

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

*Département des Sciences de la Nature et de la Vie*

## Mémoire

*Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de*

## MAGISTER

*Spécialité : Biologie*

*Option : Microbiologie Appliquée*

**Par : DJERBAOUI Amina Nesrine**

**THEME :**

***UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES  
AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE  
BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES  
SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR  
LES HYDROCARBURES***

**Soutenu publiquement le : 27/ 11 /2011**

**Devant le jury:**

**Président Mr HAMDI AISSA B. Professeur (U.K.M.O)**

**Encadreur Mme OULD EL HADJ A. Maitre de conférence A(U.K.M.O)**

**Examineur Mme BISSATI S. Maitre de conférence A(U.K.M.O)**

**Examineur Mme SIBOUKEUR O. Maitre de conférence A(U.K.M.O)**

**Invité Mr ARROUSSI A. Chef département d'analyses CRD (HMD)**

**Année universitaire : 2010 / 2011**

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

*Département des Sciences de la Nature et de la Vie*

## Mémoire

*Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de*

## MAGISTER

*Spécialité : Biologie*

*Option : Microbiologie Appliquée*

**Par : DJERBAOUI Amina Nesrine**

**THEME :**

***UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES  
AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE  
BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES  
SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR  
LES HYDROCARBURES***

**Soutenu publiquement le : 27/11/2011**

**Devant le jury:**

Président	Mr HAMDI AISSA B.	Professeur	(U.K.M.O)
Encadreur	Mme OULD EL HADJ A.	Maitre de conférence A	(U.K.M.O)
Examineur	Mme BISSATI S.	Maitre de conférence A	(U.K.M.O)
Examineur	Mme SIBOUKEUR O.	Maitre de conférence A	(U.K.M.O)
Invité	Mr ARROUSSI A.	Chef département d'analyses CRD	(HMD)

**Année universitaire : 2010 / 2011**

# *Dédicace*

---

*Je dédie ce mémoire :*

*A ma chère maman 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 mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.*

*A mon frère Imed Eddine et ma sœur Ikram qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.*

*A ma grande famille, grands et petits.*

*A mes chères copines :*

*Sameh, Imene, Nesma, Naouel et Hafida.*

*A tous mes ami(e)s de la promotion :*

*Amel, Sawsen, Amine, wafa, Atika, Asma, Fatma, Amina, Wacila, Sara et Amar.*

*Amina Nesrine*

# Remerciements

---

*Le présent travail a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla et le Laboratoire de Centre de Recherche et de Développement de SONATRACH (CRD) à Hassi Messaoud.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.*

*Je remercie très chaleureusement ma promotrice Mme OULD EL HADJ-KHELIL A., Maître de conférence A à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, 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.*

*J'adresse mes remerciements à mon Co-promoteur Mr ARROUSSI A., chef de département Analyses au CRD Hassi Messaoud, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour l'attention et les conseils qu'il m'a prodigués malgré ces multiples responsabilités.*

*Je remercie les membres du jury, Monsieur HAMDI AISSA., Professeur à l'U.K.M.O., Madame BISSATI S., maître de conférence A à l'U.K.M.O., et Madame SIBOUKEUR O., Maître de conférence A à l'U.K.M.O., qui ont bien voulu examiner ce travail.*

*Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont contribué à ma formation.*

*Mes vifs remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Aride, du laboratoire pédagogique à l'université Kasdi Merbah Ouargla, et du laboratoire d'analyses de CRD à Hassi Messaoud pour leurs aides et surtout pour leurs gentillesse.*

*Enfin, il me serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.*

*Amina Nesrine*

# TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	I
Liste des photos.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Résumé.....	V
ملخص.....	VI
Abstract.....	VII

## Partie 1 : Etude bibliographique

I. Généralités sur les hydrocarbures.....	03
I. 1. Définition des hydrocarbures.....	03
I. 2. Origine des hydrocarbures.....	03
I. 3. Nature des différents types d'hydrocarbures.....	04
I. 3. 1. Composés pétroliers.....	04
a. Hydrocarbures saturés.....	04
b. Hydrocarbures aromatiques.....	05
c. Composés polaires.....	05
d. Asphaltènes.....	05
I. 3. 2. Hydrocarbures biogènes.....	05
II. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures.....	06
II. 1. Types de polluants.....	06
II. 2. Evaluation des sites pollués.....	06
II. 3. Impact des hydrocarbures sur l'environnement.....	07
III. Devenir des hydrocarbures dans les sols (cas des hydrocarbures aliphatiques polycycliques « HAP »).....	07
III. 1. Le sol : système polyphasique.....	07
III. 2. Sorption des HAP dans le sol.....	08
III. 2. 1. Définition de la matière organique.....	08
III. 2. 2. Mobilité et transport des HAP dans le sol.....	08
IV. Méthodes de remédiation des sols pollués par les hydrocarbures.....	09
IV. 1. Traitement par remplacement.....	09
IV. 2. Traitements physico-chimiques.....	10
IV. 2. 1. Traitements thermiques.....	10
IV. 2. 2. Traitements physiques.....	10
IV. 2. 3. Traitements chimiques.....	10
IV. 3. Traitements biologiques.....	10
V. La biodégradation des hydrocarbures.....	11
V. 1. Définition.....	11
V. 2. Principe de la biodégradation.....	11
V. 3. Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures.....	12
V.4. Interactions huile / microorganismes et modes d'accession aux hydrocarbures....	12
V. 4. 1. Utilisation de la phase dissoute (le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse).....	13
V. 4. 2. Transfert interfacial direct (TID).....	13
V. 4. 3. Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA).....	13
V. 4. 4. Transfert micellaire.....	13

V.5. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation.....	14
V. 5. 1. Structure et nature du sol.....	13
V. 5. 2. Nature du polluant.....	14
a. Composition chimique des hydrocarbures.....	14
b. Etat physique et concentration des hydrocarbures dans le sol.....	14
V. 5. 3. Facteurs microbiologiques.....	15
V. 5. 4. Facteurs environnementaux.....	15
a. Influence de la température.....	15
b. Influence de l'oxygène.....	16
c. Influence des éléments nutritifs.....	16
d. Effet de la salinité.....	16
e. Effet du pH.....	17
f. Effet de l'humidité.....	17
VI. Remédiation des sols pollués par les HAP à l'aide de biosurfactants.....	17
VI. 1. Présentation des différents biosurfactants.....	18
VI. 1. 1. Définition.....	18
VI. 1. 2. Classification.....	18
VI. 1. 3. Utilisation des biosurfactants.....	19
VI. 2. Production des biosurfactants.....	19
VI. 2. 1. Microorganismes producteurs.....	19
VI. 2. 2. Paramètres influençant la production.....	20
a. Influence de la source de carbone.....	20
b. Influence de l'azote.....	20
c. Influence du pH.....	21
d. Influence des sels minéraux.....	21
e. Influence de l'oxygène.....	21
f. Influence de la vitesse d'agitation.....	21
VI. 2. 3. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	21
VI. 3. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants.....	22
VI. 3. 1. Concentration Micellaire Critique (CMC).....	22
VI. 3. 2. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation.....	22
VI. 3. 3. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température.....	23
VI. 4. Sorption des biosurfactants sur les solides.....	24
VI. 5. Toxicité et biodégradabilité.....	25
VI. 6. Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants.....	25
VI. 6. 1. Modes d'action.....	25
a. Mobilisation.....	25
b. Solubilisation.....	26
VI. 7. Technique de récupération et biodégradation des hydrocarbures assistées par les biosurfactants.....	26

## **Partie 2 : Matériel et méthodes**

I. Présentation de la zone d'étude.....	27
II. Matériel et méthodes.....	27
II. 1. Matériels biologique.....	27
II. 2. Méthodologie du travail.....	28
II. 2. 1. Prélèvement des échantillons.....	28
III. 2. 2. Analyses physicochimiques du sol.....	28

a. Texture du sol .....	28
b. Mesure de pH par électrométrie .....	28
c. Mesure de l'hygrométrie « humidité à 105°C » .....	29
d. Dosage des différents éléments chimiques .....	29
d <sub>1</sub> . Dosage du phosphore (Norme NFT 90-023).....	29
d <sub>2</sub> . Dosage des nitrates (Norme NFT 90-012).....	30
d <sub>3</sub> . Dosage des nitrites (Norme NFT 90-013).....	30
e. Dosage des hydrocarbures totaux .....	31
II. 2. 3. Analyses microbiologiques du sol.....	31
a. Dénombrement de la microflore totale.....	31
b. Isolement et purification des souches de <i>Pseudomonas</i> .....	32
b <sub>1</sub> . Isolement.....	32
b <sub>2</sub> . Purification.....	32
b <sub>3</sub> . Conservation des souches isolées.....	33
c. Identification des souches purifiées.....	33
c <sub>1</sub> . Etude morphologique .....	33
α. Aspect macroscopique.....	33
β. Aspect microscopique.....	33
c <sub>2</sub> . Etude biochimique.....	34
α. Métabolisme énergétique.....	34
β. Métabolisme glucidique.....	36
γ. Métabolisme protéique.....	37
δ. Croissance sur milieu King (King A et King B).....	38
II. 3. 4. Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant.....	39
a. Milieu de sélection.....	39
b. Suivi de la cinétique de croissance des souches pures isolées.....	39
c. Détermination de l'index d'émulsion E <sub>24</sub> .....	39
d. Détermination de la tension superficielle.....	41
II. 2. 5. Production de biosurfactant.....	41
a. Préparation de l'inoculum.....	41
b. Milieu de production et conditions de culture.....	41
c. Extraction du biosurfactant .....	41
II. 2. 6. Biodégradation du pétrole brut en présence de biosurfactant.....	42
III. 2. 7. Essai de remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol à l'aide du biosurfactant produit.....	42
a. Remobilisation par centrifugation.....	42
b. Remobilisation par lavages successifs.....	43

### **Partie 3 : Résultats et discussions**

I. Analyses physicochimiques du sol.....	44
I. 1. Granulométrie.....	44
I. 2. Autres Paramètres physicochimiques.....	44
I. 3. Teneur du sol en hydrocarbures .....	46
II. Analyses microbiologiques du sol.....	46
II. 1. Dénombrement de la microflore totale.....	46
II. 2. Isolement et identification des différentes souches de <i>Pseudomonas</i> .....	46
II. 2. 1. Caractères macroscopique.....	46
II. 2. 2. Caractères microscopique.....	47

II. 2. 3. Résultats des tests biochimiques .....	48
II. 2. 4. Identification des souches isolées.....	49
III. Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant.....	50
IV. Production de biosurfactant .....	52
V. Biodégradation du pétrole brut en présence de biosurfactant .....	55
VI. Essai de remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol à l'aide du biosurfactant produit.....	57
VI. 1. Remobilisation des hydrocarbures par centrifugation.....	57
VI. 2. Remobilisation des hydrocarbures par lavages successifs.....	58
<b>Conclusion</b> .....	61
<b>Références bibliographiques</b> .....	64
<b>Annexe</b>	



## Liste des figures

Figure 01 :	Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	12
Figure 02 :	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.....	22
Figure 03 :	Représentation schématique d'une molécule de biosurfactant.....	23
Figure 04 :	Solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température.....	23
Figure 05 :	Représentation schématique de l'adsorption de biosurfactant sur un sol.....	24
Figure 06 :	Représentation schématique d'un pompage et traitement avec injection de biosurfactant.....	26
Figure 07 :	Localisation de la région de Hassi Messaoud.....	27
Figure 08 :	Représentation schématique des étapes de remobilisation des hydrocarbures par les lavages successifs.....	43
Figure 09 :	Composition granulométrique du sol étudié.....	44
Figure 10 :	Triangle textural.....	44
Figure 11 :	Cinétique de croissance des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu M <sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut.....	50
Figure 12 :	Index d'émulsion des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu M <sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut.....	51
Figure 13 :	Tension superficielle des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu M <sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut.....	51
Figure 14 :	Suivi de la production de biosurfactant par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivée sur le milieu M <sub>2</sub> additionné de 4% d'huile tournesol.....	52
Figure 15 :	Suivi de la concentration microbienne durant la biodégradation du pétrole brut.....	55
Figure 16 :	Suivi des paramètres tensioactifs dans la biodégradation du pétrole brut (indice d'émulsion et tension superficiel).....	55
Figure 17 :	Suivi du taux de biodégradation des hydrocarbures totaux.....	55
Figure 18 :	Taux de remobilisation des hydrocarbures à différentes concentration de biosurfactant par centrifugation.....	57
Figure 19 :	Suivi de concentration des hydrocarbures mobilisés par les solutions de biosurfactant à des concentrations de 0,2 % et 0,5% par lavages successifs	58
Figure 20 :	Taux des hydrocarbures cumulés mobilisés par les solutions de biosurfactant à des concentrations de 0,2 % et 0,5% par lavages successifs	58

## Liste des photos

Photo 01 :	Spectrophotomètre type DR 2000 .....	29
Photo02 :	Analyseur d'hydrocarbures à infrarouge de type HORIBA.....	31
Photo03 :	Selection de la meilleure souche productrice de biosurfactant .....	39
Photo04 :	Biodégradation du pétrole brut en présence de biosurfactant.....	42
Photo05 :	Procédé de la remobilisation par lavages successifs.....	43
Photo06 :	Test biochimique des deux souches $S_1$ et $S_2$ par la galerie Api 20 E.....	49
Photo07 :	Aspect macroscopique de la souche $S_1$ .....	49
Photo08 :	Aspect microscopique de La souche $S_1$ (G X 100).....	49
Photo09 :	Aspect macroscopique de la souche $S_2$ .....	50
Photo10 :	Aspect microscopique de la souche $S_2$ (G X 100).....	50
Photo11 :	Suivi d'index d'émulsion au cours de la production de biosurfactant.....	52

## Liste des tableaux

Tableau I :	Principaux types de surfactants biologiques.....	19
Tableau II :	Résultats des analyses physicochimiques.....	44
Tableau III :	Caractères macroscopiques des colonies isolées sur le Cétrimide Agar.....	47
Tableau IV:	Observations microscopiques des souches.....	47
Tableau V:	Résultats des tests biochimiques.....	48

## Liste des abréviations

- ADH** : Arginine dihydrolase
- CMC** : Concentration micellaire critique
- ESR** : Evaluation simplifiée des risques
- HAP** : Hydrocarbures aromatique polycycliques
- LCFA<sub>S</sub>** : Acides gras à longues chaînes
- LDC** : Lysine décarboxylase
- MO** : Matière organique
- MOD** : Matière organique dissoute
- MOF** : Matière organique fraîche
- NAPL** : Non aqueous phase liquids
- ODC** : Ornithine décarboxylase
- ONP** : Orthonitrophényl
- ONPG** : Orthonitrophényl-  $\beta$ -D- galactopyranoside
- TDA** : Tryptophane désaminase
- TIA** : Transfert interfacial assisté par les biosurfactants
- TID** : Transfert interfacial direct
- TS** : Tension superficielle
- UFC** : Unité formant colonie

# UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR LES HYDROCARBURES

## Résumé :

L'objectif de notre étude est la bioremédiation d'un sol provenant d'un bourbier à Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures en utilisant sa microflore autochtone additionnée de leur propre biosurfactant produit dans les conditions de laboratoire.

Malgré les conditions environnementales et les caractères physicochimiques du sol étudié peu favorables, une biomasse microbienne non négligeable soit  $2.10^8$  UFC/g de sol a été mise en évidence. Parmi les souches existantes, deux ont été isolées : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas luteola*. La meilleure productrice de biosurfactant est *Pseudomonas aeruginosa* qui a pu produire en utilisant l'huile de tournesol comme seule source de carbone 2,4 g/l de biosurfactant capable de diminuer la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 26,06mN/m avec un index d'émulsion  $E_{24}$  de 50%.

Le taux de biodégradation du pétrole brut par la souche *Pseudomonas aeruginosa* est plus élevé en présence de biosurfactant (53,03%) qu'en son absence (35,27%). Par ailleurs, Le taux d'hydrocarbures mobilisés après le lavage du sol contenant 62,70 g d'hydrocarbures par kilogramme de sol par centrifugation est de 50,21% et de 76,13% en utilisant des faibles concentrations de biosurfactant de 0,2% et 0,5% respectivement. Les mêmes concentrations de biosurfactant ont permis de remobiliser 46,09% et 79,03% de contaminant lorsque les échantillons de sol sont soumis à plusieurs lavages successifs sans centrifugation.

La souche autochtone de *Pseudomonas aeruginosa* isolée est donc capable de produire un biosurfactant qui a un grand pouvoir dans la remobilisation des hydrocarbures et l'accélération de leur biodégradation.

**Mots clés :** Hydrocarbures, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, pétrole brut, biodégradation, remobilisation.

## استخدام سلالات بكتيرية محلية في إنتاج جزيئات السطح و المعالجة الحيوية لتربة حاسي مسعود الملوثة بالنفط

### ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو المعالجة الحيوية لتربة مستخرجة من مستنقع نفطي بحاسي مسعود عن طريق استعمال جراثيمه الطبيعية مضافا إليها جزيئات السطح المنتجة عن طريقها تحت الشروط المخبرية.

بالرغم من الظروف البيئية و الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة غيرالملائمة، إلا انه قمنا بتحديد كتلة حيوية جرثومية هائلة مقدرة ب  $2.10^8$  ووم/غ من التربة.من بين السلالات البكتيرية الموجودة، قمنا بعزل اثنتين: *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas luteola*. السلالة الأكثر إنتاجا لجزيئات السطح هي *Pseudomonas aeruginosa* التي استطاعت أن تنتج باستخدام زيت عباد الشمس كمصدر وحيد للكربون، 2،4 غ /ل من جزيئات السطح و خفض التوتر السطحي إلى غاية 26،06 م ن/م مع مؤشر استحلاب يقدر ب 50% .

نسبة التحلل البيولوجي للبتروال الخام عن طريق سلالة *Pseudomonas aeruginosa* كانت أعلى في وجود جزيئات السطح (53،03%) من غيابها (35،27%). من ناحية أخرى، نسبة النفط المسترجعة من تربة تحتوي على 62،70 غ من النفط في الكيلوغرام من التربة بعد غسلها عن طريق الطرد المركزي هي 50،21% و 76،13% باستعمال تراكيز ضعيفة من جزيئات السطح المقدرة ب 0،2% و 0،5% على التوالي. نفس هذه التراكيز من جزيئات السطح استطاعت استرجاع 46،09% و 79،03% من هذاالنفط الملوث عندما خضعت عينات التربة لغسيل متتالي بدون طرد مركزي.

السلالة المعزولة *Pseudomonas aeruginosa* تستطيع إذن إنتاج جزيئات السطح و التي لها القدرة على استرجاع النفط و تسريع تحلله البيولوجي.

الكلمات الدالة: *Pseudomonas aeruginosa* ، جزيئات السطح، البتروال الخام، التحلل البيولوجي، استرجاع النفط

# THE USE OF ABORIGINAL BACTERIAL STRAINS IN THE PRODUCTION OF BIOSURFACTANT AND THE BIOREMEDIATION OF HASSI MESSAOUD SOILS CONTAMINATED BY HYDROCARBONS

## **Abstract:**

The aim of our study is the bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbons from a quagmire in Hassi Messaoud by using its aboriginal microorganisms added their own biosurfactant produced in laboratory conditions.

Despite of the unfavorable environmental conditions and physicochemical characteristics of soil studied, significant microbial biomass that is  $2.10^8$  UCF/g of soil. Among the existing strains, two were isolated: *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas luteola*. The best biosurfactant producing is *Pseudomonas aeruginosa* that could produce by using sunflower oil as sole source of Carbone, 2,4 g/l of biosurfactant that reducing the surface tension of culture medium until 26,06 mN/m with an emulsion index of 50%.

The biodegradation rate of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* is higher in the presence of biosurfactant (53, 03%) than in its absence (35, 27%). Moreover, the rate of hydrocarbons mobilized after soil washing containing 62, 70 g of hydrocarbons per kilogram of soil by centrifugation is 50, 21% and 76, 13% by using low concentrations of biosurfactant that are 0,2% and 0,5% respectively. The same biosurfactant concentrations made it possible to remobilize 46, 09% and 79, 03% of contaminants when the soil samples are subjected to several successive washings without centrifugation.

Aboriginal strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated is capable to produce a biosurfactant that has a great power in the remobilization of hydrocarbons and the acceleration of their biodegradation.

**Keywords :** hydrocarbons, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, crudeoil, biodegradation, remobilization.



# *Introduction*



## Introduction

Depuis le siècle dernier et jusqu'à nos jours, l'importance de l'industrie pétrolière n'a cessé de croître et ceci grâce au rôle stratégique et politique que le pétrole joue sur la scène mondiale (SOLTANI, 2004).

Cependant, les effets dévastateurs de cette industrialisation et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors d'accidents (par exemple fuite de pétrole), de rejets ou de déversements volontaires, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles. Les conséquences de ces pollutions écologiques, peuvent avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et sur l'équilibre des écosystèmes (GABET, 2004).

Par ailleurs, le problème majeur rencontré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte de la nappe phréatique affectant ainsi la qualité des eaux, d'où la nécessité de leur traitement (PERFUMO et *al.*, 2010).

Les techniques de remédiation des sols reposent sur des processus physico-chimiques ou biologiques. Il existe des techniques modifiant totalement l'intégrité des sols qui sont le plus souvent très coûteuses, c'est le cas de l'excavation, la vitrification, l'incinération...etc. (BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999).

Une destechniques largement utilisée pour traiter les sols *in situ* est le "pompage et traitement", qui consiste en une circulation d'eau dans la zone de pollution, celle-ci étant retraitée en sortie. Cependant, du fait de la faible solubilité des hydrocarbures, les rendements obtenus demeurent faibles, et il est souvent nécessaire d'ajouter des substances supplémentaires pour favoriser leur désorption. Dans la plupart des cas, des co-solvants organiques ou des surfactants sont employés (GABET, 2004).

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (VIPULANANDAN et REN, 2000). C'est pourquoi, depuis quelques années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques ou **biosurfactants**. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces dans le cas de micro-organismes extrémophiles à des températures, des pH et des salinités extrêmes (BANAT *etal.*, 2000).

Devant l'ampleur que prend la pollution des sols dans les zones pétrolières et compte tenu de l'importance écologique et économique de la bioremédiation, nous nous proposons à travers cette étude à entreprendre la bioremédiation des sols contaminés par les hydrocarbures dans la région de Hassi Messaoud, en utilisant d'une part leur microflore autochtone et d'autre part, le biosurfactant produit par ces mêmes souches microbiennes dans les conditions expérimentales.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties. La première représente une analyse de la littérature scientifique où sont exposées les données relatives aux hydrocarbures (sources, nature, toxicité,...), à leur devenir dans les sols (sorption, dégradation...) et aux différentes techniques de réhabilitation des sols pollués par les hydrocarbures. La connaissance des propriétés et des modes d'action des biosurfactants a aussi fait l'objet de cette première partie bibliographique.

La seconde partie, est réservée à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de notre travail.

La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Le manuscrit est achevé par une conclusion et des perspectives.



*Etude*

*Bibliographique*

## I. Généralités sur les hydrocarbures

### I. 1. Définition des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques dont la formule chimique comprend uniquement des atomes de carbone (C) et d'hydrogène (H), ils ont pour formule brute  $C_nH_m$  où n et m sont deux entiers naturels (FRANENNEC *et al.*, 1998).

On distingue :

- ✓ les hydrocarbures saturés dont la chaîne carbonée est constituée uniquement de liaisons simples (ex : les alcanes).
- ✓ les hydrocarbures insaturés dont la chaîne carbonée présente au moins une liaison double ou triple (ex : les alcènes, les alcynes et les composés aromatiques).

De plus, il existe plusieurs enchaînements possibles :

- Les hydrocarbures linéaires où chaque atome de carbone n'est lié qu'à deux autres atomes de carbones au plus (ex : allènes).
- Les hydrocarbures ramifiés où un ou plusieurs atomes de carbone sont liés à plus de deux autres atomes de carbone (ex : isooctane).
- Les hydrocarbures cycliques où la chaîne carbonée se referme sur elle-même (ex.: cyclohexane)(SOLTANI, 2004).

### I. 2. Origine des hydrocarbures

Les rapides transformations chimiques et mécaniques du pétrole déversé dans l'environnement terrestre, du fait des mécanismes d'altération (évaporation, dissolution, photo oxydation, biodégradation...), sont souvent un obstacle à la détermination de son origine. Par conséquent, si un pétrole ne peut être rapidement analysé après son introduction dans le milieu naturel, son identification devient très difficile (BOCARD,2006).

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines :

*Les hydrocarbures fossiles*, qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires. Cela demande des caractéristiques géologiques passées spécifiques ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles.

*Les hydrocarbures actuels*, qui sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais)

et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroître cette production dans les zones actuellement gelées et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre.

*Les rejets industriels et urbains*, qui sont les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (SOLTANI, 2004).

### I. 3. Nature des différents types d'hydrocarbures

#### I. 3. 1. Composés pétroliers

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique (TISSOT et WELTE, 1984).

Selon SOLTANI (2004), Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentés en proportions variables selon l'origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %).

#### a. Hydrocarbures saturés

Parmi lesquels, on distingue :

*Les alcanes linéaires* (*n*-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

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

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

## **b. Hydrocarbures aromatiques**

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques.

En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier.

## **c. Composés polaires**

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que:

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

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

## **d. Asphaltènes**

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes O, N, S), d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables.

