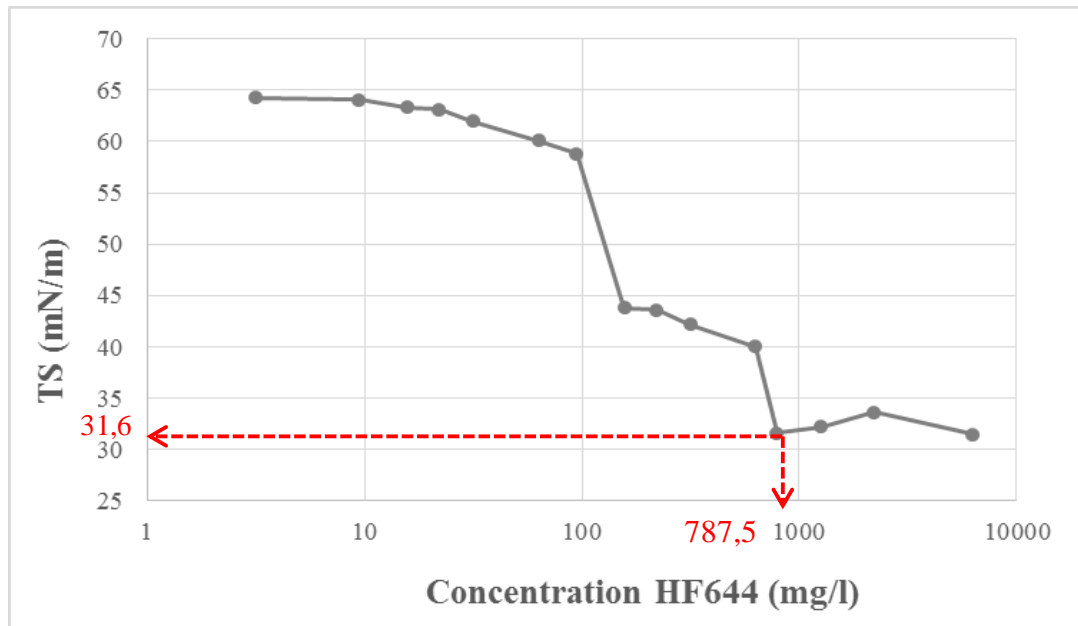


Figure 3.3 : Évolution de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant HF644 et détermination de sa CMC.

La valeur de la CMC du biosurfactant de la souche SdK644 est de 787,5 mg.L⁻¹. Cette valeur est relativement élevée par rapport aux valeurs de la CMC des biosurfactants, généralement comprises entre 1 et 200 mg.L⁻¹ [35]. Toutefois, cette valeur reste faible par rapport à certains surfactants chimiques comme le SDS, dont la CMC est comprise entre 2307,2 et 2595,6 mg.L⁻¹ [44] avec une tension de surface minimale de 35 mN.m⁻¹ [44, 45].

La CMC de notre produit est proche à celle de quelques biosurfactants comme celui synthétisé par une souche *Staphylococcus* sp. 1E, dont la valeur est de 750 mg.L⁻¹ [46].

Ferhat et al. (2011) [37] ont isolé deux souches productrices de biosurfactants, l'une *Ochrobactrium* sp. 1C produit un biosurfactant avec une CMC de 1500 mg.L⁻¹ et une TS minimale de 31 mN.m⁻¹ et une autre *Brevibacterium* sp. 7G qui produit un biosurfactant dont la CMC est de 2000 mg.L⁻¹ avec une TS correspondante de 32 mN.m⁻¹. **Gudina et al. (2010)** [47] ont isolé un biosurfactant synthétisé par une bactérie *Lactobacillus paracasei* avec une CMC de 2500 mg.L⁻¹ et une TS minimale de 41,8 mN.m⁻¹. Ces valeurs sont plus élevées par rapport à nos valeurs avec bien une TS minimale similaire voire moins.

En revanche, certains biosurfactants ont des valeurs de CMC très faibles, justifiant ainsi leur efficacité à des faibles concentrations. **Saimmai et al. (2013)** [48] ont pu produire un biosurfactant avec une CMC de 9 mg.L⁻¹ et une TS minimale de 26,5 mN.m⁻¹ synthétisée par une souche de *Leucobacter komagatae* 183. **Ghojavand et al. (2008)** [49]

ont produit un biosurfactant par une souche de *Bacillus subtilis* PTCC 1696 dans un milieu minéral avec le saccharose (10 g.L^{-1}) comme unique source de carbone. La CMC de ce biosurfactant a été déterminée après deux étapes de purification. La première étape constitue une précipitation acide suivie par lyophilisation du produit, Alors que la deuxième étape consiste à extraire le biosurfactant issu de la première étape avec le méthanol et l'évaporer par la suite. Le biosurfactant de la précipitation acide a donné une CMC de 100 mg.l^{-1} , tandis que le biosurfactant purifié par le méthanol, sa CMC a diminuée jusqu'à une valeur de 10 mg.L^{-1} . La purification des biosurfactants améliore donc significativement leur CMC.

3.2.2 Caractérisation structurale du biosurfactant par IRTF

La caractérisation structurale du biosurfactant par la spectroscopie d'absorption infrarouge nous permet de connaître la nature des différents groupements (fonctions) chimiques présents dans le biosurfactant de la souche SdK644 et donc de prédire la nature de sa structure. L'analyse des spectres d'absorption IRTF (enregistrés en transmittance) a permis d'identifier la totalité des bandes d'absorption présentes dans un spectre d'infrarouge de l'échantillon de biosurfactant comme le montre la **Figure 3.4**.

Le traitement du spectre et l'identification des pics caractéristiques a été facilité par l'emploi d'un logiciel universel (version gratuite) Specamp-v.1.4 qui pointe sur toute bande intéressante. L'interprétation de ces pics caractéristiques a été obtenue entre autre par la consultation de la base de données du logiciel Specamp-v.1.4 et d'une autre base numérique fournie par le lien [50].

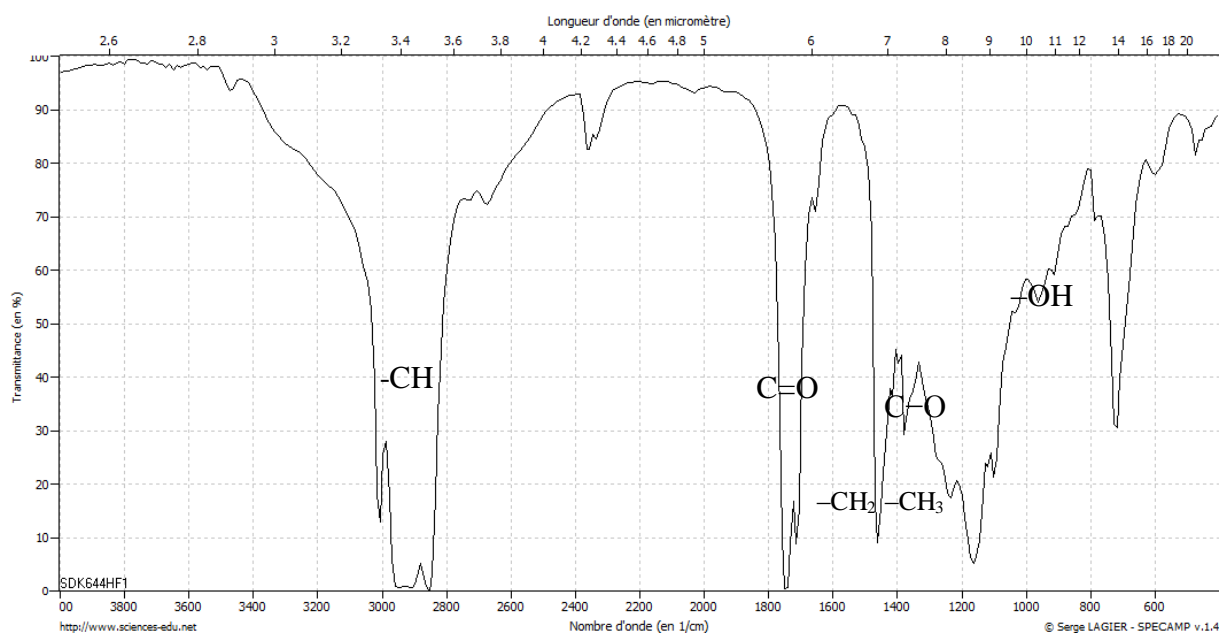


Figure 3.4: Spectre d'absorption (IRFT) de biosurfactant HFSdK644.

Le spectre du biosurfactant HF644 présenté sur cette figure affiche les bandes caractéristiques suivantes :

- Les bandes d'absorption situées à 2952, 2907, 2853 cm^{-1} de fortes intensités sont dues aux vibrations d'élongation des $-\text{CH}$ aliphatiques[51] généralement positionnés entre 2850 et 2980 cm^{-1} .
- Les deux pics à 1750 et 1714 cm^{-1} de fortes intensités sont des pics caractéristiques des groupements carbonyle $\text{C}=\text{O}$ des acides carboxyliques (1700 à 1760 cm^{-1}) [51].
- Les bandes apparues à 1461 cm^{-1} et 1380 cm^{-1} sont dues aux vibrations de déformation des liaisons $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ respectivement.
- 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 $\text{C}-\text{O}$ affirmant la présence intense des liaisons formées entre les atomes de carbone et les groupes hydroxyles dans les structures chimiques de la partie glycoside [51].
- Les pics affichés à 963 et 912 cm^{-1} sont affectés aux vibrations ($-\text{OH}$ dans les acides carboxyliques [52].
- Le pic apparu à 719 cm^{-1} est provoqué par le balancement de la liaison $-\text{CH}_2$ [50].

La nature des différentes bandes d'absorption, qui caractérise l'échantillon du biosurfactant HF644, (en particulier celles situées entre 1000 et 1300 cm^{-1}), montre que notre produit a une structure similaire des biosurfactants glycolipidiques.

