

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ DE BOUIRA
Faculté des Science de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre



Département des Science Biologiques.

Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2021

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domine : SNV **Filière : Sciences Biologiques.**

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Présenté par :
BELKEBIR Yacine et SEGHIR Nabila.

Thème

**Production des biosurfactants à partir des résidus
Agro-alimentaires par une bactérie hydrocarbonoclastes.**

Soutenu le : 15 /07 / 2021

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mme. IDER D</i>	<i>MAB.</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Présidente.</i>
<i>Mme YALAOUI-GUELLAL D.</i>	<i>MCB.</i>	<i>Univ. De Bouira</i>	<i>Examinatrice.</i>
<i>Mme MOURI-HADIDI L.</i>	<i>MCB.</i>	<i>Univ.de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme BENCHOUK A.</i>	<i>Docteur</i>	<i>DC RD-SONATRACH.</i>	<i>Co-promotrice.</i>

Année Universitaire : 2020/2021.

Remerciements.

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de laboratoire de centre de recherche et développement
DCRD - SONATRACH Boumerdès

الحمد لله رب العالمين

Le remerciement infini avant tous est à notre Dieu le plus puissant qui nous avoir aidés à réaliser ce modeste travail.

Nous tenons particulièrement à exprimer fortement nos gratitude et nos sincères sentiments respectueux à notre encadreur Mme **BEN CHOUK AMINA, chercheur au DCRD-SONATRACH** qui a eu la bienveillance de nous 'accueillir au sein du leur équipe au laboratoires DCRD, de nous a proposer le thème, et pour son aide précieuse, ses encouragements, ses conseils, ses discussions constructives, et commentaires, sa disponibilité pour nous avoir dirigé sa patience et son soutien favorable pour l'aboutissement de ce travail.

Nous adressons nos remerciements à notre promotrice Mme **MOURI-HADIDI Lila, Maître de conférences B à l'université de Bouira** qui a accepté de superviser ce travail et sa confiance tout au long de ce travail pour puisse avoir ce jour.

Nos sincères considérations et nos vifs remerciements vont également aux membres du jury : **Mme IDER D.** Maitre-Assistant A à l'université de Bouira, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, **Mme GUELLAL Drifa** Maître Assistant B à l'université de Bouira, pour avoir accepté d'examiner de ce mémoire.

Nous remercions le chef de département de biologie, tous les enseignants de notre spécialité Microbiologie Appliquée qui nous ont enseigné durant le cursus universitaire, et tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre de l'université de Bouira qui ont contribué à notre formation. Ainsi que tous le personnel de DCRD.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci à tous

« Il n'y a pas de réussite facile ni d'échecs définitifs »

Marcel Proust

Dédicace.



Dédicace

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon **DIEU** de m'avoir aidée à réaliser ce mémoire*

Je dédie ce mémoire :

***A ma très chère mère**, est très difficile de choisir les termes adéquats pour t'exprimer mon amour et ton respect. Que dieu te garde en bonne santé, j'espère que je serai toujours à la hauteur de tes aspirations*

***A mon très cher père**, je n'oublie jamais ses sacrifices. Ce travail n'est que le fruit de son soutien, de son encouragement, de ses prières, de son amour profond.*

***A mes très chères sœurs** : Saida, Hadjer et Sabrina.*

***A mes très chers frères** : Youcef, Mohamed et Ali.*

« Vous êtes la lumière qui illumine mon chemin, tous les mots ne peuvent exprimer l'amour que je vous porte. Je remercie dieu de vous avoir dans ma vie et je l'implore pour qu'il puisse vous garder à mes côtés éternellement ».

***A mes cousins** : Mohamed et Salim*

A tous et a toutes mes enseignants durant mes études.

A ma binôme Nabila qui à partager avec moi ce travail.

A tous mes amis et en particulier :

Yassine, Tahar, Nassim, Nahi, Rochdi, Mohamed et Mohamed riadh.

Maroua, Lamia, Ikram Et Roumaïssa.

Pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Que Dieu vous réserve bonne santé, bonheur et longue vie.

Yacine.



Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire

Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce travail :

A mon cher papa

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Votre chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Je souhaite que vous trouviez en moi source de fierté.

A ma chère maman

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur. Je souhaite que vous trouviez en moi source de fierté.

A mon cher frère Mohamed Ayoub,

A mes chères sœurs Anfal et Nour el houda

Pour toute l'affection qu'ils m'ont toujours témoignée, je leur souhaite une vie pleine de bonheur, de gloire, de triomphe et de succès.

A mon binôme Yacine

A tous mes amis et en particulier

Abir, Linda, Sara, hanna, Ichrak, Fatima et billal pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment, Que Dieu vous réserve bonne santé, bonheur et longue vie

NABILA.

Liste des Tableaux.

Liste des Tableaux

Tableau I : Principaux types de biosurfactants.....	19
Tableau II : Avantages des biosurfactants.....	23
Tableau III : Différentes applications potentielles et les rôles des biosurfactants.....	25
Tableau IV : les caractères macroscopiques de <i>Bacillus sp</i>	44
Tableau V : Résultats de dosage des protéines totaux.....	45
Tableau VI : Résultats de dosage des sucres réducteurs.....	45
Tableau VII : résultats de l'indice d'émulsification.....	49
Tableau VIII : les résultats des tests DDH pour chaque milieu.....	51
Tableau IX : les résultats de test de récupération des huiles.....	51
Tableau X : Résultats de rendement de production de biosurfactants par les différents milieux testés.....	52

Liste des Figures.

Liste des Figures

Figure 01 : Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules.....	4
Figure 02 : Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.....	5
Figure03 : pollution de sol par les hydrocarbures.....	7
Figure 04 : schéma récapitulatif de la processus biotique et abiotique conduisant à l'élimination naturel des déchets pétroliers dans le milieu marin.....	11
Figure 05 : A : Représentation schématique d'un surfactant.....	16
Figure 06 : Différents types de tensioactifs.....	17
Figure 07 : coloration de Gram (A : frottis / B : lame pour coloration de Gram.....	29
Figure 08 : préparations de milieu MS.....	30
Figure 09 : préparations de milieu ME.....	31
Figure 10 : préparations de milieu à base de caroubier.....	32
Figure 11 : les étapes de préparation de milieu à base de biscuite BISTA.....	34
Figure 12 : Les étapes de la préparation de milieu de jus de riz.....	35
Figure 13 : Aspect des milieux de cultures avant la fermentation.....	36
Figure 14 : protocole de la réalisation de test d'index de l'émulsification.	38
Figure 15 : Lecture de test d'émulsification E24.....	38
Figure 16 : les étapes de la réalisation du test DDH.....	39
Figure 17 : les étapes de test de récupération des huiles.....	40
Figure 18 : protocole d'extraction des biosurfactants par solvant organique.....	42
Figure 19 : les étapes d'extraction des biosurfactants.....	43
Figure 20 : l'aspect macroscopique des colonies de Bacillus sp sur le lieu GN.....	44
Figure 21 : résultats de la coloration de Gram.....	45
Figure 22 : suivie de la croissance de milieu Ms pendant 03 jours.....	46

Figure 23 : les résultats d'indice émulsification (E24) de différents milieux testés.....	47
Figure 24 : le pourcentage de teste E24 pour chaque milieu.....	49
Figure 25 : les résultats des tests DDH.....	50
Figure 27 : les résultats de récupération des biosurfactants dans des déférentes milieu.....	52

Liste des Abréviations.

Liste des Abréviations

BS : Biosurfactant.

GN : Gélose nutritif.

BN : Bouillon nutritif.

MS : milieu synthétique.

ME : milieu a base des épluches.

DDH : déplacement dans l'huile.

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique.

CMC : concentration micellaire critique.

DCM : dichlorométhane.

UFC : unité formant colonie.

SP : de latin species pluralis, espèce non précise.

He : Hauteur d'émulsification.

Ht : Hauteur totale.

CHCA: α -cyano-4- hydroxycinnamique.

GRAS : Generally Recognized as Safe.

Table Des Matières.

Table Des Matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I: Hydrocarbure et biodégradation

I. 1. Généralités sur les hydrocarbures.....	3
I.1.1 Définition.....	3
I.1.2 Origine.....	3
I.1.3. Classification.....	4
I.1.4. Les hydrocarbures dans l'environnement.....	6
I.1.5. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement	7
I.2. La biodégradation.....	11
I.2.1. Définition.....	11
I.2.2. Les bactéries hydrocarbonoclastes.....	12
I.2.3. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes.....	12
I.2.4. Les modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne.....	12
I.2.5. Facteurs qui influencent la biodégradation.....	13

Chapitre II: les biosurfactants

II.1. Généralités.....	15
II.2. Définition des surfactants.....	15
II. 3. Définition des biosurfactants.....	16
II.4. Classification des biosurfactants.....	17
II.4.1. Selon la charge de la partie polaire.....	17
II.4.2. Selon le poids moléculaire.....	17
II.4.3. Selon la structure chimique.....	18
II.4.3.1. Les glycolipides.....	18
II.4.3.2. Les lipopeptides.....	18
II.4.3.3. Les phospholipides.....	18
II.4.3.4. Lipopolysaccharides ou polymériques.....	18
II.4.3.5. Les lipides neutres.....	19

II.5. Les microorganismes producteurs de biosurfactants.....	19
II.6. Biosynthèse et rôle physiologique des biosurfactants.....	20
II.7. Propriété physico-chimiques des biosurfactants.....	20
II.7.1. Diminution de la tension superficielle.....	20
II.7.2. Diminution de la tension interfaciale.....	20
II.7.3. Concentration micellaire critique (CMC)	20
II.7.4. Tolérance aux conditions extrêmes.....	21
II.7.5. Biodégradabilité.....	21
II.7.6. Faible toxicité.....	21
II.8. Facteurs qui influencent la production des biosurfactants.....	21
II.8.1. Facteur nutritionnels.....	21
II.8.1.1 Influence de la source de carbone.....	21
II.8.1.2. Influence de la source d'azote.....	21
II.8.1.3. Influence des sels minéraux.....	22
II.8.2. Facteur environnemental.....	22
II.8.2.1. La température.....	22
II.8.2.2. Le pH.....	22
II.8.2.3. L'oxygène.....	22
II.8.2.4. L'agitation.....	22
II.9. Avantages des biosurfactants.....	22
II.10. Application des biosurfactants.....	23

Chapitre III: Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes.....	26
III.1 But de l'étude.....	26
III.2 Matériels.....	26
III.2.1 Matériel biologique.....	26
III.2.2 Matériel non biologique.....	26
III.1 Methods.....	26
III.3.1 Révivation de la souche.....	26
III.3.2 Conservation sur gélose incliné.....	27
III.3.3 Vérification de la pureté de la souche.....	27
III.3.3.1 Aspect macroscopique.....	27
III.3.3.2 Etude microscopique.....	28
III.3.4 La préparation des milieux de culture.....	30

III.3.4.1 préparation de milieu synthétique (MS)	30
III.3.4.2. Préparation de milieu à base des épiluches de pomme de terre et coquilles d'œufs (ME)	30
III.3.4.3 préparation de milieu à base de caroubier.....	31
III.3.4.4 préparation de milieu de culture à base de biscuite.....	33
III.3.4.5 Préparation de milieu de culture à base de jus de pâte.....	34
III.3.5 Analyse biochimique des milieux préparés.....	35
III.3.5.1 Dosage de protéines totales.....	35
III.3.5.2 Dosage des sucres réducteurs.....	36
III.3.6. Le suivi de la croissance bactérienne.....	37
III.7 Evaluation de la production de biosurfactant.....	37
III.7.1 Test d'émulsification (E24)	37
III.7.2 Test de déplacement dans l'huile (DDH)	39
III.7.3 Test de récupération des huiles à partir de la boue.....	39
III.8. L'extraction des biosurfactants.....	40

Chapitre IV: Résultats et Discussion

IV. Résultats de l'étude microbiologique.....	44
IV.1 Les caractères macroscopiques de la souche.....	44
IV.2 L'étude des caractères microscopique.....	44
IV.2.1 Coloration de Gram.....	44
IV.3 Résultats de dosage des milieux utilisés	45
IV.3.1 dosage des protéines totaux.....	45
IV.3.2 dosage des sucres réducteurs.....	45
IV.4 Résultats de démembrement bactériennes.....	46
IV.5 Résultats de l'évaluation de la production des biosurfactants.....	49
IV.5.1 Les résultats de E24 de différentes milieu.....	49
IV.5.2 Les résultats des tests de déplacement dans huiles(DDH).....	50
IV.5.3 Resultats de test de recuperation des huiles à partir de la boue de forage.....	51
IV.6 L'extraction des biosurfactants.....	52
Conclusion	54

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Introduction.

La découverte des hydrocarbures ou l'or noir a provoquée des changements dans notre mode de vie, à tel point que la majorité de nos activités dépendent aujourd'hui de son utilisation (**Hassaine., 2015**). Grâce à son rôle stratégique, politique et économique, il devient une scène mondiale (**Soltani., 2004**).

Dans notre ère industrielle, le développement de nos activités économiques et énergétiques est basé sur les produits à base de pétrole car sont, la principale source d'énergie pour l'industrie pétrochimique et l'origine de différents produits utilisables dans la vie quotidienne (**Zahed et al., 2010 ; Pintado-Herrera et al.,2017**). Ces activités massives sont devenues aujourd'hui une menace pour l'environnement marin et terrestre et conséquences des rejets ou déversements des déchets des industries pétrochimiques volontairement dans la nature. Les fuites de pétrole dans le sol sont les conséquences de ces pollutions qui se manifestent par des catastrophes écologiques pouvant avoir des impacts direct ou indirect sur la santé humaine (d'une contamination par les métaux lourds cancérigène) et sur l'équilibre des écosystèmes (**Gabet., 2004**).

Afin de protéger l'écosystème contre les agents polluants, généralement des métaux lourds ou bien des composés organiques, il est nécessaire d'évoluer ou développer des techniques fiables et efficaces pour lutter contre la pollution. Ces dernières de nature physique, chimique et biologiques sont utilisées dans le but d'immobiliser ou dégrader les hydrocarbures et diminuer ou détruire leur impact sur la santé et l'environnement (**Azubuiké et al., 2016**).

Les techniques physiques et chimiques sont généralement trop chères et non respectueuses de l'environnement (**Azubuiké et al., 2016**), sont généralement des surfactants, produits chimiques et des dérivés de pétrole qui présentent des risques toxiques et non dégradables (**Banat et al.,2000**).

Grâce à l'évolution de la biotechnologie moderne, les recherches actuelles s'orientent vers une approche biologique dites « la bioremédiation » qui est basée sur l'utilisation des microorganismes dans la biodégradation des polluants nocifs en produits moins dangereux (**Nikitha et al., 2017**).

L'orientation vers les techniques biologiques est principalement favorisée vue les avantages de ces biomolécules ou les biosurfactants synthétisés par les microorganismes, leur biodégradabilité, leur faible coût et faible toxicité pour la santé et l'environnement et l'efficacité dans les conditions extrêmes (**Makkar et al., 2011**).

Le but de notre travail est la production des biosurfactants par une souche bactérienne *Bacillus sp.* (Isolée et identifiée à partir des boues et bassins de stockages des hydrocarbures

par l'équipe de Centre de Recherche et de Développement (CRD), la division centrale de sonatrach, Boumerdès), en utilisant des déchets agroalimentaires (jus de patate (Riz), les épluchures de pomme de terre, Biscuits de Bista et le caroubier) dans les milieux de culture comme source de carbone afin d'augmenter le rendement de cette production.

Le présent travail est subdivisé en trois parties. La première est une synthèse bibliographique où sont exposées les données relatives aux hydrocarbures et leur biodégradation (généralités, origine, classification...), suivies des biosurfactants qui nous intéressent (définition, classification, propriétés...).

La seconde partie est réservée à la présentation des matériels et méthodes utilisées dans notre travail pour la production des biosurfactants à base des déchets agro-alimentaires.

La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Notre étude s'achèvera par une conclusion et des perspectives, suivie de références bibliographiques et des annexes.

Chapitre I

Hydrocarbures et biodégradation.

I. 1. Généralités sur les hydrocarbures

I.1.1 Définition

Les hydrocarbures sont des molécules organiques constituées d'une chaîne qui contient exclusivement des atomes d'hydrogène et du carbone avec une formule brute C_nH_m où « n » et « m » sont deux entiers naturels. Ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité, utilisés comme source d'énergie primaire. Cette énergie est souvent associée au pétrole et au gaz naturel (Tarayre, 2012).

L'accumulation dans l'environnement des quantités importantes de déchets pétroliers engendrée par l'exploitation de cette source d'énergie qui ne cesse d'augmenter, entraîne de sérieux risques de pollution. Pour cela, une élimination de ces déchets s'avère nécessaire pour se remédier au problème à travers différentes techniques à savoir le processus de biodégradation. Le taux de ce dernier dépendra de la longueur de la chaîne hydrocarbure et le nombre de cycles ; plus la chaîne d'un hydrocarbure sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile et plus l'hydrocarbure comportera de cycles, plus sa biodégradabilité sera importante (Tarayre, 2012).

I.1.2 Origine

Le pétrole est un mot d'origine latin "petroleum" qui signifie « huile de roche », se présente sous forme liquide sombre, huileux, collant et visqueux (Vieira et al., 2007). Se produit par la décomposition thermique précédée par une activité microbiologique intense sur la matière organique (plancton, végétaux, animaux, etc.) enfouie profondément sur des dizaines de millions d'années.

Les hydrocarbures dans l'environnement ayant différentes origines :

a. Origines de fossiles : ce type des hydrocarbures résultent de la décomposition de la matière organique qui est située entre deux couches de sédiments, leur exploration nécessite des études géologiques.

b. Les hydrocarbures actuels : sont des hydrocarbures résultant de la dégradation microbienne de la matière organique dans les zones humides. Cette dégradation peut être influencée par les changements climatiques (Djerbaoui, 2011).

c. Les rejets industriel et urbains : la source des hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (Soltani, 2004).

Le pétrole brut (pétrole brut naturel), une fois extrait du sous-sol, il est transporté vers les raffineries où il subit une distillation pour produire divers produits car c'est un mélange de plusieurs hydrocarbures pétroliers, constitués de proportions variables de carbone et d'hydrogène.

Cependant, ils contiennent également de l'azote, du soufre et de l'oxygène en quantité variables (Speight *et al.*, 2014 ; Varjani, 2017).

I.1.3. Classification

Le pétrole brut peut être classé comme pétrole léger, moyen ou lourd en fonction des proportions relatives des constituants de haut poids moléculaire présents dans sa composition. Les hydrocarbures (figure 01) sont classés généralement selon leur composition chimique en trois groupes distincts (Varjani, 2017).

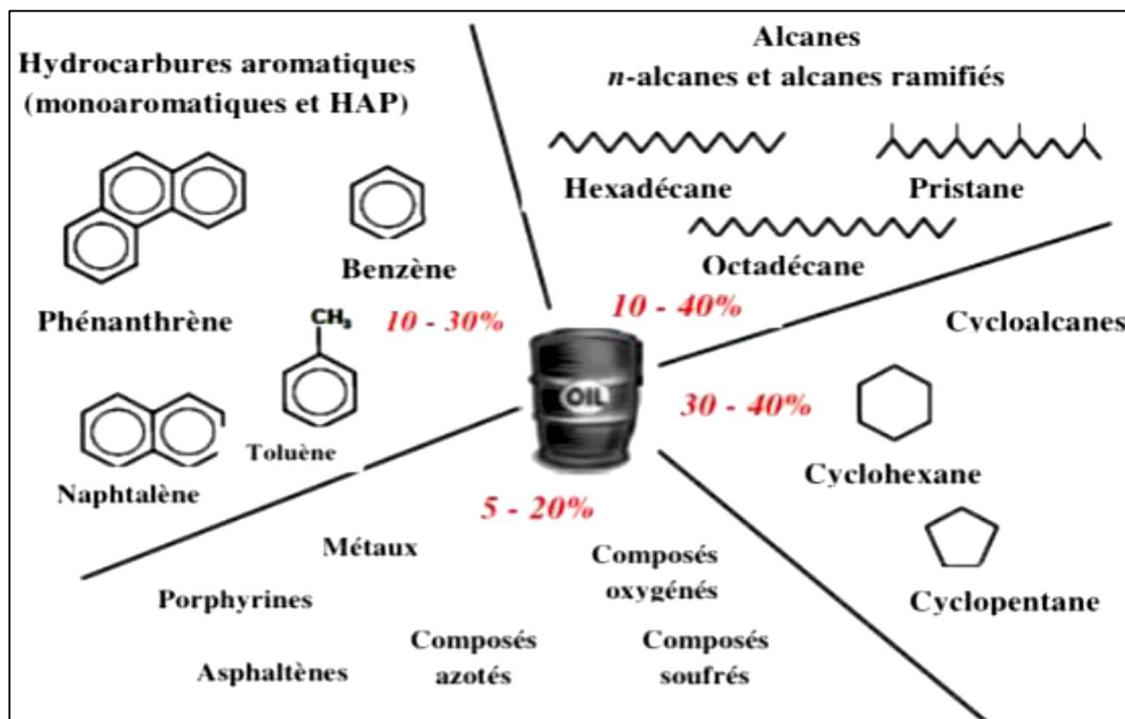


Figure 01 : Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules modifiées (Syakti, 2004).

1- Les composés saturés

Appelés aussi les composés aliphatiques, sont des hydrocarbures caractérisés par l'absence de double liaison, leurs atomes sont liés par de simple liaisons, représentent le pourcentage dominant de composants du pétrole (Abbasian, 2015) Le groupe des hydrocarbures saturés est divisé en trois sous-groupes qui sont comme suit (figure 01) :

a. Alcanes linéaires : Sont des alcanes ou n-alcanes saturés à une chaîne linéaire ouverte à une longueur varie entre 7 à 40 atomes de carbone avec une formule brute C_nH_{2n+2} exemple : paraffines et pentadécane (Rahman,2003).

b. Alcanes ramifiés : ce sont des alcanes linéaires caractérisés par la présence d'un ou plusieurs ramifications ou des radicaux généralement des groupement méthyle dans la position 2 pour les iso-alcanes les plus dominant exemple : pristane et phytanes (Bertrand et Mille, 1989).

c. Les cycloalcanes : ce sont des alcanes saturés où les atomes de carbone sont liés par des simples liaisons sous forme cycliques avec 5 ou 6 atomes de carbone exemples : les stérans, triterpanes et cyclohexane.

2- Les composés non saturés : ce sont des hydrocarbures caractérisés par la présence de double ou triple liaison entre les atomes de carbone ex : les alcènes, les alcynes et les composés aromatiques (**figure 02**), on distingue :

a. Les hydrocarbures aromatiques

Ils regroupent les hydrocarbures monocycliques avec une seule molécule cyclique telle que le Benzène, Toluène et le Xylène, des molécules polycycliques (HAPs) qui sont des composés organiques comportant au moins deux cycles de benzènes. Exemple le plus simple est le naphthalène avec deux cycles benzènes et le plus complexe est le coronène avec 07 cycles.

b. Les oléofines : sont des hydrocarbures insaturés en chaîne caractérisés par la présence de doubles liaisons ex : alcènes.