Les métaux sont également présents mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés.

### **I. 3. 2. Hydrocarbures biogènes**

Les organismes vivants biosynthétisent des hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et polyaromatiques condensés (SALIOT, 1981).

Le développement des techniques analytiques (chromatographiques et spectroscopiques) a démontré la complexité de ces composés présents en faibles quantités dans les colonnes d'eau et les sédiments. En effet, la biosynthèse et les mécanismes de transformations (dissolution, évaporation, photo-oxydation, adsorption désorption sur des particules, transformations biologiques, ...) conduisent à un mélange de composés dont la

spécificité dépend des organismes producteurs et des conditions physicochimiques du milieu. Ainsi, la stabilité de ces composés a fait d'eux des marqueurs biologiques et géochimiques d'une très grande valeur (SALIOT, 1981).

## **II. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures**

La notion de la pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'Homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (BERTRAND *et al.*, 1972).

L'étude de la pollution des hydrocarbures nécessite des dosages très précis ; 200 ppb d'hydrocarbures dans l'eau sont suffisantes pour altérer son odeur. On constate que 10 ans peuvent s'écouler entre un déversement dans le sol et son arrivée dans une nappe aquifère (BERTRAND *et al.*, 1972).

### **II. 1. Types de polluants**

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la biodépollution est possible sont :

- ✓ Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuels, kérosène, huiles minérales).
- ✓ Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages) (BERTRAND *et al.*, 1972).

### **II. 2. Evaluation des sites pollués**

L'évaluation de la contamination des sites suspects et l'estimation du danger qui l'associe est un grand problème. L'évaluation simplifiée des risques (ESR) concerne leur impact potentiel sur les cibles définies. Le risque est défini par la combinaison de trois facteurs :

- ✓ Le danger de la source polluante ; lié à la nature des substances polluantes présentes sur le site et à leur quantité.
- ✓ Le transfert des substances de la source vers les milieux.
- ✓ Une cible : l'Homme seul, ou l'environnement (l'Homme, faune, flore...) (BERTRAND *et al.*, 1972).

## II. 3. Impact des hydrocarbures sur l'environnement

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées (SOLTANI, 2004).

Les risques que font courir les pollutions du milieu souterrain par les hydrocarbures concernent en premier la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (eau potable en particulier) (SCRIBAN, 1999).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'Homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (SOLTANI, 2004).

Au niveau de la phase gazeuse du sol, les risques sont réels avec la présence de substances volatiles : émanations toxiques, incendies et explosions avec des produits inflammables et explosifs en atmosphère confinée (SCRIBAN, 1999).

## III. Devenir des hydrocarbures dans le sol (cas des hydrocarbures aliphatiques polycycliques « HAP »)

### III. 1. Le sol : système polyphasique

Le sol peut être défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Du point de vue pédologique, le sol représente la partie des formations naturelles superficielles soumises aux processus pédologiques et subissant des évolutions plus ou moins importantes de la composition chimique et de la constitution minéralogique. Le sol résulte de l'évolution de la roche mère sous-jacente transformée en surface par divers facteurs (climat, nature de la roche, activité biologique...) (GABET, 2004).

Le sol est donc un système hétérogène et complexe. Il est composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol (qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules) et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol (GABET, 2004).

Les deux fractions intervenant principalement dans la sorption des HAP sont :

**La fraction minérale**, qui est principalement constituée de minéraux primaires (quartz, feldspaths, micas ...), de minéraux secondaires et les oxydes métalliques ou les argiles



(DUCHAUFOR, 2001). Généralement, cette fraction n'intervient pas ou peu dans la sorption des HAP sauf quand la teneur en carbone organique du sol est faible (HWANG *et al.*, 2003).

**La fraction organique**, qui est formée en grande partie de cellulose et d'hémicellulose, de lignine et de tanins en plus faibles pourcentages, venant du matériel décomposé. Cette matière organique (MO) contient également de petites quantités de protéines et des fragments d'hydrates de carbone, des composés aminés, phénoliques ou aromatiques issus de l'activité biologique (PIGNATELLO, 1998). D'autres types de molécules peuvent entrer dans la composition de la MO du sol, tels que les acides gras, qui sont incorporés à la matrice organique par estérification (GOBE *et al.*, 2000).

### **III. 2. Sorption des HAP dans le sol**

#### **III. 2. 1. Définition de la matière organique**

La matière organique est la partie non vivante de la fraction organique du sol. Elle est constituée d'un mélange hétérogène de résidus de décomposition microbienne et de matière organique fraîche (MOF) (KÖGEL KNABNER, 2002).

La minéralisation de la MO est un processus continu, mais les différentes phases de décomposition engendrent de nombreux produits de dégradation. Ainsi, on distingue la litière, qui est une fraction de la MO faiblement décomposée, et l'humus qui représente la MO transformée et qui est généralement incorporée à la phase minérale du sol (DUCHAUFOR, 2001).

#### **III. 2. 2. Mobilité et transport des HAP dans les sols**

Bien que les HAP soient fortement sorbés aux couches superficielles riches en MO, ils sont également retrouvés dans les couches plus profondes du sol, caractéristique d'un phénomène de lessivage. Le partage des HAP entre le sol, l'eau du sol et la matière organique dissoute (MOD) est crucial pour observer le lessivage (WILCKE, 2000).

Il peut y avoir une contamination des eaux souterraines par les HAP suite à leur lixiviation à travers les sols, surtout quand ils sont accompagnés de solvants organiques mobiles (ANONYME 1, 1994).

## IV. Méthodes de remédiation des sols pollués par les hydrocarbures

Plusieurs techniques de traitement ont vu le jour afin de tenter de restaurer les sites pollués classés dangereux pour les écosystèmes et la santé humaine (BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999).

L'intérêt d'une méthode se mesure à son efficacité, à son coût, à la facilité de sa mise en œuvre, à la qualité du sol obtenu après traitement ainsi qu'à la facilité de retraitement des sous-produits générés (BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999).

Pour réaliser une action curative sur un site reconnu contaminé par les hydrocarbures, plusieurs filières sont envisageables : traitements physiques, chimiques ou biologiques.

Le choix de la filière obéit à des impératifs technologiques (moyens disponibles, volume à traiter, nature du sol et objectifs à atteindre) et économiques (RHODIA, 1998).

Il existe trois grandes classes de techniques de décontamination de sol :

- ✓ Techniques *in-situ* : sans excavation des sols, la pollution est traitée sur place.
- ✓ Techniques sur-site : les terres polluées sont excavées mais sont tout de même traitées.
- ✓ Techniques hors-site : on procède à l'excavation du sol et les terres polluées, qui sont ensuite traitées hors du site.

En outre, la technique de dépollution ne doit pas être plus polluante que le résultat de la pollution (pas de transfert de polluant) (LECOMTE, 1995).

Les opérations de traitements des sols pollués peuvent se faire de plusieurs manières :

### IV. 1. Traitement par remplacement

Historiquement, il s'agit de la première méthode employée : on décape le sol contaminé sur toute l'épaisseur polluée et on remplace la terre polluée par la terre saine prélevée ailleurs (LECOMTE, 1995).

Outre les coûts de transport que cela induit, les coûts liés au retraitement ou au stockage de la terre contaminée sont proportionnels au volume déplacé, qui dépend directement de la surface et de la profondeur de la zone polluée (LECOMTE, 1995).

## **IV. 2. Traitements physico-chimiques**

### **IV. 2. 1. Traitements thermiques**

Dans les techniques basées sur un traitement thermique, la chaleur est utilisée pour modifier physiquement ou chimiquement les polluants (SOLTANI, 2004).

Deux techniques *ex-situ* sont utilisées, l'incinération et la désorption, et sont employées pour la décontamination des sols pollués par les produits organiques. Ces technologies consistent à utiliser les hautes températures pour détruire les polluants en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et plus différents autres résidus de combustion (GABET,2004).

L'incinération se réalise en deux étapes ; une première à 400°C, dite de volatilisation et une seconde dite de destruction à une température supérieur à 1000°C. L'incinération est la seule technique qui détruit réellement les polluants. Cependant, cette technique est extrêmement coûteuse et les fumées toxiques qui se dégagent lors de la combustion nécessitent d'importants traitements qui engendrent des surcoûts (GABET,2004).

### **IV. 2. 2. Traitements physiques**

Les traitements physiques constituent la majorité des techniques mises en œuvre actuellement ; elles consistent à séparer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire. Les procédés d'adsorption sur charbon, d'extraction, de lavage et de confinement sont les plus souvent utilisés (SCRIBAN, 1999).

### **IV. 2. 3. Traitements chimiques**

Les méthodes chimiques telles que l'oxydation ou la neutralisation ont pour but de détruire les polluants ou de les transformer en une forme moins nocive pour l'environnement, en provoquant des réactions chimiques entre le polluant et le réactif ajouté. Ils peuvent être applicables *in-situ* ou après excavation des sols (BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999).

La majorité des procédés de traitements chimiques exigent que les sols soient sous forme de boues où les contaminants soient mobilisés dans un milieu liquide (GABET,2004).

## **IV. 3. Traitements biologiques**

Les procédés biologiques permettent de dégrader les polluants par l'action de microorganismes (bactéries, champignons...). Ils peuvent être utilisés seuls ou en complément d'une autre technique. La décontamination par voie biologique consiste donc à

stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone (COLIN, 2000).

La décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* en traitant le sol excavé (COLIN, 2000).

Pour la dégradation des hydrocarbures, différents micro-organismes sont utilisés tels que *Arthrobacter*, *Novocardia* ou *Pseudomonas*. Si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants ou est peu abondante, des souches bactériennes performantes allochtones peuvent être ajoutées au sol (COLIN, 2000).

Les procédés de traitements biologiques sont : le bioventing, le biosparging, le pompage et traitement, le traitement bioréacteur (bioslurry) et le traitement en tas (biotertre, les andains et landfarming) (VOGEL et BALLERINI, 2001).

## **V. La biodégradation des hydrocarbures**

L'utilisation de méthodes biologiques dans la dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures se basant sur le phénomène de la biodégradation par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (SOLTANI, 2004).

### **V. 1. Définition**

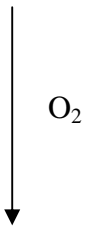
La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminant en différents sous produits par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phases du polluant (liquide, solide, gazeuse) (LECOMTE, 1995).

### **V. 2. Principe de la biodégradation**

La biodégradation est un phénomène naturel. Elle est le résultat de la dégradation de molécules organiques par les microorganismes (bactéries, champignons...) dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone qui est utilisé comme source d'énergie. Cette réaction met en jeu deux autres éléments, l'azote et le phosphore, qui participent à la synthèse protéique ; lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène, on parle de condition d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane (JOSE, 1999).

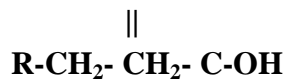


Chaîne hydrocarbonée

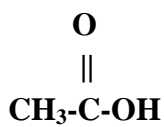


Oxydation de la longue chaîne hydrocarbonée en acide.

O



$\beta$  oxydation sous l'action enzymatique des microorganismes et del'oxygène O<sub>2</sub> la chaîne hydrocarbonée est dégradée en acide acétique.



Dégradation de l'acide acétique en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O dans le cycle de Krebs.

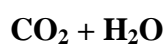
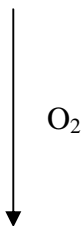


Figure 01 : Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures (LECOMTE, 1995).

La littérature concernant l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes indique que la croissance cellulaire dépend des processus de transport des hydrocarbures à la surface cellulaire et de passage à travers l'enveloppe cellulaire jusqu'au cytoplasme (SOLTANI, 2004).

Dans les conditions naturelles, la biodégradation des hydrocarbures est un processus lent et complexe, son mécanisme est décrit dans la **figure1**.

Elle se déroule selon une réaction d'oxydation en chaîne, les hydrocarbures sont transformés par cassures successives en molécules de moins en moins complexe jusqu'à l'obtention de sous-produits simples qui sont représentés par l'H<sub>2</sub>O et le CO<sub>2</sub> avec renouvellement de la biomasse (LECOMTE, 1995).

### V. 3. Microorganismes aptes à biodégrader les hydrocarbures

L'existence d'organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures a été signalée dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle par SOHGEN (GATELLIER, 1970).

Les bactéries et les champignons sont des acteurs essentiels dans le recyclage des composés organiques de toutes natures, contribuant ainsi à la biodégradation d'une foule de substances utilisées comme source d'énergie ou comme source de carbone directement assimilable par les cellules (PELMONT, 1995).

La dégradation des hydrocarbures dans les milieux marin et terrestre est réalisée par les bactéries suivantes : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Actinomycètes*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium*(CHAMPAGNAT et ADRIAN, 1974).

Selon PELMONT, (1995), Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont les suivantes :

- Génétiquement stable ;
- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage de longue durée ;
- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers ;
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimum ;
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques ;
- 63% pigmentés (orange, jaune et rouge) ;
- La majorité des souches bâtonnées Gram négatives ;

- 32% des bactéries motiles ou mobiles ;
- 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux.

#### **V.4. Interactions huile / microorganismes et modes d'accès aux hydrocarbures**

Depuis longtemps, la faible dégradation de plusieurs contaminants a été attribuée à leur récalcitrance (résistance à l'attaque enzymatique). Mais, depuis le début des années 90, il a été avancé que c'est plutôt leur très basse hydro-solubilité qui expliquerait leur catabolisme difficile et limité (COMEAU, 1999).

Selon SCOTT et FINNERTY (1976), le mécanisme d'accès impliqué dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi des microorganismes est mal élucidé bien que des gouttelettes d'hydrocarbures soient fréquemment observées dans la cellule. Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accès par les microorganismes peut se faire selon quatre modes que l'on peut décrire comme suit :

##### **V. 4. 1. Utilisation de la phase dissoute (le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse)**

C'est l'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisation extra cellulaire (SOLTANI, 2004).

##### **V. 4. 2. Transfert interfacial direct (TID)**

Dans ce cas, le microorganisme ne produit pas de biosurfactants mais adhère du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface : phase hydrophobe / phase aqueuse (SCRIBAN, 1999).

##### **V. 4. 3. Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA)**

Des biosurfactants sont produits par la bactérie. Ils accélèrent le transfert de façon importante en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobes et hydrophiles (émulsification) (SCRIBAN, 1999).

##### **V. 4. 4. Transfert micellaire**

Le transfert micellaire se fait où l'hydrocarbure est pseudo-soluble à l'intérieur de micelle formé par les biosurfactants produits par les microorganismes (SCRIBAN, 1999).

## **V.5. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation**

Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales (LEAHY et COLWELI, 1990).

Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont :

### **V. 5. 1. Structure et nature du sol**

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est important de connaître la structure et la nature du sol à traiter (LECOMTE, 1995).

La taille des pores et les propriétés de l'eau et de l'air dans ces pores sont des facteurs spécifiques de chaque sol (GIRARD *et al.*, 2005).

Les particules élémentaires du sol sont généralement liées entre elles par les forces électrostatiques formant des agrégats plus ou moins volumineuses groupés en unités structurales du sol. En effet, les agrégats tendent à diminuer l'activité microbienne dans le sol de manière indirecte. Par un ralentissement de la diffusion de l'oxygène et l'apport des nutriments à l'intérieur de l'unité structurale et par la protection mécanique des substrats qu'elle renferme (GIRARD *et al.*, 2005).

### **V. 5. 2. Nature du polluant**

#### **a. Composition chimique des hydrocarbures**

Les composés pétroliers diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (SOLTANI, 2004).

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition ; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd (SOLTANI, 2004).

#### **b. Etat physique et concentration des hydrocarbures dans le sol**

La dispersion artificielle a été étudiée comme moyen d'augmentation de la surface de contact entre les hydrocarbures et les membranes cellulaires des microorganismes. Cependant,



les dispersants sont dans la plupart du temps toxiques et peuvent conduire à des dommages dans la faune et la flore, et ils peuvent aussi inhiber le processus microbien (LEAHY et COLWELL,1990).

### V. 5. 3. Facteurs microbiologiques

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses (COLIN, 2000).

L'action toxique du polluant peut provoquer un ralentissement de l'activité de la microflore du sol (VOGEL et BALLERINI,2001).

Dans un habitat bien défini, il est reconnu que les différentes communautés microbiennes autochtones ont eu la possibilité de développer des interactions :

- **Positives** : le concept de commensalisme implique l'action normale d'une population qui modifie l'environnement de telle façon que ces modifications permettent le développement d'une espèce (VOGEL et BALLERINI, 2001).
- **Négatives** : parmi ces interactions, le phénomène dénommé amensalisme ou « antagonisme » qui implique la production par une espèce donnée de métabolites inhibiteurs pour d'autre population qui ne pourront ainsi venir coloniser l'habitat (VOGEL et BALLERINI, 2001).

### V. 5. 4. Facteurs environnementaux

#### a. Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (LEAHY et COLWELL, 1990).

Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (WALWORTH *et al.*, 2001).

Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C. Au delà de la température optimale de

croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique (BOSSARD et BARTHA, 1984).

RÖLING *et al.*, (2003) mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au delà de 80-90°C malgré l'isolement de bactéries thermophiles.

### **b. Influence de l'oxygène**

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable. Les conditions aérobies sont, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement (LEAHY et COLWELL, 1990).

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols, MARIN *et al.* (1996), ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux de 10 % par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation.

Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole (SOLTANI, 2004).

### **c. Influence des éléments nutritifs**

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (LEAHY et COLWELL, 1990).

Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple: dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes. L'azote et le phosphore sont donc des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (BERTRAND et MILLE, 1989).

### **d. Effet de la salinité**

Les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la biodégradation des hydrocarbures. Des chercheurs ont trouvé que la biodégradation des hydrocarbures est maximale pour une concentration en sel de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci (SOLTANI, 2004).

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

#### e. Effet du pH

Les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (LEAHY et COLWELL, 1990).

DIBBLE et BARTHA (1979) et HAMBRICK *et al.* (1980) ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

#### f. Effet de l'humidité

L'humidité est un paramètre important dans le processus de la biodégradation car l'eau est un élément indispensable au développement des bactéries. Les bactéries sont influencées par la concentration osmotique et la disponibilité en eau dans le sol, pour cela, GABET (2004) a signalé que pour une meilleure activité de biodégradation, l'humidité doit être de 25 à 90%.

### VI. Remédiation des sols pollués par les HAP à l'aide de biosurfactants

Il est nécessaire de combiner différentes techniques de traitements entre elles, et l'ajout des biosurfactants pour favoriser la désorption des molécules est souvent choisi. Les tensioactifs, ou "surfactants" ("Surface Active Agent") sont des molécules capables de réduire les tensions inter-faciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide. Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants (BANAT *et al.*, 2000).

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés de pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (VIPULANANDAN et REN, 2000). C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou **biosurfactants**. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont

également efficaces, dans le cas de micro-organismes extrémophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes (BANAT *et al.*, 2000).

## **VI. 1. Présentation des différents biosurfactants**

### **VI. 1. 1. Définition**

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. 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 (DESAI et BANAT, 1997).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants: les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (WEST et HARWELL, 1992).

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (WEST et HARWELL, 1992).

### **VI. 1. 2. Classification**

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (HEALY *et al.*, 1996).

*Les glycolipides*, sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (RONet ROSENBERG, 2002).

*Les lipopeptides*, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornitine sont les plus connus (HEALY *et al.*, 1996).

Tableau I : Principaux types de surfactants biologiques (BANAT et al., 2000)

Groupe	Biosurfactant	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i>
	Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida antartica</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
Acides gras	Acide gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou polymériques	Emul san	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

*Les phospholipides*, sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique. BOGNOLO (1999) indique que bien que présents dans tous les micro-organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire.

*Les lipopolysaccharides* ou *polymériques*, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras(HEALY *et al.*, 1996).

*Les acides gras* et *lipides neutres*, sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée(HEALY *et al.*, 1996).

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (DESAI et BANAT, 1997).

### **VI. 1. 3.Utilisation des biosurfactants**

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (BANAT *et al.*, 2000). C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique (CHRISTOFI et IVSHINA, 2002).

### **VI. 2. Production des biosurfactants**

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, MAKKAR et CAMEOTRA (2002) indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...). Une étude réalisée par MERCADE et MANRESA (1994) reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.L<sup>-1</sup> pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

#### **VI. 2. 1. Microorganismes producteurs**

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (**Tableau I**).

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale

entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (MATA SANDOVAL *et al.*, 2000).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de quatre rhamnolipides (VAN DYKE *et al.*, 1993).

Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (BANAT *et al.*, 2000). La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance. Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (THANGAMANI et SHREVE, 1994).

## VI. 2. 2. Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec la composition du milieu (source de carbone ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc).

### a. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive (DESAI et BANAT, 1997). En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes (CAMEOTRA et MAKKAR, 1998).

### b. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité

limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices (LANG et WULLBRANDT, 1999).

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant (GABET, 2004).

### **c. Influence du pH**

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardiacorynebacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 (ARINO *et al.*, 1996).

### **d. Influence des sels minéraux**

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (GUERRA SANTOS *et al.*, 1986).

### **e. Influence de l'oxygène**

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (GABET, 2004).

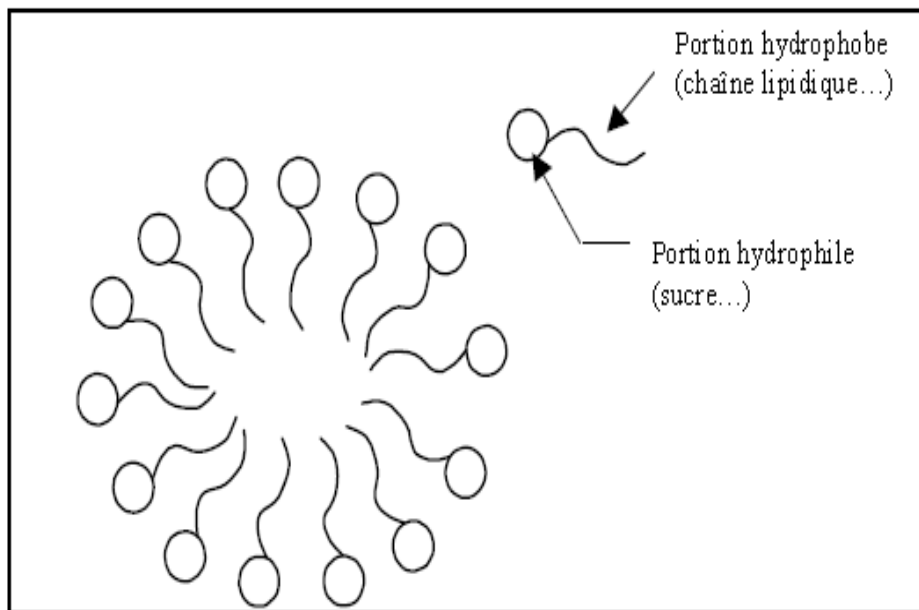
### **f. Influence de la vitesse d'agitation**

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (DESAI et BANAT, 1997).

## **VI. 2. 3. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance**

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





**Figure 02 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant(GABET, 2004).**

être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices (DESAI et BANAT, 1997).

### **VI. 3. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants**

#### **VI. 3. 1. 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 (PORE, 1992).

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 (HAIGH, 1996).

En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure 2**).

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  en solution aqueuse). Pour de nombreux biosurfactants, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  (ABALOS *et al.*, 2001).

La CMC d'un biosurfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (EDWARDS *et al.*, 1991).

Les effets des électrolytes sur la CMC sont plus prononcés pour les biosurfactants ioniques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (HAIGH, 1996).

#### **VI. 3. 2. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation**

Les micelles de biosurfactants s'arrangent en différentes microstructures sphériques, globulaires ou cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bicouches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées (CHAMPION *et al.*, 1995).

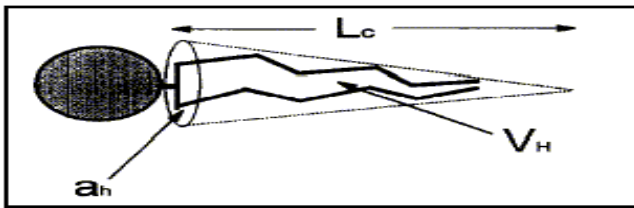


Figure 03 : Représentation schématique d'une molécule de biosurfactant (BAI *et al.*, 1998).

