

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ DE TLEMCE

Faculté des Sciences, de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'univers
Département de biologie

MÉMOIRE

Pour l'obtention

DIPLÔME DE MASTER

EN SCIENCES BIOLOGIQUES, OPTION :

MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE

Soutenu le 28 juin 2022

Par

KERMOUNI SERRADJ MOHAMMED BOUZIAN

DEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LES MICRO-ORGANISMES DANS LES MILIEUX MARIN

JURY

<u>Président :</u>	Dr. Bouali Wafaa	M.C.A.	(Université de Tlemcen)
<u>Membres :</u>	Dr. Bensalah Fatéma (Encadreur)	M.C.B	(Université de Tlemcen)
	Dr. Kholkhal Wahiba (Examineur)	M.C.B	(Université de Tlemcen)

Année Universitaire : 2021/2022

Résumé

Un groupe d'espèces fongiques a été examiné pour sa capacité à dégrader les hydrocarbures et il s'est avéré que la plupart des champignons isolés des milieux pollués par le pétrole possèdent un équipement enzymatique leur permettant de survivre dans ces milieux hostiles.

Dans une étude il a été constaté que Les champignons dominants sélectionnés sont *Aspergillus oryzae* et *Mucor irregularis*. De plus, la présence d'enzymes putatives, de laccase (Lac), de peroxydase de manganèse (MnP) et de peroxydase de lignine (LiP) a été confirmée dans des filtrats de culture utilisant des substrats appropriés. Un test d'activité enzymatique a révélé que ces deux champignons produisaient plus de Lac que MnP et LiP. *A. oryzae* a agi sur tous les composants d'hydrocarbures, *M. irregularis* n'a dégradé que les hydrocarbures à longue chaîne et le BTEX. Cette étude confirme que *A. oryzae* et *M. irregularis* ont le potentiel d'être exploités dans le bio traitement et l'élimination des hydrocarbures dans les milieux pollués.

Dans une autre étude il a été confirmé que la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse étaient des outils très précis pour démontrer l'efficacité de la biodégradation du pétrole brut par *A. terreus* KC462061. L'effet synergique du composé Cu-ABTS a le niveau d'induction le plus élevé du profil de transcription. Lcc11 et 12 étaient les principaux gènes de Lcc dans les profils de transcription tout au long du cycle de vie d'*A. terreus* KC462061, et leur abondance de transcription a été corrélée avec le composé Cu-ABTS.

La réaction en chaîne de la polymérase en temps réel ou quantitative (qPCR) a été utilisée pour l'analyse du profil de transcription de huit gènes de laccase chez *A. terreus* KC462061. Le Cu-ABTS s'est révélé très efficace pour le profilage efficace de l'expression de laccase, principalement par induction de transcription des gènes Lcc11 et 12

Finalement *Aspergillus* possèdent un équipement enzymatique puissant capable de dégrader la plupart des hydrocarbures.

Mot clés : hydrocarbures, biodégradation, *Aspergillus*, enzyme, champignon, laccase.

الملخص

تم فحص مجموعة من الأنواع الفطرية لمعرفة قدرتها على تحلل الهيدروكربونات ووجد أن معظم الفطريات المعزولة عن البيئات الملوثة بالزيت لديها المعدات الإنزيمية للبقاء على قيد الحياة في هذه البيئات المعادية.

في إحدى الدراسات، وجد أن الفطريات السائدة المختارة هي *Aspergillus oryzae* و *Mucor irregularis* بالإضافة إلى ذلك، تم تأكيد وجود الإنزيمات المفترضة واللاكاس (Lac) وبيروكسيداز المنغنيز (MnP) والليجنين بيروكسيداز (LiP) في مرشحات الزراعة باستخدام الركائز المناسبة. كشف اختبار نشاط الإنزيم أن كلا الفطرين أنتجا Lac أكثر من MnP و LiP. عمل *A. oryzae* على جميع المكونات الهيدروكربونية، *M. irregularis* فقط تحلل سلسلة طويلة من الهيدروكربونات و BTEX. تؤكد هذه الدراسة أن *A. oryzae* و *M. irregularis* لديهما القدرة على الاستغلال في المعالجة البيولوجية وإزالة الهيدروكربونات من البيئات الملوثة.

في دراسة أخرى، تم التأكيد على أن كروماتوغرافيا الغاز وقياس الطيف الكتلي هما أداتان دقيقتان للغاية لإثبات كفاءة التحلل البيولوجي للنفط الخام بواسطة *A. terreus* KC462061. كان التأثير التآزري لمركب Cu-ABTS هو أعلى مستوى من الحث على موجز النسخ. كانت Lcc11 و 12 جينات Lcc الرئيسية في ملفات تعريف النسخ طوال دورة حياة *A. terreus* KC462061، وكانت وفرة نسخها مرتبطة بمركب Cu-ABTS.

تم استخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الفعلي أو الكمي (qPCR) لتحليل صورة النسخ لثمانية جينات لأكيز في *A. terreus* KC462061. وجد أن Cu-ABTS فعال جداً في تحديد ملامح تعبير اللقطة، بشكل أساسي من خلال تحريض نسخ

Lcc11 و 12

أخيراً، يمتلك *Aspergillus* معدات إنزيمية قوية قادرة على تحطيم معظم الهيدروكربونات.

الكلمات الرئيسية: الهيدروكربونات، التحلل البيولوجي، *Aspergillus*، الإنزيم، الفطريات، اللكيز.

Abstract

A group of fungal species were examined for their ability to degrade hydrocarbons and it was found that most fungi isolated from oil-polluted environments have the enzymatic equipment to survive in these hostile environments.

In one study it was found that the dominant fungi selected were *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis*. In addition, the presence of putative enzymes, laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) was confirmed in culture filtrates using appropriate substrates. An enzyme activity test revealed that both fungi produced more Lac than MnP and LiP. *A. oryzae* acted on all hydrocarbon components, *M. irregularis* only degraded long chain hydrocarbons and BTEX. This study confirms that *A. oryzae* and *M. irregularis* have the potential to be exploited in the bio-treatment and removal of hydrocarbons from polluted environments.

In another study, it was confirmed that gas chromatography and mass spectrometry were very accurate tools to demonstrate the efficiency of biodegradation of crude oil by *A. terreus* KC462061. The synergistic effect of the Cu-ABTS compound had the highest level of induction of the transcript profile. Lcc11 and 12 were the major Lcc genes in the transcript profiles throughout the life cycle of *A. terreus* KC462061, and their transcript abundance was correlated with the Cu-ABTS compound.

Real-time or quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to analyse the transcriptional profile of eight laccase genes in *A. terreus* KC462061. Cu-ABTS was found to be very effective in profiling laccase expression, mainly through induction of transcription of the Lcc11 and 12

Finally, *Aspergillus* have a powerful enzymatic equipment capable of degrading most hydrocarbons.

Key words: hydrocarbons, biodegradation, *Aspergillus*, enzyme, fungus, laccase.

Remerciement

Avant toute chose, je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire. Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme Bensalah Fatima Conférences Classe B à l'Université Abou-bekr Belkaid - Tlemcen, je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant ma préparation de ce mémoire je tiens à remercier à Melle Bouali Wafaà Maitre de conférences Classe A à l'université de Tlemcen, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Nos remerciements vont aussi à Mme Kholkhal Wahiba Maitre de conférences Classe B à l'université de Tlemcen, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Enfin, nous adressons nos remerciements particuliers à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts.....	6
Figure 2: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.....	8
Figure 3: Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer	13
Figure 4: Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes.....	17
Figure 5: Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs.....	19
Figure 6: Facteurs affectant l'efficacité de biodégradation.....	22
Figure 7: Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique Ou naturel, et détermination de la CMC.....	23
Figure 8: Essai sur plaque pour le criblage colorimétrique des enzymes ligninolytiques Produites par les champignons isolés.....	45
Figure 9: Activités d'enzymes extracellulaires produites par <i>Mucor irregularis</i> B-Yorla10 isolées d'un site pollué par le pétrole brut au Nigeria.....	46
Figure 10: Activités d'enzymes extracellulaires produites par <i>Aspergillus oryzae</i> (C-Effurun) isolées d'un site pollué par le pétrole brut au Nigeria.....	47
Figure 11: Suivi de l'activité laccase dans le milieu MSM avec cinq inducteurs (individuels et combinés) (témoin) et les même conditions 1 % de pétrole brut et les mêmes inducteurs (traitement).....	49
Figure 12: Composition de l'huile moteur usagée révélée par l'analyse GC/MS.....	50
Figure 13: Dégradation des fractions d'hydrocarbures dans l'huile de moteur usée par certains champignons filamenteux. (<i>Mucor irregularis</i> et <i>Aspergillus oryzae</i>).....	51

