



*Département de Génie de l'Environnement
Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement (l'URIE)*

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement

Présenté par :

Melle KEDDOU Imene

Thème

*Isolement de souches bactériennes
productrices de biosurfactants à partir
d'un sol contaminé par les hydrocarbures*

Soutenu le : 24/06/2015

Devant le jury :

Président : Mr. N. MAMERI Professeur à l'E.N.P

Examineur : Mr. R. BOUARAB Professeur à l'E.N.P

Promotrice : Mme N. ABDI Professeur à l'E.N.P

Co-Promoteur : Mr. D. TAZDAÏT Maître de Conférences B à l'U.M.M.T.O

Promotion Juin 2015

Dédicaces

- *En hommage à mon père.*

- *A ma très chère mère.*

- *A mes frères et mes belles sœurs.*

- *A toute ma famille.*

- *A mes amis.*

- *A mes camarades de la promotion.*

Remerciement

Dieu merci pour le courage et la volonté sans lesquelles mon travail n'aurait jamais pu voir la lumière de ce jour

Ce travail a été réalisé au laboratoire des biotechnologies environnementales et génie des procédés du département de Génie l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique et a été effectué sous la direction de Madame N.Abdi professeur à l'ENP.

Je tiens à lui exprimer mes remerciements les plus respectueux pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour ses directives judicieuses qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

Je tiens vivement à remercier mon Co-promoteur Monsieur D. Tazdait Maître de Conférences B à l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, pour ses conseils, son aide et orientations tout au long de ce travail.

Je remercie monsieur N.Mameri, professeur à l'ENP qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance

Je remercie également monsieur R. Bouarab, professeur à l'ENP pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Enfin je ne saurai terminer, sans oublier de remercier ma mère, mes frères, Monsieur Zerga Djamel et sa femme Naima pour leur soutien, leur patience et leur amour et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail

ملخص

الهيدروكربونات. تم عزل ب من تربة ملوثة لجزيئات السطح منتجة ميكروبية سلالات عزل هو دراستنا الهدف من نوع عينتنا من التربة. السلالات الخمسة المعزولة تنتمي إلى من سلالات خمسة *Pseudomonas aeruginosa* الاستحلاب، مختلفة (اختبار مؤشر إجراء اختبارات جزيئات السطح. ، تم المعزولة لإنتاج السلالات قدرة للتدليل على قطرة و انتشار النفط الالاستحلاب، انهيار قطرة، اختبار انتشار النفط). اختبارات مؤشر الالدم، انهيار أجار اختبار اختبار سلالة. لكن إلى سلالة من مؤشر استحلاب يختلف مع جزيئات السطح من حيث إنتاج إيجابية أسفرت عن نتائج ليست من طبيعة سلالات ال التي تنتجها هذه جزيئات السطح إلى أن تشير نتيجة سلبية و هذه النتيجة الدم أعطي أجار .rhamnolipides

الهيدروكربونات. تربة، جزيئات السطح، بكتيريا، كلمات البحث : عزل،

Résumé

L'objectif de notre étude est l'isolement de souches microbiennes productrices de biosurfactants à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures. Cinq souches ont été isolées à partir de notre échantillon de sol. Les cinq souches isolées ont été apparentées à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Pour mettre en évidence la capacité des souches isolées à produire des biosurfactants, différents tests ont été effectués (test de l'index d'émulsion E₂₄, test de la gélose au sang, test des puits et test de propagation de la phase hydrophobe). Les tests de l'index d'émulsion, des puits et de propagation de la phase hydrophobe ont donné des résultats positifs en termes de production de biosurfactants avec un index d'émulsion qui varie d'une souche à une autre. En revanche le test de la gélose au sang a donné un résultat négatif indiquant que les biosurfactants produits par les souches isolées ne sont pas de nature rhamnolipidiques.

Mots clés : Isolement, bactéries, biosurfactant, sol, hydrocarbures.

Abstract:

The aim of our study is to isolate and characterize microbial strains producing biosurfactants from soil contaminated by hydrocarbons. Five strains were isolated from this soil. The five isolates were related to the species *Pseudomonas aeruginosa*. To demonstrate the ability of strains to produce biosurfactants, different tests were carried out (test of the emulsification index E₂₄, test of the Blood agar, test of the drop collapse and test of spreading of the hydrophobic phase). The tests of the emulsification index, drop collapse and spreading of the hydrophobic phase gave positive results in terms of production of the biosurfactant with an emulsion index which varies from one strain to another. However the test of blood agar gave a negative result indicating that the biosurfactants produced by strains are not rhamnolipidic in nature.

Keywords: Isolation, bacteria, biosurfactant, soil hydrocarbons.

LISTE DES ABREVIATIONS

API : Appareillage et Procédés d'Identification

ONPG : Ortho-nitro-phynilgalactoside

GLU : Glucose

ARA : Arabinose

LDC : Lysine décarboxylase

ODC : Ornithine décarboxylase

CIT : Citrate

URE : Urée

TDA : Tryptophane désaminase

IND : Indole

OX ; Oxydase

E₂₄ : Indexe d'émulsion

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principaux types de surfactants biologiques.....	20
Tableau 2	Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne.....	26
Tableau 3	résultats de la coloration de gram.....	41
Tableau 4	résultats de l'indentification avec galeries API 10S.....	45
Tableau 5	Résultats du test des puits.....	50
Tableau 6	Résultats du test de propagation de la phase hydrophobe	51

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Constituants formant un sol et quelques exemples d'interactions entre les différents constituants.....	3
Figure 2	Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol.....	11
Figure 3	Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	14
Figure 4	Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures.	17
Figure 5	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.....	23
Figure 6	Solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température.....	25
Figure 7	L'échantillon du sol prélevé	29
Figure 8	Schéma montrant la série de dilutions et l'ensemencement sur des boîtes de Pétri.....	31
Figure 9	Aspect macroscopique des colonies bactériennes.....	40
Figure 10	Aspect macroscopique des colonies formées sur le milieu UriSelect 4...	42
Figure 11	Les galeries API 10S inoculées avant l'incubation.	43
Figure 12	Les galeries API 10S inoculées après l'incubation	44
Figure 13	Observation macroscopique de l'émulsion obtenue pour chaque souche isolée.....	46
Figure 14	Valeurs de l'index d'émulsion (E_{24}) obtenues pour chaque souche isolée.....	47
Figure 15	Résultats du test de la gélose au sang.....	49

SOMMAIRE

Résumés

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Etude bibliographique

I. Le sol : milieu complexe vivant.....3

I.1. Le sol, milieu à trois phases.....3

I.2. Les organismes vivants du sol.....4

II. Généralités sur les hydrocarbures.....5

II. 1. Définition des hydrocarbures.....5

II. 2. Origine des hydrocarbures.....5

II. 3. Classification des hydrocarbures.....5

a. Hydrocarbures saturés5

b. Hydrocarbures insaturés.....6

c. Hydrocarbures aromatiques.....6

d. Composés polaires.....8

e. Asphaltènes.....8

II.4. Les hydrocarbures et l'environnement.....9

II.4. 1. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures.....9

II.4.2. Pollution des sols par les hydrocarbures9

II.4.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.....10

II.4.3.1. Transformations abiotiques.....10

a. Evaporation.....10

b. Solubilisation.....11

c. Emulsification.....	11
d. Sédimentation.....	11
e. Photo-oxydation.....	12
f. L'hydrolyse	12
II.4.3.2. Transformation biotique	12
II.5.La biodégradation des hydrocarbures.....	13
II.5.1.Définition.....	13
II.5.2. Principe de la biodégradation.....	13
II.5. 3. Microorganismes dégradants les hydrocarbures.....	15
II.5.4. Modes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures.....	16
a. Utilisation de la phase dissoute.....	16
b. Transfert interfacial direct.....	16
c. Transfert interfacial assisté par les biosurfactants	16
d. Transfert micellaire.....	17
II-5-5- Métabolisme des hydrocarbures.....	17
III. Généralités sur les bio-surfactants.....	18
III.1.Définition.....	18
III.2.Classification.....	18
III.3. Microorganismes producteurs de biosurfactant.....	19
III.4. Biosynthèse et rôle physiologique.....	20
III.5. Paramètres influençant la production des biosurfactants.....	21
a. Influence de la source de carbone.....	21
b. Influence de l'azote.....	21
c. Influence du pH.....	22
d. Influence des sels minéraux.....	22
e. Influence de l'oxygène.....	22
f. Influence de la vitesse d'agitation.....	22

III.6. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	22
III.7. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants.....	23
III.7.1. Concentration Micellaire Critique (CMC).....	23
III.7.2. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation	24
III.7.2. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température.....	24
III.8. Les différentes applications des biosurfactants	26
a. La bioremédiation.....	26
b. l'industrie pétrolière.....	27
c. l'agriculture.....	27
d. l'industrie alimentaire.....	27
e. l'industrie du cosmétique.....	27
f. l'industrie pharmaceutique.....	27
g. le secteur de haute technologie.....	27

Matériel et méthodes

I. Matériel	29
II. Méthodes.....	29
II.1. Réalisation de l'échantillonnage.....	29
II.2. Préparation du milieu de culture	29
II.3. Enrichissement.....	30
II.4. Ensemencement sur des boîtes de Pétri.....	31
II.5. Isolement	31
II.6. Identification des souches isolées.....	32
II.6.1. Test de coloration de Gram	32
II.6.2. Identification sur le milieu UriSelect 4.....	32
II.6.3. Identification par galeries api 10 S.....	33
II.7. Sélection des souches productrices de biosurfactants	34
II.7.1. Test de l'index d'émulsion E_{24}	35
II.7. 2. Test de la gélose au sang.....	36
II.7.3. Test des puits.....	36

II.7.4. Test de propagation de la phase hydrophobe.....	37
---	----

Résultats et discussions

I. Dénombrement de la microflore à l'issue de l'étape d'enrichissement et de sélection.....	39
II. Résultats de l'isolement des différentes souches.....	39
III. Résultats de l'identification des différentes souches isolées.....	41
III.1. Test de la coloration de Gram	41
III.2. Identification sur le milieu UriSelect 4	41
III.3. Résultats de l'identification obtenus par la galerie API 10 S	43
IV. Résultats de de la sélection des souches productrices de biosurfactants	46
IV .1. Test de l'index d'émulsion E ₂₄	46
IV. 2. Test de la gélose au sang	48
IV. 3. Test de puits	50
IV.4. Test de propagation de la phase hydrophobe	51
Conclusion.....	53

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

INTRODUCTION

La pollution des écosystèmes résulte des conséquences des diverses activités humaines (industrielles, agricoles, etc.) cumulées au cours des temps. Ces pollutions négligées jusqu'à une époque relativement récente deviennent aujourd'hui une préoccupation majeure en raison de leurs conséquences sanitaires, environnementales et socio-économiques.

Le sol est l'un des écosystèmes les plus complexes, à travers la communauté bactérienne qui l'habite.

Les conditions physicochimiques et l'altération des sols par les déversements d'hydrocarbures ne font qu'augmenter l'adaptation de certains genres bactériens, tandis que d'autres deviennent incapables de survivre. Ces bactéries à pouvoir inductible synthétisent des biomolécules appelées biosurfactants, leurs permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme sources de carbone et d'énergie. Ces biosurfactants constituent des outils très intéressants dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales, et peuvent être envisagés comme remplaçants au surfactants chimiques vu leur biodégradabilité, biocompatibilité et manque de toxicité.

Beaucoup de travaux ont porté sur l'optimisation de conditions de culture de ces bactéries *in vitro*, l'évaluation de leur capacité d'émulsification, la production des biosurfactants et leurs différentes applications.

L'objectif de notre travail est d'une part, l'isolement par la méthode d'enrichissement, des souches bactériennes productrices de biosurfactants à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures, et d'autre part de les caractériser et de les identifier par les galeries biochimiques d'identification.

Etude Bibliographique

I. Le sol : milieu complexe vivant

I.1. Le sol, milieu à trois phases

D'un point de vue pédologique, le sol est la partie superficielle de l'écorce terrestre fortement soumise à l'action des agents climatiques et biologiques. C'est un milieu triphasique : il est constitué d'une phase solide dont l'arrangement ménage de pores. Ces pores sont remplis d'une phase liquide ; la solution du sol, constituée d'eau et de substances dissoutes, et par une phase gazeuse, mélange d'azote, d'oxygène, de dioxyde de carbone et de vapeur d'eau. Les proportions de ces différentes phases varient, selon le type de sol bien entendu, et aussi au cours du temps selon les épisodes climatiques. Aux trois phases inertes s'ajoutent un compartiment vivant [1]. Ces 4 compartiments interagissent entre eux et sont le siège de nombreuses réactions bio-physicochimiques, dont quelques exemples sont cités dans la (Figure 1)[2].