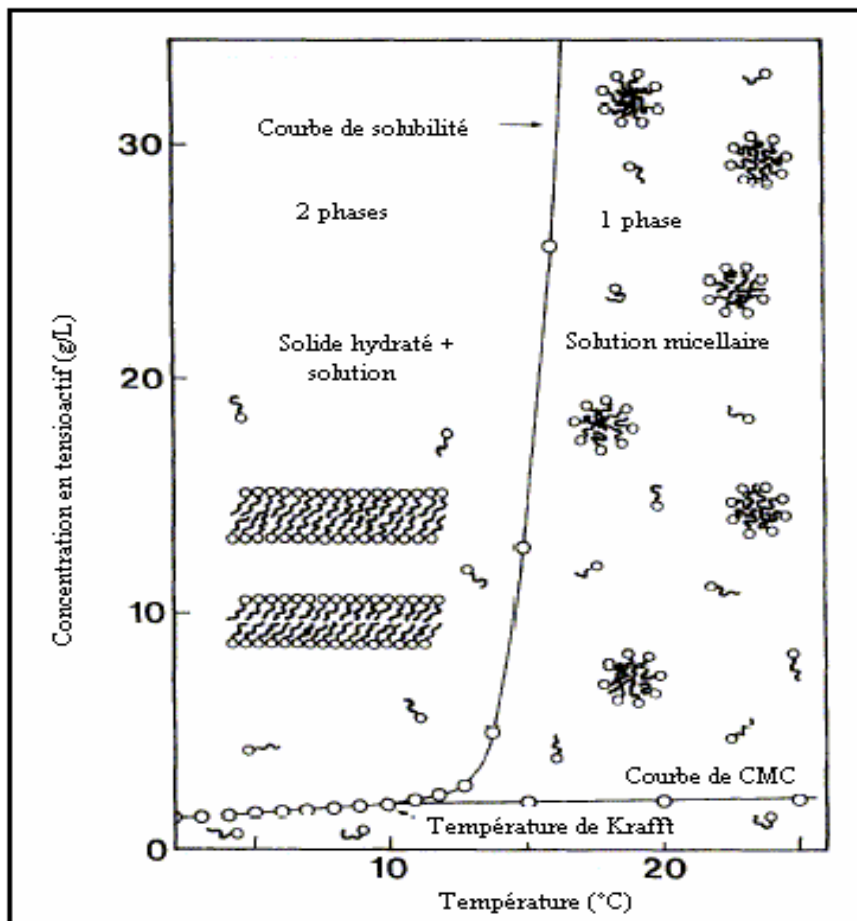


Figure 04 : Solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température (SHINODA et FONTELL, 1995)

Le volume intérieur des micelles dépend de la forme des micelles et du nombre d'agrégation (nombre de monomères constituant la micelle). Généralement, il faut de 50 à 100 monomères pour former une micelle (CHRISTOFI et IVSHINA, 2002).

Le nombre d'agrégation augmente quand l'aire de la section transversale de la partie hydrophile ( $a_h$ ) diminue (**Figure 3**).

$L_c$  représente la longueur de la chaîne hydrophobe et  $V_H$  le volume occupé par celle-ci. La forme de la micelle dépend également de la structure du biosurfactant. À l'aide d'une approche géométrique, la forme de la micelle peut être déterminée par le rapport  $V_H/(a_h * L_c)$ , si ce rapport est inférieur à 1/3, la micelle est de forme sphérique (BAI et al., 1998).

Quand le nombre d'agrégation augmente, le volume intérieur de la micelle augmente (BAI et al., 1998).

La morphologie des agrégats varie avec le pH, la concentration en biosurfactant, la température ou la force ionique (CHAMPION et al., 1995).

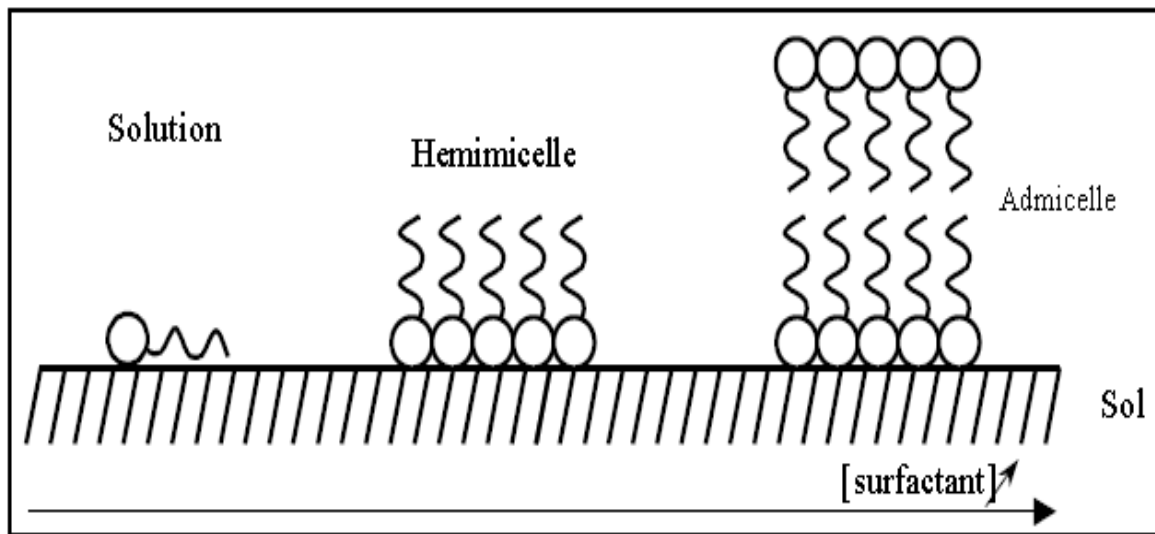
### VI. 3. 3. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température

Pour les biosurfactants ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température fait apparaître un comportement irrégulier : à partir d'une certaine température  $T_k$ , dite température de **Krafft**, la solubilité augmente brusquement. Sur ce même graphe, la courbe représentant la CMC en fonction de la température a été ajoutée (**Figure 4**) (SHINODA et FONTELL, 1995).

En dessous du point de Krafft, la solubilité est faible ; elle est uniquement due aux monomères présents en solution. Lorsque ces derniers atteignent la saturation (à la CMC), le biosurfactant précipite sous forme de solide hydraté. Au-dessus de  $T_k$ , la solubilité croît rapidement avec la température : ceci est lié à la formation de micelles puisque l'activité des micelles reste constante (SHINODA et FONTELL, 1995).

Ce sont les micelles qui font croître la solubilité. Le biosurfactant se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères (GABET, 2004).

Les biosurfactants non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble (GABET, 2004).



**Figure 05 : Représentation schématique de l'adsorption de biosurfactant sur un sol (WEST et HARWELL, 1992)**

#### VI. 4. Sorption des biosurfactants sur les solides

Les biosurfactants utilisés lors des traitements de sols pollués voient leur efficacité diminuer suite à deux phénomènes principaux : la **précipitation** du biosurfactants ou la **sorption** de ce dernier au sol. Ces deux phénomènes aboutissent à une réduction en phase aqueuse de la concentration active en surfactant pour mobiliser et transporter les contaminants organiques dans les sols et parallèlement à une augmentation des coûts de dépollution (WEST et HARWELL, 1992).

L'adsorption résulte d'interactions "énergétiquement" favorables entre l'adsorbat (le sol) et le soluté. C'est un processus complexe car il peut être influencé par tout composé solide, solvant ou soluté présent dans le système. Cette adsorption peut-être de nature physique ou chimique, la différence entre les deux dépendant de la nature des forces mises en jeu (KARICKHOFF *et al.*, 1979 ; SOMASUNDARAN et KRISHNAKUMAR, 1997).

Plusieurs auteurs (ABDUL et GIBSON, 1991 ; WEST et HARWELL, 1992 ; EDWARDS *et al.*, 1994) travaillant avec des surfactants chimiques anioniques ont proposé un modèle selon lequel l'adsorption des surfactants comprendrait trois étapes (**Figure 5**).

La première serait un recouvrement partiel de la surface des sols ou sédiments par des monomères. Cette étape est contrôlée par des interactions électrostatiques entre les monomères anioniques du surfactant et les sites de surface de charge opposée. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en surfactant, les monomères s'auto-associent sous l'effet de forces électrostatiques et hydrophobes, pour donner des hémimicelles puis des admicelles.

Une fois que la concentration en surfactant sorbé à la surface du sol est maximale, tout ajout supplémentaire de surfactant restera en solution pour solubiliser les HAP.

Le type de surfactant influe sur sa sorption. SOMASUNDARAN et KRISHNAKUMAR (1997) indiquent que l'adsorption des surfactants non ioniques diffère de celle des surfactants ioniques du fait de l'absence d'interactions électrostatiques.

Les biosurfactants anioniques sont préférentiellement choisis lors des traitements de sols pollués car ils se sorbent moins aux surfaces minérales, mais ils ont la particularité de précipiter et de déstabiliser les particules fines des sols (DWARAKANATH *et al.*, 1999).

## VI. 5. Toxicité et biodégradabilité

Des tests de toxicité réalisés par HABA *et al.*, (2003) ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

Une étude réalisée par DESCHENES *et al.*, (1996) reporte que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations. Ces auteurs indiquent de plus que ce biosurfactant était biodégradable.

## VI. 6. Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants

Bien qu'utilisés dans de nombreux domaines, les surfactants d'origine biologique voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sols (GABET, 2004).

La remédiation assistée par les biosurfactants présente de nombreux avantages. WEST et HARWELL (1992) indiquent que les biosurfactants cationiques se sorbent fortement aux sols. Or, les molécules d'origine biologique ont le plus souvent un caractère non ionique ou anionique qui les rend moins sensibles à la sorption sur les sols. De plus, ils ont des CMC moindres que leur homologues chimiques, ce qui les rend efficaces à de plus faibles concentrations. Enfin le caractère peu toxique et biodégradable des biosurfactants facilite leur utilisation.

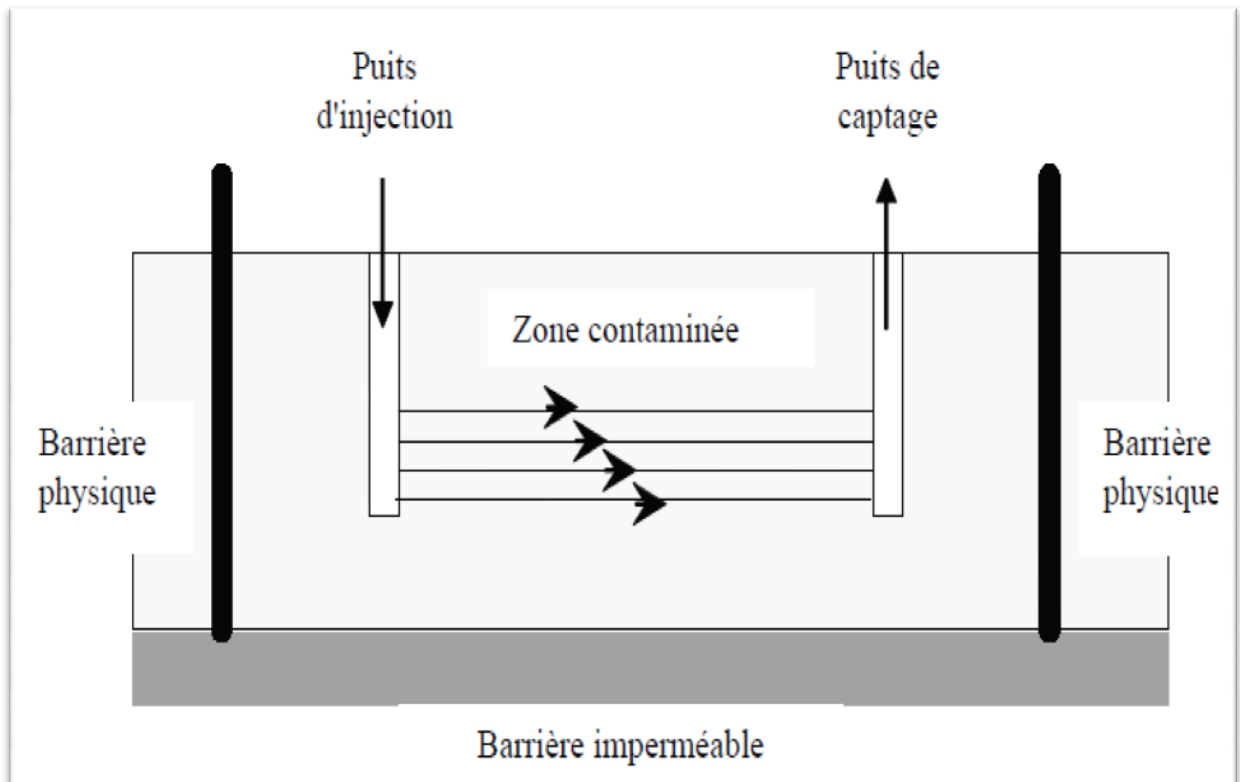
### VI. 6. 1. Modes d'action

Les biosurfactants agissent de façons différentes : par *mobilisation* et par *solubilisation*.

#### a. Mobilisation

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants à diminuer les tensions interfaciales entre les NAPL (non aqueous phase liquids) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface du NAPL (MC CRAY *et al.*, 2001).

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de *déplacement* et une étape de *dispersion*. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions (BAI *et al.*, 1997).



**Figure 06 : Représentation schématique d'un pompage et traitement avec injection de biosurfactant (AUGESTIJN *et al.*, 1994).**



## **b. Solubilisation**

La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes (GABET, 2004).

Généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effets sur la plupart des hydrocarbures (PENNEL*et al.*, 1993).

Au-dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des hydrocarbures dans les micelles apparaît, permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente (GABET, 2004).

Ainsi, pour que les micelles se forment, il faut ajouter suffisamment de biosurfactant pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC réelle. La sorption dépend donc de la concentration de biosurfactant en solution (VAN DYKE *et al.*, 1993).

BAI *et al.* (1998) indiquent qu'à de fortes concentrations, la solubilisation est le mécanisme principal.

## **VI. 7. Technique de récupération et biodégradation des hydrocarbures assistées par les biosurfactants**

La technique de pompage et traitement est utilisée pour la récupération des hydrocarbures. Elle permet de confiner hydrauliquement la pollution et de procéder à une décontamination en surface de l'eau pompée afin de pouvoir la réinjecter (**Figure 6**).

Cette technique nécessite souvent l'ajout de biosurfactant pour favoriser la désorption des hydrocarbures (CÖME et DUCREUX, 2001).

L'addition de ces biosurfactants en solution dans la technique de pompage et traitement peut aussi être un atout aux procédés de biodégradation en augmentant la biodisponibilité des hydrocarbures aux microorganismes (LAPOINTE, 1996).



*Matériel et*  
*Méthodes*

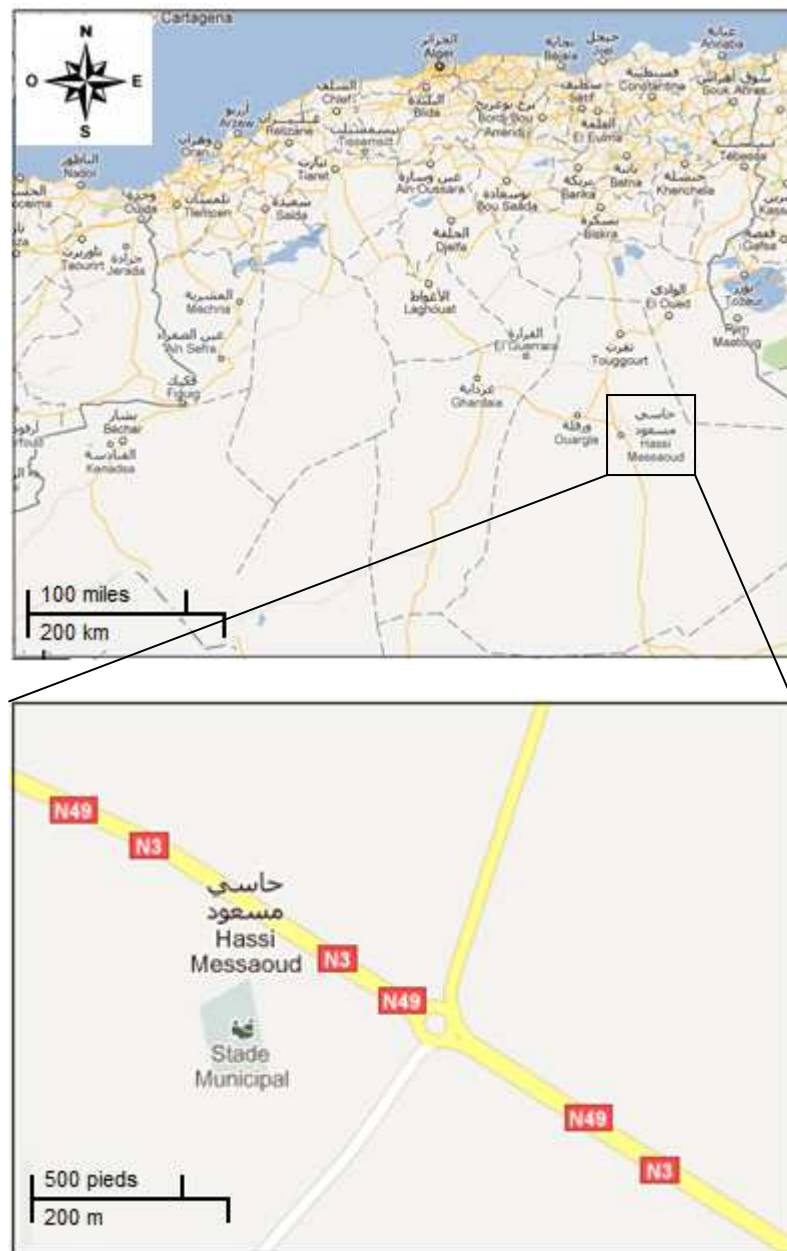


Figure 07 : Localisation de la région de Hassi Messaoud (Google Map 2011).

## I. Présentation de la zone d'étude

Des échantillons de sol ont été prélevés dans un borbier où ont été déversées les boues de forage. Ce borbier est situé dans le Centre Industriel Sud de Hassi Messaoud.

Le gisement de Hassi Messaoud est l'un des plus grands champs pétroliers au monde. Sa superficie est de 2000 Km<sup>2</sup> et il se trouve à 142 m au dessus du niveau de la mer (ANONYME 2, 2011).

La découverte du champ remonte à 1956 et sa mise en production a démarré en 1958. Depuis cette date, le champ ne cesse de produire (ANONYME 2, 2011).

Les caractéristiques géoclimatiques du champ de Hassi Messaoud sont :

- **Position:** - 870 Km au Sud-Est d'Alger.
- 80 Km à L'Est d'Ouargla (**Figure 07**).
- **Climat:** Désertique
- **Température:** 0°C - 47°C.
- **Vents dominants:** Nord / Nord-Est (ANONYME 2, 2011).

La zone d'étude a été choisie sur la base de son degré de pollution en relation avec l'ancienneté du borbier.

Un borbier est construit de telle sorte qu'il occupe une surface aussi réduite que possible et que les déchets de forage rejetés y soient contenus sans engendrer des risques de pollution (CHABOUNI, 2008).

Le fonctionnement des borbiers peut devenir inefficaces vu que ces derniers reçoivent un volume élevé de rejets qui peut avoir comme conséquence directe l'endommagement des plastiques de recouvrement, d'où l'échec dans le maintien des déblais ; et par la suite provoquer la migration verticale des polluants induisant la contamination d'une large zone du sous sol pouvant inclure les réserves d'eau (CHABOUNI, 2008).

## II. Matériel et méthodes

### II. 1. Matériel biologique

A partir d'échantillon de sol prélevés au borbier du « centre industriel sud » pollué par des rejets de forage, des bactéries sont isolées afin d'être identifiées, purifiées et utilisées dans la production du biosurfactant.

## **II. 2. Méthodologie de travail**

### **II. 2. 1. Prélèvement des échantillons**

Sur terrain, les échantillons du sol sont prélevés à partir de 40 cm de profondeur selon la norme NF ISO 11464-1998 pour les analyses physicochimiques et à une profondeur de 20 cm selon la norme ISO 10381-1994 pour les analyses microbiologiques.

Les échantillons destinés aux analyses microbiologiques sont conservés dans des flacons à 4°C, par contre ceux destinés aux analyses physicochimiques sont d'abord séchés à l'air libre et tamisés pour éliminer les débris puis conservés dans des flacons à l'abri de la lumière à 4°C.

### **II. 2. 2. Analyses physicochimiques du sol**

#### **a. Texture du sol (NF X 11.507)**

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

Pour réaliser l'analyse granulométrique du sol, on utilise 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.

On se reporte 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 normalisés AFNOR n° X 11.507 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.

#### **b. Mesure de pH par électrométrie (Norme NF ISO 10390)**

Le pH est déterminé par la différence du potentiel existant entre une électrode en verre et une électrode de référence plongeant dans la solution du sol. Cette différence du potentiel est une fonction linéaire du pH de cette solution.

La valeur du pH est celle affichée par le pH mètre de type INOLAB après sa stabilisation.



**Photo 01 : Spectrophotomètre type DR 2000.**

**c. Mesure de l'hygrométrie « humidité à 105°C » (Norme NF ISO 1146)**

La teneur pondérale en eau du sol est déterminée par la méthode gravimétrique. Elle s'exprime en % c'est-à-dire en gramme d'eau pour 100 g de sol déshydraté à 105°C.

Le taux d'humidité s'exprime en % selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{P_0 - P_1}{P_0}$$

**P<sub>0</sub>** : poids de la prise d'essai du sol (g).

**P<sub>1</sub>** : poids de la prise d'essai de sol après séchage à 105°C (g).

**d. Dosage des différents éléments chimiques**

Les éléments chimiques du sol dosés sont : le phosphore, les nitrates et les nitrites. La teneur du sol en phosphore, nitrates et nitrites est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre type DR 2000 (**Photo 01**) et des cellules en verre de 25 ml de capacité suivant la méthode HACH. La détection dans le domaine du visible (325 à 900 nm).

L'analyse de l'élément ou du composé est réalisée suite à une complexation de celui-ci avec le réactif ajouté, ce qui développe une couleur. L'intensité de la couleur obtenue et le choix approprié de la longueur d'onde permettent l'analyse de l'élément dans l'échantillon.

**d<sub>1</sub>. Dosage du phosphore (Norme NFT 90-023)**

Le phosphore en solution se trouve sous forme de phosphates. La seule forme de phosphate pouvant être détectée est l'orthophosphate. Toutes les autres formes doivent subir un prétraitement afin d'être transformées en orthophosphate avant de les analyser. Le dosage de ce dernier nécessite une mise en œuvre d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché selon la réaction suivante :

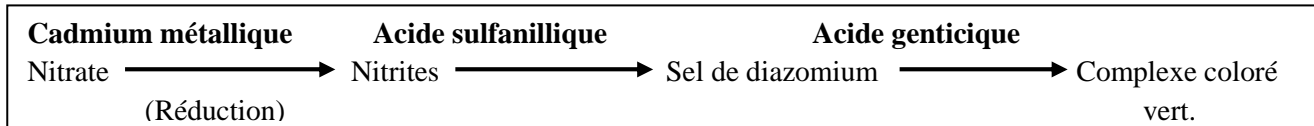
**Molybdate** **Acide ascorbique**

L'orthophosphate  $\longrightarrow$  Complexe phosphomolybdate  $\longrightarrow$  Complexe coloré  
(Bleu de molybdène)

Le dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre type DR 2000 à une longueur d'onde de 890 nm après l'ajout du contenu d'une gélule Phos ver 4 à 25 ml de la solution du lixiviat de sol. Le temps de réaction est 3 minutes et le résultat s'affiche en mg/l.

### **d<sub>2</sub>. Dosage des nitrates (Norme NFT 90-012)**

Le dosage des nitrates nécessite une mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché selon la réaction suivante:



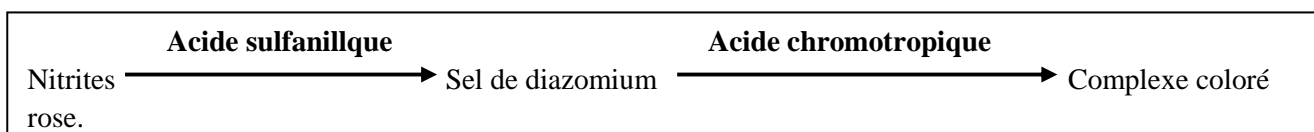
Ce dosage s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre type DR 2000 à une longueur d'onde de 500 nm après l'ajout du contenu d'une gélule Nitra ver 6 à 25 ml de la solution du lixiviat de sol à en deux temps de réaction. Un premier de 3 minutes permettant la dissolution du réactif et le deuxième de 2 minutes pour la sédimentation du cadmium.

Après l'écoulement des deux temps de réaction, on ajoute le contenu d'une gélule Nitri ver 3. Le dosage s'effectue dans la même longueur d'onde avec un temps de réaction de 10 minutes. Le résultat s'affiche en mg/l.

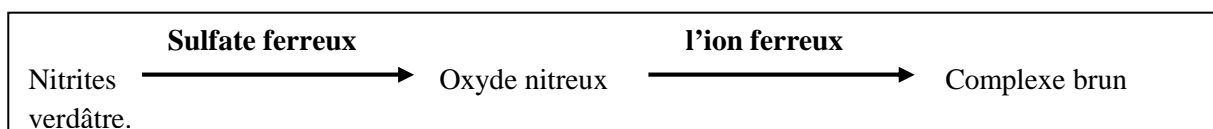
### **d<sub>3</sub>. Dosage des nitrites (Norme NFT 90-013)**

Le dosage des nitrites nécessite une mise en œuvre préliminaire d'une réaction colorée spécifique de l'élément recherché. Dans ce cas, la réaction dépend de la teneur en nitrites.

➤ pour les faibles concentrations, la réaction est la suivante:



➤ pour les fortes concentrations, la réaction est:







**Photo 02: Analyseur d'hydrocarbures à infrarouge de type HORIBA.**

Ce dosage s'effectue l'aide d'un spectrophotomètre type DR 2000 à une longueur d'onde de 585 nm après l'ajout du contenu d'une gélule Nitri ver à 25 ml de la solution du lixiviat de sol. Le temps de réaction est 3 minutes et le résultat s'affiche en mg/l.