3.3 Bioremédiation des hydrocarbures par l'utilisation du biosurfactant HF644

Les hydrocarbures pétroliers sont des composés organiques hydrophobes, dont la majorité est insoluble ou faiblement soluble dans la matrice eau et ont tendance à se partager dans la matrice sol. Le phénomène de partage peut concerner jusqu'à 90 – 95 % de leur masse totale. Par conséquent, les polluants hydrocarbonés persistent aux traitements physico-chimiques et leur accessibilité aux microorganismes devient limitée [53].

Ainsi, l'appel aux surfactants et biosurfactants facilitera leur récupération et améliore leur accessibilité pour le traitement éventuel in-situ ou ex-situ. Le domaine d'application des (bio) surfactants en remédiation des hydrocarbures concerne la mobilisation in-situ et le lavage ex-situ des sols en zones insaturées, le pompage et traitement des aquifères en zones saturée et l'amélioration de la biodégradation des environnements contaminés.

Dans ce travail, le biosurfactant HF644 synthétisé par la souche hydrocarbonoclaste marine SdK644 a été appelé dans le lavage d'un sol sableux contaminé par des hydrocarbures pétroliers et dans la solubilisation du pétrole brut dans l'eau de mer, comme étape facilitant leur accessibilité aux microorganismes. Dans les deux traitements, un surfactant chimique (le Tween 80) a été utilisé dans les mêmes conditions pour comparer son efficacité ainsi que l'eau distillée (ou l'eau de mer) comme témoin.

Le Tween 80 est un surfactant non ionique largement utilisé dans les technologies de remédiation [54, 55]. Les biosurfactants non ioniques sont d'ailleurs les moins toxiques. Le **Tableau 3.1** présente les propriétés de ce surfactant.

Tableau 3.1 : Propriétés physico-chimiques du surfactant Tween 80 adapté de **Luna et al. (2008)** et **Lai et al. (2009)**[42, 45].

Type	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	CMC (mg.L ⁻¹)	HLB et type d'émulsion	Tension de surface minimale (mN.m ⁻¹)
Bioémulsifiant	1309	13,09	15 Huile dans l'eau	43,7

3.3.1 Remobilisation des hydrocarbures du sol

3.3.1.1 Analyses physico-chimiques et microbiologique de l'échantillon de sol contaminé

- **Granulométrie**

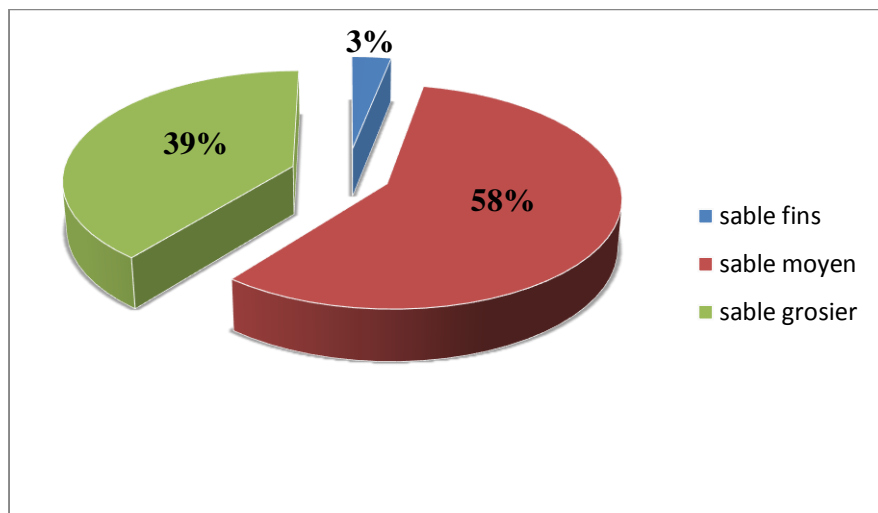


Figure 3.5 : Résultat de l'analyse granulométrique de l'échantillon SETH.

Tableau 3.2 : Caractéristiques minéralogiques et texture d'échantillon SETH.

Echantillon	Niveau (cm)	A%	L%	SF%	SM %	SG %	Texture
SETH	0-20	0	0	3.10	57.36	39.14	Sableux

Les résultats des analyses granulométriques de notre échantillon de sol sont représentés par la **Figure 3.5** qui fait ressortir une prédominance de la fraction sableuse dans notre échantillon de sol avec 3% de sable fins, 58% de sable moyen et 39% de sable grossier.

Les résultats représentés dans le **Tableau 3.2** indiquent l'absence totale de fraction d'argile (A) et de limons (L), notre échantillon de sol est composé essentiellement d'une fraction sableuse.

Le sol étudié est donc classé comme très sableux selon le triangle textural du Groupement d'Étude des Problèmes de Pédologie Appliquée GEPPA (**ANNEXE B**).

L'importance de la fraction sableuse dans le sol étudiée suggère une bonne perméabilité facilitant ainsi la circulation des fluides contenant les nutriments et l'oxygène qui sera d'autant plus accessibles aux microorganismes que le milieu est perméable. Sa diminution va limiter leur extension, aboutissant à la fin à une mauvaise biodégradation [56]. En effet, une faible perméabilité limite le passage d'air nécessaire pour promouvoir la croissance bactérienne[1].

Cependant, l'absence d'argile dans notre sol affecte négativement l'activité microbienne puisqu'on peut considérer que la fraction d'argile se comporte comme une sorte d'entrepôt dans lequel serait mise en réserve une partie de ressources nutritives, assurant de cette façon aux microorganismes un plus grand étalement dans l'espace et la disponibilité des nutriments et de l'eau [57].

- **Propriétés physicochimiques et microbiologiques du sol**

Les résultats physicochimiques et microbiologiques d'échantillon du sol du Centre de Traitement des Huiles (SCTH) sont représentés dans le **Tableau 3.3**.

Tableau 3.3 : Propriétés physico-chimiques et microbiologiques d'échantillon SETH.

Paramètre	Valeur	Minéralogie	
		Minéraux	Formule
TPH (g.Kg ⁻¹)	71,66		
pH	8,26	Quartz Halite Calcite	SiO ₂
Conductivité (mS.cm ⁻¹)	5,37		NaCl
Salinité (mg.L ⁻¹)	3,44		CaCO ₃
Flore autochtone (UFC.g ⁻¹)	1,4×10 ³		

Le dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué fait ressortir une teneur de 71,66 g.Kg⁻¹ de sol soit 7,16 % de sol.

La teneur du borbier en hydrocarbures est largement supérieure à la valeur fixée par la norme hollandaise (0,1 g.Kg⁻¹ de sol), ce qui confirme bien une pollution par ces composés hydrocarbonés. Cette pollution causée par les rejets des boues constitue une source de carbone importante pour les microorganismes du sol [58].

Le chromatogramme CG/MS de ce sol a permis l'identification des n-alcanes de poids moléculaires moyens de n-C₁₇ à n-C₂₇ **Figure 3.6**. La fraction légère et moyenne jusqu'à n-C₁₆ est totalement absente sur le spectre du sol (SETH). Cela pourrait être le résultat du phénomène d'évaporation dû aux températures élevées qui caractérisent cette région.

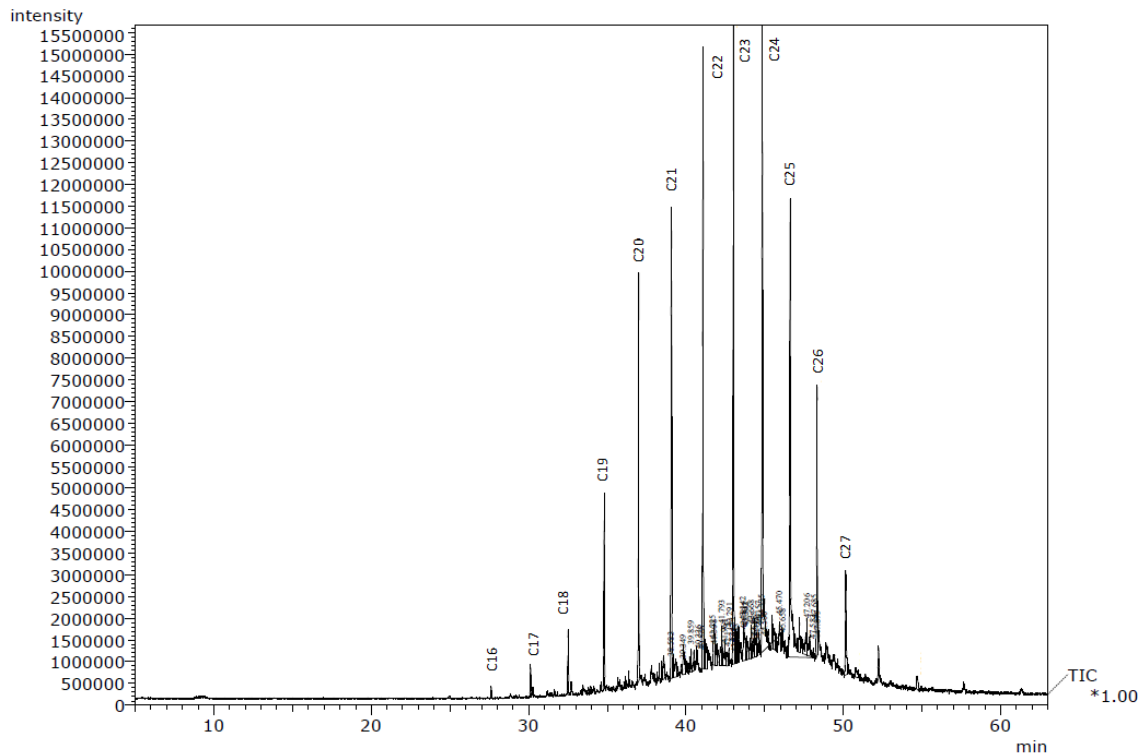


Figure 3.6 : Chromatogramme d'échantillon SETH.

Le pH légèrement alcalin du borbier est influencé par celui des boues rejetées présentant des pH allant de 9 à 10 pour éviter la corrosion du matériel de production. À cette valeur de pH, l'activité de la flore autochtone du sol, dégradant les hydrocarbures, est maintenue. La plupart des microorganismes sont capables de se développer dans un intervalle de pH allant de 5 à 9 avec un optimum se situant aux alentours de 7 légèrement alcalin [1].