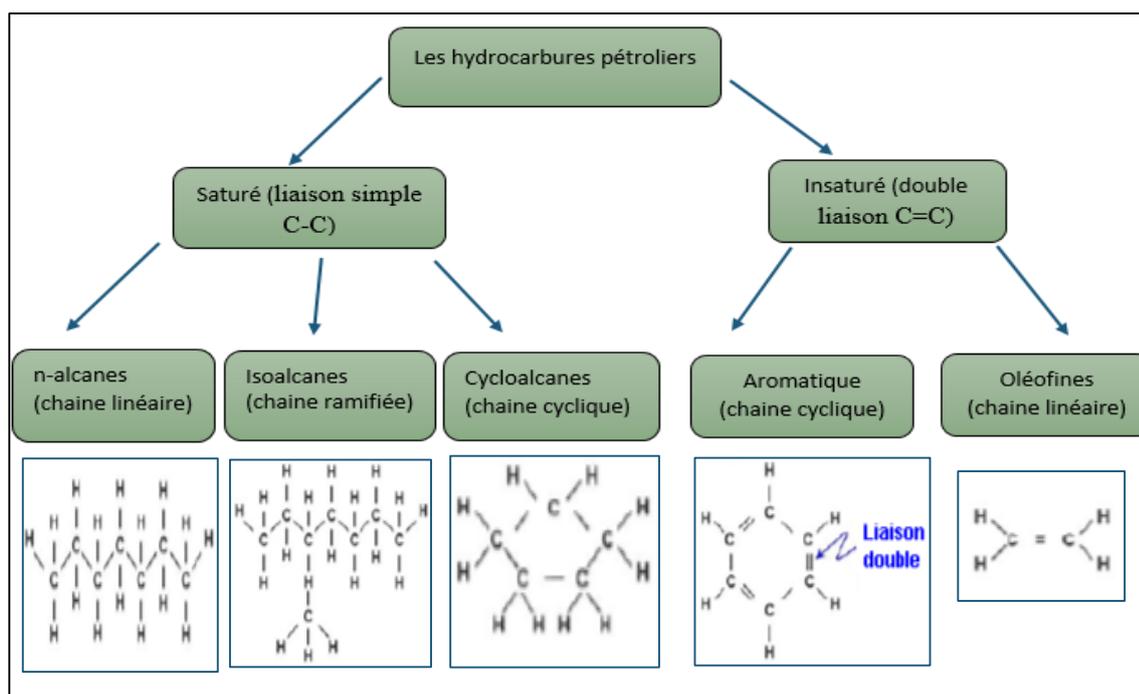


Figure 2 : Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et al, 2008)

3-Les composés non-hydrocarbonés

a. Résines : sont des composés contenant des structures aromatiques (plus de 06 cycles) avec une longue chaîne d'alkyle, tels que les quinolines, sont des solides parfaitement dissoutes dans les huiles (Varjani, 2017).

b. Asphaltènes : comme les résines, ils comportent plusieurs groupes fonctionnels tels que les acides gras, le phénol et les esters (Varjani, 2017), composés visqueux à haute poids moléculaire composé de groupements polycycliques (Parra-Barraza, 2003).

c. Les composés polaires : généralement sont des composés avec des molécules hétérocycliques représentent 5 à 25% de la composition des pétroles brutes en trouve des composés azotés exemple : quinoléines, des composés soufrés : sulfures, disulfures et mercaptans et des composés oxygénés : phénol, acide carboxyliques, aldéhydes et alcools (Colati et al., 2013).

d. Les métaux : sont présents dans les hydrocarbures sous forme des tracs en trouve le nickel le plus abondants, le fer, le cuivre et l'uranium sont également détectés (Escobar et al, 2012).

I.1.4. Les hydrocarbures dans l'environnement

Le diversement aléatoire ou les fuites des réservoirs souterrains, vapeur, les puits de pétrole et les travaux des raffineries et les déchets de l'industrie pétrochimiques causent plusieurs dégâts et catastrophes écologiques dus à la contamination des sols, des eaux souterraines et les mers et les océans (Varjani, 2017). Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont nombreux, en premier lieu la détérioration de la qualité des eaux souterrains qui devient impropre à l'utilisation ex : eau potable, les sols contaminés aussi représentent un grand danger pour l'homme et l'animal lors d'un contact direct ou indirect ou le transfert de ces polluants dans la chaîne alimentaire. En second lieu, l'augmentation de la quantité des déchets pétrochimiques provoque leur accumulation dans l'environnement, et qui peut être réduite par les végétaux et les animaux (Soltani, 2004).

La majorité des composants chimiques des hydrocarbures sont hautement toxiques à cause de la présence des composés cancérogènes et tératogènes. Les composés aromatiques sont plus toxiques que les composés aliphatiques (Harayama, 1999), la présence de ces polluants au niveau du sol ayant plusieurs risques réels ainsi la présence des molécules toxiques, explosifs et inflammables peut causer des incendies (Scriben, 1999).

Les polluants pétroliers dans l'environnement sont classés en deux catégories selon leur risque : des polluants lourds et difficiles à la dégradation par les microorganismes et des polluants pétroliers.

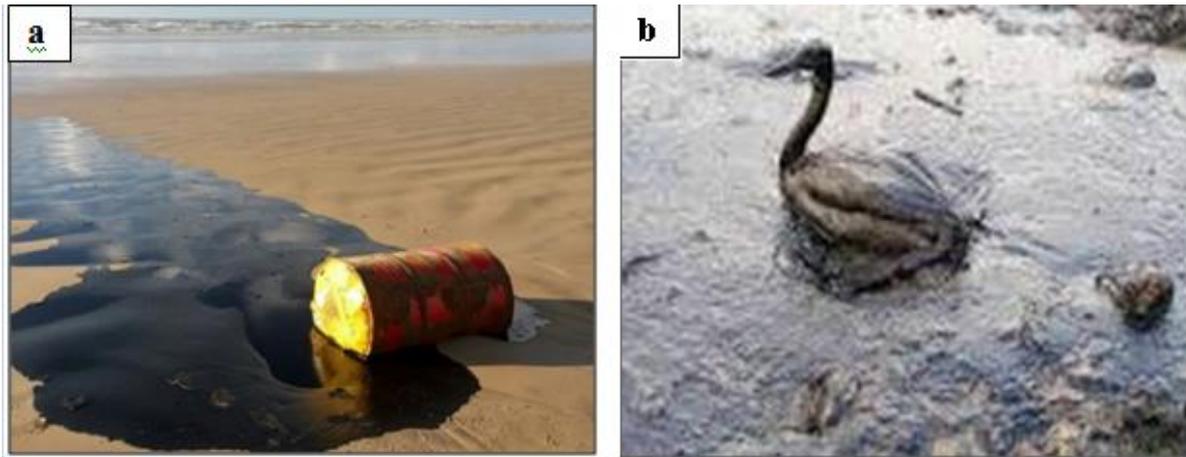


Figure 03 : Pollution du sol (a) et de milieu marin (b) par les hydrocarbures (Anonyme 1, 2).

I.1.5. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

Une fois les hydrocarbures sont déversés ou rejetés dans l'environnement marin ou terrestre, ils subissent différents processus naturels provoquant ainsi des changements et des modifications de leur aspect et leurs caractéristiques physico-chimiques, et par conséquent, changement dans leur composition avec le temps. C'est l'altération ou le vieillissement (Harayama, 1999).

I.1.5.1. Dans le sol

C'est un système polyphasique où la couche supérieure de la croûte terrestre est composée de particule minérale, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes. Il résulte de l'évolution de la roche mère transformée en surface par divers facteurs qui sont le climat, la nature de la roche et l'activité biologique. Donc, le sol est un milieu hétérogène et complexe constituée de trois phases : composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonnée dans le sol (Gabet, 2004).

Les hydrocarbures sont fortement absorbés par la couche superficielle de sol, riche en microorganismes qui jouent un rôle dans la remédiation du sol pollué en hydrocarbures (Djerbaoui, 2011). Il existe trois grandes techniques d'élimination de pollution de sol :

1. Traitement par remplacement

C'est une ancienne technique employée pour la lutte contre la pollution de sole, consiste à prélever le sol contaminé en profondeur et le remplacer par une terre saine (Leconte, 1995).

2. Traitements physico-chimiques

2.1 Traitement physiques

Ce sont des techniques basées sur l'utilisation de la chaleur pour la modification de la composition chimique des agents polluants (**Soltani, 2004**). L'utilisation des hautes températures permet de réduire les polluants en CO₂ et H₂O (**Gabet, 2004**).

Ces traitements consistent à concentrer et séparer les polluants du sol sans le modifier ou le détruire, les techniques les plus mises en œuvre sont l'adsorption sur charbon, extraction, lavage et confinement (**Scirban,1999**).

2.2 Traitements chimiques

Le but de ces traitements est de détruire ou bien réduire les polluants en produits moins nocives pour l'environnement par des réactions chimiques (l'oxydation et la neutralisation) entre les polluants et l'agent chimique ajouté (**Ballerini et Vandecastel,1999**).

3. Traitements biologiques

Les traitements biologiques des zones polluées par les hydrocarbures sont basés sur l'utilisation des microorganismes tels que les bactéries, champignons dans la dégradation de ces agents polluants. Ce type de traitement consiste à détruire les polluants organiques en produits moins complexes comme le CO₂ qui sera utilisé comme source de carbone pour la croissance microbienne.

Différents microorganismes sont utilisés tels que les *actinomycètes*, *Arthrobacte* et *Pseudomonas*, si les flores de sol sont incapables de faire la dégradation des polluants des souches bactériennes allochtones peuvent être ajoutées pour la décontamination de sol (**Colin,2000**).

La technique biologique repose sur l'injection de l'air dans le sol ou l'aération qui permet d'enrichir le milieu en oxygène nécessaire par les microorganismes pour leur croissance et à la biodégradation des polluants (**Bouderhem, 2011**)

I.1.5.2. Dans le milieu marin

Le déversement aléatoire des hydrocarbures dans l'environnement peut provoquer des contaminations de milieu aquatique soit par le rejet volontairement des déchets de l'industrie pétrochimique, soit lors des actions accidentelles durant les fuites de canalisations de transport.

Dès que les polluants des hydrocarbures sont présents dans le milieu marin, il subit des modifications de leur composition physico-chimiques grâce à deux catégories de processus : un processus abiotique et un processus biotique. **(Colin,2000)**.

❖ **Processus abiotique**

1. Etalement

C'est la première étape qui se déroule après le versement des hydrocarbures dans la mer, la dispersion de déchets pétroliers dépend de leur viscosité et leur compositions chimiques et de la température ambiante. On trouve que le pétrole avec une faible viscosité s'étale rapidement que le pétrole avec une viscosité très élevée **(Federation, T.I.T.O.P., 2018)**.

2. Evaporation

L'évaporation est le processus qui permet la transformation des agents polluants lors de la présence des déchets pétrochimiques dans le milieu aquatique. Cette transformation est influencée par la nature et la quantité d'agent polluant et stimulée par l'agitation de la mer et le vent qui favorise l'évaporation des polluants **(Goeury, 2012)**.

L'évaporation est le principal agent de dénaturation des hydrocarbures, cette voie peut détruire les hydrocarbures les plus légers dans leur composition chimique est inférieur à 15 atomes de carbone et les hydrocarbures lourds supérieur à 25 atomes de carbones. Cette réaction peut provoquer des pollutions atmosphériques si le pétrole continue sa dispersion dans l'eau (augmentation de la surface de la marée noire) **(Kanan ,2012)**.

3. Dispersion

Le transport de la nappe d'hydrocarbures par les vagues hydriques, les courants et le vent entraîne la dispersion de ces nappes pétrolières en forme de gouttelettes avec des tailles variables, les grosses gouttelettes remontent à la surface de l'eau pour former une couche superficielle mince alors que les petites gouttelettes resteront en suspension dans l'eau. Ceci stimule d'autres processus naturels tels que la biodégradation, la dissolution et la sédimentation. **(Fédération, T.I.T.O.P., 2018)**.

4. Photo-oxydation

Ce phénomène se déroule à la surface de l'eau suite à l'exposition de la couche superficielle des hydrocarbures à l'air libre et les radiations solaires résultant des dérivés

polaires solubles dans l'eau. La photo-oxydation sera plus rapide dans le cas de film mince des hydrocarbures (**Chalghmi,2015**).

5. Dissolution

C'est la capacité d'une substance à se dissoudre dans l'eau. Un hydrocarbure est soluble lorsque sa masse moléculaire est faible et sa polarité est élevée. Plus l'eau de la mer est salée plus la dissolution est faible (**Marchand et Kantin, 1997**).

Les hydrocarbures solubles sont parmi les hydrocarbures les plus dangereux pour l'environnement car ils sont difficiles à éliminer (**Bouchez et al., 1995**).

6. Emulsification

Généralement, c'est un processus qui conduit à la formation d'une émulsion stable sous forme d'une mousse au chocolat (**Fingas, 2013**). C'est une incorporation entre l'eau et le pétrole qui peut être dispersée dans l'eau par le vent, les vagues et le courant d'eau. Donc, l'émulsification est un facteur très important dans l'élimination du pétrole de la couche superficielle de la mer (**Marchand et Kantin, 1997**).

7. Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes des hydrocarbures peuvent interagir avec la matière organique et minérale contenant dans l'eau pour la formation des agrégats des hydrocarbures de haute densité difficile à dégrader par les processus naturels (**Gong et al, 2014**).

❖ Processus biotique

C'est un processus de dégradation des agents polluants basé sur l'utilisation des microorganismes aquatiques (**figure 05**), qui consiste à détruire le polluant en composant moins complexe qui sera utilisé par la suite comme source de carbone pour la croissance des microorganismes par un phénomène naturel qui s'appelle la biodégradation (**Haritash et Kaushik, 2009**).

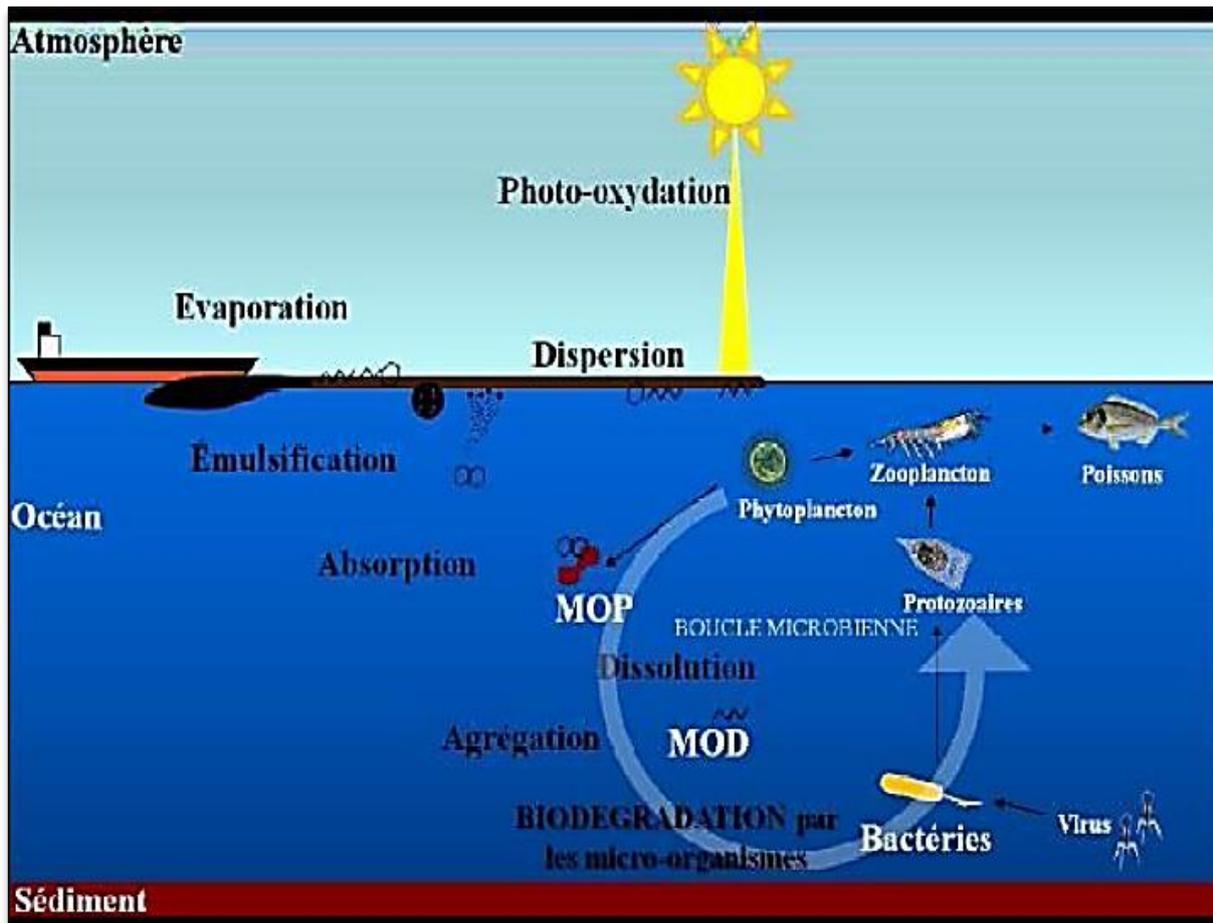


Figure 04 : Schéma récapitulatif du processus biotique et abiotique conduisant à l'élimination naturelle des déchets pétroliers dans le milieu marin (Sauret, 2011).

I.2. La biodégradation

I.2.1. Définition

C'est la dégradation biologique qui consiste à la transformation des agents contaminants et les polluants organiques en différents sous-produits moins toxiques tels que le CO₂ et H₂O par l'action des microorganismes (bactéries et champignons). Le phénomène de la biodégradation s'effectue en différents milieux que ce soit un milieu aquatique (liquide) ou bien terrestre (solide). Les produits de la biodégradation sont généralement de simples molécules comme le dioxyde de carbone qui est utilisé comme une source de carbone et d'énergie pour la croissance microbienne, avec la participation des autres molécules dans la synthèse protéique tels que l'azote et le phosphore. On parle de la biodégradation aérobie en présence d'oxygène et de la biodégradation anaérobie en absence d'oxygène où ce dernier est remplacé par le nitrate, sulfate ou le méthane (Lemonte, 1995).

I.2.2. Les bactéries hydrocarbonoclastes :

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes terrestres. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes (**Atlas et al.,2011**).

Les bactéries hydrocarbonoclastes utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone, De nombreuses études ont montré qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination. Naturellement, leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole. Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes (**Sauret, 2011**).

Les bactéries représentent le groupe microbien le plus dominant de la communauté microbienne qui dégrade les hydrocarbures, la première bactérie hydrocarbonoclastes isolée en 1988 par Heitkampest. Plusieurs bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont été isolé pour leur capacité de biodégradation (**Bouchez et al., 2014**).

I.2.3. Caractéristiques des bactéries hydrocarbonoclastes

Les bactéries hydrocarbonoclastes sont des bactéries génétiquement stables qui utilisent les hydrocarbures comme source de carbone. Elles sont caractérisées par une reproduction rapide suite à un entreposage dans les milieux contaminés afin de réduire les risques de contamination des sols, des eaux de surface et les eaux souterraines (**Pelmont, 1995**).

Ces bactéries sont aptes à biodégrader une vaste étendue de polluant pétroliers, et ne représentent aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques. Comme elles sont douées d'une activité enzymatique et croissance bactérienne dans des conditions environnementales optimales. Elles sont des bactéries mobiles, à Gram négatif ou à Gram positif (**Pelmont, 1995**).

I.2.4. Les mode d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Les cellules bactériennes en présence des hydrocarbures dans le sol, utilisent ces polluants comme seule source de carbone et énergie pour leur croissance. Les hydrocarbures sont des molécules hydrophobes, de ce fait les microorganismes développent de nombreuses stratégies d'assimilation de pétrole liquide dont quatre modes cités comme suit :

- L'utilisation de composés organiques solubles surtout les alcanes légers et certains hydrocarbures aromatiques solubles (**Bouchez et al., 1995**).
- Par contact direct entre la cellule bactérienne et le composé organique, et qui peut être facilité par des modifications cellulaires telles que l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire qui favorise l'attachement de la cellule et le composé organique, et le substrat pénètre directement dans la cellule bactérienne par diffusion ou transport actif sans le dissoudre dans la phase aqueuse (**Duker, 1996**).
- La synthèse des biomolécules appelé les biosurfactants qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau qui facilitent l'attachement des cellules aux hydrocarbures (**Maier et al., 2009**).
- La synthèse des biomolécules appelées les biosurfactants qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau et qui facilitent l'attachement des cellules aux hydrocarbures (**Maier et al., 2009**).

I.2.5. Facteurs qui influencent la biodégradation

La vitesse de la biodégradation des hydrocarbures est influencée par nombreux facteurs physiques et chimiques qui sont :

I.2.5.1. Structure et nature du sol

La nature du sol, la structure et la composition en matière organique et les éléments nutritifs, les sels minéraux et la diffusion d'oxygène sont des facteurs importants qui influencent la biodégradation des agents polluants (**Lecomte, 1995**).

I.2.5.2. La composition chimique des hydrocarbures

Le pétrole est un mélange complexe de molécules, la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures saturés est plus rapide et élevée viennent ensuite les aromatiques puis les aromatiques à haute poids moléculaire (**Soltani, 2004**).

I.2.5.3. Humidité

La bioremédiation des composés organiques simples ou complexes et influencée par l'humidité, c'est un paramètre important. Les milieux en teneurs élevées en humidité influencent sur la perméabilité des sols aux gaz et la diffusion d'oxygène qui provoque une limitation de métabolisme microbien aérobie (**Ballerini, 1999**).

I.2.5.4. Température

Les microorganismes sont caractérisés par une température optimale pour leur croissance et un taux de reproduction plus élevée, c'est la gamme de température qu'un microorganisme tolère et survie dans leur écosystème, en dessous desquelles ils sont métaboliquement inactifs et il n'y a pas de croissance (**Atlas et Bartha, 1993**).

I.2.5.5. Salinité

Quand on parle de la salinité on sous-entend le phénomène d'osmose, la salinité exerce un effet osmotique, les fortes concentrations en sels provoquent des cassures au niveau de la structure protéique qui sont essentielle à l'activité enzymatique nécessaire pour la biodégradation des hydrocarbures (**Abed et al., 2006**).

I.2.5.6. Potentiel hydrogène

Comme la température, l'activité microbienne est influencée aussi par le pH qui doit être située entre 5 et 9 avec un pH optimal 7. Le milieu acide favorise la solubilité des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (**Gabet., 2004**).

I.2.5.7. Taux d'oxygène

La biodégradation aérobie est le processus le plus rapide par rapport à la biodégradation anaérobie, donc l'oxygène est un facteur primaire nécessaire pour l'élimination de ces polluants (**Gareer et al, 2003**).

Chapitre II
Biosurfactants.

II.1. Généralités

Les réserves de pétrole ont été utilisées de façon irrationnelle provoquant des risques à court et à moyen terme. Etant donné que ces énergies ne sont pas renouvelables la recherche d'une meilleure exploitation des gisements et la récupération maximale du pétrole est nécessaire d'où la naissance des substances chimiques dérivées de pétrole appelées « les surfactants chimiques ». Les surfactants constituent la classe la plus importante de produits industriels largement utilisés dans divers secteurs, et vue la toxicité de ces surfactants, les scientifiques s'intéressent et s'orientent vers les surfactants synthétisés par voie microbienne ou biosurfactants grâce à leur meilleure fonctionnalité dans les conditions extrêmes (**pruthi et al., 1995**).

Ces agents de surface peuvent avoir différentes origines, on trouve les surfactants commercialement disponibles d'origine chimique et les biosurfactants d'origine microbienne, les scientifiques s'intéressent à l'élimination des dérivés de pétrole présentent un risque toxique pour l'écosystème par la biodégradation (**Vipulanandan et Ren, 2000**).

L'essor de la biotechnologie des surfactants produits par des organismes vivants (les tensioactifs biologiques) ou les biosurfactants ayant mêmes propriétés tensioactives avec les surfactants chimiques la référence est que les biosurfactants sont moins toxiques et biodégradables par rapport aux surfactants chimiques (**Banat et al., 2000**).

II.2. Définition des surfactants

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des agents à activité de surface, ce sont des tensioactifs, synthétisés par voie chimique caractérisés par une haute énergie et se répartissent dans une position de l'interface entre deux liquide non miscible. La réduction de l'énergie et la force répulsive entre deux phases différentes permet la formation des microémulsions des solutions aqueuses ou les mélanges des hydrocarbures pour faciliter de mélanger les deux liquides hétérogènes (**Al- Arajil et coll., 2007**).

