



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكربولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Intitulé :

Les Biosurfactants Bactériens et l'Assainissement des Sols Pollués aux Hydrocarbures. Quel Rôle Jouent-Ils ? Et Comment Réduire Le Coût De Leur Synthèse Industrielle ? Revue Bibliographique.

Présenté et soutenu par : Bouchebaa Maroua

Le : 24/09/2020

Bakha Sihem

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr Chabbi Rabeh (Maître assistant « A » à UFC)

Rapporteur : Mme Guergouri Ibtissem (Maître Assistante « A » à UFC)

Examineurs : Melle Abdelaziz Wided (Maître de conférence « B » à UFC)

Année universitaire
2019- 2020

Remerciements

Avant tout nous remercions le bon dieu, le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, et la volonté pour poursuivre nos études.

La première personne à qui nous souhaitons adresser nos chaleureux remerciements est notre encadreur de recherche Mme GUERGOURI IBTISSEM Maitre-Assistante « A » à UFC qui nous a encouragés, et a dirigé ce travail pendant ces sept mois et Durant la période de confinement.

Il nous est très agréable de vous exprimer notre gratitude, et reconnaissance. Vos orientation vers le meilleur chemin et vos conseils judicieux ainsi votre disponibilité malgré vos lourdes responsabilité. Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans son aide précieuse. C'était un véritable plaisir de travailler avec vous.

Nous remercions les membres du jury Mr Chabbi Rabeh (Maître assistant « A ») et Melle Abdelaziz Wided (Maître de conférence B) d'avoir accepté d'évaluer ce modeste mémoire.

En fin, nos remerciements les plus sincères à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Merci à tous.

Dédicaces

A tous les membres de famille « BAKHA » et « BOUCHEBAA ». A tous ceux qui (re) connaissent la valeur des études et du travail. Que dieu vous procure santé et joie pour le restant de la vie.

Résumé

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures suite à leur déversement en milieu marin et terrestre constitue un danger permanent qui perturbe l'équilibre des écosystèmes et menace les êtres vivants notamment l'Homme.

L'industrie pétrolière en Algérie est secteur qui contribue au développement de l'économie du pays, mais reste à nos jours à l'origine de la détérioration de plusieurs ressources naturelles. La raffinerie de Skikda est exposée ici comme exemple.

La biodégradation est un processus naturel puissant et efficace qui survient pour rétablir la balance. Les acteurs sont principalement des microorganismes qui interviennent simultanément ou successivement chacun selon son mode d'accès au pétrole brut ou ses dérivés.

Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes aptes à dégrader les polluants hydrocarbonés en les utilisant comme seule source de carbone. Certains d'entre eux peuvent aussi produire des biosurfactants.

Cette recherche jette la lumière sur les connaissances actuelles liées à la capacité des bactéries isolées de sites pollués à produire les biosurfactants. Elle donne une idée générale sur les raffineries en Algérie, leurs activités, les déversements et le processus de la biodégradation des hydrocarbures grâce à l'action des hydrocarbonoclastes.

Plusieurs bactéries ont prouvé leur efficacité comme agents qui synthétisent les biosurfactants en utilisant des déchets d'industrie alimentaire comme source de carbone et d'énergie. La souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI, étudiée par l'équipe de Marcia et ses collaborateurs est un bon exemple de ceci.

Mots clés : hydrocarbures, hydrocarbonoclastes, biodégradation, biosurfactants, déchets huileux.

ملخص

يعد التلوث البيئي بالمواد الهيدروكربونية بعد انسكابها في البيئة البحرية والبرية خطرا دائما يخل بتوازن النظام البيئي ويهدد الكائنات الحية، وخاصة البشر.

صناعة النفط في الجزائر قطاع يساهم في تنمية اقتصاد البلاد، و لكنه لا يزال الى يومنا هذا يسبب في تدهور العديد من الموارد الطبيعية، و تظهر مصفاة سكيكدة مثالا على هذا.

التحلل البيولوجي هو عملية طبيعية قوية وفعالة تحدث لاستعادة التوازن. والمسؤولون على ذلك هم كائنات دقيقة تتدخل بشكل متزامن أو متتابع ، ويعتمد كل منها على طريقة للوصولها إلى النفط الخام أو مشتقاته.

البكتيريا "هيدروكربونوكلاست" هي كائنات دقيقة قادرة على تحطيم المحروقات من خلال استخدامها كمصدر وحيد للكربون. كما يمكن أن ينتج البعض منهم السرفكتونات الحيوية.

يلقي هذا البحث الضوء على المعرفة الحالية المتعلقة بقدرة البكتيريا المعزولة من المواقع الملوثة على إنتاج المواد الحيوية كما يعطي فكرة عامة عن المصافي في الجزائر وأنشطتها وانسكاباتها وعملية التحلل البيولوجي للهيدروكربونات بفضل عوامل "هيدروكربونوكلاست".

لقد ثبت أن العديد من البكتيريا فعالة كعوامل تصنع السرفكتونات الحيوية باستخدام نفايات صناعة الأغذية كمصدر للكربون والطاقة. تعتبر سلالة *Pseudomonas aeruginosa* LBI ، التي درسها فريق Marcia والمتعاونون ، مثالا جيدا على ذلك.

الكلمات المفتاحية : المحروقات- الهيدروكاربنوكلاستية- التحلل البيولوجي- السرفكتونات الحيوية- النفايات النفطية

Abstract

The pollution caused by spills and Illegal disposal of hydrocarbons in both land and water creates a permanent danger that alters ecosystems and threatens life forms in general and mainly mankind.

The petroleum industry in Algeria is a sector that contributes to the country's development yet it remains the root of multiple resources' deterioration. The refinery of Skikda is hereby presented as an example.

Biodegradation is an efficient and powerful natural process that occurs to restore balance. Key players are microorganisms that intervene simultaneously or successively each according to its access manner into crude oil or its derivatives.

Bacteria (Hydrocarbonoclasts) are microorganisms that degrade hydrocarbon pollutants using them as a source of carbon, some of which can also produce biosurfactants.

This research sheds light on current information related to the ability of extracted bacteria from polluted sites to produce biosurfactants , it provides an overview of refineries in Algeria, their activities, spills and the biodegradation of hydrocarbons by hydrocarbonoclasts' action.

Several Bacteria has proven its efficiency as synthesizing agents for biosurfactants utilizing food industry waste as a source carbon and energy. The strain *Pseudomonas Aeruginosa* LBI , studied by the Marcia team and its partners is a fine example.

Key Words: hydrocarbons, hydrocarbonoclastes, biodegradation, biosurfactants, oily waste.

Liste Des Figures

Numéro	Intitulé	Page
01	Schéma des activités de la raffinerie de SKIKDA	5
02	Les diverses formes de pollution des sols	7
03	Principe général de la dégradation des hydrocarbures.	15
04	Dégradation aérobie de la matière organique.	17
05	Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes.	18
06	Dégradation anaérobie de la matière organique	19
07	L'activité d'une souche bactérienne dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers récalcitrants avec production simultanée de biosurfactant	22
08	Schéma représentant une biomolécule amphiphile.	23
09	Schéma regroupant les applications de biosurfactants	27
10	Les différentes méthodes analytiques appliquées pour la synthèse de biosurfactants rhamnolipides.	31
11	La spectrométrie de masse ESI en mode ion négatif pour les mélanges de biosurfactants produits à partir de (A) glycérol et (B) d'huile de soja	36
12	L'évolution de la production de rhamnolipides par <i>P. aeruginosa</i> LBI à partir de déchets d'huile de soja	38

Liste Des Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
01	Les principaux polluants retrouvés sur les sites pollués.	8
02	La classification des hydrocarbures pétroliers.	9
03	Composition élémentaire du pétrole brut.	11
04	Principaux facteurs abiotiques influençant la biodégradation des hydrocarbures.	20
05	Les Principales classes de surfactants biologiques	26
06	La production des types de biosurfactants à partir de différentes souches.	29
07	Production de biosurfactants par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI croissant sur différentes sources de carbone	34
08	Utilisation des acides gras provenant des déchets de raffinage de différentes huiles <i>P. Aeruginosa</i> LBI après 144 h d'incubation	37
09	Les propriétés tensioactives des rhamnolipides obtenus à partir des déchets de raffinage de différentes huiles	39

Liste Des Abréviations

HP : Hydrocarbures pétroliers.

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

GNL : Gaz naturel liquéfié.

GPL : Gaz de pétrole liquéfié.

PNB : Produit national brut.

RA/K : Raffinerie SKIKDA.

BTEX : Benzène, Toluène, Ethyl-benzène et Xylènes.

TCA : Cycle d'acide tricarboxylique.

pH : Potentiel d'hydrogène.

BS : Biosurfactants.

GN : Gélose nutritive.

MSM : minéral Salt medium.

rpm : Rotation par minute.

UFC : unité formant colonie.

ST : surface superficielle.

IT : surface interfaciale.

DO : Densité optique.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse.

E₂₄ : indice d'émulsion.

Table Des Matières

Résumé	
المخلص	
Abstract	
Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste d'abréviations.....	III
Introduction Générale	1
Chapitre I : Les Raffineries Algériennes et leurs Activités Polluantes	
1. Généralités sur les raffineries algériennes.....	3
2. La raffinerie de Skikda (RA/K).....	4
3. La pollution engendrée par l'industrie pétrolière.....	6
3.1. Définitions.....	6
3.2. Les principaux types de la pollution.....	6
3.3. Pollution du sol aux hydrocarbures.....	8
3.3.1. Les hydrocarbures pétroliers (HCP).....	9
3.3.2. Pétrole brut.....	11
3.3.3. Le condensat du gaz naturel.....	12
3.4. Toxicité des hydrocarbures et leur devenir dans le sol.....	12
3.4.1. Evaporation.....	13
3.4.2. Dissolution.....	13
3.4.3. Photooxydation.....	13
3.4.4. Emulsification.....	13
3.4.5. Sédimentation.....	13
Chapitre II : La Dégradation des Hydrocarbures	
1. Définition de la biodégradation.....	14
2. Principe de la biodégradation.....	14
3. les voies métaboliques de la biodégradation.....	15
3.1. La minéralisation.....	15
3.2. Le co-métabolisme.....	16
3.3. La biodégradation aérobie.....	16

3.4. La biodégradation anaérobie.....	18
4. Dégradation des hydrocarbures par les hydrocarbonoclastes.....	19
5. Paramètres influant la biodégradation des hydrocarbures.....	20
6. Modes d'action des hydrocarbonoclastes.....	21
6.1. Le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse.....	21
6.2. Le transfert interfacial direct (TID).....	21
6.3. Le transfert interfacial facilité ou émulsification.....	21
6.4. Le transfert micellaire (pseudo solubilisation).....	21

Chapitre III : Les Biosurfactants et leur Rôle dans la Biodégradation

1. Surfactants.....	23
2. Biosurfactants.....	24
3. Production de biosurfactants.....	24
4. Rôle de biosurfactants.....	24
5. Les variétés de biosurfactants	25
5.1. Glycolipides.....	25
5.2. Lipopeptides ou lipoprotéines.....	25
5.3. Phospholipides.....	25
5.4. Polymériques.....	25
6. L'intérêt et la valeur industrielle de biosurfactants.....	26

Chapitre IV : La Synthèse de Biosurfactants par des Espèces Bactériennes à partir de Déchets de l'Industrie Alimentaire

1. Recyclage de déchets pour la synthèse de produits d'intérêt... les biosurfactants.....	28
2. Présentation d'un article scientifique portant sur la synthèse de rhamnolipides par la souche. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI à partir de différentes sources de carbone.....	30
2.1. Protocole expérimentale.....	31
2.1.1. Ensemencement et incubation	31
2.1.1.1. Milieu de culture (MSM).....	31
2.1.1.2. Substances testés.....	31
2.1.1.3. Souche bactérienne.....	32
2.1.1.4. Préculture.....	32
2.1.1.5. Culture.....	32
2.1.2. Estimation de la biomasse.....	32

2.1.3. Extraction des rhamnolipides.....	32
2.1.4. Activité d'émulsification.....	33
2.1.5. Composition en acides gras des déchets	33
2.2. Résultats et discussion	33
2.2.1. Rendement en rhamnolipides selon le substrat.....	33
2.2.1. Propriétés structurales des rhamnolipides selon le substrat (hydrophobes ou hydrophile).....	34
2.2.3. Comparaison de plusieurs substrats hydrophobes (déchets d'industrie de raffinage de différentes huiles).....	36
2.2.4. Propriétés fonctionnelles des rhamnolipides selon le substrat.....	38
3. Conclusion.....	40
Conclusion Générale	41
Références Bibliographiques	42

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, le pétrole brut prend une place prépondérante dans l'évolution de la civilisation moderne. Les activités industrielles dans les raffineries génèrent des groupes de composés pétroliers telles que : l'essence, les fiouls et les lubrifiants qui posent une véritable pollution qui peut être accidentelle ou chronique, pour les différents compartiments de l'environnement : le sol, l'eau et biosphère (Guermouche, 2013).

Le déversement des hydrocarbures est une problématique environnementale fréquente dans le monde entier, en effet, plus de 10 000 galons de pétrole ont été reportés dans la base de données internationale des déversements pétroliers (Pulgarin, 2012).

La dépollution du sol contaminé peut s'effectuer par de nombreuses méthodes en fonction de la toxicité du polluant et du risque qu'il présente. Parmi ces processus qui sont qualifiés aptes à éliminer les hydrocarbures figure le processus biologique (ou la bioremédiation) qui représente une technologie simple, efficace, et moins coûteuse par rapport aux autres alternatives comme les méthodes physiques et chimiques. D'ailleurs cette méthode biologique est basée principalement sur la capacité épuratrice des organismes vivants entre autres des bactéries dites hydrocarbonoclastes.

La biodégradation peut être définie comme une manière de rendre moins toxiques les polluants environnementaux les plus récalcitrants y compris les produits de l'industrie pétrolière. Ces hydrocarbures pétroliers dont la structure et la composition varient suscitent l'intervention de plusieurs groupes bactériens chacun selon ses propriétés enzymatiques.

Certaines bactéries sont caractérisés par leur capacités à synthétiser des tensioactifs pour dégrader les hydrocarbures et les utiliser comme une source de nutriment, à titre d'exemple les espèces suivantes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium spp*, *Haemophilus spp*, *Rhodococcus spp.*, *Paenibacillus spp*, dont la plupart sont isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole brute ou ses dérivés.

La synthèse des biosurfactants à l'échelle industrielle reste conditionnée par son cout.

L'utilisation de déchets de l'industrie alimentaire telle que la mélasse, les déchets de raffinage des huiles végétales et autres, comme substrats dans le milieu de fermentation augmente le rendement et réduit le cout constituant ainsi une meilleure alternatives aux autres techniques appliquées.

Le présent mémoire représente une recherche bibliographique qui comprend quatre chapitres.

Les trois premiers chapitres englobent toutes les informations sur les raffineries d'Algérie, la biodégradation des hydrocarbures pétroliers et la synthèse de biosurfactants.