Pour évaluer la salinité du sol, nous utiliserons l'échelle de la conductivité électrique (CE : $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) suivante [12]:

- Sol non salin $\text{CE} < 2$
- Sol légèrement salin $2 < \text{CE} < 3$
- Sol salin $3 < \text{CE} < 5$
- Sol très salin $9 < \text{CE} < 16$
- Sol extrêmement salé $\text{CE} > 16$

Notre échantillon de sol peut être classé comme sol salin. Cela est justifié par la composition chimique des fluides utilisés dans les différentes unités de production contenant une quantité importante de sels.

Le dénombrement de la microflore totale dans notre échantillon de sol pollué par les hydrocarbures fait ressortir un taux de $1,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de sol. La densité microbienne de ce sol est considérée comme la plus pauvre. La nature sableuse du sol (considéré comme très sableux) et sa concentration très élevée en hydrocarbures (77600 mg TPH.kg⁻¹ de sol) le rend dans cette situation. **Margesin et Schinner (2001)** suggèrent qu'une teneur supérieure ou égale à 10^6 germes/g de sol est suffisante pour procéder à la biodégradation de ces composés [59].

La minéralogie de notre échantillon de sol indique la présence prédominante du Quartz suivi par l'Halite et la Calcite (Diffractogramme en ANNEX C).

La présence de ces minéraux peut être justifiée par la nature de sol de la région, par ailleurs la minéralogie nous confirme encore une fois la texture de notre échantillon en ce qui concerne l'absence d'argile et de limons.

3.3.1.2 Test de remobilisation

Afin de valider l'efficacité des tensioactifs d'origine biologique dans la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, il est nécessaire de comparer les rendements obtenus avec ceux de leurs homologues chimiques [19]. La **Figure 3.7** montre l'aspect des hydrocarbures pétroliers avant et après traitements avec les surfactants.



Figure 3.7 : Photos montrant l'aspect des hydrocarbures pétroliers mobilisés du sol. (a) avant traitement, (b) après traitement.

La quantification des hydrocarbures remobilisés a été évaluée par deux méthodes ; une analyse CG/MS permettant d'étudier la distribution des fractions individuelles des alcanes linéaires, solubilisées suite à l'application des surfactants et une mesure gravimétrique donnant le pourcentage d'hydrocarbures totaux (*Total Petroleum Hydrocarbons* TPH).

- **Analyse par CG/MS**

La **Figure 3.8** présente la distribution des n-alcanes remobilisés par les surfactants appliqués.

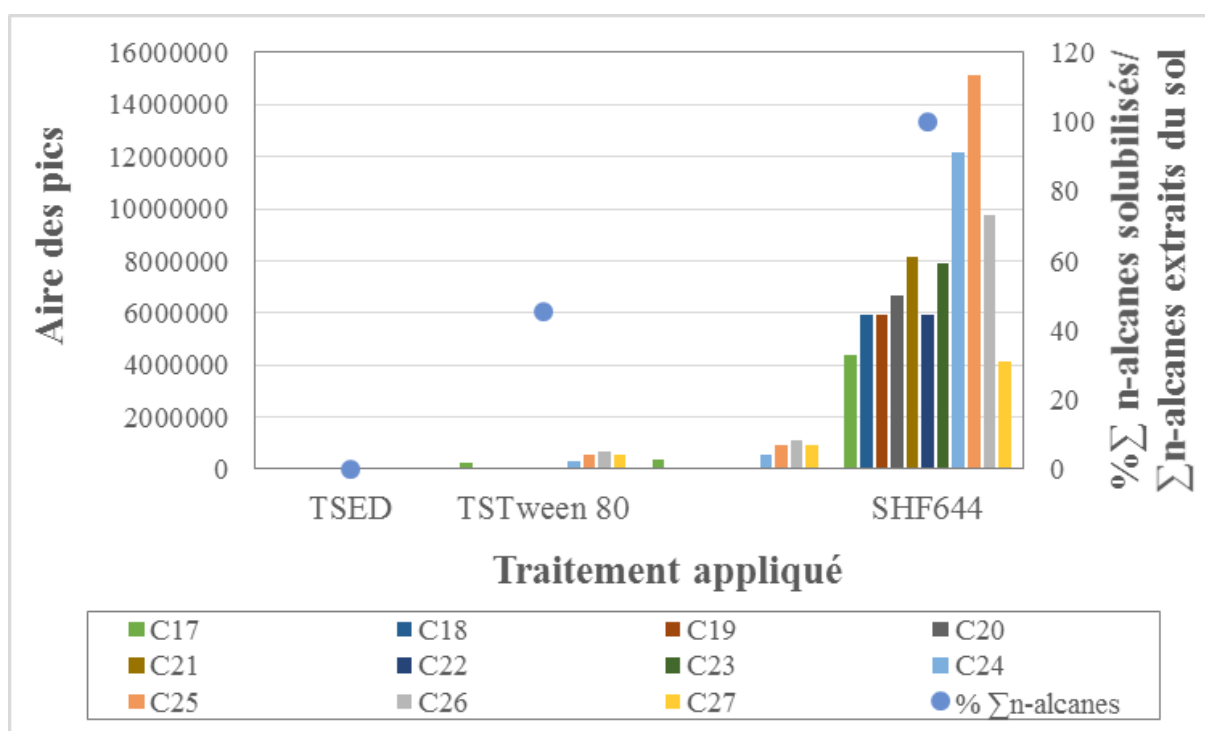


Figure 3.8 : Distribution des n-alcanes mobilisés sous l'effet des surfactants appliqués.

La figure montre que le biosurfactant HF644 est plus efficace dans la remobilisation des hydrocarbures du sol par rapport au surfactant Tween 80. Le HF644 a pu mobiliser la totalité des n-alcanes (100 %) présente dans le chromatogramme de l'échantillon du sol (**Figure 3.6**) avec une aire de pics nettement supérieure à celle causée par le Tween 80. Ce dernier n'a solubilisé qu'une fraction limitée (46 %) des alcanes linéaire. L'eau distillée ; appelé comme témoin de lavage est sans effet sur la mobilisation des hydrocarbures du sol. Les surfactants étudiés (HF644 et Tween 80) ont été appliqués à une concentration égale à leur CMC. À cette concentration, le HF644 diminue la tension de surface jusqu'à une valeur de $31,6 \text{ mN.m}^{-1}$ alors que le surfactant Tween 80 la

réduit à une valeur de $43,7 \text{ mN.m}^{-1}$. L'activité de surface de notre biosurfactant est donc plus élevée à celle de Tween80.

De nombreux auteurs ont montré que l'élimination des hydrocarbures dans les sols se fait par un mécanisme de mobilisation (déplacement et dispersion) plutôt qu'avec un phénomène de solubilisation ou d'émulsification [54, 60].

La mobilisation des hydrocarbures dans le sol est le résultat de l'abaissement de la tension de surface entre les phases air/eau ou sol/eau, ce qui permet le détachement des hydrocarbures au sol par réduction des forces capillaires. Le phénomène se produit à des concentrations de biosurfactants au-dessous de la CMC. À des concentrations de biosurfactant supérieures à la CMC, la formation des micelles augmente plutôt la solubilité de l'hydrocarbure [61].

Bai et al. (1997) [54] ont montré que la mobilisation est le principal mécanisme responsable de l'élimination de l'hexadécane à travers des colonnes du sol, avec une action plus forte du monorhamnolipide par rapport à d'autres surfactants chimiques testés (SDS et Tween 80). De même, **Urum et Pekdemir (2004) [61]** ont montré que ce phénomène est le responsable de l'élimination du pétrole brut dans le sol pour certains biosurfactants étudiés. Toutefois, les mêmes auteurs ont constaté que pour d'autres (bio) surfactants (Rhamnolipide et SDS), l'élimination du pétrole est améliorée à des concentrations supérieures à leur CMC. Les auteurs ont conclu que l'élimination des hydrocarbures dans les sols est un processus complexe dépendant à la fois des propriétés des (bio) surfactants et à l'effet combiné des systèmes : surfactant/pétrole/sol. Quoique diverses études ont été menées pour examiner l'influence de différents facteurs sur l'élimination des hydrocarbures dans le sol. Des résultats contradictoires sont toujours rapportés, même sous conditions opératoires identiques [62]. Selon **Gabet (2004) [1]**, la solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols pollués par les hydrocarbures.

Cependant, dans leur travail, **Pekdemir et al. (2005) [60]** indiquent que la formation des émulsions pendant le processus de lavage du sol par les biosurfactants a un effet désagréable, en effet lorsque les émulsions ont un aspect visqueux, cela est causé par la solubilisation. Ces émulsions deviennent immobiles et diminuent la perméabilité du sol et le contact sol/biosurfactant ce qui entraîne une mauvaise circulation et par conséquent, un faible taux des hydrocarbures mobilisés est obtenu.

D'après **Kuyukina et al. (2005) [63]**, l'efficacité d'un surfactant dans le sol pourrait être limitée par la texture du sol. En particulier, sa teneur en argile et en matière organique naturelle qui le rend plus adsorbant aux contaminants organiques.

L'effet bénéfique des biosurfactants par rapport aux surfactants chimiques dans l'élimination des hydrocarbures dans le sol et l'amélioration de la biodégradation est ainsi reporté dans la littérature.

Cameotra et Singh (2008) [64] ont prouvé que le traitement d'une boue huileuse par un biosurfactant brut (100 ml.kg^{-1} de sol) induit mieux la biodégradation par rapport à une solution de nutriments (50 ml.kg^{-1} de sol) dans un système inoculé avec un consortium bactérien. Le taux de biodégradation était de $95,3 \pm 1,31 \%$ avec le biosurfactant brut comparé à $91,2 \pm 1,65 \%$ avec la solution de nutriments.

