

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : **Biotechnologie Microbienne**

Thème

Essai de Production de Biosurfactants par des Bactéries
Promotrices de la Croissance des Plantes « PGPR » sur
milieu à base de fruit de Caroubier (*Ceratonia siliqua L.*)

Présenté par :

soutenu le : 09/07/2023

HACHEROUF Sadia

HAMOUM Chahinaz

Devant le jury :

Président : Melle Benahmed Djilali A. Professeur UMMTO

Examineur : Mme Leksir Ch. Maitre de Conférences B. UMMTO

Promotrice : Mme Benazzouz K. Maitre de Conférences B. UMMTO

Année universitaire : 2022 / 2023.

Remerciements

Avant tout, nous tenons à exprimer notre gratitude envers Dieu, le Tout-Puissant, pour les innombrables bénédictions et la guidance qu'Il nous a accordées tout au long de notre parcours académique. Sa grâce infinie et Sa sagesse ont été notre lumière dans les moments de doute et d'incertitude.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers notre promotrice, Madame BENAZOUZ Kinza Maître de Conférences Classe B, à l'Université de Mouloud MAMMERIE de TIZI-OUZOU pour son soutien inestimable, ses conseils avisés et sa disponibilité tout au long de ce projet. Sa passion pour la recherche et son dévouement ont été une source d'inspiration constante pour nous. Sa présence précieuse a grandement contribué à notre réussite.

Nous remercions par ailleurs vivement Madame DJILALI BENAHMED Adiba Professeur à l'Université de Mouloud MAMMERIE de TIZI-OUZOU et Madame LEKSIR Choubaila Maître de Conférences Classe B, à l'Université de Mouloud MAMMERIE de TIZI-OUZOU de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance.

Nous n'oublierons jamais l'amour et le soutien inconditionnels de nos familles. Leurs prières, leurs encouragements constants et leur présence précieuse ont été notre source de force et de motivation.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Leur soutien, leurs conseils et leur engagement ont été d'une valeur inestimable.

Résumé

La contamination des sols par les hydrocarbures pétroliers constituent un problème préoccupant pour l'environnement du fait de leur toxicité et leur bioaccumulation dans les chaînes alimentaires. Parmi les différentes techniques de dépollution des sols, la bioremediation est une alternative intéressante aux autres procédés grâce à son impact environnemental réduit.

Ce travail repose sur l'étude de la capacité des bactéries hydrocarbonoclastes à dégrader les hydrocarbures pétroliers. Ainsi que leur pouvoir à produire des biosurfactants qui sont synthétisés en présence d'une ou plusieurs sources de carbone. Le test de dégradation d'un hydrocarbure (gasoil) a été effectué en utilisant deux souches du genre *Bacillus* sp. La souche *Bacillus* sp.4 s'est avérée beaucoup plus efficace dans la dégradation de l'hydrocarbure que la souche *Bacillus* sp.3.

Une fermentation sur milieu à base de poudre du fruit Caroubier comme source de carbone. Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'indentification et caractérisation des biosurfactants, à savoir l'indice d'émulsification, test du pouvoir moussant et l'effet nettoyant ainsi que le test parafilm. et la souche *Bacillus* sp.4 a montré des meilleurs résultats lors de sa cultivation dans le milieu Caroubier beaucoup plus ; que *Bacillus* sp.3.

Les biosurfactants extraits ont été testés sur des bactéries commensales à savoir *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Le biosurfactant extraits du milieu à base de caroubier a exhibé une activité antimicrobienne satisfaisante sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, avec des zones d'inhibition de 10-12 (mm) et 9-12(mm) respectivement, comparé au biosurfactant extrait du milieu à base de glucose pour lequel nous avons enregistré des zones d'inhibition de 10 mm et 12mm respectivement.

Mots clés : Bactéries hydrocarbonoclastes, biosurfactants, hydrocarbures, fermentation, activité antibactérienne.

Abstract

Soil contamination by petroleum hydrocarbons, is a worrying problem for the environment, because of their toxicity and bioaccumulation in food chains. Among the different cleanup techniques, bioremediation is an alternative to other processes thanks to its reduced environmental impact.

This work is based on the study of the ability of hydrocarbonoclasts bacteria to degrade petroleum hydrocarbons. As well as their ability to produce biosurfactants. Which are synthesized in the presence of one or more carbon sources. Hydrocarbon degradation test was carried out using two bacterial strains of the kind *Bacillus* sp. *Bacillus* sp. 4 has proven to be much more effective than *Bacillus* sp. 3 in biodegradation test.

A fermentation in the middle based on powder of the carob fruit as a source of carbon, in the object of identification and characterization of biosurfactants; namely: emulsion test, foaming, cleansing effect and parafilm paper test. *Bacillus* sp. 4 had better results than *Bacillus* sp. 3 during its cultivation in carob environment.

The biosurfactants extracted have been tested on pathogenic bacteria like *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The biomolecules extracted from the carob based medium exhibited satisfactory anti-bacterial activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The inhibition areas are 10.5, 10.5 respectively, in regards to biosurfactant extracted from the glucose based medium for which we recorded the values 10mm - 12mm on *Staphylococcus aureus*.

Key words: Hydrocarbonoclasts bacteria, biosurfactants, hydrocarbons, fermentation, anti – bacteria activity.

يشكل تلوث التربة بالهيدروكربونات البترولية مشكلة مقلقة للبيئة بسبب سميتها وتراكمها الحيوي في السلسلة الغذائية. من بين تقنيات معالجة التربة المختلفة، تعد المعالجة الحيوية بديلاً مثيراً للاهتمام للعمليات الأخرى بفضل تأثيرها المنخفض على البيئة.

يعتمد هذا العمل على دراسة قدرة البكتيريا الهيدروكربونية على تحليل الهيدروكربونات البترولية. فضلاً عن قدرتها على إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية التي يتم تصنيعها في وجود مصدر واحد أو أكثر من مصادر الكربون. تم إجراء اختبار تحلل الهيدروكربون (الديزل) باستخدام سلالتين من جنس *Bacillus sp*. تم العثور على سلالة *Bacillus sp* 4 لتكون أكثر فعالية في تحلل الهيدروكربونات من سلالة *Bacillus sp* 3.

التخمير على وسط يعتمد على مسحوق ثمار الخروب كمصدر للكربون. خضعت عدة عوامل لتحديد وتوصيف المواد الخافضة للتوتر السطحي وهي: مؤشر الاستحلاب واختبار قوة الرغوة وتأثير التنظيف بالإضافة إلى اختبار البارافيلم، وأظهرت سلالة *Bacillus sp* 4 نتائج أفضل بكثير عند زراعتها في الخروب.

تم اختبار المواد الخافضة للتوتر السطحي على البكتيريا ، وهي الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية. أظهر الفاعل بالسطح الحيوي المستخرج من الوسط القائم على الخروب نشاطاً مرضياً مضاداً للميكروبات ضد الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية، مع مناطق تثبيط 10-12 (مم) و 9-12 (مم) على التوالي، مقارنة بالفاعل بالسطح الحيوي المستخرج من الوسط. الجلوكوز الذي سجلنا له مناطق تثبيط 10 ملم و 12 ملم على التوالي.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الهيدروكربونية، المواد الخافضة للتوتر السطحي، الهيدروكربونات، التخمر، النشاط المضاد للبكتيريا

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
I. HYDROCARBURES PETROLIERS.....	3
I.1 Définition.....	3
I.2 Classification des hydrocarbures	3
I.2.1 Hydrocarbures aliphatiques saturées	3
I.2.2 Hydrocarbures insaturés	3
I.3 Propriétés physico-chimiques.....	4
• Densité	4
• Viscosité.....	5
• Solubilité.....	5
I.4 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement	5
• Adsorption.....	6
• Dissolution	6
• Emulsification	6
• Biodégradation.....	6
I.5 Impact des hydrocarbures sur l'environnement	7
I.5.1 Effets des hydrocarbures sur le sol.....	7
I.5.2 Effets des hydrocarbures sur la santé humain	7
I.5.3 Effets des hydrocarbures sur les végétaux.....	8
II. Bioremediation des sols pollués.....	9
II.1 Principe de la bioremediation.....	10
II.2 Techniques de biodégradations	10
II.2.1 In-situ.....	10
II.2.2 Ex-situ.....	12
II.3 Facteurs influençant la dégradation des hydrocarbures.....	13
II.4 Bioremediation des hydrocarbures par les microorganismes.....	14
II.4.1 Microorganismes hydrocarbonoclastes	14
II.4.2 Mécanisme bactérien de dégradation des hydrocarbures	16
II.5 Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures	17
• Composition physique et chimique des hydrocarbures	17

Sommaire

•	Température	17
•	Nutriments.....	18
II.6	La Bioinformatique dans la biorestauration	18
II.7	Biosurfactants	18
II.7.1	Classification des biosurfactants	19
II.7.2	Microorganismes producteurs de biosurfactants	19
II.7.3	Paramètres influençant la production	19
II.7.4	Propriétés des biosurfactants	20
III.	LE CAROUBIER : CARACTERES GENERAUX.....	22
III.1	Exigences écologiques.....	23
III.2	Composition chimique.....	23
III.3	Domaines d'utilisation du caroubier	24
III.3.1	Intérêt économique	24
III.3.2	Utilisation thérapeutique.....	25
IV.	MATERIEL ET METHODES	26
IV.1	Matériel.....	27
IV.1.1	Matériel végétal	27
IV.1.2	Matériel du laboratoire	27
✓	Produits chimiques et appareillage.....	27
IV.1.3	Matériel biologique.....	27
IV.2	Test de dégradation des hydrocarbures	28
IV.3	Préparation du Milieu minérale à base de glucose	28
IV.4	Préparation du milieu de culture à base du fruit de caroubier.....	28
IV.5	Caractérisation physico-chimique du milieu à base de Caroube.....	29
✓	Mesure de la matière sèche(MS) (norme NFT 90- 029 06 1970)	29
✓	Mesure du taux de cendres (TC) (norme NFT 90- 029 06 1970)	30
✓	Matières volatiles sèches (MVS).....	31
IV.6	Étude de la production de biosurfactants.....	31
IV.6.1	Repiquage des souches	31
IV.6.2	Préparation de pré-culture à base de caroubier.....	31
IV.6.3	Culture sur milieu à base de caroubier	31
IV.7	Tests d'identification de production de biosurfactants.....	31

Sommaire

✓	Index d'émulsification.....	31
✓	Le pouvoir moussant (foaming) :	32
✓	Test de l'effet nettoyant des biosurfactants	33
✓	Test parafilm	33
IV.8	Extraction du biosurfactants	34
IV.9	Test d'activité antibactérienne.....	35
V.RESULTATS ET DISCUSSION		37
V.1.	Caractérisation des isolats	37
✓	Caractères morphologiques	37
V.2.	test de dégradation des hydrocarbures.....	38
V.3.	Résultats des paramètres physico-chimiques de <i>Ceratonia siliqua</i>	40
V.4.	Résultats des tests de production des biosurfactants	40
✓	L'indice d'émulsification	40
✓	Test du pouvoir moussant	42
✓	Test de l'effet nettoyant.....	44
✓	Test de parafilm.....	45
V.5.	Résultat d'extraction de biosurfactants	46
V.6.	Test d'activité antibactérien du biosurfactant	46
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		50
Références.....		52
Annexes		

Liste des figures

Figure 1. Classification des hydrocarbures	4
Figure 2. Comportement physique et biochimique des hydrocarbures pétroliers dans le sol	5
Figure 3. Schéma récapitulatif du principe de bioaugmentation	11
Figure 4. Schéma récapitulatif du principe de biostimulation.	12
Figure 5. Dessin schématique d'une bactérie dégradant les HAP se développant à proximité d'un sol emprisonné de HAP.	17
Figure 6 . Présentation générale de différentes parties d'un arbre de Caroubier.	22
Figure 7. Diagramme représentant l'ensemble des étapes expérimentales.	26
Figure 8 . Différentes étapes suivies pour la préparation de la poudre du caroubier.	29
Figure 9. Cristallisoirs contenant la matière fraîche.	30
Figure 10. Schéma représentant les étapes de réalisation de l'indice d'émulsification.	32
Figure 11: Schéma de démonstration du test sur papier parafilm.	33
Figure 12. Diagramme montrant les étapes d'extraction de biosurfactant.	34
Figure 13. Milieu Muller Hinton ensemencé par <i>Staphylococcus</i> et <i>E. coli</i> en présence des deux biosurfactants.	35
Figure 14. Résultats du repiquage des souches du genre <i>Bacillus</i> sp.	37
Figure 15 : Résultats de croissance bactérienne après 6 jours.	39
Figure 16: Résultats du test d'émulsification de <i>Bacillus</i> sp. 3 et <i>Bacillus</i> sp. 4.	41
Figure 17 : Résultats d'observation microscopique d'émulsion.	42
Figure 18: Résultats du pouvoir moussant dans le milieu à base de Caroubier.	43
Figure 19: Résultats du test parafilm.(C4) : milieu caroubier, <i>B.</i> sp.4 ; (C3) : milieu.	45
Figure 20. Figure montrant l'extraction du biosurfactant.	46
Figure 21 : Résultats du test antibactérien pour les souches cultivées dans le milieu Caroubier. (a) : biosurfactant produit par les deux souches sur milieu caroubier ;(b):biosurfactant produit par les deux souches sur milieu glucosé.	47

Liste des tableaux

Tableau I. Facteurs influençant le processus de bioremediation .	13
Tableau II .Principaux genres bactériens rhizosphérique dégradants les hydrocarbures	15
Tableau III . Espèces fongiques dégradant les hydrocarbures	16
Tableau IV. Caractéristiques biochimiques des souches du genre <i>Bacillus</i> .	28
Tableau V. Caractères culturels des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du blé dur.	37
Tableau VI. Caractères microscopiques de <i>Bacillus</i> sp.3 et <i>Bacillus</i> sp.4.	38
Tableau VII: Résultats de quelques paramètres physico-chimiques caractérisant la plante.....	40
Tableau VIII : Résultats de l'indice d'émulsification.....	41
Tableau IX : Résultats du pouvoir moussant.	43
Tableau X: Résultats de test effet nettoyant.	44
Tableau XI: Résultats des diamètres des microgouttelettes sur papier parafilm.	45
Tableau XII: Résultats de l'activité antibactérienne des biosurfactants.	47

Liste des abréviations

BS : Biosurfactant.

E24 : Index d'émulsification après 24 heures.

HCL : Chlorure d'hydrogène.

MH : Mueller Hinton.

He : Hauteur de l'émulsion.

Ht : Hauteur totale.

MES : Matière en suspension.

Tr : Tour.

MS : Matière sèche.

MF : Matière fraîche.

pH : Potentiel d'hydrogène.

HAM : Hydrocarbure aromatique monocyclique.

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique.

BTEX : Benzène, toluène, éthylbenzène et xylène.

ROS : Reactive oxygen species.

MVS : Matières volatils sèches.

HP : Hydrocarbure pétrolier.

Introduction

Introduction

Les hydrocarbures sont des composés organiques hautement polluants qui présentent des dangers importants pour la santé humaine ainsi que pour l'environnement. Certaines d'entre eux peuvent être extrêmement toxiques en raison de leurs propriétés mutagènes et/ou cancérogènes (Das et Chandran, 2011). Le processus de raffinage, ainsi que le stockage et le transport des produits pétroliers, constituent toutes des sources localisées de pollution des sols et des eaux (Chikere et *al.*, 2011). Face à ce défi majeur, il est essentiel d'explorer des solutions de dégradation naturelle et respectueuse de l'environnement, tel que l'utilisation des microorganismes notamment les bactéries.

La biodégradation des hydrocarbures est un processus naturel qui présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles de dégradation physico-chimiques. En effet, ces dernières peuvent être coûteuses, non écologiques, complexes et entraîner la destruction de la texture et des caractéristiques du sol, sans garantir une neutralisation complète des polluants. C'est ainsi que l'utilisation des méthodes biologiques basées sur l'emploi d'hydrocarbonoclastes, qui sont des microorganismes spécialisés dans la dégradation des hydrocarbures, offrent de multiples avantages. En effet, ces approches permettent non seulement de réduire les coûts associés à la dépollution, mais aussi de préserver l'environnement tout en garantissant une dégradation intégrale et efficace des polluants hydrocarbonés (Agarry et Ogunleye, 2012; Soltani, 2004).

Les bactéries rhizosphériques, qui résident dans la zone entourant les racines des plantes, jouent un rôle crucial dans la dégradation des hydrocarbures. Elles ont développé des mécanismes d'adaptation leur permettant de survivre dans des environnements contaminés par ces polluants, tout en utilisant ces hydrocarbures comme source de carbone (Abbasian et *al.*, 2015). Grâce à leurs enzymes spécifiques, elles sont capables de décomposer les hydrocarbures en composés moins toxiques, ce qui favorise la restauration des écosystèmes contaminés (Acevedo et *al.*, 2011). Ces bactéries sécrètent des biosurfactants dans leur environnement pour faciliter l'accès aux sources de nutriments, notamment les hydrocarbures dans le sol.

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles avec des parties hydrophobes et hydrophiles, sont principalement produits par des micro-organismes. Ils jouent un rôle essentiel dans la solubilisation et l'émulsion des hydrocarbures, facilitant ainsi leur dégradation par les microorganismes. De plus, les biosurfactants ont des propriétés tensioactives qui réduisent la tension superficielle des liquides, favorisant la dispersion et l'élimination des hydrocarbures (Singh et *al.*, 2007 ; Banat et *al.*, 2010).

Introduction

C'est dans ce contexte que le caroubier (*Ceratonia siliqua*) se révèle d'un intérêt particulier. Cette plante méditerranéenne est réputée pour sa richesse en composés bioactifs et constitue un environnement favorable à la croissance des bactéries. Le caroubier fournit des sources nutritives nécessaires, telles que des glucides, des lipides et des acides aminés, qui stimulent la synthèse de biosurfactants par les bactéries.

Notre objectif est d'étudier les bactéries rhizosphériques du genre *Bacillus* pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures et à produire des biosurfactants. En utilisant les fruits du caroubier comme sources de nutriments, vu leur richesse en sucres, vitamines, polyphénols et minéraux. Cela rentre dans le cadre de la valorisation des fruits de cet arbre qui est souvent négligé en Algérie.