Le dernier chapitre est un exemple de production de biosurfactants par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* LBI à partir des déchets de l'industrie alimentaire.

CHAPITRE I

Les Raffineries Algériennes et leurs Activités Polluantes

1. Généralités sur les raffineries algériennes

Notre pays possède une grande richesse en réserve de pétrole et constitue ainsi un acteur principal dans l'industrie pétrolière nationale et internationale.

La première découverte de pétrole remonte au mois de janvier 1956 au Sahara, à Edjeleh, dans la région d'In Amenas, Fort Polignac à l'époque. La découverte du plus grand champ pétrolier algérien, Hassi Messaoud, à 106 Km au sud d'Ouargla, est intervenue en juin de la même année (<https://algeria-watch.org/?p=65805>)

SONATRACH (Société nationale pour la recherche, la production, le transport, la transformation, et la commercialisation des hydrocarbures) est la première entreprise du continent africain. Elle est classée 12ème parmi les compagnies pétrolières mondiales, 2ème exportateur de GNL et de GPL et 3ème exportateur de gaz naturel. Sa production globale (tous produits confondus) est de 230 millions de tep en 2006. Ses activités constituent environ 30% du PNB de l'Algérie (https://www.memoireonline.com/08/09/2573/m_Rapport-de-stage-societe-petroliere-SONATRACH1.html)

En effet, au niveau des différents complexes, se traite le pétrole pour l'obtention des produits de consommation énergétiques et non énergétiques qui seront utilisés comme matière première par exemple :(carburant, bitumes, Gaz, kérosène, naphta...) dans d'autres domaines (Benchouk, 2017).

En Juillet 1972, les unités de la raffinerie étaient lancées. Actuellement l'entreprise nationale du raffinage de pétrole « NAFTEC » gère l'ensemble de six raffineries en cours d'exploitation : (www.lestrepublikain.com).

- Raffinerie de Skikda.
- Raffinerie d'Alger
- Raffinerie d'Arzew.
- Raffinerie d'Adrar
- Raffinerie d'In Amenas.
- Raffinerie d'Hassi Messaoud.

L'industrie du raffinage en Algérie met en œuvre plusieurs techniques de séparation et de transport qui permettent de produire à partir de pétrole brut des produits commerciaux.

2. La raffinerie de Skikda (RA/K)

Nous avons obtenue l'autorisation de visiter la raffinerie de Sonatrach à Skikda en mois de février, dans le cadre d'effectuer un échantillonnage de sols pollués autour des citernes de stockage des hydrocarbures et nous avons eu l'occasion de voir de près les activités pétrolières d'avoir aussi quelques informations sur le fonctionnement des différents services.

Globalement, la raffinerie de Skikda est considérée comme l'une des plus grandes raffineries d'Afrique (www.lestrepublikain.com).

Elle a été construite en 1976 par la société italienne SNAM-PROGETTI et SAIPEM et se situe au bord de la mer, dans une zone industrielle à 7 Km à l'Est de SKIKDA et à 2 Km par rapport au centre de la ville (Benchouk, 2017).

La raffinerie était conçue pour traiter une grande gamme de brut. Il existe des cas particuliers où elle traite uniquement un seul brut ; lorsque les ressources estimées en brut sont assez importantes. Pour se faire les raffineurs recourent à quatre types de traitement : la séparation, l'amélioration, la conversion et le mélange (James, 2005)

La raffinerie de Skikda est alimentée directement en brut algérien par celui venant de Hassi-Messaoud avec une capacité de traitement de 15 millions t/an. Ainsi le brut est exporté à 50%, (c'est une station intermédiaire de Hassi-Massaoud), ce qui reste est traité pour avoir les produits suivants : GPL, essences, naphta, kérosène, gasoil, fuels, aromatiques et bitumes (figure 1).

Le transport du pétrole brut est réalisé à l'aide de pipelines, la distance entre les champs pétroliers est de 760 Km (Ghazali, 2016).

La raffinerie de Skikda est divisée en différentes zones, elle comprend (05) unités :

- Unité 100 = pour la production de l'essence normale de la raffinerie de Skikda.
- Unité 200 = c'est une unité de traitement de kérosène.
- Unité 300 = unité de stockage (il existe 11 bacs et 03 sphères).
- Unité 400 = unité de Torche.
- Unité 500 = unité de traitement des eaux.

3. La pollution engendrée par l'industrie pétrolière

3.1. Définitions

La pollution tient son nom du latin « pollutio » qui signifie « salissure » ou « souillure » (<http://www.toupie.org/Dictionnaire/Pollution.htm>). C'est un changement défavorable d'un écosystème qui apparaît par une modification de concentration des constituants chimiques, physiques ou biologiques de l'air de l'eau et du sol (www.lestrepublikain.com) dans laquelle elle peut ou aura un effet néfaste réel ou potentiel, non seulement sur la vie humaine, mais aussi sur le progrès industriel, le climat et les autres organismes vivants.

En quelque sorte, la pollution est une sorte de stress négatif exercé sur la santé positive d'écosystème (Abhijit, 2018).

En effet, les substances qui provoquent les changements indésirables sont appelées « polluant ». Par conséquent, ce dernier est une substance (poussière, fumée...), des produits chimiques (SO₂, méthylmercure) ou un facteur (comme la chaleur, le bruit, le vent...) qui peuvent être à un état solide, liquide, gazeuse (Abhijit, 2018).

Deux origines de la pollution sont distinguées : (http://toupie.org/Dictionnaire//Pollution_formes.htm).

- ❖ Pollution accidentelle : c'est le déversement ou le dépôt ponctuel de polluants qui peut se produire lors des accidents de transport (citernes) et des fuites de conduites.
- ❖ Pollution chronique : la pollution chronique est une pollution permanente qui est la conséquence d'émissions répétées ou continues de polluants.

3.2. Les principaux types de pollution

Il existe différents genres de contaminants environnementaux dans lesquelles la pollution extérieure naturelle peut être classée selon le milieu analysé : l'air, l'eau et le sol.

La pollution atmosphérique résulte de l'introduction des polluants mélangés directement dans l'air, nous appelons ce phénomène « les polluants primaires », ou bien qui sont créés dans l'air « les polluants secondaires », provoquant ainsi des problèmes respiratoires chez l'homme, comme chez de nombreux animaux (Mahjoub, 2012).

La pollution d'eau désigne la présence d'une quantité excessive du polluant, cette contamination est presque inévitable car l'eau est une ressource naturelle importante (Mahjoub, 2012).

Par ailleurs certains polluants tels que les produits chimiques sont quasiment propagés dans le sol ce qui provoque ce qu'on appelle la pollution du sol qui est considéré comme l'écosystème terrestre le plus précieux au monde, dans lequel évolue de nombreux organismes. Parmi les causes de cette pollution : les activités humaines (anthropiques), les déchets industriels, les opérations agricoles et les fuites de citernes des hydrocarbures pendant le stockage ou le transport, touchant les différents types de sols, qu'ils soient : agricoles, forestiers ou urbains (figure 2) (Hamelin et al., 2000) et (Pepper et al., 2009).

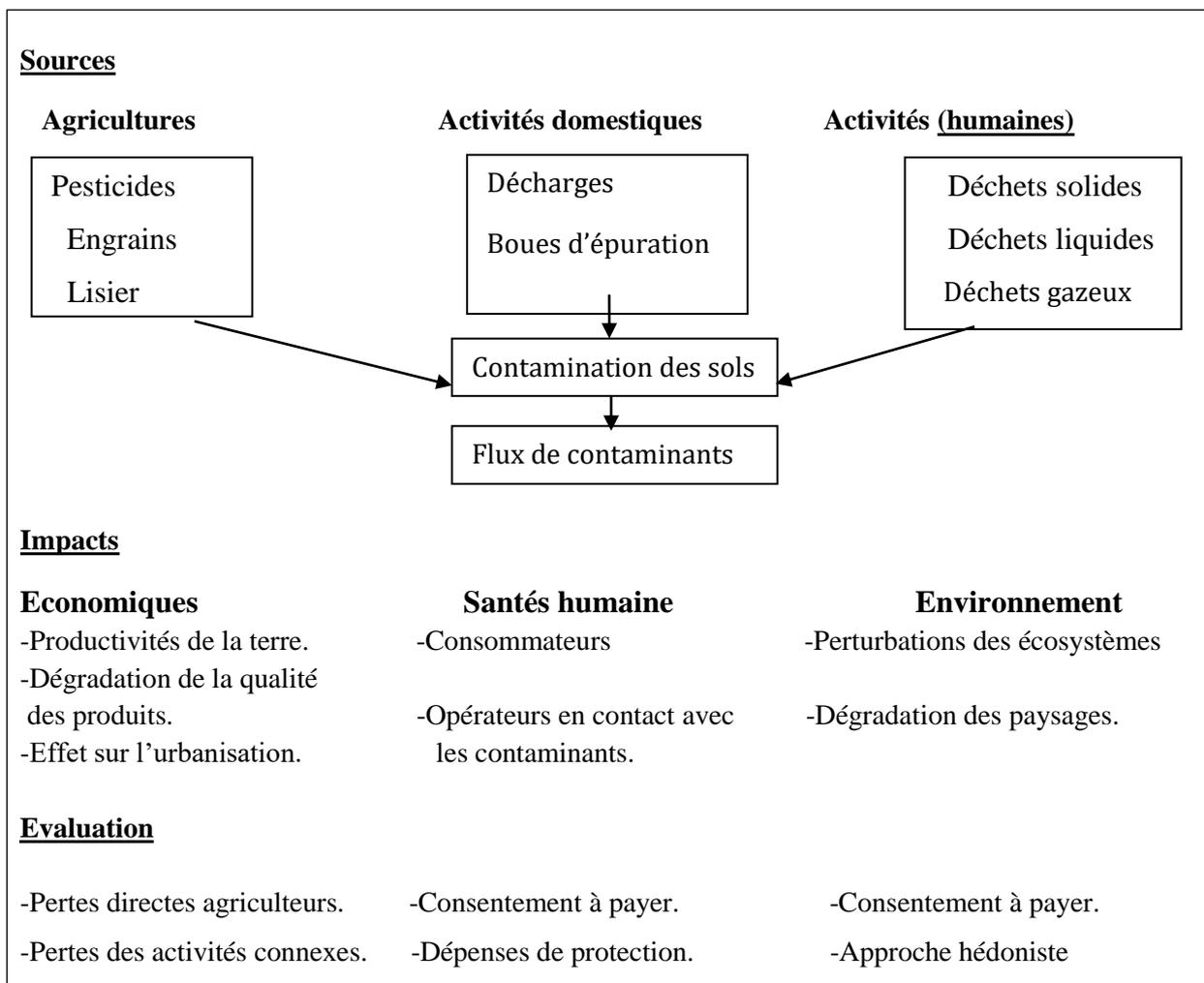


Figure 2- Les diverses formes de pollution des sols (Rainelli, 1996).

Les polluants sont découverts dans des sols, lesquels sont des milieux intégrateurs et des milieux d'exposition pour l'homme ou pour les écosystèmes (Callier et al., 2002).

La nature et le degré de la contamination d'un sol sont très variables selon l'origine de la pollution et la région géographique, sans compter la possibilité de transformation des polluants primaires en polluants secondaires sous l'effet de phénomènes biotiques ou abiotiques (Matte, 1997).

Les pollutions multiples peuvent se faire par des polluants de la même famille chimique ou de familles différentes. Le tableau ci-dessous représente les différents polluants rencontrés sur des sites.

Tableau 1: Les principaux polluants retrouvés sur les sites pollués (Matte, 1997).

Polluants	Pourcentage (%)
Hydrocarbures	49
Plomb	20
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	19
Solvants halogènes	15
Chrome	15
Zinc	15
Cyanure	12
Cuivre	11
Arsenic	10
Nickel	8
Polychlorobiphényles (terphényles)	7
Solvants non halogènes	7
Cadmium	7
Mercure	6

3.3. Pollution du sol aux hydrocarbures

Les pollutions du sol aux hydrocarbures sont fréquentes pouvant venir à partir des fuites de bacs, ainsi que des pipelines.

Généralement les hydrocarbures tels que (essence, pétrole, condensat, gasoil...) sont des contaminants environnementaux ubiquistes. Ils constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux (Abbia et Guitoun, 2016). De plus, on peut classer les sols contaminés aux hydrocarbures en deux catégories : il y a les terrains contaminés par les anciennes

activités industrielles et les déversements accidentels de substances toxiques dans les sols pendant la production et le transport des matières chimiques, par conséquent la deuxième catégorie du sol contaminé est constituée par les anciens dépotoirs ou lagunes (Zmirou et *al.*, 2003).

3.3.1. Les hydrocarbures pétroliers

Les hydrocarbures pétroliers désignent un mélange de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières (Abbia et Guitoun, 2013).

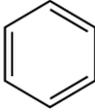
Ces produits pétroliers sont les plus simples de la chimie organique faits exclusivement à partir de deux éléments d'hydrogène (H) et de carbone (C), leur formule brute est $C_n H_m$, Où n et m sont deux nombres entiers naturels (Franennec et *al.*, 1998).

Les composés organiques (carbone, gaz naturels, pétrole) sont présents dans les différentes parties d'écosystème (air, sol, eau) (Mbogne, 2017) et ils font partie des principales sources d'énergie car sont utilisés pour la fabrication des huiles lubrifiantes et pour la constitution de la matière première des synthèses pétrochimiques (Lefebvre, 1978).

Quatre familles des hydrocarbures pétroliers sont regroupées selon leur composition chimique comme suit (tableau 2)

Tableau 2 : La classification des hydrocarbures pétroliers (Soltani, 2004)

Classes d'hydrocarbures		
Hydrocarbures (acycliques)	aliphatiques	Composés saturés <u>1-Alcanes linéaires</u> (paraffines normales ou n-alcanes) <ul style="list-style-type: none"> • simple liaison • chaîne ouverte • formule brute $C_n H_{2n+2}$ • formule développée $CH_3-(CH_2)-CH_3$
		<u>2-Alcanes ramifiés</u> (isoparaffines ou isolalcanes) <ul style="list-style-type: none"> • simple liaison • chaîne ramifiée ex : isopentane

		$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
		<p>3-Cycloalcanes (cyclanes ou naphènes)</p> <ul style="list-style-type: none"> • simple liaison • chaîne cycliques
		<ul style="list-style-type: none"> • noyau aromatique 
	Composés insaturés	<p>1-<u>Les alcènes</u> (éthylénique ou oléfines)</p> <ul style="list-style-type: none"> • au moins une double liaison C=C • formule brute : $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$ <p>ex : éthylène C_2H_4</p>
		<p>2-<u>Les alcynes :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • au moins une triple liaison • formule brute $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$ • acétylène C_2H_2
Hydrocarbures aromatiques	<ul style="list-style-type: none"> • trois doubles liaisons • cycle insaturé à six atomes de C • formule brute : $\text{C}_n\text{H}_{2n-6}$ 	<p>1-hydrocarbures aromatiques monoaromatiques ex :(BTEX).</p> <p>2-hydrocarbures aromatiques polycycliques.</p>
Composés polaires		On trouve : composés soufrés, composés azotés, et composés oxygénés.
Les asphaltènes		Contenant : l'oxygène, soufre, l'azote et l'hydrogène.