II. 3. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont définis comme des molécules tensioactives amphiphiles actives aux surfaces composés de deux types de polarités différentes : une tête hydrophile et polaire avec une affinité pour l'eau et une queue hydrophobe et apolaire avec une affinité pour les lipides (figure 05). Donc, d'interagir entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau en réduisant la tension superficielle et par conséquent permettent de mélanger les deux phases et de s'interagir plus facilement (Morelli et Szajer, 2000),

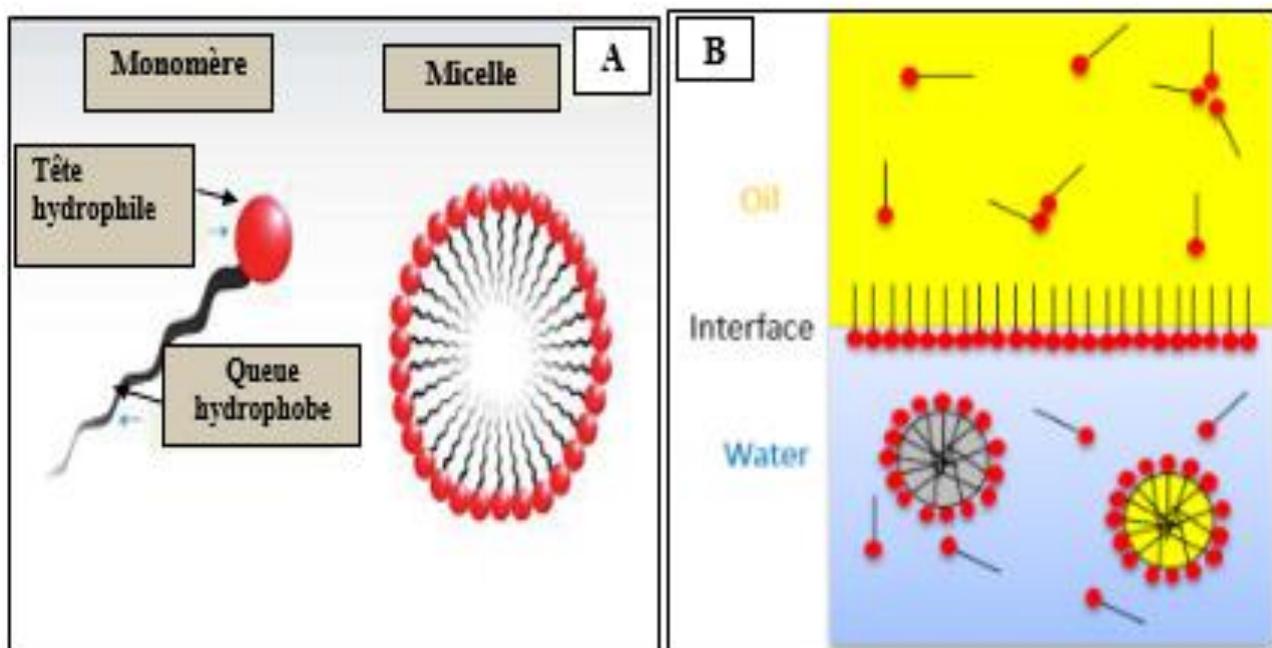


Figure 05 : Représentation schématique d'un biosurfactant.

A : Représentation schématique d'un surfactant et de son positionnement à l'interface. **B** : Partage des tensioactifs (micelles) entre un milieu gras et un milieu aqueux (Hadj, 2013).

La phase hydrophile est constituée d'un acide aminé ou d'un peptide, les anions ou les cations et les polysaccharides s'immergent dans l'eau et la phase hydrophobe ou lipophile constituée par des acides gras saturés et insaturés (Dessai et Banat, 1997). L'accumulation ou l'agrégation de ces molécules donnent formation de molécules tensioactives qui s'appellent micelles.

II.4. Classification des biosurfactants

La classification des biosurfactants est différente que les surfactants chimiques qui classés selon la structure de dissociation dans l'eau, les surfactants biologiques sont classés selon la charge de la partie polaire, leur poids moléculaire, selon la nature biochimique, propriétés physico-chimiques, leur mode d'action l'origine microbienne (**Ron et Rosenberg, 2002**).

II.4.1. Selon la charge de la partie polaire

En fonction de la nature de la charge sur la partie polaire (**figure 06**), les tensioactifs peuvent être classés en :

- ✓ Les tensioactifs anioniques chargés négativement.
- ✓ Les tensioactifs non ioniques sont la plupart des produits de polymérisation.
- ✓ Les tensioactifs cationiques avec un groupement qui est chargé positivement.
- ✓ Les tensioactifs amphotères ou les zwitterioniques caractérisés par la présence de deux groupements dans la même molécule, l'un chargé positivement et l'autre chargé négativement (**Pattanathu et al., 2008**).

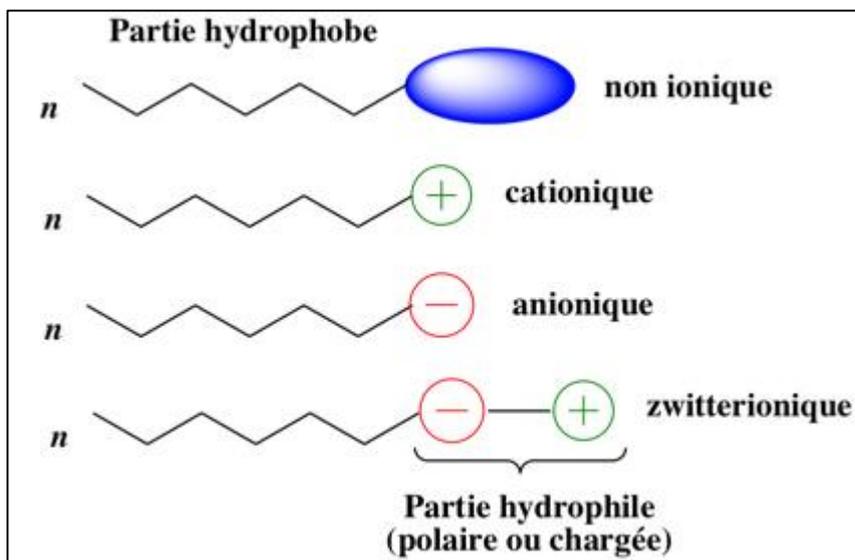


Figure 06 : Différents types de tensioactifs (**Kara, 2017**).

II.4.2. Selon le poids moléculaire

Les biosurfactants sont divisés en deux catégories (**Rosenberg et Ron, 1999**) :

- **Faible poids moléculaire** : ils sont efficaces pour diminuer la surface et la tension interfaciale comme les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides.

- **Haut poids moléculaire ou polymères** : contenant des polysaccharides amphiphiles, des protéines, des lipopolysaccharides et des lipoprotéines. Connus comme des bio émulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans réduction importante de la tension de surface.

II.4.3. Selon la structure chimique

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres (**Wise, 1997**).

II.4.3.1. Les glycolipides

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acide aliphatique ou d'acide hydroxyaliphatique. Les bio-émulsifiants glycolipides les plus étudiés sont : les rhamnolipides, les lipides tréhalose et les sophorolipides (**Ron et Rosenberg, 2002**).

II.4.3.2. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont particulièrement intéressants en raison de leurs activités de surface élevées (**Rodrigues et al., 2006**) et de leur potentiel antibiotique contre diverses bactéries, algues, champignons et virus. Ceux-ci consistent en un lipide attaché à une chaîne polypeptidique (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**). Parmi ces biosurfactants les plus puissants est la surfactine (lipopeptide cyclique) produite par *Bacillus subtilis*.

II.4.3.3. Les phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphate et de chaîne lipidique (**Wise, 1997**), bien qu'ils soient présents dans les émulsions dans l'huile. Pour chaque micro-organisme, il existe très peu d'exemples de production extracellulaire (**Bognolo, 1999**).

II.4.3.4. Lipopolysaccharides ou polymériques

Les biosurfactants polymères sont des biosurfactants de haut poids moléculaire, ont un squelette de trois ou quatre sucres répétés avec des acides gras attachés aux sucres. Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont les émulsanes. L'émulsane est un émulsifiant extracellulaire soluble dans l'eau produit par les bactéries (**Bognolo, 1999**).

II.4.3.5. Les lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités de ces tensioactifs lors de leur croissance, par exemple le phosphatidyléthanolamine qui est produit à partir d'*Acinetobacter sp.* Et forme des microémulsions dans l'eau (Shoeb et al., 2013).

II.5. Les microorganismes producteurs de biosurfactants

Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les plantes, les animaux ou l'homme sont également capables d'en produire (Mulligan et al., 2001 ; Christofi et Ivshina, 2002). Les bactéries productrices sont isolées à partir de leur milieu naturel et sont cultivés en laboratoire pour trouver un milieu de culture avec une meilleure source de carbone pour obtenir un taux de production maximum, le principal rôle de ces tensioactifs est de permettre aux micro-organismes de croissance sur des substances insolubles en abaissant la tension interfaciale entre l'eau et les hydrocarbures (Tableau 01).

La régulation de la biosynthèse des biosurfactants bactérien est mal connue, les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat et al., 2000).

Tableau I : Principaux types de biosurfactants (Banat et al., 2000).

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

II.6. Biosynthèse et rôle physiologique des biosurfactants

Les surfactants biologiques sont des métabolismes secondaires synthétisés lors de la phase exponentielle de la croissance microbienne, ce sont des produits extracellulaires, intracellulaires ou localisés à la surface de la cellule contenant des groupes hydrophiles et hydrophobes ayant une capacité de réduire la tension superficielle entre deux liquide hétérogènes et faciliter la dégradation des substrats insoluble comme les hydrocarbures, ayant un rôle dans l'amélioration de la disponibilité des hydrocarbures aux cellules microbienne par augmentation de la surface de contacts entre les cellules microbiennes et la substrat, certaines bactéries produisent des biosurfactants qui émulsifient le substrat (**Mulligan et al.,2014**).

II.7. Propriété physico-chimiques des biosurfactants

Les propriétés majeures des biosurfactants sont la diminution de la tension superficielle, pouvoir moussant par l'apparition d'une mousse de café, pouvoir émulsifiant, stabilité et résistance aux conditions extrêmes tels que la température et le pH, ces caractéristiques sont communes pour la plupart des biosurfactants connues.

II.7.1. Diminution de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme la force qui existe à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface, les biosurfactants abaissent considérablement la tension de l'eau même dans les solutions très diluées qui permet la solubilité et la disponibilité de la substrat (**Holmberg et al.,2001**)

II.7.2. Diminution de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force qui existe entre deux solutions hétérogènes pour rompre la surface entre ces deux liquides immiscibles, les biosurfactants aident à la réduction de cette force et l'émulsification des contaminants pour être disponible à l'utilisation par les cellules bactériennes (**Neidre, 1993**)

II.7.3. Concentration micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique est définie comme la concentration minimale du biosurfactants présente dans un liquide nécessaire pour une réduction maximale de la tension superficielle, 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 la formation des micelles (**Pore., 1992**).

II.7.4. Tolérance aux conditions extrêmes

Les microorganismes produisant les surfactants biologiques sont isolés à partir des environnements à conditions extrêmes (température, Ph extrême et la force ionique), les biosurfactants peuvent être utilisés dans ces conditions extrêmes (**Gabet,2004**).

II.7.5. Biodégradabilité

Les surfactants biologiques sont facilement dégradés par les microorganismes dans l'eau ou le sol, ce qui les rend appropriés pour les applications dans la bioremédiation et le traitement des agents contaminants de l'environnement.

II.7.6. Faible toxicité

Ces composés permettent leur utilisation dans divers produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

II.8. Facteurs qui influencent la production des biosurfactants

La production des surfactants chimiques est trop chère et nécessite des équipements et méthodes complexes. Les chercheurs s'orientent vers les biosurfactants en utilisant des milieux de cultures moins coûteux à savoir les milieux à base de déchets agro-alimentaires.

La quantité des biosurfactants produite par les micro-organismes varie selon la composition de milieu, la source de carbone, les nutriments et les conditions de culture tels que la température, l'agitation et le pH (**Mulligan et al., 2014**).

II.8.1. Facteur nutritionnels

La composition de milieu de culture en nutriments joue un rôle essentiel dans la production et le rendement des biosurfactants (source de carbone, source d'azote, le phosphate et les ions) (**Mulligan et al., 2014**).

II.8.1.1 Influence de la source de carbone

La source de carbone joue un rôle très important dans la croissance microbienne et la production de biosurfactants, la meilleure production est lorsque tout le carbone sous la forme soluble a été consommé par le micro-organisme producteur (**Banat, 1995**).

II.8.1.2. Influence de la source d'azote

L'azote utilisé dans la production de biosurfactants peut avoir différentes origines (source organique et inorganique). 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 limitées (**Lang et Wullbrandt, 1999**).

II.8.1.3. Influence des sels minéraux

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

II.8.2. Facteur environnemental

Déférents facteurs environnementaux influence la croissance microbienne tels que le pH, la température, oxygène, agitation et la salinité tous ces facteurs résultent une augmentation ou diminution de rendement de la production de biosurfactants (**Mulligan et al., 2014**).

II.8.2.1. La température

Les souches thermophiles produisent des biosurfactants résistants à des températures extrêmes, les biosurfactants produits par *Bacillus* restent stables à des températures supérieures à 40°C (**Eddouada, 2012**)

II.8.2.2. Le pH

La stabilité et la solubilité des métabolites est influencé par le pH (**Lee et al., 2018**). Généralement, le milieu acido-basique est défavorable pour la production des biosurfactants (BS) chez les souches de *P. aeruginosa* à des rendements maximaux dans une large gamme de pH entre 6,0 et 6,5 et la productivité qui chute rapidement à des pH inférieurs ou supérieurs (**Kosaric, 2015**).

II.8.2.3. L'oxygène

L'oxygène est l'un des facteurs environnementaux essentiels pour la croissance microbienne grâce à son effet sur l'activité cellulaire et la croissance. Dans le cas de *B.subtilis* C9, un rendement trois fois plus élevé en lipopeptides a été observé dans des conditions limitées en oxygène par rapport à des conditions suffisantes en oxygène (**Kosaricet Sukan, 2000**).

II.8.2.4. L'agitation

L'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de culture lors de la production provoque une augmentation de cisaillement et un rendement moindre chez les bactéries en comparaison avec les levures (**Edwarde et al., 1991**).

II.9. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent plusieurs avantages en comparaison avec les surfactants chimiques dérivés du pétrole car leur production par voie microbienne est très rapide, ainsi que les caractéristiques structurales et propriétés des biosurfactants qui sont supérieures ou comparables (**Tableau 02**) (**Zajic et Donaldson, 1985**).

Les biosurfactants sont plus acceptés écologiquement car sont biodégradables et ne sont pas toxiques pour l'environnement comme les surfactants chimiques qui sont toxique et non dégradable et une source de pollution (**Benerjee, 1991**).

Les biosurfactants peuvent réduire la viscosité du pétrole par la formation d'émulsion huile dans l'eau. Les surfactants biologiques sont utilisés comme des agents de lutte contre la pollution causée par les hydrocarbures par exemple : dans le nettoyage des bacs de stockage du pétrole brute, ces biosurfactants sont moins chers que les surfactants chimique (**Banat et al., 1991**).

Les biosurfactants résistent à l'autoclavage à 121°C pendant une heure et gardent leur pouvoir émulsifiant (**Benerjee, 1991**).

Tableau II : Avantages des biosurfactants (Tabka, 2014).

Caractéristiques	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution de la tension interfaciale. • Diminution de la tension superficielle. • Emulsification. • Pouvoir moussant. • Pouvoir mouillant. • CMC. • Pouvoir antibiotique ou fongicide.
Stabilité thermique et chimique	<ul style="list-style-type: none"> • Plus stable que les surfactants chimiques. • T° (4-100°C). • Ph (4-9). • Salinité (5-20%).
Caractéristiques écologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Biodégradable, non toxiques biocompatibles et utilisable dans le domaine pharmaceutique et agro-alimentaire

II.10. Application des biosurfactants

II.10.1. Application en industrie pétrolière

Les biosurfactants présentent de nombreuses utilisations dans le domaine pétrochimique grâce à leur performance, ils sont utilisés pour le bio-nettoyage des tanks de stockages et les cuves pétroliers, et pour l'extraction du pétrole adsorbé sur les tanks de stockage, les boues et

les sédiments et la récupération d'un pourcentage significatif de pétrole commercialisé (**Banat et al., 1991**).

La dégradation des pollutions d'origine pétrolières dans le milieu marin ou terrestre se fait par la voie biologique qui est le mécanisme le plus efficace de ces agents contaminants (**Mallei, 2000**).

II.10.2. Application en industrie agro-alimentaire

En industrie alimentaire les biosurfactants sont utilisés comme des additifs alimentaires et comme améliorant dans la boulangerie et la charcuterie (**Marquis, 2000**).

En agriculture les biosurfactants sont utilisés dans la formation des herbicides et pesticides (**Lang et wallbrant, 1999**).

II.10.3. Application en cosmétologie

L'utilisation des surfactants biologiques connaît une grande croissance dans le marché du soin corporel et cosmétique grâce à leur effet antibiotique sur divers microbes (**Wertz, 2012**).

Les biosurfactants entrent dans la fabrication des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles, dans la préparation des savons riches en huiles essentielles et la préparation des shampoings (**Tabka, 2014**).

II.10.4. Application pharmaceutique

Généralement, les biosurfactants ont des propriétés antimicrobiennes telles que la surfactine qui a un effet antibactérien, anti-tumoral, hypercholestérolémique et dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (**Banat, 2000**).

Le tableau ci-dessus résume les différents domaines d'application des biosurfactants et leur rôle.

Tableau III : Différentes applications potentielles et les rôles des biosurfactants. (Santos et al., 2016).

industries	Applications	Rôle des biosurfactants
Environnement	Bioremédiation ; Nettoyage des déversements D'hydrocarbures	Emulsification des huiles, abaissement de la tension interfaciale, dispersion des huiles, inhibition de la corrosion dans les huiles combustibles et les équipements,
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole; Désémulsification	Emulsification des huiles, abaissement de la tension interfaciale, solubilisation des huiles, réduction de la viscosité, inhibition de la corrosion dans les fuel-oils et les équipements.
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds ; Assainissement des sols; Flottation	Mouillage et moussage, collecteurs et mousses, enlèvement de métal ions de solutions aqueuses, sols et sédiments, métaux lourds séquestrant, étalement, inhibition de la corrosion dans les huiles.
Aliments	Émulsification désémulsification ; Ingrédient fonctionnel	Solubilisation des huiles aromatisées, contrôle de la consistance, émulsification, agent mouillant, étalement, détergence, moussage, épaississant
Médicament	Microbiologie Pharmaceutique thérapeutique	Agents antiadhésifs, antifongiques, vaccins antibactériens, antiviraux, thérapie génique, molécules immun modulatrices.
Agriculture	Bio contrôle; Les engrais	suspension de pesticides en poudre et engrais, émulsification de solutions de pesticides, élimination des agents pathogènes des plantes et augmentation de la biodisponibilité des nutriments pour des microbes bénéfiques associés aux plantes.
Produits de beauté	Produits de santé et de beauté	Emulsification, agents moussants, solubilisation, agents mouillants, agents nettoyants, agents antimicrobiens, médiateurs de l'action enzymatique
Nettoyage	Détergents à lessive	Détergents et désinfectants pour la lessive, le mouillage, la diffusion, inhibition de la corrosion.
Textiles	Préparation des fibres ; Teinture impression; Finition des textiles	Mouillage, pénétration, solubilisation, Emulsification, détergence et dispersion, mouillage et Emulsification en finition formulations

Chapitre III

Matériel et méthode.

III. Matériels et méthodes

III.1 But de l'étude

La présente étude est réalisée au niveau du laboratoire de la Direction Centrale Recherche et Développement-SONATRACH de Boumerdès et laboratoire de la microbiologie au niveau de la faculté de biologie université d'Akli Mohand Oulhadj de Bouira, elle vise à utiliser les résidus agroalimentaires riches en nutriments comme milieu de culture pour la production des biosurfactants par des bactéries hydrocarbonoclastes, l'exemple de *Bacillus sp.*

Dans cette étude, un milieu synthétique a été utilisé comme milieu de référence en comparant avec des milieux issus de déchets agro-alimentaires moins coûteux dans le but d'augmenter la production de ces biomolécules et d'améliorer leur efficacité. Les biosurfactants produits dans les différents milieux seront utilisés pour récupérer les hydrocarbures piégés dans les boues des bacs de stockage de pétrole brut. Ces boues représentent un véritable enjeu environnemental au sein de la société car elles occupent un grand espace de stockage et sont également très concentrées en hydrocarbures.

III.2 Matériels :

III.2.1 Matériel biologique :

Pour la réalisation de notre travail nous avons utilisé la souche bactérienne *Bacillus sp* isolée et identifiée par l'équipe de la DC RD-SONATRACH Boumerdès dans le cadre d'un projet de recherche visant à valoriser les boues huileuses par les Biosurfactants.

III.2.2 Matériel non biologique :

La liste des appareillages, verreries, les équipements et les milieux de culture utilisée dans notre travail est présentée dans (**Annexe I**).

III.3. Méthodes

III.3.1 Revivification de la souche :

La revivification de la souche bactérienne a été réalisée dans des tubes à essai contenant le bouillon nutritif BN, leur préparation est présentée dans (**Annexe II**), à l'aide d'une anse stérile en prélevant quelques colonies et nous les inoculons dans les tubes qui contiennent 5ml de BN préalablement autoclavés à 121°C pendant 20 min, les tubes sont agités à l'aide d'un vortex. L'incubation s'est faite dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

III.3.2. Conservation sur gélose inclinée

C'est une méthode utilisée dans les laboratoires pour conserver les cultures des espèces microbiennes isolées c'est à dire gardé constant les propriétés morphologiques, métaboliques, génétiques et physiologiques, cette technique de conservation est effectuée par le repiquage périodique à l'aide d'une anse de platine en prélevant quelques colonies et on les ensemencer sur la gélose nutritive inclinée. Les tubes sont placés dans l'incubateur à 37°C pendant 24h puis sont placés en réfrigérateur de type (ENIAM) à 4°C.

Cette conservation dure 4 à 6 semaines pour la continuation de l'étude (**Martinneau, 1996**)

III.3.3. Vérification de la pureté de la souche

III. 3.3.1. Aspect macroscopique

C'est la première étape qui oriente à la vérification des bactéries, elle consiste sur la description des colonies obtenues sur le milieu solide, l'identification macroscopique base sur la détermination des caractères morphologique des colonies, l'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identification décrit par thomas et *al*, 1970 sont comme suite :

- La forme de colonie : circulaire, ondulée, filamenteuse.
- La taille de colonie : moins de 1mm de diamètre ou punctiforme, supérieur de 1mm ou non punctiforme.
- La chromogénès ou la couleur de pigment.
- Opacité : transparent, translucide ou opaque.
- L'élévation : colonies plate, convexe ou concave.
- Aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuses, brillante ou émoussée.
- La consistance : visqueuse ou non.
- Aspect de contour : régulier ou non (denté, étoilé).

Odeur : présence ou absence.

III. 3.3.2 Etude microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes pour connaître leur mode d'association, leur forme et mobilité.

1. Coloration de Gram

C'est une double coloration et la coloration de base en bactériologie, nous permet de distinguer la forme, l'association ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, c'est une coloration qui permet de classer les bactéries selon leur capacité de fixer le cristal violet ou le violet de Gentiane sur les composants cytoplasmiques, après la fixation de violet de gentiane toutes les bactéries sont violettes.

Selon le passage de l'alcool dans les cellules bactériennes en distingue deux catégories des bactéries : celles qui possèdent une mince ou fine couche de peptidoglycane sont décolorées suite d'un lavage avec l'alcool donc sont des Gram négatif, alors que les cellules bactériennes qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant donc sont des Gram positif (Marchal et Bourdon, 1982).