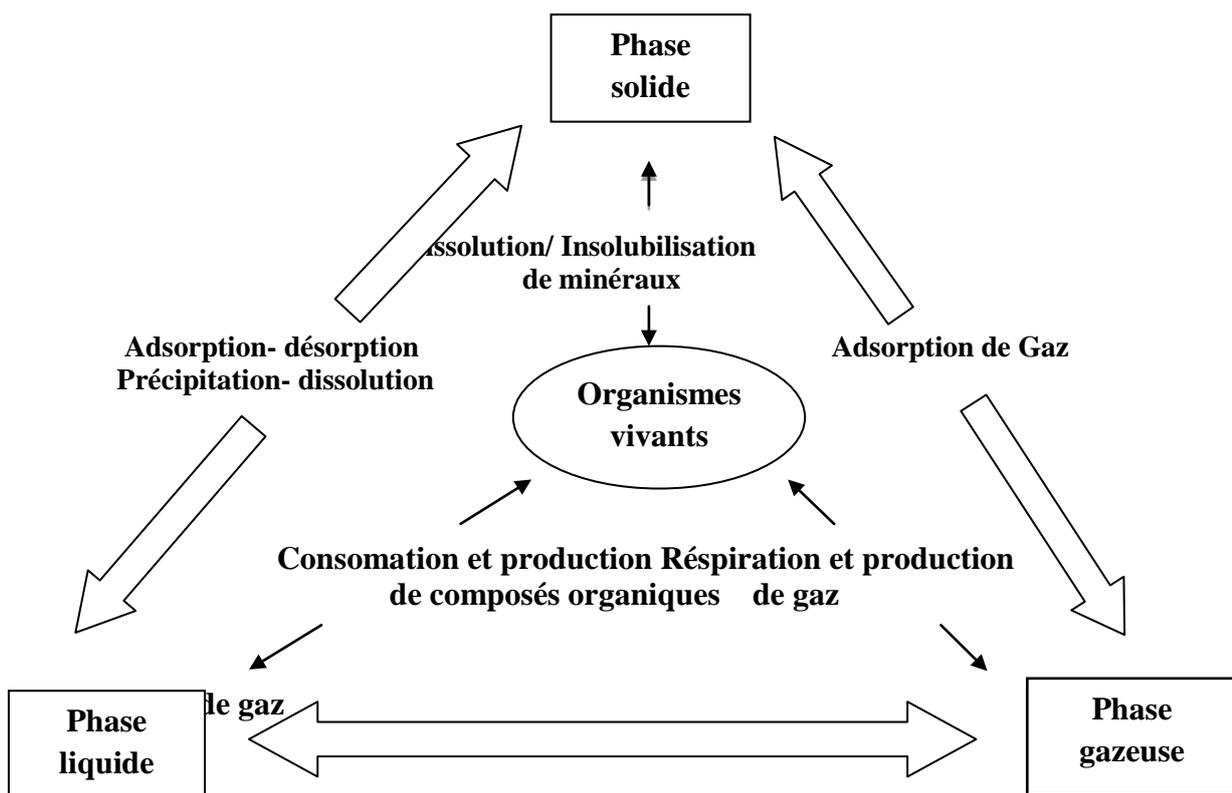


Figure 1: Constituants formant un sol et quelques exemples d'interactions entre les différents constituants [2].

• **La phase solide** représente de la moitié au deux tiers du volume du sol. Elle est constituée à plus de 90% de minéraux inorganiques primaires (quartz, feldspath, etc.) et secondaires (kaolinite, goethite, etc.) [3]. La matière organique, représentant de 0,5 à 10 % du sol, est un mélange complexe de constituants en décomposition, solubles ou insolubles, provenant principalement des plantes, animaux et microorganismes. Cette matière organique est importante biologiquement (source d'énergie pour les organismes vivants...), chimiquement (sorption, complexations, adsorption de cations...) et physiquement (stabilité du sol) [4].

• **La phase liquide** correspond à de l'eau infiltrée qui, par percolation, se charge en gaz dissous (O_2 , CO_2), en substances minérales dissoutes et en particules en suspensions (colloïdes). Elle véhicule les substances nutritives (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , NO_3^- , Cl^- ...) nécessaires aux organismes vivants [4].

• **La phase gazeuse**, ou atmosphère du sol, occupe les pores du sol non envahis par la phase liquide. L'atmosphère du sol contient généralement de 18 à 20 % d' O_2 , mais la teneur en O_2 peut chuter à 2 % voire 0 % au voisinage des racines, de résidus organiques en décomposition, au cœur d'agrégats ou de mottes saturées en eau, ou en profondeur dans le sol. La teneur en CO_2 peut varier de 0,3 à 5 % et peut atteindre et dépasser les 20 % dans certains cas (voisinage de racines ou source importante de matière organique). L'atmosphère du sol contient toujours aussi N_2 , H_2O vapeur et Ar, mais elle contient aussi très souvent d'autres gaz produits et/ou consommés biologiquement : NO, N_2O , NH_3 , H_2 ou CH_4 [4].

I.2. Les organismes vivants du sol

Les organismes vivants du sol sont en excluant les racines et la méso-faune, les bactéries (25 %), les champignons (59 %), les algues (traces), les protozoaires (4 %) et la microfaune (12 %) [5].

Les bactéries représentent les microorganismes les plus abondants dans le sol en densité et en nombre, même si les champignons représentent une quantité de biomasse plus importante. Les microorganismes du sol sont aujourd'hui reconnus comme étant un des facteurs clés dans l'évolution des sols [4].

II. Généralités sur les hydrocarbures

II. 1. Définition des hydrocarbures

Le terme Hydrocarbure possède deux significations selon le contexte. Au sens strict, il désigne un composé contenant des atomes d'hydrogène et des atomes de carbone, avec parfois quelques atomes d'oxygène ou d'azote ne formant pas de groupements fonctionnels. Au sens large, il désigne un mélange quelconque de composés chimiques du carbone et de l'hydrogène [6].

II. 2. Origine des hydrocarbures

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 [7].

II. 3. Classification des hydrocarbures

a. Hydrocarbures saturés :

Ils sont constitués d'un enchaînement d'atomes de carbone portant chacun de 0 à 3 atomes d'hydrogène (sauf pour le plus simple d'entre eux, le méthane : CH_4) chaque carbone est toujours lié à quatre autres atomes (soit carbone, soit hydrogène) ; leur formule générale est : $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ [8].

On distingue, parmi lesquels:

Les alcanes linéaires qui sont facilement dégradables[8]. Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) [7].

Les alcanes ramifiés se caractérisent par des branchements qui les rendent résistants à la dégradation. Les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés anti-iso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (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 qui 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 [7].

b. Hydrocarbures insaturés :

Dans cette catégorie on trouve [9]:

Les alcènes qui comportent dans leur molécule deux hydrogènes de moins que les hydrocarbures saturés correspondants et une double liaison. Leur formule générale est donc C_nH_{2n} .

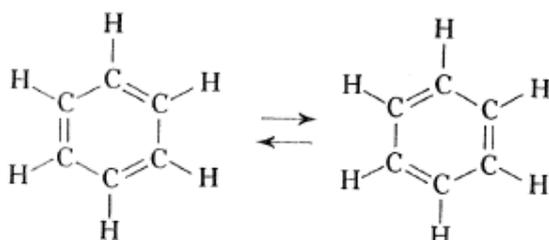
Les alcynes ou hydrocarbures acétylénique, ont pour formule générale C_nH_{2n-2} et sont caractérisés par la présence dans leur molécule d'une liaison triple.

c. Hydrocarbures aromatiques

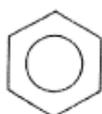
Ce sont des hydrocarbures cycliques polyinsaturés. La présence dans leur formule d'au moins un cycle à trois doubles liaisons conjuguées leur confère des propriétés remarquables. En effet, les premiers termes (benzène, toluène, xylènes) sont des matières premières fondamentales de la pétrochimie (ils contribuent également à augmenter

l'indice d'octane d'une essence) alors que les homologues supérieurs sont en général néfastes (problèmes d'environnement, de santé publique, de détérioration de l'activité de catalyseurs par leur capacité à former du coke....) [8].

Le motif élémentaire commun à tous les hydrocarbures aromatiques est le cycle benzénique (formule de Kékulé) [8].



Il est souvent représenté par :

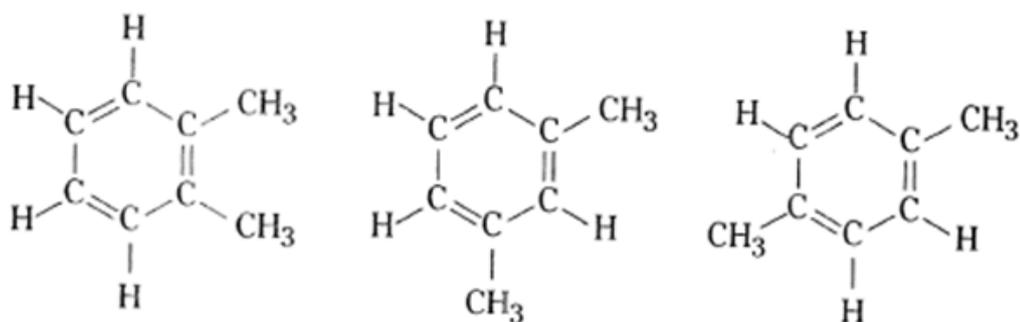


La présence d'un atome d'hydrogène à chaque sommet de l'hexagone étant omise par convention.

Leur formule générale est : C_nH_{2n-6}

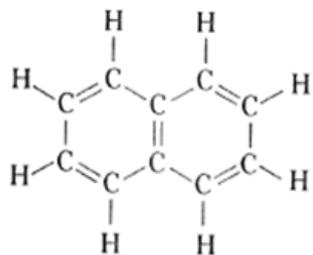
Les divers atomes d'hydrogène peuvent être substitués :

- Soit par des chaînes alkyles (que nous désignerons par R) pour donner des alkyl-aromatiques, ou l'on définit les positions des substituants par les termes ortho, meta et para. Ainsi, les C_8H_{10} ou diméthylbenzènes, ou xylènes :

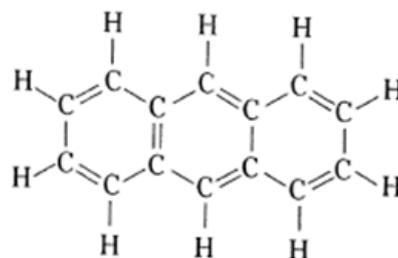


Orthoxylène Métaxylène Paraxylène

- Soit par d'autres aromatiques, par exemple :

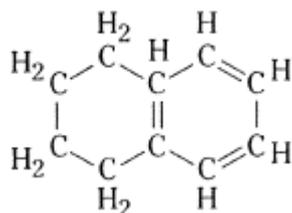


Le naphthalène



l'anthracène

- Soit par un cycle naphhténique, par exemple



La tétraline

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 [7].

d. 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,...

Dans la plupart des cas les dérivés soufrés sont plus abondants que les composés oxygénés ou azotés [7].

e. 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 [7].

II.4. Les hydrocarbures et l'environnement

II.4. 1. 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 [10].

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel (dégradation, altération) qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine [11]. Les hydrocarbures sont des contaminants environnementaux omniprésents. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérogènes, génotoxiques, immunotoxique, mutagénique ou tératogénique. Ils représentent une menace pour la santé publique [12].

II.4.2. Pollution des sols par les hydrocarbures

D'après la définition du Ministère français de l'Ecologie et du Développement durable M.E.E.D « Un site pollué est un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltration de substances polluantes, présente une contamination susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement » [13].

Les sources de pollution du sol sont diverses et leurs disséminations au niveau des sols et sous-sols présentent des structures spatiales très hétérogènes. La pollution engendrée peut être diffuse ou ponctuelle [14] :

- Les pollutions ponctuelles caractérisées par la présence locale de forte concentration de substances dangereuses non confinées dans le sol donnant naissance à des « sites localement contaminés » [NF ISO 1107-11997].

- Les pollutions diffuses issues de la dispersion puis de l'accumulation de substances dangereuses sur d'importantes surfaces de sols, qui caractérisent des « sites uniformes contaminés » [NF ISO 1107-11997].

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 [7].

II.4.3. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été diffusé dans l'environnement. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs environnementaux qui sont :

II.4.3.1. Transformations abiotiques

Les pertes abiotiques des hydrocarbures sont uniquement dues à des phénomènes d'ordre physique et chimique. Aucune action d'organismes vivants n'intervient. Elles seraient responsables de la perte de 20% des hydrocarbures aromatiques à 2 et 3 cycles dans le sol [15].

Les phénomènes de transformation abiotique des hydrocarbures peuvent se traduire principalement par :

a. Evaporation

L'évaporation est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température, etc.). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ($T^{\circ} \text{ébullition} < 270 \text{ }^{\circ}\text{C}$), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont

éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère [7].

b. Solubilisation

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore [16].

c. Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions « huile dans l'eau » facilitent l'élimination des hydrocarbures [7].

d. Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond (Figure 2).