Ce présent travail est organisé en trois parties distinctes. La première partie offre un aperçu bibliographique des sujets traités, incluant les hydrocarbures, leur biodégradation, les bactéries hydrocarbonoclastes, les biosurfactants et le caroubier. La deuxième partie présente la méthodologie expérimentale utilisée. Enfin, la dernière partie est dédiée aux résultats obtenus et à leur interprétation, suivie d'une conclusion et des perspectives.

Etude
Bibliographique

I Hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures sont fréquemment perçus comme une large catégorie de composés organiques. Toutefois, selon la définition de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA, 2014), les hydrocarbures sont des composés organiques ne contenant que du carbone et de l'hydrogène (Lefebvre, 1978). Les dérivés du pétrole sont une ressource énergétique essentielle pour l'industrie et la vie quotidienne. Toutefois, leur exploration, leur traitement, leur transport et leur stockage peuvent entraîner des impacts environnementaux importants (Hua et Wang, 2014)

I.1 Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques de structure très variée et possédant une formule brute de type C_nH_n , contenant les atomes de carbone et d'hydrogène avec parfois quelques atomes d'azote ne formant pas des groupements fonctionnels. Ils sont essentiellement utilisés comme carburant ; comme combustible et comme base pour la fabrication des huiles lubrifiantes. Ils constituent aussi la matière première des synthèses pétrochimiques (Lefebvre, 1978).

I.2 Classification des hydrocarbures

On distingue trois grandes catégories d'hydrocarbures :

I.2.1 Hydrocarbures aliphatiques saturés

Les hydrocarbures saturés également connus sous le nom d'alcanes dans lesquelles on trouve que des liaisons simples entre les atomes de carbone, ils sont répartis en deux groupes les alcanes non cycliques, qui correspondent aux alcanes linéaires ou ramifiés, et les alcanes cycliques (Lefebvre, 1978).

I.2.2 Hydrocarbures insaturés

Les hydrocarbures insaturés sont également appelés alcènes, selon qu'ils contiennent des liaisons doubles ou triples entre les atomes de carbone. Les alcènes, ont pour formule générale C_nH_{2n} . Les molécules contiennent une seule double liaison $C=C$. (Conia, 2002).

- **Hydrocarbures aromatiques**

Les hydrocarbures aromatiques présentent au moins un cycle benzénique dans leur structure moléculaire. Ils sont caractérisés par leur insaturation, car le noyau benzénique est constitué de six atomes de carbone liés par des liaisons simples et présente une insaturation équivalant à trois doubles liaisons (Lefebvre, 1978).

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est faible, composés de moins de quatre cycles, et les lourds composés de quatre noyaux et plus (Figure 1) (Samanta et al., 2002).

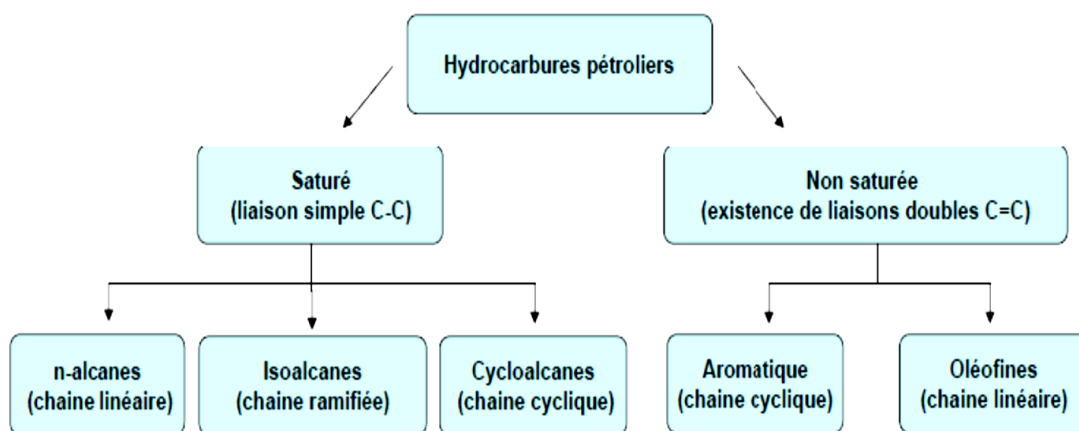


Figure 1. Classification des hydrocarbures (Inceet Ince, 2020).

I.3 Propriétés physico-chimiques

Les hydrocarbures pétroliers sont des composés organiques peu miscibles avec l'eau, qui ont une faible pression de vapeur et une capacité élevée à s'adsorber sur les sols et les matières particulaires (Johnsen et al., 2005). Leur structure moléculaire influe sur leurs propriétés physico-chimiques, qui les rendent résistants à la dégradation naturelle (Gschwend et Hites 2007).

- **Densité**

La densité d'une substance représente sa masse en fonction de son volume, et joue un rôle clé dans l'infiltration des fluides dans le sol par gravité (Torabzadeh et Handy, 1984). Pour les hydrocarbures, la densité est un facteur crucial pour contrôler leur mobilité dans le sol. La température est l'un des principaux facteurs qui affectent la densité (Wang et al., 2021).

- **Viscosité**

La viscosité est la mesure de la résistance d'un fluide, qui peut être affectée par la température et joue un rôle crucial dans le processus d'évaporation des hydrocarbures (Nicolas *et al.*, 2015). À mesure que la température augmente, la viscosité diminue, ce qui peut entraîner une évaporation et une propagation plus rapides des hydrocarbures (Fingas, 2016).

- **Solubilité**

La solubilité des hydrocarbures pétroliers dans l'eau dépend de leur proportion d'hydrocarbures légers, car ceux-ci sont les plus solubles. Certains considèrent que la solubilité est importante pour la biodisponibilité des hydrocarbures face aux attaques microbiennes (Grimberget *et al.*, 1996).

I.4 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

Lorsque les hydrocarbures pétroliers sont libérés dans l'environnement, ils sont soumis à de nombreux processus chimiques, physiques et biologiques qui peuvent altérer leur composition (Colombo *et al.*, 2015). Ces processus peuvent inclure la volatilisation, adsorption, émulsification et Photo-oxydation (**Figure 2**).

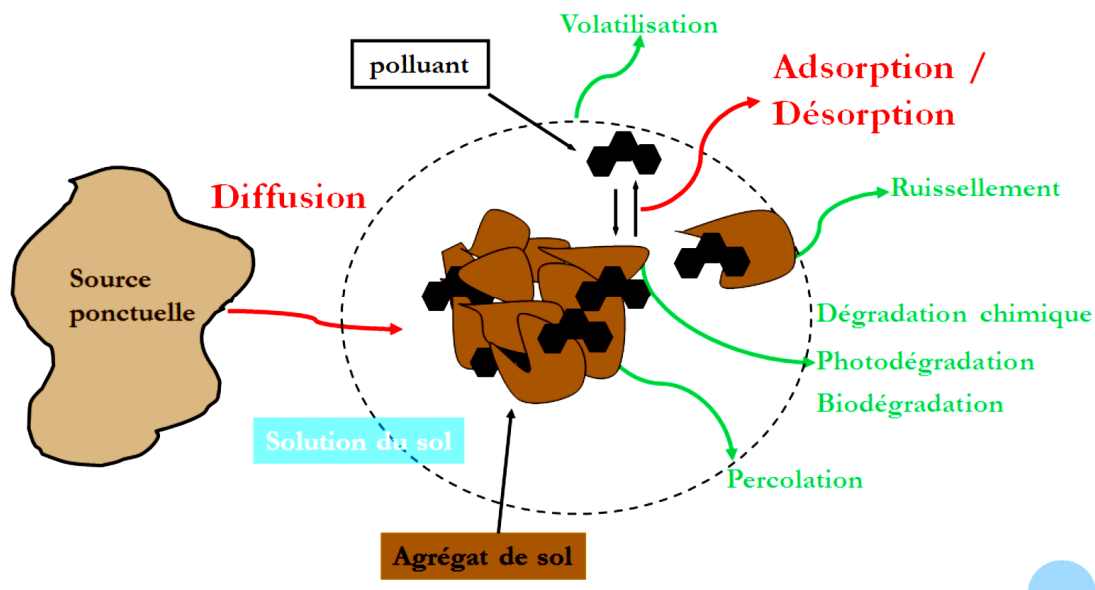


Figure 2. Comportement physique et biochimique des hydrocarbures pétroliers dans le sol (Adipah, 2019)

- **Adsorption**

Les hydrocarbures sont constitués de molécules qui ont la propriété d'être retenues à la surface de certains corps solides, ce qu'on appelle l'adsorption. On distingue deux mécanismes d'adsorption physique et chimique. La première peut être réversible, tandis que la seconde est une adsorption irréversible (Saada et *al.*, 2005). Cette adsorption dépend de nombreuses conditions environnementales (température, le pH, d'humidité, etc.) ainsi que des caractéristiques du polluant (sa solubilité, sa masse moléculaire, son âge, etc..) et aussi les propriétés du sol (sa granulométrie, sa minéralogie, etc.) (Khan et *al.*, 2018).

- **Dissolution**

La capacité des hydrocarbures à se dissoudre dans l'eau dépend de leur structure moléculaire, de leur polarité et de leur solubilité. En général, les hydrocarbures aromatiques ont une plus grande solubilité que les hydrocarbures aliphatiques. De plus, la solubilité diminue avec le nombre de carbones dans la molécule, et les hydrocarbures les plus légers sont les plus solubles (Colombo et *al.*, 2015).

- **Emulsification**

L'émulsification est un procédé qui consiste à incorporer des gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers, Il existe deux types d'émulsions qui peuvent se former : la première est une émulsion eau-dans-huile ; où des gouttelettes d'eau sont incorporées dans les hydrocarbures, et l'émulsion huile-dans-eau, où des gouttelettes d'hydrocarbures sont dispersées dans l'eau. Ces émulsions peuvent modifier les propriétés physiques des hydrocarbures et augmenter le volume de produit déversé, ce qui peut aggraver la pollution (Fingas, 2013).

- **Biodégradation**

La biodégradation est un processus clé dans lequel les micro-organismes sont utilisés pour châtier la dégradation naturelle des contaminants (Yuniat, 2018).

La dégradation biologique est influencée par de multiples facteurs qui interagissent de manière vitale et souvent divergente entre les micro-organismes et d'autres paramètres environnementaux (Amrane et *al.*, 2022).

I.5 Impact des hydrocarbures sur l'environnement

I.5.1 Effets des hydrocarbures sur le sol

Les hydrocarbures altèrent la structure et les fonctions des sols en impactant leur humidité, pH, carbone organique, azote, potassium et l'activités enzymatiques (Polyak *et al.*, 2008 ; Wei et Li, 2018 ; Barua *et al.*, 2011 ; Kumari *et al.*, 2018) . Plus les concentrations des polluants augmentent, plus la teneur en argile des sols contaminés augmente (Osuji *et al.*, 2006) , ce qui empêche l'aération de la partie rhizosphérique , provoquant ainsi la diminution de la perméabilité (Sharma, 2021). La pollution du sol par les hydrocarbures peut provoquer la contamination des sources d'eau souterraines, causant ainsi une pollution organique. Cette situation peut également engendrer une diminution de la productivité des sols agricoles (Wang *et al.*, 2008; Thapa *et al.*, 2012). Certaines études révèlent que le principal contaminant qui cause la salinisation et l'acidification du sol est le benzo[a]pyrène, qui est présent dans le pétrole (Buzmakov et Khotyanovskaya, 2020).

I.5.2 Effets des hydrocarbures sur la santé humain

Les humains peuvent être confrontés à des problèmes de santé importants dus à l'exposition au pétrole et à ses dérivés, que ce soit par contact direct avec la peau ou inhalation d'air pollué, ou par contact indirect à travers la consommation d'aliments contaminés ou la baignade dans de l'eau contaminée (Kuppusamy *et al.*, 2020). L'aspiration peut causer une pneumonie mortelle, l'exposition cutanée peut causer des brûlures, des blessures et une dermatite irritative (Tormoehlen *et al.*, 2014). L'ingestion de grandes quantités d'hydrocarbures peut causer une intoxication aiguë, entraînant des symptômes graves tels que des maux de tête, des vomissements, une confusion, un coma et même la mort. L'exposition prolongée à ces substances peut également entraîner des dommages au système nerveux, au foie et aux fonctions rénales (Haller et Jounsson, 2020). En outre, ces substances peuvent générer un excès d'oxygène réactif (ROS) dans le corps, qui est un facteur contribuant au développement des cancers (Tormoehlen *et al.*, 2014). Les femmes sont également plus susceptibles de subir des fausses couches (O'Callaghan-Gordo *et al.*, 2016).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent plusieurs autres effets toxicologiques, notamment la mutagénicité, la génotoxicité, la cardiotoxicité, la cytotoxicité et la tératogénicité (Pattabhiramaiah *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2020 ; Premnath *et al.*, 2021).

I.5.3 Effets des hydrocarbures sur les végétaux

Les polluants pétroliers peuvent affecter la croissance des plantes, réduisant la germination, la hauteur, la superficie des feuilles et le rendement en matière sèche. Les plantes peuvent absorber les polluants du sol et les transporter à travers le système vasculaire, modifiant la longueur des tiges, la racine et la surface foliaire. La teneur en chlorophylle est également réduite dans les sols contaminés (Uzoho *et al.*, 2006 ;Hou *et al.*, 2021; Steliga et Kluk, 2020).

II Bioremediation des sols pollués

Les hydrocarbures pétroliers lorsqu'ils sont introduits dans l'environnement en quantité anormale, sont considérés comme des contaminants, car ont un effet délétère sur la faune, la flore, le sol, l'air, etc. ainsi que des dommages extrêmement importants sur l'écosystème. Selon le degré de pollutions qu'ils peuvent causer dans les différents compartiments de l'environnement, et des risques sur la santé humaine, des techniques de dépollutions doivent être mises en œuvre. La détoxification peut être activée à travers quatre grands types de méthodes, associant éventuellement la combinaison de plusieurs techniques (Gan *et al.*, 2009). On trouve :

- **Les méthodes physiques** : consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides (eau ou gaz) pour le transport.
- **Les méthodes chimiques** : font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation, etc.) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement.
- **Les méthodes thermiques** : consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire.

Cependant, de nombreux inconvénients sont associés à ces techniques qui nécessitent des méthodes mécaniques laborieuses. De plus, ces méthodes mécaniques sont fastidieuses, prennent du temps et ne sont capables d'éliminer les contaminants pétroliers que dans une certaine limite, laissant derrière elles une grande quantité d'huile adsorbée dans le sol (Lim *et al.*, 2016).

Un défi auquel sont confrontés les scientifiques aujourd'hui, est de s'attaquer à ce problème de dégradation des contaminants d'une manière sûre et respectueuse à l'environnement avec des implications rationnelles sur les coûts. Une technique intéressante et intensivement étudiée est la bioremediation, qui a pour avantage indéniable qu'elle est naturelle, qu'elle n'implique aucune intervention humaine, et donc aucun effet supplémentaire sur la flore, et surtout qu'elle est moins chère (Russell, 1992). Son inconvénient majeur est qu'elle peut être très lente. Le challenge est donc d'accélérer ce processus naturel (Megharaj *et al.*, 2011).

II.1 Principe de la bioremediation

Les activités de bioremediation ont été remarquées pour la première fois chez les Romains vers 600 av. La bioremediation a été officiellement inventée par George Robinson lorsqu'il a utilisé les microorganismes pour dégrader une marée noire sur la côte de Santa Barbara en Californie à la fin des années 1960. Elle est décrite comme l'utilisation des microorganismes pour détruire ou immobiliser les déchets toxiques. Ce processus de désintoxification cible les produits chimiques nocifs, par minéralisation, transformation ou altération (Adams et al., 2015). Présents dans le sol, l'air, les sédiments, etc. Les microorganismes utilisent les contaminants comme source d'énergie, puis l'intégrer directement dans leurs réactions métaboliques à la place d'un élément chimique proche utilisé habituellement (Ambaye et al., 2022). Lorsque la détoxification des déchets est effectuée sur le site contaminé, on parle de bioremediation *in-situ*. Au contraire, lorsque la détoxification des déchets se fait en dehors du site d'origine de la contamination, on parle de bioremediation *ex-situ* (Maitra, 2018). Cette fameuse technologie est appliquée sur des sites contaminés en utilisant des technologies pour améliorer les processus de biodégradation (Azubuike et al., 2016).

II.2 Techniques de biodégradations

Il y a eu progrès récents dans les techniques de bioremediation afin de restaurer efficacement les environnements pollués. Elles sont considérées en fonction du type du polluant, le degré et la profondeur de contamination, l'emplacement géologique de pollution et aussi selon le coût de détoxification.

II.2.1 In-situ

Implique le traitement de la matière polluée sur le site contaminé. Est un processus utilisé lorsque la pollution est profonde dans le sol par des contaminants souvent volatiles. La transformation se fait dans des conditions naturelles en dioxyde de carbone et en eau il s'agit d'une approche peu coûteuse, nécessite peu d'entretien et respectueuse de l'environnement (Azubuike et al., 2016). On trouve différentes techniques de biorestauration *in-situ*, mais les plus exploitées sont décrites ci-dessous :

- **Bioaugmentation**

Est un concept qui est basé sur la culture de la biomasse à partir d'une fraction d'un sol contaminé et l'utilisation ultérieure comme inoculum pour la Bioaugmentation du même sol (Santanu, 2018).

Les microorganismes adaptés par exposition antérieure à la dégradation des polluants organiques tels que les hydrocarbures, peuvent être une source de microorganismes pour assainir les sols fraîchement contaminés ainsi que pour compléter les populations autochtones. Cette technique repose sur l'addition d'une souche bactérienne pure pré-adaptée, ajout d'un consortium pré-adapté, ou par introduction de bactéries génétiquement modifiées (Adams et *al.*, 2015) (**Figure 3**).