Figure 14: Profil de transcription des gènes de codage de laccase pendant la croissance d’A. terreus KC46206 dans les cultures liquides, supporté par 1% de pétrole brut à différents moments de croissance.....52

Figure 15: Abondance relative des transcriptions (exprimée en pourcentage) des gènes de laccase. (a) Abondance relative des transcriptions des huit gènes de laccase au cours de chaque jour. (b) Abondance relative de la transcription des huit gènes de laccase pendant tous les jours. Le niveau de transcription total de tous les gènes Lcc a été considéré comme étant de 100%.....53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Exemples des souches bactériennes marines capables de dégrader des hydrocarbures.	15
Tableau 2: Exemples des souches bactériennes produisant des rhamnolipides, en utilisant différentes sources de carbone.....	27
Tableau 3: Différents domaines d'application des biosurfactants.....	34
Tableau 4: Incidence et souches fongiques dominantes isolées de sites pollués par le pétrole brut.	43
Tableau 5: Tolérance aux hydrocarbures et inhibition de la dose par deux souches fongiques sélectionnées provenant de sites pollués par du pétrole brut.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

HAPs: hydrocarbures aromatiques polycycliques.

CMC : concentration micellaire critique.

NRPS : Non Ribosomal Peptides Synthétase.

PDA : gélose stérile au dextrose de pomme de terre.

PDB : bouillon de dextrose de pomme de terre.

Lcc : laccase.

MnP : peroxyde de manganèse.

LiP : lignine peroxidase.

MEA : gélose à l'extrait de malt stérile.

ABTS: 2,2-Azino-bis-3-benzothiazoline-6-sulfonic acid.

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

BH : Bouillon cœur-cervelle.

CRISPR-Cas: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.

Table des matières

1	Les Hydrocarbures	4
1.1	Origine des hydrocarbures	4
1.2	Les hydrocarbures fossiles.....	5
1.3	Les hydrocarbures actuels	5
1.4	Les différents types d'hydrocarbures.....	5
1.4.1	Les hydrocarbures aliphatiques ou n-alcane.....	5
1.4.2	Alcane linéaires.....	5
1.4.3	Alcane ramifiés	6
1.4.4	Cycloalcanes	6
1.4.5	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	6
2	Le pétrole.....	7
2.1	Origine.....	7
2.2	La composition chimique.....	7
3	Pollution marine.....	8
3.1	Sources de la pollution marine	8
3.2	Pollution physique.....	9
3.3	Pollution chimique	9
3.4	Pollution biologique	10
3.5	La Pollution Par Les Hydrocarbures	10
3.5.1	Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin	11
3.5.1.1	Processus abiotiques.....	11
3.5.1.1.1	Évaporation.....	11
3.5.1.1.2	Transport de la nappe d'hydrocarbures	11

3.5.1.1.3	Photo-oxydation	11
3.5.1.1.4	Dissolution	12
3.5.1.1.5	Émulsification	12
3.5.1.1.6	Sédimentation.....	13
3.5.1.2	Processus biologique.....	14
3.5.1.2.1	Biodégradation.....	14
3.5.1.2.1.1	La biodégradation des hydrocarbures	14
4	Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine	17
5	Biodégradation des HAPs	18
5.1	Biodégradation des HAPs par les bactéries	19
5.2	Biodégradation des HAPs par les champignons	20
5.3	Biodégradation des HAPs par les algues	21
6	Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures	21
7	Surfactants	22
8	Biosurfactants	24
8.1	Propriétés	24
8.2	Classification	25
8.2.1	Les glycolipides	25
8.2.1.1	Les rhamnolipides	26
8.2.1.2	Les sophorolipides	27
8.2.1.3	Les lipides mannosylerythrioles (LME) et les lipides à tréhalose	28
8.2.2	Les lipopeptides.....	28
8.2.2.1	Les surfactines	29
8.2.2.2	Les lichenysines	29
8.2.2.3	Les iturines	30

8.2.2.4	Les fengycines	30
8.2.3	Les Phospholipides.....	30
8.2.4	Les acides gras.....	31
8.2.5	Les lipides neutres.....	31
8.2.6	Les biosurfactants polymériques	31
8.2.7	Surfactants particuliers	32
8.3	Production de biosurfactants.....	32
8.3.1	Microorganismes producteurs de biosurfactants	33
8.3.2	Applications.....	33
8.3.2.1	Environnement	35
Matériel et méthode		38
1	Sites d'étude et échantillonnage.....	38
1.1	Isolement des champignons	38
1.2	Activités enzymatiques des champignons dominants sélectionnés	39
1.3	Teste de biodégradation.....	40
1.4	Les Amorces spécifiques des gènes laccase :	41
1.5	La Transcription de gènes laccase à l'aide de qRT-PCR :	42
Résultats		43
1	Résultat d'isolement des champignons.....	43
1.1	Résultat de l'activité enzymatique.....	44
1.2	Les Effets des cinq inducteurs sur la production de l'enzyme laccase :	48
1.3	Résultat de biodégradation.....	50
1.4	La Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques du pétrole lourd :	51
1.5	La Biodégradation des hydrocarbures aromatiques du pétrole brut :	51
1.6	Profil de transcription de huit gènes de laccase <i>d'A. terreus KC46206</i>	52

Discussion	54
Conclusion et perspective.....	59
Références bibliographiques	62

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :

La pollution des écosystèmes marins constitue l'un des problèmes environnementaux majeurs par son impact sur la biosphère et la santé humaine. Le milieu marin, largement exploité pour ses richesses économiques (mariculture, pêche,) et touristiques, subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (déversements de pétrole, effluents urbains et industriels...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques) (**Vikas et Dwarakish 2015**).

Les substances xénobiotiques susceptibles de contaminer les eaux sont extrêmement nombreuses et diverses en raison des activités humaines multiples qui peuvent en être la source. Les hydrocarbures, et en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont notamment considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes marins du fait de leur faible solubilisation dans les milieux aqueux et leur adsorption aux particules solides. De plus, les HAPs, présentent un risque toxicologique important même à des faibles concentrations, notamment par leurs propriétés mutagènes et cancérigènes (**Duran et Cravo-Laureau, 2016**).

Afin de préserver et de restaurer l'environnement et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution. Les méthodes physiques et chimiques sont appliquées afin d'immobiliser les hydrocarbures et de les détruire pour réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement (**Azubuiké et al., 2016**). La plupart de ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement (**Azubuiké et al., 2016**). Toutefois, une approche biologique par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse (**Nikitha et al., 2017**). Les recherches actuelles s'orientent vers l'élimination des hydrocarbures, incluant les HAPs, par des bioprocédés dont l'intérêt de ces nouvelles techniques réside surtout dans l'aspect non polluant et l'absence de sous-produits chimiques. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes est considérée comme le mécanisme principal par lequel la plupart des polluants xénobiotiques, notamment les hydrocarbures sont éliminés de l'environnement (**Nikitha et al., 2017**).

INTRODUCTION GENERALE

Par ailleurs, l'addition des agents tensioactifs est une approche prometteuse pour augmenter la biodégradation des hydrocarbures. Ces molécules peuvent augmenter la solubilisation et la dispersion des hydrocarbures et modifier l'affinité entre la cellule microbienne et le composé organique (**Geetha et al., 2018**). La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (**Banat et al., 2000**). De ce fait, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, la production des tensioactifs produits par les microorganismes suscite un grand intérêt par les scientifiques. Ceci est dû principalement aux avantages présentés par ces biomolécules par rapport à leurs homologues chimiques, à savoir la biodégradabilité, la faible toxicité, l'efficacité dans des conditions extrêmes (pH, température et salinité) et la production en présence des ressources renouvelables (**Makkar et al., 2011**). Les biosurfactants ont de nombreuses applications potentielles couvrant des domaines très variés tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la médecine, l'agriculture, les détergents, la fabrication de textiles, le traitement des métaux, l'industrie pétrolière et la bioremédiation de sites contaminés par les hydrocarbures, grâce à leur capacité d'émulsification et de solubilisation, etc... (**Santos et al., 2016**). Néanmoins, leurs coûts élevés de production soulignent la nécessité d'optimiser le processus de production pour permettre une éventuelle application à l'échelle industrielle (**Banat et al., 2014b**). Les biosurfactants peuvent être produits sur des ressources agricoles et de déchets renouvelables, permettant non seulement une diminution significative de coût de production, mais aussi une réduction des quantités des déchets à traiter générés par diverses entreprises (**Geetha et al., 2018**).