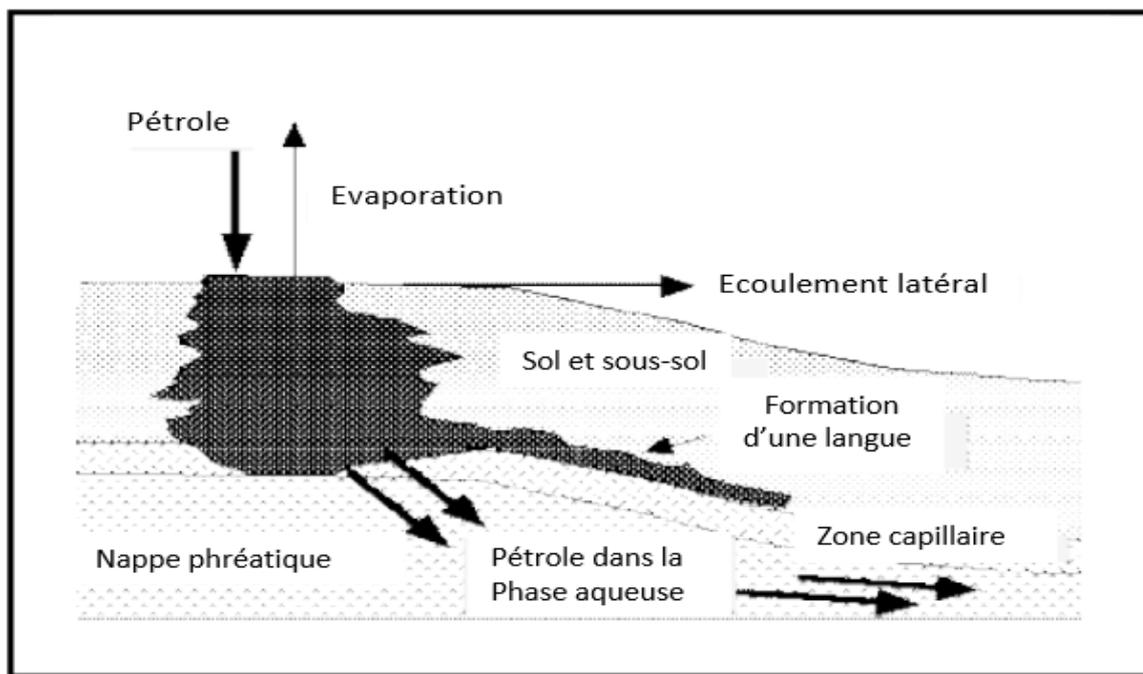


Figure 2 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol [17].

Le phénomène de sédimentation concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle [17].

e. Photo-oxydation

La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-alcanes [18].

La photolyse correspond à la transformation des hydrocarbures sous l'effet d'un rayonnement lumineux. Après absorption de l'énergie lumineuse, la molécule est déstabilisée et peut réagir (généralement avec de l'oxygène) pour former une molécule oxydée, plus polaire et généralement plus toxique [19]. Dans le cas des sols, ce phénomène n'a lieu que dans les premiers centimètres de la surface [15]. La photolyse est un processus extrêmement rapide (temps de demi-vie de l'ordre de la minute) qui peut poser des problèmes expérimentaux [20].

f. L'hydrolyse

C'est un processus de dégradation des molécules organiques sous l'action de l'eau, fortement influencé par le pH et la température du sol [4].

II.4.3.2. Transformation biotique

a. Biodégradation par les micro-organismes

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries [11].

II.5. La biodégradation des hydrocarbures

II.5.1. 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) [21].

II.5.2. Principe de la biodégradation

La biodégradation est un phénomène naturel. C'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 où l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane, on parle d'anaérobiose [22].

Dans les conditions naturelles, la biodégradation des hydrocarbures est un processus lent et complexe, son mécanisme est décrit dans la **(Figure 3)**.

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 (H_2O et CO_2) avec un renouvellement de la biomasse [21].

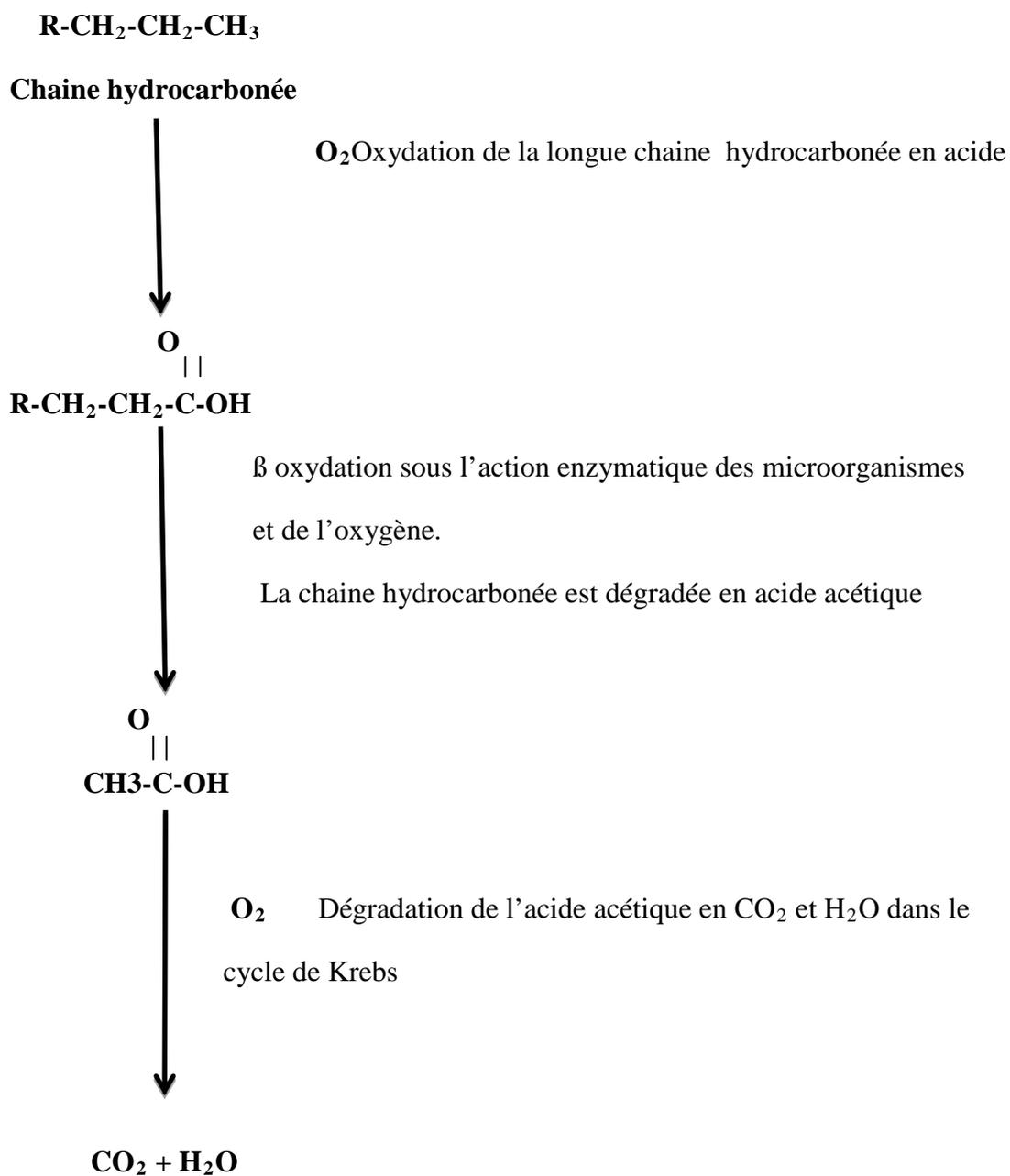


Figure 3 : Principe de la biodégradation aérobie des hydrocarbures [21].

II.5. 3. Microorganismes dégradants les hydrocarbures

Ils proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques[23].

Les bactéries 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 [24].

La dégradation des hydrocarbures dans les milieux marin et terrestre est réalisée par les bactéries des genres suivantes : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Actinomycètes*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* et *Mycobacterium* [25].

Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont les suivantes [24] :

- 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% des bactéries pigmentées (orange, jaune et rouge).
- La majorité des souches bâtonnées Gram négatives.
- 32% des bactéries motiles ou mobiles.
- 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux.

II.5.4. Modes d'accès des microorganismes aux hydrocarbures

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible ($< 0,1$ g/l), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre modes d'accès, illustrés dans la (**Figure 4**) ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes [26].

a. 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 [7].

b. Transfert interfacial direct (TID)

Les micro-organismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe [27].

L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation [4].

c. Transfert interfacial assisté par les biosurfactants (TIA),

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent au pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la

croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance [28].

d. Transfert micellaire

Le transfert micellaire se fait où l'hydrocarbure est pseudo-soluble à l'intérieur d'une micelle formée par les biosurfactants produits par les microorganismes [29].

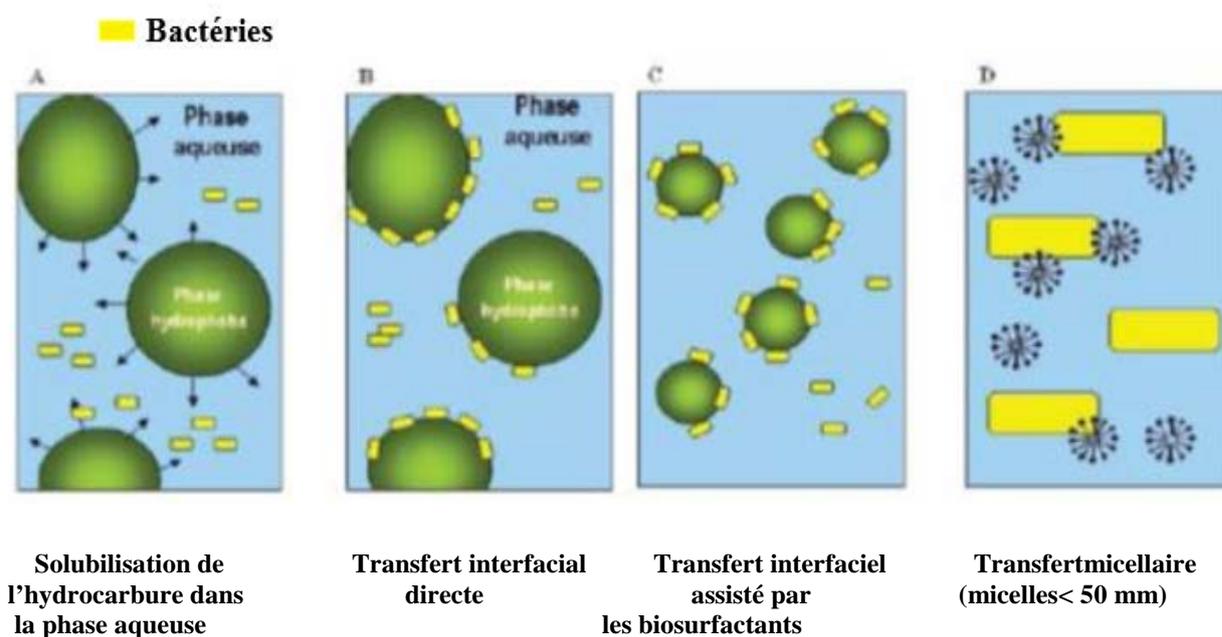


Figure 4: Les mécanismes d'accès des microorganismes aux hydrocarbures [30].

II.5.5. Métabolisme des hydrocarbures

Pour initier la biodégradation et permettre le déroulement des autres étapes, la molécule d'hydrocarbure doit être activée. La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases [31]. Typiquement, les hydrocarbures sont hydroxylés à l'alcool primaire correspondant et seront plus loin oxydés par un alcool ou aldéhyde déshydrogénase. Les acides gras qui en résultent entrent en β -oxydation

ou sont incorporés dans les lipides cellulaires. Des fois, la dégradation est complète, générant du CO₂, c'est le cas pour certaines bactéries et levures [31]. Dans la dégradation anaérobie, l'accepteur final d'électrons est autre que l'O₂, du CO₂ par exemple. Le mécanisme d'activation initiale des molécules d'hydrocarbure implique soit une carboxylation, une méthylation, une hydroxylation, une déshydrogénation soit une réaction d'addition (fumarate surtout) [32].

III. Généralités sur les bio-surfactants :

III.1. Définition:

Les surfactants (**SURFaceACTiveAgeNTS**) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) [33].

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 constitué d'acides gras saturés ou non saturés [34].

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 [35].

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification [35].

III.2. Classification

Les bio-surfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme.

On distingue cinq grandes classes de bio-surfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres) [36].

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 [37].

Les lipopeptides, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les Lipides d'ornitine sont les plus connus [36].

Les phospholipides, sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique [36].

Les lipopolysaccharides ou *polymériques*, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras [36].

Les acides gras et *lipides neutres*, sont les bio-surfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée [36].

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les Bio-surfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [34].

III.3. Microorganismes producteurs de biosurfactant

Les bio-surfactants 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**).

Tableau I : Principaux types de surfactants biologiques [38].

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	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible [39].

Les bactéries utilisées pour produire les bio-surfactants 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 [40].

III.4. Biosynthèse et rôle physiologique

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une

production efficiente [41]. Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles [42].

En effet, les bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule [43] pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader [33].

Les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas dans le sol comme polluants, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par les mêmes microorganismes prédominants [44].

Les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds [30].

III.5. Paramètres influençant la production des biosurfactants

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 [34].

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

[45]. 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 [46].

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 [47].

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 [48].

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 [46].

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 [34].

III.6. 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 [34].

III.7. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

III.7.1. 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 [49].

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 [50].

En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure 5**).