#### **e. Dosage des hydrocarbures totaux**

Les hydrocarbures totaux ont été caractérisés quantitativement. L'analyse quantitative des hydrocarbures totaux est effectuée à l'aide d'un analyseur d'hydrocarbures à infrarouge de type HORIBA (**Photo 02**). Ces hydrocarbures totaux sont constitués par des produits hydrocarbonés extractibles par le solvant polychlorotrifluoroethylene (S-316). La concentration de l'échantillon en hydrocarbures s'affiche dans l'appareil en mg/l.

### **II. 2.3. Analyses microbiologiques du sol**

#### **a. Dénombrement de la microflore totale**

Afin de dénombrer la microflore existante dans les échantillons de sol contaminés par les hydrocarbures, nous avons procédé à une culture sur gélose nutritive. Pour se faire, une série de dilution variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$  a été préparée selon les étapes suivantes:

**Préparation de la solution mère :** A partir d'un échantillon de sol destiné à l'analyse microbiologique, 1 g de sol est pesé puis introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique préalablement autoclavée. Le tube est ensuite agité énergiquement pendant 2 minutes. Le contenu du tube représente la solution mère.

**Préparation des dilutions :** Dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, est ajouté 1 ml de la solution mère. Le mélange bien agité représente la dilution à  $10^{-1}$ . 1 ml de cette dilution mélangé à 9 ml d'eau physiologique, correspondra à la dilution  $10^{-2}$ . On continue ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-9}$ .

**Ensemencement par étalement sur gélose nutritive:** Le milieu gélosé préalablement fondu est réparti dans des boîtes de pétri à une hauteur d'environ 3 à 4 mm qu'on laisse ensuite refroidir. 0.1 ml de chaque dilution est prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur puis déposé sur la gélose, ensuite étalé sur toute la surface du milieu.

Après 24h à 48h d'incubation à 30°C, les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies.

Le nombre de germes par gramme de sol est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule:

$$N = n / d \cdot v$$

Où :

N : nombre des microorganismes en UFC/ ml.

n: nombre des colonies dénombrées.

v: Volume prélevé (0.1ml).

d: Dilution(MARCHAL et BOURDON, 1982).

### **b. Isolement et purification des souches de *Pseudomonas***

Les biosurfactants anioniques sont préférentiellement choisis lors des traitements de sols pollués car ils se sorbent moins aux surfaces minérales (DWARAKANATH *et al.*, 1999). Les rhamnolipides sont des biosurfactants anioniques produits par les différentes espèces de la famille des *Pseudomonadaceae*(BANAT *et al.*, 2000).

De ce fait, nous avons isolé et purifié les différentes espèces de *Pseudomonas* existantes dans notre échantillon de sol contaminé par les hydrocarbures.

#### **b<sub>1</sub>. Isolement**

À partir d'un échantillon de sol, 1 g est prélevé puis mélangé à 9 ml de milieu minéral(M<sub>1</sub>) (voir composition en annexe II). Le milieu est additionné de pétrole brut à raison de 2 % qui est considéré ici comme seule source de carbone. Le mélange est ensuite incubé à 30°C sous agitation à raison de 150 tours/min pendant 24 heures.

Après l'étape de pré enrichissement, des dilutions variant de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup> sont réalisées, ensuite, 0.1 ml de chaque dilution est ensemencé sur le milieu Cétrimide agar (milieu d'isolement des *Pseudomonas*). L'incubation se fait à 30°C pour une durée de 24 heures(MARTINNEAU, 1996).

#### **b<sub>2</sub>. Purification**

Après 24 h d'incubation, l'étape de purification des cultures permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes souches obtenues.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité...etc. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquage successif selon la méthode de stries (MARTINNEAU, 1996).

### **b<sub>3</sub>. Conservation des souches isolées**

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant le milieu gélose nutritive incliné. Les souches sont ensemencées en stries sur lapente des tubes, puis incubées à 30°C pendant 24 heures. Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à 6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois (MARTINNEAU, 1996).

### **c. Identification des souches purifiées**

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur les études morphologique et biochimique.

#### **c<sub>1</sub>. Etude morphologique**

##### **α. Aspect macroscopique**

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après SINGLETON (1999), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières, ...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La Chromogénèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ...etc.

##### **β. Aspect microscopique**

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de GRAM :

**Etat frais** : permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100 (SINGLETON, 1999).

**Coloration de GRAM** :est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées.

Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (GRAM-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (GRAM+). La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (MARCHAL et BOURDON, 1982).

## **c<sub>2</sub>. Etude biochimique**

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes.

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (TORTORA *et al.*, 2003).

### **α. Métabolisme énergétique**

#### **➤ Étude du type respiratoire**

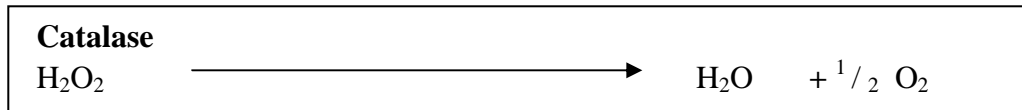
Selon MARCHAL et BOURDON (1982), Le type respiratoire est mis en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande-foie) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1 cm.

Après incubation des milieux à 30°C pendant 24 heures, 4 types respiratoires peuvent être distingués :

- Croissance en surface: bactéries aérobies strictes.
- Croissance en profondeur: bactéries anaérobies strictes.
- Croissance le long du tube: bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- Croissance dans la partie supérieure proche de la surface: bactéries microaérophiles.

#### **➤ Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspond à l'oxygène dégagé (TORTORA *et al.*, 2003).

#### ➤ Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase;enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthylparanitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (SINGLETON, 1999).

#### ➤ Recherche de la nitrate réductase

L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose.

L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réduction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote ( $\text{N}_2$ ).

A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30°C en bouillon nitraté, cinq gouttes de réactif de Griess sont ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est rose ou rouge ; les nitrates sont réduits en nitrites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).
- Lorsque le milieu reste incolore ; de la poudre de zinc est ajoutée (réducteurs des nitrates) ; après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :
  - si le milieu devient rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie: nitrate réductase négative NR<sup>-</sup>.

- si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà d'état de nitrites: nitrate réductase positive NR<sup>+</sup>(TORTORA *et al.*, 2003).

## β. Métabolisme glucidique

### ➤ Étude de la voie d'attaque des glucides

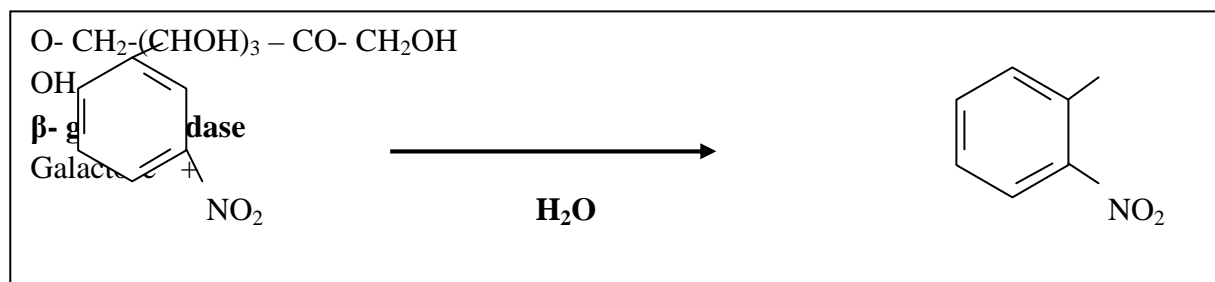
L'étude de la voie d'attaque des glucides permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif ou fermentatif ou les deux à la fois (TORTORA *et al.*, 2003).

### ➤ Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires

L'étude des différentes voies fermentatives intermédiaires permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction VogesProskauer, VP) (SINGLETON, 1999).

### ➤ Recherche de la β-galactosidase

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β-galactosidase. L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β-galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl- β-D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est composé d'une molécule de glucose et une molécule de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. Selon MARCHAL et BOURDON (1982), L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu, Ce processus se fait selon la réaction suivante :



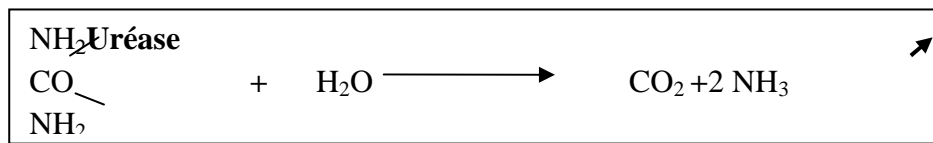
### ➤ Utilisation des sucres

La voie d'utilisation des sucres permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate (H<sub>2</sub>S) (MARCHAL et BOURDON, 1982).

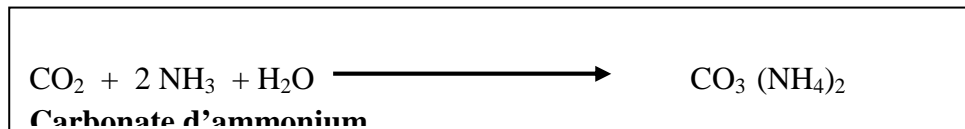




Seule, une uréase très active aboutit finalement à la réaction :



Le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{NH}_3$  se combinent en donnant le carbonate d'ammonium:



#### ➤ Production d'indole

La production d'indole est mise en évidence par utilisation de tryptophane exempt d'indole (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

#### ➤ Recherche du tryptophane désaminase (TDA)

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (SINGLETON, 1999).

#### ➤ Recherche des protéases

En pratique, une seule protéase est recherchée ; la gélatinase ou collagénase, qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides.

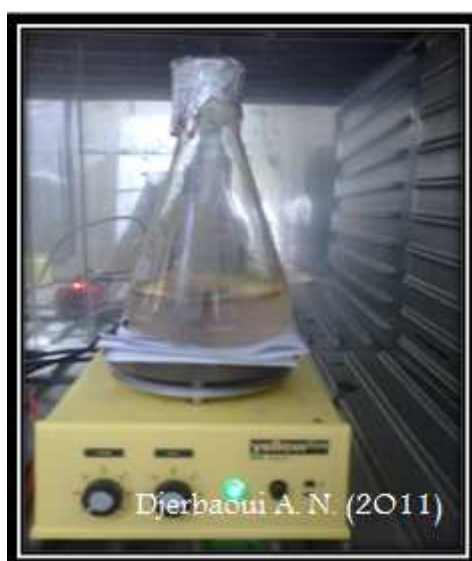
La mise en évidence de la gélatinase utilise comme substrat la gélatine fabriquée à partir du collagène (JOFFIN et LEYRAL, 2006).

*Tous les tests du métabolisme, glucidique et protéique sont réalisés dans la galerie Api 20 E (Annexe III).*

### δ. Croissance sur milieu King (King A et King B)

Les milieux King A et King B permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques.

La production des pigments est favorisée par la composition du milieu (MARCHAL et BOURDON, 1982).



(a)



(b)

**Photos 03 : Selection de la meilleure souche productrice de biosurfactant « souche S1 (a), souche S2 (b) ».**

Ce test est effectué par l'ensemencement d'un tube de milieu King A et un tube de milieu King B en réalisant des stries médianes à la surface de la pente ; remplaçant les capsules des tubes sans les revisser et Incubant à 30°C pendant 4 jours.

Le milieu King A favorise la production de pyocyanine, pigment permettant l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.

Le milieu King B favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). La pyoverdine se manifeste par une coloration vert fluorescent du milieu de culture (MARCHAL et BOURDON, 1982).

## **II. 2. 4. Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant**

### **a. Milieu de sélection**

La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant est effectuée selon la méthode de PATEL et DESAI (1997) ; dans deux Erlenmeyers contenant 100 ml de milieu minéral M<sub>1</sub> (dont la composition est citée dans l'annexe II), additionné de 2% du pétrole brute. Ce milieu liquide est inoculé par 1% d'une culture bactérienne âgée de 16 heures cultivée en bouillon nutritif. L'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à 180 rpm pendant 5 jours (**Photos 03<sub>a</sub> et 03<sub>b</sub>**).

### **b. Suivi de la cinétique de croissance des souches pures isolées**

A partir des souches isolées sur un milieu minéral contenant le pétrole brut, la sélection portera sur la meilleure croissance de ces souches en mesurant la concentration microbienne durant la période de fermentation.

Nous avons réalisé un suivi de la croissance des souches sur le milieu de sélection en mesurant la concentration microbienne toutes les 12 heures durant 5 jours.

L'échantillon est dilué de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-7</sup>, puis 1 ml de chaque dilution est incorporé en milieu GN (gélose nutritive) solide.

La viabilité des souches a été déterminée par le dénombrement des colonies après 24 et 48 heures d'incubation à 30°C.

### **c. Détermination de l'index d'émulsion E<sub>24</sub>**

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture (de fermentation) avec 3 ml de pétrole brute dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3min. Puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion ( $E_{24}$ ) selon la relation à après.

Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Puis le calcul de  $E_{24}$  est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion (BODOUR *et al.*, 2004).

Le calcul d' $E_{24}$  est effectué selon la relation suivante :

$$E_{24} = (h_e / h_t) \times 100$$

- **h<sub>e</sub>** : hauteur de l'émulsion.
- **h<sub>t</sub>** : hauteur totale du mélange.

#### **d. Détermination de la tension superficielle**

La tension superficielle est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface. La méthode utilisée consiste à prélever un échantillon de culture toutes les 12 heures et ce pour une durée de 5 jours pour le suivi de la tension superficielle. Ce procédé a été réalisé pour chaque souche bactérienne étudiée (ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991).

La mesure est effectuée par la méthode de capillarité, où un tube de verre de faible diamètre est plongé dans le milieu de fermentation. Dans le tube, le niveau du liquide est supérieur au niveau de la surface libre du récipient. L'ascension capillaire est due aux forces superficielles appliquées en tout point du contour du ménisque. La résultante  $F$  de ces forces équilibre le poids  $P$  du liquide soulevé. L'élévation du liquide dans le tube compense la différence de pression entre les deux côtés de la paroi (BONNEL, 2006).

Le calcul de la tension superficielle s'effectue en appliquant la loi de Jurin :

$$h = \frac{2 \gamma \cos \alpha}{r \rho g}$$

Où :

r : rayon intérieur du tube,

$\rho$ : masse volumique du liquide,

$g$  : accélération de la pesanteur,

$\gamma$  : tension superficielle du liquide,

$\alpha$ : angle de raccordement liquide/tube.

On déduit une valeur de  $\gamma$  de la mesure de la dénivellation  $h$  et de la connaissance des autres paramètres.

## II. 2. 5. Production du biosurfactant

### a. Préparation de l'inoculum

Dans un environnement stérile, et à partir d'une culture sur gélose nutritive on prélève une surface d'environ 10 cm<sup>2</sup> de la meilleure souche productrice sélectionnée, au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif préalablement autoclavé. L'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 180 rpm pendant 16 heures (LAPOINTE, 1996).

### b. Milieu de production et conditions de culture

La production de biosurfactant s'effectue dans un Erlenmeyer de 2000 ml contenant 1000 ml de milieu M<sub>2</sub> (dont la composition est dans l'annexe II) préalablement autoclavé additionné de 4 % d'huile de tournesol comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1 % de la préculture précédente et l'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 180 rpm pendant 5 jours (SIFOUR et *al.*, 2007).

Les prélèvements sont effectués toutes les 12 heures, avec le suivi régulier des paramètres suivants :

- La concentration microbienne ;
- Test d'index d'émulsion E<sub>24</sub> ;
- La tension superficielle.

### c. Extraction du biosurfactant

L'extraction du biosurfactant s'effectue selon la méthode de LAPOINTE (1996), par « la précipitation acide » avec quelques modifications.

Après l'incubation, les cellules bactériennes ont été enlevées deux fois du milieu d'incubation par centrifugation à 8500 rpm durant 10 minutes à 4°C après la neutralisation de son pH à 7 au moyen d'une solution de NaOH à 0,1 mole/l. Ensuite, le surnageant a été ajusté



**Photo 04 : Biodégradation du pétrole brut en présence de biosurfactant.**

à un pH de 2 au moyen d'une solution de HCl à 1 mole/l avant d'être recentrifugé à 8500 rpm durant 20 minutes à 4°C. Le culot obtenu subit un lavage avec de l'eau distillée plusieurs fois par centrifugation à 8500 rpm durant 45 minutes à 4°C. Le culot formé représente le biosurfactant produit par la souche.

## II. 2. 6. Biodégradation du pétrole en présence de biosurfactant

Pour évaluer la biodégradation du pétrole brut, nous nous sommes basés sur la méthode de SIFOUR et *al.*(2007).

10 microgrammes du biosurfactant par millilitre est ajouté à un Erlenmeyer contenant 50 ml du milieu minéral M<sub>2</sub> additionné de 2% de pétrole brut comme seule source de carbone. Un milieu sans biosurfactant est utilisé comme témoin. Les deux Erlenmeyers sont inoculés par 1 % d'une culture âgée de 16 heures de la souche isolée cultivée sur le bouillon nutritif. L'incubation s'effectue à 30°C dans un incubateur à agitation à 180 rpm pendant 5 jours(**Photo 04**).

Les prélèvements sont effectués chaque 24 heures avec le suivi régulier des paramètres suivants :

- Le taux des hydrocarbures totaux.
- L'index d'émulsion E<sub>24</sub>.
- La tension superficielle.
- La concentration microbienne.

## II. 2. 7. Essai de remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol à l'aide du biosurfactant produit

La grande capacité des biosurfactants à former des émulsions stables avec les hydrocarbures, indique leur tendance à améliorer la remobilisation des hydrocarbures à partir des sols contaminés (PEKDEMIR et *al.*, 2005).

Le lavage des sols pollués par les hydrocarbures, à l'aide des solutions de biosurfactant peut donc réduire leur degré de contamination.

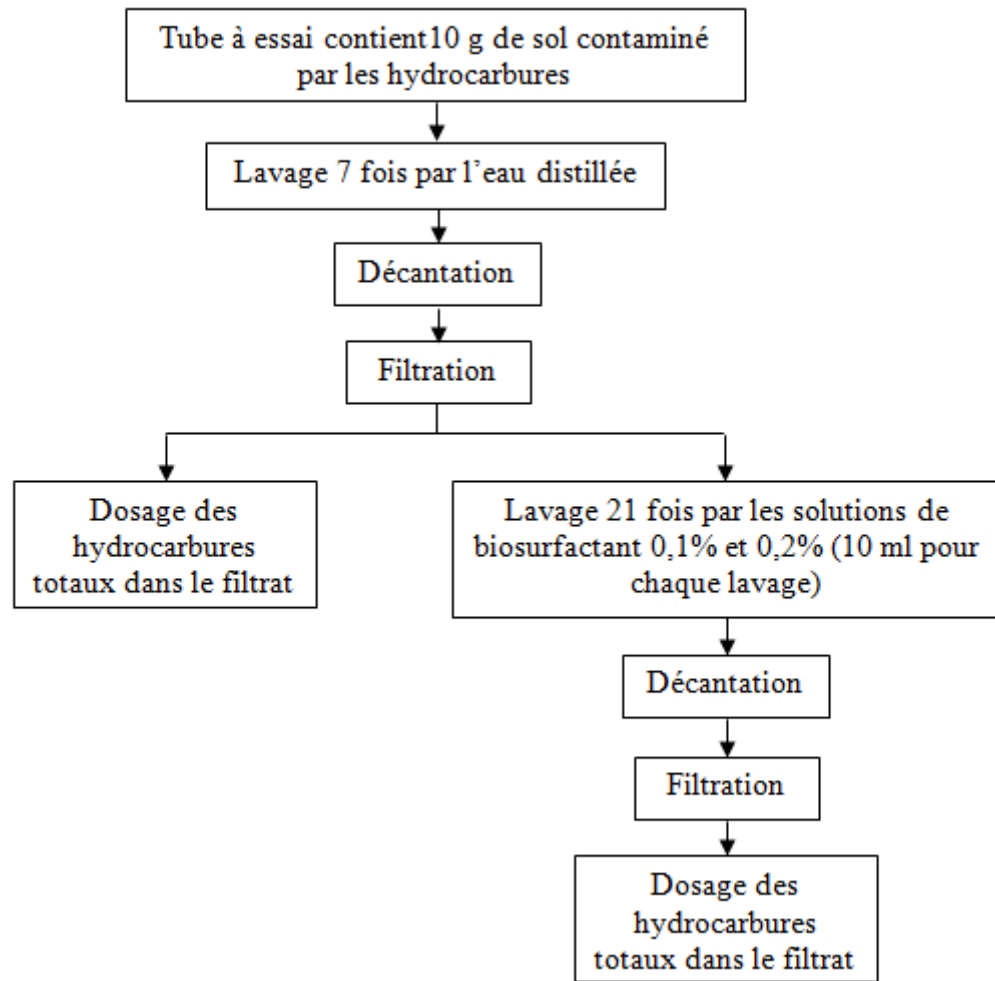


Figure 08 : Représentation schématique des étapes de remobilisation des hydrocarbures par les lavages successifs.



Photo 05 : Procédé de la remobilisation par lavages successifs.



### **a. Remobilisation par centrifugation**

Pour définir les concentrations du biosurfactant optimales à mobiliser le maximum des hydrocarbures présent dans le sol, un lavage par centrifugation à des différentes concentrations de biosurfactant en solution a été effectué.

Pour réaliser cette opération, des solutions de biosurfactant à concentrations (2%, 1%, 0.5% et 0.2%) ont été préparées. Ensuite 100 g du sol contaminé par les hydrocarbures sont ajoutées à 100 ml de chaque solution de biosurfactant. Chaque mélange a été centrifugé à 2000 rpm durant 10 minutes.

Le taux des hydrocarbures totaux est mesuré par l'analyseur d'hydrocarbures HORIBA avant et après centrifugation.

### **b. Remobilisation par lavages successifs**

Pour mieux connaître la capacité du biosurfactant produit à remobiliser les hydrocarbures adsorbés au sol, la méthode de MARTEL et GELINAS (1996), a été adoptée. Elle est basée sur l'injection successive des volumes de biosurfactant dans une colonne du sol contaminé par les hydrocarbures, par une pompe péristaltique, et les volumes de lixiviats sont recueillis et ensuite, la détermination de leurs concentrations en hydrocarbures est effectuée.

En se basant sur le même principe, la mobilisation des hydrocarbures du sol étudié a été effectuée par le lavage successif à l'aide d'une solution de biosurfactant.

Les 10 g de sol contaminé par les hydrocarbures placés dans un tube à essai ont subit une série de lavage à l'eau distillée et filtration jusqu'à l'obtention d'un surnageant limpide, puis une autre série de lavage au biosurfactant à 0,2 et 0,5 % jusqu'à la remobilisation maximal des hydrocarbures (**Figure 08 et Photo 05**).



*Résultats  
et  
Discussion*

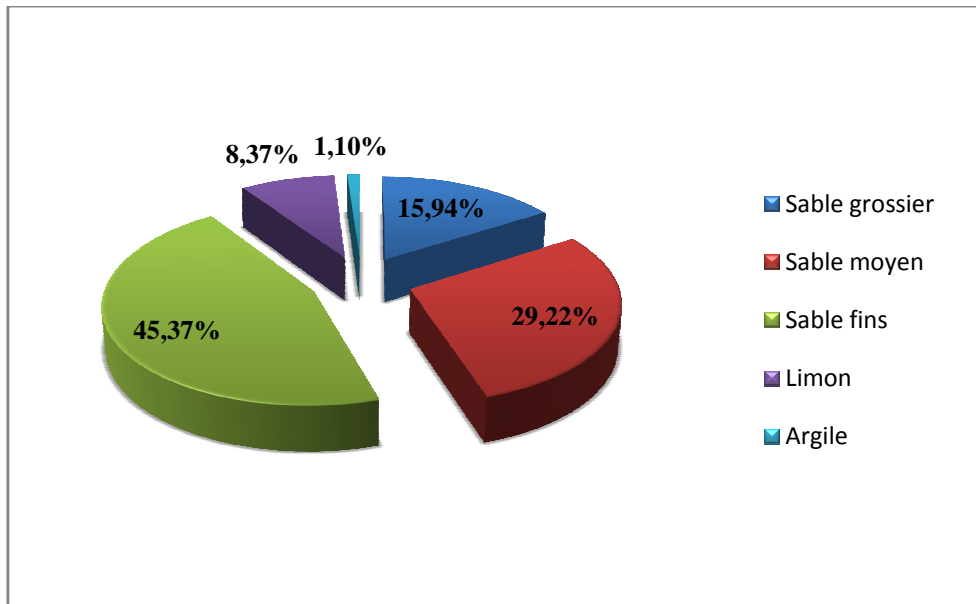


Figure 9: Composition granulométrique du sol étudié.