Ce manuscrit fera appel, en premier lieu, à une synthèse bibliographique dans laquelle on exposera quatre chapitre les hydrocarbures, leur effet sur les milieux marins, la biodégradation par les microorganismes, et la production de surfactants enfin en terminera avec une analyse de deux articles scientifiques traitant la biodégradation des hydrocarbures par les champignons

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les Hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant seulement du carbone et de l'hydrogène et hautement insoluble dans l'eau, les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont gazeux, tandis que ceux d'un poids moléculaire plus élevé sont liquides, ou solides, à la température ambiante (**Michael et John, 2007**). Le carbone et l'hydrogène peuvent former des molécules saturées, linéaires ou cycliques, et parmi les molécules cycliques, certaines grâce à un type particulier d'insaturation ont des propriétés particulières qui les font classer à part.

(**Manahan, 2007**). On distingue donc trois types d'hydrocarbures :

1. Les hydrocarbures saturés à chaîne ouverte ou cyclique.
2. Les hydrocarbures insaturés à double ou triple liaison et qui peuvent aussi être cycliques ou acycliques.
3. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques ou polycycliques (**Lefebvre, 1986**).

Les hydrocarbures regroupent différents produits pétroliers (pétrole brut, pétrole raffiné, kérosène, essences, fuel, lubrifiants, huiles à moteurs (**Jeannot et al, 2001**)). Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10% à 30% des hydrocarbures totaux du pétrole (**Soltani, 2004**). Les hydrocarbures déversés dans l'environnement subissent une série de transformations aboutissant à plus ou moins long terme à leur disparition totale ou partielle. Les transformations microbiennes par les microorganismes sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie des hydrocarbures (**Arris, 2008**), car ces microorganismes, principalement les bactéries utilisent les hydrocarbures comme substrats de croissance (**Scriban, 1993**). Chaque microorganisme utilise un hydrocarbure dans un milieu spécifique. Chaque espèce a des exigences spécifiques : longueur de chaîne, ramification, insaturation (**Pelmont, 2005**).

1.1 Origine des hydrocarbures

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

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines :

1.2 Les hydrocarbures fossiles

Proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique. Ces hydrocarbures se forment à partir de débris d'algues, de résidus de la faune marine et de plancton. Alors le vieillissement, la température et la pression (qui s'exerce sur les fonds marins) transforment cette substance organique en hydrocarbures (**Bocard, 2006**).

1.3 Les hydrocarbures actuels

Qui sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroître cette production dans les zones actuellement gelée et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre (**Djerbaoui, 2011**).

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

1.4 Les différents types d'hydrocarbures

1.4.1 Les hydrocarbures aliphatiques ou n-alcane

Les hydrocarbures aliphatiques sont constitués de chaînes carbonées linéaires qui peuvent être saturées ou possède une ou plusieurs doubles ou triples liaisons (alcane / alcène / alcyne).

La famille des n-alcane est généralement subdivisée en 2 sous-groupes : les n-alcane légers (chaîne linéaire ≤ 20 carbone) et les n-alcane lourds (chaîne linéaire > 20 carbone) (**Bertrand et Mille, 1989**)

Parmi les hydrocarbures saturés on distingue :

1.4.2 Alcane linéaires

Les alcane linéaires (n-alcane, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de leur chaîne (n) varie entre 7 et 40 constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (**figure 1**) (**Bertrand et Mille, 1989**).

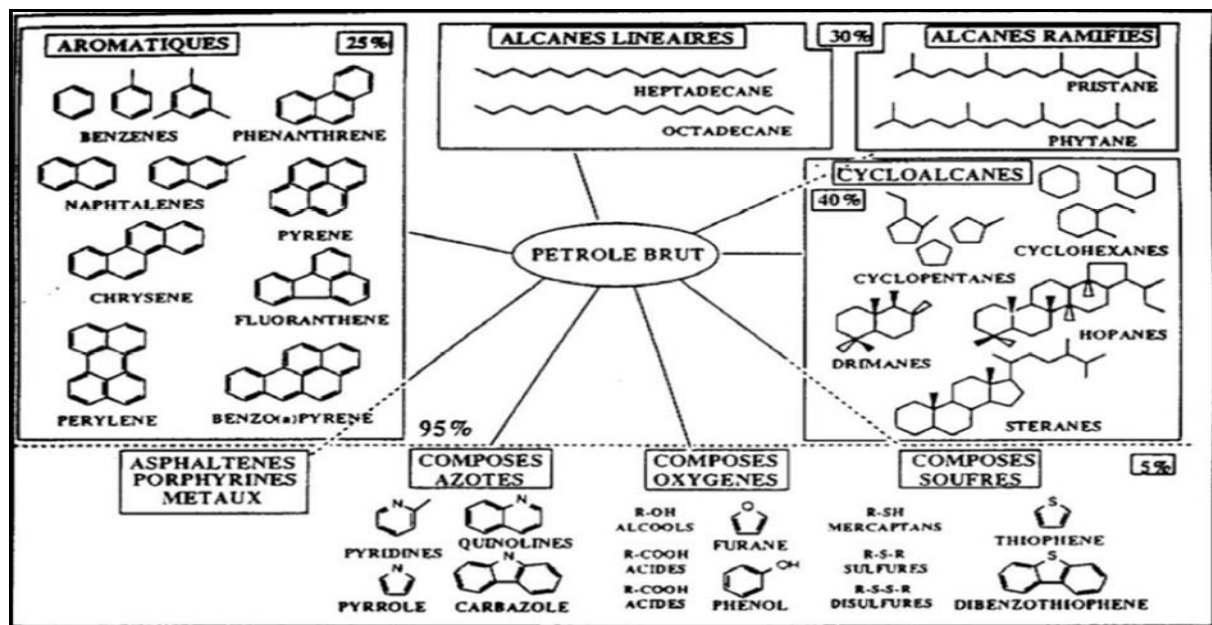


Figure 1: Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts (Bertrand et Mille, 1989).

1.4.3 Alcanes ramifiés

Les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2) et les antéiso-alcanes (groupement méthyle en position 3). On retrouve des poly-ramifiés tels que les isoprénoides (Exemples : pristane (C₁₉H₄₀) et phytane (C₂₀H₄₂)), qui sont beaucoup moins nombreux (Tissot et Welte, 1978 ; Nakajima *et al.*, 1985).

1.4.4 Cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpènes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 40 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut. Appelés aussi cyclanes ; ce sont des alcanes sur lesquels les carbones sont liés par des liaisons simples de manière à former un cycle (Dooley *et al.*, 2014). Exemple : Cyclohexane (C₆H₁₂).

1.4.5 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Ce sont des molécules principalement formées par la condensation de cycles benzéniques.

Cette condensation peut être linéaire (anthracène) ou bien angulaire (phénanthrène).

Certains auteurs ont même subdivisé ce groupe d'HAP en deux catégories en fonction de la disposition relative des cycles condensés. Ils ont ainsi défini les systèmes kata-annelés et péri-

condensés qui correspondent respectivement aux molécules dont le carbone tertiaire est engagé dans une liaison entre deux cycles (anthracène) et dans une liaison entre trois cycles (pyrène) (**Bjorseth et Becher, 1986**). Cependant, bien que la plupart des molécules soient formées par des réactions de condensation, certains HAP ont leurs cycles liés par les sommets ou même grâce à des chaînes aliphatiques (**Arnaud, 1983**).