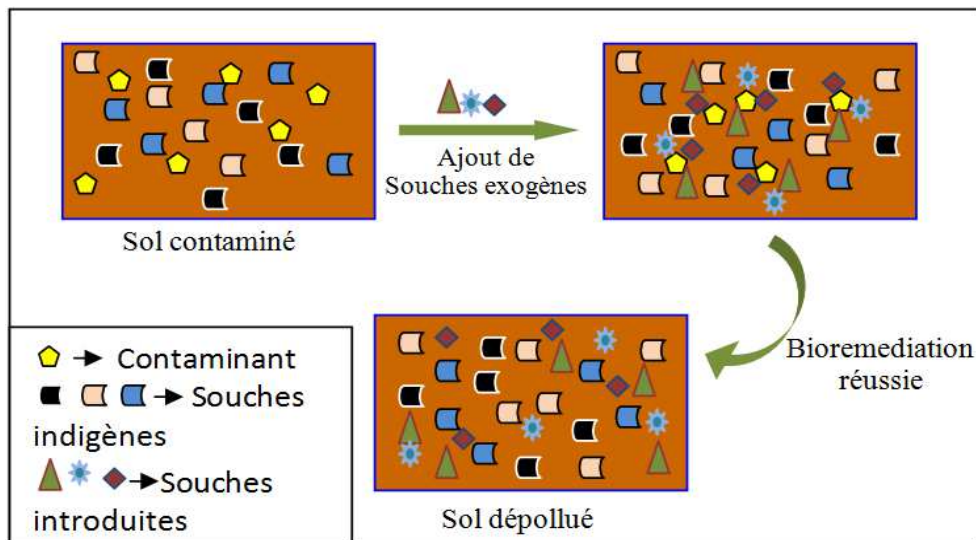


Figure 3. Schéma récapitulatif du principe de bioaugmentation(Adams et *al.*, 2015).

- **Biostimulation**

La biostimulation implique des modifications de l'environnement par l'ajout de diverses formes de nutriments limitant et d'accepteurs d'électrons, tels que le phosphore, l'azote, l'oxygène ou le carbone qui sont par ailleurs disponibles en quantités suffisamment faible limitant ensuite l'activité microbienne, afin d'augmenter l'activité des microorganismes naturels disponibles pour la bioremédiation. Ces nutriments peuvent être de nature organique ou inorganique (**Figure 4**).

Il a été estimé que la biostimulation peut être considérée comme une technique d'assainissement appropriée pour l'élimination des polluants pétroliers dans le sol, et nécessite l'évaluation à la fois des capacités de dégradations intrinsèques de la microflore autochtone, et des paramètres environnementaux impliqués dans la cinétique du processus *in-situ*.

Le principal avantage de cette méthode est que la biorestoration sera entreprise par des microorganismes indigènes déjà présents, et qui sont bien adaptés à l'environnement

souterrain et bien repartis spatialement dans le sous-sol. Cependant elle peut être limitée par de nombreux facteurs, y compris les nutriments, le pH, la température, l'humidité, l'oxygène, les propriétés du sol et la présence des contaminants (Adams et al ,2015).

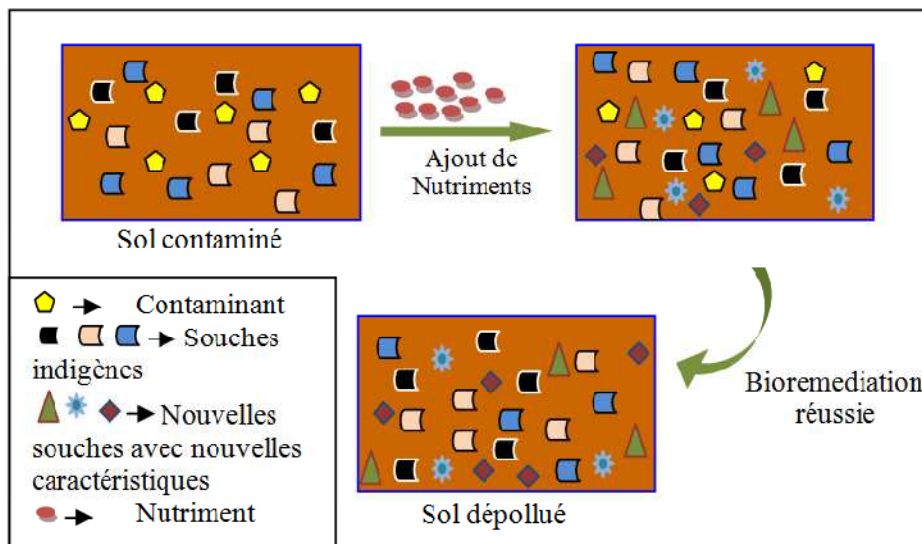


Figure 4.Schéma récapitulatif du principe de biostimulation(Adams et al ,2015).

- **Bioatténuation**

Présente la dégradation des contaminants dans les sites de contamination d'une façon naturelle et sans ajouts de nutriments ou d'autres espèces de microorganismes. Les procédés d'atténuation naturels sont spécifiques aux contaminants, acceptés comme méthode de traitement des composants des combustibles, mais pas pour de nombreuses autres classes. Les temps nécessaire à l'atténuation naturelle varient considérablement selon les conditions du site (Santanu, 2018).

II.2.2 Ex-situ

Ce modèle consiste à creuser des polluants à partir du site pollué ; puis les transporter vers d'autres sites pour le traitement (usines...), seuls dans le processus ex-situ permet un meilleur control des paramètres d'incubation (température, pH, humidité, etc.) (Mouginet *al.*, 2009).Ce processus se compose de différents techniques (Biopiling, landfarming, ; bioréacteur, etc.).

II.3 Facteurs influençant la dégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement est largement affectée par des facteurs abiotiques et biotiques. Les microorganismes peuvent résister à des fluctuations assez importantes des conditions environnementales. Les divers facteurs qui influencent les taux de croissance et les activités enzymatiques des microbes affectent également les taux de dégradation des déchets.

Tableau I. Facteurs influençant le processus de bioremediation (Sarojet *al.*, 2022).

Facteurs	Remarques
Facteurs biologiques	Les microorganismes du sol en compétition pour le carbone favorisent la dégradation des composés organiques. Les enzymes des microorganismes doivent être impliquées dans le métabolisme des contaminants pour une meilleure dégradation.
Oxygène	La plupart des organismes vivants utilisent l'oxygène pour survivre ; pour ceci la décomposition des contaminants se réalise en anaérobiose. Dans le cas de la détoxification des hydrocarbures ça implique l'ajout d'oxygène.
Humidité	Ce facteur joue un rôle majeur dans la croissance microbienne, aussi lorsqu'il est en quantité insuffisante ; les agents de biodégradation ne fonctionnent pas aussi bien.
Nutriments	Les nutriments influencent la croissance microbienne et la biodégradation. En faible concentration, la dégradation des contaminants est limitée, mais en ajoutant des nutriments, surtout dans des environnements froids, on peut améliorer la bioremediation.
Température	Dans les climats froids, la détoxification des polluants est lente, ce qui met une pression sur les microbes pour les éliminer. Les températures basses ralentissent le renouvellement métabolique des enzymes de dégradation, et l'eau gelée bloque les canaux de transport des microbes. Chaque composé nécessite une température spécifique pour être minéralisé.
pH	L'acidité, l'alcalinité et la basicité d'un composé affecte le microbien ainsi que le processus d'élimination. Même les changements mineurs de pH ont un impact significatif sur les processus métaboliques.
Caractérisation du site contaminé	Il est crucial de réaliser des enquêtes correctives pour évaluer la contamination. Cela implique de déterminer la portée horizontale et verticale de la contamination, de définir les paramètres et les sites d'échantillonnage, ainsi que de décrire les méthodes d'échantillonnage et d'analyse.

II.4 Bioremediation des hydrocarbures par les microorganismes

C'est la décomposition des contaminants organiques (hydrocarbures) par les microorganismes en composés moins toxiques à travers des processus métaboliques ou enzymatiques. La contamination par les hydrocarbures pétroliers est souvent composée d'un mélange d'hydrocarbures aliphatiques saturés (alcanes) et aromatiques (dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques, HAP). Les micro-organismes peuvent dégrader pratiquement tous les hydrocarbures présents dans le pétrole par diverses voies, bien qu'avec des efficacités différentes (Sara *et al.*, 2018). Le processus de dégradation dépend de la concentration ; la composition et la nature de l'hydrocarbure. Dans ce processus ; les composés sont dégradés par anaérobie et aérobie spécifique. Par exemple, les hydrocarbures aliphatiques ont un taux de dégradation plus élevé que les hydrocarbures aromatiques (HAP) ; en raison de leur moindre complexité structurale et leur faible poids moléculaire (Ambaye *et al.*, 2022). Les bactéries et les champignons sont relativement abondants dans le sol ; les membres des deux groupes contribuent à la dégradation des hydrocarbures. La fraction de la communauté hétérotrophe totale de bactéries et de champignons permet une meilleure restauration d'un sol contaminé, par opposition à l'efficacité d'un organisme individuel (Subhash *et al.*, 2012).

II.4.1 Microorganismes hydrocarbonoclastes

II.4.1.1 Bactéries

Les bactéries sont les plus impliquées et les plus actives dans la dégradation des déchets pétrochimiques. Les travaux menés sur la bioremediation des sols durant les deux dernières décennies ont permis l'isolement et l'identification d'une grande variété de souches capables de métaboliser les HAP. Cette diversité regroupe aussi bien des bactéries « Gram négatives » (Gram (-)) que des bactéries « Gram positives » (Gram (+)). Il a été démontré que de nombreuses bactéries spécifiques du phylum *Actinobacteria* et *Proteobacteria* ; dégradent les hydrocarbures aromatiques aliphatiques et polycycliques (HAP) Tableau II. Toutefois, les différentes souches isolées appartiennent souvent à un nombre plus restreint de taxons, comprenant essentiellement les *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Técher, 2011). On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies, des anaérobies, des mésophiles, des psychrophiles et des thermophiles. Dans le tableau ci-dessous on retrouve les principaux genres bactériens dégradant les hydrocarbures isolés du sol.

Tableau III. Principaux genres bactériens rhizosphérique dégradants les hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990 ; Cerniglia, 1992).

Gram	Clades	Genres
Gram (-)	<i>α- Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas, Achromobacter, Agrobacterium.</i>
	<i>β- Proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes, Burkholderia, Comamonas, Polaromonas, Ralstonia, Rhizobium</i>
	<i>γ- Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas, Acinetobacter, Klebsiella, Stenotrophomonas, Haemophilus</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>
Gram (+)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter; Rhodococcus Micrococcus, Mycobacterium, Terrabacter, Gordonia</i>
	<i>Nocardioides</i>	<i>Nocardia</i>
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus, Paenibacillus</i>

II.4.1.2 Champignons

Les champignons sont considérés plus efficaces que les bactéries, car grâce à leur mycélium et à la croissance des hyphes ; leur permet une meilleure propagation dans le sol et un contact facile avec les hydrocarbures. La production d'une large gamme d'enzymes hydrolytiques extracellulaires favorisent la dégradation des hydrocarbures à grande échelle (Subhashet *al.*, 2012). Les basidiomycètes ectomycorhiziens et saprotrophes (champignons de la pourriture blanche et brune) ont montré une remarquable capacité *in vitro* de dégradation des HAP et des composés phénoliques.

Parmi les genres qui ont démontrés une efficacité de biorestauration des sols ; on trouve : *Amorphoteca, Neosartorya, Talaromyces, Graphium, Candida, Yarrowia, Pichia, Aspergillus, Cephalosporium, Pencillium, Cunninghamella, Fusarium, Mucor, Phanerochaete, Rhodotorula, Sporobolomyceset Trichoderma.*

Tableau IV. Espèces fongiques dégradant les hydrocarbures (Chaillan *et al.*, 2004; Singh, 2006)

Genre	Espèce	Hydrocarbures
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavipes</i>	HA, asphltène, résines
<i>Penicillium</i>	<i>Penicellium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
<i>Trametes</i>	<i>Trametes versicolor</i>	Benzo[a]pyrène, Anthracène
<i>Eupenicillium</i>	<i>Eupinecillium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
<i>Emericella</i>	<i>Emericella nidulans</i>	HA, asphltène, résines

II.4.2 Mécanisme bactérien de dégradation des hydrocarbures

La majorité des composés organiques polluants se dégradent dans les conditions aérobies ; l'incorporation des polluants à l'intérieur des cellules déclenche le processus oxydatif qui est la réaction enzymatique catalysée par les enzymes : oxygénase, peroxydase, les déshydrogénases, cytochrome P450 (Cabral *et al.* .) la fixation microbienne aux substrats, et la production des biosurfactants sont des systèmes utilisés pour remédier la dégradation des PHS (Jérémy *etal.*, 2022). Le mécanisme de production des biosurfactants est bien étudié, car ces derniers sont des agents émulsifiants et des tension-actifs. Ce qui résulte la réduction des tensions superficielles entre les parties hydrophobes en formant des micelles, puis les microgouttelettes encapsulées à la surface des cellules microbiennes hydrophobes ; sont prises à l'intérieur et dégradées (Subhash *et al.*, 2012). Sur le plan génétique de la cellule, l'ADN plasmidique est une forme mobile, et peut transférer la capacité oxydatif et solubilisant des hydrocarbures d'un organisme à un autre. De nombreuses voies cataboliques sont spécifiées par des plasmides, et sont transférés latéralement, en améliorant le potentiel métabolique des membres d'un écosystème.

Certaines bactéries ont développées un système de chimiotactisme à travers des chimiorécepteurs ; pour recevoir le signal de la zone contaminée. La bactérie se déplace en fonction de la concentration du polluant (**Figure 5**).

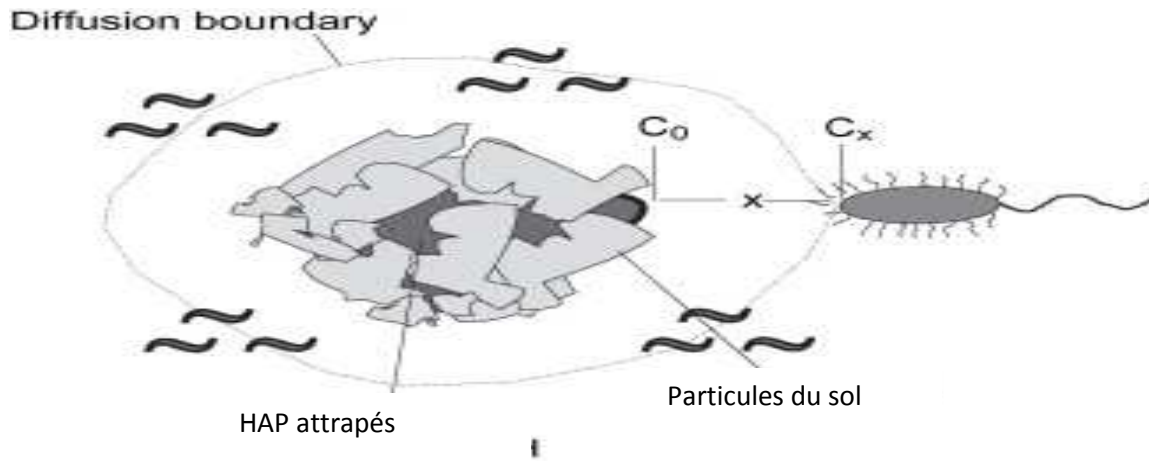


Figure 5. Dessin schématique d'une bactérie dégradant les HAP se développant à proximité d'un sol emprisonné de HAP. C_0 est la concentration en HAP à la surface de la particule, C_x est la concentration au niveau des cellules et x est la longueur du trajet de diffusion.

II.5 Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures

- **Composition physique et chimique des hydrocarbures**

La sensibilité des hydrocarbures à la biodégradation est déterminée par la structure et le poids moléculaire de la molécule. Les n-alcanes de longueur de chaînes intermédiaires (C10-C24) sont dégradés le plus rapidement, ceux à courte chaîne (moins C9) sont toxiques pour les microorganismes, mais étant volatiles, sont généralement perdus dans l'atmosphère.

Les alcanes à longues chaînes sont résistants à la biodégradation. Les hydrocarbures poly aromatiques sont généralement dégradés lentement par rapport aux autres composés

En plus de l'état physique, la biodisponibilité, la concentration, l'hydrophobicité ainsi que la solubilité de ces composés organiques, influencent sur l'étendue de la biorestauration. Il a été démontré que le taux de dégradation est plus élevé chez les composés saturés suivis des aromatiques légers.

- **Température**

La température joue un rôle essentiel dans la bioremediation, elle affecte à la fois l'état physique et chimique des hydrocarbures, présents dans le site pollué, ainsi que la diversité de la flore microbienne (Sunta et al., 2017) Bien que la biodégradation puisse se produire sur une large gamme de température. Les températures élevées augmentent la solubilité des polluants hydrophobes, diminuent la viscosité et améliorent la diffusion dans le sol.

A basses température, la solubilité des hydrocarbures et la volatilisation des alcanes toxiques à chaîne courte se réduit et leur solubilité dans l'eau diminue, ce qui retarde le début de la biodégradation (Subhash *et al.*, 2012).

- **Nutriments**

L'azote, le phosphore et le fer sont des ingrédients nécessaires pour la biodégradation, ils peuvent être des facteurs limitants pour la croissance des populations de dépollution, sans oublier le carbone qui est un facteur très essentiel pour la majorité des bactéries (Subhash *et al.*, 2012)..

II.6 La Bioinformatique dans la biorestauration

Avec l'évolution de la technologie, l'outil de bioinformatique a permis de mieux interpréter les données issues d'une base de données biologique comme, les composés organiques, les enzymes catalytiques et les voies de dégradation microbiennes des déchets suivis de la génomique, afin de comprendre l'aspect génétique lors de la dégradation ; des déchets (l'expression en ARN et ADN), ce qui a facilité l'étude sur la bioremediation des environnements pollués, ainsi que développer la technologie de nettoyage.

Concernant les microorganismes effectuant la dégradation ont été cartographiés par la bioinformatique, et à l'aide des approches de la protéomique tel que l'électrophorèse sur le gel en polyacrylamide, les spectrométries de masse, etc. ont permis d'expliquer et d'approfondir la recherche sur le processus microbien qui se déroule lors de la détoxification, et la caractérisation structurale des protéines microbiennes. Ce qui a franchi les frontières entre la biologie et l'informatique (Saroj *et al.*, 2022).

II.7 Biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par une grande variété de microorganismes (bactéries, levures, algues et champignons) (Roy, 2017), Ces agents ont de nombreux avantages par rapport aux tensioactifs synthétiques, notamment une toxicité moindre, une biodégradabilité accrue et une compatibilité écologique importante (Sharma, 2021).

Leurs applications ont été étendues à de nombreux domaines, tels que l'industrie alimentaire, pharmaceutique et pétrolière, ainsi que dans le domaine de bioremediation où ils peuvent être utilisés comme une alternative plus durable aux produits chimiques tensioactifs synthétiques

(Gakpe *et al.*, 2007). Ils ont une affinité pour les milieux non polaires comme les huiles et les graisses. Ils présentent la propriété de réduire la tension interfaciale en se fixant à l'interface de deux composés non miscibles (Banat *et al.*, 2021 ; Desai et Banat, 1997).