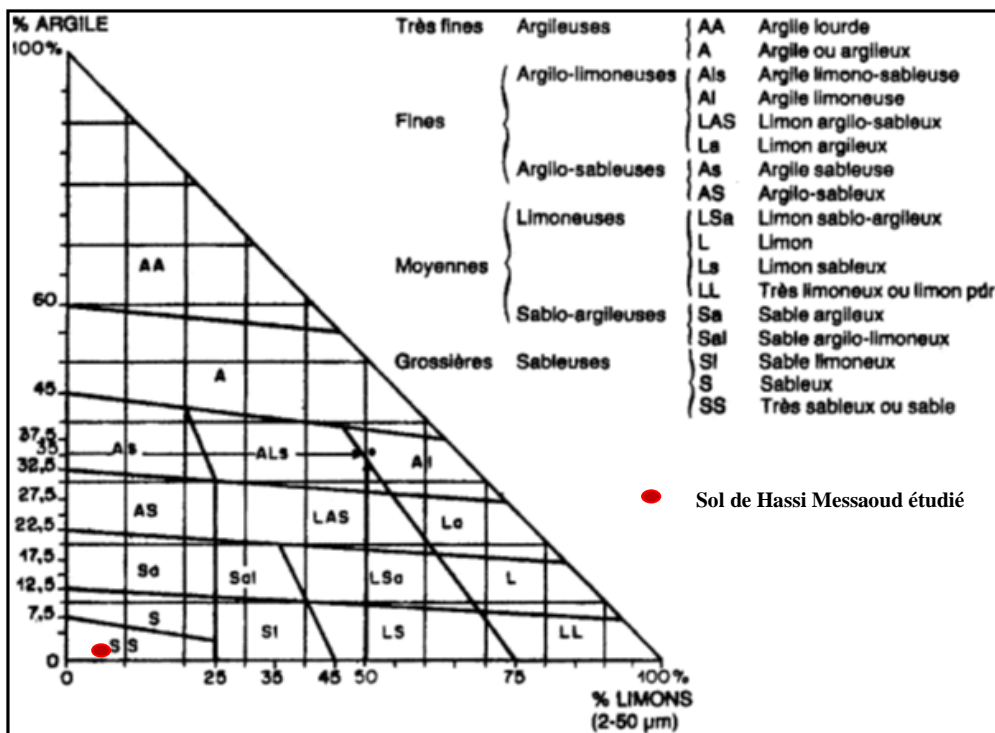


Figure 10 : Triangle textural (BAIZE, 1990).

## I. Analyses physicochimiques du sol

### I. 1. Granulométrie

Les résultats des analyses granulométriques de notre échantillon de sol sont représentés par la **figure 09** qui fait ressortir une prédominance de la fraction sableuse dans notre échantillon de sol avec 45, 37% de sable fins, 29,22% de sable moyen et 15, 94% de sable grossier. Les autres fractions sont représentées par 8,37% de limon et 1,10 % d'argiles.

Le sol étudié est donc classé comme très sableux selon le triangle textural du Groupement d'Études des Problèmes de Pédologie Appliquée : GEPPA (**Figure 10**).

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 seront 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 (LECOMTE, 1995). En effet, une faible perméabilité limite le passage d'air nécessaire pour promouvoir la croissance bactérienne (GABET, 2004).

Cependant, la faible proportion en argile de 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 (DOVET, 1996).

### I. 2. Autres paramètres physicochimiques

Les résultats des différents paramètres physico-chimiques sont représentés dans le **Tableau II**.

**Tableau II : Résultats des analyses physico-chimiques**

Paramètres	Résultats
Phosphore (mg/l)	2.75 ± 0,02
Nitrates (mg/l)	6.90 ± 0,10
Nitrites (mg/l)	3.51 ± 0,02
Humidité (%)	8.60
pH	8.07 ± 0,04

L'échantillon de notre sol étudié est caractérisé par un pH alcalin de  $8.07 \pm 0,04$ , une humidité de 8.60%. Les éléments minéraux dosés sont le : le phosphore, le nitrate et de nitrites dont les teneurs respectivement sont de  $2.75 \pm 0,02$  mg/l,  $6.90 \pm 0,10$  mg/l et  $3.51 \pm 0,02$  mg/l (**Tableau II**).

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. Ce pH du borbier proche de la neutralité, favoriserait la croissance des bactéries et des champignons et par conséquent assurait un déroulement efficace de la biodégradation des hydrocarbures (LEAHY et COTWELL, 1990).

La faible humidité relative du sol étudiée peut être directement liée aux conditions climatiques de la zone d'étude et / ou à la texture du sol. Toutefois, il est à noter qu'une faible humidité peut avoir un effet négatif sur l'activité microbienne en réduisant les transports et les échanges biochimiques ainsi que les contacts microorganismes / polluant (LECOMTE, 1998).

La composition chimique du sol étudié indique un déficit en éléments azotés et phosphorés (**Tableau II**). Selon ECKFORD et *al.* (2002), la pollution des sols par les hydrocarbures (diesel, carburant) a pour conséquence un déficit en azote par rapport au carbone (le rapport C/N est supérieur à 250/1) ; ce qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures. Pour tout traitement biologique, un enrichissement du sol par le phosphore et l'azote sera donc nécessaire.

Par ailleurs, il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote, dont les proportions optimales, généralement admises, sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100g de carbone. Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...etc.)(BALLERINI, 1999). REIS et *al.* (2010) rapportent que dans les environnements aérobies, les éléments limitants les plus susceptibles sont l'azote et le phosphore.

### I. 3. Teneur du sol en hydrocarbures

Le dosage des hydrocarbures totaux dans le sol pollué fait ressortir une teneur de **62.70 g/Kg** de sol soit **6.27%** de sol.

La teneur du borbier en hydrocarbures est largement supérieure à la valeur fixée par la norme hollandaise (0.1 g/kg de sol), ce qui confirme bien une pollution par ces composés hydrocarbonés. Cette pollution causée par les rejets de boues de forages constitue une source de carbone importante pour les microorganismes du sol (AKMOUSI, 2009).

## II. Analyses microbiologiques du sol

### II. 1. Dénombrement de la microflore totale

Le dénombrement de la microflore totale dans notre échantillon de sol pollué par les hydrocarbures fait ressortir un taux de **2.10<sup>8</sup> UFC/g** de sol.

L'importance de la microflore autochtone du borbier suggère la possibilité de cette dernière à assurer la biodégradation des hydrocarbures, sachant que selon MARGESIN et SCHINNER (2001), une teneur  $\geq 10^6$  germes/g de sol est suffisante pour procéder à la biodégradation de ces composés.

### II. 2. Isolement et identification des différentes souches de *Pseudomonas*

L'isolement des bactéries sur le milieu spécifiques des *Pseudomonas* « le Cétrimide Agar » aboutit à la détermination de deux types de colonies bactériennes distinctes par leur aspect, leur taille et leurs couleurs.

#### II. 2. 1. Caractères macroscopique

Les caractères macroscopiques des deux souches isolées sont regroupés dans le **Tableau III**.

**Tableau III : Caractères macroscopiques des colonies isolées sur le Cétrimide Agar**

<b>Souche</b> <b>Critère</b>	<b>S<sub>1</sub></b>	<b>S<sub>2</sub></b>
<b>Diamètre</b>	2 mm	2mm
<b>Chromogénèse</b>	Blanc jaunâtre	Beige
<b>Forme</b>	Ronde	Ronde
<b>Élévation</b>	Plate	Convexe
<b>Contour</b>	Régulière	Régulière
<b>Opacité</b>	Translucide	Opaque
<b>Surface</b>	Granulaire	Lisse brillante
<b>Consistance</b>	Crémeuse	Crémeuse
<b>Odeur</b>	+	+

L'observation macroscopique des colonies des deux souches isolées S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> montre qu'elles ont une forme ronde, un contour régulier, une consistance crémeuse et un diamètre de 2 mm avec la présence d'une odeur. Par ailleurs, les deux souches ont quelques caractères différents. En effet, la souche S<sub>1</sub> est de couleur blanc jaunâtre, translucide, plate avec une surface granulaire, alors que la souche S<sub>2</sub> a une couleur beige, opaque, d'élévation convexe avec une surface lisse brillante.

### II. 2. 2. Caractères microscopique

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : à l'état frais et après coloration de Gram. Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau IV**.

**Tableau IV : Observations microscopiques des souches**

<b>Critère</b> <b>Souches</b>	<b>Coloration de GRAM</b>			<b>Etat frais (mobilité)</b>
	<b>Arrangement</b>	<b>Forme des cellules</b>	<b>GRAM</b>	
<b>S<sub>1</sub></b>	Isolés, diplo et amas	Coccobacilles	Négatif	Mobile
<b>S<sub>2</sub></b>	Isolés, diplo et amas	Bacilles	Négatif	Mobile

D'après nos observations, il ressort que les deux bactéries isolées sont mobiles et à GRAM négatif. Cependant, leurs formes diffèrent. En effet, la souche S<sub>1</sub> est un coccobacille alors que la souche S<sub>2</sub> est un bacille (**Tableau IV**).

### II. 2. 3. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le **Tableau V**.

**Tableau V : Résultats des tests biochimiques**

Test biochimique		Souche	
		S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>
Métabolisme énergétique	Type respiratoire	Aérobie stricte	Aérobie stricte
	Catalase	+	+
	Oxydase	+	-
	Nitrate réductase	+	+
Métabolisme glucidique	Saccharose	-	-
	H <sub>2</sub> S	-	-
	Gaz	-	-
	β Galactosidase (ONPG)	-	+
	Citrate perméase	+	+
	Manitol	+	-
	Mobilité	+	+
	VP	-	-
Métabolisme protéique	LDC	-	+
	ODC	-	-
	ADH	+	+
	Uréase	-	-
	TDA	-	-
	Indole	-	-
	Gélatinase	+	+
Milieu King	King A	+	+
	King B	+	+





(a) Souche  $S_1$ .

(b) Souche  $S_2$ .

Photos 06 : Test biochimiques des deux souches  $S_1$  et  $S_2$  par galerie Api 20 E.

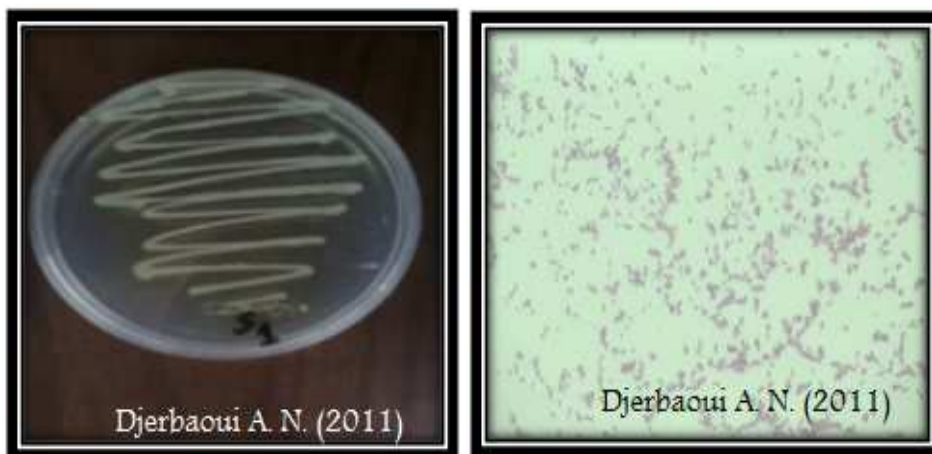


Photo 07 : Aspect macroscopique de la souche  $S_1$ . Photo 08 : Aspect microscopique de La souche  $S_1$ . (G X 100).

D'après les résultats obtenus, on constate que les deux souches isolées sont aérobies strictes, capables de réduire le nitrate et capables de croître dans les milieux King A et King B. Ces deux souches ont une catalase, une citrate perméase, une nitrate réductase, une ADH et une gélatinase positives. Elles ne produisent pas d'H<sub>2</sub>S, de gaz et d'indole, et n'utilisent pas le saccharose et ne possèdent pas une TDA (**Photos 06<sub>a</sub> et 06<sub>b</sub>**).

#### II. 2. 4. Identification des souches isolées

La morphologie macroscopique et microscopique et les caractères biochimiques des deux souches S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> suggèrent qu'elles appartiennent au genre de *Pseudomonas sp* (YIN et al., 2009).

##### a. Souche S<sub>1</sub>

La souche S<sub>1</sub> a été rattachée au genre *Pseudomonas* pour sa morphologie macroscopique et microscopique : colonies très grandes, blanc jaunâtre, plates (**Photo07**), bactérie GRAM négative de forme coccobacilles (**Photo08**), aérobie stricte à oxydase, ADH, catalase, citrate perméase positives et ONPG, LDC négatives (**Tableau V**).

Cette souche peut être rattachée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* vue qu'elle est caractérisée par la production des pigments de *pyocyanine* et *pyoverdine*. Ces pigments diffusent dans les cultures sur gélose et les colonies colorent le milieu en bleu verdâtre ou jaune verdâtre (SINGLETON, 1999). Ces caractères sont spécifiques de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (LOTFABAD et al., 2009).

*Pseudomonas aeruginosa* est un microbe pathogène opportuniste important, fortement résistant à un grand nombre de désinfectants et d'antibiotiques. Cette bactérie vit à l'état saprophytique dans l'eau, le sol et sur les végétaux (SOTIROVA et al., 2009). Elle est par ailleurs connue par sa capacité à biodégrader les composés hydrocarbonés. En effet, plusieurs chercheurs l'ont isolé à partir des sols contaminés par les hydrocarbures (SIFOUR et al., 2007 ; CHABOUNI, 2008 ; YIN et al., 2009 ; LOTFABAD et al., 2009).



Photo 09 : Aspect macroscopique de la souche S<sub>2</sub>.  
(G X 100).

Photo 10 : Aspect microscopique de la souche S<sub>2</sub>.

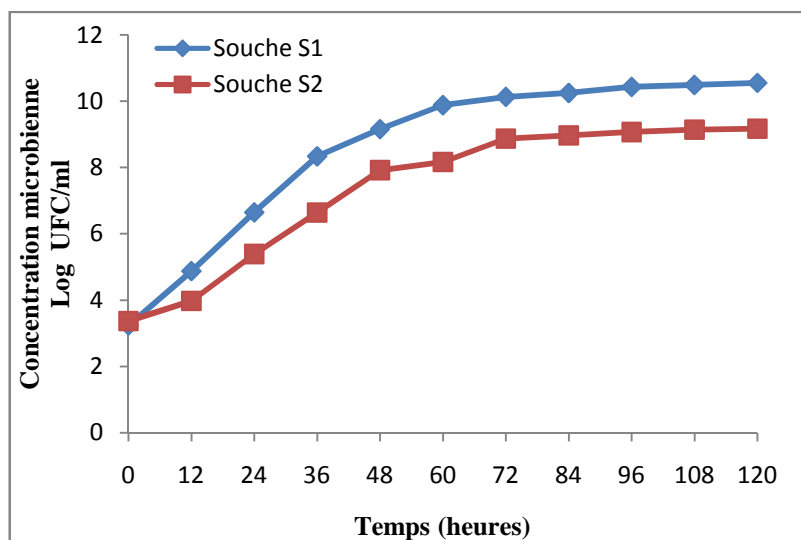


Figure 11 : Cinétique de croissance des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu M<sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut.

## b. Souche S<sub>2</sub>

D'après sa morphologie macroscopique et microscopique, la souche S<sub>2</sub> a été rattachée au genre *Pseudomonas*. Celle-ci forme de petites colonies circulaires de couleur beige, lisses et brillantes (**Photo 09**). La souche a une forme bacillaire, à GRAM négatif (**Photo 10**), oxydase négative, catalase, ADH et citrate perméase positives et présente un caractère aérobic strict (**Tableau V**).

L'incapacité de cette souche à dégrader le mannitol avec l'ONPG positif et l'oxydase négative nous permet de supposer qu'il s'agit de *Pseudomonas luteola* (SINGLETON, 1999).

D'après la littérature, l'espèce *Chryseomonas luteola*, aurait également comme synonyme le nom d'espèce *Pseudomonas luteola* (LAURENT et al., 2000).

L'habitat naturel du *Pseudomonas luteola* est mal connu mais elle est trouvée fréquemment dans le sol, l'eau et les environnements légèrement humides (DE et al., 2010). Elle a été également isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures par AKMOUCI (2009) à Hassi Messaoud.

## III. Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant

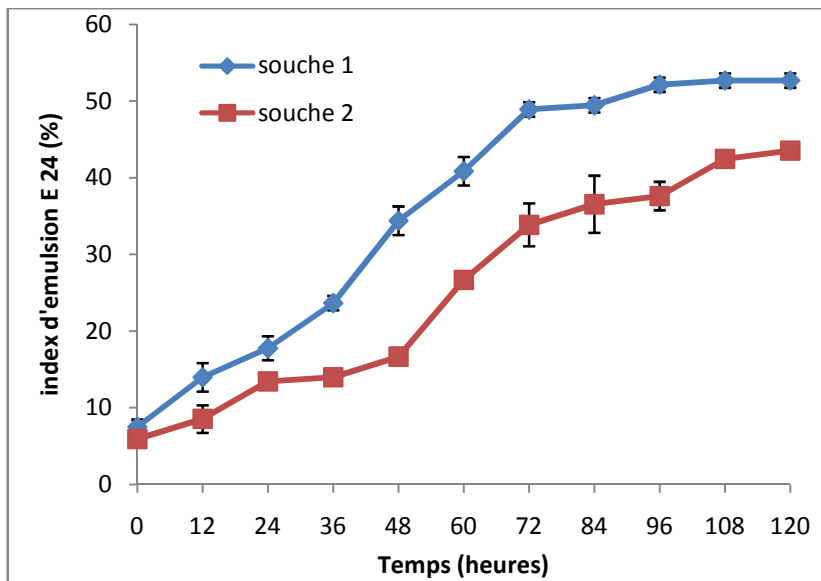
La cinétique de croissance des deux souches isolées sur milieu M<sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut comme seule source de carbone a été suivie en mesurant la concentration microbienne en fonction du temps ; ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par la **figure 11**.

Les deux courbes **Log UFC/ ml = f (t)** obtenues ont l'allure d'une courbe de croissance bactérienne classique.

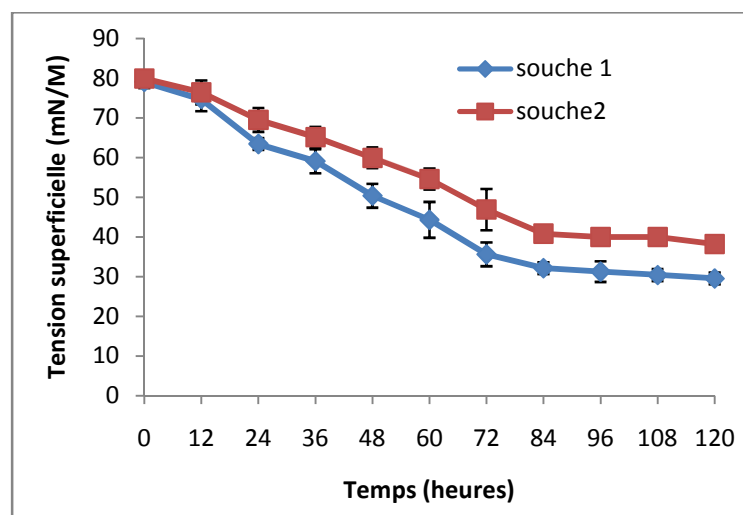
Pour les deux souches bactériennes étudiées, les phases de latence observées sont très courtes. D'après ces courbes, nous pouvons observer que la concentration microbienne augmente dès la 1<sup>ère</sup> heure de fermentation de  $1,73 \cdot 10^3$  UFC/ml et  $2,34 \cdot 10^3$  UFC/ml jusqu'à atteindre des valeurs maximales au bout de 72 heures à  $1,34 \cdot 10^{10}$  UFC/ml et  $7,41 \cdot 10^8$  UFC/ml pour les deux souches S1 et S2 respectivement (**Annexe V**). Cette concentration microbienne se stabilise au delà de 72 heures jusqu'à la fin de la fermentation (**Figure 11**).

Les courtes phases de latence démontrent une adaptation plus au moins rapide des souches étudiées à la source de carbone utilisée « le pétrole brut » (AKMOUCI, 2009).

Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat « pétrole brut » suffit aux



**Figure 12 : Index d'émulsion des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu  $M_1$  additionné de 2% de pétrole brut.**



**Figure 13 : Tension superficielle des deux souches bactériennes isolées, cultivées sur milieu  $M_1$  additionné de 2% de pétrole brut.**

besoins métaboliques des souches. Ainsi, La stabilisation de la concentration microbienne au-delà de 72 heures montre que le niveau des exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante, c'est donc la phase stationnaire (ROCHA *et al.*, 2007).

Les deux souches bactériennes ont la capacité d'émulsionner le pétrole brut (**Figure 12**). Les deux courbes obtenues  $E_{24} (\%) = f(t)$  des deux souches étudiées ont la même allure que les courbes de croissance (**Figure 11**).

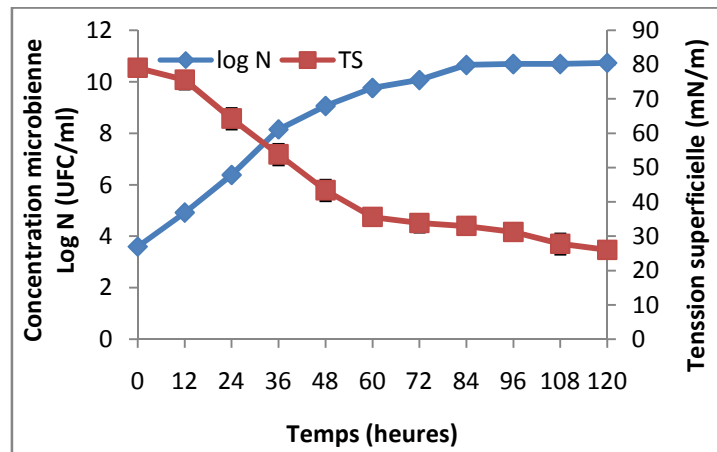
L'augmentation de l'index d'émulsion est proportionnelle à la concentration microbienne. Il atteint des valeurs de 52,68 % et 43,54 % pour les deux souches S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> respectivement (**Figure 12**).

Des résultats similaires ont été trouvés chez *Pseudomonas aeruginosa* qui peut atteindre un index d'émulsion de 50% (BENINCASA et ACCORSINI, 2009) et de 58% (LOVAGLIO *et al.*, 2011).

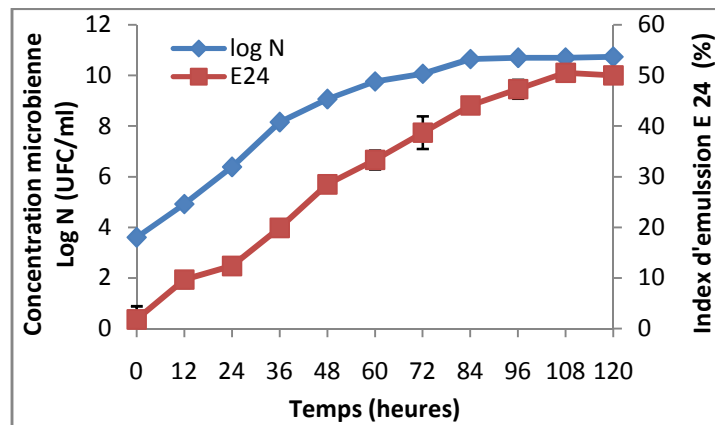
Les deux courbes obtenues  $TS (mN/m) = f(t)$  sont inversement proportionnelle aux courbes de croissance (**Figure 13**). Ces courbes indiquent que les deux souches S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> peuvent réduire la tension superficielle de 79,92 mN/m jusqu'à 29,54 mN/m et 38,22 mN/m respectivement. Ce résultat nous permet de suggérer qu'il y a production de biomolécules spécifiques ayant des propriétés tensio-actives ; **les biosurfactants** connus pour provoquer l'abaissement de la tension superficielle (TABATABAEE *et al.*, 2005).

Les mêmes résultats ont été obtenus par BANAT *et al.* (1991) qui ont pu isoler plusieurs bactéries ayant la capacité de réduire la tension superficielle du milieu de culture à des valeurs inférieures à 40 mN/m. Parmi les quelles, le rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* et la surfactine produite par *Bacillus subtilis* ont la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à 30 mN/m. Une autre souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures peut réduire la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 36 mN/m (SOMAYEH *et al.*, 2008).

Plusieurs travaux ont indiqués que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont la capacité de réduire la tension superficielle à des valeurs minimales et peuvent émulsionner et stabilisent les émulsions de différents types d'hydrocarbures et des huiles comme le pétrole brut, kérosène, n-alkanes, les composés aromatiques, l'huile d'olive et les huiles minérales et le diesel (PATEL et DESAI, 1997 ; BENINCASA *et al.*, 2004 ; WEI *et al.*, 2005).



(a) : Suivre de de la tension superficielle.



(b) : Suivre de l'index d'émulsion.

Figure 14 : Suivi de la production de biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* cultivée sur le milieu M<sub>2</sub> additionné de 4% d'huile tournesol.

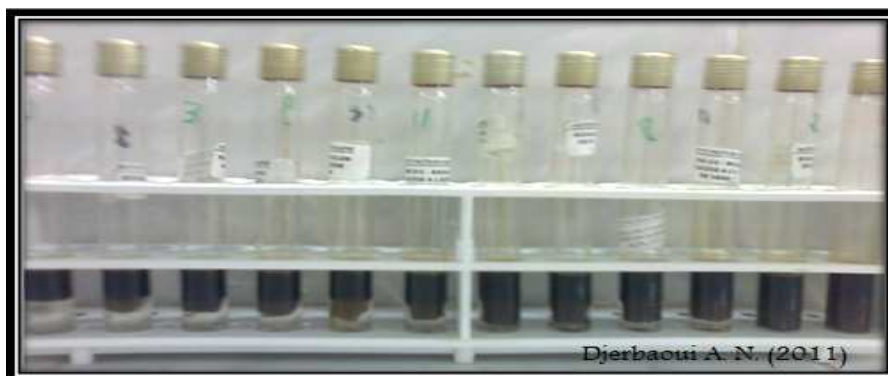


Photo 11 : Suivi d'index d'émulsion au cours de la production de biosurfactant.