2 Le pétrole

2.1 Origine

Le pétrole est une roche liquide carbonée, ou huile minérale, constituée d'une multitude de molécules composées majoritairement d'atomes de carbone et d'hydrogène appelés hydrocarbures. Suite à la sédimentation de matières organiques végétales et animales et à leur enfouissement sous d'autres couches sédimentaires. La décomposition de ces matières organiques provoque une perte d'oxygène dans le milieu induisant des réactions réductrices. Puis, sous l'action combinée de la chaleur (60 °C) et de la pression (enfouissement d'environ 1 200 à 1 800 mètres), la transformation en hydrocarbures débute. Ce pétrole en formation est moins dense que la roche qui l'entoure, il migre donc vers la surface. Si le pétrole est arrêté dans sa progression par des roches imperméables, il se concentre pour former des poches qui sont à l'origine des réservoirs actuels (**Tissot et Welte, 1984**).

2.2 La composition chimique

Le pétrole brut est parmi les mélanges les plus complexes des composés organiques qui se produisent sur la terre. Les progrès récents de la spectrométrie de masse à ultra-haute résolution ont permis d'identifier plus de 17 000 composants chimiques distincts et le terme de pétroleomique est inventé pour exprimer cette complexité récemment découverte (**Hassanshahian et Cappello, 2013**).

Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane non cycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (**Harayama et al, 1999**). D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltènes (**Balba et al, 1998**). La composition élémentaire

des hydrocarbures pétroliers est présentée dans la (figure 2).

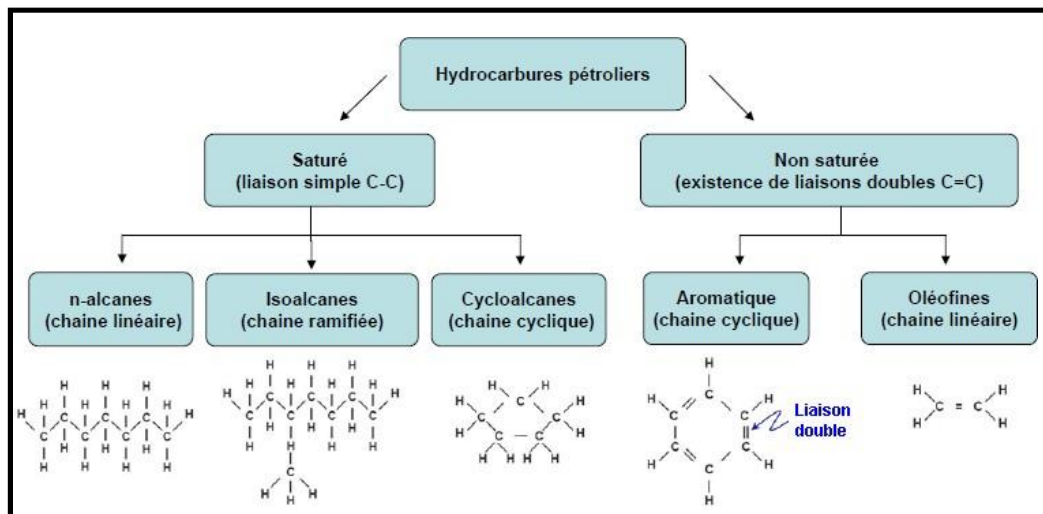


Figure 2: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano Et al, 2008).

3 Pollution marine

La pollution marine est définie comme étant l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans le milieu marin occasionnant des effets néfastes tels que des risques pour la santé humaine, des nuisances envers les ressources biologiques, une altération de la qualité de l'eau de la mer, ainsi que des entraves aux activités maritimes (y compris la pêche) (Gesamp, 1989).

Un pourcentage de 80% de la pollution marine des océans est d'origine continentale, c'est-à-dire qu'elle provient des activités humaines sur les continents et non pas des activités maritimes. Les divers polluants sont entraînés par le cycle de l'eau des continents (ville, montagne...) vers les océans par les cours d'eau (rivières, fleuves) ou par les nappes phréatiques souterraines (Goeurly David, 2014).

3.1 Sources de la pollution marine

Les sources de pollution du milieu aquatique sont diverses. Ces pollutions peuvent être d'origines naturelle ou anthropique. Parmi les pollutions naturelles, on trouve les tempêtes, les éruptions volcaniques, ou les crues qui peuvent, par leur action de brassage, disperser et/ou remettre en suspension des sols ou des sédiments contaminés. Quant aux pollutions d'origine anthropique, elles présentent des causes très multiples. Il peut s'agir de pollutions chroniques, telle que la dispersion de produits chimiques liée aux activités agricoles (produits phytosanitaires, fèces,

pesticides), industrielles, portuaires (hydrocarbures), ou de pollutions liées à la vie courante tels que les effluents résiduaires, les produits pharmaceutiques et les gaz d'échappement. Il peut également s'agir de pollutions accidentelles telles que les marées noires ou certaines catastrophes nucléaires (**Shahidul Islam et Tanaka, 2004**). En effet, les hydrocarbures représentent une importante source de pollution, notamment en cas d'accident pendant le transport par la mer ou par fuite ou accident sur une plateforme pétrolière, sur une barge de stockage pétrolière, ou sur un pipeline de transport sous-marin (**Chalghmi, 2015**).

3.2 Pollution physique

La pollution physique peut être soit de nature mécanique, thermique ou radioactive. Une pollution mécanique est due à une charge importante des eaux en éléments en suspension provenant d'effluents industriels ou d'eaux usées de carrières ou de chantiers divers. Une pollution thermique quant à elle est causée par le rejet d'eaux chaudes provenant des centrales électriques des sources thermales. La pollution par les agents radioactifs est pour sa part limitée par le contrôle strict effectué dans les installations nucléaires ; toutefois, les risques demeurent dans certains hôpitaux face aux déchets d'utilisation des radioéléments (**Potters, 2013**).

3.3 Pollution chimique

L'immense majorité des nuisances est causée par ce type de rejets. Parmi lesquels, on distingue ceux de nature minérale et les effluents organiques. La pollution à dominance minérale est caractérisée par la présence d'éléments chimiques, tels que les phosphates, les nitrates, les nitrites, les sulfates, l'ammoniaque, ou de substances non naturelles à toxicité immédiate ou différée, comme les pesticides, les métaux lourds, les détergents, qui s'accumulent dans les tissus des organismes vivants (**Richir et Gobert, 2016**). Les premiers sont déversés dans le milieu aquatique sous forme d'excédents d'engrais agricoles qui sont entraînés par le ruissellement, le lessivage ou la lixiviation. Si leur charge devient élevée, on observe alors une forte multiplication des populations algales débouchant à l'eutrophisation et au vieillissement précoce du cours d'eau (**Tuffery, 1980**). Quant aux pesticides, aux métaux lourds et aux détergents, la réponse de leur action sur les biocénoses reste liée à l'espèce. En effet, lorsque la concentration en ces toxiques atteint ou dépasse la dose létale d'un taxon donné, celui-ci meurt.

La pollution organique a des origines multiples. Les sources principales sont les rejets des agglomérations urbaines, les industries agro-alimentaires telles que les laiteries, les conserveries,

les tanneries etc... (**Tuffery, 1980**). Les apports importants de matières organiques agissent sur les organismes, sur la production des biocénoses et sur le vieillissement des plans d'eau.

3.4 Pollution biologique

Il s'agit de l'introduction d'un ou des microorganismes (bactéries, champignons, virus) dans une zone où ils sont normalement absents et dans laquelle ils ont un impact non négligeable. Ces microorganismes peuvent proliférer à leur arrivée dans le milieu marin et devenir envahissants, tout en causant de multiples impacts sur le milieu naturel comme une compétition pour la nourriture et la lumière avec les espèces indigènes ainsi que la dispersion des toxines dans le milieu naturel (**Potters, 2013**).

Cette pollution peut résulter du rejet, dans les eaux continentales ou littorales, d'une grande variété de substances organiques fermentescibles d'origines multiples (effluents urbains, industries, élevages, matières fécales...). Elle se traduit par une forte contamination bactériologique et soulève, dans la plupart des cas, de vrais problèmes d'hygiène dont la qualité des eaux et la salubrité des plages (**Mearns et al., 2018**).