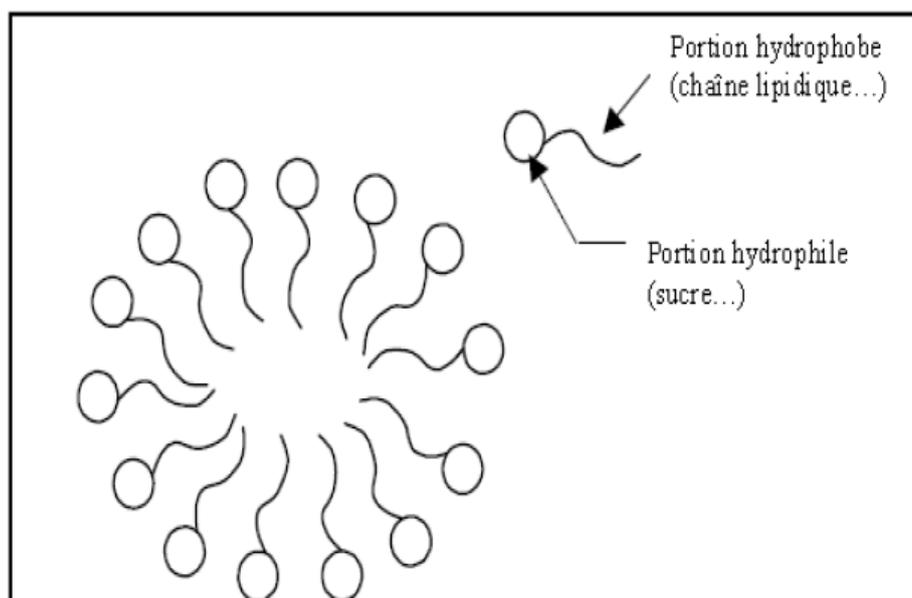


Figure 5 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant [46].

La CMC d'un biosurfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques [51].

III.7.2. 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 [52].

III.7.3. 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 6**) [53].

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 [53].

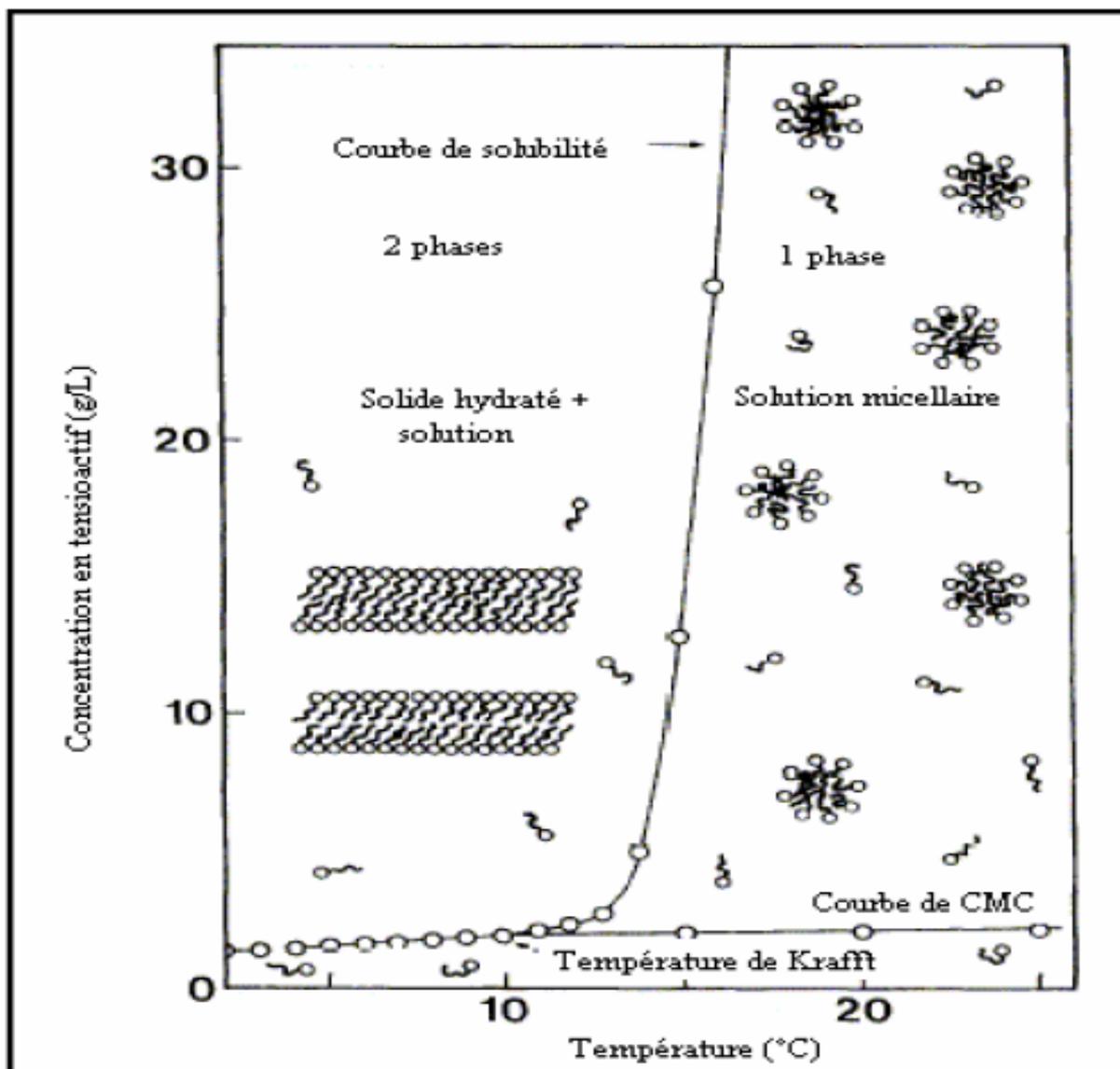


Figure 6 : Solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température [53].

Ce sont les micelles qui font croître la solubilité. Le biosurfactant se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères [46].

Les biosurfactants non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble [46].

III.8. Les différentes applications des biosurfactants :

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les biosurfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que :

a. La bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds (**Tableau 2**), [55] et dans le traitement des eaux usées [56].

Tableau 2 : Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne [54]

Composés éliminés par voie bactérienne	Références bibliographiques
Composés organiques	
Phénanthrène	H. Yin et coll., 2008
Styrène	Y. Guo et coll., 2006
Polychlorobiphényle	Occulti et coll., 2008
Pétrole Brut (Heavy. Light)	Vasefy et coll., 2008, Mehdi et coll., 2008
Gaz-oil	Li et coll., 2006
Diesel	L-M. Whang et coll., 2008
4-Chlorophenol (4-CP)	A. Uysal et coll., 2007
Perchloroéthylène (PCE)	J.S. Clifford et coll., 2007
Métaux lourds	
Cadmium	Juwarkar et coll., 2007, Asci et coll., 2007
Plomb	Juwarkar et coll., 2007, Kim et coll., 2006
Zinc	B. Dahrazma et coll., 2007, Asci et coll., 2007
Copper et Nickel	B. Dahrazma et coll., 2007, W – J. Chen et coll., 2008
Chromium hexavalent	H. Massara et coll., 2007
Arsenic	Wang and coll., 2009
Phénanthrène mélangé au cadmium	S. Song et coll., 2008

b. l'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupérationtransport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage dupétrole [57].

c. l'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) [58].

d. l'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie [59].

e. l'industrie du cosmétique et dans les procédés de teinturedu textile [60].

f. l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses [61].

g. le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrementmagnétique, la micro-électronique [62] ainsi que dans lesnanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO,etc. [54].

Matériel et méthodes

I. Matériel (voir annexe 1)

Avant toute utilisation, il convient de laver le matériel soigneusement avec un détergent et le rincer avec l'eau distillée. La stérilisation se fait par la suite à 121 °C pendant 20 min dans un autoclave.

II. Méthodes

II.1. Réalisation de l'échantillonnage

L'échantillon faisant l'objet de notre étude est de nature solide, c'est un sol contaminé par des hydrocarbures, prélevé dans une station-service sise à Boumerdès

Le prélèvement a été effectué en 5 endroits différents et à une profondeur de 10cm environ, à l'aide d'une pioche propre. Chaque échantillon est mis dans un sachet en plastique propre et acheminé au laboratoire.



Figure 7 : L'échantillon du sol prélevé

II.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé a la composition la suivante :

- Glucose.....3 g
- K_2HPO_41,6 g
- KH_2PO_40,4 g
- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$0,2 g
- NaCl.....15 g

- NH ₄ NO ₃	3 g
- CaCl ₂	0,02 g
- ZnSO ₄	0,01 g
- FeSO ₄ ; 7 H ₂ O.....	0,05 g
- MnSO ₄ ; H ₂ O.....	0,008 g
- CuSO ₄ ; 5 H ₂ O.....	0,004 g
- Co(NO ₃).....	0,0026 g
- Eau distillée.....	1L

Le pH du milieu est ensuite ajusté au environ de la valeur 7 avec une solution de NaOH. Le milieu est ensuite stérilisé à 120 °C pendant 20 min dans un autoclave.

II.3. Enrichissement

L'objectif de cette étape est de favoriser la croissance des micro-organismes recherchés tout en inhibant la croissance des autres bactéries.

L'enrichissement permet une augmentation significative et spécifique du nombre de micro-organismes recherchés.

On introduit 12,5 g du mélange des différents sols prélevés dans un erlenmeyer de 250 ml. On ajoute 5 mL d'un mélange d'Essence-gasoil pour favoriser la production du biosurfactant, puis on complète le volume jusqu'à 250 mL avec le milieu de culture et on ferme l'erlenmeyer avec du coton. On obtient ainsi une solution à 5% (p/v). Cette solution est mise sous agitation pendant 5 jours à température ambiante.

A l'issue de cette période d'incubation, la culture obtenue sert à ensemercer à 5% (v/v) un milieu de culture neuf de même composition. On répète l'opération 4 fois. On obtient à la fin une culture enrichie en micro-organismes susceptibles de produire des biosurfactants en réponse à la présence d'hydrocarbures.

II.4. Ensemencement sur des boîtes de Pétri

Avant de procéder à l'ensemencement de la culture enrichie sur milieu solide, on réalise d'abord à partir de la dernière culture obtenue des dilutions décimales successives (voir figure 8). Le diluant utilisé est le sérum physiologique. La série de dilutions s'effectue de la manière suivante :

On répartit stérilement 9ml de diluant dans une série de 5 tubes ; après avoir homogénéisé par agitation la suspension mère (elle sera la dilution 0), on transfère 1ml dans le tube n°1 prélevé à partir de la dilution 0; après avoir homogénéisé le contenu du tube n°1 on en prélève 1ml et on l'introduit dans le tube n°2, et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-5} .

On prélève 2 gouttes (l'équivalent de 0,1 ml) de la solution mère et de chaque tube de dilution à l'aide des pipettes Pasteur ; on ensemence ensuite en surface des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritif.

Après l'ensemencement, les boîtes de pétri sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 72 heures.

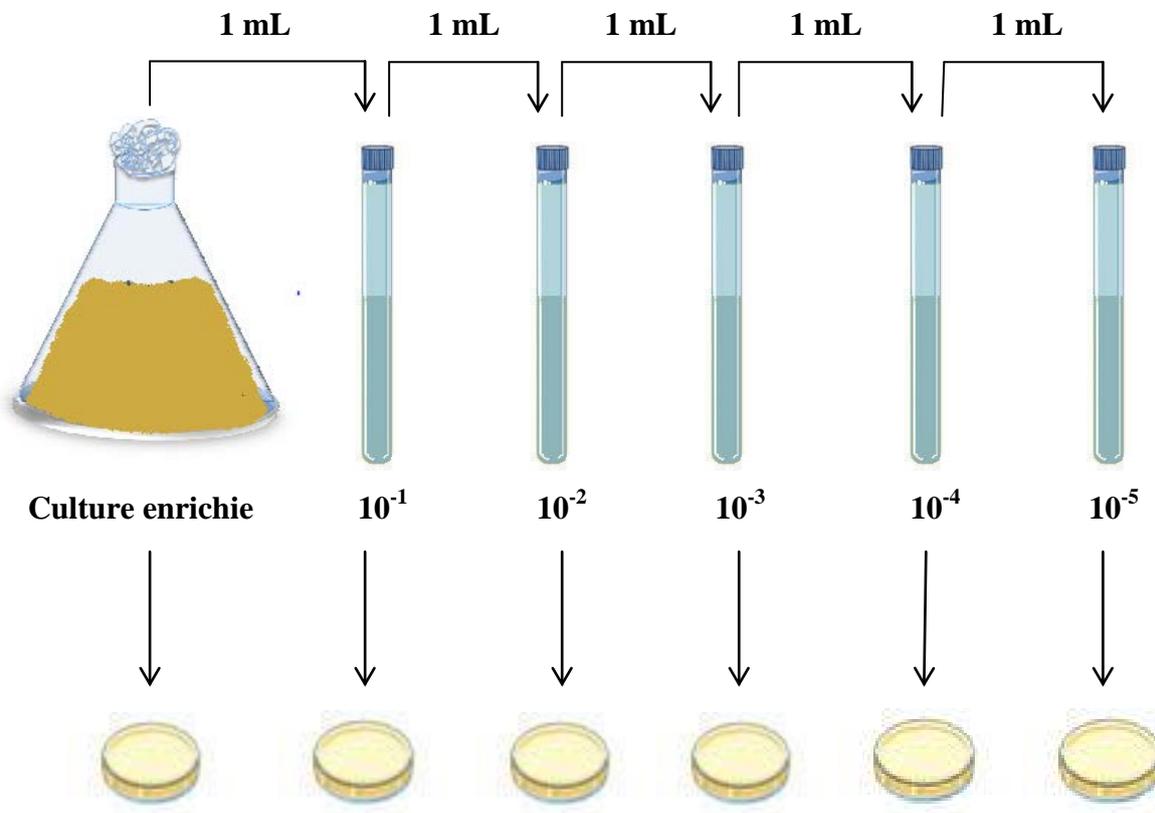


Figure 8 : Schéma montrant la série de dilutions et l'ensemencement sur des boîtes de Pétri

II.5. Isolement :

A partir de la boîte de Pétri présentant des colonies bien distinctes, on prélève chaque colonie morphologiquement différente à l'aide d'une pipette Pasteur en grattant et on

l'ensemencement sur une boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées par la suite dans une étuve à 35 °C pendant 72 heures.