#### IV. Production de biosurfactant

La souche jugée meilleure productrice de biosurfactant est *Pseudomonas aeruginosa* isolée d'un bournier de Hassi Messaoud. Cette souche est cultivée dans le milieu minéral M<sub>2</sub> additionné de 4% d'huile de tournesol comme seule source de carbone à 30°C pendant 5 jours à 180 rpm.

La cinétique de la croissance microbienne et les paramètres indicateurs de production de biosurfactant à savoir, la tension superficielle et l'index d'émulsion E<sub>24</sub> sont représentés par les **figures (14<sub>a</sub>)** et **(14<sub>b</sub>)**.

D'après les **figures(14<sub>a</sub>)** et **(14<sub>b</sub>)**, la variation de la concentration microbienne **log UFC/ml = f (t)** est une courbe typique d'une croissance microbienne, caractérisée par l'absence de phase de latence et par une longue phase exponentielle et se termine par une phase stationnaire.

Plusieurs auteurs ont observés le même comportement avec différentes microorganismes (ROCHA *et al.*, 2007).

Le biosurfactant produit a pu réduire la tension superficielle du milieu de culture de 79,06 mN/m à 26,06mN/m à la fin de l'expérimentation (**Figure 14<sub>a</sub>**).

Des émulsions stables ont été formées par le milieu de fermentation avec le pétrole brut (**Photo 11**), et la valeur maximale obtenue d'E<sub>24</sub> est de 50% au bout de la 120<sup>ème</sup> heure de fermentation (**Figure 14<sub>b</sub>**).

D'après les **figures(14<sub>a</sub>)** et **(14<sub>b</sub>)**, La production maximale du biosurfactant est achevée à la fin de la phase exponentielle au bout de la 84<sup>ème</sup> heure de fermentation.

La propriété tensioactive du biosurfactant dépend principalement de sa capacité de réduire la tension superficielle et la formation des émulsions stables avec des différents substrats immiscibles dans l'eau (RAZA *et al.*, 2007).

Il est à noter qu'il existe une relation entre l'augmentation de la biomasse, l'index d'émulsion, la diminution de la tension superficielle et la production de biosurfactant par notre souche de *Pseudomonas aeruginosa*, ceci peut être expliqué par la phase prolongée de la croissance microbienne (DAS *et al.*, 2009). Ce qui confirme que la production de biosurfactant s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, et qui suggère qu'il est produit comme métabolite primaire (AMIRIYAN *et al.*, 2004). La croissance bactérienne associée à la production de biosurfactant pourrait faciliter l'adhérence des cellules



bactériennes aux molécules de substrats hydrophobes et les métaboliser (BARATHI et VASUDEVAN, 2001).

Les microorganismes qui dégradent les hydrocarbures produisent des substances tensioactives et certains d'entre eux, permettent la stabilité de l'huile ou les phases hydrophobes dans l'émulsion. Ces microorganismes peuvent être divisés en deux catégories, une qui produit les biosurfactants à faible poids moléculaire mais habituellement ne font pas des émulsions stables, et l'autre qui produit des biosurfactants qui agissent principalement en tant que stabilisateurs d'émulsions sans affecter la tension superficielle (SILVA *et al.*, 2010). D'après nos résultats obtenus notre souche *Pseudomonas aeruginosa* peut être incluse dans la 2<sup>ème</sup> catégorie puisque son biosurfactant produit réduit la tension superficielle et stabilise les émulsions de pétrole brut.

Le même résultat a été obtenu par RAZA *et al.* (2007) qui ont utilisé l'huile d'olive comme seule source de carbone dans la production du biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* qui a réduit la tension superficielle jusqu'à 29 mN/m.

Après incubation de 5 jours, le biosurfactant a été extrait à partir du milieu de production par précipitation acide. Notre souche *Pseudomonas aeruginosa* a pu produire 2,4 g de biosurfactant par litre de milieu minérale M<sub>2</sub> additionné de 4% d'huile de tournesol comme seule source de carbone.

Dans leurs travaux, WU *et al.* (2008) ont pu produire par *Pseudomonas aeruginosa* 3,70g/l et 2,63g/l de biosurfactant en utilisant l'huile d'olive et l'huile soja comme source de carbone respectivement. Par ailleurs, COSTA *et al.* (2006), RAHMAN *et al.* (2002) et HABA *et al.* (2000), signalent la production de 2,9 g/l de biosurfactant en présence de l'huile de buriti, de l'huile de carthame et de l'huile de friture respectivement par la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

On se basant sur nos résultats obtenus, on peut déduire que l'huile de tournesol utilisée ici comme seule source de carbone est un substrat approprié pour la croissance et la production du biosurfactant, car ce dernier a été produit en quantité importante (2,4 g/l) et a réduit la tension superficielle en dessous de 30 mN/m avec un index d'émulsion de 50 % (**Figures 14<sub>a</sub> et 14<sub>b</sub>**).

SANTOS *et al.* (2010) ont indiqué que l'utilisation des huiles végétales comme seule source de carbone ont un grand potentiel comme substrat dans la production de biosurfactant par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, l'utilisation de l'huile de tournesol

comme seule source de carbone par *Pseudomonas aeruginosa* a permis de produire un biosurfactant dont l'index d'émulsion est de 51 % et la tension superficielle est de 36 mN/m (SIFOUR et al., 2007). ROBERT et al., (1989), ont également pu produire un biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 en utilisant l'huile d'olive, avec un index d'émulsion de 49 % et une tension superficielle de 38 mN/m. Ces résultats corroborent avec les nôtres.

La raison probable de cette tendance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à préférer l'utilisation des huiles végétales est qu'elles ont une activité lipase qui facilite l'assimilation des acides gras contenus dans les fractions des huiles végétales (ABOUSEOUD et al. 2008), et agissant sur ces huiles pour former des acides gras à longues chaînes (LCFA<sub>S</sub>) composés de 12 à 18 carbones (WEI et al., 2005). Les (LCFA<sub>S</sub>) peuvent être oxydés pour maintenir la croissance bactérienne ou être transformés en un précurseur lipidique afin de favoriser la biosynthèse de biosurfactant (MAIER et al., 2000).

Le biosurfactant produit par notre souche *Pseudomonas aeruginosa* peut être considéré comme rhamnolipides puisque les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour produire des biosurfactants glycolipidiques contenant le rhamnose et les acides gras qui sont nommés les rhamnolipides (GUNTHER et al., 2005). Leur composition chimique et activité émulsifiante dépendent non seulement de la souche productrice, mais aussi des conditions de culture et des paramètres physiques (température, aération, agitation et pH), ainsi que la nature des sources de carbone et d'azote qui influencent la quantité et la qualité du biosurfactant produit (CALVO et al., 2009).

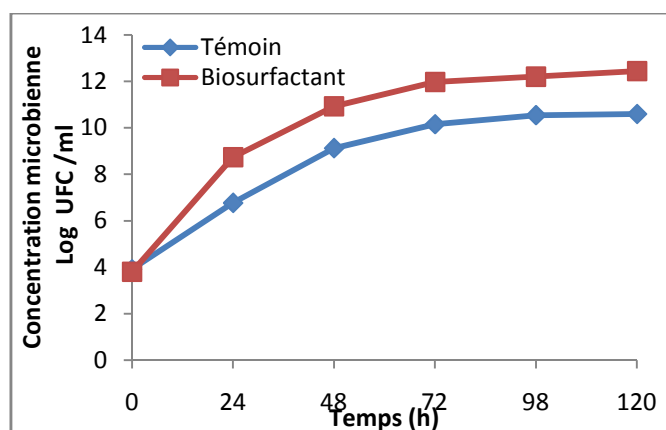
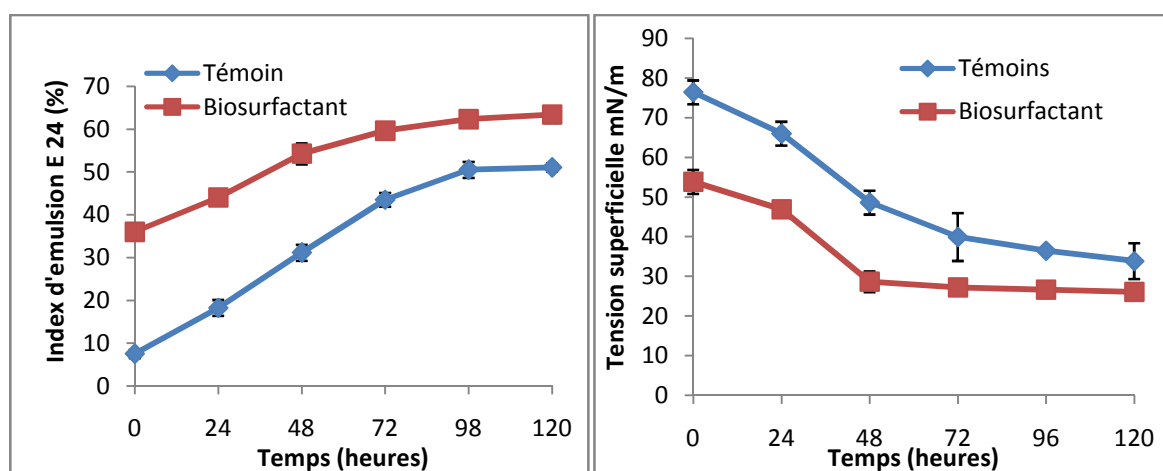


Figure 15 : Suivi de la concentration microbienne durant la biodégradation du pétrole brut.



(a) : Suivi de l'index d'émulsion.

(b) : Suivi de la tension superficielle.

Figure 16 : Suivi des paramètres tensioactifs dans la biodégradation du pétrole brut (index d'émulsion et tension superficielle).

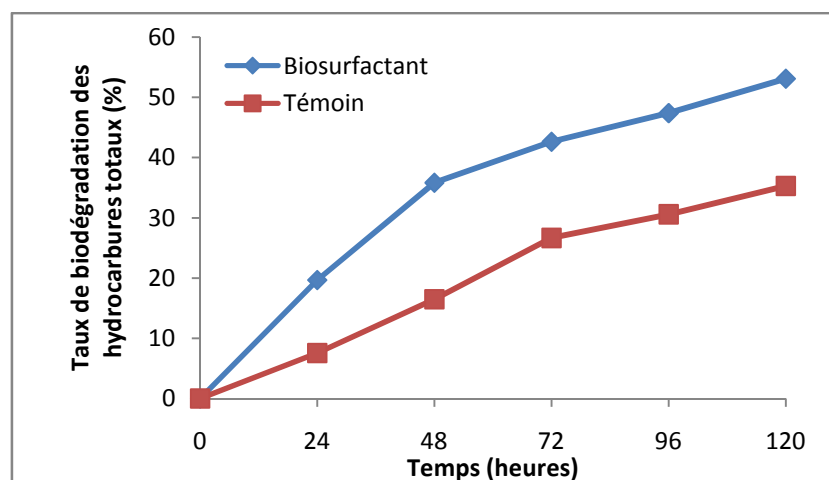


Figure 17 : Suivi du taux de biodégradation des hydrocarbures totaux.

## V. Biodégradation du pétrole brut en présence de biosurfactant

Afin de mieux comprendre les phénomènes qui accompagnent la biodégradation du pétrole brut avec et sans biosurfactant et le comportement des microorganismes concernés, nous avons suivi l'évolution de certains paramètres comme la concentration microbienne, l'index d'émulsion ( $E_{24}$ ), la tension superficielle et le taux de biodégradation du pétrole brut par *Pseudomonas aeruginosa* isolée dans nos conditions expérimentales.

D'après la **figure 15**, nous observons une augmentation de la concentration bactérienne dans le milieu contenant du pétrole comme source de carbone. Lorsque le milieu est additionné de biosurfactant, la courbe suit la même allure que celle du témoin mais avec des valeurs supérieures. En effet, un maximum de biomasse bactérienne est atteint au bout de 72 heures « la phase exponentielle », elle est de  $9,33.10^{11}$  UFC/ml et de  $1,44.10^{10}$  UFC/ml en présence et en absence de biosurfactant respectivement (**Annexe V**). Au-delà de 72 heures, les concentrations bactériennes se stabilisent jusqu'à la fin de l'incubation, c'est la phase stationnaire.

L'augmentation de la concentration bactérienne est accompagnée d'une augmentation de l'index d'émulsion qui atteint 51,07% et 63,44% et d'une diminution remarquable de la tension superficielle qui atteint 33,88 mN/m et 26,06 mN/m respectivement dans le témoin et dans le test de biodégradation assistée par l'ajout de biosurfactant (**Figures 16<sub>a</sub> et 16<sub>b</sub>**).

D'après les résultats obtenus, on remarque que le biosurfactant favorise l'augmentation de la concentration bactérienne expliquant l'augmentation de l'index d'émulsion et la diminution de la tension superficielle (**Figures 16<sub>a</sub> et 16<sub>b</sub>**).

Le taux de biodégradation du pétrole brut par la souche *Pseudomonas aeruginosa* est plus élevé en présence de biosurfactant qu'en son absence. Il atteint son maximum à la fin de la croissance bactérienne. Il est de 35,27 % en absence de biosurfactant et de 53,09 % en présence de celui-ci (**Figure 17**).

La différence du taux de biodégradation entre les deux tests est environ de 18 %, ce qui corrobore les résultats trouvés par THAVASI et al., (2011<sub>b</sub>) qui signalent une différence de 20,25%. Ceci indique que la présence de biosurfactant accélère le processus de biodégradation du pétrole brut en augmentant sa biodisponibilité aux microorganismes (PERFUMO et al., 2010).

Dans leur travail, THAVASI et al. (2011<sub>a</sub>) indiquent que l'addition des rhamnolipides au milieu de culture facilite l'accessibilité du pétrole brut aux cellules bactériennes et

accélère donc la croissance bactérienne qui est suivi d'une production de biosurfactant en diminuant la tension superficielle.

Plusieurs travaux indiquent que l'addition des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* améliore et accélère le taux de biodégradation des hydrocarbures aromatiques aliphatiques, du phénanthrène, de l'hexadécane, de la gasoline et du diesel (CHURCHILL et al. 1995 ; GARCIA- JUNCO et al. 2001 ;NOORDMAN et al. 2002 ;RHAHMAN et al. 2002 ;WHANG et al., 2008).

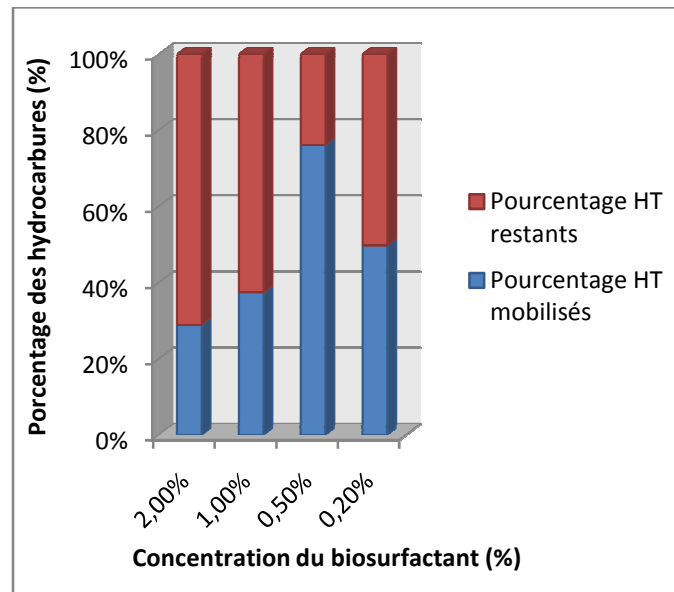
Le taux maximum de 89% de biodégradation de pétrole brut a été observé par THAVASI et al. (2011<sub>b</sub>), en ajoutant 0,1% de biosurfactant dans le milieu de culture.

NORMAN et al. (2002) ont clairement prouvé que les rhamnolipides stimulent différents processus impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, signalant que l'efficacité du processus de biodégradation et de mécanisme spécifique de l'action des rhamnolipides dépend de la nature du substrat à métaboliser.

Concernant les mécanismes de transport des hydrocarbures insolubles aux cellules bactériennes, BURY et al. (1993) ont indiqué que les biosurfactants peuvent influencer la prise et la consommation des hydrocarbures par les microorganismes. Les trois mécanismes de la prise des hydrocarbures par les microorganismes sont :

- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse ;
- le contact direct des cellules avec les hydrocarbures ;
- l'interaction des cellules avec les hydrocarbures solubilisés ou pseudosolubilisés ou émulsifiés dans des entités beaucoup plus petites que la taille des cellules.

L'ajout des biosurfactant fournit donc non seulement des micelles pour la solubilisation des hydrocarbures insolubles, mais facilite aussi leur émulsification, avec une augmentation de leur biodisponibilité (GOSWAMI et al., 1992).



**Figure 18 : Taux de remobilisation des hydrocarbures à différentes concentration de biosurfactant par centrifugation.**

## VI. Essai de remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol à l'aide du biosurfactant produit

### VI. 1. Remobilisation des hydrocarbures par centrifugation

Le taux de remobilisation des hydrocarbures du sol en présence des solutions de biosurfactant à différentes concentrations est représenté par la **figure 18**.

Il ressort des résultats obtenus que l'addition de la solution de biosurfactant à 0,2% permet de mobiliser 50,13% d'hydrocarbures contaminant le sol étudié. Lorsqu'on augmente la concentration de biosurfactant à 0,5% nous obtenons une meilleure remobilisation atteignant 76,13%. Cependant, l'augmentation de la concentration de biosurfactant au-delà de 0,5 % conduit à une diminution de la quantité d'hydrocarbures remobilisés. En effet, les taux d'hydrocarbures remobilisés sont inversement proportionnels aux concentrations de biosurfactant. Seulement 37,43% et 28,92% d'hydrocarbures ont été remobilisés en présence des concentrations de 1% et de 2 % de biosurfactant respectivement.

D'après les résultats obtenus, on peut déduire que les biosurfactants agissent mieux dans la remobilisation des hydrocarbures lorsqu'ils sont à faibles concentrations.

URUM *et al.* (2003), ont trouvés des résultats similaires aux nôtres (79%) lorsqu'ils ont réalisé le lavage d'un sol contaminé par les hydrocarbures en présence de la solution de biosurfactant à 0,5%.

La remobilisation des hydrocarbures par le biosurfactant s'effectue par deux mécanismes ; la mobilisation et la solubilisation. La mobilisation se produit lorsque la concentration du biosurfactant est inférieure à sa concentration micellaire critique « CMC » en diminuant la surface de contact entre le sol et le polluant qui favorise par la suite sa mobilisation, alors que la solubilisation se réalise lorsque la concentration de biosurfactant est supérieure à sa CMC en formant des émulsions (URUM *et al.*, 2004).

Selon GABET (2004), La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols pollués par les hydrocarbures et elle résulte de la formation de micelles. Cependant, dans leur travail, PEKDEMIR *et al.* (2005), indiquent que la formation des émulsions pendant le processus de lavage du sol par le biosurfactant pourrait être indésirable. En effet, si les émulsions sont fortement visqueuses suite à la solubilisation, elles deviennent immobiles et restent donc dans le sol, en empêchant ainsi la circulation des molécules de biosurfactant pendant le lavage du sol pollué, gênant de ce fait sa perméabilité et son contact avec le biosurfactant et par conséquent, un faible taux d'hydrocarbures mobilisés est obtenu.

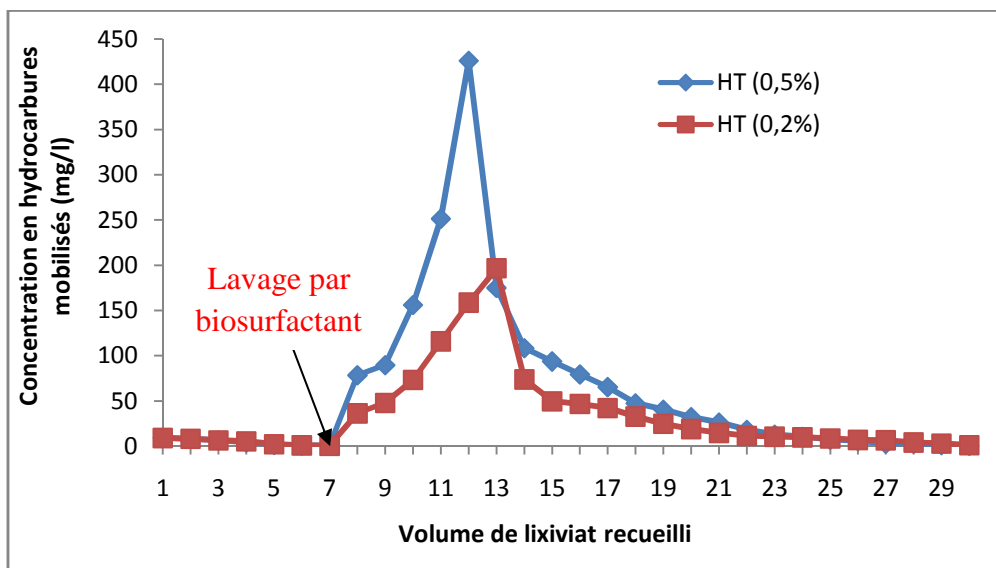


Figure 19 : Suivi de concentration des hydrocarbures mobilisés par les solutions de biosurfactant à des concentrations de 0,2 % et 0,5% par lavages successifs.

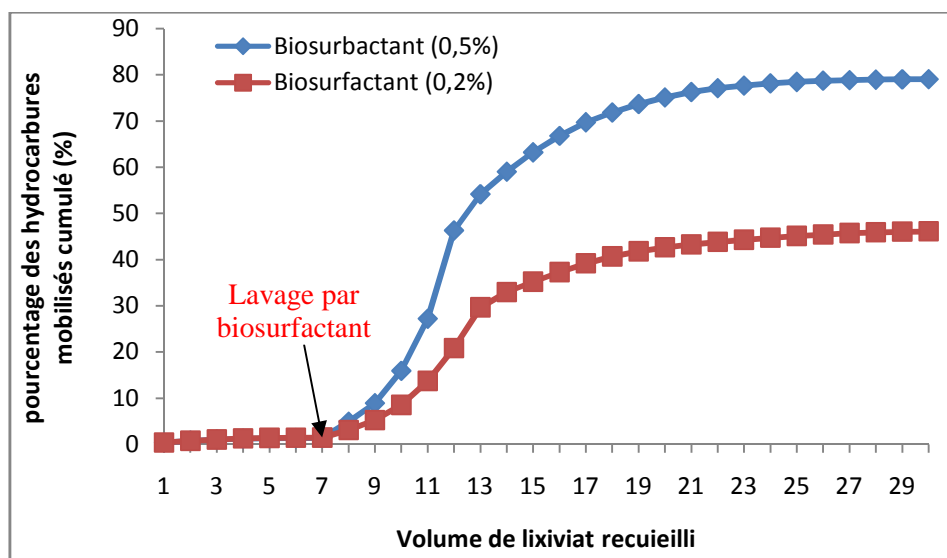


Figure 20 : Taux des hydrocarbures cumulés mobilisés par les solutions de biosurfactant à des concentrations de 0,2 % et 0,5% par lavages successifs.



## VI. 2. Remobilisation des hydrocarbures par lavages successifs

La **figure 19** représente l'évolution de la concentration des lixiviats en hydrocarbures totaux après le lavage du sol. Les 7 premiers lavages sont effectués à l'eau distillée pour la saturation du sol en eau. Ensuite, une série de lavage à l'aide du biosurfactant a été réalisée pour la remobilisation d'un maximum d'hydrocarbures existants dans le sol.

La concentration en hydrocarbures totaux dans les lixiviats provenant des 7 lavages à l'eau distillée passe de 9,20 mg/l au début à 0,6 mg/l à la fin des lavages(**Figure 19**). En cumulant la masse moyenne des hydrocarbures totaux recueillis, seulement 1,22% d'hydrocarbures contenus au départ dans le sol contaminé ont été mobilisés.

Les deux courbes de mobilisation des hydrocarbures par les solutions de biosurfactant à 0,2% et 0,5% présentées par la **figure 19** illustrent bien l'influence de la concentration de biosurfactant sur la mobilisation des hydrocarbures.

La concentration maximale en hydrocarbures dans les lixiviats est atteinte pour les deux essais après le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> lavage pour les solutions de 0,5% et 0,2 % de biosurfactant respectivement. Le pic de concentration maximale en hydrocarbures est presque deux fois plus élevé en présence de 0,5% de biosurfactant (426 mg/l) qu'en présence de 0,2% de biosurfactant (196,53 mg/l), sachant qu'après les valeurs maximales d'hydrocarbures mobilisés, la diminution de la concentration des hydrocarbures dans les lixiviats est nettement plus importante après le 5<sup>ème</sup> lavage à 0,5 % (de 426 mg/l à 108,40 mg/l) qu'après le 6<sup>ème</sup> lavage à 0,2% (de 196,53 mg/l à 73,80 mg/l)(**Figure 19**).

La **figure 20** représente les taux d'hydrocarbures mobilisés par l'application des différents lavages (eau puis solution de biosurfactant).

Il apparait clairement que l'essentiel d'hydrocarbures mobilisés provient des lavages en présence de biosurfactant. En effet, on passe de 1,22% de polluant mobilisé par lavage à l'eau distillée à 46,09 % en présence de 0,2% de biosurfactant et à 79,03% en présence de 0,5% de tensioactif produit.