3.3.2. Le pétrole brut

C'est un mélange extrêmement complexe des hydrocarbures liquides ou gazeux. Il contient également des composés organiques oxygène, soufre, et azote. Aussi des métaux chimiquement liés à des molécules organiques (tableau 3). Il occupe les vides de roches poreuses appelées (réservoirs) (Lefebvre, 1978). Leur couleur va de l'ombre clair au noir opaque (brut asphalténique) (Salle et Denyser, 1979).

La formation des gisements du pétrole est un processus naturel correspondant à une accumulation de débris végétaux et d'organismes marins sur la surface de la terre durant plusieurs millions d'années (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Hydrocarbure>)

Les pétroles bruts ont des caractéristiques physiques et chimiques très variables tels que le poids moléculaire qui leurs permet de se regrouper en deux familles principales (Proskouriakov et *al.*, 1998).

- **Pétroles légers** : qui renferment une proportion plus élevée de fraction essence, relativement peu de résine et de soufre.
- **Pétroles lourds** : contiennent des proportions importantes de résine. Ces pétroles brut sont les meilleurs des Bitumes.

Tableau 3 : composition élémentaire du pétrole brut (Bocard, 2006)

Composants	Poids %
Carbone	84 à 87
Hydrogène	11 à 14
Soufre	0 à 6
Azote	0 à 1*
Oxygène	0 à 8**

*souvent <0.1

**souvent <0.1

3.3.3. Le condensat du gaz naturel

Le gaz naturel est un mélange d'hydrocarbure, combustible et fossile. Il est composé principalement du méthane (CH_4), propane (C_3H_8), du butane (C_4H_{10}), de l'éthane (C_2H_6) et du pentane (C_5H_{12}). Présent naturellement sous forme gazeuse dans les roches poreuses (<https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/gaz-naturel>).

En effet, un condensat de gaz naturel est un composé d'hydrocarbures, liquide incolore, avec une odeur d'essence. C'est un produit volatil et inflammable, qui se trouve sous forme gazeuse dans un gisement, et devient liquide lorsqu'il atteint la surface. Typiquement le condensat gazeux contient des hydrocarbures dont le point d'ébullition est jusqu'à C8, exemple: pentane (C_5H_{12}), octane (C_8H_{18}), et naphta (<https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/gaz-naturel>).

La distillation c'est une application qui permet de séparer le condensat en : gaz, naphta, kérosène, gaz légers, gaz lourds. Ces produits sont classés comme suit :

- naphta léger
- naphta lourd
- kérosène
- gasoil léger
- gasoil lourd

3.4. La toxicité des hydrocarbures et leur devenir dans le sol

Le sol avec ses trois fractions : solide, liquide et gazeuse constitue un milieu vivant, complexe et sensible au changement environnemental (Soltner, 2011). Ce dernier peut être exposé à l'émission d'un hydrocarbure qui est valable à amener une pollution nocive pour l'homme directement ou indirectement (quand elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles). Ce sont des polluants toxiques, mutagènes ou cancérigènes. Ces pollutions dépendent souvent les conditions environnementales, du type d'hydrocarbure déversé et de la composition chimique qui assujetti à des processus naturels adéquat pour des modifications physicochimiques (Pauline et *al.*, 2010) et (Henati, 2018). Parmi les phénomènes de transformation des hydrocarbures qui peuvent avoir lieu, on cite :

3.4.1. Evaporation

C'est le principal phénomène d'altération qui affecte les portions de faible poids moléculaire (transfert des composés volatils plus légers), et influe par les changements atmosphériques (vent, vagues, température...), c'est-à-dire les molécules de faible poids moléculaire s'évaporent plus rapidement que celles de poids moléculaire élevé qu'existent dans le sol (Soltani, 2004).

3.4.2. Dissolution

Généralement, les molécules à faible masse moléculaire (inférieur à C_{15}) sont touchés par la dissolution en particuliers les molécules aromatiques comme les benzènes et les Cyclènes (Albert, 1995). La vitesse de ce processus dépend principalement de la quantité des hydrocarbures présente dans le sol et du degré de leur dispersion, ainsi que de nombreux facteurs environnementaux (Faksness et *al.*, 2008).

3.4.3. Photooxydation

Le phénomène de photooxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. L'efficacité de la photooxydation dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés (Soltani, 2004).

3.4.4. Emulsification

C'est un mélange de gouttelettes d'eau dans l'huile appelée (mousse chocolat). Ces émulsions sont constituées par les hydrocarbures de haut poids moléculaires (Soltani, 2004). Celui-ci augmente le volume du produit déversé et modifie certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité (Fingas, 2013).

3.4.5. Sédimentation

C'est un phénomène d'un passage des hydrocarbures légers ou lourds de la surface du sol vers le fond. Cette sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle (Vandecasteele, 2005).

CHAPITRE II

La Dégradation Des Hydrocarbures

A présent, les produits hydrocarbonés sont considérés comme un axe principal pour l'industrie (Kvenvolden et Cooper, 2003). les rejets des hydrocarbures dans l'environnement, qu'ils soient accidentels ou dus à des activités anthropiques, sont la principale cause de pollution des sols (Holliger et *al.*, 1997).

La décontamination des sites pollués nécessite l'intervention de nouvelles techniques telles que la bioremediation. Cette dernière peut se définir comme un phénomène qui permet la destruction des composés xénobiotiques ou les rendre moins toxiques par l'utilisation des activités naturelles biologiques. Il existe plusieurs processus de la bioremediation parmi eux la diffusion et l'advection, la sorption, la désorption et la biodégradation (Vogel et Ballerini, 2001).

1. Définition de la biodégradation

La biodégradation ou la dégradation biologique, est un phénomène naturel qui conduit à la transformation des composés organiques complexes en molécules plus simples pour la production d'énergie, par l'action de différents organismes vivants entre autres des microorganismes qui peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (ajoutées au milieu), ou encore être prélevés sur le site contaminé. Sur un plan chimique, la biodégradation c'est la décomposition des substances organiques sous une action enzymatique (James, 2005) et (Abdelly, 2007), celle-ci se déroule aux trois phases depolluant (liquide, solide , gazeuse), ainsi que dans des différents milieux (sol, eau...) (Lecomte, 1995).

La biodégradation est considérée comme un système majeur de la réduction naturelle des polluants en raison de sa capacité à simplifier les contaminations d'une façon significative. Ce phénomène dépend de nombreux processus ce qui rend difficile sa compréhension totale (Aid et Zafrane, 2018).

2. Principe de la biodégradation

Le principe de la biodégradation repose sur la transformation d'un contaminant (hydrocarbure, pesticides, solvant, matière plastique...) en différents sous-produits (Head et *al.*, 2006). Les produits néoformés (métabolites) présentent une faible toxicité car cette biodégradation provoque une diminution du taux de la contamination initiale (Juhasz et Naidu, 2000). Dans ce cas, les agents de la biodégradation se nourrissent sur des constituants

de polluant organique (C, H, O, N, P, S, Oligoéléments), cette réaction utilise deux autres éléments : l'azote et le phosphore qui participent à la synthèse protéique.

Dans les conditions d'aérobiose l'oxydation s'effectue par la molécule d'oxygène comme un accepteur terminal, alors que pour la dégradation anaérobie l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou le méthane (Jose, 1999). Cette dégradation est beaucoup moins efficace par rapport à l'action des microorganismes aérobies. (figure 3).

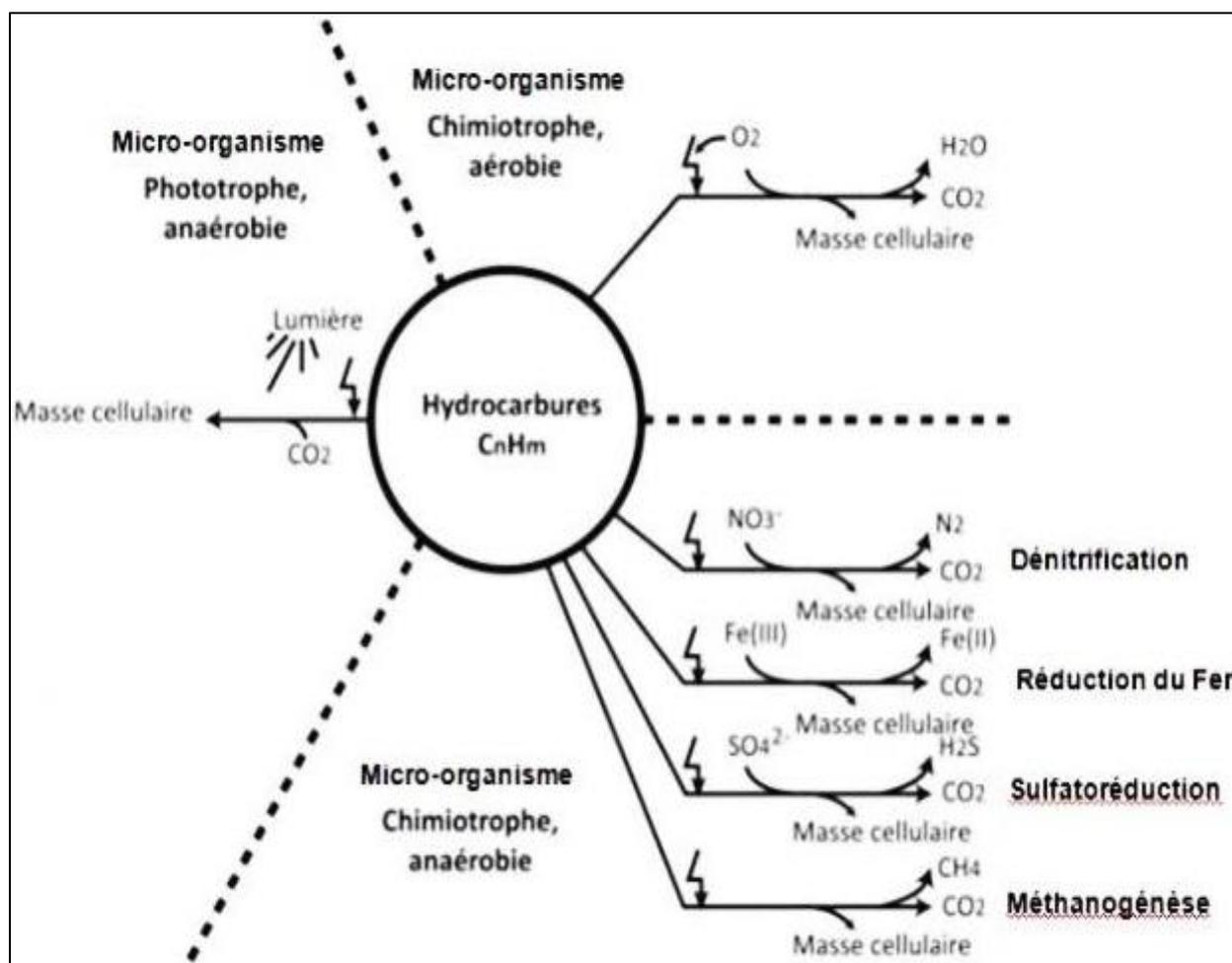


Figure 3- Principe général de la dégradation des hydrocarbures (Widdel et Rabbus, 2001).

3. Les voies métaboliques de la biodégradation

3.1. La minéralisation

La minéralisation est une forme de la transformation complète des molécules organiques en constituants inorganiques ($\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$) qui s'impliquent directement dans la croissance primaire des microorganismes. La minéralisation est un processus intéressant car il conduit à une évaporation totale du milieu contaminé (Madsen et *al.*, 1997). L'attaque

enzymatique des microorganismes permet également l'oxydation des hydrocarbures aromatiques par dioxygénases dans le substrat (Gibson et *al.*, 1975). La biomasse et le dioxyde de carbone sont les principaux produits finaux de cette voie, le pyruvate est l'un des principaux intermédiaires de la voie.

3.2. Le co-métabolisme

Les hydrocarbures sont transformés soit directement pour leur utilisation comme une source de carbone soit indirectement par le co-métabolisme. Le co-métabolisme est un processus qui correspond à une dégradation fortuite des composés organiques par des microorganismes utilisant des enzymes ou des co-facteurs pendant le métabolisme d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable, sans que ceux-ci soient pour eux une source d'énergie et d'éléments nutritifs (Benchouk, 2007), alors dans ce cas-là le polluant ne sert pas de source principale de nutriment, il est considéré comme un substrat secondaire. Les produits du Co-métabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne, ils sont généralement stockés et ne sont pas entièrement minéralisés.

Dans ce cas le métabolite produit est consommé par une seconde espèce comme un champignon (Bouchez et *al.*, 1999). Il existe plusieurs microorganismes ayant la capacité de minéraliser les hydrocarbures, par contre la présence d'un consortium bactérien peut être requise pour la dégradation complète et efficace des HAP, notamment les HAP à haut poids moléculaire (Vinas et *al.*, 2002).

3.3. La biodégradation aérobie

La biodégradation aérobie est la dégradation complète des substances organiques en composés inorganiques solubles en conditions d'aérobiose. La figure suivante illustre ce processus.

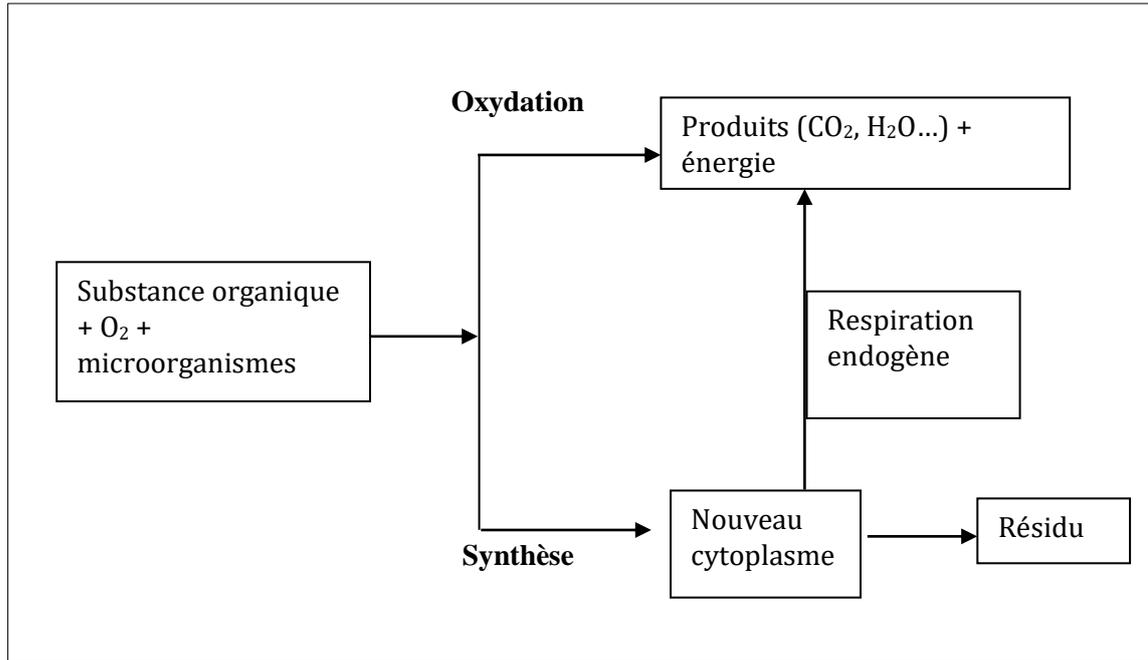


Figure 4- Dégradation aérobie de la matière organique (Medejoub, 2012).