3.5 La Pollution Par Les Hydrocarbures

La pollution pétrolière avec ses constituants toxiques, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), est l'une des formes de pollution aquatique les plus visibles et les plus dommageables. Pénétrant dans les milieux d'eau douce et marins par les égouts pluviaux, les rejets industriels, l'élimination des déchets non traités et l'exploitation minière, ainsi que par les accidents de navigation et la navigation de plaisance, la pollution pétrolière cause des dommages importants aux biotes aquatiques et à la pêche côtière. L'exposition au pétrole brut peut perturber la fonction cardiaque et provoquer des malformations cardiaques chez les poissons en développement. (**Muncaster S.P. et al., 2016**) L'exposition au pétrole et son ingestion peuvent également endommager les systèmes reproducteurs des poissons, modifier leur taux de croissance et altérer leurs comportements. L'exposition aux déversements de pétrole peut causer une immunodépression chez les poissons les rendant plus vulnérables aux agents pathogènes. L'immunosuppression était évidente chez le hareng du Pacifique exposé au pétrole brut. (**Matt Landos et al 2021**) Après des marées noires importantes, des espèces importantes sur le plan commercial comme les huîtres, les crevettes et le thon peuvent subir un déclin de leur population et devenir trop contaminées pour être capturées et consommées en toute sécurité.

3.5.1 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin

À la suite d'un déversement dans un milieu aquatique, sous l'influence de processus de transports horizontaux et verticaux, les hydrocarbures vont se propager dans le milieu. Ils seront également soumis à différents processus d'altération physique, chimique et biologique qui vont modifier leur composition chimique et leurs propriétés physiques ainsi que leur devenir dans le milieu. Il s'agit des processus d'évaporation, d'émulsification, de dispersion naturelle, de dissolution, de photooxydation, de sédimentation, d'interaction avec des particules fines et de biodégradation (Fingas, 2013).

3.5.1.1 Processus abiotiques

3.5.1.1.1 Évaporation

Lorsque déversés en mer ou sur la côte, l'évaporation est le processus de transformation le plus important des hydrocarbures lors des deux premiers jours d'évolution de la nappe. Selon le type de pétrole, elle peut affecter la quasi-totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Elle agit sur les fractions légères et elle s'intensifie lorsque l'étalement des hydrocarbures est important. L'agitation de la mer et des vents favorisent fortement l'évaporation (Goeury Cédric, 2012).

3.5.1.1.2 Transport de la nappe d'hydrocarbures

Le transport d'une nappe d'hydrocarbures est généralement induit par le courant, le vent, les vagues et la diffusion turbulente. La vitesse d'étalement dépend du point d'écoulement et de la viscosité. En effet, les hydrocarbures légers s'étaleront très rapidement, quelle que soit la température de la mer, alors que les hydrocarbures lourds s'étaleront plus lentement et resteront épais plus longtemps, notamment dans les mers froides, qui constituent des environnements réduisant la vitesse de dispersion (ANPE, 2012).

3.5.1.1.3 Photo-oxydation

La photooxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire, la composition chimique des hydrocarbures déversés et la teneur en particules en suspension dans la colonne d'eau (Prince et al., 2003). Sous l'action du rayonnement solaire, essentiellement les rayons UV, certains composés peuvent être oxydés. Les composés produits sont alors plus solubles que les composés initiaux et peuvent être plus toxiques. Les composés saturés ne sont pas affectés, mais la majorité des composés aromatiques

sont convertis en résines ou en molécules polaires (**Prince et al., 2003**). Plus les composés aromatiques sont alkylés, plus ils sont sujets à la photooxydation (**Caldwell et al., 1998**).

D'après **Fingas (2013)**, pour la plupart des hydrocarbures, le processus de photooxydation a peu d'influence sur leur devenir ou l'évolution de leur masse à la suite d'un déversement.

La photo-oxydation sera plus rapide lorsque les hydrocarbures sont étalés en film mince (**Chalghmi, 2015**).

3.5.1.1.4 Dissolution

La dissolution se produit rapidement après le déversement et affecte principalement les composés aromatiques polaires et de faible poids moléculaire (**Prince et al., 2003**), c'est-à-dire essentiellement les composés inférieurs à C15 (**Mansuy et al., 1997**).

Généralement, on estime qu'une très faible partie de la masse d'hydrocarbure déversée va se dissoudre dans l'eau, ainsi peu de modèles prennent ce phénomène en compte. La présence de sels minéraux contribue à réduire l'espace limité disponible pour les molécules d'hydrocarbures. En fait, plus l'eau de mer est salée (c'est le cas de la Méditerranée), plus la dissolution est faible (**Marchand et kantin, 1997**).

Plusieurs facteurs environnementaux influent sur ce processus d'altération des hydrocarbures. Ainsi, la dissolution prend plus de temps pour atteindre l'équilibre lorsque les températures sont plus basses (**Faksness et al., 2008**). La vitesse de dissolution des hydrocarbures peut être également influencée par l'étalement de la nappe, l'épaisseur de la couche d'hydrocarbures et le degré de dispersion de la nappe (**ITOPF, 2012**).

3.5.1.1.5 Émulsification

L'émulsification est un processus d'incorporation de gouttelettes d'eau dans les hydrocarbures pétroliers. Ceci augmente le volume du produit déversé et modifie certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Pour que le produit obtenu soit appelé « émulsion », il doit avoir une certaine stabilité (**Fingas, 2013**).

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse au chocolat" et huile-dans-eau (**Figure 3**).

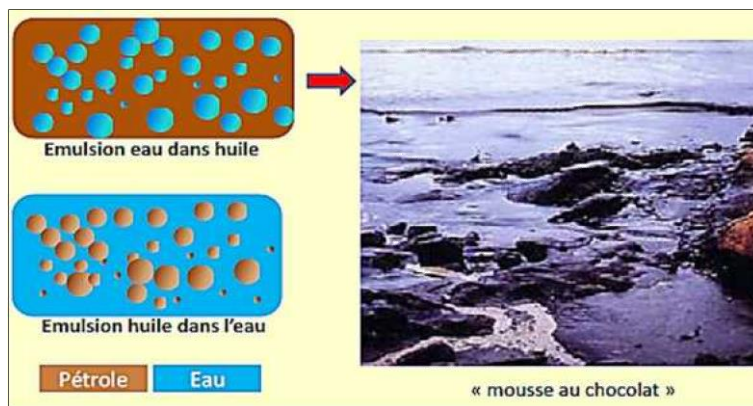


Figure 3: Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer (D'après Bertrand et al., 2012)

Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages. Leur formation et leur stabilisation dépendent essentiellement de la composition chimique du pétrole et en particulier d'une teneur élevée en composés polaires, en résines et en asphaltènes. Elles sont très stables, leur dégradation est alors considérablement ralentie et elles sont extrêmement dommageables pour les zones côtières qui sont impactées (Asia, 2012).

Les émulsions huile dans eau, quant à elles facilitent l'élimination des hydrocarbures, leur formation est favorisée par la présence de substances tensioactives naturelles.

Parallèlement, la biodégradation s'accompagne d'une production de substances émulsifiantes (biosurfactants) qui vont favoriser la dispersion/dissolution (Asia, 2012).

3.5.1.1.6 Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. Les hydrocarbures adsorbés préférentiellement sur les particules en suspension sont entraînés gravitairement vers le sédiment marin. Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (Dachs et al., 2002 ; Deyme, 2011).

La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle (Morgan et Watkinson, 1989 ; Mazouz et Smail, 1996).

3.5.1.2 Processus biologique

3.5.1.2.1 Biodégradation

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

3.5.1.2.1.1 La biodégradation des hydrocarbures

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

Les bactéries marines ont évolué pour produire des enzymes leur permettant d'utiliser les hydrocarbures issus des pétroles bruts comme source de carbone et d'énergie (**Haritash et Kaushik, 2009**). On parle alors de la bioremédiation qui peut être définie comme un processus d'ingénierie qui utilise des mécanismes biochimiques des organismes pour dégrader les polluants environnementaux, et les transformer en produits finaux moins complexes, tels que le dioxyde de carbone (CO₂) et de l'eau (H₂O) (**Gillespie et Philp, 2013**). À travers ce processus naturel, la majorité des hydrocarbures issus d'un déversement se biodégradent, l'énergie et les matériaux qu'ils contiennent étant alors intégrés à la chaîne alimentaire (**Head et al., 2006**).