Les faibles taux d'hydrocarbures mobilisés par l'eau distillée seraient liés à la nature chimique de ces polluants à savoir leur faible polarité rendant difficile leur solubilisation dans l'eau.

La faible capacité de l'eau seule à mobiliser les hydrocarbures a également été observée par ROY *et al.* (1994), sur la remobilisation d'anthracène en utilisant une colonne de sable fin.

La forte remobilisation des hydrocarbures du sol pollué grâce à l'utilisation du biosurfactant peut être due au caractère amphiphile de ce tensioactif permettant la désorption et la solubilisation des hydrocarbures apolaires.

L'augmentation du taux d'hydrocarbures mobilisés en relation avec l'augmentation de la concentration de biosurfactant serait liée à la quantité plus élevée des micelles dans la solution de biosurfactant à 0,5% que celle à 0,2%. Il est possible que la solution de biosurfactant à 0,5% par son contenu en micelles plus élevé que celui de la solution à 0,2%, puisse mettre en solution dès les premiers lavages la quasi-totalité de la fraction d'hydrocarbures faiblement liés au sol (ou liés à une fraction de la matière organique peu retenue au sol), en plus de la mise en solution tout au long du lavage, d'une faible partie de la fraction d'hydrocarbures fortement liés au sol (ou liés à une fraction de la matière organique davantage retenue au sol). Ce qui expliquerait la concentration en hydrocarbures dans les lixiviats très élevée au début du lavage par le biosurfactant (le pic), suivie d'une diminution très rapide de celle-ci après le pic. La solution de biosurfactant à 0,2% par son plus faible contenu en micelles, ne mettrait en solution durant les premiers lavages qu'une partie de la fraction d'hydrocarbures faiblement liés au sol, se traduisant par un pic moins élevé et une diminution beaucoup moins rapide de la concentration en hydrocarbures dans les lixiviats.

Des résultats similaires ont été obtenus par LAPOINTE (1996) après injection d'une solution de biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* à 0,5% en colonne de sol contaminé par le pyrène. L'injection de 19 volumes de pores de cette solution a permis de récupérer 62,7% de contaminant.

Selon LEE *et al.*, (2005), les concentrations typiques en biosurfactant pour le lavage du sol contaminé par les hydrocarbures sont de 1 à 2%, tandis-que les mêmes contaminants peuvent être solubilisés dans des solutions à faibles concentrations (0,1 à 0,2%).

Les biosurfactants non ioniques mobilisent plus d'hydrocarbures (jusqu'à 89%) par rapport au biosurfactant anioniques (rhamnolipides), mais ces derniers s'avèrent être plus efficaces dans les tests de remobilisation combinés à la biodégradation en présence de la souche *Pseudomonas aeruginosa* (BILLINGSLEY *et al.*, 2002).

BAI et al. (1997) ont pu mobiliser environ de 84% d'hydrocarbures contaminant le sol en utilisant un biosurfactant anionique (monorhamnolipide) produit par *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après nos résultats, le meilleur rendement de mobilisation des contaminants hydrocarbonés du sol est obtenu en utilisant une solution de biosurfactant produit par notre souche *Pseudomonas aeruginosa* à 0,5% plutôt qu'une solution à 0,2%. Son utilisation nécessite donc l'injection d'un volume de solution presque deux fois moins grand pour mobiliser une quantité déterminée d'hydrocarbures. Par conséquent, un plus faible volume de solution de biosurfactant à injecter implique un plus faible volume de lixiviats à traiter et un temps de lavage plus court, se traduisant par des coûts inférieurs en opération.

*Conclusion*

*Générale*

## Conclusion

L'objectif de notre travail est la bioremédiation d'un sol pollué par les hydrocarbures à l'aide d'un biosurfactant produit par un microorganisme autochtone *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans un premier temps, le sol pollué par les hydrocarbures prélevé à partir de borbier du Centre Industriel Sud à Hassi Messaoud a subi des analyses physicochimiques et microbiologiques.

L'analyse granulométrique indique que le sol étudié est un sol très sableux qui suggère une bonne perméabilité facilitant ainsi la circulation des fluides contenant les nutriments et l'oxygène qui seront d'autant plus accessible aux microorganismes que le milieu est perméable.

Le sol étudié présente une faible humidité qui peut être directement liée aux conditions climatiques de la zone d'étude et / ou à la texture du sol. Ce sol est aussi caractérisé par un pH alcalin qui est influencé par celui des boues de forage rejetées dans le borbier.

La composition chimique du sol étudié indique un déficit en élément phosphorés et azotés expliquée par les fortes teneurs de ce sol en hydrocarbures, sachant que ces éléments sont limitants pour la croissance microbienne.

Ce sol possède une microflore autochtone importante, qui suggère la possibilité de cette dernière à assurer la biodégradation des hydrocarbures lorsque les bonnes conditions du milieu sont réunies.

L'isolement des différentes souches de *Pseudomonas* existantes dans le sol a abouti à l'identification de deux souches S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>. En se basant sur leurs caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, nous avons pu rapprocher la souche S<sub>1</sub> à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* et la souche S<sub>2</sub> à l'espèce *Pseudomonas luteola*.

La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant est effectuée en se basant sur son grand pouvoir émulsifiant et sur la valeur minimale de la tension superficielle atteinte.

La culture de *Pseudomonas aeruginosa* en présence d'huile de tournesol comme substrat a permis la production d'une quantité importante de biosurfactant capable de réduire la tension superficielle et ayant un bon index d'émulsion.

Concernant la biodégradation du pétrole brut par la souche de *Pseudomonas aeruginosa*, nos résultats indiquent que le taux de biodégradation du pétrole brut est plus élevé en présence de biosurfactant qu'en son absence.

Le lavage par centrifugation a montré que le biosurfactant agit mieux dans la remobilisation lorsqu'il est à faibles concentrations. Par ailleurs, les résultats des lavages successifs du sol à l'aide de biosurfactant montrent que le meilleur rendement de mobilisation des contaminants hydrocarbonés du sol est obtenu en utilisant une solution de biosurfactant produit par notre souche *Pseudomonas aeruginosa* à 0,5% plutôt qu'une solution à 0,2%. Son utilisation nécessite donc l'injection d'un volume de solution presque deux fois moins grand pour mobiliser une quantité déterminée d'hydrocarbures. Par conséquent, un plus faible volume de solution de biosurfactant à injecter implique un plus faible volume de lixiviats à traiter et un temps de lavage plus court, se traduisant par des coûts inférieurs en opération.

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

- L'optimisation des paramètres de production du biosurfactant par l'essai d'autres substrats à faibles valeurs marchandes (huile de friture, huile de vidange,...etc.).
- L'étude des propriétés physicochimiques du biosurfactant produit, pour mieux connaître sa nature, sa structure, sa concentration micellaire critique et les paramètres influençant sa micellisation.
- Une approche moléculaire par le séquençage de l'ARN 16S de nos souches isolées aiderait à déterminer de façon précise leur affiliation phylogénique.
- La réalisation des analyses qualitatives des hydrocarbures après la biodégradation et après la remobilisation pour connaître les fractions biodégradées et remobilisées à l'aide de notre biosurfactant.
- En fin, il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs à grande échelle puisqu'il a prouvé son efficacité dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures.



*Références*

*Bibliographiques*

## A

1. **ANONYME 1 (1994).**Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement (LCPE),*Liste des substances d'intérêt prioritaire - Rapport d'évaluation - Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques*, 69p.
2. **ANONYME 2 (2011).** Rapport d'Audit Environnemental Sonatrach. *BOUTS & COUTS en collaboration avec le cabinet ERM*, France le 27 janvier 2011.
3. **ABALOS A., PINAZO A., INFANTE M. R., CASALS M., GARCIA F. et MANRESA A., (2001).** Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir*, 17 (5) :1367- 1371.
4. **ABDUL A. A. et GIBSON T. L., (1991).** Laboratory studies of surfactant-enhanced washing of biphenyl from sandy material, *Environ. Sci. Technol.*, 25 (4) : 665-671.
5. **ABOUSEOUD M., MAACHI R., AMRANE A., BOUDERGUA S. et NABI A., (2008).**Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223: 143-151.
6. **ABU-RUWAIDA A. S., BANAT M., HADITIRTO A., SALEM S. et KADRI A., (1991).** Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *ActaBiotech*, 11(4): 315-24.
7. **ADELZADEH M. R. et NOGHABI K. A.,(2009).**An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01,isolated from oil excavation areas in south of Iran.*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 69 :183–193.
8. **AKMOUCI S., (2009).** 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*. P 109.
9. **AMIRIYAN A., ASSADI M. M. et SAGGADIAN V. A., (2004).**Bioemulsan production by Iranianoilreservoirsmicroorganisms. *Iranian J. Environ. HealthSci. Eng.* 2: 28-35.
10. **ARINO S., MARCHAL R. et VANDECASTEELE J.P., (1996).** Identification and production of rhamnolipidicbiosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 162-168.
11. **AUGESTIJN D. C., JESSUP R. E., RAO P. S. C. et WOOD A. L., (1994).** Remediation of contaminated soils by solvent flushing. *J. Environ.*, 120 (1) : 41-57.



## B

12. **BAI G., BRUSSEAU M. L. et MILLER R. M., (1997).** Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, *J. Contam. Hydrol.*, 25. 157-170.
13. **BAI G., BRUSSEAU M. L. et MILLER R. M., (1998).** Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by biosurfactant, *J. Contam. Hydrol.*, 30 : 265-279.
14. **BAIZE D., (1990).** Guide des analyses courante en pédologie : choix, expression, présentation, interprétation, INRA, 173 p.
15. **BALLERINI D., (1999).** Traitements biologiques des sols. *Technique de l'ingénieur*, traité Environnement, G2 620, pp. 1- 6.
16. **BALLERINI D. et VANDECASTEELE J. P., (1999).** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. *In : Biotechnologie*, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, *Edition Tech et Doc*, pp. 835- 865.
17. **BANAT I., SAMARAH N., MURAD M., HORNE R., et BENERJEE S., (1991).** Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 80–84.
18. **BANAT I. M., (1995).** Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresource Technology*, 51 : 1-12.
19. **BANAT M., MAKKAR R. S. et CAMEOTRA S. S., (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.
20. **BARATHI S. et VASUDEVAN N., (2001).** Utilization of hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Inst.* 26: 413-416.
21. **BENINCASA M. et ACCORSINI F. R., (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *BioresourceTechnology*, 99 : 3843–3849.
22. **BENINCASA M., ABALOS A., OLIVEIRA I. et MANRESA A., (2004).** Chemical structure, surface properties, and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonio van Leeuwenhoek*, 85 : 1–8.
23. **BERTRAND A. R., BRIANT J., CASTELA A., DEGOBERT P., GATELLIER C., MASSON M., OUDIN J.-L. et J. POTTIER., (1972).** Prevention et lutte contre la pollution au cours des opérations de forage et de production en mer. *Oil and Gas Energy Booksellersince*.

24. **BERTRAND J. C. et MILLE G., (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
25. **BILLINGSLEY K.A., BACKUS S. M., WILSON S. et WARD O. P., (2002).** Remediation of PCBs in soil by surfactant washing and biodegradation in the wash by *Pseudomonas sp.* LB400. *BiotechnolLett*; 24 : 1827–32.
26. **BOCARD C., 2006.** Marrées noires et sols pollués par les hydrocarbures et traitement des pollutions. *Technip*, p. 12.
27. **BODOUR A. A, GERRERO-BARAJAS C. et MAIER M., (2004).** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.*, **10** (6): 1114-20.
28. **BOGNOLO G., (1999).** Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152 (1-2) : 41-52.
29. **BONNEL B., (2006).** Tension superficielle et capillarité. *Fichier power point*. p 16.
30. **BOSSARD I. et BARTHA R., (1984).**The fat of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 440-445.
31. **BRODERICK L. S. et COONEY J. J., (1982).** Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. *Dev. Ind. Microbiol.* 23 : 425-434.
32. **BURY S. J. et MILLER C. A.,(1993).**Effect of micellarsolubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 27 : 104–110.

## C

33. **CALVO C., MANZANERA M., SILVA-CASTRO G. A., UAD I. et GONZALEZ-LOPEZ J., (2009).** Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Science of totale environment*, 407 : 3634-3640.
34. **CAMEOTRA S. S. et MAKKAR R. S., (1998).** Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50 : 520-529.
35. **CHABOUNI S., (2008).** Essai d'utilisation des souches bactériennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures « pétrole ». *Mémoire de DES Microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla*. P. 78.
36. **CHAMPAGNAT et ADRIAN, (1974),** Pétrole et protéines. *Doin. Paris*.

37. **CHAMPION J. T., GILKEY J. C., LAMPARSKI H., RETTERER J. et MILLER R. M., (1995)**, Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. *J. Environ. Qual.*, 24 : 19-28.
38. **CHRISTOFI N. et IVSHINA I.B., (2002)**, A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93 : 915-929.
39. **CHURCHILL S. A., GRIFFIN R. A., JONES L. P. et CHURCHILL P. F., (1995)**. Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*, 24 : 19–28.
40. **COLIN F., (2000)**. Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, *Académie des sciences, rapport n° 44, Editions Tec&Doc*, 417 p.
41. **COME J.M. et DUCREUX J., (2001)**, Dépollution par injection de tensioactifs d'un forage d'alimentation en eau potable contaminé par du fioul domestique, *L'Eau, l'Industrie, les Nuisances*, 240 : 41-47.
42. **COMEY Y., (1999)**. Biorestoration des sols contaminés. *Cours professeur à l'Ecole Polytechnique de Montréal, Etudes supérieures en génie de l'environnement*.
43. **COSTA S. G. V. A. O., NITSCHKE M., HADDAD R., EBERLIN M. N. et CONTIERO J., (2006)**. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, 41 : 483–488.

## D

44. **DAS P., MUKHERJEE S. et SEM R., (2009)**. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour. Technol.* 100: 1015-1019.
45. **DE A. S., SALUNKE P. P., PARIKH H. R. et BAVEJA S. M., (2010)**. *Chryseomonas luteola* from bile culture in adult male with severe jaundice. *J of laboratory physicians*, 2 : 40-41.
46. **DESAI J. D. et BANAT I. M., (1997)**. Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1) : 47-64.
47. **DESCHENES L., LAFRANCE P., VILLENEUVE J.-P. et SAMSON R., (1996)**. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46 : 638-646.

48. **DIBBLE J.T. et BARTHA R., (1979).**Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37 : 729-739.
49. **DOVET P., (1996).**Vie microbienne du sol et production végétal. *Ed INRA*.
50. **DUCHAUFOR P.,(2001).** *Introduction à la science du sol - Sol, Végétation, Environnement*, 6<sup>ème</sup> Edition de l'Abrégé de pédologie, *Dunod sciences, Paris*, 331 p.
51. **DWARAKANATH V., KOSTARELOS K., POPE G. A., SHOTTS D. et WADE W. H., (1999),** Anionic surfactant remediation of soil columns contaminated by nonaqueous phase liquids, *J. Contam. Hydrol.*, 38, (4), 465-488.

### E

52. **ECKFORD R., COOK F. D., SAUL D., AISLABIE J., et FOGHT J., (2002).** Free-Living Heterotrophic Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Fuel-Contaminated Antarctic Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5181–5185.
53. **EDWARDS D. A., ADEEL Z. et LUTHY R. G., (1994).**Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (8) :1550-1560.
54. **EDWARDS D. A., LUTHY R.G. et LIU Z., (1991).** Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, *Environ. Sci. Technol.*, 25 : (1), 127- 133.
55. **ERIKSSON M., KA J. O. et MOHN W. W., (2001).** Effects of Low Temperature and Freez-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11) : 5107 – 5112.
56. **ERIKSSON M., SODERSTEN E., YU Z., DALHAMMAR G. et MOHN W. W., (2003).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1) : 275 – 284.

### F

57. **FRANENNEC J. P., LEPRINCE P., TREMBOUZE P. et FAVENNEC J. P., (1998).** Le raffinage de pétrole : Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication, Tome 1. *Technip*.

## G

- 58. GABET S., (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p. 177.
- 59. GARCIA-JUNCO M., DE OLMEDO E. et ORTEGO-CALVO J. J., (2001).** Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environmental Microbiology*, 3 : 561–569.
- 60. GATELLIER C., (1970).** La microbiologie du pétrole. *Revue de l'institut français de pétrole*. 25 : 04.
- 61. GIRARD M., WALTER C., REMY C., BERTHERLIN et MORE L., (2005).** Sol et environnement, exercices et études de cas. *Dunod*. P. 799.
- 62. GUNTHER N. W., NUNEZ A., FETT W. et SOLAIMAN D. K., (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a non-pathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2288–2293.
- 63. GOBE V., LEMEE L. et AMBLES A., (2000).** Structure elucidation of soil macromolecular lipids by preparative pyrolysis and thermochemolysis. *Organic Geochemistry*, 31, 409-419.
- 64. GOSWAMI P., SINGH H.D., (1992).** Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng*, 37 : 1–11.
- 65. GUERRA-SANTOS L. H., KAPPELI O. et FIECHTER A., (1986).** Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24 : 443-448.

## H

- 66. HABA E., ESPUNY M. J., BUSQUETS M., et MANRESA A., (2000).** Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 379–387.
- 67. HABA E., PINAZO A., JAUREGUI O., ESPUNY M.J., INFANTE M.R. et MANRESA A. (2003).** Physicochemical characterization and antimicrobial properties

- of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (3) : 316-322.
- 68. HAIGH S.D., (1996).** A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*, 185 :161-170.
- 69. HAMBRICK G.A., DELAUNE R.D. et PATRICK W.H.JR., (1980).** Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 40 : 365-369.
- 70. HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996),** Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
- 71. HWANG S., RAMIREZ N., CUTRIGHT T.J. et JU L.K., (2003).** The role of soil properties in pyrene sorption and desorption. *Water, Air and Soil Pollution*, 143 : 65-80.

## J

- 72. JOFFIN J. N. et LEYRAL G., (2006).** Microbiologie technique, Tome 1 : Dictionnaire des techniques, 4<sup>ème</sup> édition. *Edition CRDP d'aquitaine*. P.368.
- 73. JOSE F., (1999).** Essai de biodegradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3<sup>ème</sup> édition. *Dunod. Paris*. P.102-116.

## K

- 74. KARICKHOFF S.W., BROWN D.S. et SCOTT T.A., (1979).** Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.*, 13 : 241-248.
- 75. KÖGEL-KNABNER I., (2002).** The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 34 : 139-162.

## L

- 76. LANG S. et WULLBRANDT D., (1999).** Rhamnolipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.
- 77. LAPOINTE M., (1996).** Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure Aromatique polycyclique (pyrène) adsorbé au sol au moyen d'un biotensioactif produit par

*Pseudomonas aeruginosa*. *Mémoire de Maîtrise es Sciences, Université de Québec, Sainte-Foy*. P. 164.

- 78. LAURENT P., BUCHON L., GUESPIN-MICHEL J. F., et N. ORANGE., (2000).** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCLO depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1538-1543.
- 79. LEAHY, J. G. et COLWELL R. R., (1990).** Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315.
- 80. LECOMTE P., (1995).** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Édition Lavoisier, TEC & DOC*, p. 198.
- 81. LEE M., KANG H. et DO W., (2005).** Application of nonionic surfactant-enhanced in situ flushing to a diesel contaminated site. *Water Res.* 39: 139 - 46.
- 82. LOTFABADT. B., SHOURIANM., ROOSTAAZADR., NAJAFABADIA. R., LAURENT P., BUCHON L., GUESPIN-MICHEL J. F. et ORANGE N., (2000).** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCLO depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 1538-1543.
- 83. LOVAGLIO R. B., DOS-SANTOS F. J., JUNIOR M. J., CONTIERO J. (2011).** Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301–305.

## M

- 84. MAIER R. M. et SOBERON-CHAVEZ G., (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 625-633.
- 85. MAKKAR R. S. et CAMEOTRA S. S., (2002),** An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.
- 86. MARCHAL N. et BOURDON J. L., (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin, Paris*.
- 87. MARIN M., PEDREGOSA A., RIOS S. et LABORDA F., (1996).** Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International Biodeterioration and Biodegradation* 27 : 69-75.

- 88. MARGESIN R. et SCHINNER F., (2001).** Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7) : 3127-3133.
- 89. MARTEL R. et GELINAS (1996).** Surfactant solutions developed for NAPL recovery in contaminated aquifers. *Ground water*. 34 (1) : 143-154.
- 90. MARTINEAU B., (1996).** Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. *Edition DECLARIE ; Montréal.*
- 91. MATA-SANDOVAL J. C., KARNIS J. et TORRENTS A., (2000).** Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci.Technol.*, 34 (23) : 4923-4930.
- 92. MCCRAY J. E., BAI G., MAIER R. M. et BRUSSEAU M. L., (2001).** Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures, *J. Contam. Hydrol.*, 48 : 45-68.
- 93. MERCADE M.E. et MANRESA M.A., (1994).** The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, *J.A.O.C.S.*, 71 (1) : 61-64.

**N**

- 94. NOORDMAN W. H., WACHTER J. J. J., DE BOER G. J. et JANSSEN D. B., (2002).** The enhancement by biosurfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*. 94 : 195–212.
- 95. NORMAN R. S., FRONTERA-SUAU R. et MORRIS P. J. (2002).** Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl Environ Microbiol.* 68 : 5096–103.

**P**

- 96. PATEL R. M. et DESAI A. J., (1997).** Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.
- 97. PEKDEMIR T., COPUR M., et URUM K., (2005).** Emulsification of crude oil–water systems using biosurfactants. *Process Safety and Environmental Protection*, 83(B1): 38–46.



- 98. PEKDEMIR, T., ISHIGAMI, Y. AND UCHIYAMA, H., (1999).** Characterisation of aescin as a biosurfactant for environmental remediation, *J SurfactDeterg*, 2(3): 337–341.
- 99. PELMONT J., (1995),** Bactéries et environnement-adaptation biologique, Tome 1. OPU. P. 875.
- 100. PENNELL K. D., ABRIOLA L. M. et WEBER W. J., (1993).** Surfactant-enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1 - Experimental Investigation. *Environ.Sci. Technol.*, 27 (12) : 2332-2340.
- 101.PERFUMO A., SMYTH T. J. P., MARCHANT R. et BANAT, I. M., (2010).** Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: Timmis, K.N. (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. *Springer- Verlag, Berlin Heidelberg*, 1501–1512.
- 102. PIGNATELLO J.J., (1998).** Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76-77 : 445-467.
- 103.PORE J., (1992).** *Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.

## R

- 104. RAHMAN K. S. M., BANAT I. M., RAHMAN T. J., THAYUMANAVAN THA. et LAKSHMANAPERUMALSAMY P., (2002).** Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *BioresourceTechnology*, 81 : 25–32.
- 105.RAHMAN K. S. M., RAHMAN T. J., KOURKOUTOAS Y., PETSAS I., MARCHANT R. et BANAT I. M., (2003).** Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *BioresourceTechnology*, 90 : 159–168.
- 106.RAHMAN K. S. M., RAHMAN T. J., MCCLEAN S., MARCHANT R. et BANAT I. M., (2002).** Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *BiotechnolProg*, 18 : 1277–81.
- 107. RAZA Z. A., REHMAN A., KHAN M. S. et KHALID Z. M., (2007).** Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* 18 : 115–121.

108. REIS R. S., GONC-ROCHAA S. L. , CHAPEAUROUGE D. A., DOMONTA G. B., SANTA- ANNA L. M. M., GUIMARES-FREIRE D. M. et PERALES J., (2010). Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. *ProcessBiochemistry*, 45 : 1504–1510.
109. RHODIA G., (1998). Guide à la décision pour le choix d'une technique de dépollution des sols. *Eddition entreprise Rhodia Ecoservice, Paris* P. 413-421.
110. ROBERT M., MERCADE M. E., BOSCH M. P., PARRA J. L., ESPUNY M. J., MANRESA M.A. et GUINEA J., (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.*, 11 (12) : 871–874.
111. ROCHA M. V. P., SOUZA M. C. M., BENEDICTO S. C. L., BEZERRA M. S., MACEDO G. R., SAAVEDRA PINTO G. A., et GONÇALVES L. R. B., (2007). Production of Biosurfactant by *Pseudomonasaeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice. *AppliedBiochemistry and Biotechnology*, 136-140.
112. RÖLING W. F. M., HEAD I. M. et LARTER S. R., (2003). The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, 154 : 321-328.
113. RON E.Z. et ROSENBERG E., (2002), Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3 : 249-252.
114. ROY D., KOMMALAPATI R. R., VALSARAJ K. T. et CONSTANT W. D., (1995). Soil flushing of residual transmission fluid: application of colloid gazaphronsuspensions and conventional surfactant solution. *Water Res.* 29 (2) : 589-595.

## S

115. SALIOT, A., (1981). Natural hydrocarbons in sea water. In :Duursma, E.K. and Dawson, R. (Eds.), *Marine organic chemistry. Elsevier, Amsterdam*, pp. 327-374.
116. SANTOS S. C. D., FERNANDEZ L. G., ROSSI-ALVA J. C., et ROQUE M. R. A., (2010). Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. *African Journal of Biotechnology*. 9(35) : 5704-5711.