La biodégradation joue un rôle crucial dans la diminution du pourcentage des polluants récalcitrants en produits moins toxiques, notamment les hydrocarbures pétroliers déversés dans l'environnement, cependant, cette biodégradation n'est pas un paramètre contournable pour prédire l'impact environnemental d'un versement (James, 2005). L'oxydation des hydrocarbures aboutit à des cassures successives en molécules de moins en moins complexe jusqu'à l'obtention des métabolites (H_2O et CO_2 avec le renouvellement de la biomasse) (Lecomte, 1995), ainsi que le transport et le passage des hydrocarbures à travers l'enveloppe cellulaire des microorganismes jusqu'au cytoplasme dépend des différents processus (Soltani, 2014).

Un schéma qui résume le processus de la biodégradation des hydrocarbures sous l'action des microorganismes a été proposé par Das et Chandran, (2011) en condition d'aérobiose (figure 5).

Dans le cas d'aérobiose, l'accepteur final d'électron est l'oxygène qui représente la clé de la réaction enzymatique qui est stimulée par l'oxygénases et des peroxydases, Par la suite, les voies périphériques de biodégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs). Les métabolites comme l'acetyl-CoA, le pyruvate ou le

succinatesont utilisés comme des précurseurs pour la biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule.

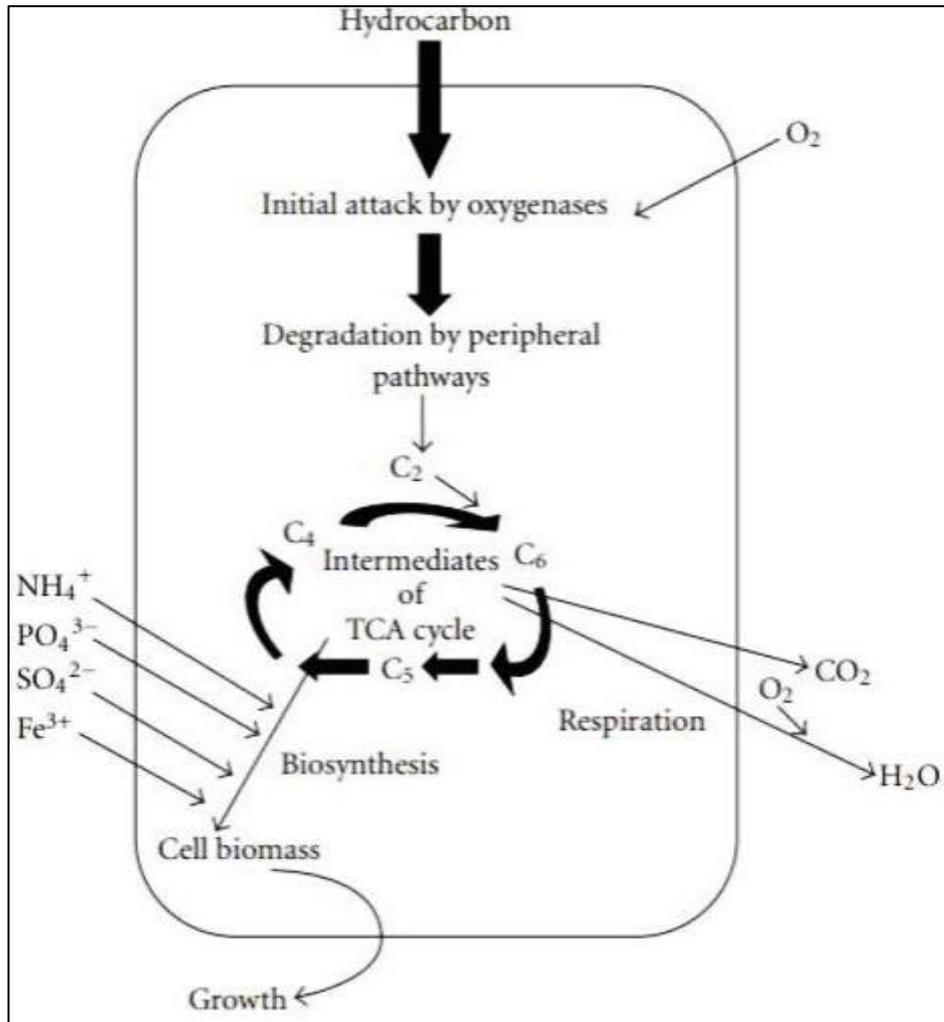


Figure 5- Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das et Chandran, 2011).

3.4. La biodégradation anaérobie

En absence d'oxygène, les microorganismes se développent grâce à la dégradation incomplète des substances organiques en acides organiques simples, le méthane et l'hydrogène gazeux comme sous-produits organiques (Kumar et Conal, 2015).

La figure suivante montre la biodégradation dans les conditions d'anaérobiose.

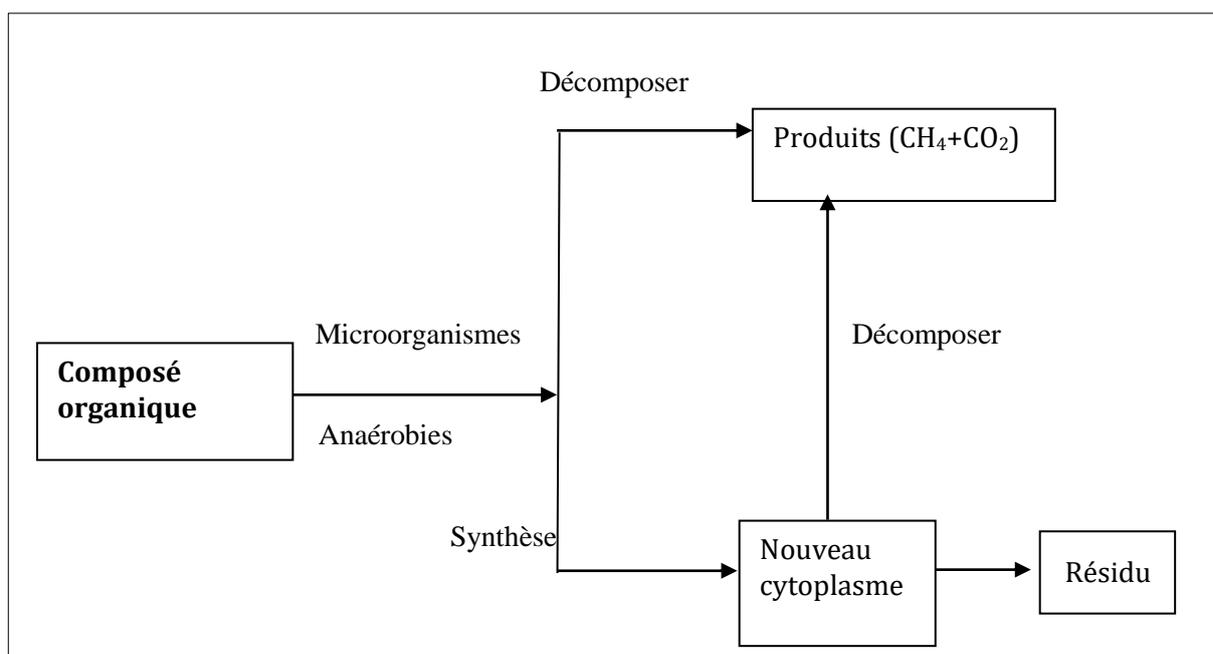


Figure 6- Dégradation anaérobie de la matière organique (Medejoub, 2012).

4. Dégradation des hydrocarbures par les hydrocarbonoclastes

Les organismes hydrocarbonoclastes sont des microorganismes, soit des bactéries ou champignons aptes à dégrader les polluants hydrocarbonés en les utilisant comme seule source de carbone pour leur croissance. D'une manière générale, cette dégradation peut être obligatoire ou facultative (Atlas, 1981 et Head et *al.*, 2006).

Depuis 1981, de nombreuses recherches ont trouvées que ces microorganismes étaient ubiquistes et présents en faible quantité même dans les différents écosystèmes dépourvus de contamination (Atlas, 1981). Les espèces hydrocarbonoclastes sont celles capables d'utiliser les hydrocarbures, grâce à l'intervention des divers enzymes spécifiques codées par des gènes dont la localisation, la régulation, et l'organisation varient.

En outre, elles peuvent produire des surfactants, ces molécules ont la capacité d'augmenter la solubilité des composés hydrocarbonés (Prince, 2005).

On peut noter quelques genres des hydrocarbonoclastes : (*Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Thalassolitus*, *Cycloclasticu ssp*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*, *Thalassolitus*).

Actuellement, une grande partie des bactéries hydrocarbonoclastes appartiennent aux gammaproteobactéries (Head et *al.*, 2006).

5. Paramètres influant la biodégradation des hydrocarbures

Le devenir des produits pétroliers ne dépend pas uniquement des activités microbiennes, mais aussi des caractéristiques du sol, des facteurs physico-chimiques comme : (température, pH, oxygène, salinité...) (tableau 4)

Tableau 4 : Principaux facteurs abiotiques influençant la biodégradation des hydrocarbures.

Facteurs	Effets sur la biodégradation des hydrocarbures
Température	Celle du sol = 20°C à 37°C, change caractéristiques physicochimiques (viscosité, solubilité). La température basse diminue la vitesse de la biodégradation et la rend plus difficile (Sandvik et <i>al.</i> , 1986. Song et <i>al.</i> , 1990)
Salinité	Les variations de la salinité déterminent le métabolisme des hydrocarbures. Dans le cas d'augmentation elle provoque la diminution des taux du métabolisme des hydrocarbures. Ainsi elle peut réduire le nombre des microorganismes dans le sol (Bouderham, 2010).
Oxygène	Les ressources en oxygène (oxygène pure, air atmosphérique ou le peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂) constituent un facteur particulièrement important dans la biodégradation des hydrocarbures (Cerniglia, 1992). sa disponibilité dans le sol dépend des taux de sa consommation microbienne et du type de sol (Medejoub, 2012). La dégradation des hydrocarbures pétroliers est meilleure en conditions oxygènes (Widdel et Rabus, 2001).
pH	Il varie de 2.5 à 11 (Leahy et <i>al.</i> , 1990), les valeurs extrêmes ont un effet négatif sur la capacité de la dégradation des hydrocarbures. Les bactéries hétérotrophes et les champignons poussent aux pH autour de la neutralité (Djerbaoui, 2011).
Nutriments	Responsables de la croissance et du métabolisme des microorganismes. Généralement le sol contient de phosphore et l'azote (Miller <i>al.</i> , 2004).
Humidité	Les faibles humidités inférieures à 2% limitent la vitesse de la biodégradation et les teneurs trop élevées agissent sur la perméabilité des sols aux gaz et génèrent des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (Medejoub, 2012).

6. Modes d'action des hydrocarbonoclastes

Depuis longtemps, les microorganismes hydrocarbonoclastes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. La plupart des hydrocarbures ont une faible solubilité ce qui rend leur catabolisme difficile et limité (Scott et Finnerty, 1976).

D'après de nombreux auteurs, le mécanisme d'accession par les microorganismes peut se faire selon quatre modes que l'on peut mentionner comme suit :

6.1. Le transfert par solubilisation dans la phase aqueuse

Généralement, ce modèle concerne la plupart des substrats, les microorganismes hydrocarbonoclastes utilisent uniquement les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse (Soltani, 2004).

6.2. Le transfert interfacial direct (TID)

Dans ce cas, les microorganismes peuvent s'associer aux gouttelettes des composés hydrocarbonés sans recours à la synthèse des biosurfactants. Ces substrats possèdent une membrane externe hydrophobe à l'interface phase hydrophobe / phase aqueuse (Miura, 1978 et Rosenberg, 1986).

6.3. Le transfert interfacial facilité ou émulsification

C'est un contact direct substrat-cellule, ce transfert facilite par l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes en augmentant l'aire interfaciale entre les deux phases (phase hydrophobe et hydrophile) (émulsification) (Balleri, 1999 et Vandecasteele, 2005).

6.4. Le transfert micellaire (pseudo solubilisation)

Plusieurs microorganismes capables de produire des biosurfactants, qui peuvent solubiliser les composés organiques en solution aqueuse liée à la formation des micelles. Par ailleurs, les micelles qui sont formées permettent le transfert à travers l'enveloppe cellulaire. Les espèces les plus importants sont celles appartenant aux genres *Pseudomonas sp.* produisant les Rhamnolipides et *Torulopsis sp.* produisant les Sopholipides (Bireche et Berreggi, 2014).

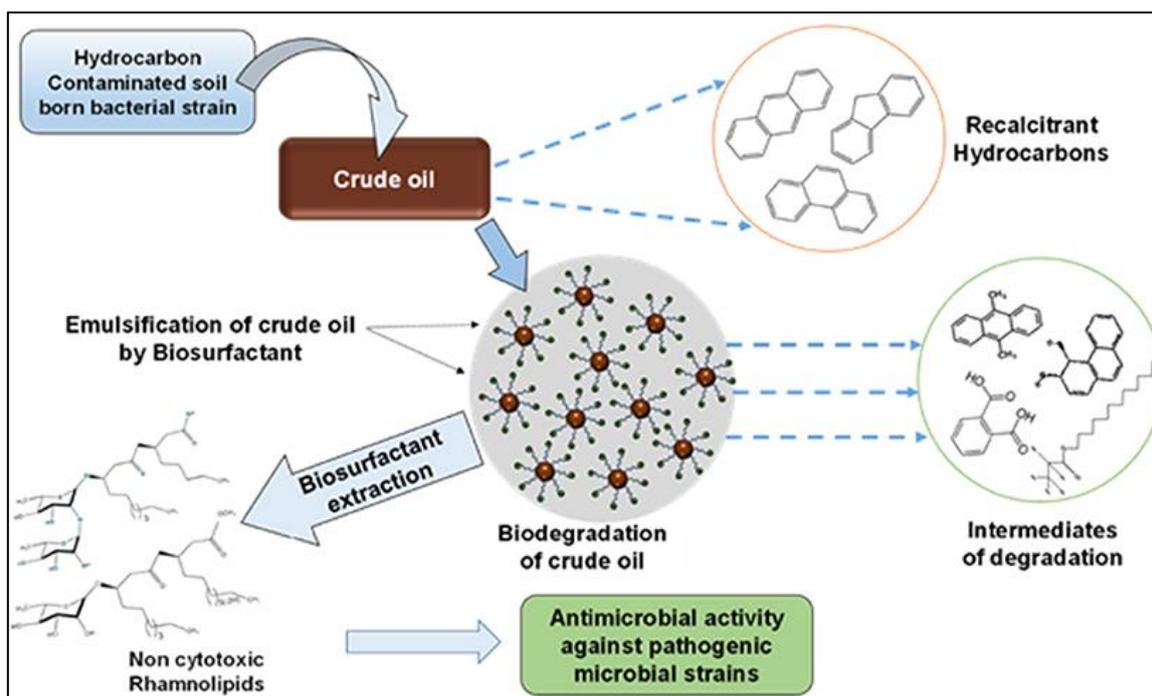


Figure7- L'activité d'une souche bactérienne dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers récalcitrants avec production simultanée de biosurfactant (Potowary et *al.*, 2017)

CHAPITRE III

Les Biosurfactants et leur Rôle dans la Biodégradation

1. Surfactants

Les surfactants peuvent se définir comme des composés amphiphiles, qui présentent une capacité à réduire la tension superficielle (liquide- air), et interfaciale (liquide- liquide). Ils se composent de deux groupes fonctionnels :

- Un groupement polaire (hydrophile ayant une grande affinité dans l'eau) comportant : des glucides, des peptides ou des polysaccharides.
- Un groupement apolaire (hydrophobe c'est-à-dire à faible affinité dans l'eau) contenant des acides gras ou des alcools gras saturés, insaturés et hydroxylés (Lang, 2002), comme il est représenté sur la figure 8.