❖ Préparation du frottis :

On dépose au centre d'une lame 2 à 3 gouttes d'une suspension bactérienne préparée préalablement, puis on les étale à l'aide d'une pipette pasteur stérile de façon à réaliser un étalement mince et homogène, puis en fait passer la lame sur la flamme bleue de bec Bunsen pour la sécher c'est la fixation par la chaleur.

❖ Etapes :

- **Coloration par le violet de gentiane :**

Ajouter quelques gouttes de violet de gentiane au frottis fixé, laissez agir 01 minute.

- **Mordantage par lugol :**

Recouvrir le frottis avec le lugol, laissez agir 01 minute, puis en élimine l'excès de lugol et rincer la lame à l'eau distillée.

- **Décoloration par l'alcool :**

Recouvrir tout le frottis par l'alcool et laisser agir 10 seconde, puis rincer le frottis avec l'eau distillée.

- **Recoloration avec la fuchine :**
- Ajouter quelques gouttes de la fuchine au frottis, laissez agir 10 seconde, rincer la lame avec l'eau distillée, sécher la lame entre deux feuilles de papier.
- **Observation microscopique :**
Examiner le frottis à l'objectif X1000 en versant une goutte d'huile à l'immersion et avec un éclairage important.

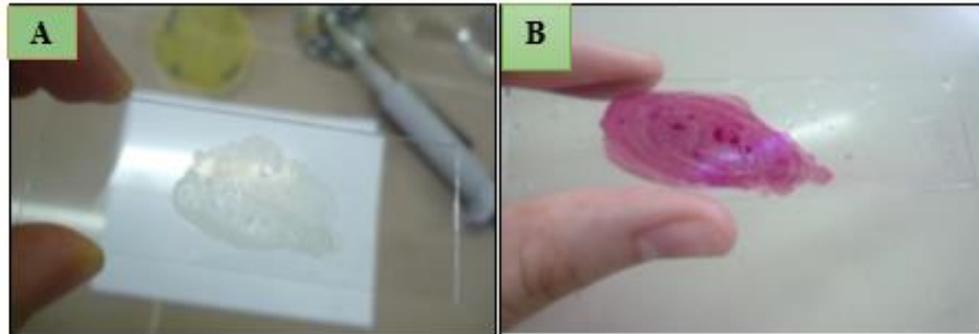


Figure 07 : coloration de Gram (A) : frottis /B : lame pour coloration de Gram.

III.3.4. La préparation des milieux de culture

L'évolution de la biotechnologie moderne donne lieu à l'utilisation des produits qui ont destiné à le rejeter dans l'environnement dans le but de diminution de la pollution et la gestion de ces déchets et le donnent une valeur dans la préparation de milieu de culture pour diminuer le coût de la production (Nikitha *et al.*, 2017).

Notre travail est inclut dans la valorisation de divers déchets agro-alimentaire utilisé comme milieu de culture pour la fermentation microbienne, dans cette étude la préparation des milieu de culture à base de déchets végétaux tels que les épluches de pommes de terre, le caroubier, le jus de pâte l'exemple de jus de riz, un biscuite inconsommable et un milieu synthétique à base de glucose utilisé comme milieu de référence, le but étant de sélectionner parmi ces milieux testé celui qui a un meilleur rendement de la production des biosurfactants.

La préparation de ces milieux a été réalisée comme suit :

III.3.4.1 préparation de milieu synthétique (MS)

Ce milieu synthétique est composé de 18g de glucose (utilisé comme source de carbone), 2,7g de l'urea (NH_2CONH_2), 0,06g NPK, 0,06g KCl, 0,42g MgSO_4 , 0,108g FeSO_4 et 0,96g de NH_4HPO_4 (Gunaseelan *et al.*, 2014).

Tous ces composants sont introduits dans un erlenmeyer de 2000 ml, rempli de 600 ml d'eau distillée puis une agitation sur une plaque chauffante-agitatrice magnétique de type (VELP scientifique, AM4) à 1000 rpm et à une température 50°C jusqu'à la solubilisation de toutes les composants.

- Ajuster le pH à 7.
- Le milieu est subdivisé et versé dans 03 erlenmeyer avec un volume de 200ml bouchonné avec le coton et l'aluminium.
- Les trois erlenmeyers sont mis dans un autoclave à 121°C avec une pression 1 bar pendant 20 minutes (**Annexe II**).

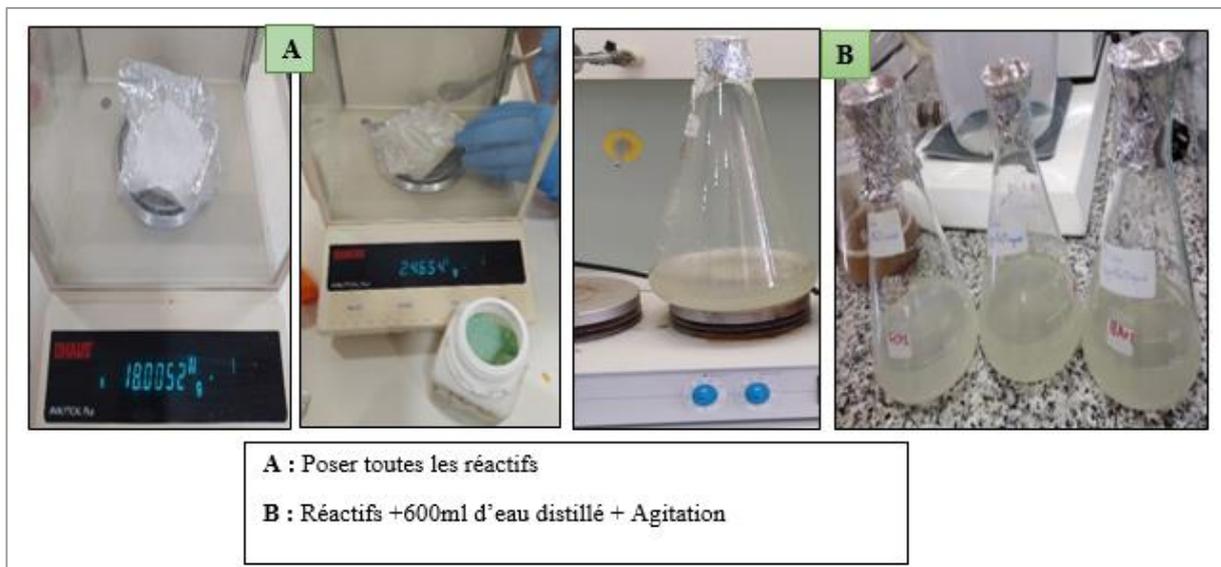


Figure 08 : préparations de milieu synthétique

III.3.4.2 Préparation de milieu à base des épluches de pomme de terre et coquilles d'œufs (ME)

Les épluches de la pomme de terre sont utilisés comme une source de carbone et les coquilles d'œuf représentent une source de calcium, de sels minéraux et de protéines nécessaires pour la croissance bactérienne (**Nys et Gautron, 2007**).

A l'aide d'une spatule et une balance de type (OHAOUS®), 18g des épluches de la pomme de terre, 6g de la poudre de coquilles d'œufs et 0,06g de NPK ont été versés dans une erlenmeyer de 2000ml ajuster avec 600ml d'eau distillé.

- Sur une plaque chauffante sous agitation magnétique (VELP scientifique, AM4) réglée à 1000 rpm et à une température de 50°C, les erlenmeyers ont été placés jusqu'à dissolution de tous les composants.
- Par filtration sous vide, le milieu a été filtré pour éliminer toutes les impuretés.
- Le pH a été mesuré.

Le milieu est subdivisé et versé dans 03 erlenmeyers avec un volume de 200ml bouchonné avec le coton et l'aluminium.

- Les trois erlenmeyers sont mis dans un autoclave à 121°C avec une pression 1 bar pendant 20 minutes (**Annexe II**).

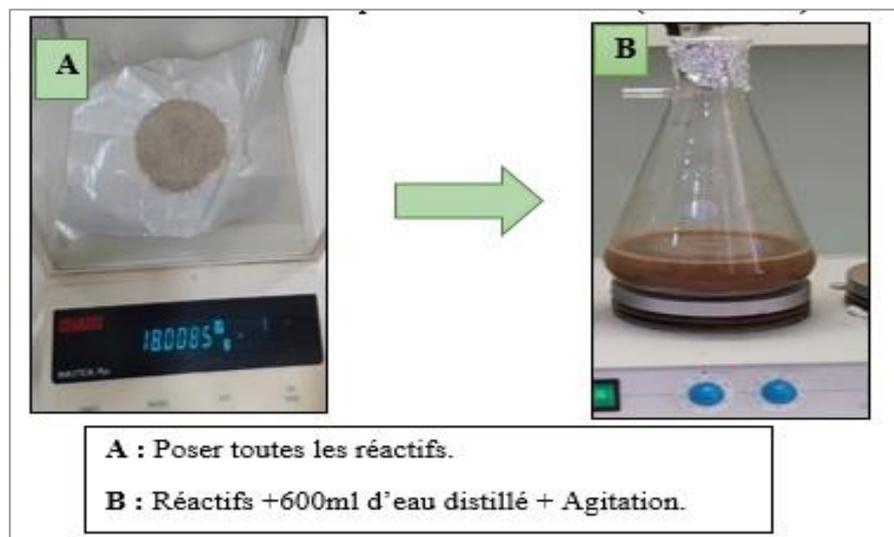


Figure 09 : préparations de milieu ME.

III.3.4.3 préparation de milieu à base de caroubier

Le caroubier ou l'étymologie scientifique *Ceratonia siliqua* du mot grec qui signifie petite corne, notre échantillon de caroubier est issu de la région de Lakhdaria la wilaya de Bouira (**Biner et al.,2007**),

- Après avoir un caroubier bien sécher on élimine les grains et on utilise seulement la gousse de caroubier couper en petits morceaux.
- Les petits morceaux de caroubier sont bien séchés à l'étuve à 60°C pendant 5heurs.
- Après le séchage et l'élimination totale de l'eau le caroubier va subir un broyage pour avoir une farine ou poudre de caroubier.

- La poudre de caroubier doit être très fine pour être bien soluble dans l'eau, le tamisage se fait à l'aide d'un tamis fin.

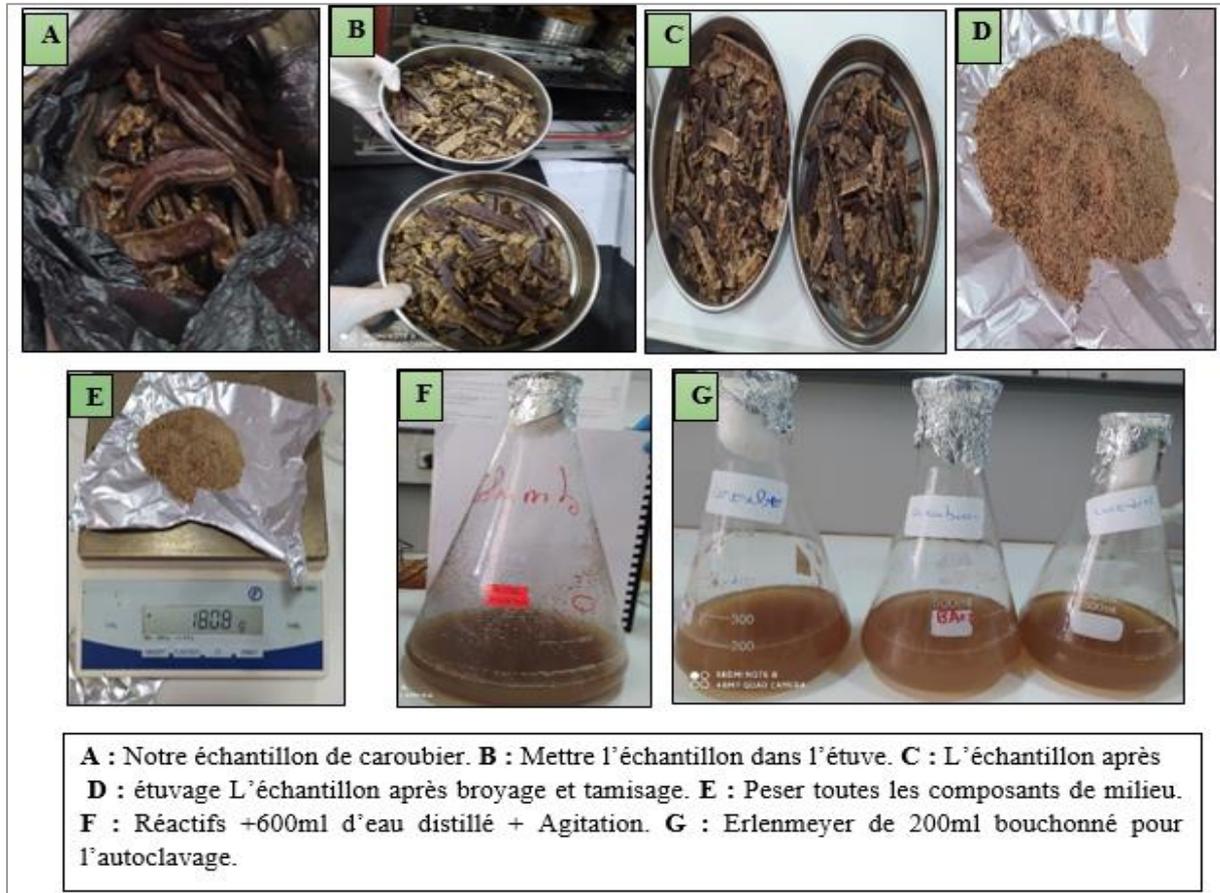


Figure 10 : Préparation de milieu à base de caroubier

La préparation de milieu se fait comme suite :

- A l'aide d'une spatule et une balance de type (OHAOUS®), 18g de caroubier en poudre, 6g de la poudre de coquilles d'œufs et 0,06g de NPK ont été mis dans un erlenmeyer de 2000 ml ajuster avec 600 ml d'eau distillé.
- Sur une plaque chauffante sous agitation magnétique (VELP scientifique, AM4) réglée à 1000 rpm et à une température de 50°C, les erlenmeyers ont été placés jusqu'à dissolution de tous les composants.

Par filtration sous vide, le milieu a été filtré pour éliminer toutes les impuretés.

- Le pH a été mesuré.
- Le milieu est subdivisé et versé dans 03 erlenmeyers avec un volume de 200ml bouchonné avec le coton et l'aluminium.
- Les trois erlenmeyers sont mis dans un autoclave à 121°C avec une pression 1 bar pendant 20 minutes (**Annexe II**).

III.3.4.4 préparation de milieu de culture à base de biscuite

Les échantillons de biscuites utilisés pour la préparation de notre milieu de culture sont des biscuites cassés lors de l'emballage, issus d'une usine de biscuite sous le nom BISTA qui est situé au niveau de Amar Khoja la wilaya de Bouira.

La préparation de milieu de culture se fait comme suite :

- L'élimination de la crème de biscuite.
- Découper en petits morceaux.
- Le séchage des biscuits dans l'étuve à 50°C pendant quelques heures.
- Le broyage des biscuits jusqu'à l'obtention d'une poudre qui doit être tamisée pour assurer leur solubilisation dans l'eau.
- A l'aide d'une spatule et une balance de type (OHAOUS®), 18g de la poudre de biscuite BISTA utilisé comme source de carbone, 6g de la poudre de coquilles d'œufs comme une source de calcium et protéine et 0,06g de NPK ont été versés dans un erlenmeyer de 2000 ml ajuster avec 600 ml d'eau distillé.
- Sur une plaque chauffante sous agitation magnétique (VELP scientifique, AM4) réglée à 1000 rpm et à une température de 50°C, les erlenmeyers ont été placés jusqu'à dissolution de tous les composants.
- Filtration sous vide de milieu.
- Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre de type (HANNA, HI8424).
- Le milieu est subdivisé dans 03 erlenmeyers avec un volume de 200 ml bouchonné avec le coton et l'aluminium.

Les trois erlenmeyers sont mis dans un autoclave à 121°C avec une pression 1 bar pendant 20 minutes (**Annexe II**).

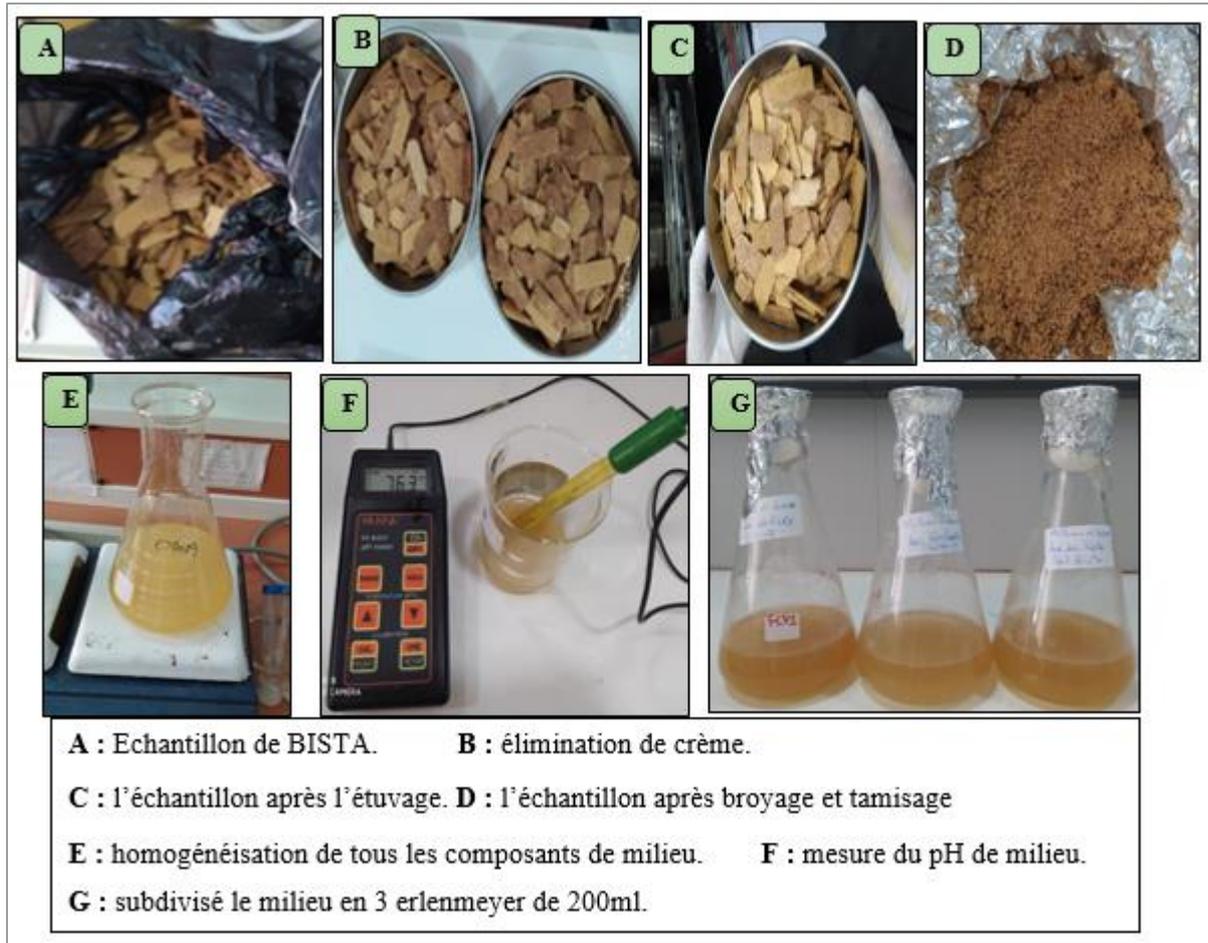


Figure 11 : les étapes de préparation de milieu à base de biscuite BISTA.

III.3.4.5 Préparation de milieu de culture à base de jus de pâte

Pour la valorisation de jus de pâte issue du restaurant, on a choisi le jus de riz pour la préparation d'un milieu de culture pour la fermentation de notre souche productive de biosurfactants.

La préparation de milieu se fait comme suite :

- A l'aide d'une spatule et une balance de type (OHAOUS®), 18g de riz utilisé comme source de carbone, 6g de la poudre de coquilles d'œufs comme une source de calcium et protéine et 0,06g de NPK ont été versés dans un erlenmeyer de 2000ml ajuster avec 600ml d'eau distillé.
- Sur une plaque chauffante sous agitation magnétique (VELP scientifique, AM4) réglée à 1000 rpm et à une température de 50°C, les erlenmeyers ont été placés jusqu'à dissolution de tous les composants.
- La filtration de notre milieu de culture par filtration sous vide.
- Le pH a été mesuré à l'aide d'un pH mètre de type (HANNA, HI8424).

- Le milieu est subdivisé et versé dans 03 erlenmeyers avec un volume de 200ml bouchonné avec le coton et l'aluminium.
- Mettre les trois erlenmeyers dans l'autoclave 20min à 121°C.
- A la sortie de l'autoclave tous les erlenmeyers contenant les différents milieux seront conservés au réfrigérateur jusqu'à leurs utilisations. (**Annexe II**).

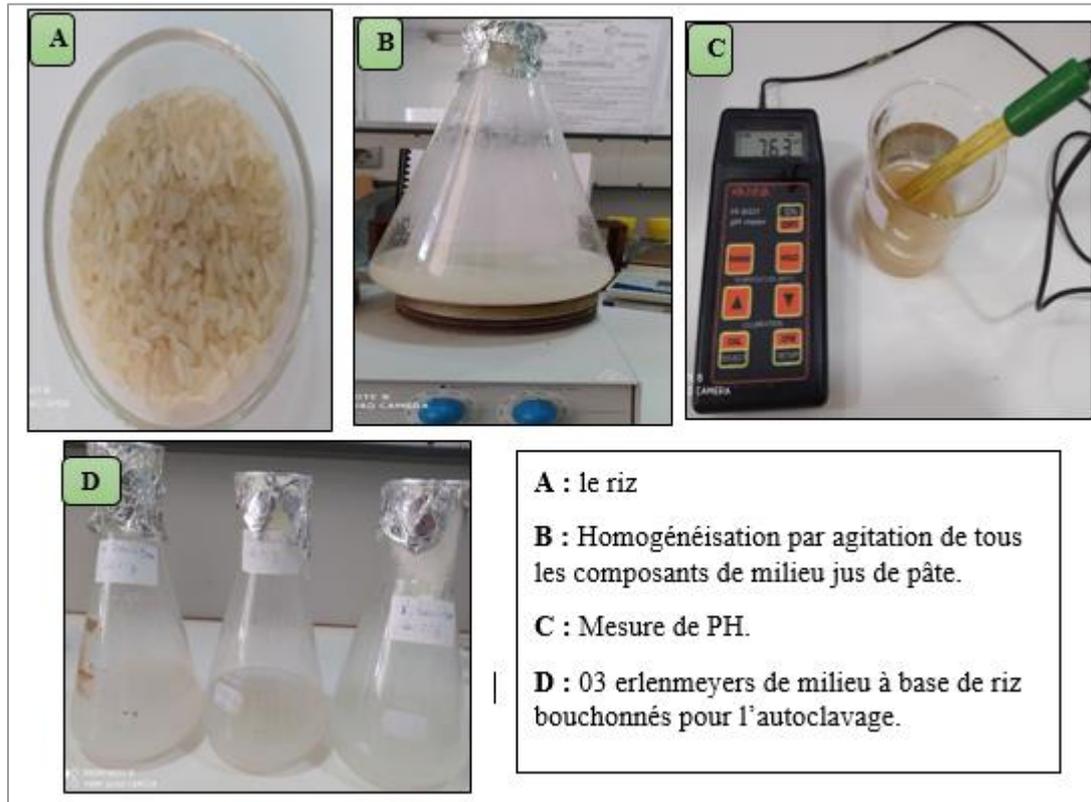


Figure 12 : Les étapes de la préparation de milieu de jus de riz.