117. SCOTT C. C. L. et FINNERTY W. R., (1976). A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon- oxidizing microorganisms. *J. Gen. Microbiol*, 94: 342-350.
118. SCRIBAN R., (1999). Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par les polluants organiques 5<sup>ème</sup> édition. *Ed Lavoisi*.
119. SHINODA K. et FONTELL K., (1995). Ionic surfactants capable of being used in hard water. *Advances in Colloid and Interface Science*, 54 : 55-75.
120. SIFOUR M., AL-JILAWI M. H. et AZIZ J. M., (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10 (8) : 1331-1335.
121. SILVA S. N. R. L., FARIAS C. B. B., RUFINO R. D., LUNA J. M. et SARUBBO L. A., (2010). Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79 : 174–183.
122. SINGLETON P., (1999), Bactériologie, *Edition Duonod 4<sup>ème</sup> édition Paris*. P.415.
123. SOLTANI M., (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. *Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique*, p. 284.
124. SOMASUNDARAN P. et KRISHNAKUMAR S., (1997). Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, 123-124 : 491-513.
125. SOMAYEH V., ABBAS A. S. et NOUHI A. S., (2008). Study the role of isolated bacteria from oil contaminated soil in bioremediation. *J Bacteriol*, 1365 : 678–707.
126. SOTIROVA A., SPASOVA D., VASILEVA-TONKOVA E. et GALABOVA D., (2009). Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 164 : 297—303
127. STAPLETON R. D., SAVAGE D. C., SAYLER G. S., et STACEY G., (1998). Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11) : 4180 - 4184.

## T

128. TABATABAEE A., ASSADI M. M., NOOHI A. A. et SAJADIAN V. A., (2005). Isolation of biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.* 2: 6-12.

129. **THANGAMANI S. et SHREVE G. S., (1994).** Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (12) : 1993-2000.
130. **THAVASI R., JAYALAKSHMI S. et BANAT I. M., (2011<sub>a</sub>).** Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource Technology*, 102 : 3366–3372.
131. **THAVASI R., JAYALAKSHMI S. et BANAT I. M., (2011<sub>b</sub>).** Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresour. Technol.* 102 (2) : 772–778.
132. **TISSOT B. P., WELTE D. H., (1984).** Petroleum formation and occurrence. *Springer, Berlin*.
133. **TORTORA G. J., FUNKE B.R. et CASE C. L., (2003).** Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.

## U

134. **URUM K. et PEKDEMIR T., (2004).** Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*; 57: 1139–1150.
135. **URUM K., PEKDEMIR T. et GOPUR M., (2003).** Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Transactions of the Institute of Chemical Engineering* 81 B : 203–209.

## V

136. **VAN DYKE M. I., COUTURE P., BRAUER M., LEE H. et TREVORS J. T., (1993).** *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.*, 39 : 1071-1078.
137. **VIPULANANDAN C. et REN X., (2000).** Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (7) : 629-634.

138. **VOGEL T. et BALLERINI D., (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, 16(3) : 204- 209.

W

139. **WALWORTH J., BRADDOCK J. et WOOLARDC., (2001),** Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold regions science & technology.* 32 : 85-91.
140. **WARD D.M. et BROCK T.D., (1978).**Hydrocarbonbiodegradation in hypersalineenvironments. *Applied and EnvironmentalMicrobiology*, 35 : 353-359.
141. **WEI Y.H., CHOU C.L. et CHANG, J.S., (2005).**Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27 : 146–154.
142. **WEST C.C. et HARWELL J.H., (1992),** Surfactants and subsurfaceremediation, *Environ.Sci. Technol.*, 36 (12) : 2324-2330.
143. **WHANG L. M., LIU P. W. G., MA C. C. et CHENG S. S., (2008).**Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil.*Journal of HazardousMaterials*, 151 :155–163.
144. **WILCKE W., (2000).** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soils – a review, *J. Plant Nutr. SoilSci.*, 163 : 229-248.
145. **WU J. Y., YE H. K. L., LU W. B., LIN C. L. et CHANG J. S., (2008).**Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *BioresourceTechnology*, 99 : 1157–1164.

Y

146. **YIN H., QIANG J., JIA Y., YE J., PENG H., QIN H., ZHANG N. et HE B., (2009).**Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *ProcessBiochemistry* 44 : 302–308.



*Annexes*

## Annexe I : Matériels utilisés

### 1. Matériels utilisés au terrain

Matériels	Utilisation
Pelle	Pour creuser le profil
Flacons	Pour l'échantillonnage du sol
Alcool et coton cardé	Pour désinfecter l'outil de prélèvement
Une glacière portative avec la glace	Pour transporter les échantillons au laboratoire
Des étiquettes	Pour déterminer chaque échantillon de chaque analyse

### 2. Matériel du laboratoire

Equipement	Verrerie et matériels en plastique
Etuve	Erlenmeyers de 50 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml et 2000 ml
Autoclave	Béchers de 100 ml, 250 ml, 500 ml et 1000 ml
Four Pasteur	Boîtes de pétrie en plastique
pH mètre	Pipettes graduées
Agitateur-plaque chauffante	Pipettes Pasteur
Centrifugeuse à froid	Anse de platine
Incubateur agitateur	Tubes à essai
Microscope photonique	Lames et lamelles
Compteur de colonies	Parafilms
Balance analytique	Pinces (métalliques et en bois)
Bain marie	
Bec bunsen	
Spectrophotomètre type DR 2000	
Analyseur d'hydrocarbures type HORIBA	
Réfrigérateur	

## Annexe II : Milieux de cultures et réactifs

### A. composition de milieux de culture

#### 1. Gélose nutritive :

Ingrédients	Quantité
Extrait de viande	1,0g
Extrait de levure	2,0g
Peptone	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Agar	15,0g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,4

#### 2. Cétrimide Agar :

Ingrédients	Quantité
Peptone de gelatine	20.0 g
Chloride de magnesium	1.4 g
Sulfate de potassium	10.0 g
Glycerol	10.0 ml/l
Cetrimide	0.3 g
Agar	13.0 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7.2 g

#### 3. Bouillon nutritive :

Ingrédients	Quantité
Peptone	5,00 g
Extrait de viande de bœuf	3,00 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,20 g

#### 4. Milieux M<sub>1</sub> :

Ingrédients	Quantité
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00 g
MgSO <sub>4</sub>	0.20 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,00 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
FeCL <sub>3</sub>	0.05 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,00



**5. Milieu M<sub>2</sub> :**

Ingrédients	Quantité
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
Fe SO <sub>4</sub>	0,008 g
CaCl <sub>2</sub>	0,05g
Urée	6 g
Extrait de levure	0,1 g
Solution d'éléments traces	1 ml
Eau distillée	1000 ml
pH	7,00

- Composition de la solution d'éléments traces**

Ingrédients	Quantité
Fe SO <sub>4</sub>	0,00152 g/l
Mn SO <sub>4</sub>	0,00151 g/l
Cu SO <sub>4</sub>	0,00016g/l
Zn SO <sub>4</sub>	0,000161g/l

**6. Milieu king A :**

Ingrédients	Quantité
Peptone dite "A"	20,0 g
Glycérol	10,0 g
Sulfate de potassium	10,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Agar	12,0 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

**7. Milieu king B :**

Ingrédients	Quantité
Peptone dite "B"	20,0 g
Glycérol	10,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	1,5 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	1,5 g
Agar	12,0 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

### 8. Milieu gélose viande foie :

Ingrédients	Quantité
Peptone pepsique de viande et de foie	30 g
Glucose	2 g
Agar	6 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,4

### B. Réactifs et solutions

- Alcool,
- Disques d'oxydases,
- Eau distillée,
- Eau oxygénée 10 V,
- Fuchsine,
- Pétrole brut,
- Dihydrogynocarbonate de sodium,
- Huile de vaseline,
- Huile à immersion,
- Poudre de Zinc,
- Réactifs de Kovacs,
- Solution de lugol,
- Violet de gentiane,
- HCl,
- NaOH,
- Nitra Ver 6,
- Nitri Ver 3,
- Nitri Ver 2,
- Phospho Ver 4,
- Réactif de TDA,
- Réactif VP 1 et VP 2.

## **Annexe III : Présentation des galeries API 20 E (d'après la documentation bioMérieux).**

### **1. Principe**

La galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé.

La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sontensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en milieu physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation.

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate ( $H_2S$ ), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA).

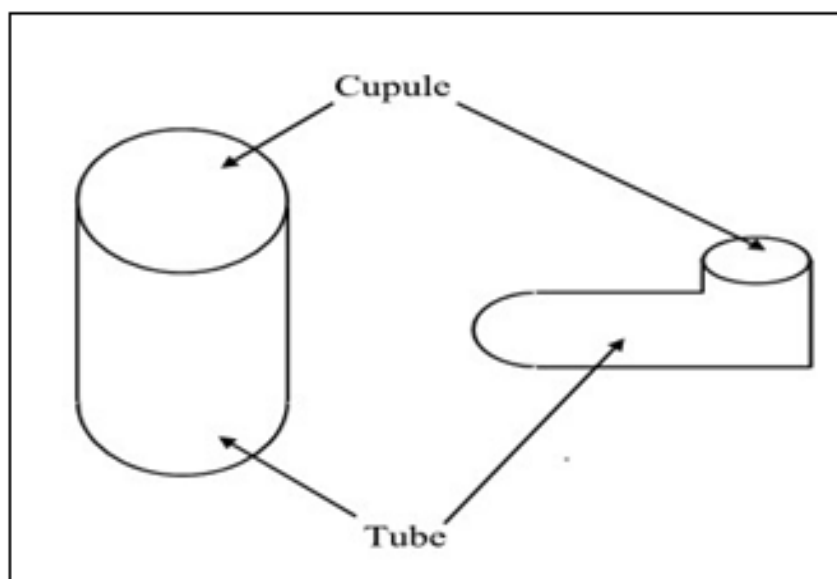
La galerie permet également la recherche de la nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

### **2. Technique**

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boîte afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".
- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein des microtubes, le fabricant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les

tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.

- Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.
- Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.



**Figure : Présentation schématique d'un microtube d'une galerie Api 20 E.**

- Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

### 3. Lecture

- Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée (voir ci-dessous le tableau de lecture).
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :

TDA : ajouter une goutte du réactif TDA

IND : ajouter une goutte du réactif de James

VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2

Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.

- Noter les résultats sur la fiche de lecture.

**Tableau 1: Lecture d'une galerie API 20 E**

Test	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactif	Résultat	
				négatif	Positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-Dgalactopyranoside	Non	Incolore	Jaune
<u>ADH</u>	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou Rouge
<u>LDC</u>	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge
<u>ODC</u>	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge
CIT *	Assimilation du citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou bleu
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
<u>URE</u>	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Incolore ou jaune	marron ou brun foncé
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou jaune	Rose ou rouge
VP*	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL *	Gélatinase	Gélatine de bœuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu Vert	Jaune
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu	Jaune

				vert	
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

- Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres noires, seul le tube doit être ensemencé.
- Pour les tests CIT, VP et GEL, le tube et la cupule doivent être ensemencés.
- Pour les tests dont les sigles sont soulignés, seul le tube doit être ensemencé. Aprèsensemencement, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

### **Annexe IV : Coloration de Gram**

D'après SINGLETON(1999), la coloration de Gram s'effectue selon les étapes suivantes :

- Préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec Bunsen.
- Recouvrir au violet de Gentiane pendant 1 minute. Eliminer l'excès par l'eau courante;
- Ajouter du Lugol : deux bains de 45 secondes, jeter l'excès par l'eau courante;
- Traiter a l'alcool 95° pendant 30 secondes, puis rinçage à l'eau;
- Recolorer à la Fuschine pendant 1à 2 minutes, rinçage à l'eau puis séchage;
- L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion ; les bactéries Gram positif se colorent en violet alors que les Gram négatif se colorent en rose.

## Annexe 5 : Suivi de la cinétique de la croissance microbienne

Tableau 2 : Suivi de la cinétique de la croissance microbienne des deux souches cultivées sur le milieu M<sub>1</sub> additionné de 2% de pétrole brut

Temps (heures)	Souche S <sub>1</sub>		Souche S <sub>2</sub>	
	N (UFC)	Log N	N (UFC)	Log N
0	1,73.10 <sup>3</sup>	3,24	2,34.10 <sup>3</sup>	3,37
12	7,58.10 <sup>4</sup>	4,88	9,54.10 <sup>3</sup>	3,98
24	4,46.10 <sup>6</sup>	6,65	2,45.10 <sup>5</sup>	5,39
36	2,18.10 <sup>8</sup>	8,34	4,36.10 <sup>6</sup>	6,64
48	1,44.10 <sup>9</sup>	9,16	5,24.10 <sup>7</sup>	7,72
60	7,58.10 <sup>9</sup>	9,88	1,47.10 <sup>8</sup>	8,17
72	1,34.10 <sup>10</sup>	10,13	7,41.10 <sup>8</sup>	8,87
84	1,77.10 <sup>10</sup>	10,25	9,33.10 <sup>8</sup>	8,97
96	2,69.10 <sup>10</sup>	10,43	1,23.10 <sup>9</sup>	9,07
108	3,09.10 <sup>10</sup>	10,49	1,38.10 <sup>9</sup>	9,14
120	3,58.10 <sup>10</sup>	10,55	1,47.10 <sup>9</sup>	9,17

Tableau 3 : Suivi de la concentration microbienne au cours de la production de biosurfactant

Temps (heures)	N (UFC)	Log N
0	3,98.10 <sup>3</sup>	3,6
12	8,31.10 <sup>4</sup>	4,92
24	2,39.10 <sup>6</sup>	6,38
36	1,41.10 <sup>8</sup>	8,15
48	1,14.10 <sup>9</sup>	9,06
60	5,75.10 <sup>9</sup>	9,76
72	1,17.10 <sup>10</sup>	10,07
84	4,46.10 <sup>10</sup>	10,65
96	4,89.10 <sup>10</sup>	10,69
108	4,89.10 <sup>10</sup>	10,69
120	5,37.10 <sup>10</sup>	10,73



**Tableau 4 : Suivi de la concentration microbienne au cours de la biodégradation de pétrole brut**

Temps (heures)	Sans biosurfactant		Avec biosurfactant	
	N (UFC)	Log N	N (UFC)	Log N
0	$8,12.10^3$	3,91	$6,30.10^3$	3,8
24	$5,88.10^6$	6,77	$5,37.10^8$	8,73
48	$1,99.10^9$	9,13	$1,99.10^{10}$	10,93
72	$1,44.10^{10}$	10,16	$9,33.10^{11}$	11,97
98	$3,54.10^{10}$	10,55	$1,58.10^{12}$	12,2
120	$3,98.10^{10}$	10,6	$2,75.10^{12}$	12,44

## UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR LES HYDROCARBURES

### Résumé :

L'objectif de notre étude est la bioremédiation d'un sol provenant d'un bourbier à Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures en utilisant sa microflore autochtone additionnée de leur propre biosurfactant produit dans les conditions de laboratoire.

Malgré les conditions environnementales et les caractères physicochimiques du sol étudié peu favorables, une biomasse microbienne non négligeable soit  $2.10^8$  UFC/g de sol a été mise en évidence. Parmi les souches existantes, deux ont été isolées : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas luteola*. La meilleure productrice de biosurfactant est *Pseudomonas aeruginosa* qui a pu produire en utilisant l'huile de tournesol comme seule source de carbone 2,4 g/l de biosurfactant capable de diminuer la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 26,06 mN/m avec un index d'émulsion  $E_{24}$  de 50%.

Le taux de biodégradation du pétrole brut par la souche *Pseudomonas aeruginosa* est plus élevé en présence de biosurfactant (53,03%) qu'en son absence (35,27%). Par ailleurs, Le taux d'hydrocarbures mobilisés après le lavage du sol contenant 62,70 g d'hydrocarbures par kilogramme de sol par centrifugation est de 50,21% et de 76,13% en utilisant des faibles concentrations de biosurfactant de 0,2% et 0,5% respectivement. Les mêmes concentrations de biosurfactant ont permis de remobiliser 46,09% et 79,03% de contaminant lorsque les échantillons de sol sont soumis à plusieurs lavages successifs sans centrifugation.

La souche autochtone de *Pseudomonas aeruginosa* isolée est donc capable de produire un biosurfactant qui a un grand pouvoir dans la remobilisation des hydrocarbures et l'accélération de leur biodégradation.

**Mots clés :** Hydrocarbures, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, pétrole brut, biodégradation, remobilisation.

### استخدام سلالات بكتيرية محلية في إنتاج جزيئات السطح و المعالجة الحيوية لتربة حاسي مسعود الملوثة بالنفط

#### ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو المعالجة الحيوية لتربة مستخرجة من مستنقع نفطي بحاسي مسعود عن طريق استعمال جراثيمه الطبيعية مضافا اليها جزيئات السطح المنتجة عن طريقها تحت الشروط المخبرية.

بالرغم من الظروف البيئية و الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة غير الملائمة، إلا انه قمنا بتحديد كتلة حيوية جرثومية هائلة مقدرة ب  $2.10^8$  ووم/غ من التربة. من بين السلالات البكتيرية الموجودة، قمنا بعزل اثنتين: *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas luteola*. السلالة الأكثر إنتاجا لجزيئات السطح هي *Pseudomonas aeruginosa* التي استطاعت أن تنتج باستخدام زيت عباد الشمس كمصدر وحيد للكربون، 2,4 غ /ل من جزيئات السطح و خفض التوتر السطحي إلى غاية 26,06 م ن/م مع مؤشر استحلاب يقدر ب 50% .

نسبة التحلل البيولوجي للبتروال الخام عن طريق سلالة *Pseudomonas aeruginosa* كانت أعلى في وجود جزيئات السطح (53,03%) من غيابها (35,27%). من ناحية أخرى، نسبة النفط المسترجعة من تربة تحتوي على 62,70 غ من النفط في الكيلوغرام من التربة بعد غسلها عن طريق الطرد المركزي هي 50,21% و 76,13% باستعمال تراكيز ضعيفة من جزيئات السطح المقدرة ب 0,2% و 0,5% على التوالي. نفس هذه التراكيز من جزيئات السطح استطاعت استرجاع 46,09% و 79,03% من هذا النفط الملوث عندما خضعت عينات التربة لغسيل متتالي بدون طرد مركزي.

السلالة المعزولة *Pseudomonas aeruginosa* تستطيع إذن إنتاج جزيئات السطح و التي لها القدرة على استرجاع النفط و تسريع تحلله البيولوجي.

**الكلمات الدالة:** النفط، *Pseudomonas aeruginosa*، جزيئات السطح، البتروال الخام، التحلل البيولوجي، استرجاع النفط.

## THE USE OF ABORIGINAL BACTERIAL STRAINS IN THE PRODUCTION OF BIOSURFACTANT AND THE BIOREMEDIATION OF HASSI MESSAOUD SOILS CONTAMINATED BY HYDROCARBONS

### Abstract:

The aim of our study is the bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbons from a quagmire in Hassi Messaoud by using its aboriginal microorganisms added their own biosurfactant produced in laboratory conditions.

Despite of the unfavorable environmental conditions and physicochemical characteristics of soil studied, significant microbial biomass that is  $2.10^8$  UCF/g of soil. Among the existing strains, two were isolated: *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas luteola*. The best biosurfactant producing is *Pseudomonas aeruginosa* that could produce by using sunflower oil as sole source of Carbone, 2, 4 g/l of biosurfactant that reducing the surface tension of culture medium until 26,06mN/m with an emulsion index of 50%.

The biodegradation rate of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* is higher in the presence of biosurfactant (53, 03%) than in its absence (35, 27%). Moreover, the rate of hydrocarbons mobilized after soil washing containing 62, 70 g of hydrocarbons per kilogram of soil by centrifugation is 50, 21% and 76, 13% by using low concentrations of biosurfactant that are 0, 2% and 0, 5% respectively. The same biosurfactant concentrations made it possible to remobilize 46, 09% and 79, 03% of contaminants when the soil samples are subjected to several successive washings without centrifugation.

Aboriginal strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated is capable to produce a biosurfactant that has a great power in the remobilization of hydrocarbons and the acceleration of their biodegradation.

**Keywords :** hydrocarbons, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, crudeoil, biodegradation, remobilization.

# UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNE AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR LES HYDROCARBURES

## Résumé :

L'objectif de notre étude est la bioremédiation d'un sol provenant d'un bourbier à Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures en utilisant sa microflore autochtone additionnée de leur propre biosurfactant produit dans les conditions de laboratoire.

Malgré les conditions environnementales et les caractères physicochimiques du sol étudié peu favorables, une biomasse microbienne non négligeable soit  $2.10^8$  UFC/g de sol a été mise en évidence. Parmi les souches existantes, deux ont été isolées : *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas luteola*. La meilleure productrice de biosurfactant est *Pseudomonas aeruginosa* qui a pu produire en utilisant l'huile de tournesol comme seule source de carbone 2,4 g/l de biosurfactant capable de diminuer la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 26,06 mN/m avec un index d'émulsion  $E_{24}$  de 50%.

Le taux de biodégradation du pétrole brut par la souche *Pseudomonas aeruginosa* est plus élevé en présence de biosurfactant (53,03%) qu'en son absence (35,27%). Par ailleurs, Le taux d'hydrocarbures mobilisés après le lavage du sol contenant 62,70 g d'hydrocarbures par kilogramme de sol par centrifugation est de 50,21% et de 76,13% en utilisant des faibles concentrations de biosurfactant de 0,2% et 0,5% respectivement. Les mêmes concentrations de biosurfactant ont permis de remobiliser 46,09% et 79,03% de contaminant lorsque les échantillons de sol sont soumis à plusieurs lavages successifs sans centrifugation.

La souche autochtone de *Pseudomonas aeruginosa* isolée est donc capable de produire un biosurfactant qui a un grand pouvoir dans la remobilisation des hydrocarbures et l'accélération de leur biodégradation.

**Mots clés :** Hydrocarbures, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, pétrole brut, biodégradation, remobilisation.

## استخدام سلالات بكتيرية محلية في إنتاج جزيئات السطح و المعالجة الحيوية لتربة حاسي مسعود الملوثة بالنفط

### ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو المعالجة الحيوية لتربة مستخرجة من مستنقع نفطي بحاسي مسعود عن طريق استعمال جراثيمه الطبيعية مضافا إليها جزيئات السطح المنتجة عن طريقها تحت الشروط المخبرية.

بالرغم من الظروف البيئية و الخصائص الفيزيوكيميائية للتربة غيرالملائمة، إلا انه قمنا بتحديد كتلة حيوية جرثومية هائلة مقدرة ب  $2.10^8$  ووم/غ من التربة. من بين السلالات البكتيرية الموجودة، قمنا بعزل اثنتين: *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas luteola*. السلالة الأكثر إنتاجا لجزيئات السطح هي *Pseudomonas aeruginosa* التي استطاعت أن تنتج باستخدام زيت عباد الشمس كمصدر وحيد للكربون، 2،4 غ /ل من جزيئات السطح و خفض التوتر السطحي إلى غاية 26،06 م ن/م مع مؤثر استحلاب يقدر ب 50% .

نسبة التحلل البيولوجي للبتروال الخام عن طريق سلالة *Pseudomonas aeruginosa* كانت أعلى في وجود جزيئات السطح (53،03%) من غيابها (35،27%). من ناحية أخرى، نسبة النفط المسترجعة من تربة تحتوي على 62،70 غ من النفط في الكيلوغرام من التربة بعد غسلها عن طريق الطرد المركزي هي 50،21% و 76،13% باستعمال تراكيز ضعيفة من جزيئات السطح المقدرة ب 2،0% و 0،5% على التوالي. نفس هذه التراكيز من جزيئات السطح استطاعت استرجاع 46،09% و 79،03% من هذا النفط الملوث عندما خضعت عينات التربة لغسيل متتالي بدون طرد مركزي.

السلالة المعزولة *Pseudomonas aeruginosa* تستطيع إذن إنتاج جزيئات السطح و التي لها القدرة على استرجاع النفط و تسريع تحلله البيولوجي.

الكلمات الدالة: *Pseudomonas aeruginosa* ، جزيئات السطح، البتروال الخام، التحلل البيولوجي، استرجاع النفط

# THE USE OF BACTERIAL STRAINS IN THE PRODUCTION OF BIOSURFACTANT AND THE BIOREMEDIATION OF HASSI MESSAOUD SOILS CONTAMINATED BY HYDROCARBONS

## Abstract:

The aim of our study is the bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbons from a quagmire in Hassi Messaoud by using its aboriginal microorganisms added their own biosurfactant produced in laboratory conditions.

Despite of the unfavorable environmental conditions and physicochemical characteristics of soil studied, significant microbial biomass that is  $2.10^8$  UCF/g of soil. Among the existing strains, two were isolated: *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas luteola*. The best biosurfactant producing is *Pseudomonas aeruginosa* that could produce by using sunflower oil as sole source of Carbone, 2,4 g/l of biosurfactant that reducing the surface tension of culture medium until 26,06 mN/m with an emulsion index of 50%.

The biodegradation rate of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* is higher in the presence of biosurfactant (53, 03%) than in its absence (35, 27%). Moreover, the rate of hydrocarbons mobilized after soil washing containing 62, 70 g of hydrocarbons per kilogram of soil by centrifugation is 50, 21% and 76, 13% by using low concentrations of biosurfactant that are 0,2% and 0,5% respectively. The same biosurfactant concentrations made it possible to remobilize 46, 09% and 79, 03% of contaminants when the soil samples are subjected to several successive washings without centrifugation.

Aboriginal strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated is capable to produce a biosurfactant that has a great power in the remobilization of hydrocarbons and the acceleration of their biodegradation.

**Keywords :** hydrocarbons, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, crude oil, biodegradation, remobilization.