La dégradation requiert un niveau approprié d'oxygène, des nutriments et des oligo-éléments ; sa vitesse dépend principalement du rapport entre la surface et le volume d'hydrocarbure. Ainsi les gouttelettes finement dispersées se dégraderont rapidement alors qu'une nappe épaisse ou une flaque d'hydrocarbure sur la côte se dégradera plus lentement. Les grosses molécules d'hydrocarbures ne sont pas facilement biodégradables et peuvent persister pendant plusieurs années ; elles comprennent en outre certains HAPs qui peuvent s'avérer toxiques mais présentent un niveau faible de solubilité dans l'eau et donc un niveau très réduit de disponibilité biologique. Certains des hydrocarbures les plus lourds, comme les asphaltènes sont si résistants à la biodégradation qu'une plaque bitumeuse, bien qu'inerte, est susceptible de persister pendant des centaines d'années (**Haritash et Kaushik, 2009**).

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Les bactéries sont les principaux dégradeurs d'hydrocarbures dans le milieu marin (**Leahy et Colwell, 1990**). Seules les archées halophiles des genres *Haloferax*, *Halobacterium* *Halococcus* et *Haloarcula*, ont été identifiées comme capables de dégrader des hydrocarbures (**Al-Mailem et al., 2010, Tapilatu et al., 2010**). Chez les eucaryotes, plus de 140 genres de champignons, lignolytiques et non lignolytiques, sont capables de dégrader les hydrocarbures, mais pas comme source unique de carbone (**Cerniglia et Sutherland, 2010**). Certaines levures ainsi que des champignons filamenteux ont un rôle dans la dégradation des hydrocarbures en milieu côtier (**Jeanbille et al., 2016**).

Pour les bactéries, on compte en tout plus de 175 genres qui comportent des isolats capables de dégrader les hydrocarbures (**Prince et al., 2010**). Ces genres sont répartis dans les phyla des *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, et *Proteobacteria*. La majorité des bactéries qui dégradent les hydrocarbures décrite actuellement Appartiennent aux *Proteobactéries*. Ils appartiennent pour la plupart aux *Gammaprotéobactéries* (*Marinobacter*, *Alkalinovorax*, *Oleispira*, *Oleiphilus*, *Antarctica*, *Thalassolituus*; *Neptunomonas*, *Cycloclasticus*) (**Head et al., 2006**).

Le tableau 1, ci-dessous présente quelques exemples des souches bactériennes isolées à partir du milieu marin et ayant des capacités biodégradatives des hydrocarbures. Ces souches ont été identifiées aux différents genres tels que : *Bacillus*, *Marinobacter*, *Cycloclasticus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Oleispira*, *Alcanivorax*. (**Tableau 1**).

Tableau 1: Exemples des souches bactériennes marines capables de dégrader des hydrocarbures.

Espèces bactériennes	Souches	Hydrocarbures	Références
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	SK2	Alcanes	Schneiker et al., 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	LB1	B; T; E; X;	Wang et al., 2008
<i>Bacillus mojavensis</i>	JB5	B; T	Wang Lin et al., 2008
<i>Cycloclasticus spirillensus</i>	P1	NAP; FL; PHE; ANT; FLU; PYR; PB	Wang et al., 2008
<i>Marinobacter</i> sp.	NCE312	NAP, 1-MN, 2-MN	Hedlund et al., 2001

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	SdK644	NAP; ANT; PYR; C16; PB	Zenati <i>et al.</i> , 2018
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	SP17	C14; C16; C19; C20; C21; PHE	Gauthier <i>et al.</i> , 1992
<i>Oleispira antarctica</i>	RB8	C10-C18	Yakimov <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	LE9	B; T; E, X	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	LE2	B; T; E, X	Wang <i>et al.</i> , 2008

B : Benzène ; **T** : Toluène ; **E** : Ethylbenzène ; **X** : Xylènes ; **NAP** : Naphtalène ; **FL** : Fluorène ; **PHE** : Phénanthrène, **ANT** : Anthracène ; **FLU** : Fluoranthène, **PYR** : Pyrène ; **PB** : Pétrole brut ; **1-MN** : 1-méthyl-naphtalène ; **2-MN** : 2-méthyl-naphtalène ; **C10** : Décane ; **C14** : Tétradécane; **C16**: Hexadécane; **C18**: Octadécane; **C19**: Pristane; **C20**: Eicosane; **C21**: Heneicosane. La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est considérée comme le processus principal d'élimination de ces contaminants (**Haritash et Kaushik, 2009**).

Un schéma général de la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes en condition aérobie, a été proposé par (**Das et Chandran, 2011**) (**Fig. 4**).

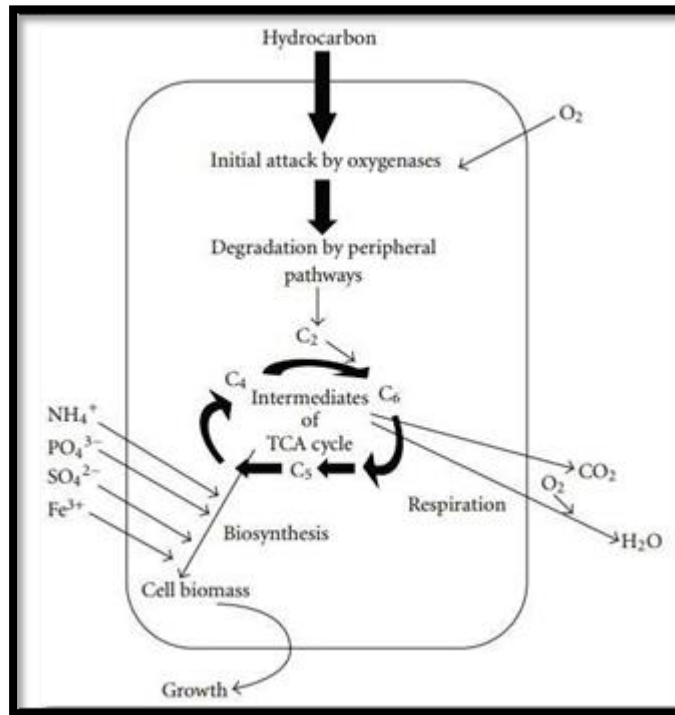


Figure 4: Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das et Chandran,2011).

L'attaque initiale est effectuée par l'incorporation d'oxygène, clé de la réaction enzymatique catalysée par des 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'acétyl-CoA, le pyruvate ou le succinate sont utilisés comme des précurseurs pour la biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule. Les sucres nécessaires à de nombreuses biosynthèses et à la croissance sont produits par la glycogénèse (Das et Chandran, 2011).

4 Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine

En milieu marin tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures commençant des planctons aux mammifères marins. Les organismes planctoniques sont relativement sensibles aux effets toxiques d'une exposition aux hydrocarbures, en particulier aux fractions solubles dans l'eau et aux petites gouttelettes d'hydrocarbures. En effet, des études de laboratoire ont décrit un large éventail d'effets aigus, chroniques et sublétaux sur diverses espèces et à divers stades de vie. Cependant, la plupart des

études sur les communautés planctoniques naturelles en mer ont permis de mettre en évidence un retour rapide à des densités et des compositions de communauté normales, une fois que les concentrations en hydrocarbures dans l'eau sont revenues à un niveau normal (**ITOPF, 2011**).

Les mollusques et les crustacés de mer (moule, crabe, crevette, huître) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Les crustacés qui se nourrissent de détritiques ou de particules en suspension seront affectés par perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires. Par contre, les huîtres accumulent moins d'hydrocarbures que les moules, car elles sont capables de se fermer pendant des périodes assez longues une fois soumises à l'agression d'un agent chimique toxique. Les moules, par contre, ne peuvent pas empêcher les polluants de pénétrer (**Chalghmi, 2015**).

Les hydrocarbures peuvent affecter également les oiseaux via trois voies de contamination : Par le contact direct avec les plumes, qui peut conduire à l'hypothermie et réduire leur capacité à se déplacer ou s'alimenter ; par l'ingestion d'hydrocarbures lors du lissage ou de la consommation d'aliments contaminés ; ou par le transfert de la contamination aux œufs ou aux jeunes pouvant réduire le taux de survie (**Anderson et al., 2006**).