III.3.5. Analyse biochimique des milieux préparés

III.3.5.1 Dosage de protéines totales (Bradford, 1976)

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance se fait par la mesure de densité optique à longueur d'onde $\lambda = 595\text{nm}$, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie après formation des liaisons de complexation entre les acides aminés aromatiques (Tryptophane, Tyrosine et le Phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines (**Mint El Moukhtar, 2010**).

Le dosage des protéines pour les différents milieux de culture à base de déchets a été effectué par la méthode de Bradford donné par **Mint El Moukhtar** en 2010 (**Annexe III**).

III.3.5.2 Dosage des sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (dinitrosalicylique) qui est de principe un dosage colorimétrique du glucose. Cette technique se base sur l'utilisation des propriétés réductrice du glucose à chaud et au milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNS (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur. (Annexe IV). (Boulal *et al.*, 2013).

Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum consiste à la réalisation d'une culture de notre souche dans différentes milieux de cultures.

Après l'incubation des tubes de BNensemencés précédemment par notre souche *Bacillus sp* productif de biosurfactants, chaque deux tubes de 5ml sont ensemencés (10ml de culture jeunes de 24h sur BN) dans une erlenmeyer contient 200ml de milieu de culture quel que soit le milieu synthétique, et les milieux à base de déchets agro-alimentaire (ME, BISTA, caroubier, jus de riz).

Les erlenmeyers inoculés par notre souche bactérienne sont incubés dans un incubateur agitateur de type (Nymen®) à 37°C pendant 24h.

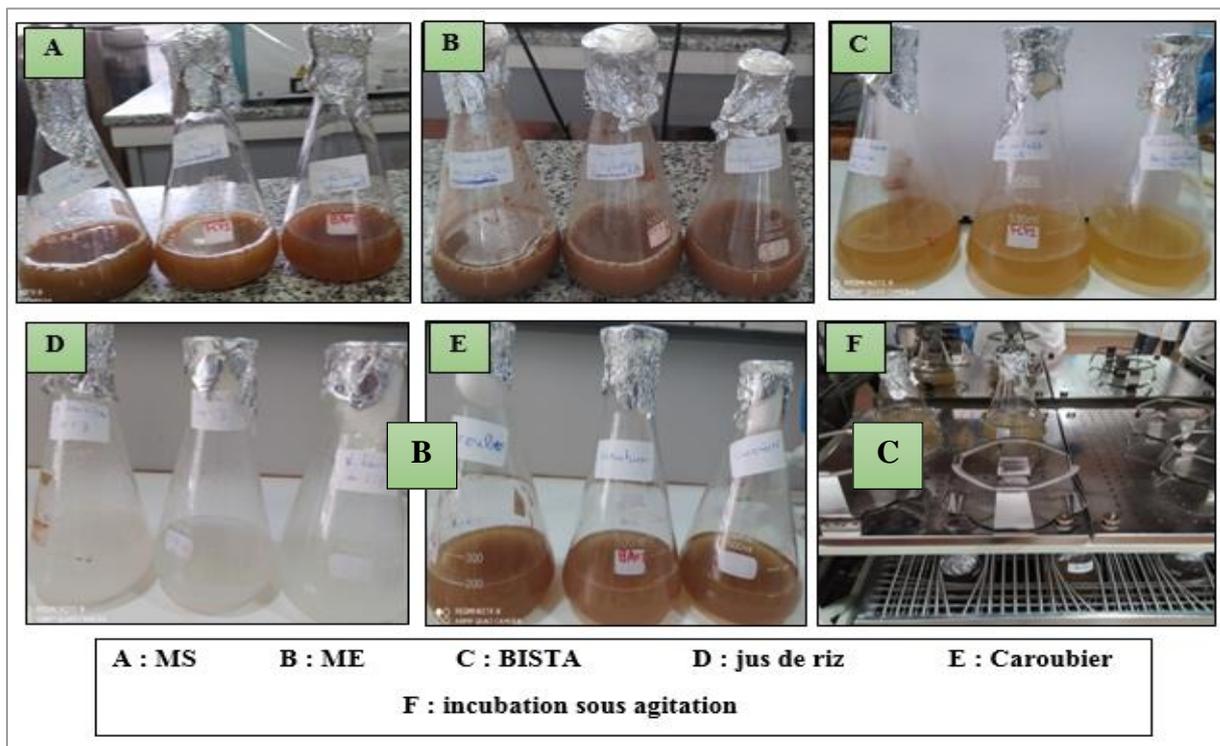


Figure 13 : Aspect des milieux de cultures avant la fermentation.

III.3.6 Le suivi de la croissance bactérienne (Dénombrement)

La croissance microbienne est définie comme une augmentation des constituants cellulaires, elle conduit à une augmentation du nombre de cellules quand le micro-organisme se multiplie. Le dénombrement microbien ou la numération consiste à déterminer la concentration en bactéries dans une culture, dans notre travail on a suivi la croissance bactérienne de différents milieux testés pendant trois jours (**Balba *et al*, 1998**).

III.7. Evaluation de la production de biosurfactant

Pour vérifier la production des biosurfactants par notre souche lors de la fermentation des cultures de déférente milieu dans les erlenmeyers, nous avons réalisés des tests qui détectent la présence de biosurfactants dans notre culture bactérienne en utilise le surnagent de chaque milieu résultant de la première centrifugation les tests sont comme suite :

III.7.1 Test d'émulsification (E24)

Ce test a été mis au point par **Broderick** et **Cooney**, puis il est modifié par **Francy *et al*** (1991) et **Bodour *et al*** (2004), c'est un test qui permet de vérifier la capacité de la souche à émulsionner une phase hydrophobe (Pétrole) dans une phase hydrophile (notre milieu de culture).

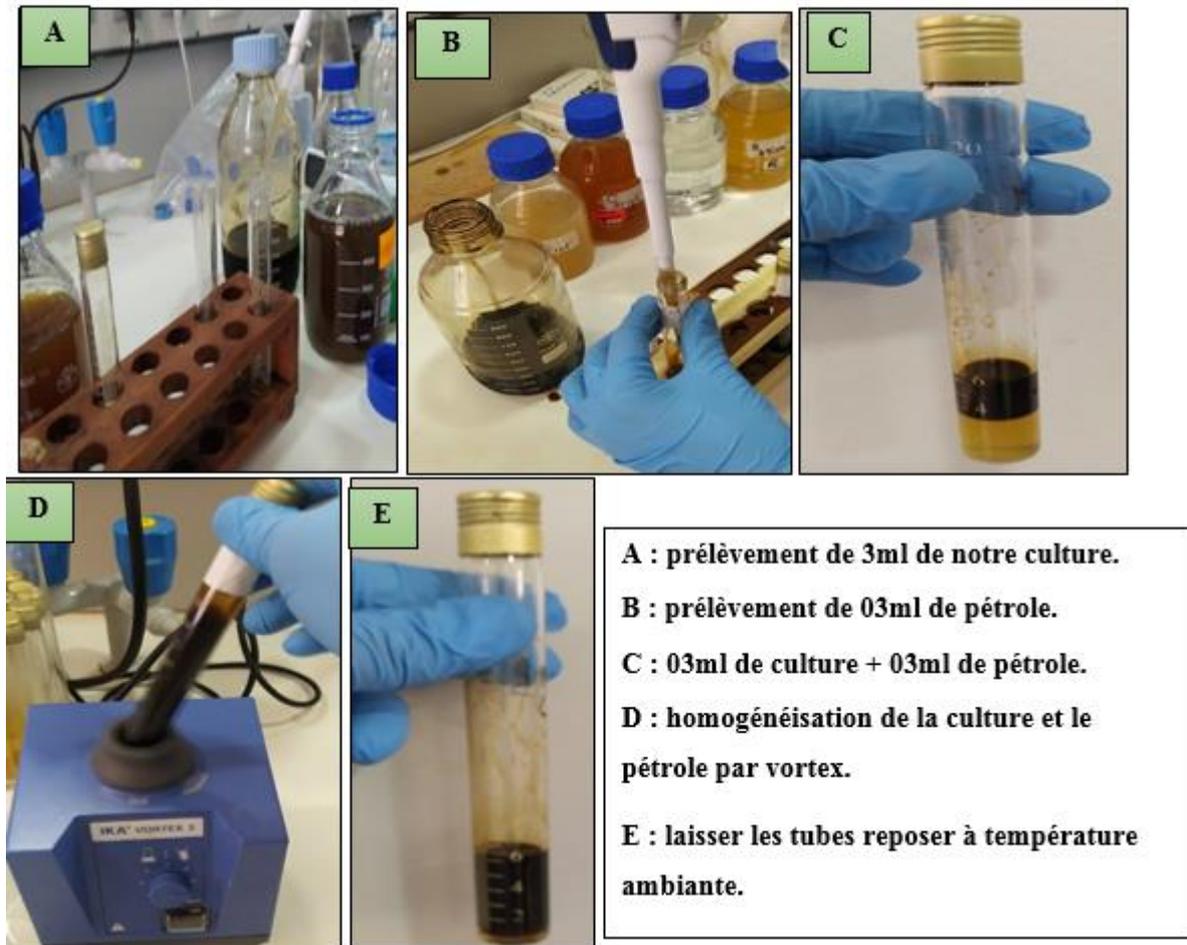


Figure 14 : protocole de la réalisation de test d'index de l'émulsification.

❖ Calcul de l'index de l'émulsification :

C'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée pour chaque milieu sur la hauteur totale de mélange multiplié par 100

He : hauteur de l'émulsion.

Ht : hauteur totale du mélange.

$$E24 = He/Ht$$

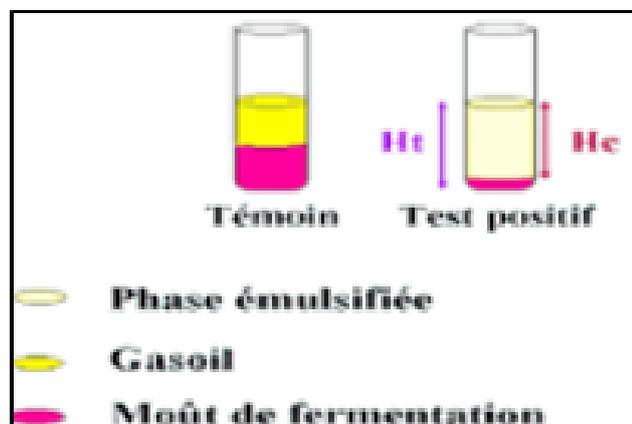


Figure 15 : Lecture de test E24

III.7.2 Test de déplacement dans l'huile (DDH)

Oil Spreading Assay ou le déplacement dans l'huile, c'est un test quantitatif permet de détecter le taux de production des biosurfactants. Dans ce test 10 μ l de pétrole est ajoutée à la surface de 10 μ l d'eau distillée dans une boîte en verre de diamètre de 5 cm pour former une mince couche d'huile (**Liu et al,2013**).

Ensuite 2 μ l de surnagent sont placés doucement au milieu de la couche d'huile, si le biosurfactant est présent dans le surnagent, l'huile est déplacée, et un halo clair et visible est formé (**Morikawa et al, 1993**). Le diamètre de la zone du halo claire est mesuré pour chaque milieu testé.

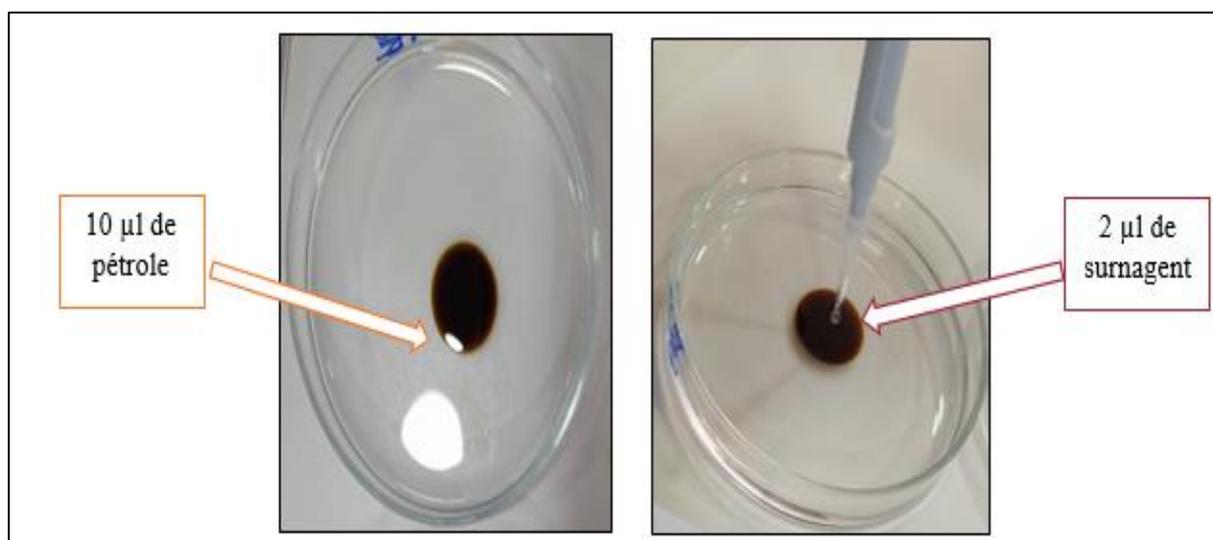


Figure 16 : les étapes de la réalisation du test DDH.

III.7.3 Test de récupération des huiles à partir de la boue

C'est un test qui permet de quantifier l'activité de biosurfactant produit par notre souche dans différentes milieu de fermentation pour but extrait l'huile piégée dans les boues issues des bacs de stockage (**Bezza et al,2015**).

La méthode employée est comme suite :

- Dans un tube conique et à l'aide d'une spatule on prélève 5g de la boue huileuse.
- En ajoute 40 ml du surnagent de chaque milieu dans les tubes coniques.
- A l'aide d'un vortex en fait une agitation de 5 minutes des tubes jusqu'à l'homogénéisation de la boue avec les surnagent et laisser les tubes en repos 24h.
- On récupère le mélange des huiles formés (surnagent et boue) dans une ampoule à décanter par le rajout de 5ml de Dichlorométhane (DCM).

- Laisser l'ampoule en repos jusqu'à la précipitation de deux phase, une phase organique en bas contient le solvant + les huiles et une phase aqueuse contient le surnagent et l'eau.
 - Récupérer la phase organique de chaque milieu dans de béchers dont leur poids vide est connu, et laisser les béchers à l'aire libre pour l'évaporation du solvant DCM.
 - Calculer le taux de récupération des huiles de chaque biosurfactants. Récupérer la phase organique de chaque milieu dans de béchers dont leur poids vide est connu.
- Laisser les béchers à l'aire libre pour l'évaporation de solvant DCM.
- Calculer le taux de récupération des huiles de chaque biosurfactants.

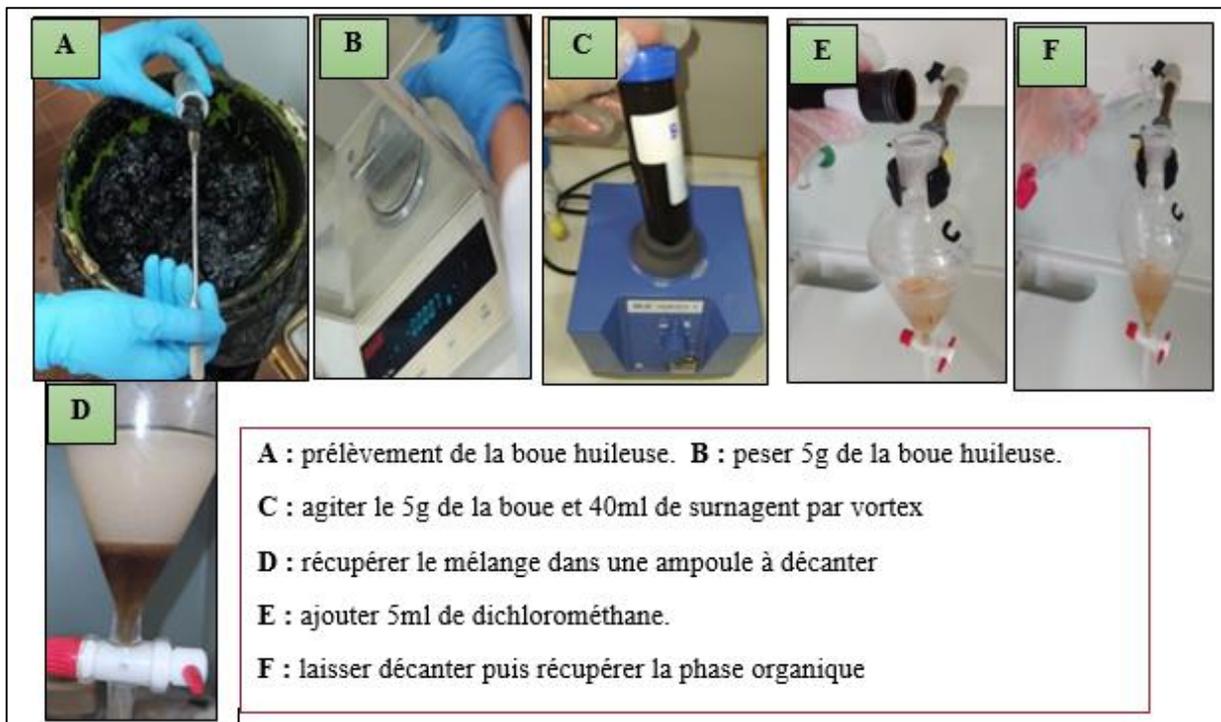


Figure 17 : les étapes de test de récupération des huiles.

III.8 L'extraction des biosurfactants

Après la préparation des milieux de culture liquide à base de source de Carbone et sels minéraux, on applique le processus de la fermentation du type batch (**Lee et al., 2018**).

Après l'incubation sous agitation et la fermentation bactérienne dans les différents milieux testés, les mouts de la fermentation obtenue après trois jours, sont récupérés pour l'extraction des biosurfactants, chaque milieu avec trois erlenmeyers de volume 200 ml sont repartie dans des tubes coniques stériles pour la centrifugation, placer en équilibre pour être centrifugés à 4000 rpm pendant 10 à 15 min à une température de -04°C, une fois la durée de

centrifugation est terminée le contenu des tubes est réparties en deux phases : le culot et le surnageant(Liu et al,2013).

Le culot est jeté alors que le surnageant est récupéré dans un flacon et acidifié leur pH à 2 par une solution d'HCl à 6N (**Annexe VII**) une deuxième centrifugation de surnageant pour la précipitation des biosurfactants dans le culot alors que le surnageant est éliminé(figure 19).

La technique d'extraction employée est la technique de **Horowitz et Griffen**, (1991) :

- Après la récupération de toutes les culots par la deuxième centrifugation, un mélange du solvant chloroforme / méthanol est préparé avec un volume (2,1) 50ml / 25ml.
- Un volume de 5ml de mélange chloroforme-méthanol est ajouté au tube conique de chaque culot de différents milieux.
- Le mixte de toutes les tubes est soumis à une agitation de 3 min par un vortex jusqu'à l'homogénéisation suivie par une centrifugation pour assurer une meilleure homogénéisation, et laissez les tubes en repos quelques minutes.
- Apparition de trois phases sont comme suite par ordre de croissant : chloroforme – biosurfactants – méthanol.
- Les trois phases sont séparées dans des béchers avec leur poids vide est connue.

Laissez les béchers en air libre, le mélange de notre solvant va évaporer à l'air libre puis en peser le poids des béchers et déduire le rendement des biosurfactants produits par chaque milieu tester (Liu et al,2013) (Bezza et al,2015).

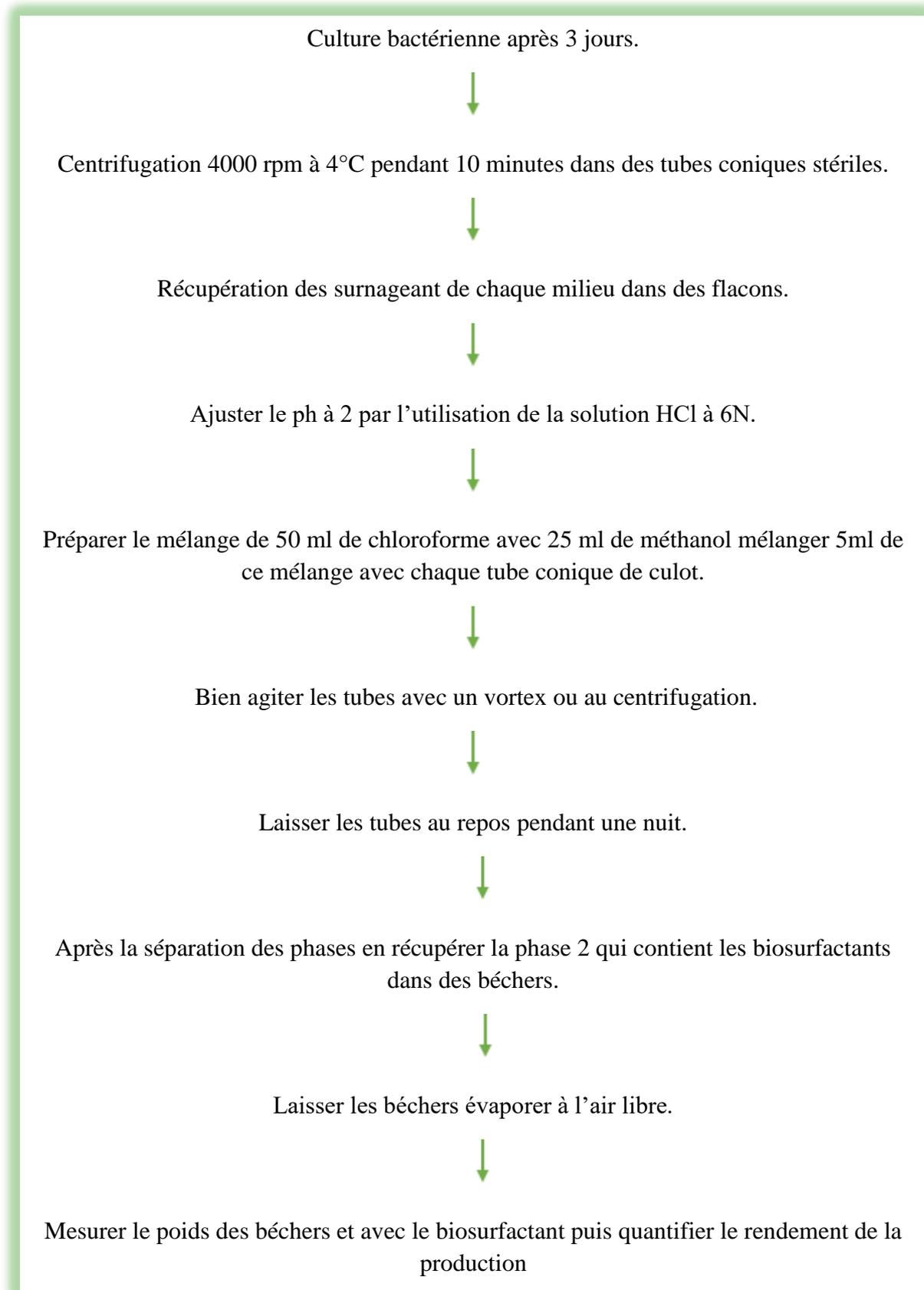


Figure 18 : protocole d'extraction des biosurfactants par solvant organique.