Les surfactants ont également la capacité d'augmenter la solubilité des composés hydrophobes et ils exercent un changement aux tension des surfaces entre deux fluides non miscibles ou entre un fluide et un solide pour les rendre homogènes (Dessai et Banat, 1997). plus la présence du surfactant augmente plus la tension de la surface réduite (Santos et *al.*, 2016).

Par ailleurs il sont classifiés selon la nature de leur tête hydrophile en quatre catégories (Shekhar et *al.*, 2015) :

- ✓ Les cationiques qui possèdent une charge positive.
- ✓ Les anioniques ont une charge négative.
- ✓ Les amphotères (zwitterioniques) qui contiennent deux charges (positive et négative)
- ✓ Non ioniques, sans charge

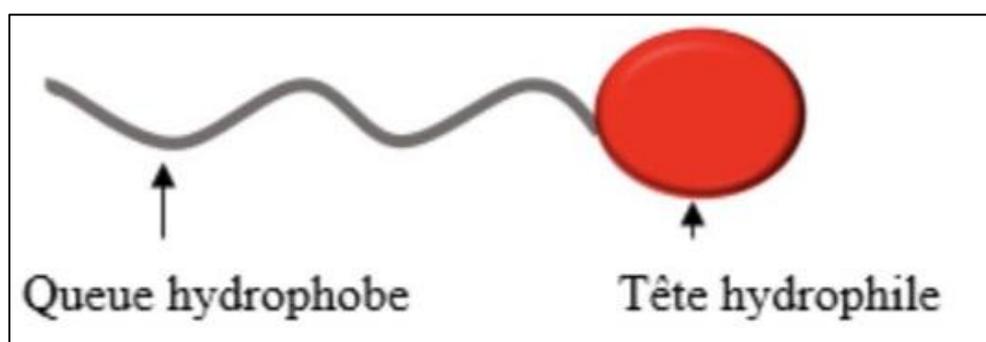


Figure 8- Schéma représentant une biomolécule amphiphile (Santos et *al.*, 2016).

La synthèse chimique des agents tensioactifs constitue un danger permanent pour l'environnement en raison de leur toxicité et leur difficulté à se décomposer sous l'action des

microorganismes. C'est pourquoi, diverses technologies sont mises en œuvre faisant appel aux organismes vivants, entre autres la synthèse microbienne de surfactants alternatifs appelés « Biosurfactants » (Vijayakumar et *al.*, 2015).

2. Les biosurfactants

Ce sont des surfactants d'origine biologique. Ce sont des composés polyvalents spécifiques qui soutiennent la biodégradation de pétrole par des processus physiques et chimiques. Ces molécules sont très peu toxiques par rapport aux surfactants artificiels (Khelil, 2014). En effet la synthèse biologique de ces molécules est considérée comme l'une des méthodes prometteuses pour l'élimination des hydrocarbures présents dans le sol les rendant disponibles pour la dégradation microbienne.

3. La production de biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par des microorganismes tels que : levures, champignons ou bactéries, qui se développent dans des conditions d'aérobiose dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone et d'énergie (Fieshter, 1992). Ces biosurfactants synthétisés par les microorganismes sont soit des molécules intercellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de cellule (Prabhu et Phale, 2003), pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne afin de les dégrader (Al-Arajil et Basri, 2007).

4. Rôle de biosurfactants

Ces dernières années, les biosurfactants jouent un rôle clé dans le rétablissement des équilibres biologiques de différents écosystèmes, qui s'effectue à l'aide d'un mécanisme précis tels que l'adhésion des cellules microbiennes à des molécules hydrophobes qui est difficile à réaliser surtout avec les composés à base de pétrole (Matvyeyeva1 et *al.*, 2014) sachant que le type de biosurfactant intracellulaire a un rôle moins efficace par rapport au deuxième type qui est une substance biologique extracellulaire. Synthétisée par une large gamme de microorganismes (*Pseudomonas*, *Bacillus*...), cette dernière modifie principalement les composés hydrophobes et les rendent en contact avec la surface cellulaire hydrophile (cellule microbienne) (Benincasa, 2004) et (Matvyeyeva1 et *al.*, 2014).

Par ailleurs, les biosurfactants aident à l'émulsification des substances non miscibles, à la formation du biofilm (Rosenberg et *al.*, 1999), ainsi qu'à la régulation du niveau énergétique cellulaire (Vandecasteele, 2008).

5. Les variétés de biosurfactants

Selon Rosenberg et ses collaborateurs (1999), les biosurfactants sont des composés structurellement divers et sont principalement classés en fonction de l'origine microbienne, la composition chimique, le poids moléculaire et le mode d'action comme suit :

5.1. Glycolipides

Les surfactants microbiens les mieux étudiés sont les glycolipides de faible masse moléculaire. Ce sont des glucides et lipides liés aux acides aliphatiques à longue chaîne ou aux acides hydroxaliphatique par un groupe ester ou éther. Les principaux types de glycolipides sont : les Rhamnolipides, les Sophorolipides, et les Tréhalolipides (Healy et *al.*, 1996) Beaucoup de bactéries telles que *Pseudomonas*, *Streptococcus* produisent des Glycolipides.

5.2. Lipopeptides ou lipoprotéines

Ce sont des biosurfactants à faible masse moléculaire, qui consistent en un lipide associé à une chaîne polypeptidique. Surfactine et Viscosine sont les types les plus étudiés (Healy et *al.*, 1996).

5.3. Phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique, ce sont les constituants essentiels des membranes microbiennes (Healy et *al.*, 1996).

5.4. Polymérique

Désignent les biosurfactants à masse moléculaire élevée. Qui sont les nouveaux produits formés entre les unités des saccharides et les acides gras. Les plus étudiés sont: émulsane, liposane, alasane, lipomanane (Santos et *al.*, 2016).

Le tableau 5 : Les principales classes de surfactants biologiques (Banat et *al.*, 2000).

Classes de biosurfactants	Les types	Microorganismes
Glycolipides	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rhamnolipides ➤ Sophorolipides ➤ Trehalolipides 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Pseudomonas aeruginos</i> -<i>Candida bombicola</i> -<i>Candida antarctica</i> -<i>Rhodococcus sp, Nocardia</i> -<i>Mycobacterium</i>
Lipoprotéine et lipolipide	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Surfactine ➤ Viscosine 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Bacillus subtilis</i> -<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Phospholipides 	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Corynebacter iuminsidiosum</i> -<i>Acinetobacter sp</i>
Polymyérique	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Emulsane 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

6. L'intérêt et la valeur industrielle de biosurfactants

les biosurfactants sont exploités dans de nombreux domaines tels que : la production des produits pharmaceutiques, thérapeutiques, les détergents, la peinture (Rodrigues et *al.*, 2006), le traitement des eaux usées (Das et *al.*, 2008), l'alimentation (la conservation des produits et la préparation en boulangerie (figure 9) (Van Haesendonck et Vanzeveren, 2004), ainsi que la bioremediation des sols contaminés à l'aide d'un effet synergique des agents tensioactifs.

Actuellement, l'industrie pétrolière occupe une place principale dans le marché mondiale. Les surfactants biologiques peuvent être utilisés pour la récupération du pétrole par l'injection directe des produits microbiens purifiés (biosurfactants) ou par d'autres opérations. Cette récupération rencontre des obstacles comme l'incertitude des résultats et le coût des biosurfactants élevé par rapport à leurs équivalents chimiques. En effet, ces molécules sont biologiquement synthétisées par des microorganismes qui se nourrissent généralement sur des hydrocarbures coûteux, ce qui augmente le coût de leur production (Reis et *al.*, 2013).

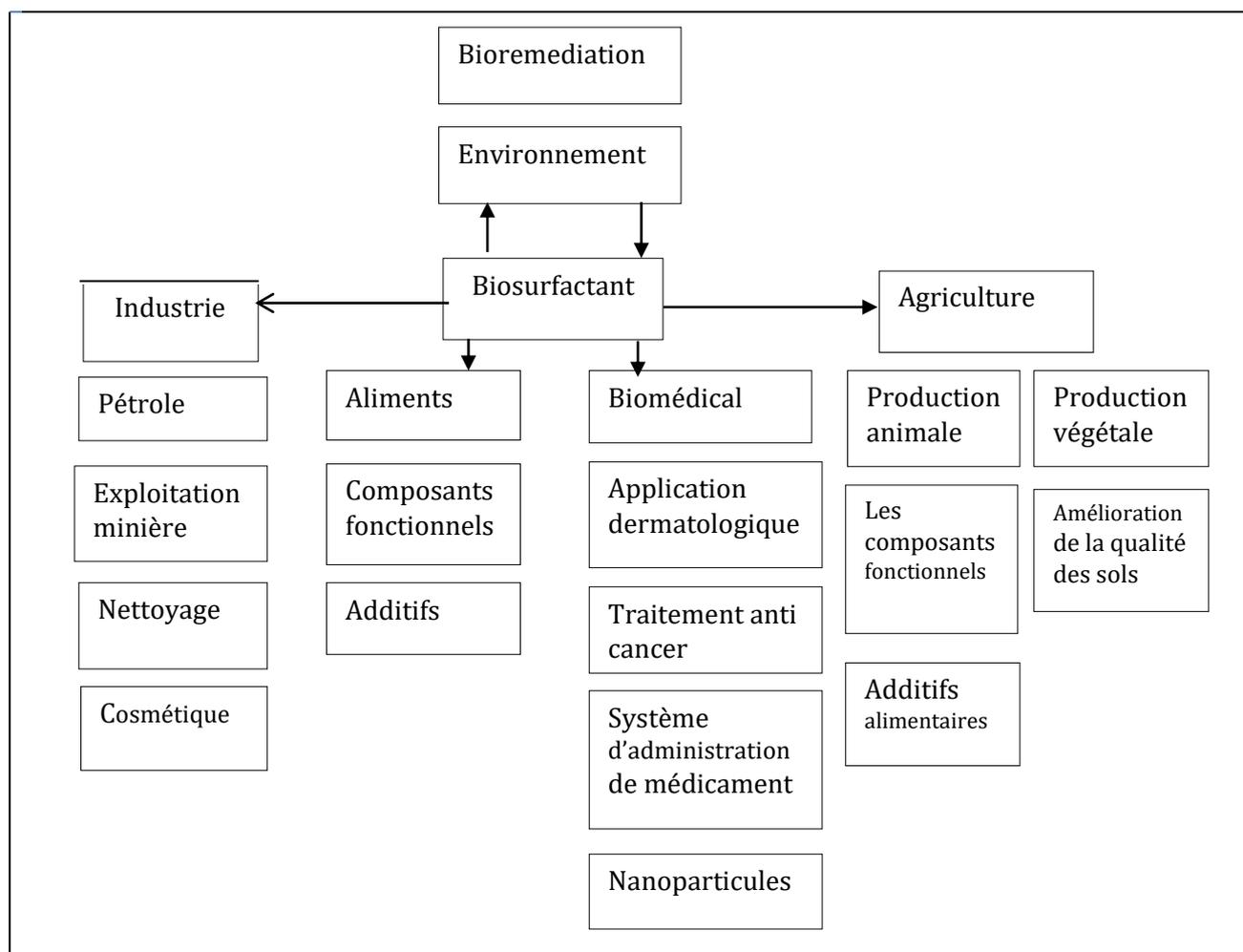


Figure 9- Schéma regroupant les applications de biosurfactants (Naughton et al.,2019)

CHAPITRE IV

La Synthèse de Biosurfactants par des Espèces Bactériennes à partir de Déchets de l'Industrie Alimentaire

1. Recyclage de déchets pour la synthèse de produits d'intérêt... les biosurfactants

Les biosurfactants bactériens jouent un rôle très important dans de multiples domaines d'application. Ces molécules peu toxiques et facilement biodégradables sont un outil puissant dans les opérations de bioremediation de sites pollués ainsi que dans la récupération assistée de pétrole brut. Ils ont également des applications potentielles en agriculture, en industrie chimique, cosmétique, pharmaceutique, alimentaire et textiles. Cependant, le coût de leur préparation reste un facteur limitant dans leur synthèse à grande échelle industrielle.

L'utilisation et le recyclage de sous-produits ou de déchets dits « bon marché » est une stratégie qui permet la réduction des coûts de production élevés. En effet, plusieurs travaux de recherche étaient menés dans ce sens et les résultats obtenus étaient satisfaisants.

Par ailleurs, les sous-produits qui ont été utilisés par les microorganismes consiste à des glucides, des huiles végétaux et des déchets organiques tels que les hydrocarbures (le pétrole brut, le condensat, le gasoil...etc). Néanmoins, les bactéries qui se nourrissent par les hydrocarbures ou des lipides produisent efficacement un bon rendement de biosurfactant (Cooper et Paddock, 1984, Mercade et Manresa, 1994). En outre la production de ces métabolites est augmenté par la participation de différentes méthodes qui comprennent la sélection des souches, la mutagenèse, la manipulation de facteurs environnementaux et nutritionnels et des manipulations génétiques (Ferraz et *al.*, 2002).

Les tensioactifs à faible poids moléculaire sont caractérisés par leur capacité à réduire les tensions superficielles et interfaciales (Javaheri et *al.*, 1985) comme les rhamnolipides produits par le genre *Pseudomonas* qui peuvent utiliser les différents déchets comme une matière première (Calvo et *al.*, 2004). D'autre part, le potentiel d'application des biosurfactants est déterminé par leur coût et leurs propriétés par rapport aux composés synthétiques (Ferraz et *al.*, 2002). Quelques exemples de biosurfactants synthétisés à partir des déchets sont cités dans le tableau ci-dessous (tableau 6).