De França et al. (2015) [65] ont étudié l'effet des différents surfactants (biosurfactant brut produit par une souche *Bacillus subtilis* ICA5 et le surnageant de culture, un surfactant anionique ; SDS, un surfactant non ionique ; Triton X-100) à une concentration de 250 mg.l^{-1} et de l'eau distillée comme témoin, sur le lavage du pétrole brut et de l'huile de moteur à travers un sable. L'étude a montré que le biosurfactant est légèrement plus efficace dans l'élimination du pétrole brut et de l'huile de moteur par rapport au SDS et au Triton X-100 ($76,89 \pm 3,3 \%$ contre $81,20 \pm 0,6$ et $76,10 \pm 2,2 \%$ et $88,60 \pm 1,0$ contre $79,20 \pm 1,4$ et $70,40 \pm 0,5 \%$ respectivement). L'eau distillée a conduit à une réduction seulement de 36% . Le surnageant de culture a donné des meilleurs résultats par rapport au biosurfactant brut, ce qui est avantageux en terme de coût [53].

Kuyukina et al. (2005) [63] ont trouvé que le biosurfactant synthétisé par une souche de *Rhodococcus* cultivés sur deux n-alcane (C_{12} et C_{16}) est plus efficace par rapport un surfactant chimique (Tween 60) dans la mobilisation du pétrole brut à travers des colonnes du sol. Selon ces auteurs, la sorption des (bio)surfactants freine leur pénétration par réduction de la concentration des micelles et par conséquent l'efficacité d'enlèvement des composés hydrophobes.

Lai et al. (2009) [55] ont testé l'effet de deux biosurfactants ; un rhamnolipide et une surfactine synthétisés par *Pseudomonas aeruginosa* S2 et *Bacillus subtilis* ATCC 21332 respectivement, en comparaison avec deux surfactants chimiques ; Tween 80 et Triton X-100 à des concentrations nettement supérieures à leur CMC. Une ration sol/eau

de 1/2 a été utilisée. Le sol a été contaminé avec deux doses du pétrole brut ; faible (3000 mg TPH.kg⁻¹ de sol sec) et élevée (9000 mg TPH.kg⁻¹ de sol sec). Le traitement a été perduré pendant 24 h et 168 h. Les résultats ont montré que les biosurfactants (rhamnolipide et surfactine) sont plus efficaces que les surfactants chimiques (Tween 80 et Triton X-100) avec un pourcentage d'élimination des TPH de 23% et 14% contre 6% et 4% respectivement pour la dose faible. L'efficacité d'élimination des TPH a augmenté en augmentant la dose du pétrole dans le sol. De même, l'enlèvement du pétrole dans le sol a augmenté avec la concentration des surfactants (de 0 à 0,2 % en masse). Toutefois, la durée de traitement ne semble pas avoir d'effet sur la mobilisation des hydrocarbures dans ce sol.

- **Mesure gravimétrique**

Les résultats de quantification des hydrocarbures après traitement par les (bio)surfactants et l'eau distillée comme témoin de lavage sont illustrés dans la **Figure 3.9**.

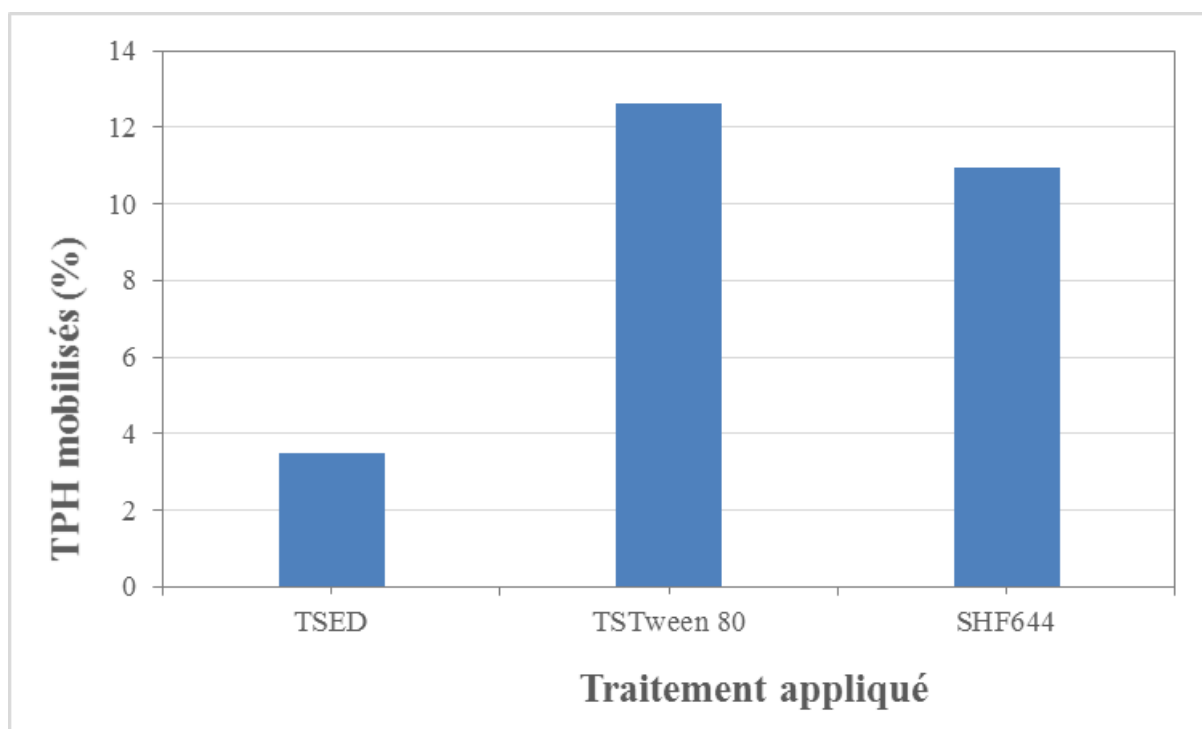


Figure 3.9 : Quantification gravimétrique des TPH mobilisés par les surfactants étudiés.

Contrairement à l'analyse CG/MS qui a montré que le biosurfactant HF644 est plus efficace dans la mobilisation des hydrocarbures et que l'eau distillée est sans effet. La mesure gravimétrique a révélé que le Tween 80 possède un pouvoir de mobilisation

comparable à celui du HF644 voire plus (13 % avec le Tween 80 contre 11 % avec le HF644). De même, l'eau distillée a permis la mobilisation d'une faible fraction des TPH mais non négligeable (4 %). La méthode gravimétrique permet le dosage non seulement de la fraction des hydrocarbures saturés, mais aussi les aromatiques, les polaires (composés contenant des composés azotés, soufrés ou oxygéné désignée sous l'acronyme NSO) et les asphaltènes [66, 67]. À titre d'exemple, l'analyse gravimétrique de 1 g du pétrole brut a indiqué la présence de 0,4225 g des alcanes, 0,1822 g des aromatiques, 0,0892 g des composés NSO et 0,3057 g des asphaltènes [67].

En comparant les deux analyses CG/MS et gravimétrique des hydrocarbures mobilisés, on peut dire que le surfactant Tween 80 est plus efficace dans la mobilisation des autres fractions hydrocarbonées par rapport au biosurfactant HF644 qui a montré une sélectivité dans la mobilisation de la fraction saturée. Ce constat reste à confirmer avec une analyse permettant la séparation des différentes fractions (élution des TPH sur une colonne de gel de silice par des solvants de polarités différentes) ou avec une analyse CG/MS plus poussée qui permet de séparer et d'analyser les fractions polyaromatiques et linéaires et de les étudier séparément.

En effet, dans une étude prometteuse, **Urum *et al.* (2006) [68]** ont comparé la sélectivité des surfactants des différentes natures (saponin : surfactant naturel, SDS : surfactant chimique et Rhamnolipide : biosurfactant) vis-à-vis l'élimination des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques du pétrole brut à partir du sol (*soil washing test*). Les auteurs ont constaté que le rhamnolipide et le SDS prennent une supériorité dans l'élimination de la fraction aliphatique, tandis que le saponin permet l'enlèvement des quantités comparables des fractions aliphatiques et aromatiques. Ainsi, cette sélectivité a été constatée au sein de la même fraction. Rhamnolipide et saponin ont été plus efficace dans l'élimination des naphthalènes par rapport au SDS. Le saponin étant plus efficace vis-à-vis les phénanthrènes.

Le Tween 80 parmi d'autres surfactants non ioniques (les Triton, les Brij) sont très utilisés dans l'amélioration de la solubilisation des contaminants organiques dans le sol du fait de leur forte hydrophobicité et leur faible adsorption dans le sol [63]. Cependant, leur application dans le sol pourrait freiner l'activité de la flore microbienne autochtone par accumulation des composés toxiques et non biodégradables. L'utilisation des biosurfactant demeure la solution idéale pour ces cas de figures.

3.3.2 Solubilisation du pétrole dans l'eau de mer

Les hydrocarbures sont des polluants organiques persistants, leur caractère hydrophobe limite leur biodisponibilité. Cette dernière est un paramètre indispensable dans la biodégradation de ces composés. Le taux de solubilisation des composés hydrophobes peut être améliorée par l'ajout du surfactant chimique ou biologique.

Dans ce contexte, le biosurfactant produit par la souche SdK644 a été testé pour la solubilisation du pétrole brut dans l'eau de mer. Le Tween 80 a été utilisé à titre comparatif ainsi que de l'eau de mer comme témoin. La **Figure 3.10** montre l'aspect du pétrole brut avant et après traitement avec les surfactants.

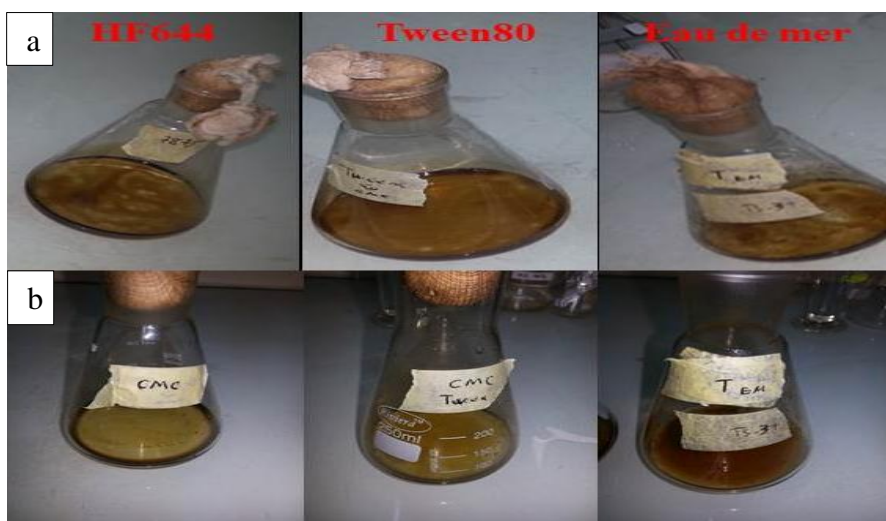


Figure 3.10 : Photos montrant l'aspect du pétrole brut solubilisé dans l'eau de mer. (a) avant traitement, (b) après traitement.