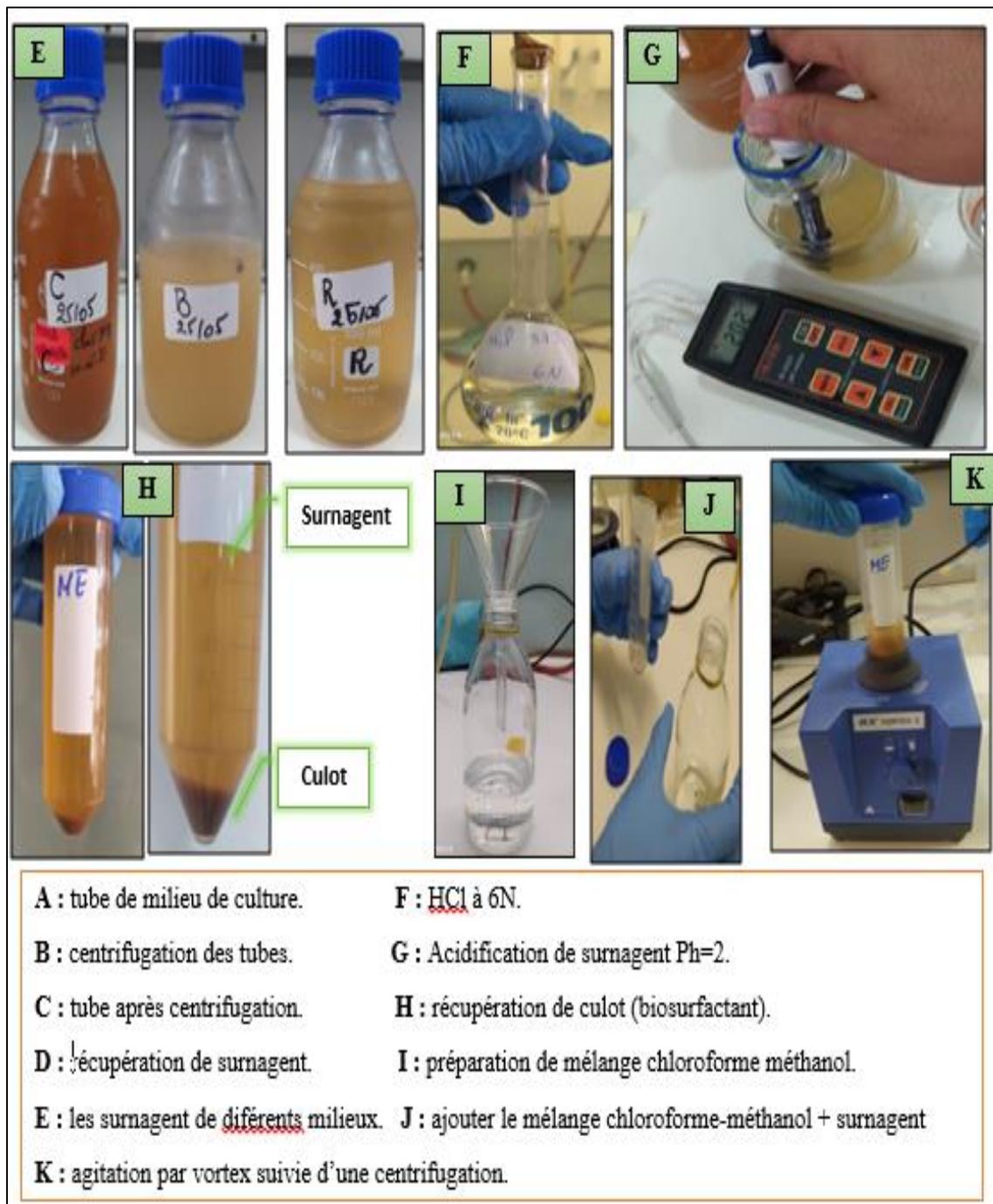


Figure 19 : les étapes d'extraction des biosurfactants.

Chapitre IV
Résultats et discussions.

IV. Résultats de l'étude microbiologique

IV.1 Les caractères macroscopiques de la souche

L'observation macroscopique à l'œil nu de l'aspect de colonie de *Bacillus sp* sur le milieu GN permet de déduire les caractères et l'aspect des colonies qui sont mentionnés dans le tableau ci-dessus.



Figure 20 : l'aspect macroscopique des colonies de *Bacillus sp* sur le milieu GN.

Le tableau ci-dessus résume les résultats de l'aspects macroscopiques de notre souche bactérienne *Bacillus sp*.

Tableau IV : les caractères macroscopiques de *Bacillus sp*.

Les caractères	L'observation
Forme et taille des colonies	Grandes colonies
Chromogènes et opacité des colonies	Blanches, opaques
Aspect de la surface et du contour des colonies	Colonies avec un contour irrégulier

IV.2 L'étude des caractères microscopique

IV.2.1 Coloration de Gram

Après l'observation de la lame de coloration de Gram au microscope photonique nous a permis de distinguer le type, la forme et l'arrangement des cellules.

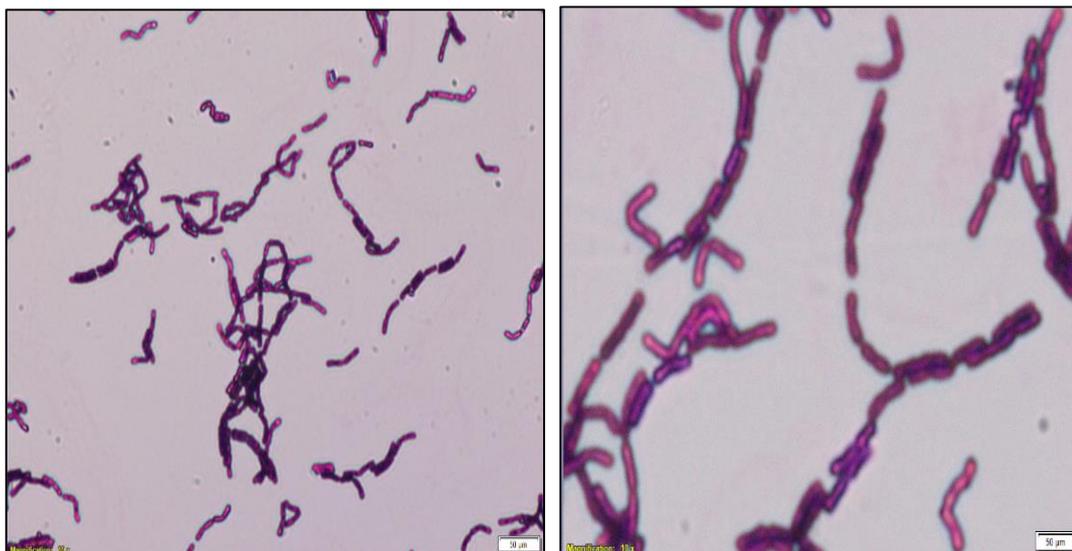


Figure 21 : résultats de la coloration de Gram.

D'après les résultats microscopiques obtenus, nous pouvons dire que notre souche est avec des cellules à Gram+, bacilles en chaîne, présentant des spores sub-terminales.

IV.3 Résultats de dosage des milieux utilisés

IV.3.1 dosage des protéines totaux

Tableau V : résultats de dosage des protéines totaux.

Milieu	ME	Caroubier	Bista	Jus de riz
[protéines]	2,9942±0,988	1,16045±0,067	5,2531±3,469	1,5186±0,785

IV.3.2 dosage des sucres réducteurs

Tableau VI : Résultats de dosage des sucres réducteurs.

Milieu	ME	Caroubier	Bista	Jus de riz
[sucres]	0,5744±0,12	0,4530±0,18	0,8009±0,35	0,4045±0,14

- Aspect des milieux de cultures après la fermentation :

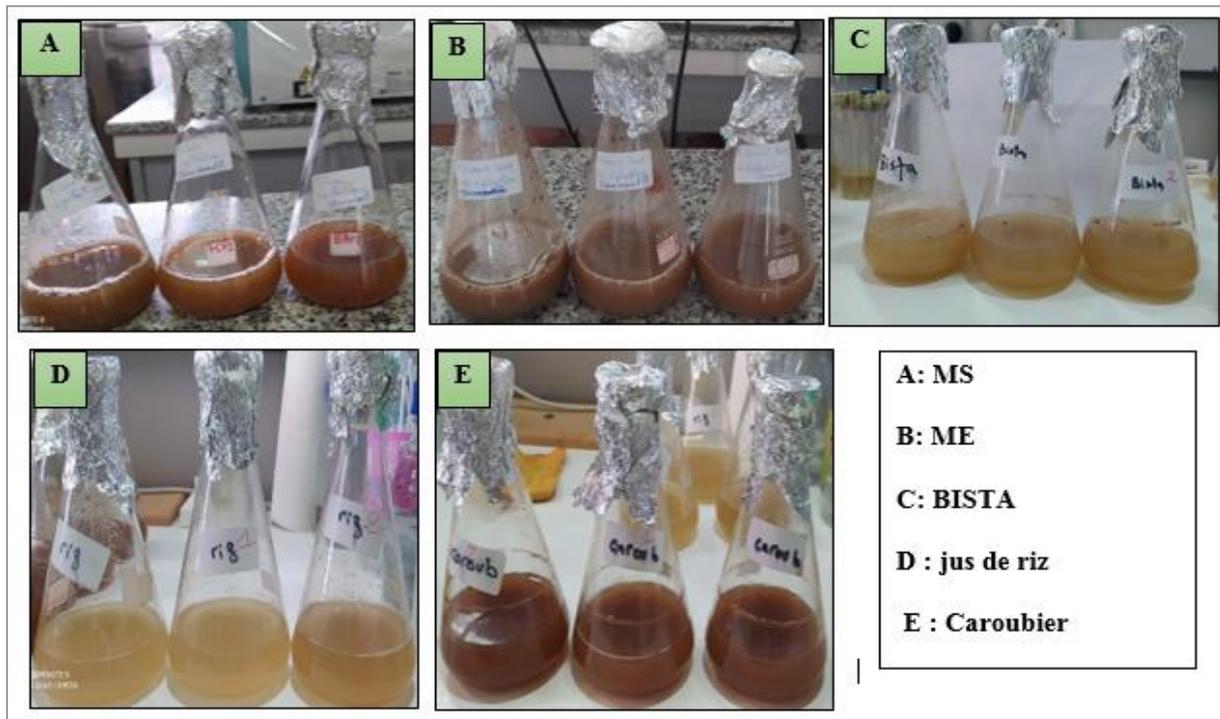


Figure 22 : Aspect des milieux de cultures après la fermentation.

IV.4 Résultats de dénombrement bactériennes

Les résultats de la suivie de la croissance bactérienne pendant 03 jours de toutes les milieux testés sont mentionnés dans le graphe suivant :

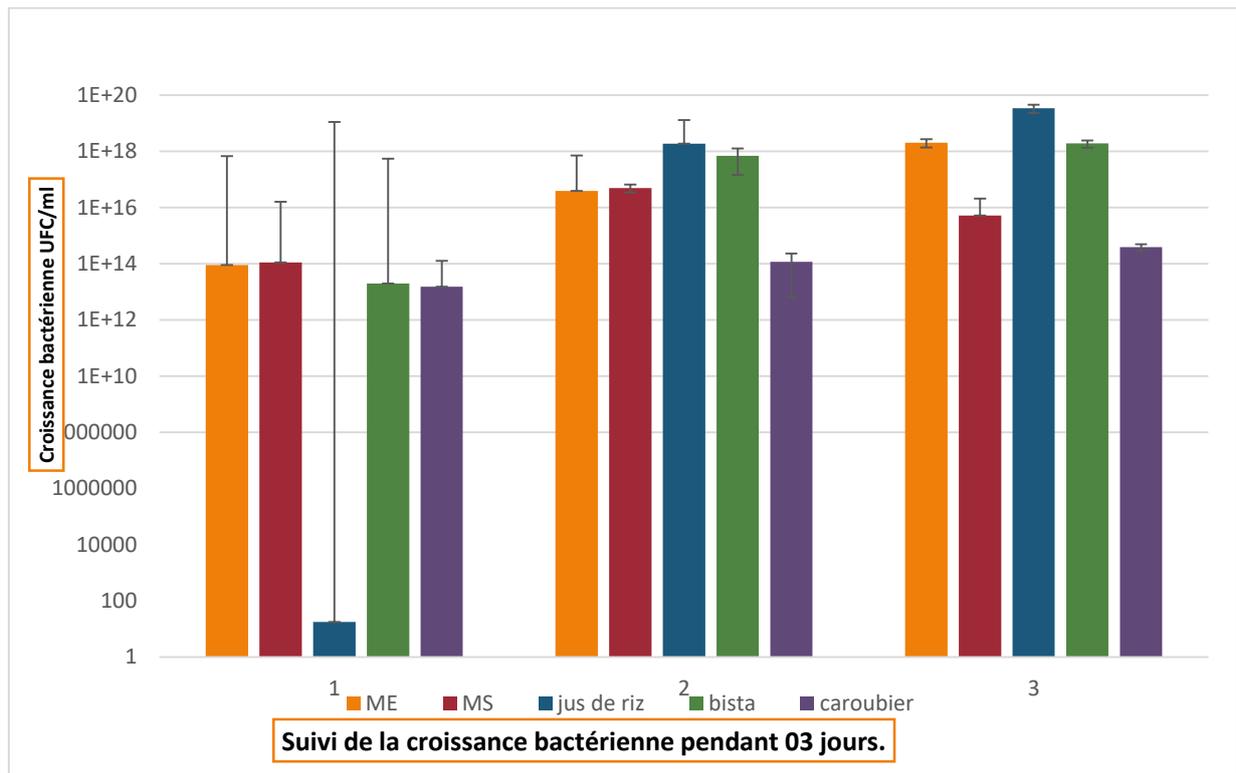


Figure23 : suivie de la croissance bactérienne pendant 03 jours.

Le choix de la source de carbone additionnée dans le milieu de fermentation n'est pas aléatoire, il se base sur plusieurs lectures car le type de la source de carbone influence sur la production des biosurfactants (Gabet, 2004).

D'après les résultats de la suivie de croissance bactérienne pendant trois jours de *Bacillus sp* utilisé dans notre travaille comme souche productrice des biosurfactants dans des différents milieux testés et un milieu synthétique comme milieu de référence montrent que :

Dans le milieu synthétique de référence où le glucose est la seule source de carbone la croissance bactérienne dans le premier jour était à $1,12 \times 10^{14}$ UFC/ml suivie par une augmentation de la biomasse bactérienne dans le deuxième jour avec une concentration de $4,99 \times 10^{16}$ UFC/ml. Au bout de troisième jour, une simple diminution de la biomasse a été remarquée avec une concentration de $5,27 \times 10^{15}$ UFC/ml ce qui indique la fin de la phase exponentielle de la croissance et le début de la phase stationnaire.

Dans le milieu ME, une phase de croissance rapide et continue avec une concentration bactérienne de $8,90 \times 10^{13}$ UFC/ml dans le premier jour qui est inférieur à celle de milieu de référence qui indique l'adaptation de la souche à la dégradation de l'amidon présent dans les épiluches de la pomme de terre comme source de carbone, suivi d'une augmentation de la

biomasse dans le deuxième et le troisième jour avec une concentration bactérienne de $3,90 \times 10^{16}$ UFC/ml et $2,04 \times 10^{16}$ UFC/ml. Le genre *Bacillus* a la capacité de produire des enzymes hydrolysant l'amidon, en particulier des amylases qui sont largement utilisées dans les processus industriels de biotransformation de l'amidon en raison de leur thermostabilité (Gupta *et al.*, 2003). Certaines espèces possèdent un statut GRAS (Generally Recognized as Safe). Ils possèdent de bons systèmes d'exportation de protéines et peuvent produire certaines enzymes extracellulaires (type amylases, xylanases ou protéases, par exemple) à des concentrations de l'ordre de 20 à 25 g/L (Schallmeyer *et al.*, 2004). Ces performances placent ces microorganismes parmi les plus importants producteurs d'enzymes industrielles.

Dans le milieu à base de caroubier, l'évolution de la biomasse est caractérisée par une phase exponentielle continue dont la concentration bactérienne en premier jour est de $1,53 \times 10^{13}$ UFC/ml suivie par $1,17 \times 10^{14}$ UFC/ml dans le deuxième jour et de $3,88 \times 10^{16}$ UFC/ml dans le troisième jour, ces concentrations obtenues sont pour la plupart inférieures à celles du milieu MS. La caroube est riche en hydrates de carbone (saccharose, fructose et glucose), ainsi qu'en fibres alimentaires, tanins et polyphénols ; elle contient également une faible quantité de protéines et de lipides. La composition chimique précise varie selon la période de récolte, l'origine du cultivar et les facteurs environnementaux (Bengoechea *et al.*, 2008).

Dans le milieu à base de jus de riz on observe une faible concentration de la biomasse bactérienne dans le premier jour avec une valeur de 17,67UFC/ml suivie d'une $1,85 \times 10^{18}$ UFC/ml dans le deuxième jour et de $3,46 \times 10^{19}$ UFC/ml dans le troisième jour ce qui permet de comprendre que la souche *Bacillus sp* s'est adaptée dans ce milieu de jus de riz et elle a utilisé ces hydrocarbonates comme seul source de carbone, par la production des enzymes extracellulaire qui permet de digérer l'amidon complexe de riz en sucres plus simples pour être utilisés par la souche pour leur croissance.

Dans le milieu à base de biscuite Bista on observe une augmentation de la croissance bactérienne dans le premier jour avec une concentration de $1,53 \times 10^{13}$ UFC/ml, suivie d'une concentration de $7,01 \times 10^{17}$ UFC/ml dans le deuxième jour et de $1,90 \times 10^{18}$ UFC/ml.

A partir des résultats de dénombrement, nous avons constaté que la croissance de la souche bactérienne est rapide dans les milieux ME, MS, Bista et le caroubier tandis qu'elle est faible seulement aux premiers jours de fermentation dans le milieu à base de jus de riz, à partir de deuxième jour nous remarquons une augmentation de leur taux de croissance, ceci est peut-

être expliqué par une phase d'adaptation et de production du bagage enzymatique adéquat à cette source de carbone

IV.5 Résultats de l'évaluation de la production des biosurfactants

IV.5.1 Les résultats de E24 de différentes milieu

Tableau VII : résultats de l'indice d'émulsification.

Milieux	Hauteur totale De tubes	Emulsification 1 ^{er} jours	Emulsification 24 h
ME	3 cm	E24=51.66%	E24=30%
MS	3 cm	E24=35%	E24=23.33%
BISTA	3 cm	E 24 = 25%	E24=18.33%
Caroubier	3 cm	E24=70%	E24=56.66%
Jus de riz	3 cm	E24=25%	E24 =28.33%

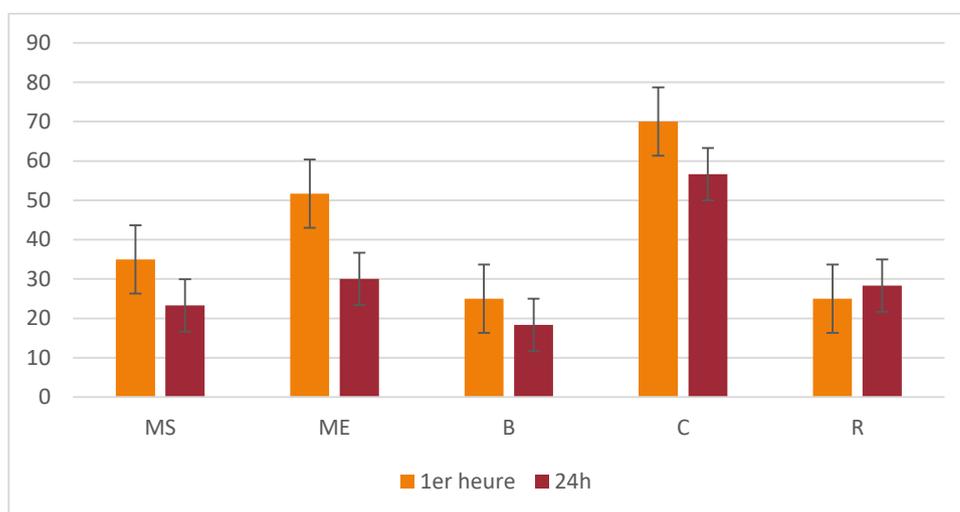


Figure 24 : le pourcentage de teste E24 pour chaque milieu.

D'après les résultats des tests de l'indice d'émulsification, les meilleurs résultats d'émulsification ont été obtenus dans le milieu à base de caroubier avec une valeur de 70 % dans la première heure suivie par une valeur de **56,66 %** après 24h, le milieu ME présente une valeur de **51,66%** dans la première heure suivie par une valeur de **30%** après 24 heure, l'émulsification dans le milieu MS était de **35%** dans la première heure suivie par **23,33%**

après 24h, le milieu à base de Bista présente un pourcentage d'émulsification de **25 %** dans la première heure suivie par une valeur de **18,33 %** après 24h. On peut déduire que ces biosurfactants produits dans le milieu ME et le caroubier sont les meilleurs rendements et sont les plus efficace à émulsionner les hydrocarbures en comparant avec les autres milieux utilisés lors de cette étude. Selon les travaux de **Naif Abdullah Al-Dhabi et al, 2020** sur la production des biosurfactants par la valorisation des résidus de la mélasse de date, les épiluches de banane, bran de riz, soja et l'amidon de maïs, ils ont trouvé que les meilleurs résultats d'émulsification étaient dans le milieu à base de la mélasse de date, et d'après la composition chimique en sucre ces milieux sont riches en saccharose.

IV.5.2 Les résultats des tests de déplacement dans huiles(DDH)

Les résultats de déplacement dans huiles après de mesurer le diamètre du halo clair dans chaque boîte qui indique la production de biosurfactants par *Bacillus sp* les résultats de ce test sont résumés dans la figure ci-dessus.

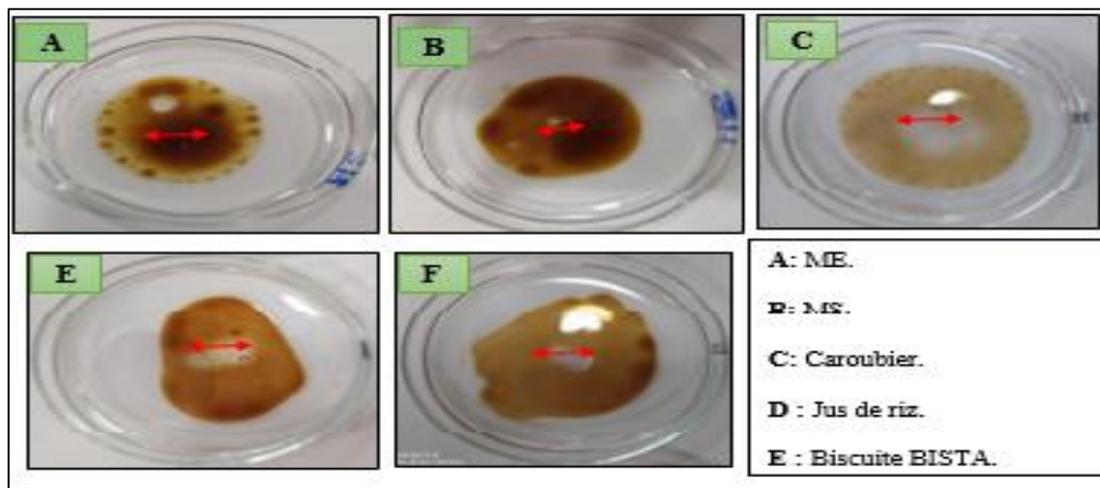


Figure25 : les résultats des tests DDH.

Tableau VIII : les résultats des tests DDH pour chaque milieu.

Milieus testés	Diamètre
Milieu synthétique(MS).	0.5cm.
Milieu à base d'épluche de pomme de terre(ME).	1cm.
Caroubier	1,5cm.
Jus de riz	0,9cm.
Biscuite BISTA	0,5cm.

Les résultats des tests de déplacement dans l'huile (DDH) montrent que le surnageant obtenu après centrifugation des différents milieux testés (ME,MS,Caroubier,Bista et Jus de riz) a formé une zone de déplacement d'huile avec différents diamètres (halo claire), le meilleur résultat a été observé pour le milieu à base de caroubier et le milieu ME avec un diamètre de 1,5 cm et 1cm respectivement, suivie par le milieu à base de jus de riz avec un diamètre de 0,9 cm et 0,5cm pour les milieux Ms et Bista, ces résultats suggèrent qu'il y a une activité de surface ce qui indique la présence de biosurfactants dans les différents surnageants testés avec des quantités et des efficacités variables(Liu et al,2013)..