Tableau 6 : La production des types de biosurfactants à partir de différentes souches.

Bactéries	Déchets alimentaire	Biosurfactants	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	La pâte de neutralisation (raffinage d'huile de soja)	Rhamnolipides	(Marcia et al., 2005)
	Graisse de poulet		
	Huile de soja usée		
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 16 LM USTHB	Huile de friture résiduelle de tournesol (RSFO)	Glycolipides	(Sadouk et al., 2008)
	Gasoil		
<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Mélasses	Rhamnolipides	(Rodrigues et al., 2006)
<i>Bacillus sp.</i> HIP3	L'huile de cuisson utilisée	Surfactine	(Badrul et al., 2019)
<i>Staphylococcus sp.</i>	Pétrole brut	Lipoprotéine	(Eddouaouda et al., 2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Huile de friture	Viscosine	(Zenati, 2018)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BU03	Pétrole	Emulsan	(Zhenyong et jonathan, 2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	Huile d'olive	Rhamnolipides	(Robert et al., 1989)

2. Présentation d'un article scientifique portant sur la synthèse de rhamnolipides par la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI à partir de différentes sources de carbone

L'intérêt des biosurfactants et notamment celui des rhamnolipides ne cesse d'augmenter ces dernières années, en raison de leur large potentiel d'applications dans divers domaines ainsi que leurs caractères plus avantageux par rapport aux surfactants de nature chimique. Le seul inconvénient quant à leur usage reste le coût élevé de leur production.

Une stratégie possible pour réduire les factures de leur production est l'utilisation de substrats peu coûteux comme matières premières. En effet, des déchets agro-industriels tels que les effluents d'huile d'olive, les déchets de raffinerie de pétrole, le lactosérum, les effluents de transformation de la pomme de terre sont quelques exemples de matières riches en glucides et lipides chose qui favorise la croissance et biosynthèse bactérienne.

Les rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, sont un bon exemple de biosurfactants efficaces, qui peuvent être obtenus à partir de substrats hydrophobes bon marché, tels que les huiles végétales et déchets de l'industrie alimentaire. Les rhamnolipides comprennent un mélange d'espèces homologues RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) et RL4 (RhaC10). Selon la souche bactérienne, les conditions de culture et la composition du milieu, la composition et la distribution des homologues varient.

Le travail de Marcia et ses collaborateurs (2005) étudie la production de tensioactifs rhamnolipidiques par la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI (isolée à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures) en utilisant comme substrats des déchets d'huile non conventionnels en comparaison avec des substrats plutôt conventionnels.

Les propriétés tensioactives ainsi que la structure préliminaire des rhamnolipides obtenus sont également caractérisés.

2.1. Protocole expérimental

La démarche suivie dans cette investigation est illustrée dans le schéma ci-dessous

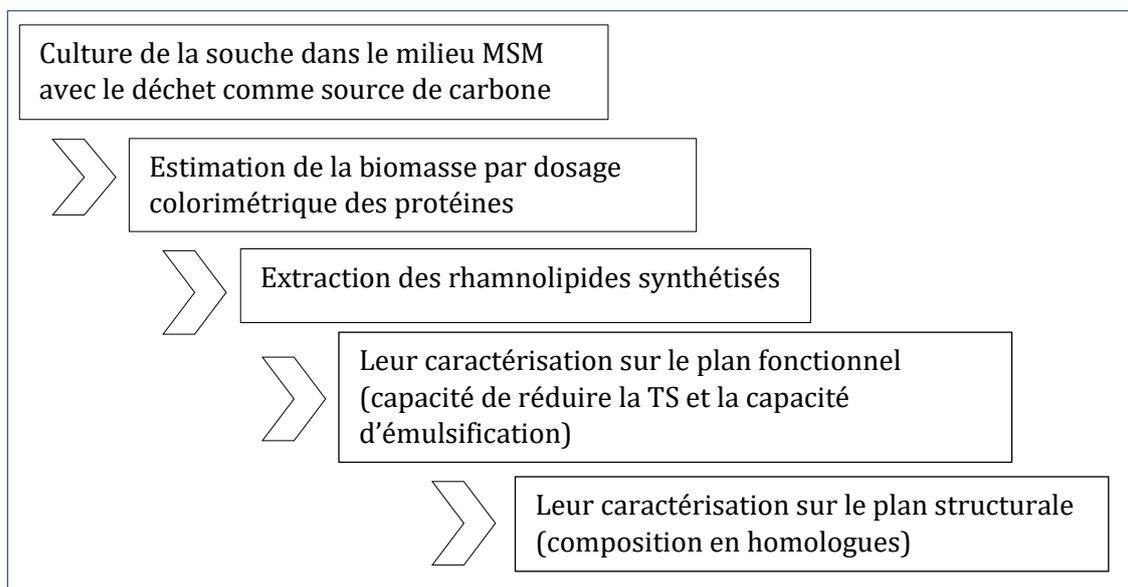


Figure10 - Les différentes méthodes analytiques appliquées pour la synthèse de biosurfactants rhamnolipides

2.1.1. Ensemencement et incubation

2.1.1.1. Milieu de culture (MSM)

Ce milieu additionné de différents déchets comme sources de carbone, sert à la synthèse de biosurfactants. Sa composition en (g / l) est : NaNO_3 : 4.0; KCl : 0.1; KH_2PO_4 : 0.5; K_2HPO_4 : 1; CaCl_2 : 0.01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.01; extrait de levure: 0.1 et 0,55 ml/l des solutions d'éléments traces suivantes: B (0.026%), Cu (0.05%), Mn (0.05%), Mo (0.006%) et Zn (0.07%) (Robert et *al.*, 1989).

2.1.1.2. Substrats testés

Deux substrats conventionnels sont utilisés : le glucose et le glycérol et trois sont non conventionnels : l'huile de soja usée, la graisse de poulet et la pâte de neutralisation.

2.1.1.3. Souche bactérienne :

Pseudomonas aeruginosa LBI, est une souche isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures. Une suspension est préparée sur un bouillon nutritif et sa densité optique est ajustée pour une longueur d'onde de 610 nm à 0,65 (correspondant à 10^8 UFC /mL).

2.1.1.4. Préculture :

Un millilitre de la suspension bactérienne est transféré dans 50 mL (MSM), additionné de 2% huile de soja. L'incubation est faite sous agitation à 200 rpm durant 24h à 30°C.

2.1.1.5. Culture :

Un millilitre de la préculture est transféré dans 50 mL (MSM) dans des flacons de 125 ml, contenant 2% de chacun des substrats à tester, incubés pendant 144 h, Le pH de culture ajusté à 6.8 – 6.9.

2.1.2. Estimation de la biomasse

La croissance bactérienne est estimée en réalisant un dosage colorimétrique du contenu protéique de la culture en utilisant la méthode de Lowry qui a été créé en 1951.

Les protéines réagissent avec un réactif cuivrique alcalin (solution de carbonate de sodium alcalin à 20g/L dans 0.1M de soude ou réactif de Gornall). Après cela le second réactif phosphotungstomolybdique est ajouté pour effectuer la réduction de la tyrosine et tryptophane qui permet la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont la densité optique est mesurée à 750 nm.

2.1.3. Extraction des rhamnolipides

Afin d'éliminer les cellules bactériennes, une centrifugation est réalisée (10000 rpm pendant 20 min), le pH du surnageant est acidifié par l'ajout de $6\text{NH}_2\text{SO}_4$ jusqu'à 2. Ensuite, la suspension est gardée dans le réfrigérateur à 4°C pendant la nuit (Marcia et *al.*, 2005). Après décantation, une centrifugation à 8000 rpm pendant 20 min est réalisée et le culot obtenu au fond de tube est récupéré et resuspendu dans l'eau distillée, son pH est ajusté à 6.1. Le culot est appliqué sur une colonne de chromatographie d'adsorption couplée à une spectroscopie de masse dans le but de séparer les petites quantités puis les détecter.

2.1.4. Activité d'émulsification

Six millilitres de kérosène sont additionnés à 4mL de solution tensioactif (0.1% p/v). Le mélange est agité au vortex pendant 2 min et laissé au repos 24h (Cooper et Goldenberg, 1987).

L'indice d'émulsion est calculé selon la formule :

$$E24 = (H_e / H_t) .100$$

H_e : hauteur d'émulsion

H_t : hauteur totale du mélange

2.1.5. Composition en acides gras des déchets

La composition en acides gras des déchets huileux est déterminée par chromatographie en phase gazeuse en utilisant le chromatographe capillaire Agilent 6850 (Agilent, USA) selon les conditions de la GC décrites par Benincasa et *al.*, 2004.

2.2. Résultats et discussion

L'objectif de cette expérience est de comparer le type de biosurfactants et le rendement de production de ceux-ci par la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI en présence de différentes sources de carbone.

2.2.1. Rendement en rhamnolipides selon le substrat

Premièrement différents substrats ont été testés pour la production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* LBI, deux sont conventionnels (glucose/ glycérol) et trois sont non conventionnels (l'huile de soja usée, la pâte de neutralisation issue du raffinage d'huile de soja et la graisse de poulet) comme le montre le tableau 7.

Tableau 7 : Production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* LBI croissant sur différentes sources de carbone (Marcia et al., 2005).

Source de carbone	ST (mN/m)	Biomasse (mg/mL)	Rhamnolipides	Homologue prédominant
Glucose	35.76	1.48	4.20	Rha2C10C10
Glycérol	34.80	1.73	8.05	Rha2C10C10
Huile de soja utilisé	30.80	1.75	7.63	RhaC10C10
Graisse de poulet	32.76	1.39	6.80	RhaC10C10
La pâte de neutralisation (raffinage d'huile de soja)	32.36	1.48	11.72	RhaC10C10

D'après les résultats obtenus, la concentration finale de rhamnolipides varie en fonction de la source de carbone utilisée, par ailleurs les déchets de la pâte de neutralisation « raffinerie de soja » sont le meilleur substrat pour la synthèse des rhamnolipides même si la quantité de biomasse finale était similaire pour les cinq substrats testés.

Des travaux similaires de Mata-Sandoval et al, utilisant la souche *Pseudomonas aeruginosa* UG2, ont montré que les substrats hydrophobes génèrent de plus grandes quantités de rhamnolipides que les substrats hydrophiles. Cependant, les résultats de Marcia et ses collaborateurs ont montré que le glycérol donne de meilleures concentrations que la graisse de poulet et l'huile de soja usée et vu sa solubilité dans l'eau, les problèmes analytiques liées à la présence d'huile dans le bouillon de culture sont éliminés.

2.2.2. Propriétés structurales des rhamnolipides selon le substrat (hydrophobe ou hydrophile)

La caractérisation des rhamnolipides et la distribution de leur homologues a été effectuée par spectrométrie de masse en mode ion négatif (ESI-MS) (Deziel et al., 1999) et (Haba et al., 2003) (figure 11). Le rhamnolipide prédominant présent dans le mélange de biosurfactant varie en fonction de la source de carbone utilisée. Les monorhamnolipides RhaC10C10 (RL2, m / z 503) prédominent lorsque le substrat utilisé est hydrophobe et les

dirhamnolipides Rha2C10C10 (RL1, m / z 649) prédominent lorsque le substrat est hydrophile tels que le glycérol et le glucose.

- Ces résultats diffèrent de ceux de Mata-Sandoval qui ont démontré que pour la souche *P. aeruginosa* UG2 la composition en rhamnolipides des mélanges de surfactants synthétisés reste similaire quel que soit le substrat utilisé.
- Cependant, Deziel et *al.*, 1999 ont constaté que les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* 57RP diffèrent à la fois qualitativement et quantitativement en fonction du substrat. Pour le mannitol, ils ont constaté que la plupart des rhamnolipides contiennent deux groupements d'acide gras, tandis que pour le naphthalène environ 80% des rhamnolipides ne contenaient qu'un seul acide gras.
- Syldatk et *al.*, 1985 trouvé non seulement la source de carbone mais aussi la température et la stratégie de fermentation ont affecté la distribution des homologues de rhamnolipides produit par *Pseudomonas sp.* DSM2874.
- Rahman et *al.*, 2002 ont rapporté la production de tensioactifs rhamnolipidiques par deux *P. aeruginosa* dégradant le pétrole. Les souches DS10-129 et GS9-119 utilisant l'huile de soja, l'huile de carthame et le glycérol comme substrats. L'huile de soja a favorisé la production de biomasse et de rhamnolipides par comparaison à l'huile de carthame et du glycérol.

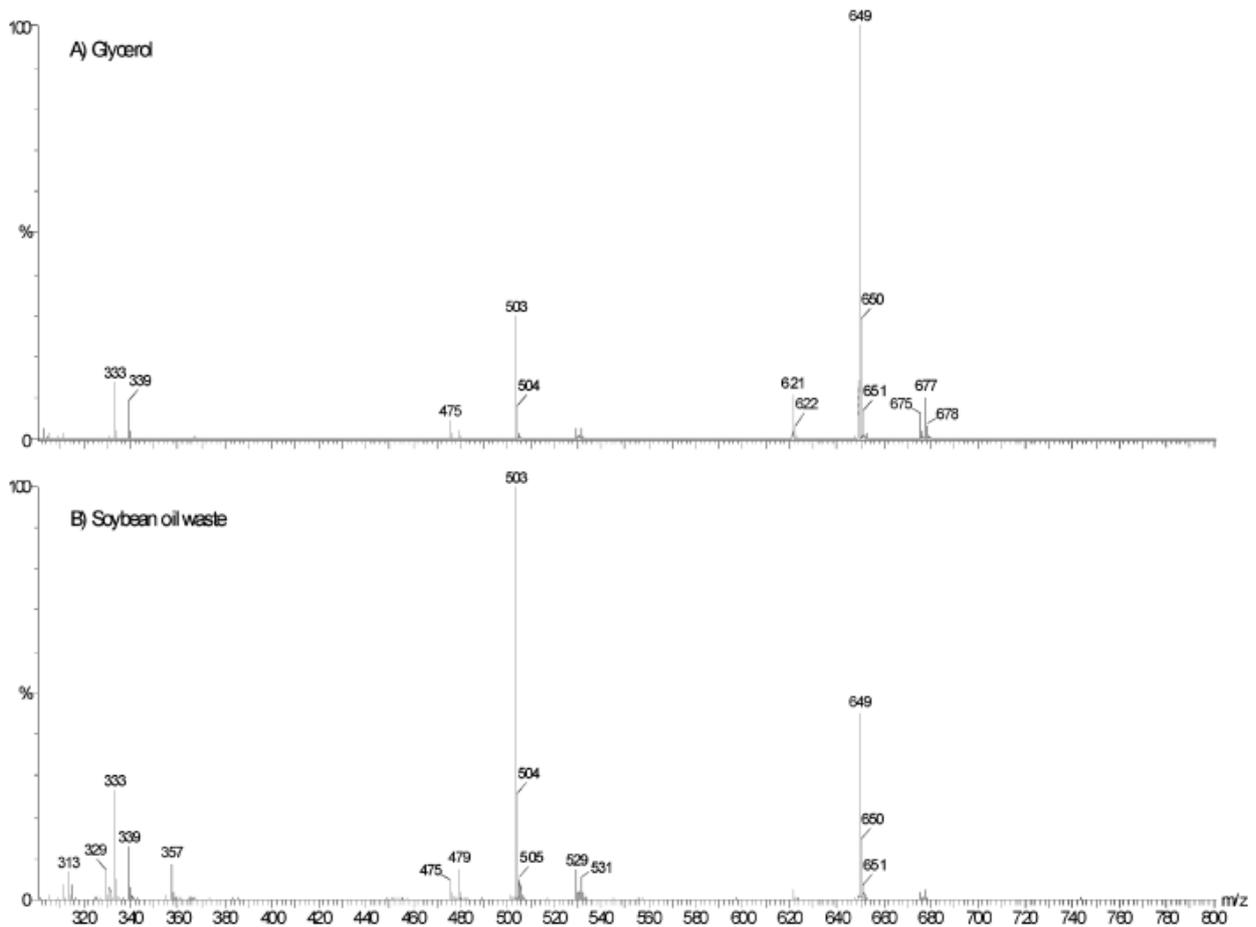


Figure 11- La spectrométrie de masse ESI en mode ion négatif pour les mélanges de biosurfactants produits à partir de (A) glycérol et (B) d'huile de soja (Marcia et *al.*, 2005).