La fraction aliphatique du pétrole brut, altéré par stérilisation et diluée directement avec le dichlorométhane a été analysée par CG/SM afin de dévoiler la distribution et la nature des composés individuels **Figure 3.11**.

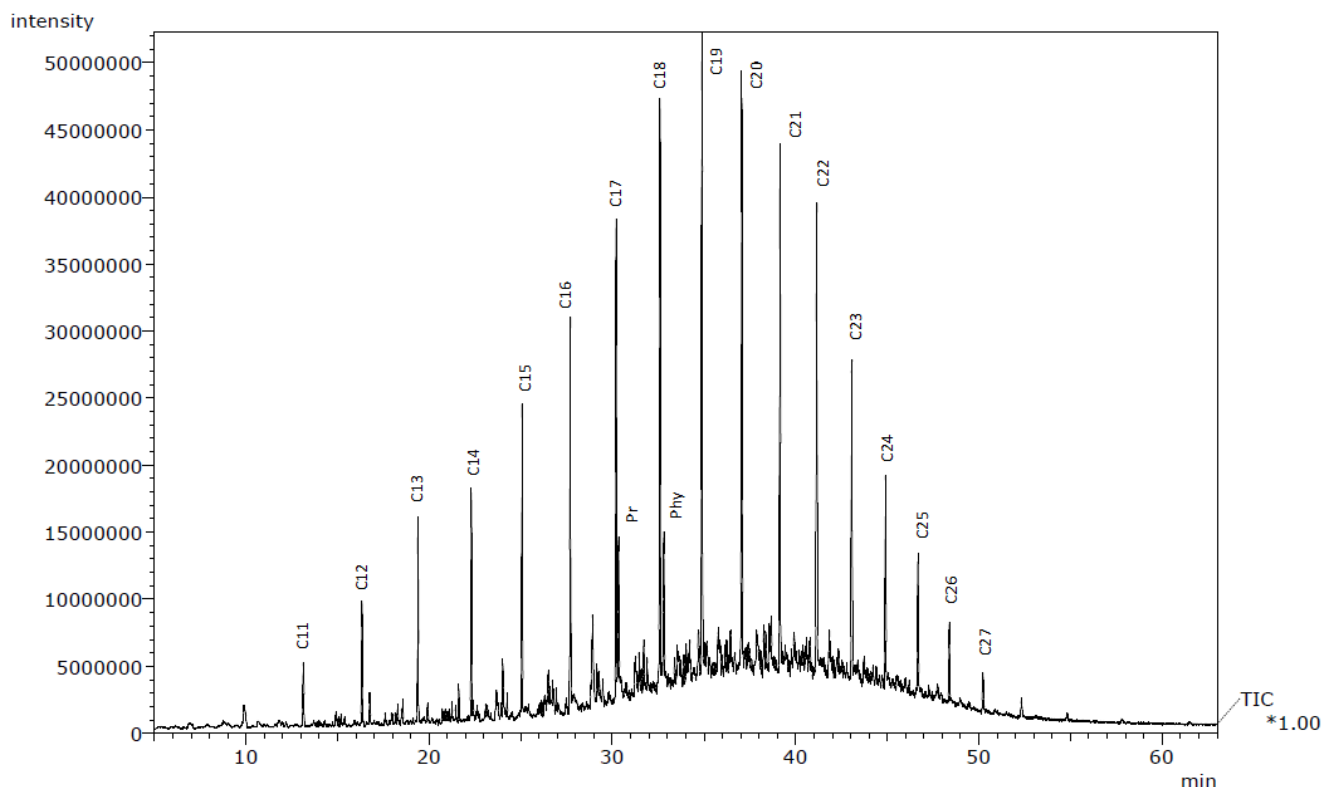


Figure 3.11 : Chromatogramme d'échantillon du pétrole brut stérile.

L'analyse CG/SM de notre pétrole a révélé la présence des n-alcanes des chaînes courtes et moyennes (n-C₁₁ jusqu'à n-C₂₇) ainsi que deux alcanes ramifiés très abondants et caractéristiques des pétroles brut ; Pentadécane,2,6,10,14-tetramethyl, appelé Pristane, venant directement après l'heptadécane C₁₇H₃₆ et Hexadécane,2,6,10,14-tetramethyl, désigné sous le nom Phytane et résolu directement après le pentadécane C₁₈H₃₈.

L'analyse des hydrocarbures après application des surfactants se fait avec les mêmes méthodes décrites dans le cas du sol.

- **Analyse par CG/SM**

Les deux **Figures 3.12** et **3.13** montrent respectivement la solubilité relative du pétrole brut en présence des (bio)-surfactants et la distribution des n-alcanes solubilisés après traitement par les (bio) surfactants.

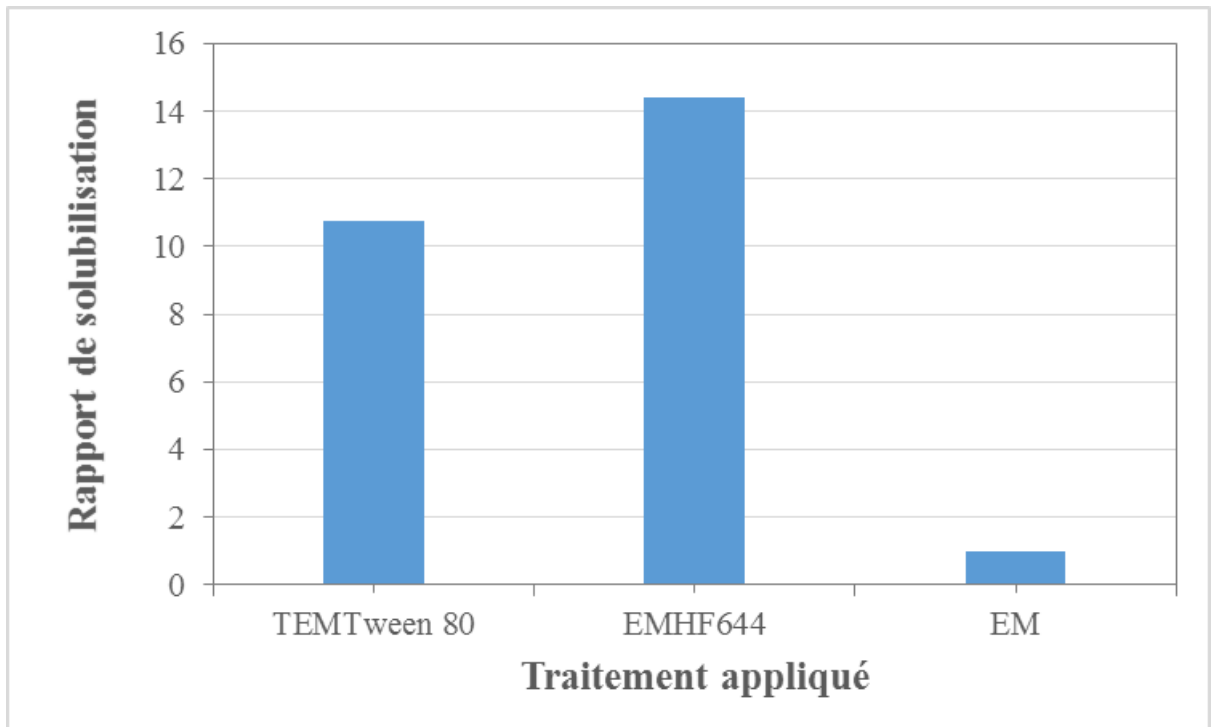


Figure 3.12 : Solubilité relative du pétrole brut en présence des surfactants.

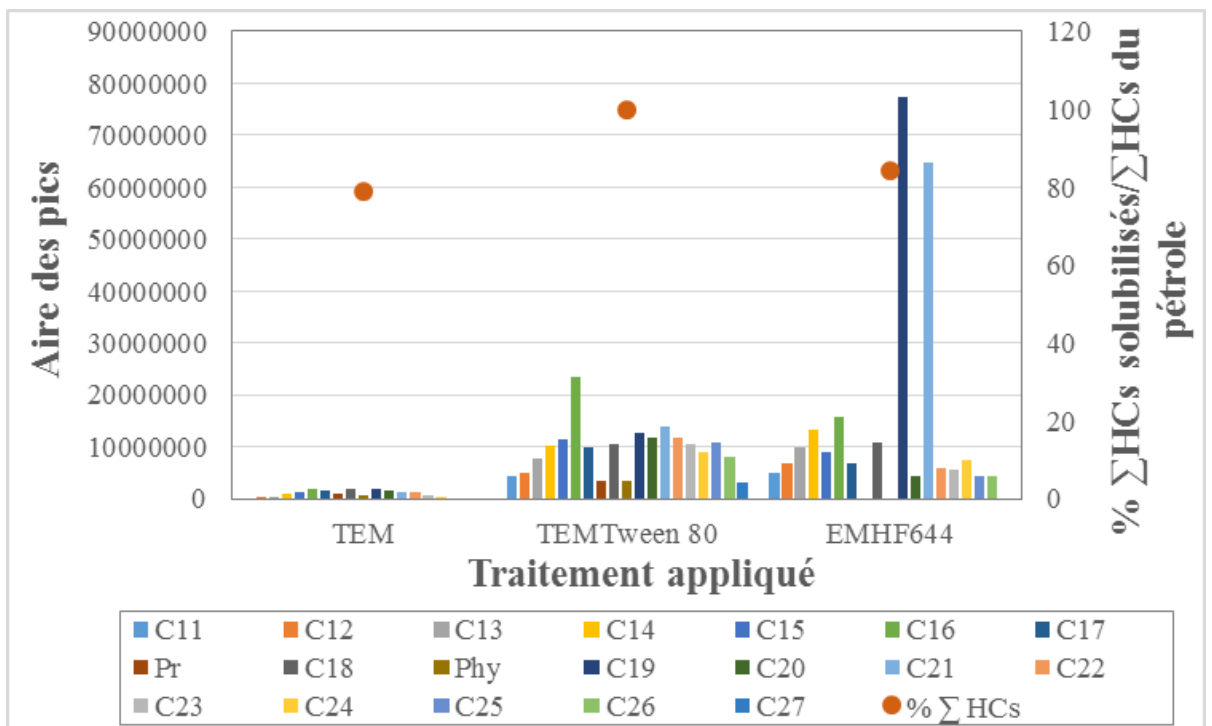


Figure 3.13 : Distribution des n-alcane solubilisés après traitement par les surfactants HF644 et Tween 80.