IV.5.3 Résultats de test de récupération des huiles à partir de la boue de forage

Les résultats de test de récupération des huiles sont résumés dans le tableau ci-dessus :

Tableau IX : les résultats de test de récupération des huiles.

Milieu	Quantités En huile	Rendement de récupération
Caroubier	5 ml	0.0368 mg
Biscuite BISTA	Dichlorométhane	0.0266 mg
Jus de riz	+ 40ml de mélange Surnageant + la boue.	0.0068 mg

IV.6 L'extraction des biosurfactants

Après la centrifugation des milieux de fermentation, résultent l'apparition de deux phases les culots qui contiennent les cellules bactériennes et les molécules insolubles sont éliminés, on récupère seulement le surnageant qui est ajusté à pH 2 par une solution HCl. L'extraction des biosurfactants par le mélange de solvant organique chloroforme-méthanol fait apparaître trois phases (chloroforme-biosurfactants-méthanol). Les phases 2 et 3 sont récupérées, laissées à l'air libre pour l'évaporation, les biosurfactants purifiés ont été pesés et on a calculé le rendement de production pour chaque milieu.

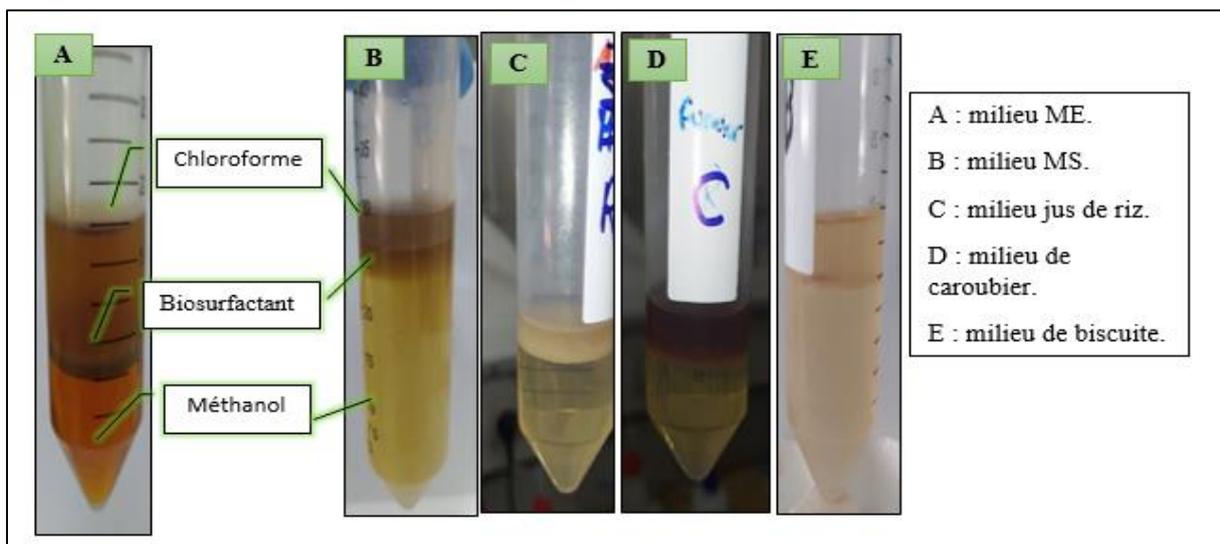


Figure 26 : les résultats de récupération des biosurfactants dans différents milieux.

Tableau X : Résultats de rendement de production de biosurfactants par les différents milieux testés.

Milieux	Ph normal	Ph ajustés	Rendement
ME	6,89	Ph= 2	0,0350 mg
MS	7,00		0,0120 mg
Caroubier	7,10		0,0368 mg
BISTA	7,74		0,0266 mg
Jus de riz	7,98		0,0068 mg

Selon les travaux de **Naif Abdullah Al-Dhabi et al, 2020** sur la production des biosurfactants par la valorisation des résidus de la mélasse de date, les épluchés de banane, bran de riz, soja et l'amidon de maïs, ils ont trouvé que les meilleurs résultats de production des biosurfactants étaient dans le milieu à base de la mélasse de date, et d'après la composition chimique en sucre ces milieux sont riches en saccharose. Des résultats similaires sont observés dans le milieu à base de caroubier, le rendement de production des biosurfactants était de **0,1847 mg** suivi par le milieu ME avec un rendement de **0.1592 mg**. Suite à ces résultats, on peut déduire que le genre *Bacillus* est capable de produire les biosurfactants dans des milieux riches en sucre simple tel que le saccharose et le glucose avec des rendements de production intéressants (**Bengoechea et al., 2008**).

Conclusion.

Malgré les multiples caractéristiques et applications des Biosurfactants par l'utilisation de bactéries, le coût de production élevé compliqué par de faibles rendements de production entrave leur production à grande échelle. Le coût des matières premières représente environ 30 % du coût total de la production dans la plupart des procédés biotechnologiques.

Par conséquent, les efforts de l'équipe de recherche de la direction centrale de recherche et développement de la société SONATRACH ont été orientés vers l'utilisation de matières premières renouvelables et à faible coût pour la production de ces biomolécules. Durant cette étude, diverses matières premières à faible coût ont été testées, notamment les épluchures de la pomme de terre, le jus de riz, un biscuit inconsommable et le caroubier. Tous les milieux qui ont été développés à partir de ces matières sont onéreux et parfois gratuits comparés au milieu de culture de référence.

La culture de *Bacillus sp.* Dans le milieu à base des épluchures de pomme de terre et le milieu à base de caroube ont permis la production des quantités importantes de biosurfactant (0.1592mg/ml) ayant un index d'émulsion (51.66%) pour le ME et (0.1478 mg/ml) ayant un bon index d'émulsion (70%) pour le milieu à base de caroube.

Le test de récupération des huiles à partir de boue de bacs de stockage par les trois milieux (caroube, jus de riz, biscuits BISTA) a permis de constater que le meilleur milieu est celui à base de caroube (0.0368 mg).

Le biosurfactant produit à partir de la souche étudiée dans ce travail pourrait servir comme un émulsifiant dans les sites pollués par les hydrocarbures.

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

- Un séquençage après amplification d'ADN 16s dans un but de taxonomie moléculaire.
- Caractérisation des Biosurfactants produits pour mieux comprendre leur nature et leur structure.
- L'optimisation de tous les paramètres de la fermentation pour la maîtrise de cette production
- Évaluation de la toxicité des biosurfactants.
- En fin, il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs à grande échelle, et ce, dans la perspective d'améliorer les rendements de production.

**Références
Bibliographiques.**

A

Abbasian ,F. (2015) *A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria*. Vol. 176.

Al-Arajil, Abd Rahman, R. N. Z. R., Basri, Salleh, M. A. B.(2007). *Minireview: Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Biol. Biotechnol.*, Vol. 15, p. 99-105.

.

Atlas, R.M. and T.C. Hazen .(2011), *Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history*, ACS Publications.

Azubuiké, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, p.32(11), 180.

B

Balba M.T., Al-Awadhi N. et Al-Daher R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*. 32 : 155–164.

Ballerrini, D. et Vandecasteele, J. P. (1999). La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. *In : Biotechnologie, coordinateur R. Scriban, 5^{ème} édition*, Edition Tech et Doc, pp. 835-865.

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.*

Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, **53**(5), 495-508.

Banat, I.M., Samarah N., Murad M., Horne R & Benerjee S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World journal of microbiology and biotechnology*. 7; pp 80-84.

Benerjee, S. (1991). Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank chemical industry digests, 4; pp. 75-78.

Bengoechea ,C. Romero, A., Villanueva, A., Moreno, G., Alaiz, M., Millán, F., Guerrero, A., & Puppo, M. C. (2008). Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins. *Food chemistry*, 107(2), 675-683.

Références bibliographiques

Bertrand, J.C. et Mille G. (1989). Devenir de la matière organique exogène. *Un modèle : les Hydrocarbures. Microorganismes dans les écosystèmes océaniques.* Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al.éds. Masson publ., Paris : 343-385.

Bezza Fisseha Andualem., Evan M., Nkhalambayausi chirwa. (2015). Application of biosurfactant produced by *Ochrobacterium intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process biochemistry.* 50, 1911-1922.

Biner, B., Gubbuk H., Karhan M., Aksu M. et Pekmezci M. (2007), Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey, *Food Chemistry*, 100, pp.1453-1455.

Bodour, A.A., Gerrero-Barajas, C. et Maier, M. (2004). Structure and Characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavolipid* sp. strain MTN11. *App. And Env. Microbiol.*, 10(6): 1114-20.

Bouchez, M., Blanchet D., et 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.

Bouderhem, A. (2011). Utilisation de souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Thèse de magister de l'Université Kasdi Merbah Ouargla. Spécialité microbiologie appliquée, p.91.

Boulal, A., Benbrahim Z., Benali, B et Ladjel, S. (2013). Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud-Ouest de l'Algérie. *Revue des Energies Renouvelables* Vol.16 N°3 :539-550.

Brodrick et Cooney. Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P.80.

C

Chalghmi, H. 2015. Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leur effets biochimiques et moléculaires sur la paloude de *Ruditapes* sp, Université de Bordeaux.

Références bibliographiques

Christofi, N. and I.B. Ivshina, 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Applied Microbiol.*, 93: 915-929.

Colati ,K, A, P., Dalmaschio, G.P., de Castro; E, V.R., Gomes, A.O., Vaz, B.G., Romao, W. 2013. Monitoring the liquid/liquid extraction of naphthenic acids in Brazilian crude oil using electrospray ionization *FT-ICR* mass spectrometry (*ESI FT –ICR MS*). *Fuel*, 108, 647-655.

Colin, F. (2000). Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés, Académie des sciences, rapport n° 44, Edition Tec &Doc, 417.

Colombano, S. V. Guerin, A. Saada, D. Hiez et H. Bomer. (2008). Journée technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques Objectifs, enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf .(le 14 /06/2021 a 10 :00)

D

Dessai, J, D., Banat, I, M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiologie and moleculaire biology Reviews*, 61(1), 47-64.

Djerbaoui, A. (2011). Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremédiation des sols de Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures.

Ducker, W.A., Grant, L.M. (1996). Effect of Substrate Hydrophobicity on Surfactant Surface–Aggregate Geometry. *The Journal of Physical Chemistry*, **100**(28), 11507-11511.

E

Eddouaouda ,K. (2012). Etude de potentiel biodégradatif de souches isolées de sol de Hassi Messoud contaminé par du pétrole : criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant. Thèse de doctorat : chimie industrielle. Université de Blida. 209p.

Edwards, D.A., Luthy R.G. et Liu Z. (1991). Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micellar nonionic surfactant solution, *Environ.Sci.Technol.* 25(1) : 127-133.

Emadali, A., Gallagher-Gambarelli, M. (2009). La protéomique quantitative par la méthode *SILAC* : technique et perspectives. *Med Sci (Paris)*; 25: 835–842. [[CrossRef](#)] [[EDP Sciences](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

Références bibliographiques

Escobar, M., Márquez G., Azuaje V., Da Silva A., Tocco R. (2012). Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alturitas oils in Venezuela. *Fuel*. 97 : 186-196.

F

Federation, T.I.T.O.P. Fate of Oil Spills. 2018; Available from: [https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/n.\(le](https://www.itopf.org/knowledge-resources/documents-guides/fate-of-oil-spills/n.(le) 15/06/2021 à 14 :15)

Fingas, M. (2013). The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.

Francy, D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond, C.H. Ward. (1991). Emulsification hydrocarbon by surface bacteria. *J. Industrial Microbiol*, 8: 237-46.

G

Gabet, S. (2004). Remobilisation d'hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tension actif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'eau, p.177.

Goeury, C. (2012). Numerical modelling of oil spill drifts in continental and estuarine water, université Paris-Est.

Gong, Y., X. Zhao, Z. Cai, S. E. O'Reilly, X. Hao et D. Zhao. (2014). A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine Pollution Bulletin*. 79(1-2) : 16-33.

Guerra Santos, L. H, Kappeli O, Fiechter, A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24 : 443-448.

Gunaseelan Dhanarajan, Mahitosh Mandal et Ramkrishna Sen .(2014). A combined artificial neural network modeling–particle swarm optimization strategy for improved production of marine bacterial lipopeptide from food waste. *Biochemical Engineering Journal*. 84: 59-65.

Gupta , R., GIGRAS, P, Mohapatra,H. et al .(2003). Microbial α - amylases : *a biotechnological perspective*. *Process Biochem.*, 38, p.1599 -1616.

H

Hadj ,M.A. (2013). Etude des propriétés thermodynamique d'un surfactant. Mémoire de Master en chimie : chimie macromoléculaire. Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen, 68p.

Harayama, S., et al., Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1999. *1(1)*: p. 63-70.

Haritash,A.K . et Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*. 169 : 1–15.

Hassine, A. (2015). Biodégradation des hydrocarbures (Pétrole et kérosène) par la microflore microbienne des eaux de la région de Skikda. Thèse de Doctorat : biologie Végétale. ANNABA : Université Badji mokhtar- ANNABA, p.189.

Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current opinion in colloid & interface Science*, 6: 148-159.

K

Kanan , R., Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin : Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, 2012, Bordeaux 1.

Kosaric ,N. et Sukan, F.V. (2015). Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. 1st Edition. International Standard Book Number-13 : 978-1-4665-9670-2. 389p.

L

Lang, S., Wullbrandt, D. (1999). Rhamnoselipidsbiosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 : 22-32.

Lecomte, P. (1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier, TEC & DOC.P.198.

Liu Jianghang, Yitan chen, Yurpeng Jia.(2013). Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oil field waste water. *Indian journal of microbiology*.53, 168-174.

M

Maier ,R. Pepper, M.I. L, Gerba C. P. (2009). Environnemental Microbiology, 2eme Edition, p598

Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, **1**(1), 5.

Marchand, M., Kantin, R. (1997). Contaminants chimiques en milieu aquatiques (troisième partie, Présentation de quelques éléments caractéristiques). Océanis (Paris).

Mint El Moukhtar, S. (2010). Etude des réponses physiologique et métabolique de dix variétés de riz (*Oryza sativa* L.) aux premiers stades de développement vis-à-vis du stress salin. Faculté des sciences et techniques département de chimie, p39.

Morelli, J.J., Szajer, G. (2000). Analyss of surfactants: Part I. *Journal of surfactants and detergents*, **3**(4), 539-552.

Mulligan, C N., Yong, R; N. Gibbs, B F.(2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: *A review. Engineering Geology*, **60**(1-4): 371–380.

N

Neidre, B.L. (1993). Tension superficielles et interfaces Techniques d'opinion in biotechnology, **3** ; 249-252.

Nikitha, T., Satyaprakash, M., Vani, S.S., Sadhana, B., Padal, S. (2017). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, **6**(4), 1627-1639.

Nys, Y., Gautron, J. (2007). Structure and formation of the egg shell in bioactive egg compounds. Reiner huopalahti, Rosina Lopez Fandino, Marc Anton, Ru-diger schade spriger Verlag Berlin Heidelberg, 99-102.

P

Parra-Barraza, H. (2003)., The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions. *Fuel*,. **82**(8): p. 869-874.

Pattanathu, K. Set Gakpe, E. (2008). Production, characterization and application of biosurfactants- *review. Biotechnology*, **7**(2):360-370.

Références bibliographiques

Pelmont, J. (1995). Bacteries et environnement-adaptation biologique, Tome 1.OPU. p.875.

Pintado-Herrera, M.G. (2017). Distribution, mass inventories, and ecological risk assessment of legacy and emerging contaminants in sediments from the Pearl River Estuary in China. *J Hazard Mater.*, **323** : p. 128-138.

Pore, J. (1992). Les agents de surface. Chapitre. 1. Dans *Micro-émulsions, Emulsions multiples, Agents de surface.* (270 p).

Prince, R.C (2005). The microbiology of marine oils pill bioremediation. *Petroleum microbiology*: 317-336.

Pruthi, V., Cameotra, S. (1995). Rapid Method for Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained by Acetone Precipitation, *Biotechnol. Techniq.* Vol. 9, p. 271–276.

R

Rahman, K.S. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, **90**(2): p. 159-168.

Ron, E.Z, et Rosenberg E. (2002). Biosurfactant and oil remediation, current opinion in biotechnology. *13*: 249-252.

Rosenberg, E. et Ron E.Z. (1999). Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new Markets. *Trends Biotechnol*, *11*: 419-424.

S

Saurett, C. (2011). Ecologies des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie, spécialité microbiologie environnementale école doctorale science de l'environnement d'île de France. P.129.

Schallmey, M. Singh, A. and Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* *50*, 1–17

Shoeb, E., Akhlaq F., Badar U., Akhter J. et Imtiaz S. (2013). *Classification and industrial applications of biosurfactants. Academic Research International.* *4*(3): 243.

Soltani, M. (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6 Spécialité chimie analytique, p.284.

Références bibliographiques

Syakti, A.D. (2004). Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipidiques de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat, Université de Droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III), Marseille, France.

Scriban, R. (1999). Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols.

T

Tabka, G. (2014). Cosmétique, Développement de produit cosmétiques, ISBST. PP 96-97.

Tarayre ,C. (2012). Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes, p.116.

V

Varjani ,S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresource Technology, **223**: p. 277-286.

Vieira, P. (2007). Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. J Hazard Mater, **140**(1-2): p. 52-59.

Vijayakumar, S. et Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. Res. J. Microbiol. 10 (5) : 181-192.

Vipulanandan, C. & Ren, X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. Journal of environmental engineering; 126(7): 629-634.

W

Wertz, J-L. (2012). Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants, Document Valbiom-Gembloux Agronomie-Biologie Technologie., pp 9-10.

Wise, D.L. (1997). Global environmental biotechnology.1st Edition. Elsevier Science. 66.791.

Z

Zahed, M.A. (2010). *et al.*, Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. Bioresource Technology, **101**(24) : p. 9455-9460.

Zajic, J.E et Donalson E.C., (1985). Microbial biosurfactants in: Microbs and recovery. Vol. 1 ; pp 19-30.

Références bibliographiques

Site web :

Anonyme01 : <https://www.futura-sciences.com/planete/questions-reponses/pollution-lutter-maree-noire>. (01/06/2021 a 01:00)

Anonyme02 : https://www.google.com/url?q=https://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement/pollutio-aux-hydrocarbures-sur-des-plages_au-bresil. (01/06/2021 a 00:00)

Annexes.

Annexe

Annexe I : matériel non biologique :

Etuve	Agitateur magnétique- plaque chauffante
Ph mètre	Balance
Bec bunsen	Incubateur agitateur
Centrifugeuse	Filtration sous vide
Réfrigérateur	Hotte microbologique
Hotte chimique	Equipement de dénombrement automatique
Vortex	Autoclave

Annexe II : Milieux de cultures et réactif utilisé :

1. Préparation de BN :

Extrait de viande	0.5 g
Extrait de levure	0.5g
Peptone	1.25g
NaCl	1.25g

2. Composition de milieu MS

Glucose	18 g
Urea NH₂CONH₂	2.7 g
Phosphate d'ammonium NH₄HPO₄	0.96 g
Azote, phosphore et potassium NPK	0.06 g
Le chlorure de potassium KCl	0.06 g
Le sulfate de magnésium MgSO₄	0.42g
Sulfate ferreux FeSO₄	0.108 g
L'eau distillé	600 ml

3. Composition de milieu ME :

Épluches de la pomme de terre	18 g
La poudre de coquilles d'œufs	6 g
NPK	0.06 g
Eau distillé	600 ml

4. Composition de milieu à base de caroubier :

La poudre de caroubier	18 g
La poudre de coquilles d'œufs	6g
NPK	0.06 g
Eau distillé	600ml

5. Composition de milieu à base de biscuite BISTA :

La poudre de biscuite	18g
La poudre de coquilles d'œufs	6g
NPK	0.06 g
Eau distillé	600ml

6. Composition de milieu à base de jus de riz :

Le riz	18 g
La poudre de coquilles d'œufs	6 g
NPK	0.06 g
Eau distillé	600 ml

7. Préparation de GN :

Extrait de viande	1.0 g
Extrait de levure	2.5 g
Peptone	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar agar	15.0 g
Eau distillé	1000 ml
PH	7.0

Annexes III : Protocole utilisé pour le dosage des protéines (méthode deBradford)

Préparation du réactif de Bradford

- 12,5mg de bleu de Coomassie
- 12,5ml de méthanol
- 25ml d'acide phosphorique
- 212,5ml d'eau distillée

Mélanger l'acide phosphorique avec l'eau distillée, ajouter le méthanol puis les mélanger avec le bleu de Coomassie.

Préparation de la solution de BSA

Solution mère de Sérum Albumine (BSA) à 2 g/l (2mg/ml), obtenue par la solubilisation de la BSA dans de l'eau distillée.

Dissoudre 40mg de BSA dans 20 ml d'eau distillée.

Protocole expérimentale

Solution mère de Sérum Albumine (BSA) à 2 g/l (2mg/ml), obtenue par la solubilisation de la BSA dans de l'eau distillée.

Dissoudre 40mg de BSA dans 20 ml d'eau distillée.

Protocole expérimentale**Préparation des dilutions de la BSA**

Volume totale = 2 ml par dilution

N° tube	T1= 0	T2= 0,25	T3= 0,5	T4= 1	T5= 1,4	T6= 2
[BSA] (ml)	0	0,25	0,5	1	1,4	2
Eau distillée (ml)	2	1,75	0,5	1	0,6	0

Préparation de la gamme étalon

Nous utiliserons 6 points pour tracer la droite pour un volume total de 3,1 ml par échantillon

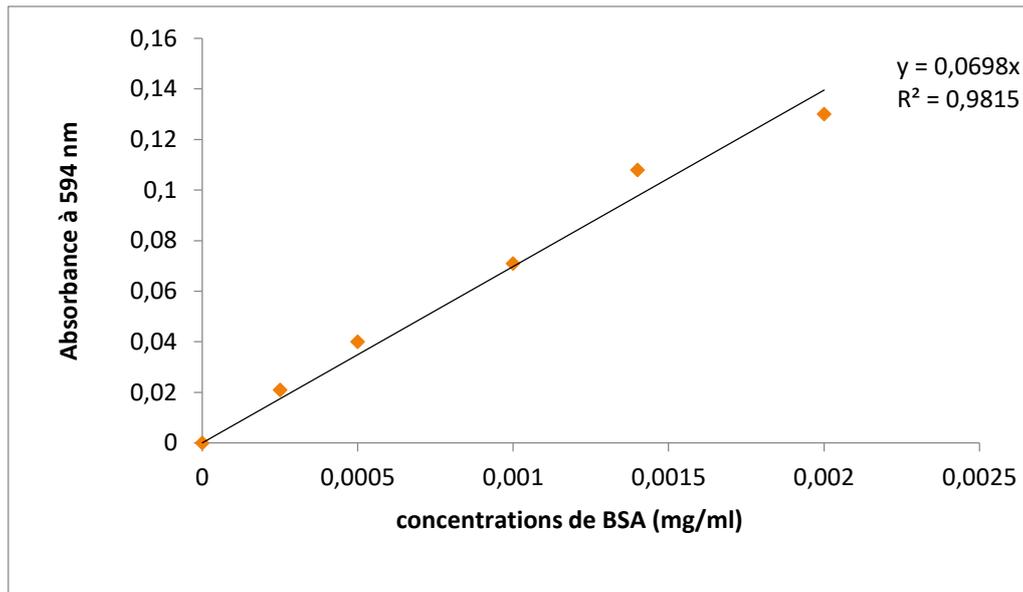
N° tube	Volume BSA en ml	[BSA] dilution (mg/ml)	Réactif de Bradford ml
1(bleu)	0,1	0	3
2	0,1	0,25	3
3	0,1	0,5	3
4	0,1	1	3
5	0,1	1,4	3
6	0,1	2	3

Tracer la gamme étalon

Régler le spectrophotomètre sur 594nm

La lecture de l'absorbance de chaque tube se fera contre le blanc (tube ne contenant pas la protéine), il faut donc d'abord positionner le zéro avec le tube n°1 pour chaque tube de la gamme, reporté dans un tableau l'absorbance indiquée par le photomètre

[BSA] mg/ml	0	0,25	0,5	1	1,4	2
DO	0	0,021	0,040	0,071	0,108	0,130



Mesure de la concentration d'un échantillon inconnu

Pour évaluer la concentration d'un échantillon il suffit alors d'utiliser le même volume que celui utilisé pour les points de la gamme (volume total et volume du réactif), d'en lire l'absorption à 594 nm au spectrophotomètre puis d'en reporter la mesure sur la courbe étalon qui nous donnera la concentration correspondante.