5 Biodégradation des HAPs

Un grand nombre des bactéries, champignons et algues ont la capacité de dégrader les hydrocarbures et ces biodégradations peuvent être faites soit par des souches pures, soit par des consortia de microorganismes. Les champignons hydroxylent les HAPs en vue de leur détoxification, tandis que les bactéries oxydent les HAPs pour assimiler leur carbone (**Cerniglia, 1993**). Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs sont présentées sur la **figure 5**.

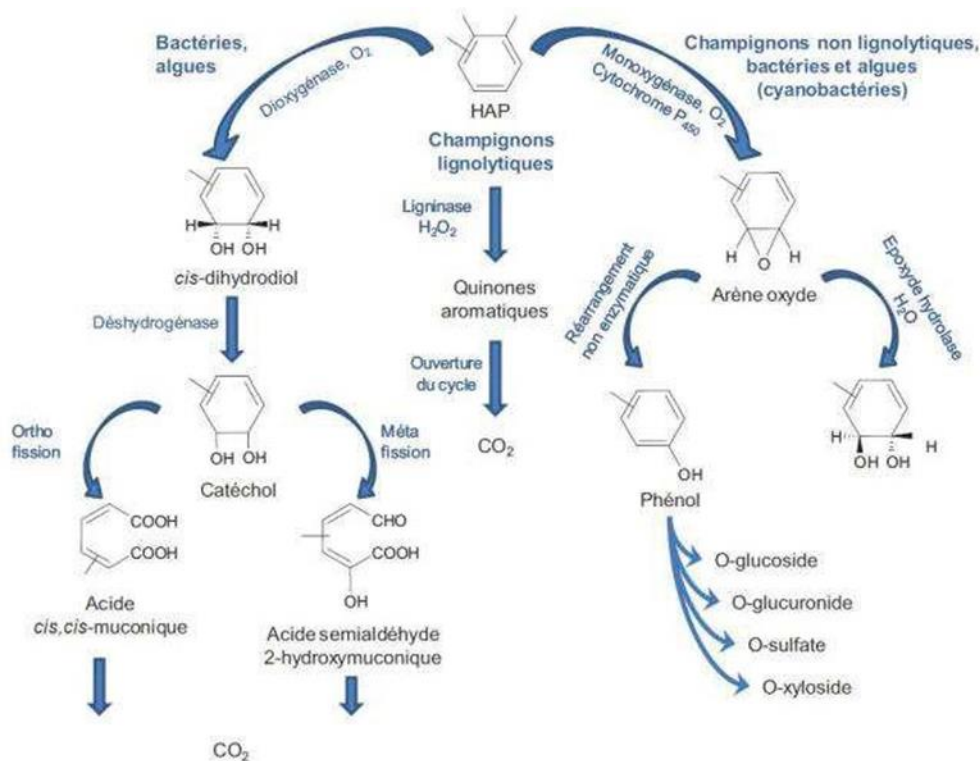


Figure 5: Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs (Cerniglia, 1993).

5.1 Biodégradation des HAPs par les bactéries

La dégradation bactérienne aérobie des HAPs est initiée généralement par l'action d'une dioxygénase (incorporation de deux atomes d'oxygène) qui attaque un des noyaux aromatiques conduisant à la formation d'un cis-dihydrodiol (**Figure 5**). Ce dernier est ensuite déshydraté en catéchol, un intermédiaire central de la biodégradation aérobie des composés aromatiques, qui va subir le clivage du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (ortho-fission) ou entre un carbone hydroxylé et un carbone non substitué (méta-fission) et va aboutir à la formation de composés simples (succinate, pyruvate) pouvant entrer dans le métabolisme central des bactéries. Cette biodégradation directe a lieu pour les HAPs de faible poids moléculaire. Cependant, peu de bactéries peuvent utiliser les HAPs de masse moléculaire élevée comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAPs de haute masse moléculaire se fait généralement par co-métabolisme (**Fang et al., 2013**). Dans ce cas, les bactéries utilisent un substrat structurellement proche aux HAPs de haut poids moléculaire (par exemple, un HAP ayant une faible masse moléculaire) pour leur croissance. Parallèlement, les enzymes non spécifiques produites sont donc impliquées dans la dégradation des HAPs à haute masse moléculaire (**Johnsen et al., 2005**). Dans le cas des cultures mixtes, des

intermédiaires métaboliques peuvent être dégradés par d'autres souches présentes. A noter que quelques bactéries, comme *Mycobacterium sp.* Peuvent aussi dégrader les HAPs par l'intermédiaire de monooxygénases à cytochrome P450 en formant des trans-dihydrodiols de manière similaire aux champignons non lignolytiques (Fig. 5) **(Rehmann et al., 1998)**.

Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie des HAPs, ont été décrits pour une large gamme de bactéries à Gram négatif et positif **(Cébron et al., 2008)**. L'étape initiale du métabolisme des HAPs se produit généralement par l'incorporation d'oxygène moléculaire dans le noyau aromatique par un système enzymatique multicomposant « les arène-dioxygénases » (ring- hydroxylating dioxygenases ou RHD), générant des cis-dihydrodiols **(Cébron et al., 2008)**.

Ce complexe enzymatique est composé d'une ferrédoxine réductase, d'une ferrédoxine et de la dioxygénase proprement dite. La composante dioxygénase (appelée aussi ISP pour iron sulfur protein) est souvent un hétérohexamère constitué de trois sous-unités α et de trois sous-unités β . Chaque sous-unité α comporte un centre [2Fe-2S] de type Rieske, ainsi qu'un atome de fer mononucléaire au site catalytique. Peu d'informations sont disponibles sur le rôle de la sous-unité β . L'hydroxylation du substrat est rendu possible grâce à l'activation de l'oxygène par une réduction à deux électrons : le NADH (ou parfois le NADPH) cède deux électrons à la réductase (RED) qui les transmet un par un à la ferrédoxine (FER). Cette dernière les transporte alors à la dioxygénase (ISP $\alpha\beta$) qui catalyse ainsi la réaction de dihydroxylation **(Haddock et Gibson, 1995)**

5.2 Biodégradation des HAPs par les champignons

Les champignons possèdent, généralement, des vitesses de croissance et de dégradation moins rapides que celles des bactéries. Les voies de dégradation des HAPs chez les champignons non lignolytiques (généralement majoritaires) et les champignons lignolytiques (connus sous le terme de pourriture blanche) sont différentes. Au moins deux mécanismes sont appliqués dans la biodégradation des HAPs par les champignons : l'un fait intervenir le système enzymatique du cytochrome P450 et l'autre utilise les enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine (les laccases et les peroxydases) **(Tortella et al., 2005)**.

Chez les champignons non-lignolytiques, la première étape de biodégradation consiste en une oxydation du HAP par le système enzymatique du cytochrome P450 (incorporation d'un seul

atome d'oxygène par la monooxygénase), conduisant à la formation d'un oxyde d'arène. Celui-ci subit ensuite une réaction d'hydratation catalysée par des époxydes hydrolases, pour former des trans-dihydrodiols. L'oxyde d'arène peut également être transformé en dérivé phénolique par un réarrangement non enzymatique. Ce dérivé phénolique peut ensuite servir de substrat pour des réactions de sulfatation, de méthylation ou de conjugaison avec un glucose, une xylose ou un acide glucuronique (**Cerniglia, 1993**).

Les champignons lignolytiques sont capables de sécréter par voie extracellulaire des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine et de la cellulose : les laccases et les peroxydases. Ces enzymes sont responsables de la capacité des champignons à dégrader des composés toxiques complexes ayant des poids moléculaires élevés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, avec la formation de quinones et d'acides aromatiques (**Colombo et al., 1996**).