II.7.1 Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés qui peuvent être classés selon leur structure chimique et leur origine microbienne. Ils peuvent également être catégorisés en trois types en fonction de la présence de groupes chimiques spécifiques. De plus, les biosurfactants sont généralement divisés en deux catégories basées sur leur poids moléculaire : les surfactants de faible masse, qui comprennent les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides et les surfactants de haute masse, tels que les polymères et les particules tensioactifs (Shoeb *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

II.7.2 Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par une variété de micro-organismes, notamment des levures, des champignons filamenteux et des bactéries, à partir de différents substrats tels que les hydrates de carbone, les huiles et les hydrocarbures (Ciurko *et al.*, 2022). Ces micro-organismes sont capables de synthétiser ces composés à l'extérieur de la cellule ou à l'intérieur de la membrane cellulaire (Gakpe *et al.*, 2007). Les micro-organismes producteurs de biosurfactants habitent dans une grande variété d'habitats, tels que des milieux aquatiques et terrestres, ainsi que des environnements extrêmes (Santos *et al.*, 2016). Sont également présents sur les tissus végétaux, dans les jus de fruits et dans le nectar (Konishi *et al.*, 2014), mais sont souvent trouvés dans des sols contaminés par le pétrole ou dans des déchets industriels (Banat *et al.*, 2010).

Les genres les plus fréquemment associés à la production de différents types de biosurfactants sont *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* et *Candida* (Singh *et al.*, 2018).

II.7.3 Paramètres influençant la production

- **Influence de la source de carbone**

La nature du substrat carboné a un impact sur la quantité et la qualité de la production de biosurfactants (Rahaman et Gakpe, 2008). Plusieurs sources de substrats carbonés ont été signalées comme étant favorables à la production de biosurfactants, telles que le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose et le glycérol (Desai et Banat, 1997).

- **Nutriments**

Les micronutriments, ainsi que les minéraux macronutriments sont des composants essentiels du milieu de culture. Les producteurs de biosurfactants utilisent couramment des micronutriments tels que le cuivre (Cu), le cobalt (Co), le zinc (Zn), le molybdène (Mo) et le bore (B), en quantités inférieures à 0,1% du volume total (Nurfarahin *et al.*, 2018).

- **Température et pH**

L'optimisation du processus biologique est essentielle pour obtenir de grandes quantités de biosurfactants, car la température, le pH, peuvent avoir un impact sur le produit final. La plupart des productions de biosurfactants ont lieu dans une plage de température de 25 à 30°C. Le pH joue également un rôle important dans la production de biosurfactants.

II.7.4 Propriétés des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules actives et qui ont des propriétés polyvalentes, connus sous le nom des tensio-actifs biologiques puisque ils permettent la réduction des tensions superficielles et inter faciales. En plus de cette caractéristique on trouve d'autres propriétés qui ont un lien avec les critères de performance de ces molécules. Ils sont plus efficaces que ; les surfactants chimiques car leur concentration critique en micelles est plusieurs fois inférieure, donc pour une diminution maximale de tension superficielle, il faut moins de biosurfactants (Constantina et Samiul, 2020).

- **La réduction des tensions de surfaces :** Le biosurfactant s'accumule sur les surfaces deux composants non miscibles afin d'augmenter l'interaction entre eux.
- **Emulsification :** Est une forme de dispersion entre une phase aqueuse et un hydrocarbure qui conduit à la formation de petites gouttelettes de graisse dispersées dans l'eau(Deepansh, 2021).
- **Formation des micelles.**
- **Formation de la mousse.**
- **Solubilisation des hydrocarbures :** La production de biosurfactants initie des changements structurels sur la surface bactérienne et augmente la disponibilité des hydrocarbures.

Les biosurfactants dès leur découverte, ils ont été exploités dans plusieurs domaines que ce soit industriel, pharmaceutique, agricole et aussi dans l'environnement comme agent de dépollution.

III Le caroubier : caractères généraux

Le mot caroubier vient de l'arabe *El kharroub*. Il est connu sous le nom scientifique de *Ceratonia siliqua* L. Est un arbre typiquement méditerranéen qui croît sous les climats chauds et peut atteindre une quinzaine de mètres de hauteur. Il possède une cime très étalée et arrondie. Le tronc est épais, très crevassé, tortueux comme l'olivier, car le caroubier pousse aussi lentement et vit longtemps, jusqu'à 500 ans avec un tronc dont la base peut atteindre 2 à 3 mètres de circonférence. Son bois est blanc-jaunâtre lorsqu'il est jeune et devient rose veiné puis rouge foncé et dur en vieillissant. Il est très apprécié en ébénisterie, marqueterie, armurerie, charonnage et aussi pour la fabrication du charbon. La floraison chez le caroubier a lieu en automne sur le bois de deux ans et les vieux bois. Cette espèce est considérée comme la seule dans la région méditerranéenne qui fleurisse en été (Figure 6).

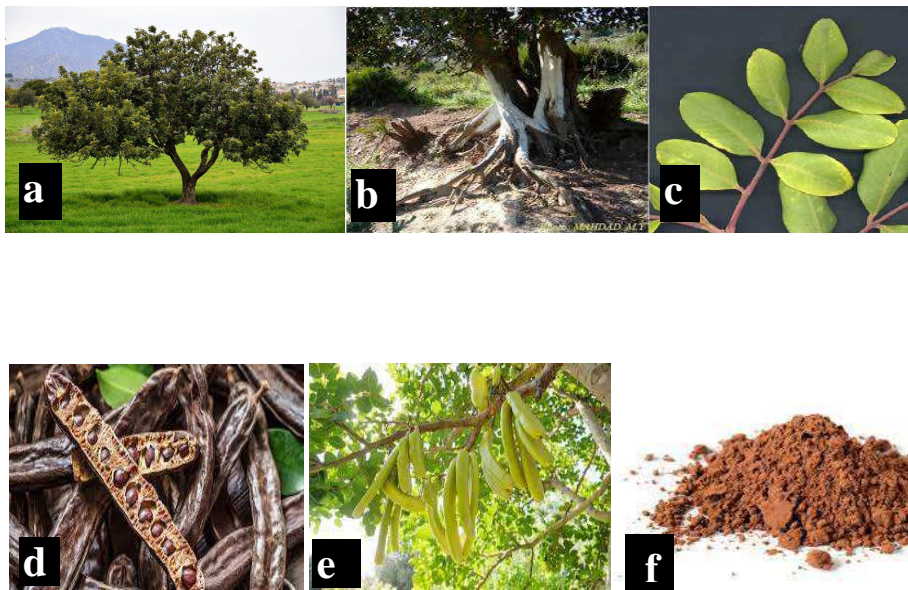


Figure 6 .Présentation générale de différentes parties d'un arbre de Caroubier (Batlle et Tous, 1997).

(a) : arbre du caroubier ; (b) : Système racinaire de l'arbre du caroubier ; (c) : Feuilles de l'arbre du caroubier ; (d, e) : Fruit de l'arbre du caroubier sec et frais ; (f) : Poudre du fruit de caroubie.

III.1 Exigences écologiques

On le rencontre à l'état naturel principalement en Espagne, Portugal, Maroc, Grèce, Italie, Turquie, Algérie, Tunisie, Égypte, et Chypre. Il a été introduit aussi en Australie, en Afrique du Sud, aux États-Unis et en Amérique du Sud, (Sbay et Abourouh, 2006).

Il n'a pas d'exigence particulière vis-à-vis de la nature du sol, l'arbre peut prospérer dans les terrains les plus divers (Morton, 1987), depuis les terres d'alluvion les plus riches jusque sur les rochers les plus arides. Le caroubier préfère les sols calcaires, bien drainés et aérés et pas trop argileux.

Les zones propices à la culture du caroubier doivent être caractérisées par un climat méditerranéen subtropical, avec des hivers doux, des printemps suaves à chauds et été chauds à très chauds et secs (Batlle et Tous, 1997). Le caroubier est un arbre xérophile, pouvant survivre sous des climats secs et sans irrigations.

III.2 Composition chimique

La gousse du caroubier est principalement constituée de pulpe et de graines, qui représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. D'après plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe varie généralement en fonction du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (Albanell et al., 1991).

La gousse du caroubier est riche en glucides, notamment en sucres hydrolysables tels que le saccharose (34%), le D-glucose (64%) et le D-fructose (6%). En revanche, sa teneur en lipides est faible, ne représentant que 3% de sa composition. Il est important de noter que la gousse du caroubier présente une valeur énergétique élevée, atteignant 17,5 kJ par gramme de matière sèche (Biner et al., 2007).

La pulpe se distingue par sa teneur élevée en sucres, constituant environ 40 à 60% de sa composition globale. Parmi ces sucres, on trouve principalement du saccharose (27-40%), du fructose (3-8%) et du glucose (3-5%), qui contribuent tous à sa saveur caractéristique. En revanche, la pulpe présente une faible teneur en lipides (0,4-0,6%) et en protéines (2-6%) (Avallone et al., 1997). En plus de cela, la pulpe se distingue par sa teneur particulièrement élevée en fibres, représentant environ 27 à 50% de sa composition. Elle contient également une quantité significative de tanins (Saura-Calixto, 1988).

La graine présente une composition chimique avec une faible teneur en minéraux, en fibres et en protéines. Cependant, elle renferme une quantité notable de lipides (**Bouzouita et al., 2007**).

III.3 Domaines d'utilisation du caroubier

Ceratonia siliqua. C'est un arbre qui sur le plan socio-économique et écologique peut jouer un rôle plus intéressants particulièrement dans les contrées sèches et dans les zones où les processus de désertification prennent des ampleurs de plus en plus alarmantes, notamment dans le bassin méditerranéen. Le caroubier présente un intérêt de plus en plus grandissant en raison non seulement de sa rusticité, de son indifférence vis-à-vis de la nature du sol, de son bois de qualité, de sa valeur ornementale et paysagère, mais surtout pour ses graines qui font l'objet de transactions commerciales dont la valeur dépasse de loin celle de la production ligneuse (Ait Chitt et al, 2007).

III.3.1 Intérêt économique

Le caroubier occupe une place d'une grande importance sur les plans écologique, industriel et ornemental. Il est considéré comme un arbre polyvalent, offrant une utilité remarquable à travers toutes ses composantes, en particulier son fruit. En tant qu'arbre fruitier et forestier exceptionnel, toutes les parties du caroubier, telles que les feuilles, les fleurs, les fruits, le bois, les écorces et les racines, possèdent une valeur intrinsèque dans de nombreux domaines (Aafi, 1996 ; Mhirit et Et-Tobi, 2002).

Le caroubier est largement utilisé dans le cadre de projets de reboisement et de reforestation, notamment dans les zones touchées par l'érosion et la désertification (Rejeb et al, 1991; Biner et al., 2007). En plus de son utilité écologique, il est également apprécié en tant que plante ornementale, souvent planté le long des routes et dans les jardins pour sa valeur esthétique (Batlle et Tous, 1997).

Le bois du caroubier, également connu sous le nom de "carouge", est caractérisé par sa dureté et son grain fin. Il est utilisé dans la fabrication d'ustensiles et comme source de combustible (Batlle et Tous, 1997). L'écorce de l'arbre est également utilisée dans l'industrie de la tannerie, en particulier pour le traitement et l'émaillage des peaux (Batlle, 1997).

III.3.2 Utilisation thérapeutique

La caroube suscite actuellement beaucoup d'intérêt en Algérie, où les industriels se disputent le marché international, en vue de son exportation sous forme de farine tirée de la pulpe et des graines pour leur culture agricole. Cet arbre est d'une importance économique considérable ; ses gousses, plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière, sont utilisées en industrie agroalimentaire et pharmacologique, notamment comme anti diarrhéique, leur richesse en fibres leur confère des vertus hypocholestérolémiantes et hypoglycémiantes ; les composés phénoliques qu'elles contiennent sont à l'origine de leur propriétés antioxydants (Hariri et *al.*, 2009).

Des recherches récentes ont mis en évidence la richesse en composés phénoliques d'autres parties de l'arbre, telles que les feuilles (Whiteley et Klurfeld, 2000 ; Tahiri *etal.*, 2009) et l'écorce (Katim et *al.*, 2010). Ces composés ont démontré leur potentiel chimio préventif contre certains cancers, en particulier ceux touchant le système gastro-intestinal (Corsi et *al.*, 2002 ; Peters et *al.*, 2003 ; El Hajaji et *al.*, 2011).

La caroube donne naissance à deux produits principaux. La gomme, extraite de l'endosperme de la graine, est très prisée dans l'industrie agroalimentaire en raison de ses propriétés texturants (Avallone et *al.*, 1997). Elle est également utilisée dans le secteur pharmaceutique, cinématographique, textile et cosmétique (Prajapati et *al.*, 2013). La gomme de caroube est considérée comme l'un des dérivés les plus recherchés de la plante en raison de ses caractéristiques exceptionnelles en tant que multi-additif (Sbay, 2008). La farine est utilisée dans l'alimentation des enfants, (Lizardo et *al.*, 2002), l'alimentation diététique humaine (Dakia et *al.*, 2007) et comme ingrédient potentiel pour les aliments sans gluten (Feillet et Roulland, 1998). Elle est également utilisée dans la production de bioéthanol, d'acide citrique et comme antioxydant en raison de sa teneur élevée en polyphénols (Makris et Kefalas, 2004).

Etude
Expérimentale

IV Matériel et méthodes

IV.1 Objectif

L'objectif de notre recherche, est la production de biosurfactants sur milieu à base de fruits de caroubier, par des souches rhizosphériques du genre *Bacillus* sp. , isolées d'une culture céréalière, Blé dur (*Triticum durum*), ainsi qu'à l'étude de leur activité hydrocarbonoclaste.

IV.1.1 Cadre de l'étude

Le travail a été effectué au sein des laboratoires pédagogiques de physico-chimie et d'analyse microbiologiques, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, durant la période allant du 23 avril 2023 jusqu'au 30 Mai 2023.

Les étapes du travail réalisées sont représentées dans le diagramme suivant :

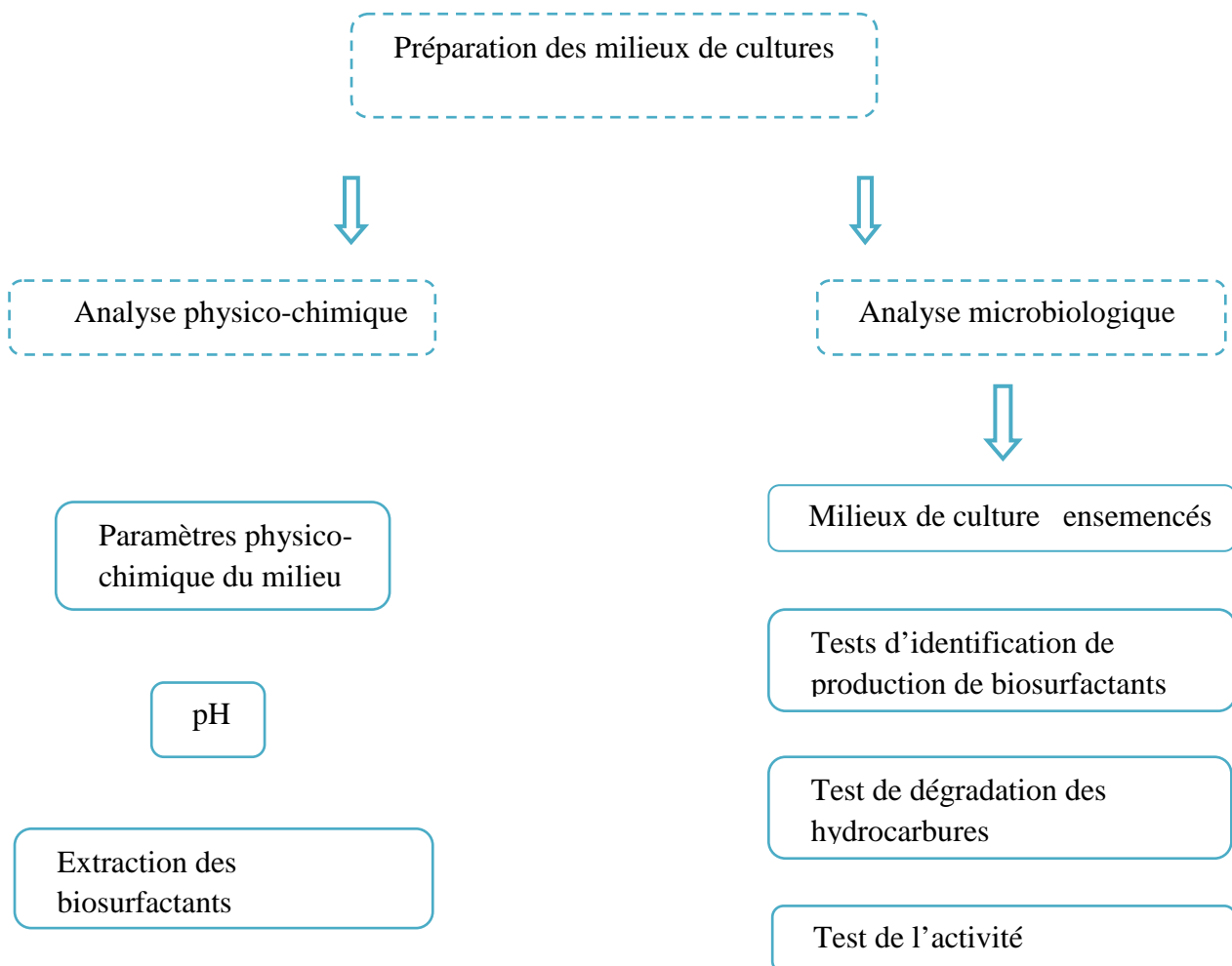


Figure 7. Diagramme représentant l'ensemble des étapes expérimentales.

IV.2 Matériel

IV.2.1 Matériel végétal

Nous avons choisis le fruit sec de l'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua L*) comme substrat, connu pour sa richesse en nutriments et vitamines nécessaires à la croissance bactérienne.

IV.2.2 Matériel du laboratoire

✓ Produits chimiques et appareillage

Appareillage et réactifs

Le matériel utilisé dans notre travail expérimental : solvants, réactifs chimiques, milieux de cultures et appareillages sont présentés en **Annexe (I)**.