Pour déterminer la concentration d'un échantillon inconnu : préparer une cuve avec 3ml de réactif de Bradford ajouter 0,1 ml de l'échantillon puis lire son absorbance et la reporter sur la courbe d'approximation qui permet de retrouver sa concentration sur l'axe des abscisses.

Annexes IV :

Le réactif au DNS est un mélange de deux solutions : Solution 1 : dissoudre 300 g de tartrate de sodium et de potassium dans 500ml d'eau distillée. Solution 2 : dissoudre 10 g de DNS dans 200 ml de soude à 2 N. Mélanger extemporanément les solutions 1et2 et compléter à 1L avec de l'eau distillée.

Gamme d'étalonnage : Dans une série de six tubes à essai :

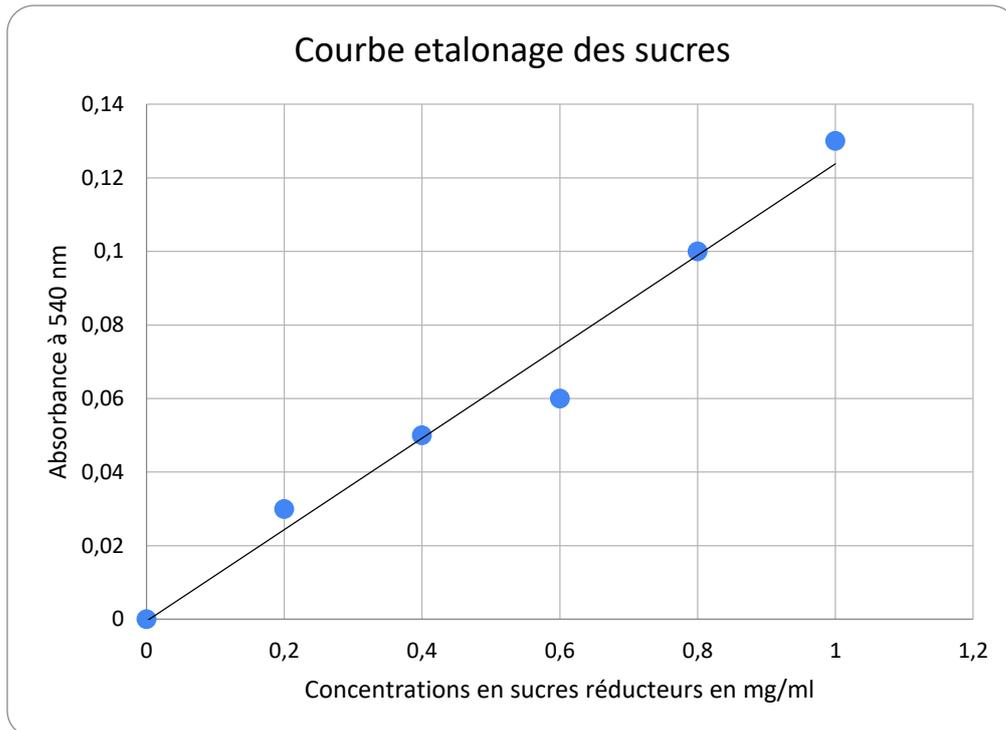
- On introduit 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1ml de solution étalon à 0,45 g/l de glucose.
- On complète à 1mL avec de l'eau distillée.
- On ajoute 2mL de réactif au 3,5-dinitrosalicylique. Tous les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant (100°C) en même temps exactement cinq minutes, puis ils sont refroidis dans un bain d'eau glacée. On complète chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée. On homogénéise et on laisse reposer 15 minutes à température ambiante.

Annexe

Les lectures des densités optiques sont réalisées à 540 nm contre le blanc réactif.

Pour l'essai, on prend 1mL qu'on dilue au dixième avec de l'eau distillée auquel on rajoute 2 ml de réactif, et on suit les mêmes étapes que précédemment

[Glucose]	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
DO	0	0,03	0,05	0,06	0,1	0,13



Courbe représentative de la DO en fonction de concentration en sucre réducteurs (DO=f [Sucres réducteurs]).

Annexe V : Préparation de l'eau physiologique :

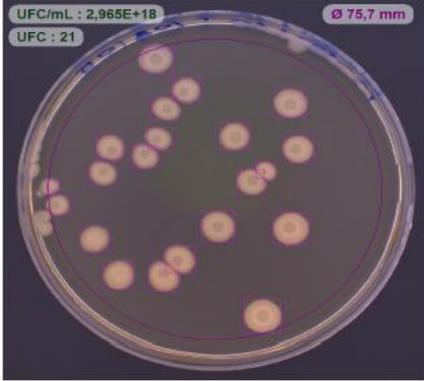
Na Cl	9 g
Eau distillé	1 L

Annexe VI : dénombrement automatique des colonies par SCAN 4000®.

interscience



Echantillon

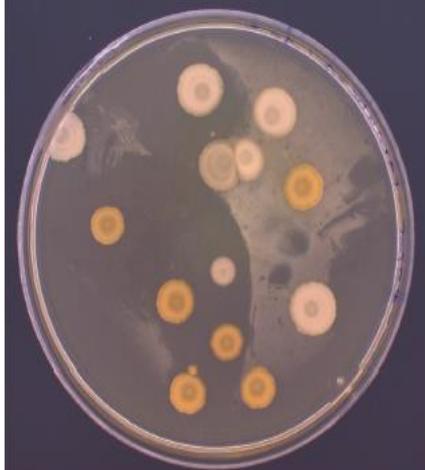


Echantillon analysé avec SCAN 4000®, version 8.5.0.0

Validé par :	labo423	N° échantillon :	5	UFC/mL :	2,965E+18
Date Heure :	04/05/2021 12:33:19	Nbre d'UFC :	21	Dilution :	1e-7
Réglages :	Denomrement sur	Surface (%) :	70,815987	Prorata UFC :	30
Commentaires : R.A.S. MS.2.E7					

Fichier : 02.05.2021.sca

interscience



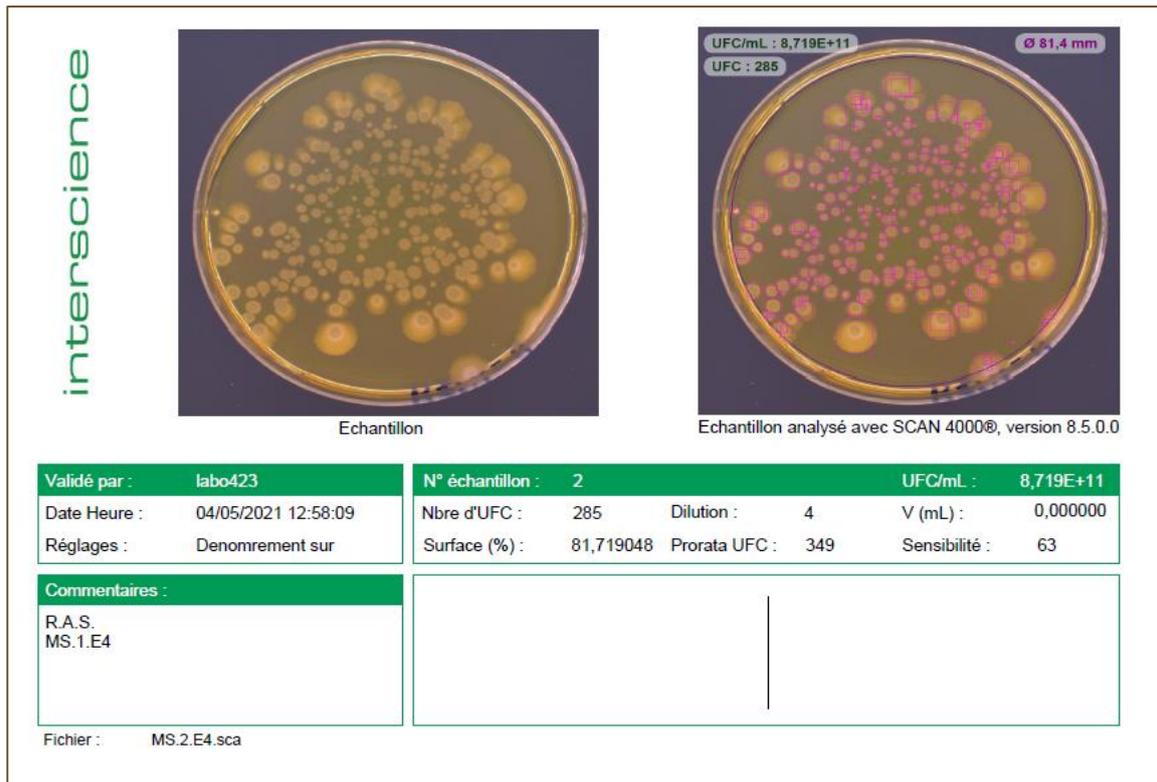
Echantillon



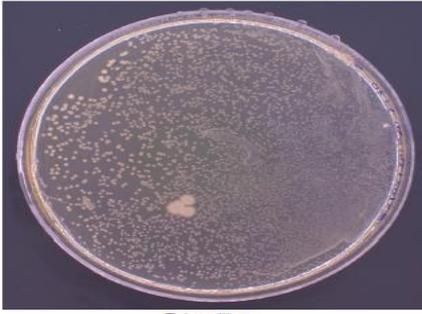
Echantillon analysé avec SCAN 4000®, version 8.5.0.0

Validé par :	labo423	N° échantillon :	1	UFC/mL :	1,649E+13
Date Heure :	08/06/2021 11:03:04	Nbre d'UFC :	14	Dilution :	1e-2
Réglages :	Denomrement sur	Surface (%) :	84,886169	Prorata UFC :	16
Commentaires : 14 UFC ajoutée(s) manuellement -- R.A.S. caroub1E2					

Fichier : caroub1E2.sca



interscience



Echantillon



Echantillon analysé avec SCAN 4000®, version 8.5.0.0

Validé par :	labo423	N° échantillon :	3	UFC/mL :	3,763E+18
Date Heure :	20/06/2021 11:41:59	Nbre d'UFC :	3158	Dilution :	1e-5
Réglages :	Denomrement sur	Surface (%) :	83,929703	Prorata UFC :	3763
Commentaires :					
R.A.S. BISTA1.E5					
Fichier :	CAROUBE2.E5.sca				

Annexe VII : Préparation de HCL a 6N :

- Préparation d'une solution de 100 ml / C = 6 mol / L

On applique la loi de dilution

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2 \quad \text{avec } C1 = 6 \text{ mol / L}$$

$$V2 = 100 \text{ ml}$$

C1 :

On a : $c = \frac{n}{v}$ / $n = \frac{m}{M}$ avec :

$$M = 36.46 / \text{HCL} = 37\% / d = 1190 / \rho \text{HCL} = 1190 \text{ g / l}$$

$$37 \text{ g} \quad 100 \text{ g}$$

$$m \quad 1190$$

$$m = \frac{1190 \times 37}{100} = 440.3 \text{ g}$$

$$n = \frac{m}{M} = \frac{440.3}{36.46} = 12.07 \text{ g}$$

$$C1 = 12.07 \text{ mol/l}$$

V1 :

$$V1 = \frac{6 \times 100}{12.07} = 49.7 \text{ ml}$$

$$V1 = 49.7 \text{ ml}$$

- On prend 49.7 ml de HCL 37 % . On le met dans une fiole de 100 ml.
- On complète par l'eau distillé jusqu'au tait de jauge.

VIII Les résultats de E24 de différents milieu

Les résultats de l'indice d'émulsification obtenue sont mesurés dans la première heure après le début d'apparition d'émulsification et après 24h, toutes les aspect macroscopique d'émulsification des milieux testés sont mentionnés dans la figure ci-dessus.

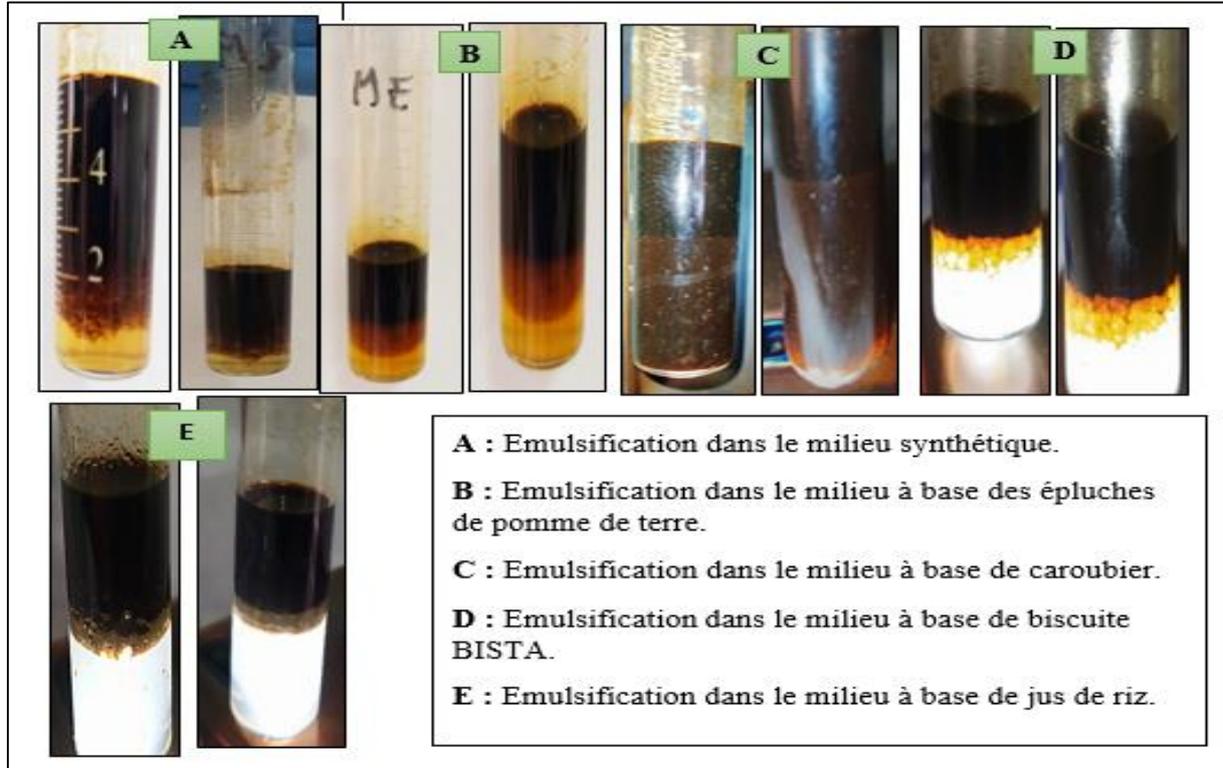


Figure : les résultats de l'indice d'émulsification

Resultats de test de recuperation des huiles à partir de la boue de forage

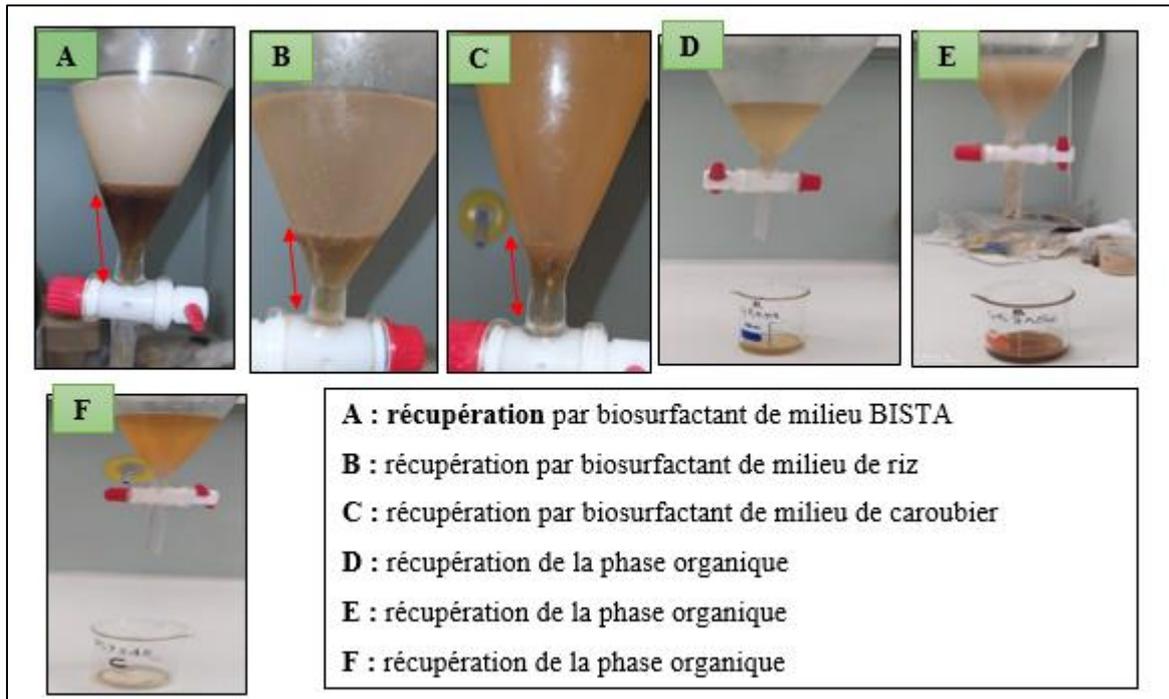


Figure : Résultats de test de récupération des huiles dans les différents milieux testés.

Résultats de l'extraction de biosurfactants

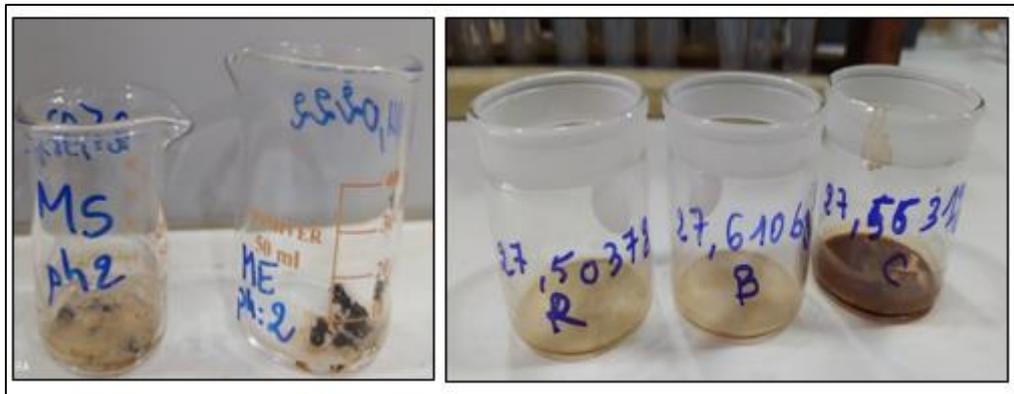


Figure : biosurfactants après évaporation des solvants organiques.

Résumé.

Résumé : Les rejets pétroliers constituent un risque majeur pour l'environnement et par conséquent sur la santé humaine et animale, vu qu'ils soient contaminés principalement par des hydrocarbures et des métaux lourds. La dépollution biologique de ces sites nécessite des microorganismes efficaces dans ce procédé. Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes qui se nourrissent typiquement d'hydrocarbures, et peuvent être aussi des bonnes productrices de biomolécules appelées « biosurfactants » présentant un grand nombre d'applications environnementales et industrielles.

A ce titre, L'objectif de de cette étude est d'utiliser les résidus agroalimentaires riches en nutriments comme milieu de culture alternatif pour produire des biosurfactants à partir de la souche *Bacillus sp* isolée des boues contaminées par les hydrocarbures. L'utilisation de ces déchets peut aider à réduire les couts de production et permettre l'obtention des Biosurfactants efficaces pour leur application dans la dépollution de l'environnement ou la récupération de l'huile pétrolière.

Les résultats du test d'émulsification et de déplacement d'huile ont permis de sélectionner le milieu à base de caroube comme le bon milieu favorisant une emulsification qui peut atteindre jusqu'à 70% .

Dans le but de tester l'efficacité des Biosurfactants produits dans le domaine pétrolier, un essai de récupération de l'huile piégée a été réalisé. Le taux de recupération le plus élevé a été remarqué par les biosurfactants produits dans le milieu à base de caroubier.

Mots clés : *Bacillus sp.*, résidus agroalimentaires, biosurfactants, boue des bacs de stockage.

Abstract: Oil discharges constitute a major risk for the environment and consequently for human and animal health, since they are contaminated mainly by hydrocarbons and heavy metals. Biological remediation of these sites requires effective microorganisms in this process. "Hydrocarbonoclast" bacteria are microorganisms that typically feed on hydrocarbons, and can also be good producers of biomolecules called "biosurfactants" with a large number of environmental and industrial applications. As such, the objective of this study is to use nutrient-rich agro-food residues as an alternative culture medium to produce biosurfactants from the *Bacillus sp* strain isolated from sludge contaminated with hydrocarbons. The use of this waste can help to reduce production costs and allow obtaining effective Biosurfactants for their application in environmental clean-up or petroleum oil recovery. The results of the emulsification and oil displacement test made it possible to select the carob-based medium as the right medium favoring emulsification which can reach up to 70. In order to test the effectiveness of Biosurfactants produced in the petroleum field, a test to recover the trapped oil was carried out. The highest recovery rate was noted by biosurfactants produced in the carob tree medium

Keys words: *Bacillus sp*, Food residues, Biosurfactants, sludge of storage tanks.

المخلص: يشكل تصريف الزيت خطرًا كبيرًا على البيئة وبالتالي على صحة الإنسان والحيوان، حيث أنه يتلوث بشكل أساسي بالهيدروكربونات والمعادن الثقيلة. تتطلب عملية إزالة التلوث البيولوجي لهذه المواقع كائنات دقيقة فعالة في هذه العملية. يكتيريا "هيدروكربونوكلاست" هي كائنات دقيقة تتغذى بشكل نموذجي على الهيدروكربونات، ويمكن أيضًا أن تكون منتجة جيدة للجزيئات الحيوية المسماة "المواد الحيوية للتوتر السطحي" مع عدد كبير من التطبيقات البيئية والصناعية. على هذا النحو، فإن الهدف من هذه الدراسة هو استخدام بقايا الأغذية الزراعية الغنية بالمغذيات كوسيلة استزراع بديلة لإنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي من سلالة *Bacillus sp* المعزولة من الحمأة الملوثة بالهيدروكربونات. يمكن أن يساعد استخدام هذه النفايات في تقليل تكاليف الإنتاج وتمكين إنتاج مواد حيوية فعالة للتوتر السطحي لتطبيقها في المعالجة البيئية أو استعادة زيت البترول. أتاحت نتائج اختبار الاستحلاب وإزاحة الزيت تحديد الوسط القائم على الخروب باعتباره الوسيط المناسب الذي يفضل الاستحلاب الذي يمكن أن يصل إلى 70% من أجل اختبار فعالية المواد الحيوية المنتجة في مجال البترول، تم إجراء اختبار لاستعادة الزيت المحاصر. ولوحظ أعلى معدل استرجاع من خلال المواد البيولوجية الخافضة للتوتر المنتجة في وسط شجرة الخروب .

الكلمات المفتاحية: *Bacillus sp*، بقايا الطعام، العوامل الحيوية، الحمأة من صهاريج التخزين .