Après incubation, on obtient des souches pures dans chaque boîte de pétri.

II.6. Identification des souches isolées :

II.6.1. Test de coloration de Gram :

En 1884, Christian Gram a mis au point une méthode simple de coloration qui demeure, même à notre époque l'outil le plus usité dans l'étude des bactéries. La coloration de Gram sépare la plupart des bactéries en deux groupes distincts : les Gram positif et les Gram négatif. Un étalement de bactéries sur lame de microscope est imprégné d'une teinture violette (violet de Gentiane pendant 2 minutes) puis traité au lugol (deux bains de 45 secondes) ; on rince ensuite à l'alcool (pendant 30 secondes) et on colore les bactéries avec la fuchsine (pendant 2 minutes) puis on rince avec l'eau.

Les bactéries Gram positif retiennent la teinture violette. L'alcool ôte la couleur violette des bactéries Gram négatif ; ces bactéries fixent alors la fuchsine et apparaissent en rose.

II.6.2. Identification sur le milieu UriSelect 4:

Il s'agit d'un milieu chromogène non sélectif pour l'isolement, la différenciation et la numération des germes des voies urinaires.

Composition du milieu :

UriSelect 4 est un milieu gélosé non sélectif, composé :

- D'une base nutritive riche, contenant 4 peptones, assurant la culture de tous les germes urinaires
- De 2 substrats chromogènes pour la détection des enzymes bactériennes : β galactosidase et β glucosidase.
- De tryptophane pour la mise en évidence de l'activité de la tryptophanase (production d'indole) et de la tryptophane désaminase (TDA).

Préparation du milieu

On mélange 56,8 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée, en agitant continuellement, jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (environ 10 mn). On chauffe la préparation initiale jusqu'à ébullition en agitant fréquemment, pour garantir une dissolution optimale de l'agar. On stérilise le milieu à 120°C pendant 15 minutes, puis on le répartit dans des boîtes de pétries.

Préparation des inocula :

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève une colonie bien isolée sur le milieu gélosé de chaque souche. Puis on réalise des suspensions bactériennes, dans des tubes contenant 5 mL d'eau physiologique stérile, en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

Inoculation dans les boîtes de Pétri :

Les boîtes contiennent 3 parties, on inocule dans la 1^{ère} partie, puis on ensemence une partie de l'inoculum et à l'aide d'une anse sur la 2^{ème} et la 3^{ème} partie. Les boîtes sont incubées par la suite dans une étuve à 37°C pendant 48 heures.

Identification (Annexe 2)

On établit l'identification en fonction de la couleur des colonies.

II.6.3. Identification par galeries api 10 S : (Annexe 3)

Préparation des inocula :

A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève une colonie bien isolée sur le milieu gélosé de chaque souche. Puis on réalise des suspensions bactériennes, dans des tubes contenant 5 mL d'eau physiologique stérile, en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

Inoculation des galeries :

On introduit chaque suspension bactérienne dans les tubes d'une galerie à l'aide d'une pipette Pasteur (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, on pose la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte vers l'avant) :

- Pour le test de CIT, on remplit le tube et la cupule.
- Pour les autres tests, on remplit uniquement les tubes.
- Pour les tests : LDC, ODC, H₂S, URE, on crée une anaérobiose en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.

On ferme les boîtes d'incubation, et on incube les galeries dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures.

Lecture des galeries :

Après l'incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture (**Annexe 3**).

On note tous les résultats des réactions spontanées. Puis on révèle les tests nécessitant l'addition des réactifs :

- Test de TDA : on ajoute une goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive.
- Test d'IND : on ajoute une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusent dans toute la cupule indique une réaction positive.
- Test de NO₂ : on ajoute 1 gouttes des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. On attend 2 à 5 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.
- Test d'oxydase : on ajoute une goutte de réactif de Kovacs dans le tube IND. La formation d'un anneau rouge qui détecte l'indole indique une réaction positive.

Interprétation :

La galerie API 10 S comporte 10 tests. La réaction de l'oxydase constitue le 11^{ème} test et la réduction des nitrates en nitrites le 12^{ème} test.

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant les valeurs correspondantes à des réactions positives à l'intérieur de chaque tube, un profil numérique à 4 chiffres est obtenu. On recherche par la suite le profil dans la liste des profils numériques.

II.7. Sélection des souches productrices de biosurfactants :

La mise en évidence des souches productrices de biosurfactants parmi celles obtenues à l'issue de l'étape d'enrichissement a été faite en effectuant les tests suivants :

- Test de l'index d'émulsion E_{24} .
- Test de la gélose au sang.
- Test des puits.
- Test de propagation de la phase hydrophobe

Avant de réaliser ces différents tests, on procède d'abord à une préculture suivie d'une culture des souches isolées.

a. Préculture :

La préculture de chaque souche isolée est réalisée sur bouillon nutritif. On prélève ainsi 2 colonies correspondant à chaque souche isolée à l'aide d'une pipette pasteur et on les ensemence dans un Erlenmeyer contenant 100 ml de bouillon nutritif. Les Erlenmeyers sont incubés par la suite à 30 °C pendant 72 heures sous agitation (115 tr/min).

b. Culture :

On prélève de chaque préculture un volume de 10 mL et on l'introduit dans un Erlenmeyer contenant le même milieu de culture. Les Erlenmeyers sont incubés par la suite à 30 °C pendant 7 jours sous agitation (115 tr/min).

II.7.1. Test de l'index d'émulsion E_{24}

L'index d'émulsion permet d'estimer la capacité des biosurfactants produits par les souches isolées à émulsionner une phase hydrophobe (le Kérosène) avec une phase hydrophile (la culture).

Avant de réaliser le test à proprement parler, il est nécessaire d'éliminer d'abord les cellules bactériennes. Pour cela, on doit centrifuger une certaine quantité de chaque culture à 5000 tr/min pendant 10 min.

Le test de l'index d'émulsion consiste à mélanger 2 ml de chaque culture débarrassée des cellules bactériennes en suspension avec 2 ml de kérosène dans des tubes à essai stériles.

Les tubes sont agités au vortex à 40 Hertz pendant 2min. On réalise deux essais pour chaque culture.

Après homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante.

Puis on procède au calcul de l'index d'émulsion (E_{24}) exprimé en pourcentage selon la relation suivante [63]:

$$E_{24} (\%) = (he / ht) \times 100$$

-**he** : hauteur de l'émulsion.

-**ht** : hauteur totale du mélange.

II.7. 2. Test de la gélose au sang

Ce test a été réalisé selon le protocole proposé par **Youssef et al. (2004)**. Deux gouttes (l'équivalent de 0,1 ml) de chaque culture sont prélevées à l'aide de pipettes Pasteur puis ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose au sang. Les boîtes sont ensuite incubées dans une étuve à 37° C pendant 48 h.

Si une activité hémolytique est détectée par la présence, l'observation d'une zone claire autour des colonies, est un signe d'une activité hémolytique traduisant une production de biosurfactants d'une classe particulière (les rhamnolipides).

Le diamètre de la zone claire dépend de la concentration de rhamnolipides produits.

II.7.3. Test des puits

Le test est basé sur l'utilisation d'une microplaque de 96 puits à fonds plats (CEB.sa)

Ce test a été réalisé selon le protocole rapporté par (Batista et al., 2006). Il consiste à remplir d'abord les puits utilisés avec 2 µl de l'huile de moteur (Costrol) puis on les laisse reposer 24h.

On introduit ensuite à l'aide d'une micropipette 5 μ l de chaque culture correspondant à chaque souche isolée (sans centrifugation) d'une part, et 5 μ l de chaque culture avec centrifugation à 5000 tr/min pendant 45 min, d'autre part.

On introduit aussi à la place de la culture dans un puit 5 μ l de l'eau distillé (témoin négatif), dans une autre 5 μ l de milieu de culture neuf (contrôle) et dans une autre 5 μ l d'une solution de Soduim Dodécyl Sulfate SDS à 0,2% qui est un surfactant chimique ionique et qui sert de témoin positif.

Au bout d'une minute de temps, on observe la taille de la goutte de culture, d'eau ou de SDS ajoutée à l'aide d'une loupe. Le résultat est considéré comme positif en termes de production de biosurfactant, si le diamètre de la goutte de l'essai dépasse d'un millimètre au moins celui de la goutte de l'essai avec l'eau distillée.

Le même test est également réalisé mais en remplaçant l'huile de moteur par l'huile d'olive.

II.7.4. Test de propagation de la phase hydrophobe

Cette technique a été réalisée selon la Morikova et *all.*, (2000) et Youssef et *all.*, (2004). Elle consiste à introduire 50 ml d'eau distillée dans des boîtes de Pétri, puis on ajoute 100 μ l de mélange essence-gasoil à la surface de l'eau. Ensuite, on introduit 10 μ l des filtrats des cultures sur la surface du mélange essence-gasoil, la formation d'une zone claire sur la surface de l'huile confirme la présence de biosurfactant dans ces filtrats des cultures.

Résultats et discussion

I. Dénombrement de la microflore à l'issue de l'étape d'enrichissement et de sélection

A l'issue de la procédure d'enrichissement et de sélection, nous avons procédé au dénombrement des germes selon la loi de Kass montrée dans l'équation suivante (2)

$$\boxed{N = n / (d \cdot V)} \dots\dots\dots (2)$$

- N : nombre de microorganisme en UFC/mL
- n : nombre des colonies dénombrées.
- V : volume prélevé (0,1 mL)
- D : facteur de dilution.

Nous avons effectué le dénombrement à partir de la boîte de Pétri correspondant à la dilution 10^{-4} .

Pour cela ;

- Le nombre de colonies dénombrées est : $n = 126$ colonies.
- Le volume prélevé est : $V = 0,1$ mL.
- Le facteur de dilution est : $D = 10^{-4}$.

D'où : $N = 126 / (10^{-4} \times 0.1) = 1,26 \cdot 10^7$ UFC/ mL

II. Résultats de l'isolement des différentes souches

Dans notre étude, on a procédé à l'isolement à partir du milieu d'enrichissement de souches susceptibles de produire des biosurfactants. Les souches ainsi mises en évidence sontensemencées sur Pétri contenant de la gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 35 °C pendant 72 heures.

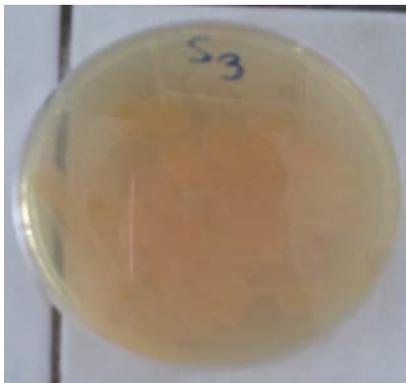
Le résultat ont permis de mettre en évidence 5 souches bactériennes pures et ce, à partir des boîtes de Pétri correspondant aux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} qui présentent des colonies bien distinctes. Les résultats de l'ensemencement individuel de ces souches sur gélose nutritive sont montrés dans la figure 9.



Souche 1



Souche 2



Souche 3



Souche 4



Souche 5

Figure 9 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes

L'observation macroscopique des colonies des souches isolées montre qu'elles ont une forme ronde, une couleur blanc jaunâtre, un contour régulier, une consistance crémeuse et un diamètre de 2 mm, une élévation convexe, avec la présence d'une odeur.

III. Résultats de l'identification des différentes souches isolées :

III.1. Test de la coloration de Gram :

Les résultats de la coloration de Gram sont rapportés dans le tableau suivant :

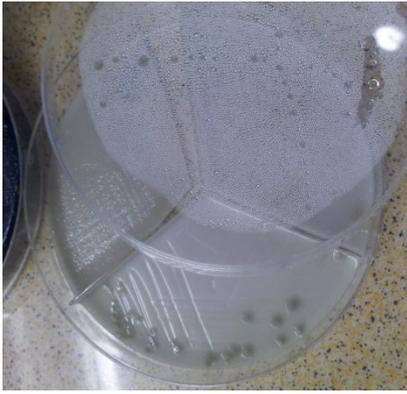
Tableau 3 : Résultats de la coloration de gram

Souche	Gram	forme
S1	-	Bacille
S2	-	Bacille
S3	-	Bacille
S4	-	Bacille
S5	-	Bacille

D'après les résultats, les bactéries des différentes souches isolées se présentent sous forme de bacilles et sont caractérisées par une paroi à Gram négatif.

III.2. Identification sur le milieu UriSelect 4 :

L'ensemencement des colonies de différentes souches dans le milieu UriSelect 4 a donné une croissance des 5 souches isolées (Figure 10).



Souche 1



Souche 2



Souche 3



Souche 4



Souche 5

Figure 10 : Aspect macroscopique des colonies formées sur le milieu UriSelect 4.