Les résultats représentés dans la **Figure 3.12** ont été aboutis par calcul de la moyenne des aires de pics des alcanes après traitement par les deux (bio) surfactants et de l'eau de mer seule. La moyenne des aires de chaque surfactant est reportée sur celle de l'eau de mer. Cette présentation permet de comparer globalement l'efficacité des (bio) surfactants l'une à côté de l'autre. Il en ressort que le biosurfactant HF644 est 14 fois plus efficace que de l'eau de mer dans la solubilisation des hydrocarbures saturés. Le Tween 80 est moins efficace (10 fois plus supérieur que l'eau de mer). L'analyse détaillée de l'abondance de chaque composé est reportée sur la **Figure 3.13**.

En terme du nombre des composés solubilisés, le tween 80 étant le meilleur; la totalité de la fraction saturée présente dans le chromatogramme du pétrole brut (**Figure 3.11**) a été retrouvée dans celui du tween 80. Le HF644 n'a pas pu solubiliser les deux alcanes ramifiés pristane et phytane, ainsi que le n-C₂₇. L'eau de mer seule a solubilisé une fraction importante des alcanes (79 % de la totalité des alcanes présentes dans le pétrole) avec une intensité très faible par rapport aux (bio)-surfactants étudiés. Les résultats affichés sur cette figure montrent clairement, comme il a été évoqué dans le cas du sol, la sélectivité des surfactants au sein d'une même famille des hydrocarbures. À titre d'exemple, le HF644 a solubilisé des quantités importantes de n-C₂₁ et n-C₁₉, le tween 80 est plus efficace vis-à-vis le n-C₁₆.

Comme il a été rapporté dans la partie précédente sur le sol, la solubilisation se produit à des concentrations en surfactants supérieures à leur CMC. Toutefois, cela n'est pas toujours envisagé. **Urum et Pekdemir (2004) [61]** ont testé la solubilisation du pétrole par six surfactants avec des concentrations croissantes. Les auteurs ont constaté que la plupart des surfactants étudiés ne présentent pas une solubilisation micellaire parce que l'allure de leur courbe de solubilité diminue ou demeure constante à des concentrations supérieures ou égales à la CMC. Cette tendance a été expliquée par une modification de la forme et la taille des micelles comme la concentration du surfactant continue à augmenter. Selon **Sikdar et Irvine (1998) [69]** cette modification pourrait avoir une influence significative sur leur comportement de phase aussi bien que leur capacité de solubilisation des contaminants organiques.

L'apport positif des biosurfactants dans l'amélioration de la solubilité et la biodégradation des hydrocarbures est ainsi reporté dans la littérature. **Bordoloi et Konwar (2009) [70]** quant à eux, ont constaté que l'ajout des biosurfactants produits des

nombreuses souches de *Pseudomonas aeruginosa* améliore significativement le taux de solubilité du pyrène, fluorène, phénanthrène et pétrole brut, durant un essai de solubilisation standard (PAHs and crude oil solubilization assay). **Varadharajan Kavitha et al. (2014) [71]** ont étudié la solubilisation du pétrole brut dans une phase aqueuse et ont constaté que plus de 80 % du pétrole brut a été solubilisé par un biosurfactant issu d'une souche de *Bacillus licheniformis* MTCC 5514.

Whang et al. (2008) [72] ont trouvé que le taux de solubilisation des hydrocarbures totaux du diesel dans l'eau a augmenté avec la concentration de deux biosurfactants ; un rhamnolipide et une surfactine. Ainsi, des expériences de biodégradation du diesel (1 %) dans un milieu BH amendé avec 80 mg.L⁻¹ des biosurfactants (rhamnolipide et surfactine) et sans amendement, ont montré l'effet positif des biosurfactants sur la croissance microbienne et le taux des TPH dégradés.

Dans une étude prometteuse, **Saeki et al. (2009) [73]** ont testé l'influence d'un biosurfactant synthétisé par une souche bactérienne *Gordonia* sp. JE-1058 dans la remédiation de l'eau de mer contaminée par le pétrole brut altéré (dont la fraction légère < n-C₁₂ a été évaporée). L'ajout du biosurfactant brut JE-1058 BS a donné les meilleurs résultats par rapport à un autre traitement avec les nutriments tant sur la stimulation de la flore microbienne indigène de l'eau de mer que sur la fraction aliphatique (n-C₁₂ à n-C₃₅, pristine et phytane) et polyaromatique totale (HAP) du pétrole dégradé. Après 28 jours d'incubation, 93 % de la fraction aliphatique linéaire et ramifiée a été éliminée dans le traitement avec l'agent JE-1058 BS contre 67 % avec la solution des nutriments. De même, 39 % des HAP ont été dégradée auprès de 9 % dans le second traitement. Selon les auteurs, la stimulation de la dégradation du pétrole par l'agent JE-1058 BS est attribuée à la dispersion de celui-ci en fines gouttelettes accessibles à la flore indigène de l'eau de mer et ainsi à l'utilisation directe de cet agent comme source de nutriments à leur besoin de croissance.

- **Mesure gravimétrique**

Les résultats de quantification des hydrocarbures solubilisés après traitement appliqué par la méthode gravimétrique sont présentés sur la **Figure 3.14**.

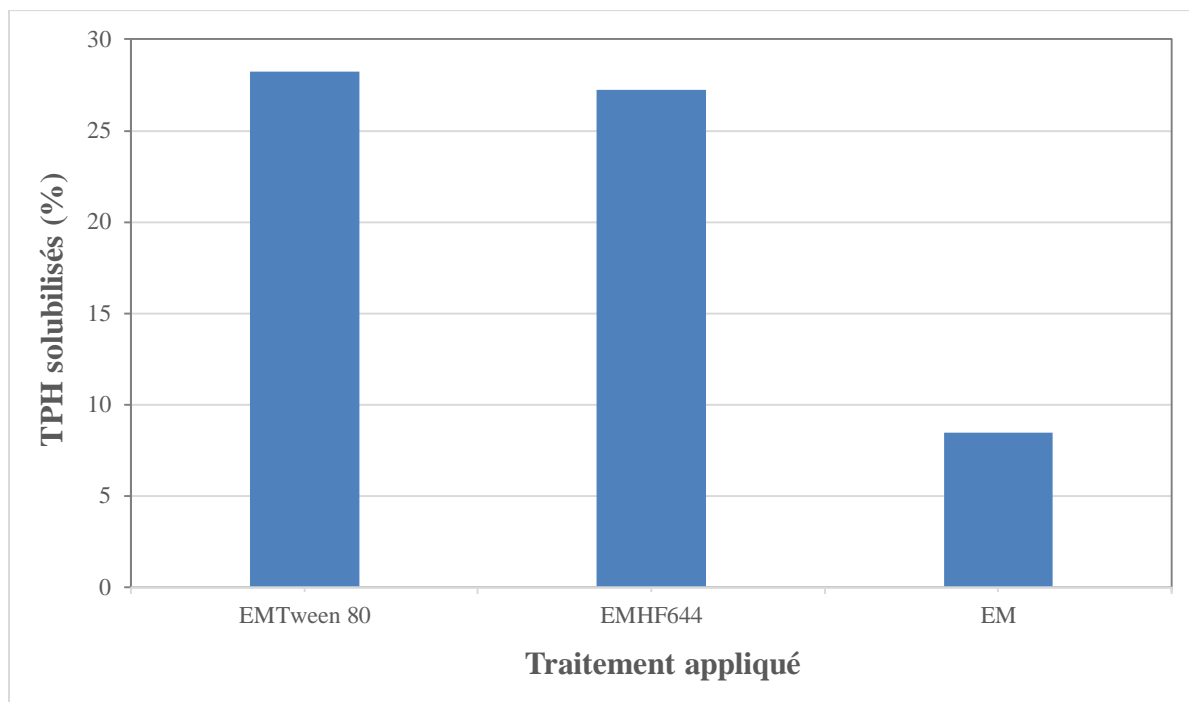


Figure 3.14 : Quantification gravimétrique des TPH solubilisés par les surfactants étudiés.

Les résultats obtenus par la méthode gravimétrique sur l'échantillon du pétrole solubilisé dans l'eau de mer rejoignent ceux obtenus dans le cas du sol. Le biosurfactant HF644 a une efficacité proche du surfactant Tween 80 (27 % et 28 % respectivement).

L'eau de mer seule a donné un taux de solubilisation de 9 %. Les taux de solubilisation obtenus avec l'eau de mer sont plus supérieurs par rapport aux taux de mobilisation obtenus dans le cas du sol. Ceci peut être dû à la nature des hydrocarbures présents dans chaque échantillon. Les hydrocarbures les plus lourds ont une solubilité plus faible.

Urum et Pekdemir (2004) [61] ont trouvé que l'eau distillée a solubilisé une faible concentration du pétrole ($4,5 \text{ mg.L}^{-1}$) par rapport à un rhamnolipide (environ 10 mg.L^{-1}) et le SDS avec environ 20 mg.L^{-1} . **Bai et al. (1997) [54]** ont étudié l'influence du type des cations, la force ionique et le pH de la solution d'un rhamnolipide sur la solubilisation de l'hexadécane. Les auteurs ont constaté que la solubilité de l'hexadécane dans la solution de rhamnolipide a augmenté plus que 7,5 fois en présence de 500 mM Na^+ et 25 fois en présence de 1 mM Mg^{2+} . La présence des cations à même réduit les tensions interfaciales entre la solution de rhamnolipide et l'hexadécane. De même, la diminution du pH (de 7 à 6) a diminué les tensions interfaciales entre la solution de biosurfactant et le C_{16} .