Les auteurs ont également observé que le dirhamnolipide Rha2C10C10 (m/z 649) était l'homologue prédominant synthétisé, le contraire de ce qu'a été observé par Marcia et ses collaborateurs.

2.2.3. Comparaison de plusieurs substrats hydrophobes (déchets d'industrie de raffinage de différentes huiles)

Les substrats de raffinage d'huile évalués ici sont des résidus (pâte de neutralisation de savon et acides gras post-raffinage) produits en grande quantité par l'industrie de traitement des huiles végétales. Ces déchets représentent 2-3% d'huile total transformé et contiennent une quantité considérable d'huile qui peut être utilisée comme source économique de carbone pour la production de biosurfactant.

Les résultats présentés dans le tableau 8, indiquent que la pâte de neutralisation de savon à partir d'huile de soja est le substrat le plus attractif pour la production de biosurfactants. À titre de comparaison, d'autres déchets d'industrie de différentes huiles ont été testés.

P. aeruginosa LBI est capable de croître et de produire des surfactants en utilisant les substrats de déchets huileux, avec des différences dans les taux de consommation d'acides gras sont consommés à des taux différents (tableau 8). Ces variations observées pourraient être liées à des différences de composition des triglycérides et spécificité de la lipase bactérienne.

Tableau 8 : Utilisation des acides gras provenant des déchets de raffinage de différentes huiles par *P. aeruginosa* LBI après 144 h d'incubation (Marcia et al., 2005).

Consommation %					
Acides gras	Cotton	Babassu	Blé	Soja	Palme
Acide laurique C12	/	43.0	/	/	57.40
Acide myristique C14	47.22	57.66	/	/	70.0
Acide palmitique C16	10.64	57.44	68.44	75.97	66.47
Acide stéarique C18	9.26	27.36	52.59	42.87	42.93
Acide oléique C18 :1	7.71	46.09	47.98	67.25	60.23
Acide linoléique C18 :2	15.55	36.20	42.34	82.20	52.47
Acide linoléique C18 :3	19.15	/	55.22	100	74.20

Les résultats obtenus dans cette présente étude montrent, que les déchets d'huile de soja sont considérés comme les meilleurs substrats pour la production de surfactants par *Pseudomonas aeruginosa* LBI avec un rendement 75% (Marcia et al., 2005).

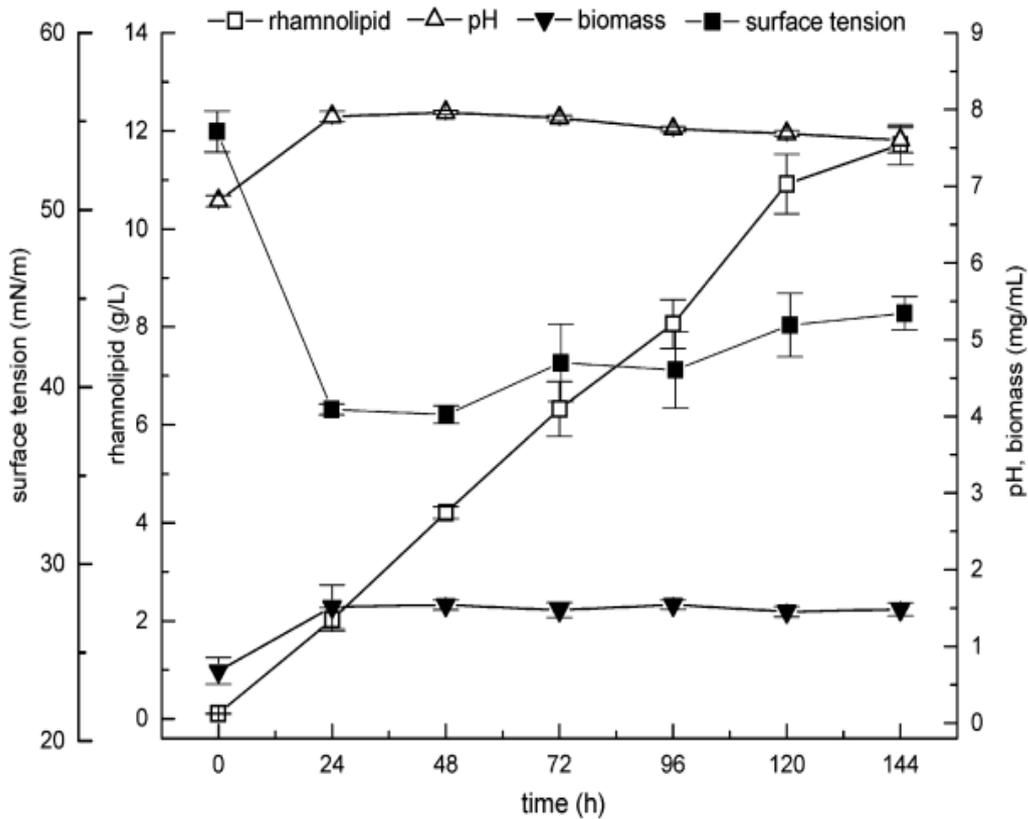


Figure 12- l'évolution de la production de rhamnolipides par *P. aeruginosa* LBI à partir de déchets d'huile de soja (Marcia et al., 2005).

La figure 12 montre que la biomasse de *Pseudomonas aeruginosa* LBI augmente pendant les premières 24 heures, ensuite elle devient constante jusqu'à la fin de la culture.

L'accumulation de surfactants de type rhamnolipide se produit en grande quantité pendant la phase stationnaire.

2.2.4. Propriétés fonctionnelles des rhamnolipides selon le substrat

Les surfactants issus de la matière première de soja montre les tensions superficielles et interfaciales les plus faibles (tableau 9), alors que le produit de la graine de coton et du babassu démontrent de mauvaises propriétés tensioactives. Le biosurfactant produit à partir de déchets d'huile de palme présente un bon indice d'émulsification.

Les variations observées dans propriétés tensioactives des biosurfactants obtenus à partir des déchets d'huile sont probablement dus à des différences de concentrations d'homologues individuels. Une autre possibilité pour expliquer les différences observées est la

présence d'impuretés du bouillon de culture qui pourraient influencer les propriétés de surface.

Tableau 9 : Les propriétés tensioactives des rhamnolipides obtenus à partir des déchets de raffinage de différentes huiles (Marcia et *al.*, 2005).

Paramètres	Déchets d'huile				
	Coton	Babassu	Blé	Soja	Palme
ST (mN/m)	33.86	30.08	30.96	26.92	31.76
CMC (mg/L)	86.79	210.77	43.21	51.56	40.19
IT(mN/m)	13.35	16.15	2.40	1.25	4.20
E 24 (%)	10.1	20.0	20.0	55.7	71.4
RL (g/l)	10.55	8.65	13.46	11.72	8.62

3. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la dégradation biologique des différents types de déchets industriels tels que : (l'huile de soja usée, graisse de poulet, la pâte de neutralisation), à l'aide des bactéries dites hydrocarbonoclastes.

Dans un premier temps, la souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI a été isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures, pour effectuer une culture bactérienne dans un milieu MSM additionné de 2% de chacun des substrats à tester et incubés pendant 144 h.

La spectrométrie de masse permet la caractérisation des rhamnolipides et la distribution de leurs homologues. Par ailleurs, le rhamnolipide prédominant présent dans le mélange de biosurfactants varie en fonction de la source de carbone utilisée.

Le test de l'extraction des rhamnolipides a permis d'avoir des quantités de rhamnolipides, qui sont varié selon les déchets utilisés. Ces derniers, ont également la capacité d'émulsifié les composés hydrophobes.

Les résultats globaux montrent que la souche *P. aeruginosa* LBI a pu croître et produire des tensioactifs rhamnolipides à partir des déchets du raffinage de différentes huiles comme sources de carbone. La pâte de neutralisation de soja génère le produit avec les meilleures propriétés tensioactives par rapport aux déchets des autres huiles. La nature de la source de carbone influence la distribution des homologues de rhamnolipides synthétisés par les bactéries.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La pollution des sols due aux déchets industriels et aux activités humaines provoquent un problème récent et préoccupant, en effet, cela se traduit par des conséquences sanitaires, environnementales et socioéconomique.

Dans ce manuscrit on a effectué des études bibliographiques qui nous permis de connaitre des techniques efficaces pour épurer l'environnement tels que la dégradation biologique (la biodégradation).

La biodégradation est un phénomène qui permet la transformation d'un composé organique en molécule plus simple et moins efficace que le composé d'origine (biotransformation), pour obtenir à la fin un produit qui est le dioxyde de carbone (minéralisation).

La biodégradation se réalise soit en conditions aérobies ou anaérobies, par ailleurs l'existence de ce phénomène dans environnement se base majoritairement sur des bactéries dite hydrocarbonoclaste.

Les bactéries hydrocarbonoclastes ont un pouvoir de développer dans un milieu pollué par des différents types de déchets, et de synthétiser des substances appelées biosurfactants.

Les biosurfactants ce sont des molécules amphiphiles moins toxique et non dangereuse, ils ont la capacité de modifier les composés hydrophobes et les rendent en contact avec la surface cellulaire hydrophile (cellule microbienne).

Ces substances possèdent différentes structures chimique, en particulier dans ce cadre d'étude les rhamnolipides qui sont synthétisé dans des milieux contient des déchets du raffinage de différents huiles, et cela effectué à l'aide d'une souche dite *P.aeruginosa* LBI.

REFERENECS
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

A

- Abbia, S., Guitoun, L. (2013)**. Les méthodes de traitement des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers. Mémoire de fin d'étude: Microbiologie fondamentale et appliquée .Ouargla: Université kasdimerbah, 30p.
- Abedelly, C. (2007)**. Bioremédiation /Phytoremédiation. Thèse: Sciences naturelles. Institute supérieur de l'éducation et de la formation continue: Université de Tunis, 32 P.
- Abhijit, M. (2018)**. Environmental science for the beginners: Environmental pollution and its control. India. 59 p.
- Aid ,K., Zafrane, H. (2018)**. Etude de potentiel de dégradation des hydrocarbures par le genre *PSEUDOMONAS* isolé de sites pollués. Mémoire de master : Génétique fondamentale et appliquée .Mostaganem: Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, 58 p.
- Al-Arajil, A.R., Basri, S. (2007)**. Microbial surfactant. *Molecular Biology and Biotechnology*, 15(3), 99-105.
- Albert, E. (1995)**. Directives OMI/PNUE sur l'application de dispersant contre les déversements d'hydrocarbures y compris les considérations liées à l'environnement: Cheminement des hydrocarbures. Northampton: Imopublishing. 45 P.
- Atlas, R.M. (1981)**. Microbial dégradation of petroleumhydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45 (1), 180–209.

B

- Badrul, H., Mohamed faizol, I., Norhayati, R et al, (2019)**. Production of Biosurfactant Produced from Used Cooking Oil by *Bacillus* sp. HIP3 for Heavy Metals Removal. *Journal listmolecules*, 24(14), 2617.
- Ballerini, A. (1999)**. Traitements biologiques des sols. *Technique de l'ingénieur, traité Environnement*, G2 620 : 1 – 6.
- Banat, M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000)**. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53 (495-508), 816 p.
- Benchouk, A. (2017)**. Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les microorganisme indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. Thèse de doctorat: Microbiologie appliquée. Mostaganem: Université ben badis, 726 P.
- Benincasa, M., Abalos, A., Olivera, I et al, (2004)**.Chemical structure, surface

properties and biological activities of the biosurfactant produced by *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85 (1), 1-8.

-Beyrouk, L. (2007). Extraction des aromatiques: Calcul de vérification de la colonne de Benzène de l'unité 200/RA1/K. Mémoire d'ingénieur d'état université. Boumerdes : M'hamed Bogara de Boumerdes.

-Bireche, Y., Berregui, F. (2014). Effets de la salinité sur l'activité des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire de master académique: Microbiologie appliquée. Ouargla: Université Kasdimerbah Ouargla, 33 p.

-Bocard, C. (2006). Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures: caractérisation, détection et analyse des hydrocarbures. Paris: Technip. 14 p.

-Bouchez–Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R et al, (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal applied microbiology*, 86 (3), 421-428.

-Bouderhem, A. (2010). Utilisation des souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Mémoire de master: Biologie. Ouargla: Université Kasdimerbah-Ouargla, 64 p.

C

-Callier, L., Clozel B., Nowak., C. (2002). Méthodes de recherches de l'origine de pollution(s) dans les sols ou dans les eaux souterraines- BRGM RP-51260-FR, 133p.

-Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodégradation*, 4(3), 331-338.

-Chamkha, M., Sayad, S. (2011). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 51, 1–11.

-Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* Species, *Appl. Environ. Microb.*, 53(2), 224-229.

D

-Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of Petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011 ,1-13.

-Desai, J.D., Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61 (1), 47-64.

-Deziel, E. F., Lepine, F., Dennie, D et al. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biophys. Acta*, 1440, 244-252. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61 (1), 47-64.

-Djerbaoui, A.N. (2011). Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminés par les hydrocarbures. Diplôme de Magister: Microbiologie appliquée. Ouargla: Université Kasdimerbah-ouargla, 133 p.

E

-Eddouaouda, k., Mnif, S., Badis, A et al. (2008). Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Marine Pollution Bulletin*, 56 (10), 1746-1754.

F

-Faksness, L. G., Brandvikret, P. J., Sydnes, L. k. (2008). Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. *Marine Pollution Bulletin*, 56 (10), 1746-1754.

-Fiechter, A. (1992). biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in food science et technology*, 3 (10), 3-12.

-Fingas, M. (2013). Oil spill science and technology: Troisième édition, Boca Raton. États-Unis CRC Press, 266 p.