D'après l'aspect macroscopiques des colonies et leur couleur (voir annexe2), les 5 souches sont de même type et appartiennent à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

III.3. Résultats de l'identification obtenus par la galerie API 10 S :

Au début (t=0):

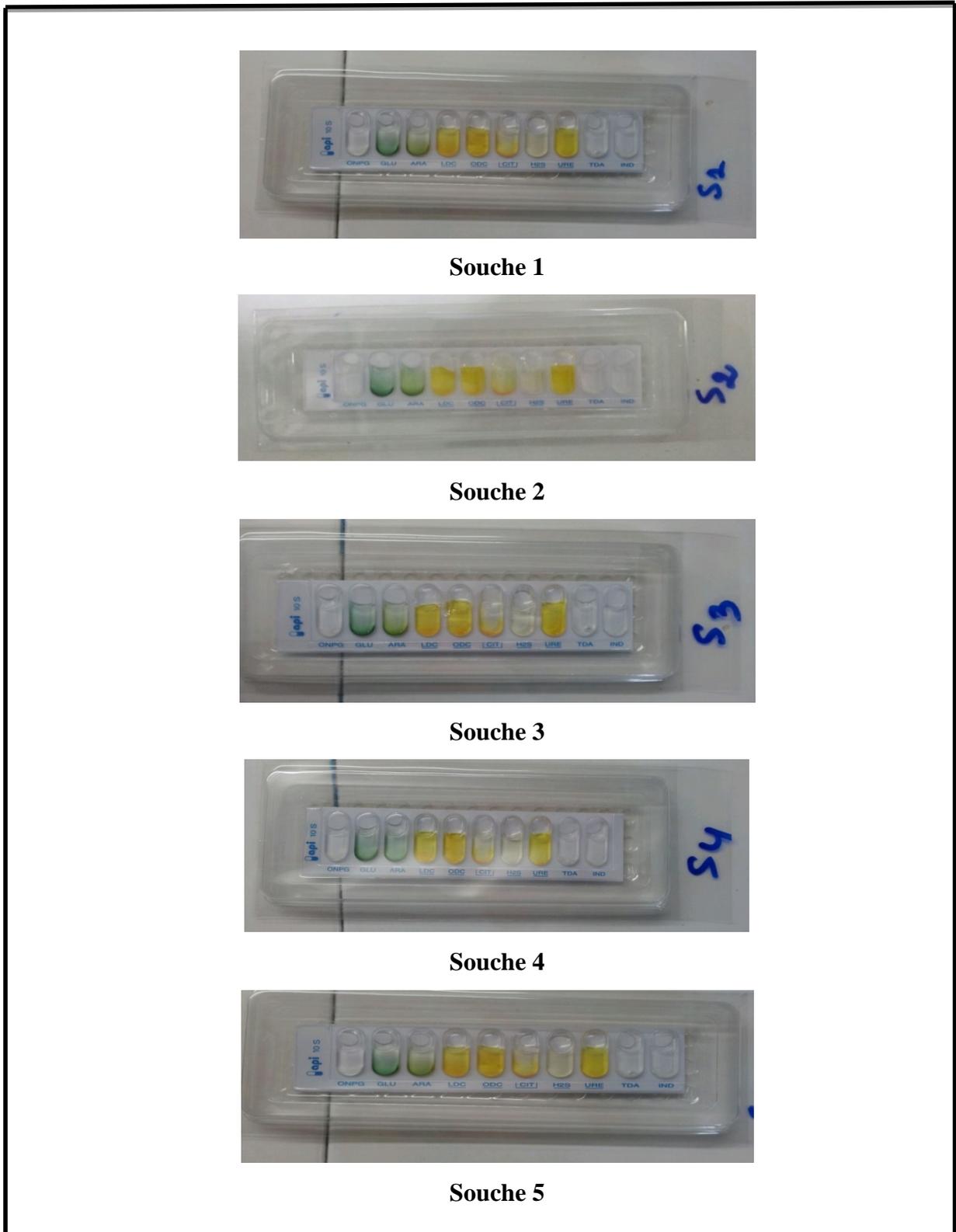


Figure 11 : Les galleries inoculées avant l'incubation.

Après 24 h :

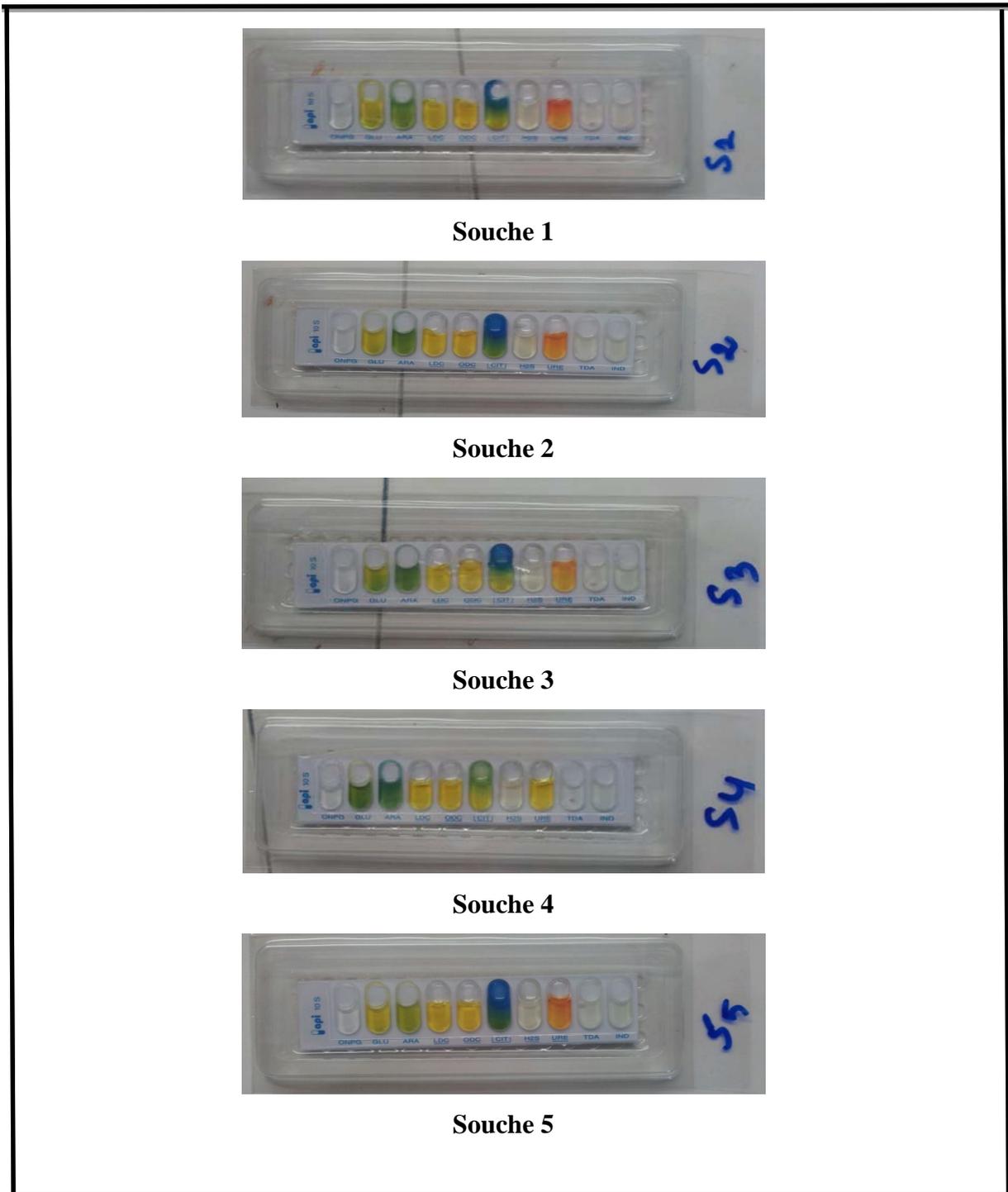


Figure 12: Les galeries inoculées après l'incubation

Après l'ajout des réactifs et en se référant au tableau de lecture, nous avons obtenu les résultats illustrés sur le tableau 4 :

Tableau 4 : résultats de l'indentification avec galeries API 10S

	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	OX	NO ₂	Profile numérique
	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
S1	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	6422
S2	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	2422
S3	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	2422
S4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	0002
S5	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	6422

On remarque que ces souches utilisent le GLU (glucose) et le CIT (citrate) comme source de carbone sauf la 4^{ème} souche qui a donné un résultat négatif. Les 5 souches sont oxydase positives. Elles ne produisent pas de gaz H₂S, sont indole négatives (incapables de convertir l'acide aminé tryptophane en indole) et ne réduisent pas les nitrates en nitres.

A partir des profils numériques obtenus et en se référant à la liste des profils numériques, les résultats obtenus sont les suivants:

S1: *Pseudomonas aeruginosa*

S2: *Pseudomonas aeruginosa*

S3: *Pseudomonas aeruginosa*

S4: *Pseudomonas spp.* ou *aeruginosa*

S5 : *Pseudomonas aeruginosa*

IV. Résultats de de la sélection des souches productrices de biosurfactants :

IV. 1. Test de l'index d'émulsion E₂₄ :

Pour estimer qualitativement et quantitativement l'émulsion donnée par les moûts de fermentation obtenus pour les 5 souches isolées, nous avons effectué le test d'émulsification E₂₄. L'observation macroscopique de l'émulsion obtenue pour chacune des souches isolées est montrée dans la figure 13. Les 5 souches montrent une production de biosurfactants, avec des différences dans les valeurs de l'index d'émulsion obtenues (figure 14).

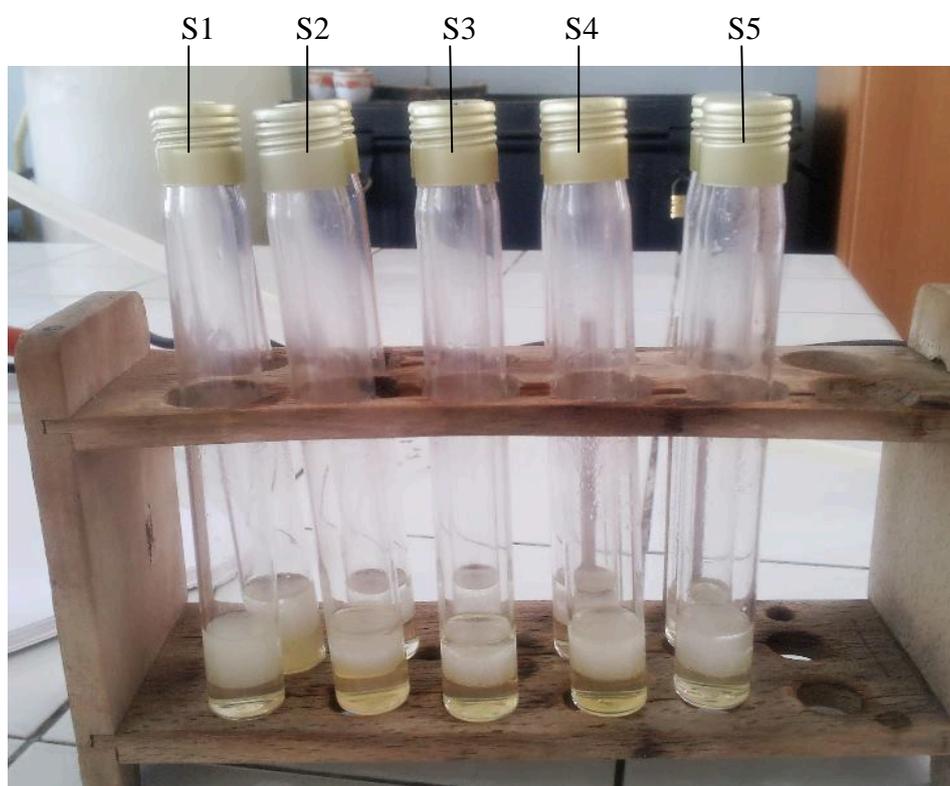


Figure 13 : Observation macroscopique de l'émulsion obtenue pour chaque souche isolée

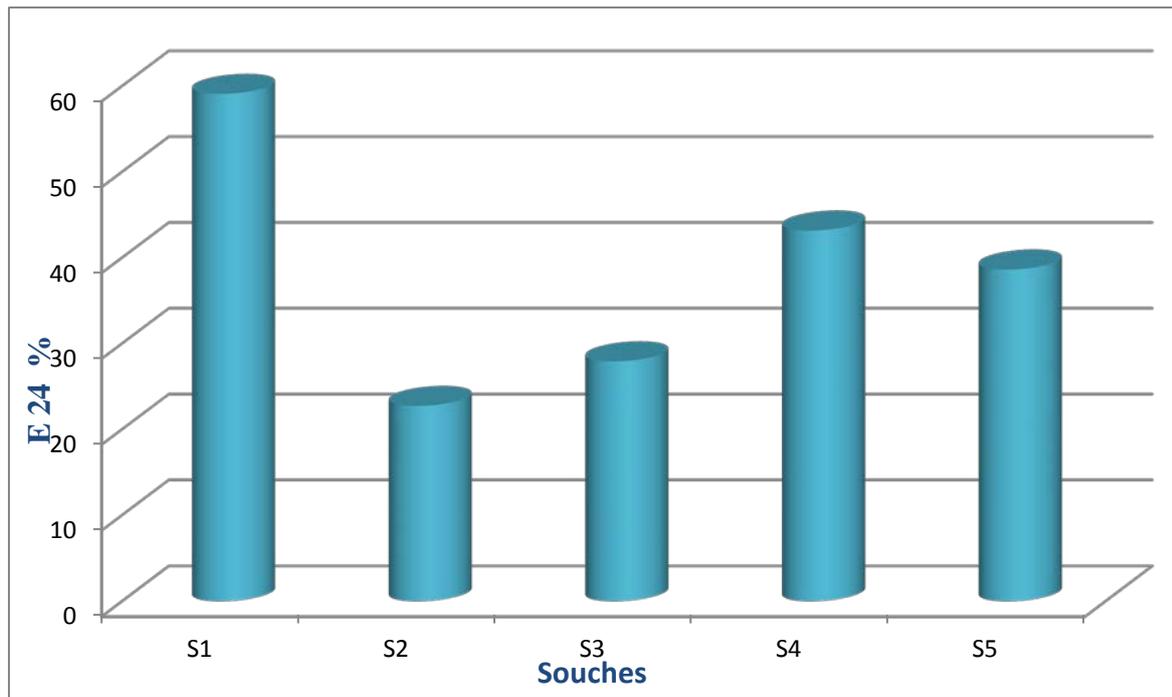


Figure 14 : Valeurs de l'index d'émulsion (E₂₄) obtenues pour chaque souche isolée.