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de notre travail est la remédiation des sites pollués (sol et eau de mer) par les hydrocarbures à l'aide d'un biosurfactant produit par une souche bactérienne hydrocarbonoclaste Sdk644.

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'huile de friture comme une source du carbone dans la production de biosurfactant par la souche Sdk644. Cette dernière a montré une capacité productrice très acceptable avec un rendement de $4,93 \text{ g.L}^{-1}$ de biosurfactant et un taux de conversion de 25 %.

Le biosurfactant partiellement purifié a une concentration micellaire critique (CMC) égale à 787 mg.L^{-1} qui a permis de diminuer la tension de surface de l'eau de 65 mN.m^{-1} jusqu'à $31,6 \text{ mN.m}^{-1}$.

Sa caractérisation par l'analyse Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) nous a permis de le classer probablement comme étant un glycolipide.

Par ailleurs, le biosurfactant HF644 a été envisagé pour une application environnementale dans le lavage d'un sol contaminé par des hydrocarbures pétroliers et la solubilisation du pétrole dans l'eau de mer.

La caractérisation physicochimiques et microbiologiques du sol prélevé à partir de bourbier du Centre de Traitement des Huiles à Hassi R'mel indique que le sol est classé comme très sableux avec une teneur élevée en hydrocarbures $71,66 \text{ g TPH.Kg}^{-1}$ de sol. L'analyse CG/SM de ce sol a permis l'identification des n-alcane de poids moléculaire moyens (n-C₁₇ à n-C₂₇). L'analyse microbiologique donne une faible densité microbienne avec un taux de $1,4 \times 10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$ du sol.

L'analyse par CG/MS des hydrocarbures mobilisés du sol a révélé que le biosurfactant HF644 est plus efficace par rapport au surfactant chimique Tween 80, Ce dernier n'a solubilisé qu'une fraction limitée (46 %) des alcanes linéaires, alors que notre biosurfactant HF644 a solubilisé la totalité des n-alcane (100%) présents dans le sol contaminé. Toutefois, la mesure gravimétrique des TPH mobilisés montre que le Tween 80 est relativement plus efficace par rapport au HF644 (13 % avec le Tween 80 contre 11 % avec le HF644). De même, l'eau distillée a permis la mobilisation fraction faible des TPH mais non négligeable (4 %).

L'analyse CG/SM de la capacité du biosurfactant HF644 dans la solubilisation du pétrole brut dans l'eau de mer a révélé que le biosurfactant HF644 est 14 fois plus efficace que de l'eau de mer dans la solubilisation des hydrocarbures saturés. Dans les mêmes conditions, le Tween 80 était 10 fois plus supérieur que l'eau de mer. L'analyse gravimétrique a donné des taux similaires des TPH solubilisés à partir du pétrole brut entre le HF644 et le Tween 80 (27 % et 28 % respectivement). L'eau de mer seule a donné un taux de solubilisation de 9 %. Les deux analyses nous permettent de conclure sur la sélectivité des deux surfactants vis-à-vis le type d'hydrocarbure. Le HF644 est présumé d'être plus sélectif dans la solubilisation des hydrocarbures saturés. Le Tween 80 est plus sélectif aux autres familles (aromatiques, polaires et asphaltènes).

A la lumière de ces résultats, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- Étude approfondie sur l'optimisation des conditions de production et le procédé d'extraction du biosurfactant.
- Une purification et une caractérisation plus poussée du biosurfactant HF644 (CCM, CL/SM, RMN, ...) et de ses propriétés physicochimiques pour mieux connaître sa nature, sa structure et les paramètres influençant sa micellisation.
- L'étude sur la capacité du biosurfactant a remobilisé les métaux.
- L'étude de la remobilisation des hydrocarbures sur colonnes de sol.
- Étude de l'effet du biosurfactant HF644 dans la biodégradation du pétrole dans l'eau de mer par la souche SdK644.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sophie Gabet, *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique*. 2004. thèse de docteur de l'université de Limoges.
2. Perfumo. A, *et al.*, *Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates*. . 2010: p. 1501–1512.
3. Vasudevan. N et Rajaram. P, *Bioremediation of oil sludge contaminated soil*"*Environ. Environ. Int.*, 2001. **26**: p. 409-411.
4. Aminot A et Chaussepied M, *Manuel des analyses chimiques en milieu marin, CNEXO, Centre national pour l'exploitation des océans. Brest*. 1983: p. 396.
5. Vogel T et Ballerini D, "*Biorestoration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés*" *Bull.Soc.Fr.Microbiol*, 2001. **16**, N°. **3**: p. 204- 209.
6. Lemièrre B, *et al.*, "*Guide sur le comportement des polluants dans le sol et les nappes*". document du BRGM 300, éditions BRGM, 2001. **119**.
7. Wild S.R. et Jones K.C., *Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget*. *Environmental Pollution*, 1995. **88**: p. 91-108.
8. Jones K.C. et Voogt P, *Persistent organic pollutants (POPs): state of the science*. *Environmental Pollution.*, 1999. **100**: p. 209-221.
9. Bouchez M, Blanchet D, et Vandecasteele J.P, *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain association : inhibition phenomena and cometabolism*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995. **43**: p. 156-164.
10. Saada A, Nowak C, et Coquerea N., , "*Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures*". *Rapport intermédiaire, Résultat de la phase 1*. Site internet: <http://www.sites-pollues.developpementdurable.gouv.fr/IMG/pdf/RP-53739-FR2.pdf>, (2005).
11. Nielsen T, *et al.*, *City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens : occurrence, source and health effects* *Science of Total Environment*, 1996: p. 41 - 49.

12. Kamel Eddouaouda, "*etude du potentiel biodegradatif de souches isolees du sol de hassi messaoud contamined par du petrole : criblage, biodegradation de hap et production de biosurfactant*". thèse de doctorat de l'université de blida 01, 2012.
13. *Infopol. session brestoised . . cedre*, 2 juin 1993 Brest.
14. *Lutte contre la pollution pétrolière dans la région sud-ouest de la méditerranée*. 8-12 janvier1996 Maroc. **Cedre**.
15. L'organisation Maritime Internationale, *Manuel sur la pollution par les hydrocarbures. Section 4. Lutte contre les déversements d'hydrocarbure. Royaume-Uni (Northampton): Arkle print ltd. . 2005-2015*.
16. L'organisation Maritime Internationale, *Directives OMI/PNVE sur l'application de dispersants contre les déversements d'hydrocarbures et considérations liées à l'environnement*. 2em édition. Royaume-Uni : In type Libra . . 1995. **54**.
17. Rémy B, *Étude de l'adsorption/désorption de polluants organiques dans les sols. Approche méthodologique et application au pentachlorophénol et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques*. Thèse de Doctorat de l'institut national des sciences appliquées de lyon, 1997.
18. S.Ferhat, "*la production de biosurfactants par des souches de Brevibacterium et Ochrobactrum isolees localement a partir d'un sol contamined par le petrole brut*". Thèse de doctorat de l'université de blida 01, 2012.
19. F-Z Ferradji, *etude des voies metaboliques de la biodegradabilite des hydrocarbures en vue d'une application d'un procede de biodepollution des eaux de mer*. thèse de doctorat universite de blida 1, 2014.
20. I.M Banat, R.S Makkar, et S.S. Cameotra, *Potential commercial applications of microbial surfactants*. Applied and Microbiological Biotechnology, 2000. **53**: p. 495-508.
21. K.Benali, *optimisation de la production du biosurfactant pas des souches bactériennes isolées à partir d'un sédiment marin portuaired contamined par des hydrocarbures pétroliers*. Mémoire de master 2, université de Blida 1 2014.
22. Thavasi R, *et al.*, *Biosurfactant production by Coryne bacterium kutscheri from waste motor lubricant oil and peanut oil cake*. Letters in Applied Microbiology, 2007. **45**: p. 686-691.
23. Banat I, *et al.*, *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Applied and Microbiological Biotechnology, 2010. **87**: p. 427-444.

24. I.E. Klosowska-Chomiczewska, K. Medrzycka, and E. Karpenko, *biosurfactants – biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants*.
25. Ramkrishna Sen, *biosurfactants "advances in experimental medicine and biology"*. 1966. **361**.
26. J Pore, *Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, ed. Techniques Et Industries Des Corps Gras 1992.
27. N. Christofi and I.B. Ivshina, *Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation*. Journal of Applied Microbiology, 2002. **93**: p. 915-929.
28. Banat I.M, *Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review*. Bioresource Technology, 1995. **51**: p. 1-12.
29. Lindley N.D and Heydemann M.T, *The uptake of n-alkanes from alkane mixtures during growth of the hydrocarbon-utilizing fungus Cladosporium resinae*. Appl Microbiol Biotechnol Journal, 1986. **23 n°5**: p. 384-388.
30. Berg G, *et al.*, *Identification and characterization of bacterium with emulsifying activity*. Environmental Science and Health Journal, 1990. **7**: p. 753-764.
31. Reddy S.A, *et al.*, *Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: a biosurfactant as stabilizing agent*. Mater. Lett Journal, 2009. **63**: p. 1227-1230.
32. A. M. Chakrabarty, *Genetically-manipulated microorganisms and their products in the oil service industries*. Trends in Biotechnology, 1985. **3(2)**: p. 32-39.
33. Shafeeq M, *et al.*, *Degradation of different hydrocarbons and production of biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa isolated from coastal waters* Appl. Microbiol. Biotechnol, 1989. **5**: p. 505-510.
34. Suneel Chhatre, *et al.*, *Bacterial consortia for crude oil spill remediation*. Water Science and Technology, 1996. **34(10)**: p. 187-193.
35. Mulligan C.N, *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental Pollution, 2005. **133(2)**: p. 183-198.
36. Haba E, *Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils* J. Appl. Microbiol, 2000. **88**: p. 379-387.
37. S.Ferhat, *et al.*, *Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011. **65(8)**: p. 1182-1188.