-Franennec, J.P., Leprince, P., Trembouze, P et al. (1998). Le raffinage du pétrole: Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication. *Applied and environmental microbiology*, 66 (10), 420 – 421.

G

-Gabet, S. (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat: Chimie et Microbiologie de l'eau. Limoges: Université de Limoges, 177 p.

-Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M et al. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo(a) pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 189 (4199), 295-297.

-Ghazali, M. (2016). Etude de vérification des performances de l'unité du dessalage de

RA1K. Projet professionnel de fin de formation Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur: spécialisé en Raffinage et Pétrochimie. Boumerdes: IAP Ecole de Boumerdès.

-Guermouche m'rassi, A. (2013). Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures. Mémoire master de recherche: Microbiologie. Oran: Université d'oran, 153 p.

H

-Haba, E., Abalos, A., Jauregui, O et al. (2003). Use of liquid chromatography- mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Surfactants Deterg*, 6, 155-161.

-Hamelin, R., Laprte, J., Ptc, A. (2000). Environnement et nuisances. Edition clartés. 157 p.

-Head, I.M., Jones, D.M. Roling, W.F.M. (2006). Marine micro-organisms make a meal of oil. *Nature reviews Microbiology*, 4, 173–182.

-Healy, M. G., Devine, C.M., Murphy, R. (1996). Microbial production of biosurfactants. *Resources, conservation and recycling*, 18 (1-4) ,17.

-Henati, D. (2018). Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax Tunisie. Thèse de doctorat: Biotechnologie et Microbiologie. Tunisie: Université de Montpellier, 322 p.

-Holliger, C., Gaspard, S., Glod , G et al, (1997). Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS microbiology reviews*, 20 (3-4), 517–523.

J

-James, G.S. (2005). Pollution prevention: Environmental Analysis and Technology for the Refining Industry. John Wiley & Sons. 416p.

-Javaheri, M., Gary, J., Michael J, M et al. (1985). Anaerobic production biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and environmental microbiology*, 50(3), 698-700.

-Jose, f. (1999). Essai de biodégradabilité sur les sols contaminés par les hydrocarbures, 3^e édition. Dunad. paris .p102-116.

-Juhasz, A.L., Naidu, K. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial of benzo. *International biodeterioration and biodégradation*, 45 (1-2), 57-88.

K

- Khelilradji, F.Z.A . (2014).** Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactéries marines isolées de la cote oronaise. Thèse de doctorat: Science de l'environnement. Oran: U niversité' d'oranahmed ben bella, 207 p.
- Kumar, B.L., GopalSai, D.V.R. (2015).** Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environnement. 3 Biotech, 5 (6), 867-876.
- Kvenvolden, K.A., Cooper, C.K. (2003).** Natural seepage of crude oil into the marine environment. Geo-Marine Letters, 23 (3-4), 140–146.

L

- Leahy, J.G., Colwell, R.R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbialreviews, 54 (3), 305-315.
- Lang, S. (2002).** Biological amphiphiles (microbialbiosurfactants). Current opinion in colloid et interface science, 7 (1-2), 12–20.
- Lecomte, P. (1995).** les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. France : Edition Lavoisier TEC et DOC.198 p.
- Lefebvre, G. (1978).** Chimie des hydrocarbures: Structure des molécules d'hydrocarbures. Paris: Edition technip. 39-63 P.
- Lahmaza, I. (2017).** Etude vérificative des performances de catalyseurs Atis-2L de l'unité d'isomérisation (RA1 K de skikda). Mémoire master: Génie des procédés. Annaba: Universitébadjimoukhtar, 74 p.
- Lowry, O. H, Rosebrought, N. J. Farr, A et al, (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 66, 265-274.

M

- Mahjoub, F. (2012).** Les instruments financiers de protection de l'environnement contre les pollutions en algérie: cas de la pollution marine par les hydrocarbure. Mémoire en magister :finances. Oran: Université d'oran, 184 p.
- Madsen, S.D., Forbes, T.L., Forbes, V.E. (1997).** Particle mixing by the polychaete *Capitella* species 1: Coupling fate and effect of a particle-bound organic contaminant (fluoranthene) in a marine sediment. Marine ecology progress series, 147 (1-3), 129- 142.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., Torrents, A. (2001).** Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2.,Microbiol. Res,155, 249-256.

- Matvyeyeval , O. L., Vasylchenko ,O. A., Aliieva1, O. R. (2014).** Microbial biosurfactants role in oil Products biodegradation. International journal of environmental bioremediation, 2 (2), 69-74.
- MATE. (1997).** Ministère de l'Aménagement du territoire et de l'Environnement. Inventaire national des sites et sols pollués, Paris.
- Marcia, N., Siddhartha, C., Renato, H et al, (2005).** Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by pseudomonas aeruginosa LBI. Biotechnology progress, 21 (5).-
- Mbogne, F., Martia, P. (2017).** Biorémédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrat organique . Mémoire de master: Génie de l'environnement. Montréal: Université de québec, 109 p.
- Medejoub, K. (2012).** Investigation de l'efficacité de certaines techniques de bioremediation depollution par HAP. Mémoire de master: Chimie Physique et analytique académique /professionnel. Tlemcen: Universitéaboubekrbelkaid, 39 p
- Mercade, M. E, Manresa, M. A. (1994).**The use of agroindustrial byproducts for biosurfactant production. J. Am. Oil Chem. Soc. 1994, 71, 61-64.
- Miller, M. N., Stratton, G.W., Murry, G. (2004).** Effects on nutriments amendments and temperature on the biodegradation of pentachlorophenol contaminated soil. Water, air, and soil pollution, 151 (113),87-101.
- Miura, Y. (1978).** Mechanism of liquid hydrocarbon uptake by micro-organisms. J Microbiol Methods. 6 : 99-112.

N

- Naughton, P.J., Marchant, R., Naughton,V et al, (2019).** Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. Journal of applied microbiology, 127 (1), 13.

P

- Pauline, W., Kabore-Ouedraogo, A., Paul, W et al, (2010).** Etude de la Bio-dépollution de Sols contaminés par les Hydrocarbures au Burkina Faso.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M.C et al, (2017).** Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. Front microbiol, 8 (279).

- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Newby, D.T et al, (2009).** Soil: A Public Health Threat or Savior. *Critical reviews in environmental science and technology*, 39 (5), 416-432.
- Prabhu, Y., Phale, P. (2003).** Biodegradation of phenanthrene by pseudomonas sp.strain pp2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity In hydrocarbon assimilation. *Appliedmicrobiologybiotechnology*, 61 (4), 342-351.
- Proskouriakov. (1998).** la chimie du pétrole et du gaz. Mir.Mosco,13-201.
- Prince, R. (2005).** The microbiology of marine oil spill bioremediation. In: Ollivier,B., Magot,M (ed). *Petroleum microbiology*. Washington : Asm press, 317-335.
- Pulgarin, A. (2012).** Méthodes pour la datation des hydrocarbures déversés dans l'environnement: Environnement. Québec: Université de Sherbrooke. 79 p.

R

- Rahman, K., Rahman, T., McClean, Set al, (2002).** Rhamnolipidbiosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 1277-1281.
- Rainelli, P. (1996).** Pollution des sols, problemeseconomiques. *Etudes et gestion des sols*, 3 (4), 307-320.
- Robert, M., Mercadé, M.E., Bosch, M.P et al, (1989).** Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Springer link*, 11, 871-874.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J et al, (2006).** Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal antimicrobial chemotherapy*, 57 (4), 609–618.
- Reis, R. S., Pacheco, G. J., Pereira, A. G et al, (2013).** Biodégradation -life of science. In: Chamy, R. *Biosurfactants: productions and applications*. Bod: books on demand, 382.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z. (1999).** High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appied microbiology biotechnology*, 52 , 154–162.
- Rosenberg, E. (1986).** Microbial surfactants. *Critical reviews biotechnol*, 3 (2), 109-132.

S

- Sadouk, Z., Tazerouti, A., Hacene, H. (2008).** Biosurfactants production from low cost substrate and degradation of diesel oil by a *Rhodococcus* Strain. *Oil & Gas Science and Technology*, 63 (6), 747-753.
- Salle, C., Debyser, J. (1979).** Formation des gisements de pétrole: Etude des phénomènes géologique fondamentaux. Paris: Technip. 336-338 p.
- Santos, D.K., Rufino, R., Luna , J et al., (2016).** Biosurfactants:

- multifunctional biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17 (3), 401.
- Scott, C. C., Finnerty, W. R. (1976).** A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon- oxidizing microorganisms. *J Gen Microbiol*, 94 (2), 342-350.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T. (2015).** Biosurfactant Producing microbes and their potential applications. *Critical reviews in environmental science and technology*, 45 (14), 1522-1554.
- 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: Chimie analytique. Paris: Université pierre et marie curie, 285 p.
- Soltner, D. (2011).** Les bases de la production végétale. France: Collection sciences et techniques agricoles, 472 p.
- Song, H.G., Wang, X., Bartha, R. (1990).** Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and environmental microbiology*, 56 (3), 652-656.
- Syldatk, C. Lang, S. Wagner, F.(1985).** Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp. DSM 2847 grown on alkanes. *Z. Naturfor-sch.* 40c, 51-60.
- V
- Vandecasteele J .P. (2005).** Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. *In: MicrobiologiePétrolière.* Edited by E. Technip. Paris. P173-239.
- Vandecasteele, J.P. (2008).** *Petroleummicrobiology: Editions technip.* Paris. 816 p.
- Vanhaesendonck, I.P.H., Vanzeveren, E.C.A. (2004).**Rhamnolipides dans les produits de boulangerie. WO 2004/040984, brevet de demande internationale (PCT), Washington, DC.,USA.
- Vijayakumar, S., Saravanan, V. (2015).** Types -biosurfactants, sources and applications. *Research journal of mbiology*, 10, 181-192.
- Vinas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., solanas, A.M. (2002).** Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Jornal of industrialMicrobiologyBiotechnology*, 28 (380), 252-260.
- Vijayakumar, S., Saravanan, V. (2015).** Types -biosurfactants, sources and applications. *Research journal of microbiology*, 10, 181-192.
- Vogel,T., Ballerini, D. (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.soc.fr.Microbiol*, 16 (3), 204-209.

W

-**Wauquier, J-o. (1994)**. Le raffinage du pétrole: composition des pétroles bruts et des produits pétroliers. Paris: Ophrys. 1-5 P.

-**Widdel, F., Rabus, R. (2001)**. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion biotechnology*, 12 (3), 259–276.

Z

-**Zenati, B. (2018)**. Étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole. Thèse de doctorat : chimie industrielle. Blida : université Saad Dahlab Blida1, 168p.

-**Zhenyong, Z., Jonathan, WC Wong. (2009)**. Biosurfactants from *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 enhance the solubility and biodegradation of phenanthrene. 30 (3), 291-299.

- **Zmirou, D., Beausoleil, M., Coninck, P et al, (2003)**. Déchets et sols pollués. In: Gérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P., Dewailly, E. Environnement et santé publique-fondements et pratiques. Paris: Edisem, 397-440.

▪ Sites web : [en ligne]

- 1-La toupie. Le dictionnaire de la politique [en ligne]. (page consultée le 10/03/2020).
<http://www.toupie.org/Dictionnaire/Pollution.htm>.
- 2-La toupie. Pollution : les différentes formes [en ligne]. (page consultée le 05/03/2020).
http://toupie.org/Dictionnaire//Pollution_formes.htm
- 3-Jimmy Wales et Larry Sanger. Hydrocarbure [en ligne]. (page consultée le 21/03/2020).
<https://fr.wikipedia.org/wiki/Hydrocarbure>.
- 4-Surinam et Mike pompeo vante. Connaissance des énergies [en ligne]. (page consultée le 19/03/2020). <https://www.connaissancedesenergies.org/fiche-pedagogique/gaz-naturel>
- 5-Jimmy Wales et Larry Sanger. Liste de raffineries de pétrole [en ligne]. (page consultée le 04/06/2020). https://fr.wikipedia.org/wiki/Liste_de_raffineries_de_pétrole.
- 6-Guermazi. Raffinerie de Skikda [en ligne]. (page consultée le 05/03/2020).
https://fr.wikipedia.org/wiki/Raffinerie_de_Skikda.
- 7-Massib, N. L'Est Républicain Algérie [en ligne]. (page consultée le 05/03/2020).
www.lestrepublikain.com.
- 8-Malti hocine. La découverte de pétrole et la durée de la guerre d'Algérie [en ligne]. (page consultée le 05/05/2020). <https://algeria-watch.org/?p=65805>.
- 9-Fabio matinez. Rapport de stage société pétrolière SONATRACH [en ligne]. (page consultée le 03/04/2020). https://www.memoireonline.com/08/09/2573/m_Rapport-de-stage-societe-petroliere-SONATRACH1.html.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Les biosurfactants bactériens et l'Assainissement des sols pollués aux hydrocarbures. Quel rôle jouent-ils ? Et comment réduire le coût de leur synthèse industrielle ? Revue Bibliographique.

Résumé

La pollution de l'environnement par les hydrocarbures suite à leur déversement en milieu marin et terrestre constitue un danger permanent qui perturbe l'équilibre des écosystèmes et menace les êtres vivants notamment l'Homme.

L'industrie pétrolière en Algérie est secteur qui contribue au développement de l'économie du pays, mais reste à nos jours à l'origine de la détérioration de plusieurs ressources naturelles. La raffinerie de Skikda est exposée ici comme exemple.

La biodégradation est un processus naturel puissant et efficace qui survient pour rétablir la balance. Les acteurs sont principalement des microorganismes qui interviennent simultanément ou successivement chacun selon son mode d'accès au pétrole brute ou ses dérivés.

Les bactéries « hydrocarbonoclastes » sont des microorganismes aptes à dégrader les polluants hydrocarbonés en les utilisant comme seule source de carbone. Certains d'entre eux peuvent aussi produire des biosurfactants.

Cette recherche jette la lumière sur les connaissances actuelles liées à la capacité des bactéries isolées de sites pollués à produire les biosurfactants. Elle donne une idée générale sur les raffineries en Algérie, leurs activités, les déversements et le processus de la biodégradation des hydrocarbures grâce à l'action des hydrocarbonoclastes.

Plusieurs bactéries ont prouvé leur efficacité comme agents qui synthétisent les Biosurfactants en utilisant des déchets d'industrie alimentaire comme source de carbone et d'énergie. La souche *Pseudomonas aeruginosa* LBI, étudiée par l'équipe de Marcia et ses collaborateurs est un bon exemple de ceci.

Mot clés : hydrocarbures, hydrocarbonoclastes, biodégradation, biosurfactants, déchets huileux.

Membre du jury :

Président du jury : Mr Chabbi Rabeh (Maître assistant « A » à UFC)
Rapporteur : Mme Guergouri Ibtissem (Maître Assistante « A » à UFC)
Examineurs : Melle Abdelaziz Wided (Maître de conférence « B » à UFC)

**Présentée par : Bouchebaa Maroua
Bakha Sihem**

Année universitaire : 2019 -2020