On remarque que l'index d'émulsification varie d'une souche à une autre. Sachant qu'il y a une relation de proportionnalité entre la valeur de l'index d'émulsion et la concentration des biosurfactants produits, on conclut donc que la souche1 (*Pseudomonas aeruginosa*) semble la plus performante en termes de production de biosurfactants avec un index d'émulsion avoisinant les 60%.

L'index d'émulsion obtenu dans notre étude est appréciable par rapport à ceux rapportés dans d'autres études pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* : 50 % [67] et 58 % [68]. Par ailleurs, un meilleur résultat en termes d'index d'émulsification a été obtenu pour l'espèce *Bacillus subtilis* (67%) [69].

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, les huiles minérales et le diesel [70, 67, 71].

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 [72]. D'après les résultats obtenus dans le cadre de cette étude, il semble que les émulsions formées par les biosurfactants produits par les souches isolées sont plutôt stables et peuvent donc être classés dans la deuxième catégorie.

Il faut signaler que le test d'émulsification effectué dans nos expériences montre la possibilité de synthèse de biosurfactants par les différentes souches isolées dans un milieu contenant une source de carbone soluble (glucose). Ainsi, les hydrocarbures ou, d'une façon générale, les substrats insolubles dans l'eau ne sont plus indispensables et qu'il n'y a pas forcément de relation entre la production de biosurfactant et la biodégradabilité de l'hydrocarbure (mélange essence/gasoil dans notre cas).

III.1. Test de la gélose au sang :

L'ensemencement des colonies des différentes souches sur les boîtes de pétri contenant la gélose au sang n'a pas révélé de zone claire autour des colonies (figure 15). Le test est donc négatif. Ceci indique que les biosurfactants produits par les souches isolées (*Pseudomonas aeruginosa*) ne sont pas de nature rhamnolipidiques.

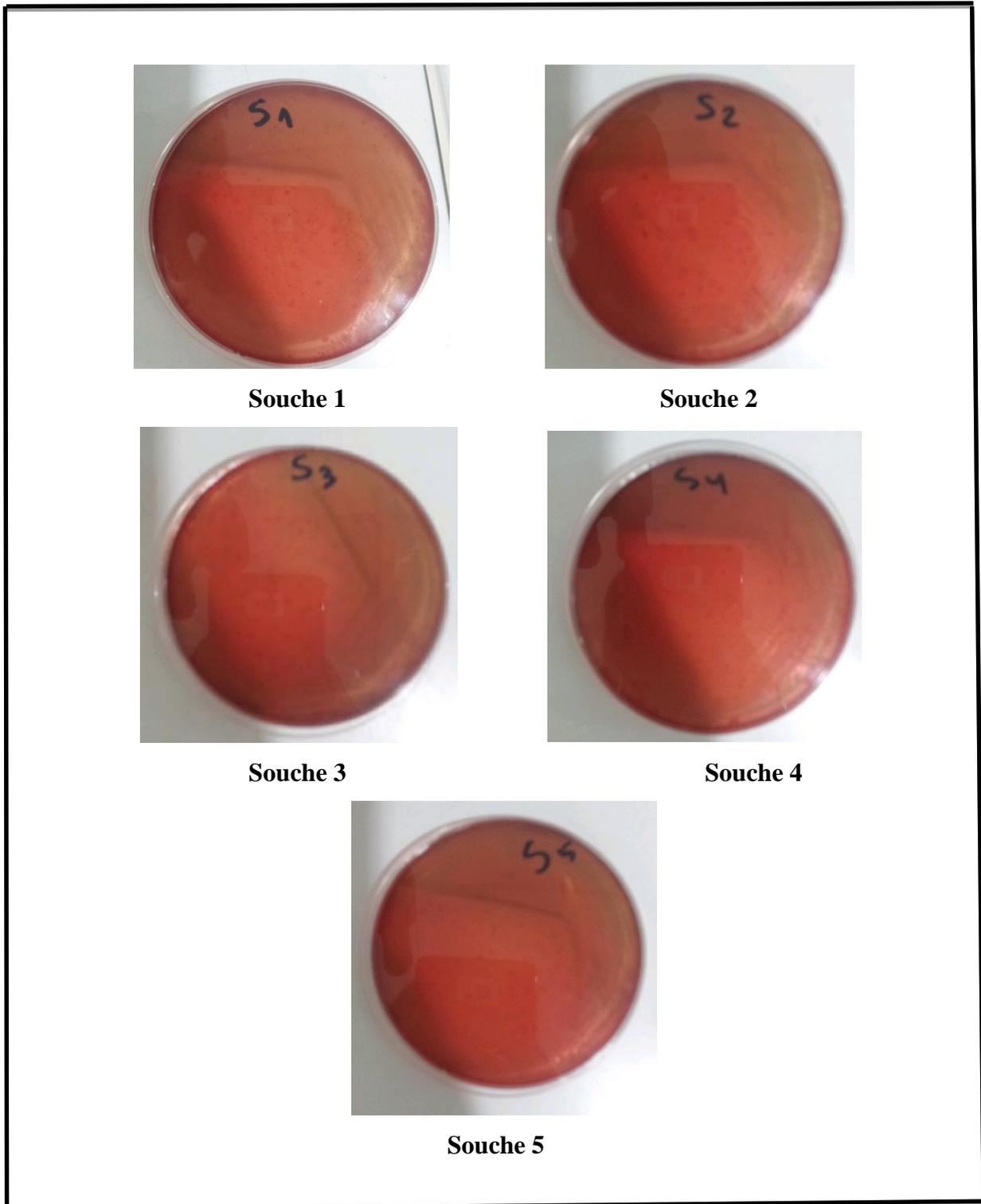


Figure 15 : Résultat du test de la gélose au sang

III.3. Test de puits :

Les résultats de ce test sont rapportés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : Résultats du test des puits.

	Avec l'huile de moteur		Avec l'huile d'olive	
	Avec centrifugation	Sans centrifugation	Avec centrifugation	Sans centrifugation
Souche 1	+	-	-	-
Souche 2	+	-	-	-
Souche 3	+	-	-	-
Souche 4	+	-	-	-
Souche 5	+	-	-	-
SDS	+		-	
Eau distillé	-		-	
Milieu nutritif sans culture	-		-	

Selon Adria et *all.*,(1998), une goutte d'eau appliquée sur une surface hydrophobe, en l'absence de tensio-actifs conduit à la formation d'un bourrelet car les molécules d'eau polaires sont repoussées à partir de la surface hydrophobe. En revanche, si la goutte d'eau contient un tensioactif, la tension interraciale entre la goutte d'eau et la surface hydrophobe est réduite, ce qui conduit à l'étalement de la goutte d'eau sur la surface hydrophobe.

Dans notre cas, on remarque que le test est négatif pour les essais dans lesquels on a introduit sur la surface hydrophobe (l'huile de moteur) l'eau (témoin négatif), le milieu de culture neuf (contrôle) et les cultures sans élimination des cellules bactériennes

Il en est autrement des essais impliquant le SDS (témoin positif) ainsi que les cultures débarrassées des cellules bactériennes, la tension interfaciale entre les gouttes des échantillons et la surface hydrophobe est réduite, ce qui a induit l'étalement des gouttes sur la surface hydrophobe. Cela confirme la production du biosurfactant par les souches bactériennes testées.

Par ailleurs, l'ensemble des essais effectués avec une huile organique (huile d'olive) se sont avérés négatifs. Ceci indique que ni le SDS ni les biosurfactants produits par les souches ne sont en mesure de solubiliser l'huile organique testée. Ce résultat pourrait également être dû à la concentration même de ces composés qui serait trop faible pour permettre la solubilisation de l'huile testée.

III.4. Test de propagation de la phase hydrophobe

Les résultats du test de propagation de la phase hydrophobe sont consignés dans le tableau suivant (**tableau 6**) :

Tableau 6: Résultat du test de propagation de la phase hydrophobe

Souche	Formation d'une zone claire
S1	+
S2	+
S3	+
S4	+
S5	+

Lorsqu'on a introduit 10 µl des filtrats de culture sur la surface du mélange essence-gasoil, on a obtenu une zone claire pour les 5 souches testées, ceci confirme la présence de biosurfactants dans les moûts de fermentation testés.

Morikawa *et al.* (2000) ont montré que la zone de déplacement par une solution contenant un agent tensio-actif est directement proportionnelle à la concentration des biosurfactants testés. (Youssef *et al.*, 2003) ont montré que la technique d'étalement de l'huile peut être utilisée pour détecter la production de biosurfactants par divers micro-organismes. Le diamètre de la zone claire augmente linéairement avec la concentration de la surfactine dans la gamme de concentrations testées.

On peut conclure que dans notre cas on a différents souches d'une même espèce à savoir *Pseudomonas aeruginosa*. La différence entre les souches isolées en termes de caractéristiques biochimiques et de capacité à produire les biosurfactants peut être due à des différences à l'échelle du génome qui seraient le résultat de mutations spontanées ou induites.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif de notre étude est l'isolement de souches microbiennes productrices de biosurfactants à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures.

L'isolement a permis de mettre en évidence cinq souches bactériennes pures. Les 5 souches isolées ont été apparentées au type *Pseudomonas aeruginosa* par des tests d'identification biochimiques (API 10S et UriSelect).

Pour mettre en évidence la capacité des souches isolées à produire des biosurfactants, différents tests ont été effectués (test de l'index d'émulsion E₂₄, test de la gélose au sang, test des puits et test de propagation de la phase hydrophobe).

Les tests de l'index d'émulsion, des puits et de propagation de la phase hydrophobe ont donné des résultats positifs en termes de production de biosurfactant. En revanche le test de la gélose au sang a donné un résultat négatif indiquant que les biosurfactants produits par les souches isolées ne sont pas de nature rhamnolipidique.

Parmi les cinq souches isolées, la souche 1 semble la plus performante en termes de production de biosurfactants avec un index d'émulsion avoisinant les 60%.

Il convient, en perspective, d'améliorer encore plus la production des biosurfactants par les souches isolées, en optimisant les paramètres nutritionnels et physico-chimiques de culture. Il peut être également envisagé l'identification plus poussée de ces souches par séquençage du gène de l'ARN_r 16s.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Stengel, P., Gelin, S., (1998).** Sol: Interface fragile. INRA, Paris, p.213.
2. **Calvet, R., (2003a).** Le Sol. Propriétés et fonctions - Tome 1. France Agricole, Paris, p.455
3. **Sposito, G., (1989).** The chemistry of soils. Oxford University Press, New York, 277
4. **Olivia Darcheville., (2008).** Rôle des composantes géochimiques et microbiologiques d'un sol sur le comportement du sélénium en conditions oxiques et anoxiques. Thèse de doctorat de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, spécialité Sciences Agronomiques, p. 251.
5. **Gobat, J.M., Aragno, M., Matthey, W., (1998).** Le sol vivant. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 519.
6. **Robert Larousse, Edition 1980,**
7. **Soltani., (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.
8. **Jean-Pierre Wauquier,** Le raffinage du pétrole Tome 1 , Technip, p .5-10.
9. **Lefebvre G.,** Chimie des hydrocarbures, Technip, 1965.
10. **Bertrand J.C., Mille G. (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Bianchi M. (ed). Paris : Masson, p.343-385.
11. **Vogel T., 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.
12. **Erikson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W. (2003).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. Appl. Environ. Microbiol. 69(1) : 275-284
13. **Boy de La Tour X., (2004),** Le pétrole : au-delà du mythe. Editions TECHNIP, p. 296
14. **Colin F., 2000,** Pollution localisée des sols et sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, rapport de l'Académie des sciences N°44, p.417.
15. **Park J.H., Zhao X., Voice T.C. (2001).** Biodegradation of non-desorbable naphthalene in soils. Environmental Science and technology, 35, p. 2734-2740.
16. **Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J. P. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations : inhibition phenomena and cometabolism Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : 156-164.