38. Kamel Eddouaouda, *et al.*, "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus sp. strain 1E* with potential application on hydrocarbon bioremediation". *Journal of Basic Microbiology*, 2012. **52**(4): p. 408-418.
39. Mukherjee S, Das P, and Ramkrishna S, *Towards commercial production of microbial surfactants* TRENDS in Biotechnology, 2006 **24** No.11: p. 1-7.
40. Wadekar S. D, *et al.*, *microbial synthesis of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source.* *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2012. **42**: p. 249-266.
41. 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 p. 1514-1520.
42. De Lima C. J. B, *et al.*, *Biosurfactant Production by Pseudomonas aeruginosa Grown in Residual Soybean Oil.* *Appl Biochem Biotechnol* 2009. **152**: p. 156-168.
43. De Gusmão C. A. B, Rufino R. D, and Sarubbo L. A, *Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from Candida glabrata UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant.* *World J Microbiol Biotechnol* 2010. **26**: p. 1683-1692.
44. Bahri A, *et al.*, *Investigation of SDS, DTAB and CTAB micelle microviscosities by Electron Spin Resonance* *Colloids Surf A* 2006. **290**: p. 206-212.
45. Juliana M. Luna, *et al.*, *Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by Candida sphaerica UCP0995.* *Process Biochemistry*, 2008. **43**(9): p. 912-917.
46. Eddouaouda K, *et al.*, "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus sp. strain 1E* with potential application on hydrocarbon bioremediation". *Basic Microbiology Journal*, 2011. **51**: p. 1-11.
47. Gudina Ej, *et al.*, *Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20.* *Lett Appl Microbiol*, 2010. **50**: p. 419-424.
48. Saimmai A, Sobhon V, and Suppasil Maneerat, *Production of biosurfactant from a new and promising strain of Leucobacter komagatae 183* *Ann Microbiol*, 2012. **62**: p. 391-402.

49. Ghojavand H, *et al.*, *Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the Bacillus subtilis group (PTCC 1696)*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. **324**(172-176).
50. [Http://Www.Unice.Fr/Cdiac/Animations/Spectroscopie/Infra_Rouge/Base_Ir_Frequenc es.Swf](http://Www.Unice.Fr/Cdiac/Animations/Spectroscopie/Infra_Rouge/Base_Ir_Frequenc es.Swf).
51. Orathai Pornsunthorntawe, *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.
52. T Hadibarata, *et al.*, *"Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus Armillaria sp. F022"*. Environmental Sciences Journal, 2012. **24 n°4**: p. 728-732.
53. Pacwa-Płociniczak M, *et al.*, *Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of Bacillus strains and production of biosurfactant*. Environ Prot Eng, 2011. **37**: p. 63-71.
54. Bai G, Brusseau M.L, and Miller R.M, *Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil*. Journal of Contaminant Hydrology, 1997. **25**: p. 157-170.
55. Chin-Chi Lai, *et al.*, *Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **167**(1-3): p. 609-614.
56. Lecomte P, *Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines.C*, ed. Édition Lavoisier and Tec & Do1995.
57. Amina Nesrine Djerbaoui, *utilisation de souches bacteriennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de hassi messaoud contamines par les hydrocarbures*. magister biologie -microbiologie appliquée- universite kasdi merbah-ouargla, 2011.
58. Akmouci S, *Contribution à l'étude des boues de forage: Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil*. Mémoire de Magister Biochimie et microbiologie appliquée. Université M'hamadBougaraBoumerdès., 2009: p. P 109.
59. Margesin R and Schinner F, *Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area.*, . Applied and EnvironmentalMicrobiology, 2001. **67 (7)**: p. 3127-3133.

60. Kingsley Urum, *et al.*, *Crude oil contaminated soil washing in air sparging assisted stirred tank reactor using biosurfactants*. *Chemosphere*, 2005. **60**(3): p. 334-343.
61. Urum K and T Pekdemir, *Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing*. . *Chemosphere*, 2004. **57**: p. 1139 - 1150.
62. Zhang W, *Batch washing of saturated hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons from crude oil contaminated soils using bio-surfactant*. *J. Cent. South Univ*, 2015. **22**: p. 895–903.
63. Maria S. Kuyukina, *et al.*, *Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system*. *Environment International*, 2005. **31**(2): p. 155-161.
64. Cameotra S.S and Singh P, *Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008. **62**: p. 274-280.
65. Ítalo Waldimiro Lima De França, *et al.*, *Production of a biosurfactant by Bacillus subtilis ICA56 aiming bioremediation of impacted soils*. *Catalysis Today*, 2015. **255**: p. 10-15.
66. Bertrand J-C, *et al.*, *Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration* *J. Esp. Mur. Biol. Ecol*, 1993. **168**(125-138).
67. Kumari B, Singh S.N, and Singh D.P, *Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation*. *Process Biochemistry*, 2012. **47**: p. 2463-2471.
68. Urum K., *et al.*, *A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils*. *Chemosphere* 2006. **62**: p. 1403-1410.
69. Sikdar K.S and Irvine L.R, *Bioremediation: Principle and Practice Fundamentals and Applications*, ed. Lancaste R. Vol. 1. 1998: Technomic Publishing Co.
70. Bordoloi N.K and Konwar B.K, *Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons*. *Journal of Hazardous Materials*, 2009. **170**: p. 495-505.
71. Varadharajan Kavitha, Asit Baran Mandal, and Arumagam Gnanamani, *Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: An approach with Bacillus licheniformis MTCC 5514*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014. **94**: p. 24-30.

72. Liang-Ming Whang, *et al.*, *Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil.* *Journal of Hazardous Materials*, 2008. **151**(1): p. 155-163.
73. 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**: p. 572-577.

ANNEX (A)

❖ A-1- Composition de la solution des éléments trace métallique

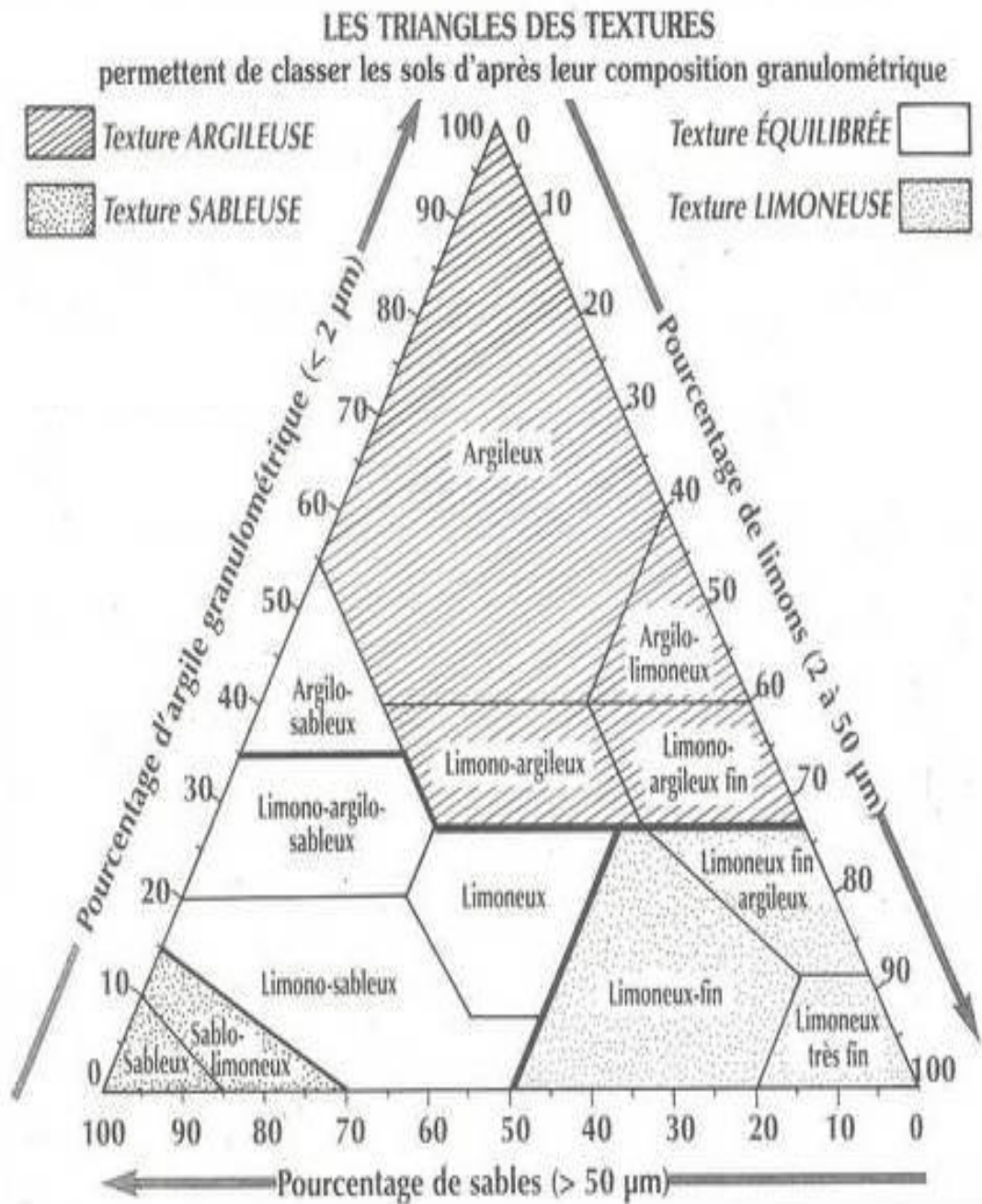
HCl 35%	6.7 ml
FeCl ₂ . 4H ₂ O	1500 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ .6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	2 mg
H ₂ O q.s.p	1000 ml

❖ A-2- Composition du milieu LB a pH= 7

Eléments	Concentration (g.L⁻¹)
Peptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	23

ANNEX (B)

- ❖ Triangle textural du Groupement d'Étude des Problèmes de Pédologie Appliquée GEPPA.



ANNEX (C)

❖ Diffractogramme d'échantillon SCTH