IV.2.3 Matériel biologique

Les microorganismes (bactéries) testés sont des souches de *Bacillus* sp. Isolées du sol Rhizosphérique de Blé dur (*Triticum durum*), provenant d'études précédentes et sélectionnées selon leurs capacités hydrolytiques de substances complexes. Leurs caractéristiques sont citées dans le Tableau V.

Tableau VI. Caractéristiques biochimiques des souches du genre *Bacillus*.

Tests biochimiques	<i>Bacillus sp.3</i>	<i>Bacillus sp.4</i>
Catalase	+	+
Oxydase	+	-
Urease	-	+
Nitrate réductase	+	+
Lécithinase	+	+
Amylase	-	-
Coagulation du lait	+	+

IV.3 Test de dégradation des hydrocarbures

Ce test a été réalisé pour confirmer la capacité hydrocarbonoclastes des deux souches bactériennes, sur milieu Gélose Nutritive additionné d'un hydrocarbure à différentes concentrations.

Trois concentrations d'hydrocarbure (1%, 2% et 4% de gasoil), ont été additionnées à la gélose nutritive liquéfiée et refroidie. Après homogénéisation, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri et ensemencé par les souches bactériennes. Les boîtes ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24h. Des boîtes témoins sans hydrocarbure ont été utilisées. La souche qui est capable de dégrader l'hydrocarbure et présente une croissance visible et un nombre important de colonies est considérée comme potentiellement la meilleure.

IV.4 Préparation du Milieu minérale à base de glucose

La composition du milieu à base de glucose qui est un milieu minimum est mentionnée dans l'annexe II.

Les différents composés ont été pesés et mélangés à l'eau distillée, après homogénéisation, le milieu est stérilisé par une tyndallisation dans un bain-marie pendant 3 jours (2h / jour) à 60°C, afin d'éliminer toute forme microbienne végétative et sporulant (Ould El Hadj et al, (2006).

IV.5 Préparation du milieu de culture à base du fruit de caroubier

Les fruits du caroubier ont été broyés dans un broyeur électrique. La poudre obtenu a été conservée dans des bocaux en verre à 4°C pendant une semaine .

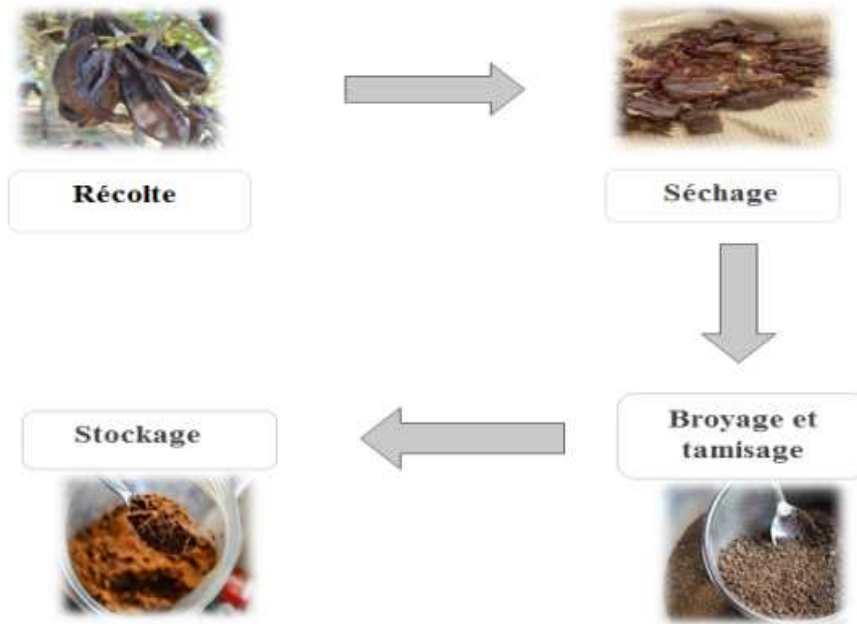


Figure 8 . Différentes étapes suivies pour la préparation de la poudre du caroubier.

La composition du milieu est indiquée dans l'annexe III.

Mode opératoire

300 g de la poudre des fruits de caroubier sont mélangés à 1000mL d'eau distillée. Après homogénéisation, le milieu est mis au bain- marie à 78°C pendant 45 minutes avec agitation rigoureuse en continu. Après refroidissement le pH a été neutralisé et le milieu a été autoclavé à 120°C pendant 20minutes (Ould El Hadj et *al.*,2006).

IV.6 Caractérisation physico-chimique du milieu à base de Caroube

✓ Mesure de la matière sèche(MS) (norme NFT 90- 029 06 1970)

La matière sèche d'une plante est constituée de minéraux (potassium, azote, phosphore, calcium, etc.) et des oligoéléments (le fer, le cuivre, le manganèse, le molybdène et le zinc, etc.). Elle peut varier en fonction du type du fruit ou de l'échantillon analysé aussi en fonction des conditions de culture et elle indique la qualité du produit.

Mode opératoire

20ml de la matière fraîche (milieu caroubier, Figure9), ont été mis, dans des cristallisoirs préalablement pesés, puis placés dans le four à Pasteur à 105°C pendant 24h.

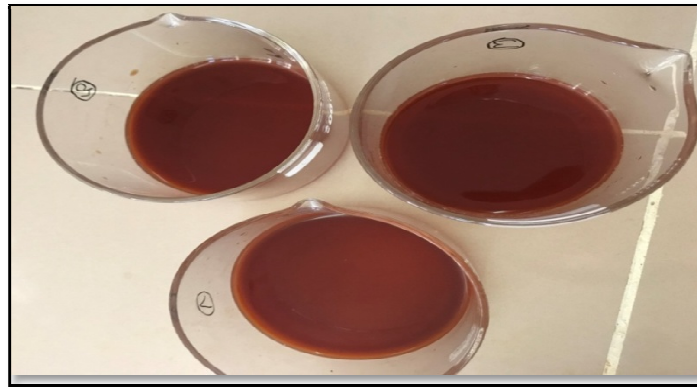


Figure 9. Cristallisoirs contenant la matière fraîche.

Le taux de matière sèche est calculé comme suit :

$$\text{Taux de matière sèche} = (m1 - m0 / V) \times 100$$

- M1 : masse de la capsule avec matière séchée en g Annexe IV.
- M0 : masse de la capsule vide en g.
- V : volume de la prise d'essai en ml.

✓ **Mesure du taux de cendres (TC) (norme NFT 90- 029 06 1970)**

Les cendres désignent le reste de matière minérale après combustion. Cette mesure nous permet d'évaluer la pureté et la qualité de notre fruit.

La matière sèche obtenue est pesée ; puis mise dans des creusés en porcelaine qui sont placés par la suite dans un four à moufle pour la calcination à 600°C. Trois essais ont été réalisés.

La teneur en cendre est calculée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendres} = (m2 - m0 / V) * 100$$

- M2 : masse de la matière sèche calcinée en g.
- M0 : masse de la capsule vide en g.
- V : volume de la prise d'essai en ml.

✓ **Matières volatiles sèches(MVS)**

Une matière volatile sèche d'une plante ou un fruit, etc. fait référence à des composés qui s'évaporent lors d'une exposition aux fortes températures qui sont présents dans la plante sous forme sèche, est déterminée en faisant la différence entre la masse de la matière sèche obtenue après évaporation dans le four à moufle à 105° et la masse des cendres après calcination à 550°. La teneur en matière volatile sèche est déterminée par formule suivante :

$$\text{MVS} = \text{MS} - \text{TC}$$

IV.7 Étude de la production de biosurfactants

IV.7.1 Repiquage des souches

Les souches de *Bacillus* sp. ont été repiquées sur Gélose Nutritive et incubées à 30°C pendant 24h. L'aspect macroscopique des colonies obtenus après incubation a été décrit (forme des colonies, contour, pigmentation).

IV.7.2 Préparation de pré-culture à base de caroubier

La préparation de la pré-culture a été réalisée par l'ensemencement de 50ml du milieu de culture stérile par une culture jeune obtenue sur gélose nutritive (prélever une colonie bien isolée), tout en respectant les conditions de stérilité dans le but d'éviter les contaminations microbiennes. Les béchers sont par la suite incubés à 30°C pendant 24h. La pré-culture est effectuée pour enrichir et préparer les bactéries sélectionnées sur le milieu de culture choisi.

IV.7.3 Culture sur milieu à base de caroubier

Dans des erlenmeyer stériles de capacité de 500 ml et 200ml de chaque milieu (glucosé ou caroubier) ont été introduits. Ensuite 1ml de l'inoculum (pré-culture) a été rajouté. Les milieux ont été incubés à température ambiante avec agitation continue à 100 tr/min pendant 10 jours.

IV.8 Tests d'identification de production de biosurfactants

✓ **Index d'émulsification**

Ce test a été mis au point par Francyet *al.* (1991) puis modifié par Bodouret Maier (1998). Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe (pétrole brut, gasoil, benzène) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Dans des tubes à essais stériles, nous avons mis 2ml du milieu de culture contenant l'inoculum avec 2ml de gasoil, les comparer à un témoin négatif contenant 2ml d'hydrocarbure et 2ml du milieu de culture stérile. Les tubes sont agités au vortex pendant 3-4 minutes ; puis laisser se reposer 24h ; les étapes sont représentées dans la (**Figure 10**).

L'index d'émulsification est calculé par la formule suivante :

$$E24 = (\text{hauteur de l'émulsion} / \text{hauteur TOT du mélange}) * 100$$

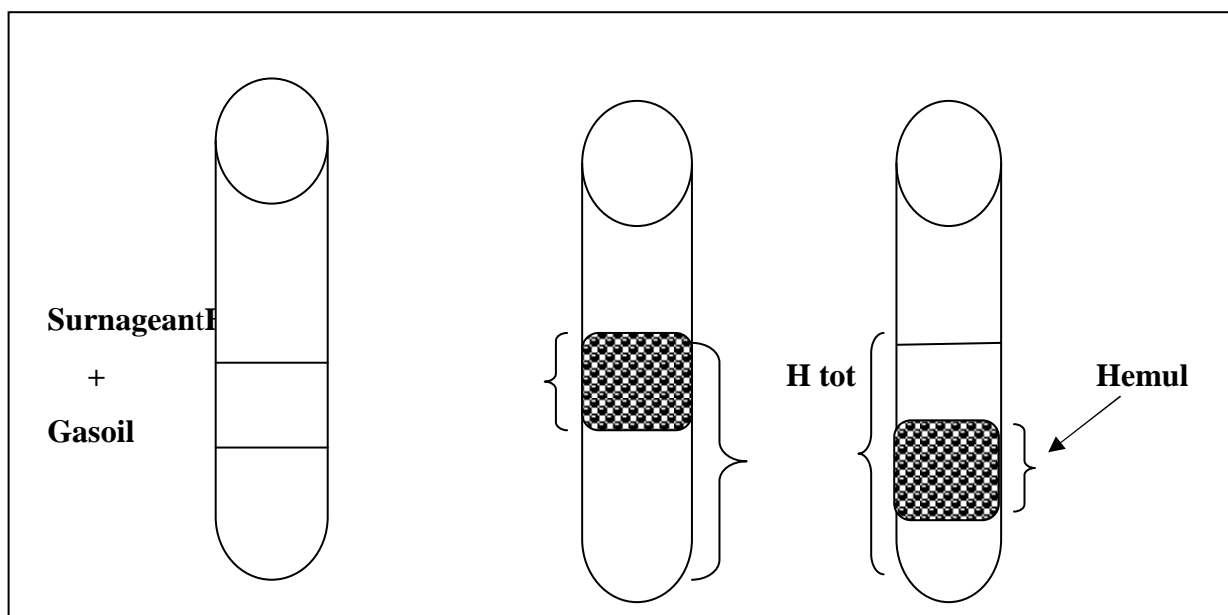


Figure 10. Schéma représentant les étapes de réalisation de l'indice d'émulsification.

✓ Le pouvoir moussant (foaming) :

Les surfactants naturels ont la capacité à former une mousse appréciable.

5ml du surnageant de chaque milieu de culture ont été introduite dans un tube à essai ; après agitation au vortex pendant 5 minutes (Mohammed, 1997), le calcul du pouvoir moussant a été réalisé par l'équation suivante :

$$\text{Foaming} = (\text{hauteur de la mousse} / \text{hauteur totale}) \times 100$$

✓ Test de l'effet nettoyant des biosurfactants

Pour déterminer la capacité nettoyante et de décontamination du biosurfactant produit, nous avons réalisé le test décrit par Pruthi et Cameotra(2000), légèrement modifié.

La paroi interne d'un bécher de 10 ml a été imbibé avec l'huile de moteur neuf (Total QUARTZ 5000 15 W-40) puis 10 ml du milieu de culture centrifugé (à 3000 tr/ 20 min) ont été introduits, le tout a été agité pendant 1 min et laissé reposer pendant 6 heures.

La capacité nettoyante est exprimée par le détachement des gouttelettes d'huile des parois du béchers. Des essais témoins d'un milieu neuf (témoin négatif) ont été réalisés dans les mêmes conditions.

✓ Test parafilm

Le test de parafilm est utilisé comme un essai préliminaire pour la détection de la production des biosurfactants. Nous avons réalisé une centrifugation des 3 milieux de cultures contenant l'inoculum à 5000 tr/min pendant 10 minutes dans le but de séparer les cellules bactériennes du surnageant (**Figure 11**).

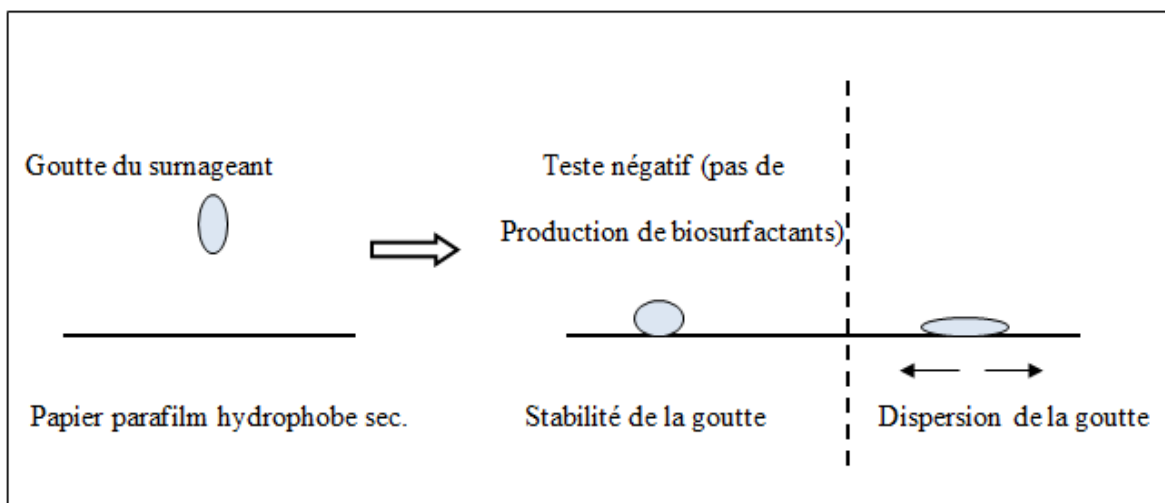


Figure 11:Schéma de démonstration du test sur papier parafilm(Satpute et *al.*, 2010)

Mode opératoire

Un volume de 20 μ l du surnageant de chaque culture, a été déposé sur la face hydrophobe du papier parafilm. Le même volume d'eau distillé a été utilisé comme témoin stable. ensuite le diamètre de diffusion des gouttes des échantillons a été mesuré et comparé à celui du témoin (Satpute et *al.*, 2010).

IV.9 Extraction du biosurfactants

L'extraction des biomolécules(**Figure 12**), a été effectuée en adoptant la technique d'extraction par solvant décrite par Chandran *et al.* (2010) et Pereira *et al.* (2013).

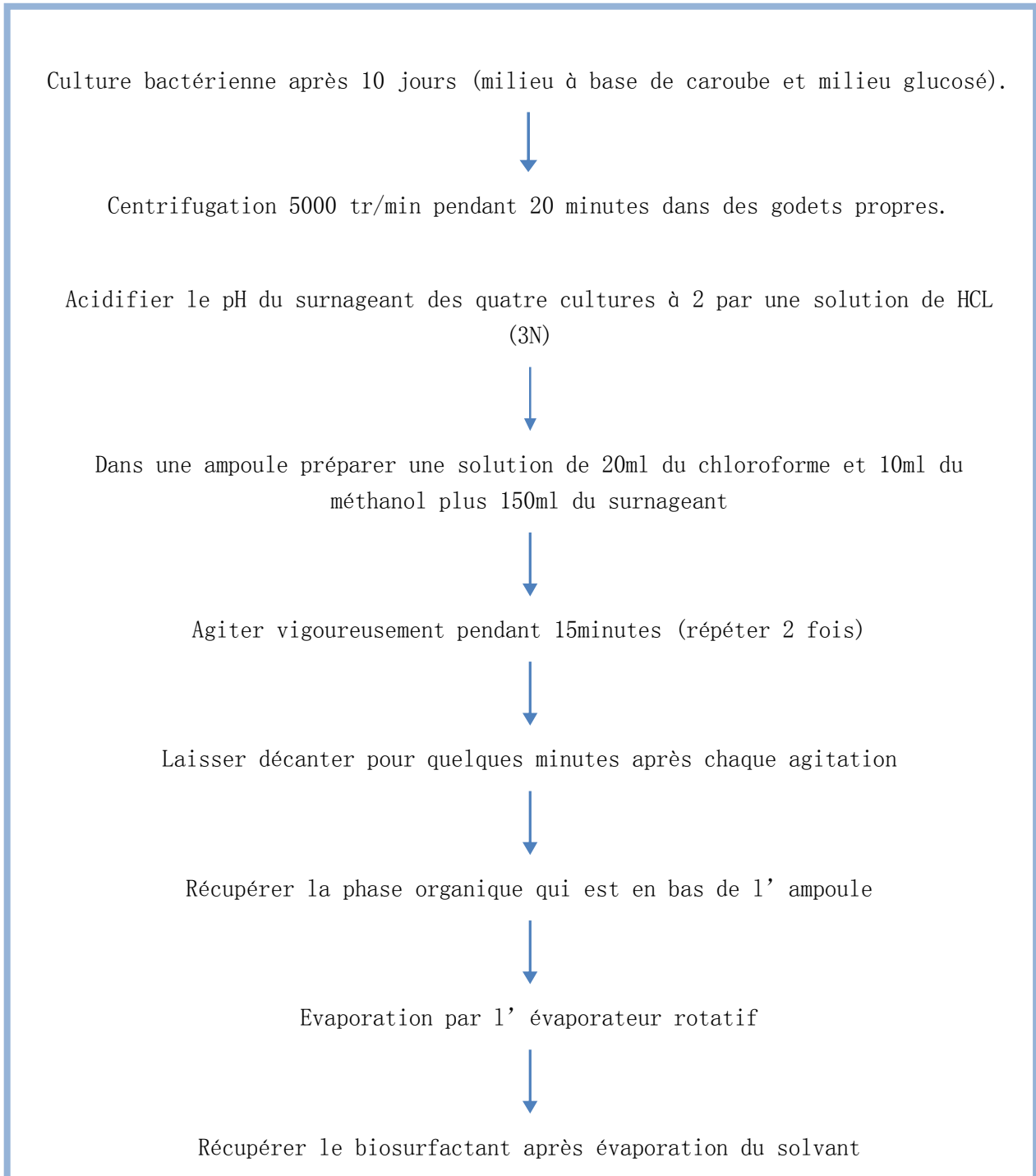


Figure 12. Diagramme montrant les étapes d'extraction de biosurfactant.