17. **Morgan P., Waykinson R.J (1989).** Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment *CRC Crit. Rev. Biotechnol* 8 : 305-333.
18. **Wilcke W. (2000).** Polycyclic Aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil –a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163 : p.229-248.
19. **Lampi M.A. (2005).** Environmental photoinduced toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons : Occurrence and toxicity of photomodified PAHs and predictive modeling of photoinduced toxicity. PhD thesis, Waterloo, Ontario, Canada, 146 p.
20. **Lehto K.M. Vuorimaa E., Lemmetyinen H., (2000).** Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in dilute aqueous solutions detected by fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A : Chemistry*, 136 : p. 53-60.
21. **Lecompte P., (1995).** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.
22. **Jose F., (1999).** Essai de biodégradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3^{ème} édition. Dunod. Paris. P.102-116.
23. **Gatellier C., (1970).** La microbiologie du pétrole. *Revue de l'institut français de pétrole* .25 :04.
24. **Pelmont J. (1995).** Bactéries et environnement-adaptation biologique, Tome 1. OPU. P. 875
25. **Champagnat N., ADRIAN A., (1974).** Pétrole et protéines. Doin. Paris
26. **Bouchez-Naitali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y., Vandecasteele J. P. (1991).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* 86 : 421-428.
27. **Rosenberg E. (1986).** Microbial surfactants. *Crit Rev Biotechnol* 3 : 109-132.
28. **Singer M.E., Finnerty W. R. (1984).** Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. New York : Macmillan Publisher.
29. **Scriban R. (1999).** Biotechnologie. 5^{ème} édition. Tec.et doc. Lavoisier, Paris, France.
30. **Vandecasteele J.P. (2005b).** Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. In *Microbiologie pétrolière*. Technip (ed). Paris : IFP publications, pp. 41-73.
31. **Ollivier B., Magot M., (2005).** Petroleum Microbiology, Édition illustrée , Éditeur ASM Press, 365 p.
32. **Singh A., Ward O. P., 2004.** Biodegradation And Bioremediation, Vol. 2 de Soil biology, Édition illustrée, Éditeur Springer, 309 p.
33. **Al-Araji1L., Abd Rahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B., (2007).** Minireview : Microbial Surfactant. (*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, Vol. 15 No.3, p. 99-105.

34. **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.
35. **West C.C. et Harwell J.H., (1992),** Surfactants and subsurface remediation, *Environ.Sci. Technol.*, 36 (12) : 2324-2330.
36. **Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R., (1996),** Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
37. **Ron E.Z. et Rosenberg E., (2002),** Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3 : 249-252.
38. **Banat M., Makkar R. S. et Cameotra S. S., (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.
39. **Mata-Sandoval J. C., Karns 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.
40. **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.
41. **Pruthi V., Cameotra S. S., (1995).** Rapid Method For Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained By Acetone Precipitation, *Biotechnol. Techniq.*, 9 :271–276.
42. **Krepesky, N., Da Silva, F.S., Fontana, LF.,Crapez, M.A.C, (2007).** Alternative Methodology For Isolation Of Biosurfactant-Producing Bacteria, *Braz. J. Biol.*, **Vol. 67**, No.1, p. 117-124.
43. **Prabhu Y., Phale P., 2003.** SB PP2 Novel Metabolic Pathway, Role Of Biosurfactant And Cell Surface Hydrophobicity In Hydrocarbon Assimilation. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* **Vol. 61**, p. 342–351.
44. **Dashti N., Al-Awadhi H., Khanafer M., Abdelghany S., Radwan S., 2008.** Potential Of Hexadecane-Utilizing Soil-Microorganisms For Growth On Hexadecanol, Hexadecanal And Hexadecanoic Acid As Sole Sources Of Carbon And Energy,*Chemosphere*, **Vol.70**, p.475–479 .
45. **Lang S. et Wullbrandt D., (1999).** Rhamnolipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.
46. **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.

47. **Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P., (1996).** Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 162-168.
48. **Guerra-Santos L. H., Kappeli O. et Fichter A., (1986).** Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24 : 443-448.
49. **Pore J., (1992).** Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.
50. **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.
51. **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.
52. **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.
53. **Shinoda K. et Fontell K., (1995).** Ionic surfactants capable of being used in hard water. *Advances in Colloid and Interface Science*, 54 : 55-75.
54. **Mulligan C. N., (2009).** Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **Vol. 14**, No. 5, p. 372-378.
55. **Raza Z. A., Khan M. S., Khalid Z. M., (2007).** Evaluation Of Distant Carbon Sources In Biosurfactant Production By A Gamma Ray-Induced *Pseudomonas putida* Mutant, *Process Biochemistry*, **Vol. 42**, p.686-692.
56. **Samadi N., Abadian N., Akhavan A., Fazeli M. R., Tahzibi A., Jamalifar H., (2007).** Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil, *J. Biol. Sci.* **Vol. 7**, No. 7, p. 1266-1269.
57. **Banat I. M., (1995).** Biosurfactants Production And Possible Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oil Pollution Remediation: A Review. *Bioresource Technol.* **Vol. 51**, p. 1-12.
58. **Hultberg M., Bergstrand K. J., Khalil S., Alsanusi B., (2008).** Characterisation Of Biosurfactant-Producing Strains Of Fluorescent *Pseudomonads* In A Soilless Cultivation System, *J. Antonie Van Leeuwenhoek*, **Vol. 94**, p. 329-334.

59. **Prommachan O., (2002).** Production And Application Of Biosurfactant From Bacillus MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailland, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants.
60. **Savarino P., Montoneri E., Bottigliengo S., Boffa V., Guizzetti T., Perrone D., Mendichi R., (2009).** Biosurfactants From Urban Wastes As Auxiliaries For Textile Dyeing, Ind. & engin. Chem. Research **Vol. 48**, No.8, p. 3738-3748.
61. **Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R ., (2006).** Biosurfactants: Potential Applications In Medicine, J. Antimicrobial Chemotherapy, **Vol. 57**,n o4, p. 609-618
62. **Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M.J., (2009).** The Physicochemical Properties and Chemical Composition of Trehalose Lipids Produced by Rhodococcus erythropolis 51T7, Chem. Phys. Lip. **Vol.158**, p.110–117.
63. **Cooper DG, Goldenberg BG. (1987),** Surface active agents from two Bacillus species. Appl Environ Microbiol 1987, **Vol 53**, p 224-229.
64. **Youssef, H. N., Duncan, K .E., Nagle, D.P., Savage, K. N., Knapp, R.M., McInerney, M.J.,(2004),** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms, J. Microbiological Methods, **Vol .56**, p 339-347.
65. **Batista, S.P., Mounter, A.H., Amorim, F. R., Totola, M.R., (2006),** Isolation and characterization of biosurfactant/ bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites, J. Bioresource Technology, **Vol 97**, p.886-875.
66. **Morikova, M., Hirata, Y., Imanaka, T., (2000).** A study on the structure–function relationship of the lipopeptide biosurfactants. Biochim. Biophys., p 211–218.
67. **Benicasa M., Abalos A., Oliviera 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, **Vol 85**, p. 1–8.
68. **Lovagilo R.B., Dos-Santos F.J., Junior. J., Contiero J. (2011).**Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **Vol 85**, p. 301–305.
69. **Freitas de Oliveira, D.W., Franc, L. I .W., Felix, A. K. N., Martins, J. J. L., Giro, M. E. A., Melo, V. M., Gonçalves, R.B.,(2013),** Kinetic study of biosurfactant

- production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101 :34-43.
70. **Patel R. M. et Desai A. J., (1997).** Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, **Vol 37**, p. 281-286.
71. **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*, **Vol 27** ,p 146–154.
72. **Siliva 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*, **Vol 79**, p 174–183.
73. **Adria A. Bodour, Raina M. Miller-Maier., (1998).** Application of a modified drop collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J of Microbiological Methods*, **Vol 32**, p 273–280

ANNEXES

Annexes 1 : Matériels utilisés

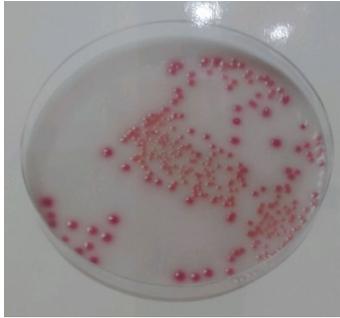
- **Verrerie et matériels en plastique :**

- Erlenmeyers, fioles et béchers de 100 ml, 250 ml, 500ml, 1000 mL.
- Pipettes graduées, micropipette et seringues.
- Tubes à essai
- Boîtes de pétrie en plastique
- Pipettes Pasteur
- Anse de platine
- Lames et lamelles

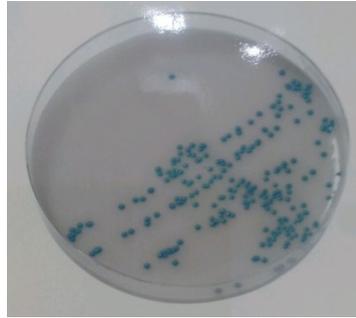
- **Equipement :**

- Autoclave
- Hôte
- Etuve
- pH mètre
- Agitateur
- Incubateur agitateur
- Balance électronique
- Bain marrie
- Bec bunsen
- Réfrigérateur
- Microscope photonique
- Vortex

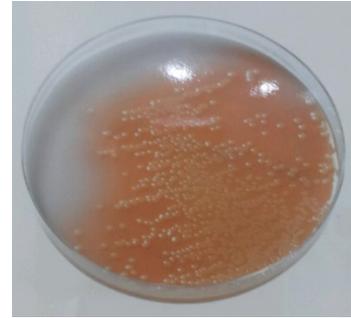
Annexe 2 : Aspect macroscopique et couleur des différentes colonies sur milieu UriSelect



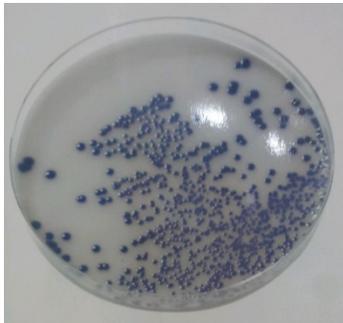
Escherichia coli



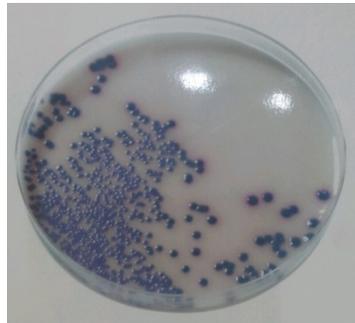
Enterococcus faecalis



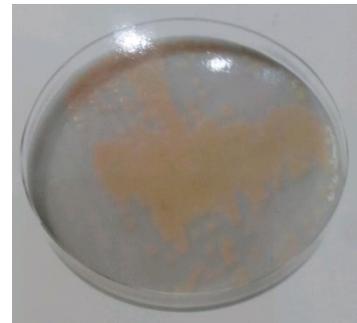
Proteus mirabilli



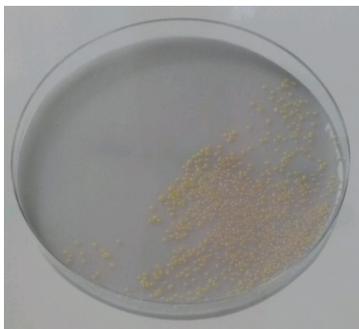
Klebsiella pneumoniae



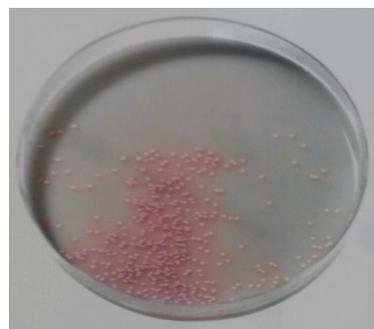
Enterobacter cloacae



Pseudomonas aeruginosa



Staphylococcus aureus



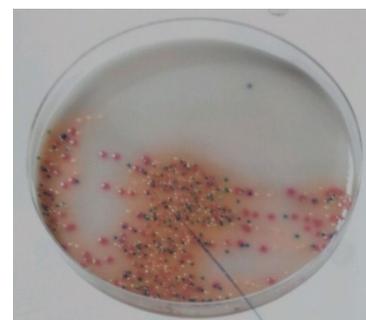
Staphylococcus saprophyticus



Streptococcus agalactiae



E. coli + P. mirabilis



E. faecalis + E. coli + P. mirabilis



Candida albicans

Annexe 3 : Galerie API 10 S

- **Présentation de la galerie :**

API 10 S est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à gram négatif non fastidieux, comportant 11 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

- **Principe :**

La galerie API 10 S comporte 10 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue en consultant la liste des profils ou à l'aide d'un logiciel d'identification.

- **Tableau de lecture :**

Test	Composant actifs	Réactions/ Enzymes	Ajout de réactif	Résultats	
				Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase	Non	incolore	jaune
GLU	D-glucose	Fermentation/ oxydation (Glucose)	Non	bleu/ bleu vert	jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation/ oxydation (Arabinose)	Non	bleu/ bleu vert	jaune
LDC	L-lysine	Lysine décarboxylase	Non	jaune	rouge/ orange
ODC	L-ornithine	Ornithine décarboxylase	Non	jaune	rouge/ orange
CIT	Trisodium citrate	Utilisation du Citrate	Non	vert pâle/ jaune	bleu-vert/ bleu
H₂S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Non	incolore/ grisâtre	dépôt noir

<u>URE</u>	Urée	Uréase	Non	jaune	orange/ rouge violacé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA	jaune	marron brun foncé
IND	L-tryptophane	Production d'indole	JAMES	incolore/ vert-pale jaune/	rose
OX		Cytochrome-oxydase	Kovacs	incolore/ vert-pale jaune/	anneau rouge
NO₂	(tube GLU)	Production de NO ₂	NIT1 + NIT 2	jaune	rouge