IV.10 Test d'activité antibactérienne

Le test d'activité antibactérienne des biosurfactants a été réalisé en utilisant deux souches de référence (*Staphylococcus* LGA251 et *Escherichia coli* ATCC 25922), préalablement ensemencées par étalement sur gélose Muller Hinton.

C'est une méthode proposée par Cooper et Woodman en 1946, pour tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

La méthode consiste à déposer des disques de papier wattman stériles imprégnés de biosurfactant sur la gélose. Ce dernier se diffuse radialement en créant une zone d'inhibition circulaire sur la surface de la gélose préalablement ensemencée par les suspensions bactériennes (Dorman et Deans, 2000). Un témoin positif (antibiotique : la gentamycine) et un témoin négatif (eau distillée stérile) ont été utilisés.

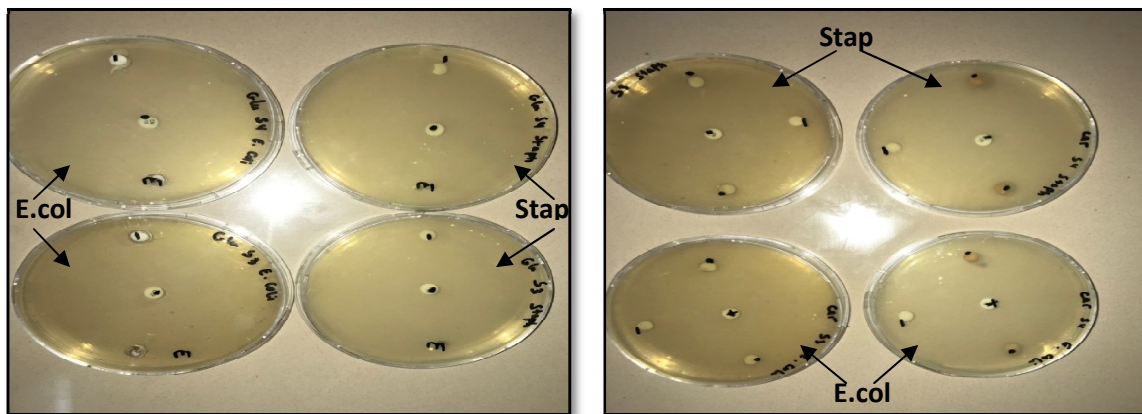


Figure 13. Milieu Muller Hinton ensemencé par *Staphylococcus* et *E. coli* en présence de deux biosurfactants.

V Repiquage des souches :

Dans des conditions aseptiques ; nous avons réalisé un ensemencement sur gélose nutritive pour les deux souches *Staphylococcus* et *E. coli*, ensuite ; les boîtes de Pétriont ont été incubées pendant 24h à 37°C.

VI Teste de pureté des colonies :

Après le repiquage et l'incubation des souches ensemencées ; nous avons réalisé une coloration de Gram, dans le but de confirmer la pureté des souches sélectionnées. Les étapes de la coloration sont décrites comme indiqué dans l'annexe V.

Cette technique nous permet de distinguer les types de bactéries (Gram positifs et les Gram négatifs), et les différencier d'après leur morphologie.

VII Préparation de la suspension bactérienne

2 à 5 colonies identiques et isolées, sont prélevées d'une culture jeune de 18 à 24 heures et émulsionnées dans 9ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %.

Après homogénéisation, la suspension bactérienne est standardisée par la mesure de l'absorbance (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 620 nm. On admet uniquement une valeur comprise entre 0.08 et 0.1, qui est l'équivalent d'une charge bactérienne de 10^7 à 10^8 UFC / ml.

VIII Résultats et discussion

V.1.Caractérisation des isolats

✓ Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques des deux souches de *Bacillus* sp. Ont été évalués en réalisant des cultures pures sur des milieux gélosés (**Figure 14**).

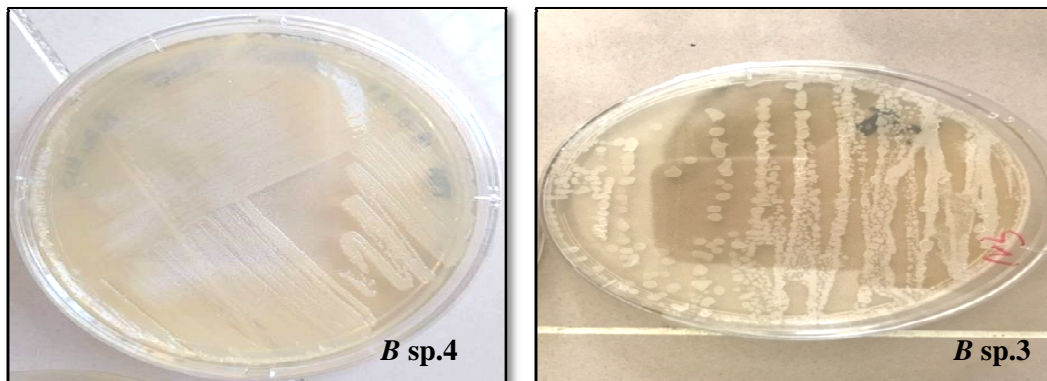


Figure 14. Résultats du repiquage des souches du genre *Bacillus* sp.

• Caractères macroscopique

Les caractères macroscopiques ont été décrits on se basant sur une observation à l'œil nu ou à la loupe binoculaire des colonies développées sur gélose nutritive (Tableau V).

Tableau VII. Caractères cultureux des souches bactériennes isolées de la rhizosphère du blé dur.

isolats	couleur	forme	taille	surface	opacité	relief	contour
<i>Bacillus</i> sp.3	Blanchâtre, jaune	ronde	1-2mm	Lisse, sèche	translucide	plate	régulier
<i>Bacillus</i> sp. 4	Blanchâtre jaune	irrégulière	envahissante	Lisse brillante	translucide	plate	irrégulier

• Caractères microscopiques

Les caractères microscopiques ont été décrits après une coloration de gram réalisé sur des colonies jeunes des deux souches développées sur gélose nutritive (Tableau VI).

Tableau VIII. Caractères microscopiques de *Bacillus* sp.3 et *Bacillus* sp.4.

isolats	forme	Gram	agencement
<i>Bacillus</i> sp.3	bacilles	positif	Isolés ou en amas, parfois à courtes ou à longues chaînes, ou enchevêtrés non fragmentés spores non déformantes)
<i>Bacillus</i> sp.4	Gros bacille avec des spores ovales	positif	En chainettes

V.2. Test de dégradation des hydrocarbures

La première étape dans le développement d'un protocole de bioremediation est la sélection de souches bactériennes avec un potentiel élevé de biodégradation des contaminants pétroliers. Cette démarche consiste en un criblage progressif de la collection des isolats bactérien selon leurs capacités à tolérer et à dégrader le gasoil après 24H, 3jours et 6jours (**Figure 15 ; 16**).

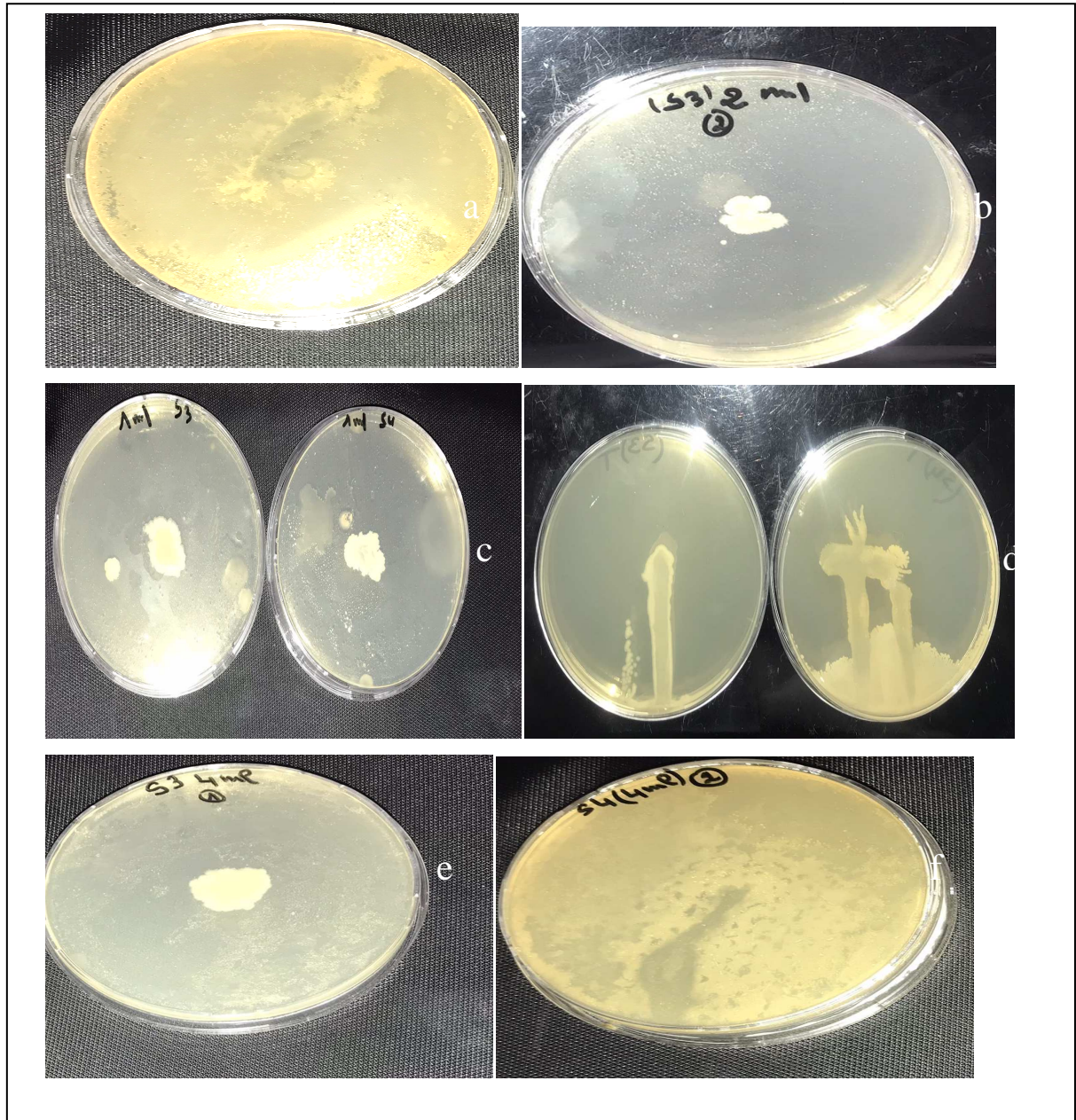


Figure 15 : Résultats de croissance bactérienne après 6 jours.

(a): Croissance de *B. sp.4* à 2% ; (b) : Croissance de *B.sp.3* à 2% ; (c) : croissance de *B.sp3* et *B.sp.4* à 1% ; (d) : croissance des deux souches ; (e) : Croissance de *B. sp.3* à 4% ; (f): Croissance de *B. sp.4* à 4%.

Selon les résultats observés dans la **Figure 15**, il a été démontré que *Bacillus sp. 4* présente une croissance importante sur le milieu additionné de l'hydrocarbure, ce qui peut être expliqué par l'adaptation de son métabolisme aux composés hydrocarbonés, par rapport à la souche *Bacillus sp. 3*, qui se manifestent par une croissance lente. Plusieurs hypothèses

peuvent être suggérées. Cela est dû soit à la nature de l'hydrocarbure, soit à la durée d'incubation ou le système enzymatique qui joue un rôle fondamentale dans ce mécanisme.

V.3. Résultats des paramètres physico-chimiques de *Ceratonia siliqua*

Les résultats obtenus pour quelques paramètres physico-chimiques des fruits de *Ceratoniasiliqua* sont résumés dans le (Tableau VI). Le résultat de chaque test est exprimé sous forme de la moyenne de trois essais \pm l'écart type (Annexe VI).

Tableau IX: Résultats de quelques paramètres physico-chimiques caractérisant la plante *Ceratonia siliqua*.

Test	Résultats
Matière sèche (%)	17 \pm 0.77
Taux de cendres (%)	0.45 \pm 0.19
Matière volatile sèche (%)	15 \pm 0.85

Selon les résultats cités ci-dessus, il a été constaté que le taux de matière sèche calculé est légèrement similaire à celui obtenu par Kamal et Youssefet *al.* (2013).

Par contre il est inférieur à celui obtenu par Sigge *et al.* (2011). cette différence peut être dû à la variété du caroubier, aux facteurs pédoclimatique (température de culture, les inondations, l'humidité, etc.) ou à la quantité de l'échantillon analysé.

V.4. Résultats des tests de production des biosurfactants

✓ L'indice d'émulsification

L'indice d'émulsification est une caractéristique de la présence des biosurfactants dans le milieu de culture provoquant ainsi une émulsion (figure 17).

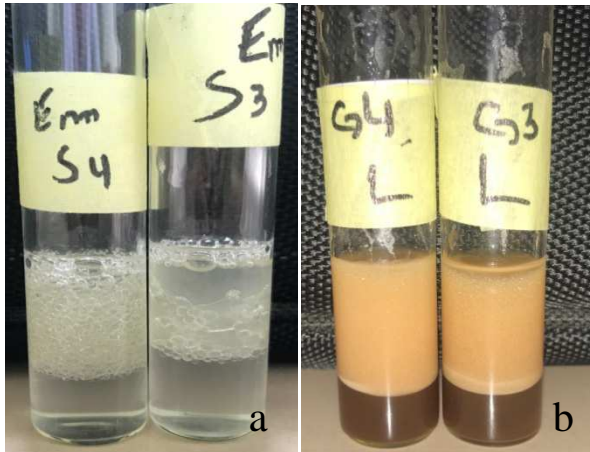


Figure 16:Résultats du test d'émulsification de *Bacillus* sp. 3 et *Bacillus* sp. 4.
(a) : Emulsion sur milieu glucosé ; (b) : Emulsion sur milieu Caroubier.

Tableau X : Résultats de l'indice d'émulsification.

Surnageant	Souche	E24
Caroubier	CB.sp.3	52%
	CB .sp.4	60%
Glucose	GB .sp.3	28.57%
	GB .sp.4	37.14%

Les résultats obtenus indiqués dans la **Figure 17** et **Tableau VIII**, ont montré que les deux souches *B.sp.3* et *B.sp.4*. sont productrices de biosurfactants avec un index d'émulsification de 52% et 60% respectivement dans le milieu à base de caroubier, et de 28.57% et 37.14% respectivement dans le milieu minimum additionné de glucose. Il s'est avéré que le milieu à base de caroubier est le mieux convenable à la production du biosurfactants, ainsi qu'à la croissance des deux souches.

Wei., et al(2005), rapportent que les surfactants produits dans le milieu à base de glucose par *Pseudomonas aeruginosa* émulsifient le kérosène et le diesel avec des indices d'émulsification de 79,5 % et 80,3 % respectivement.

Pereira et al. (2013) ont isolé une souche appartenant au genre de *B. subtilis* à partir d'un champ pétrolier au Brésil, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadecane de 52.7 %.

Les résultats rapportés précédemment, permettent de suggérer l'utilisation des deux souches testées comme agents de bioremediation et producteurs de biosurfactants qui émulsifient les hydrocarbures dans la rhizosphère.

Une observation microscopique au grossissement(x100) ; a été effectuée pour la mousse formée après 24h, dans le but de savoir la qualité de l'émulsion formée et la taille des bulles (**Figure17**).

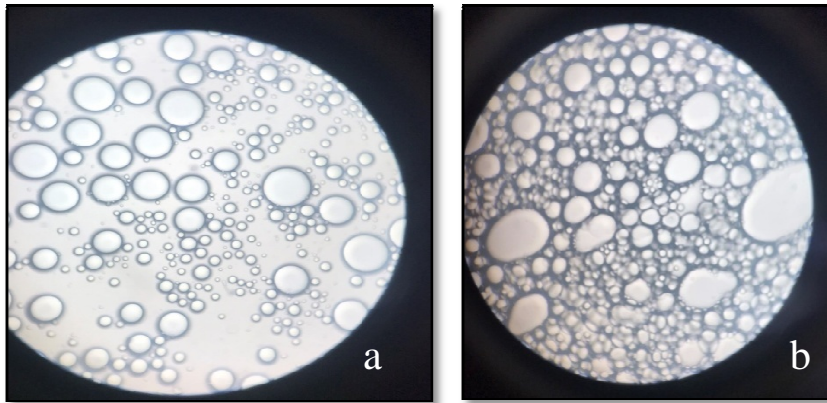


Figure 17 : Résultats d'observation microscopique d'émulsion.

(a): Emulsion de la souche *B Sp.3* ;**(b)** : Emulsion de la souche *B sp.4*.

Ces observations ont montré que les bulles formées par la souche *B. sp.4* sont plus petites et régulières que celles de la souche *B. sp. 3*, ce qui indique que la première souche a une bonne émulsification. Plus les bulles sont petites plus l'émulsification est élevée et inversement.

✓ Test du pouvoir moussant

Les biosurfactants produits par les espèces bactériennes ont la capacité de former une mousse lorsqu'ils sont mélangés ou agités avec de l'eau et la concentration en mousse dépend de la concentration et des propriétés spécifiques des biosurfactants utilisés. La figure suivante ; montre la mousse formée par les biosurfactants produits par les souches ; lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu à base de Caroubier.

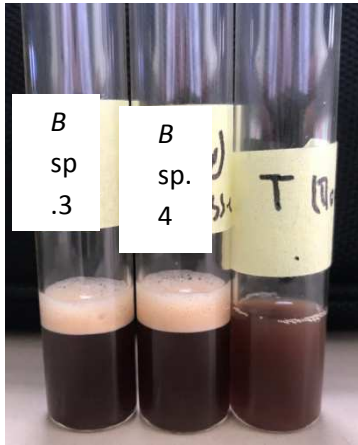


Figure 18: Résultats du pouvoir moussant dans le milieu à base de Caroubier.

(B3) :*Bacillus* sp.3 ;**(B4)** :*Bacillus* sp.4 ; **(T)** : témoin.

Les résultats du pouvoir moussant en pourcentage pour les deux souches sont présentés dans le Tableau suivant

Tableau XI : Résultats du pouvoir moussant.

Surnageant	Souche	Taux de mousse
Caroubier	C B .sp.3	30%
	C B .sp.4	37.03%
Glucose	G B .sp.3	20%
	G B .sp.4	25%

D'après la **figures 18 et tableau XII** ; il a été relevé que les deux souches révèlent un pouvoir moussant, important sur milieu à base de caroubier que sur le milieu à base de glucose. *Bacillus* sp. 4 a exhibée un bon résultat que *Bacillus* sp. 3.

Le caroubier représente un milieu favorable et convenable au développement des deux souches. C'est une plante riche en sucres, polyphénols, minéraux, etc.

Xu et al. , (2020) ont décrit une forte production de rhamnolipids par *Pseudomonas* sp.

Et une capacité moussante importante sur milieu riche en nutriments dans le bioréacteur.

✓ Test de l'effet nettoyant

Les biosurfactants sont connus à échelle large, qu'ils ont la capacité de disperser les huiles, et leur efficacité varient en fonction du type des huiles, et la concentration du biosurfactant dans le milieu.

Nous avons procédé à un test spécifique pour évaluer l'effet nettoyant du biosurfactant excrété par les souches *B* sp.3 et *B* sp.4 dans milieu à base du fruit de caroubier et glucosé. Ce test a permis de mesurer l'efficacité nettoyante de ces souches par rapport à l'huile de moteur. Les résultats de cette évaluation sont illustrés dans le Tableau XIII, mettant en évidence les performances de nettoyage des différentes souches.

Tableau XIV: Résultats de test effet nettoyant.

Milieux	Traitements	Rapport Hn/Ht x 100 (%)
Glucosé	Milieu neuf + huile du moteur	0
	Surnageant <i>B</i> .sp.3 + huile du moteur	38%
	Surnageant <i>B</i> .sp.4 + huile du moteur	44.4%
Caroubier	Milieu neuf + huile du moteur	0
	Surnageant <i>B</i> .sp.3 + huile du moteur	55%
	Surnageant <i>B</i> .sp.4 + huile du moteur	60%

- **Hn : Hauteur nettoyée. Ht : Hauteur totale**

Selon les résultats montrés au tableau ci-dessus ; en comparaison au témoin négatif dont le milieu n'a pas étéensemencé. Le milieu à base de caroubier en présence de la souche *B*.sp. 3 ou *B*.sp. 4, présente un pouvoir nettoyant satisfaisant (55% et 60 %) respectivement, que le milieu à base de glucose (38% et 44.4 %). Cela a permis de constater que le fruit de caroubier peut être valorisé dans le domaine de la bioremediation (comme biostimulant) des sols contaminés par les hydrocarbures, en l'utilisant comme source de nutriments pour les bactéries rhizosphérique à caractère hydrocarbonoclastes, Silva et al. (2014) ont

démontré que les biosurfactants possèdent la fonction de nettoyer des solides contaminés d'une couche d'huile.

✓ Test de parafilm

Le papier parafilm contient une surface hydrophobe. Ce test nous permet de confirmer la présence de biomolécules dans notre échantillon, les résultats sont représentés dans le **Tableau XV** et la **Figure 20**.

Tableau XVI: Résultats des diamètres des microgouttelettes sur papier parafilm.

Milieu	Témoin	Surnageant			
	Eau distillé	G B. sp 3	G B. sp 4	C B. sp 3	C B. sp 4
Diamètre (mm)	5mm	6	6.5	6.5	7

(G) : Milieu glucosé ; (C) : Milieu à base de fruit de caroube

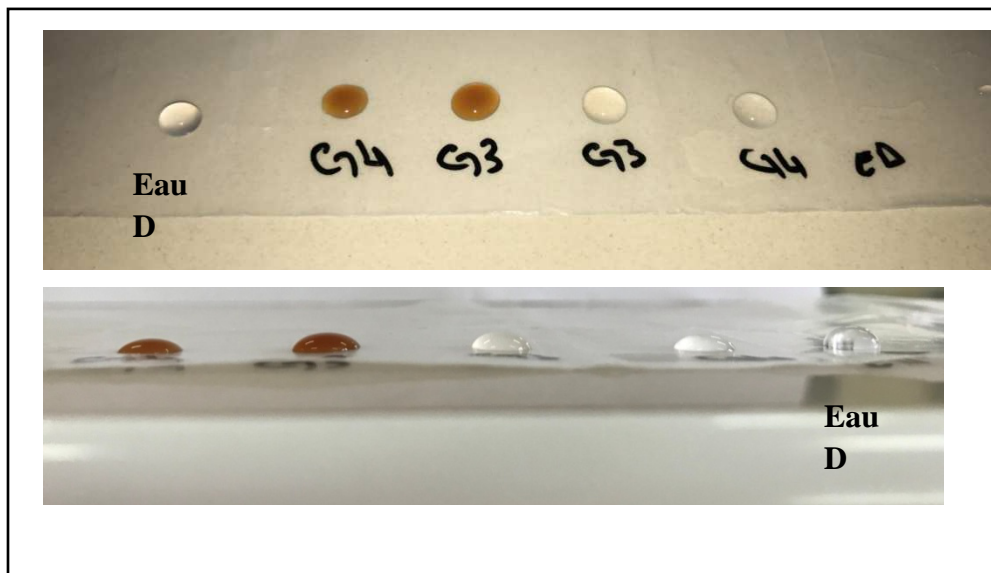


Figure 19 : Résultats du test parafilm. (C4) : milieu caroubier, *B. sp.4* ; (C3) : milieu Caroubier, *B. sp.3* ; (G4) milieu glucosé, *B. sp.4* ; (G3) : milieu glucosé *B. sp.3*.

Les résultats du test de parafilm montrent que les diamètres des gouttelettes obtenus (après effondrement sur papier parafilm par comparaison à une goutte d'eau comme témoins stables) s'échelonnent entre 6.5 et 7 mm pour la souche *B. sp. 4*. et entre 6 et 6.5 pour la souche *B. sp.3*. D'après ces résultats, la souche *B. sp. 4* est la plus productrice de tensio-actifs. Mais reste toujours faible par rapport aux résultats obtenus par **Sari et al. (2014)** qui ont enregistré des valeurs de diamètres allant de 8 à 10 mm.

Nohaet al. (2004) ont énoncés que lorsque le surnageant ne contient pas de biosurfactants, les molécules d'eau polaire sont repoussées par la surface hydrophobe du parafilm et les gouttes restent stables. Par contre lorsque le surnageant contient des biosurfactants, les gouttes s'étalent sur la surface car la tension interfaciale entre la goutte du surnageant et la surface hydrophobe du parafilm est réduite par la présence du biosurfactant.

V.5 Résultat d'extraction de biosurfactants

La technique d'extraction par solvant organique après évaporation à l'aide d'un rota vapeur ; a donnée des extraits de couleur jaune à doré avec une texture visqueuse pour les biosurfactants produits dans le milieu minimum. En milieu à base de caroubier, il a été constaté la présence d'une émulsion stable, formée après agitation vigoureuse du mélange solvants et moût de fermentation indiquant la production de biosurfactants(Figure20).



Figure 20.Figure montrant l'extraction du biosurfactant.

V.6. Test d'activité antibactérien du biosurfactant

Les résultats de l'activité antibactérienne des biosurfactants sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Tableau XVII et Figure21).

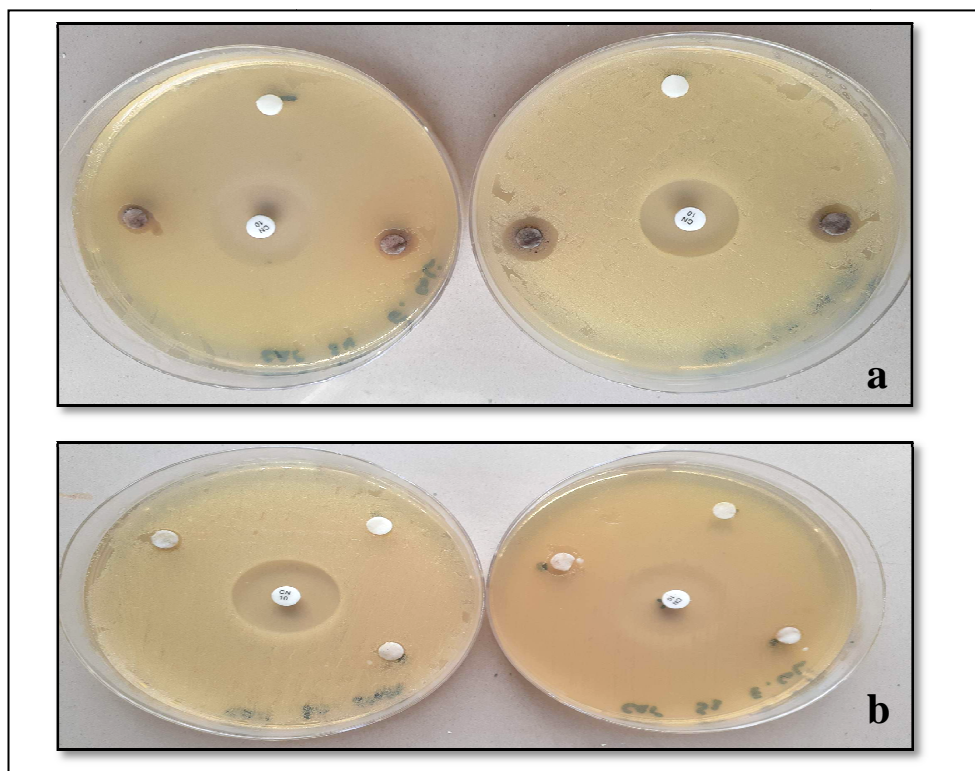


Figure 21 : Résultats du test antibactérien pour les souches cultivées dans le milieu Caroubier.(a) : biosurfactant produit par les deux souches sur milieu caroubier ;(b):biosurfactant produit par les deux souches sur milieu glucosé.

L'activité antibactérienne des biosurfactants extraits, révèlent une activité notable sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Les diamètres de zones d'inhibition, vis-à-vis de *S. aureus* LGA251 et d'*E. Coli* ATCC 25922 sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVIII: Résultats de l'activité antibactérienne des biosurfactants.

Souche étudiée Extrait testé	Diamètre des zones d'inhibition est en (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> LGA251	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 5922
Extrait de C B sp.3	10.5 ± 0.7 (+)	10.5 ± 0.7 (+)
Extrait de C B sp.4	11 ± 1.4 (+)	11.5 ± 0.7 (+)
Extrait de G B sp.3	11 (+)	Non observé
Extrait de G B sp.4	12 (+)	Non observé
Témoin positif (disque d'ATB Gentamicine)	23 (++)	27 (+++)
Témoin négatif (disque wattman stérile)	0	0

Résistante(-), sensible(+), très sensible (++) , extrêmement sensible (+++).

Les biosurfactants issus des cultures *GB. sp.3* et *GB.sp.4* ont présenté une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus* LGA251.avec des zones d'inhibition 11 mm et 12 mm respectivement. Les biosurfactants produits par *CB.S3* et *CB.S4* ont montré une activité antimicrobienne contre *E. coli* ATCC 5922, avec des zones d'inhibition de $10.5\text{mm} \pm 0.7$ et $11.5\text{mm} \pm 0.7$ respectivement et de $10.5\text{mm} \pm 0.7$ et $11\text{mm} \pm 0.7$ respectivement sur LGA251, Plusieurs études ont confirmé l'effet similaire des biosurfactants sur différentes souches pathogènes. Par exemple, dans une étude menée par **FERHAT et al.,(2011)** les agents tensioactifs produits par *Brevibacterium* 7G et *Ochrobactrium* 1C ont démontré un effet antimicrobien en inhibant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1544 et *Staphylococcus aureus* ATCC 9144.

Ces résultats confirment que les biosurfactants peuvent jouer un rôle important dans l'inhibition de diverses souches bactériennes pathogènes, offrant ainsi des perspectives, prometteuses pour leur utilisation en tant qu'agents antimicrobiens.

Conclusion

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de notre travail était de tester la capacité des souches rhizosphériques du genre *Bacillus* sp. À produire des biosurfactants dans un milieu à base du caroubier, et leur pouvoir de se développer dans un milieu contenant un hydrocarbure pétrolier.

Le suivi de la croissance des souches sur une gélose nutritive contenant l'hydrocarbure (gasoil) à trois concentrations différentes a été effectué pendant 6 jours ; La souche *Bacillus* sp.4 a montré une forte adaptation à la source de carbone et une bonne production de biomasse, en comparant à la souche *Bacillus* sp.3.

La détermination de certaines caractéristiques physico-chimiques du caroubier a été réalisée.

Les résultats obtenus montrent que la gousse du Caroubier est riche en matière organique ainsi une quantité moins importante de matière minérale et matières volatiles.

Concernant la production des biosurfactants par les deux souches ; et d'après les tests réalisés (l'indice d'émulsion (IE24), foaming, test de parafilm et la capacité nettoyante de l'huile du moteur neuve.) il a été énoncé que les deux souches ont donné des résultats satisfaisantes pour chaque paramètre étudié lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu enrichi qu'au milieu minimum.

Les biosurfactants extraits du milieu caroubier et glucosés (*Bacillus* sp.3 et *Bacillus* sp.4) ont exhibés un effet antibactérien moyen vis-à-vis d'*Escherichia coli* ATCC 5922 et *Staphylococcus aureus* LGA251.

A la lumière des résultats encourageants obtenus sur le caroubier, il est souhaitable de compléter cette étude par des

Approches plus approfondies, à savoir :

- Une étude physicochimique, photochimique et thérapeutique.
- Identification des souches étudiées et leur classification taxonomique.
- Etude des propriétés physico-chimiques du biosurfactant produit pour mieux connaître sa nature, sa structure ...etc.
- Etude de son activité antibactérienne contre d'autres souches microbiennes pathogènes notamment fongiques.
- 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 »

1. **Aafi, A. (1996).** Le caroubier : Caractères botaniques et écologiques, groupements végétaux, techniques d'élevage en pépinière, traitement et soins culturaux, utilisation et production. Centre national de la recherche forestière. Maroc. 1-7.
2. **Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., & Naidu, R. (2015).** A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol.* 176(3):670-99.
3. **Acevedo, F., Pizzul, L., del Pilar Castillo, M., Cuevas, R., & Diez, M.C. (2011).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *Journal of hazardous materials.* 185(1), p 212-219.
4. **Adams, G.O., prekeyi, T.F., samson, E.O., & igelenyah, E. (2015).** Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation. *international journal of environmental bioremediation & biodegradation.* 3(1), 28-39.
5. **Adipah, S. (2019).** Introduction of Petroleum Hydrocarbons Contaminants and its Human Effects. *Journal of Environmental Science and Public Health,* 2575-9612.
6. **Ait Chitt, M., Belmir, H., & Lazrak, A. (2007).** Production de Plants Sélectionnés et Greffés de Caroubier. Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTTA, Transfert de Technologie en Agriculture N°153. Royaume du Maroc, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, 4 p.
7. **Aggary, S., & Ogunleye, O. (2012).** Factorial Designs Application to Study Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Weathered Bonny Light Crude Oil through Biostimulation and Bioaugmentation Strategy. *Journal of Environmental Protection.* 3, 748-759
8. **Albanell, E., Caja, G., & Plaixats, J. (1991).** Characterization of Spanish carob pod and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes,* N°16, 135-136.
9. **Al-Joumaa, K. (2009).** Effect of pollution with petroleum on some soil characteristics and plant growth. *Arab. Univ. J. Agric. Sci.* 17 (1), 267-275.
10. **ATSDR. (1999).** Toxicological profile for petroleum hydrocarbons (PHC).
11. **Avallone R., Plessi M., Baraldi M., & Monzan A. (1997).** Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates, and tannins. *J. Food Comp. Anal.,* 10 (2): 166-172.

12. Amran, R.H., Jamal, M.T., Pugazhendi, A., Al-Harbi, M., Ghandourah, M., Al-Otaibi, A., & 13. Banat, I., Carboue, Q., Saucedo-Castaneda, G., & Cazares-Marinero, J.D.J. (2021). Biosurfactants: The green generation of specialty chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. *Journal of Bioresource Technology*, 320(Part A), 1-13. [12422].

« B »

14. Batlle I., Tous J. (1997). Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1-79.

15. Barua, D., Buragohain, J., Sarma, S.K. (2011). Certain physico-chemical changes in the soil brought about by contamination of crude oil in two oil fields of Assam. *NE India Pelagia Res. Libr.* 1, 154–161.

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

17. Bodour, A., Gerrero-Barajas, C., & 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.

18. Bouzouita, N., Khaldi, A., Zgoulli, S., Chebil, L., Chekki, R., Chaabouni, M. M., & Thonart, P. (2007). The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. *Jouranl of Food Chemistry*, Vol. 101, N°4, 1508-1515.

19. Buzmakov, S.A.; Khotyanovskaya, Y.V. (2020) .Degradation and pollution of lands under the influence of oil resources exploitation. *Appl. Geochem.* 113, 104443.

« C »

20. Cabral, L., Giovanella, P., Pellizzer, E.P., Teramoto, E.H., Kiang, C.H., & Sette, L.D. (2022). Microbial communities in petroleum-contaminated sites: structure and metabolisms. *Chemosphere* 286, 131752.

21. Cerniglia, C.E. (1992) .Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368

- 22. Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A., & Oudot, J. (2004).** Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Journal of Research in Microbiology*, 155(7), 587-595.
- 23. Chandran, P., & Das, N. (2010).** Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2(12): 6942-6953
- 24. Chikere C. B., G. Chijioke Okpokwasili, & B. O. Chikere. (2011).** Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech* . 1: 117–138 .
- 25. Christopher chibueze, A., chioma blaise, Ch., & gideon chijioke, O. (2016).** “bioremediation techniques- classification based on site of application : principles, advantages, limitations and prospects”. *World J microbiol biotechnol* . 32:180.
- 26. Colombo S., Saada A., Victoire E., Guerin V., Zornig C., Amalric L., Blessing M., Widory D., Hube D. et Blanc C. avec la collaboration de Honarado J-C. et Gassiat B. (2014).** Natures des produits pétroliers et origine du vieillissement : tentatives de l'identification de la source via la prise en compte des impacts et l'analyse de l'âge approximatif des déversements. Rapport final. Rapport BRGM RP-64174-FR, 136p.
- 27. Conia H. (2002).** Introduction a la chimie organique, Inter Edition 87 Avence du Maine 75014 paris, 367.
- 28. Cooper, K.E., Woodman, D. (1946).** The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 58 (1), 75-84.
- 29. Constantina, E-D., Samiul, A. (2020).** Biosurfactants: Formulations, properties, and Applications. *Colloid & Interface Science*, 48, 77-90.
- 30. Corsi, L., Avallone, R., Cosenza, F., Farina, F., Baraldi, C., & Baraldi, M. (2002).** Antiproliferative Effects of *Ceratonia siliqua* L. on Mouse Hepatocellular Carcinoma Cell Line. *Fitoterapia*, 73, 674-684.

« D »

- 31. Dakia, P. A., Wathelet B., & Paquot M. (2008).** Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Journal of Food Chemistry*. 102: 1368-1374.

32. **Das, N., Chandran, P. (2011).** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon.1,1-14.Contaminants: An Overview. *International journal of Biotechnology Research*.
33. **Desai, J.D., & Banat, I.M. (1997).** Microbial production of biosurfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
34. **Didier Técher, M., Jaïro Falla, M., & Philippe Laval-Gilly. (2011).** réhabilitation des sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de miscanthus X giganteus ; université de LORRAINE (Metz) ; thèse ; (page : 40).
35. **Dorman, H.J.D., & Deans, S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316

« E »

36. **El Hajaji H., Lachkar N., Alaoui K., Cherrab Y., Farah A. Ennabli A., El Bali B., & Lachkar M. (2011).** Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob growing in Morocco. *Arab. J. of Chem.* 4: 321 – 324

« F »

37. **Feillet, P., & Roulland, T. M. (1998).** Caroubin: A gluten-like protein isolate from carob bean germ. *Journal of Cereal Chemistry*, 75, 488–492.
38. **Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherit, A., Mhiri, N., Moulai-Mostefa, N., & Sayadi, S. (2011).** Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1182-1188.
39. **Fingas M. (2013).** The Basics of oil spill cleanup. CRC Press, États-Unis.
40. **Fingas, M. (2016).** Oil spill science and technology. Gulf professional publishing. États-Unis.
41. **Francy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L & Ward, C.H . (1991).** Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology* . 8. pages 237–24.

« J »

42. Jérémie, A. ,Adedeji , Emmanuel Kweiyor Tetteh, Mark Opoku Amakwa,Dennis Asante-Sackey,Samuel Ofori-Frimpong, Edward Kwaku Armah , Sudesh Rathilal , Amir H.Mohammadi , Maggie Chetty .(2022).Microbial Bioremediation and Biodegradation of Petroleum Products Mini Review. *Applied sciences* 12(23).

43. Johnsen, A.R., Wick, L.Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), p 71-84.

44. Jordan,P. (1980).Fate and weathering of petroleum Spills in the Marine Environment : A Literature Review and Synopsis .Ann arbor Science Publishers ,Ann Arbor ,Michiga

« H »

45. Haller, H., & Jonsson, A. (2020). Growing food in polluted soils: A review of risks and opportunities associated with combined phytoremediation and food production (CPFP). *Chemosphere*, 254, 126826.

46.Hou, J., Wang, Q., Liu, W., Zhong, D., Ge, Y., Christie, P., & Luo, Y. (2021). Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Sci. Total Environ.* 792, 148411.

47. Hua, F., & Wang, H. Q. (2014). Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(2), 165-175.

« I »

48. Information resources management association. (2021).*Research anthology on emerging techniques in environmental remediation* (Ed). IGI Global.

« G »

49. Gakpe, E., Rahman, P.K.S.M., & Mohamed Hatha, A.A. (2007). Microbial Biosurfactants – Review. *Journal of Marine and Atmospheric Research*, 3(2), 1-17

50. Gan,S., Lau, E.V., &Ng, H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials.* 172(2-3): 532-549. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.118

51. Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T., & Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), p 2387-2392.

52. Gschwend, P. M., & Hites, R. A. (2007). Physical Properties and Fate of Petroleum Hydrocarbons in the Environment: A Review. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(4), 413-425.

« K »

53. Kamal .M., Youssef, E., Moshera, M ., H, El-Manfaloty, . & Ali, M. (2013). Assessment of Proximate Chemical Composition, Nutritional Status, Fatty Acid Composition and Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia Siliqua* L.). *Journal of Food and Public Health* .3:6, 304-308.

54. Konishi, M., Maruoka, N., Furuta, Y., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., & Kitamoto, D. (2014). Biosurfactant-producing yeasts widely inhabit various vegetables and fruits. *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(3), 516-523.

55. Khan, S., Hesham, A. E., Qiao, M., & Rehman, S. (2018). Factors influencing the adsorption of pollutants in soil: A review. *Chemosphere*, 194, 231-246.

56. Kumari, S., Regar, R.K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Journal Bioresour. Technol.* 254, 174–179.

57. Kuppusamy, S.; Raju, M.N.; Mallavarapu, M., & Kadiyala, V. (2020). Impact of Total Petroleum Hydrocarbons on Human Health. In *Total Petroleum Hydrocarbons*; Springer: Cham, Germany. 139–165.

« L »

58. Leahy, J.G., & Colwell, R.R. (1990) .Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54, 305-315

59. Lefebvre, G. (1978). Chimie des hydrocarbures. Paris: Éditions Technip et Institut Français du Pétrole.

60. Lim, Y. J., Osman, A., Salahuddin, S. N., Romle, A. R., & Abdullah, S. (2016). Factors Influencing Online Shopping Behavior: The Mediating Role of Purchase Intention. *Journal of Procedia Economics and Finance*, 35, 401-410.

61. Lizardo, R. , Canellas, J., Mas, F., Torrallardona, D., & Brufau, J., 2002. Utilisation of carob powder in piglet diets and its influence on growth performance and health after weaning. *Journées Rech. Porc.*, 34: 97-101.

« M »

62. Maitra, S. (2018). In Situ Bioremediation - An Overview. *RJLBPCS*, 4(6), 576.

63. Makris D. P., & Kefalas P. (2004). Carob Pod as a source of polyphenolic antioxidants, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2): 105–108.

64. Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011).Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective, *Journal of Environment International*, 37(8), 1362-1375

65. Mhirit O., Et-Tobi M. (2002). Les arbres hors forêt: le cas du Maroc. Archives de documents de la FAO.

66. Mougín, C., Boukcim, H., & Jolival, C. (2009). Soil bioremediation strategies based on the use of fungal enzymes. In *Advances in Applied Bioremediation* (pp. 123-149). Springer, Berlin, Heidelberg.

67. Mohammed.,A .(1997). Study on biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing Microorganism (Ph.D. thesis), Botany Dept. Faculty of Girls, for arts, *Journal of science and education*, Ain shams University.

Morton, J. (1987). Carob. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. pp. 65–69.

« N »

68. Nurfarahin, A.H., Mohamed, M.S., & Phang, L.Y. (2018). Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview. *Molecules*, 23(5), 104

« O »

69. O’Callaghan-Gordo, C., Orta-Martínez, M., & Kogevinas, M. (2016). Health effects of non-occupational exposure to oil extraction. *Journal of Environmental Health*, 15, 1-4.

70. Ould El Hadj M.D., Bitour Z., & Siboukeur O. (2006). Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces cerviciae*) cultivée surmount de dates. *Courrier du*

savoir. N°07, pp. 13-18.

80. Osuji, L.C.; Idung, I.D., &Ojinnaka, C.M (2006) Preliminary investigation on Mgbede-20 oil-polluted site in Niger Delta, Nigeria. *Chem. Biodivers.* 3, 568–577.

« P »

81. Pattabhiramaiah, M., Shanthala, S., Rajashekara, S., Sheikh, F., & Naik, S. (2018). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbes isolated from the marine sponge *Biemna fortis* (Topsent 1897). In *Microbial Action on Hydrocarbons*, Springer, Singapore.

82. Peters, M., Kumpfert, J., Ward, C. H., &Leyens, C. (2003). Titanium alloys for aerospace applications. *Advanced engineering materials*, 5(6), 419-427.

83. Polyak, Y., Bakina, L.G., Bakina, L.G., Chugunova, M.V.;& Bure, V .(2018) .Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil—A field study. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 126, 57–68.

84. Prajapati, S. K., Kaushik, P., Malik, A., &Vijay, V. K. (2013). Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: possibilities and challenges. *Journal of Biotechnology Advances*, 31(8), 1408-1425.

85.Premnath, N., Mohanrasu, K., Rao, R.G.R., Dinesh, G.H., Prakash, G.S., Ananthi, V., Ponnuchamy, K., Muthusamy, G., & Arun, A. (2021). A crucial review on polycyclic aromatic hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, 130608.

86. Pruthia, V., & Cameotrab, S. S. (2000). Novel Sucrose Lipid Produced by *Serratia marcescens* and Its Application in Enhanced Oil Recovery. *Journal of Sustainable Development* . 3, 533–537.

« R »

87. Rejeb, M. N., Laffray, D., &Louguet P. (1991). Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France, pp. 417-426.

88. Roy, A. (2017). A Review on Biosurfactants: Properties, Types, and Their Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8(1).

89. Russell, D.L. (1992). Remediation manual for petroleum-contaminated sites, Technomic Publishing Co., Lancaster, PA., USA. ISBN 0-87762-876-9. Pages: 175.

« S »

90. Saada,A,Nowark.C& Coquereau.N.(2005). Etat des connaissances sur l'atténuation des hydrocarbures .Rapport intermédiaire : résultat de la phase1.

91.Samanta, S.K., Singh, O.V., & Jain, R.K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons:environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 20(6), p 243-248.

92. Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., & Sarubbo, L.A. (2016).Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.

93.Sara, C-G ., Pranav P ., Armand S ., Marc ST – A ., Etienne Y . (2018).Rhizoremédiation des hydrocarbures pétroliers: un système modèle pour la manipulation du microbiome végétal. *Journal ofEnvironnemental microbiology* (819-832).

94. Saura-Calixto, F. (1988). L'utilisation de la farine de caroube dans les aliments de sevrage et son influence sur les performances et la santé des porcelets. *Journal of Food Science*, N°53, 1769-1771. In Rosil Lizardo et al, (2002).

95.Satpute,S., Banpurkar,A., Dhakephalkar,P., Banat,I., &Chopade,B. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010: 1-18.

96.Sbay ,H., Abourouh ,M. (2006). Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable : cas du pin pignon et du caroubier. Centre de recherche forestière haut commissariat aux eaux et forêts et à la lutte contre la désertification, Rabat, pp. 1-9.

97. Sharma, D. (2021). Biosurfactants: Greener Surface Active Agents for a Sustainable Future.

98. Silva-Pitondo,A.,Martins ,V.V., Fernandes,A.F.T., & Stehling,E.G. (2014). High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa*isolated from soil of different crops in Brazil., *Journal of Science of the Total Environment*. 473-474: 155-158.

99.Sigge ,G. O., Iipumbu, L., & Britz, T. J. (2011). Proximate composition of carob cultivars growing in South Africa. *South African Journal of Plant and Soil*. 28(1): 17-22.

- 100. Singh, RK., Chang ,HW., Yan, D., Lee, KM., Ucmak ,D., Wong, K., Abrouk, M., Farahnik, B., Nakamura, M., Zhu, TH., Bhutani, T., & Liao, W. (2017).** Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal Transl Med.* 15(1):73.
- 101. Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., & Imtiaz, S. (2013).** Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. *Journal of Natural and Applied Sciences*, 4(3), 243
- 102. 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.
- 103. Steliga, T., & Kluk, D., (2020).** Application of *Festuca arundinacea* in phytoremediation of soils contaminated with Pb, Ni, Cd and petroleum hydrocarbons. *Journal of Ecotoxicol. Environ. Saf.* 194, 110409.
- 104. Sunta ,J., varjani , Vivek ., & N upasani .(2017).** Un nouveau regard sur les facteurs affectant la dégradation microbienne des polluants d'hydrocarbures pétroliers. *Journal of International bioteriation & biodégradation* (71-83).

« T »

- 105. Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2009).** Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Journal of Food microbiology*, 26(8), 783-793. Vol. II. Mundi-Prensa. España, pp. 19-162.
- 106. Técher, D .(2011).** Rehabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus X giganteus*. Thèse de doctorat en Toxicologie de l'environnement. Université de Metz.
- 107. Thapa, B.; KC, A. K., & Ghimire, A. (2012) .** A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Journal of Sci, Engin. and Techn.*, 2.
- 108. Torabzadeh, S. J., & Handy, L. L. (1984).** The Effect of Temperature and Interfacial Tension on Water/Oil Relative Permeabilities of Consolidated Sands. Tulsa, Oklahoma: SPE-AIME.
- 109. Tormoehlen, L ., Tekulve, K., & Nañagas K.(2014).** Hydrocarbon toxicity : a review. *Clin Toxicol (Phila)*. 52(5):479-89.

« U »

110. Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA). (2014)

111. Uzoho, B., Oti, N., & Onweremadu, E.(2006). Effect of crude oil pollution on maize growth and soil properties in Ihiagwa, Imo State, Nigeria. *International journal. Agric. Rural Dev.*5, 91–100.

« W »

112. Wang,J., Zhongzhi,Z., Youming,S., Wei,H ., Feng,H., & Hongguang,S. (2008). Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Journal of Petroleum Sci.*, 5, 67-171.

113. Wang, L., Cheng, Y., Naidu, R., & Bowman, M. (2021). The Key Factors for the Fate and Transport of Petroleum Hydrocarbons in Soil With Related in/ex Situ Measurement Methods: An Overview. *Journal of Frontiers in Environmental Science*,9.

114. Wei, Y., Chou, C.L.&Chang, J.S.(2005).Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas Aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Journal of BiochemicalEngineering* ,27: 146–154

115. Wei, Y., & Li, G .(2018). Effect of oil pollution on water characteristics of loessial soil .IOP *Journal of Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 170, 032154.

116. Whiteley, L.O., Klurfeld, D.M. (2000). Nutrition and Cancer 36 : 131–149.

117.Wilcke ,W. (2000).PolycyclicAromaticHydrocarbons (PAHs) in soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163: 229-248.

« X »

118.Xu, N., Liu, S., Xu, L., Zhou, J., Xin, F., Zhang, W., Qian, X., Li, M., Dong, W., &Jiang, M. (2020). Enhanced rhamnolipids production using a novel bioreactor system based on integrated foam-control and repeated fed-batch fermentation strategy. *Journal ofBiotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–10.

« Y »

119. YuniatiM. (2018). Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. in IOP conference series. *Journal of earth and environmental science.* IOP Publishing 118: 012063

« Z »

120. Zhang, Y., Peng, C., Guo, Z., Xiao, X., & Xiao, R. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban soils of China: distribution, influencing factors, health risk, and regression prediction. *Journal of Environmental Pollution*, vol 254.

Annexes

Annexe VII

a) composition des milieux de culture

➤ Milieu glucose

- Glucose 5g
- Na Cl 15g
- K₂HPO₄ 1.6g
- KH₂PO₄ 0.4g
- MgSO₄ 0.09g
- NH₄NO₃ 0.1g
- CaCl₂ 0.02g
- ZnSO₄ 0.01g
- FeSO₄.7H₂O 0.05g
- MnSO₄.H₂O 0.008g
- CuSO₄.5H₂O 0.004g
- CO(NH₂).H₂O 0.01g

pH=7

➤ Milieu à base de Caroubier

- Poudre de caroube 300g
- Eau distillé 1000ml

pH=7

➤ Gélose nutritive

- Eau distillé 1000ml
- Agar 28g

➤ L'eau physiologique

- Chlorure de sodium 9g
- Eau distillée 1000ml

Annexe VIII

Tableau 01. Liste des appareils

Appareille	Marque
Autoclave	Webeco
Balance de précision	KERN 770
Balance	KERN EMB 1200-1
Ph mètre	Methrohm
Agitateur	Heidolph
Centrifugeuse	SIGMA
Four a moufle	Nabertherm
Etuve à 30°	BINDER
Microscope Photonique	Hund WETZLAR
Réfrigérateur	ENIEM
Vortex	
Four pasteur	Memmert
Etuve à 37°	Memmert
Spectrophotomètre	BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO.LTD.(UK).VIS – 7220G

Tableau 2. Liste de matériels et verrerie

Petits matériels et verrerie	
Ampoule à décanter	Eprouvette
Barreau magnétique	Erlenmeyer
Béchers	Fiolle
Boîtes pétri	Flacons en verre
Burette graduée	Micropipette
Compresse stériles	Parafilm M
Cuvette	Pipette pasteur
Écouvillons stériles	Spatules

Entonnoirs

Tube à essai

Annexe IX**Tableau 4.** Mesures de la masse des cristallisoirs, matière sèche et matière fraîche

Essai	Masse du cristallisoir (g)	Masse de la MF (g)	Masse de la MS(g)
1	122.1	143	125.2
2	128.32	151.3	131.7
3	126.3	143.9	126.3

Tableau 5. Mesures des poids des creusets en porcelaine, des cendres de chaque essai

Essai	Masse du creuset (g)	Masse des cendres (g)
1	21.9778	21,7643
2	21.6784	22.0562
3	21.7623	21.8425

Annexe X

Coloration de Gram

Différentes étapes de cette coloration :

- _ préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- _ Coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau
- _ Ajouter du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20secondes. Rincer à l'eau.
- _ On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- _ Décoloration de l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration (5à10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous filet d'eau.
- _ Recoloration à la fuchsine. Laisse agir de 30secondes à 1 minute. Rinçage à l'eau puis séchage.
- _ Observer avec une goutte d'huile à immersion, objectif 100(grossissement x100). Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.