5.3 Biodégradation des HAPs par les algues

Les algues photo-autotrophes oxydent les HAPs pour former des intermédiaires hydroxylés (**Labana et al., 2007**). Il existe très peu d'information sur la biodégradation des HAPs par les algues et sur les enzymes impliquées. La capacité de quatre espèces de microalgues *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus platydiscus* et *Chlorella vulgaris* à dégrader le fluoranthène (1 mg/l), le pyrène (1 mg/l) et leur mélange (chacun à 0,5 mg/l), a été montrée (**Lei et al., 2007**). Cependant, ni l'identification de métabolites, ni la mesure des activités enzymatiques, n'a été effectuée dans cette étude. La biotransformation du benzo(a)pyrène par les algues *Chara* (*Chara aspera*), les algues vertes (*Cladophora glomerata* et *Enteromorpha intestinalis*), brunes (*Chorda filum* et *Fucus vesiculosus*) et rouges (*Furcellaria lumbricalis*), a été également étudiée (**Kirso et Irha, 1998**). Il a été montré que leurs systèmes enzymatiques les plus importants impliqués dans la détoxification du benzo(a)pyrène étaient l'o-diphénoloxidase, le cytochrome P450 et une peroxydase (**Kirso et Irha, 1998**). Par ailleurs, il a été montré que *Selenastrum capricornutum* métabolise le benzo(a)pyrène en cis-dihydrodiol par l'intermédiaire de système enzymatique dioxygénase (**Warshawsky et al., 1995**).

6 Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les micro-organismes ont montré que ce processus dépend de

la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique (**Figure 6**) (Atlas, 1981 ; Leahy et Colwell, 1990).

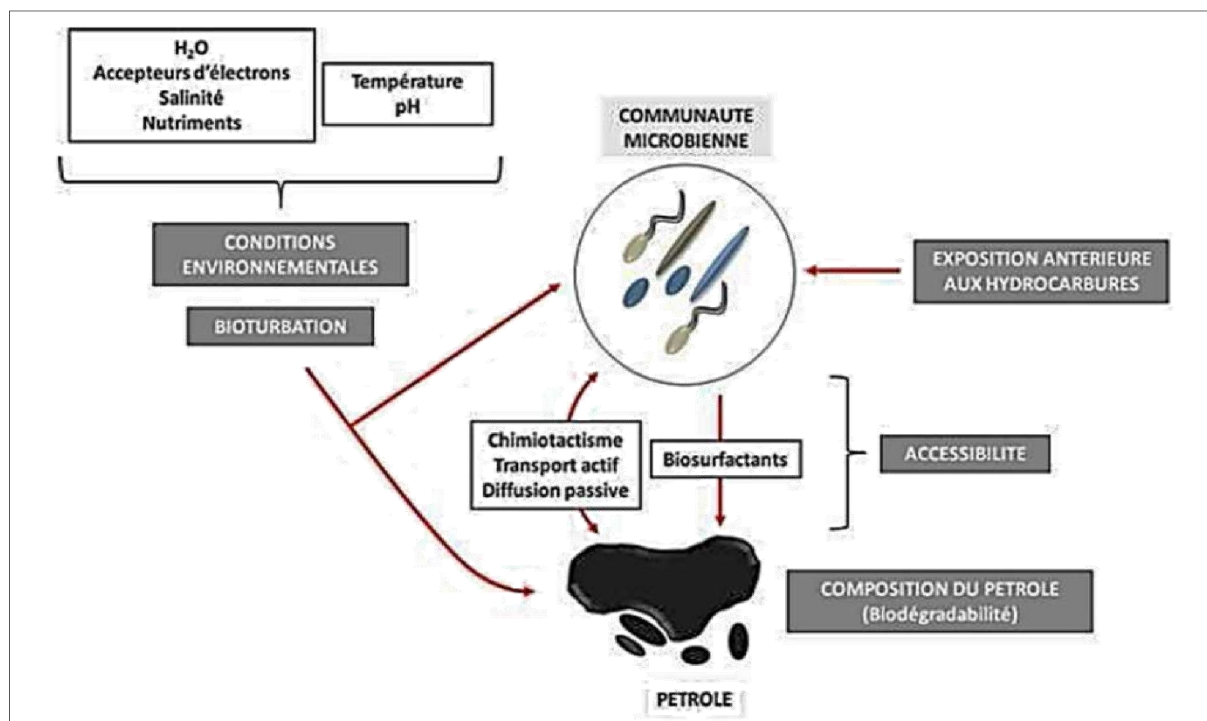


Figure 6: Facteurs affectant l'efficacité de biodégradation (Stauffert, 2011).

7 Surfactants

Un agent de surface ou tensioactif ou surfactant est une substance capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux domaines de polarités différentes : l'un hydrophile et polaire (affinité pour l'eau) et un autre hydrophobe et apolaire (affinité pour les lipides) (Morelli et Szajer, 2000). Ces composés ont la propriété de se concentrer et de s'agréger aux interfaces afin d'abaisser les tensions de surface (interfaces liquide/gas) et les tensions interfaciales (liquide/solide ou liquide/liquide), tout en réduisant les forces répulsives entre deux phases différentes qui à leur tour se mélangent et s'interagissent plus facilement (Desai et Banat, 1997). En effet, aux interfaces eau-matière grasse, par exemple, les surfactants concentrent leur partie lipophile, comprenant généralement des acides gras saturés, insaturés ou hydrocarbonés dans le corps gras. Leur partie hydrophile, constituée par un acide aminé ou un peptide, des anions ou des cations, des mono-di-ou polysaccharides,

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

s'immergent dans l'eau. Ces agrégats de molécules tensioactives ainsi formés s'appellent des micelles (**Desai et Banat, 1997**).

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur tête polaire en quatre grandes familles : les tensioactifs cationiques chargés positivement, les anioniques dont la tête polaire est chargée négativement, les amphotères possédant à la fois une charge négative et une charge positive et les non-ioniques. (**Shekhar et al., 2015**)

Les surfactants sont parfois dénommés selon la fonction qu'ils remplissent : détergents, agents dispersants, agents de solubilisation, agents mouillants, agents émulsifiants et agents moussants (**Santos et al., 2016**).

Les caractéristiques physico-chimiques qui définissent un agent tensioactif sont sa capacité à augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans l'eau pour former des émulsions d'hydrocarbures avec l'eau, et réduire la tension de surface (**Dessai et Banat, 1997**). Plus la concentration de surfactant en solution est élevée, plus la tension de surface est réduite. Toutefois, à une certaine concentration de surfactants, la tension de surface atteint une valeur minimale constante, connue comme la concentration micellaire critique (**CMC**), qui est la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément (**Fig. 7**) (**Santos et al., 2016**).

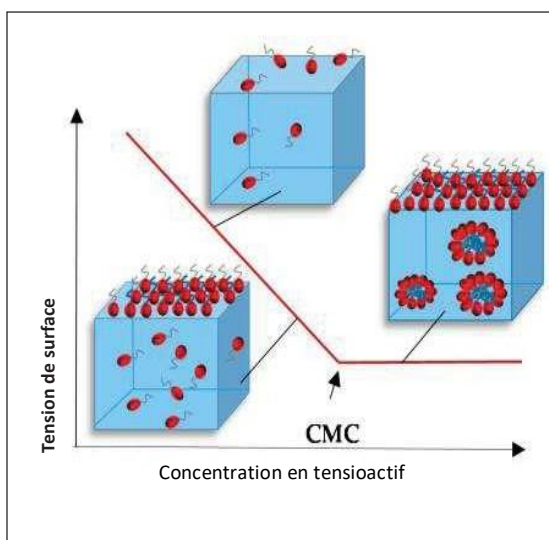


Figure 7: Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique Ou naturel, et détermination de la CMC (**Santos et al., 2016**).

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 18 millions de tonnes par année (**Marketsandarkets, 2016**). Les tensioactifs synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012 (**Marketsandarkets, 2016**). Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont toxiques et non biodégradables (**Santos et al., 2016**). C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Les biotensioactifs possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques (**Sriram et al., 2011**).

8 Biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures (**Marchant et Banat, 2012**). La plupart des biosurfactants sont des agents extracellulaires. Ils sont excrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse (**Salihu et al., 2009**). Par ailleurs, on peut trouver des biosurfactants intracellulaires (**Padmapriya et al., 2013**). Dans d'autres cas, les biosurfactants peuvent rester adhérents à la membrane cellulaire suite à leur synthèse et la cellule, elle-même, peut jouer le rôle de biosurfactant (**Maneerat et Phetrong, 2007 ; Muthusamy et al., 2008**).

8.1 Propriétés

En comparaison avec leurs équivalents chimiques de synthèse, les biosurfactants présentent de nombreux avantages. Ils sont respectueux de l'environnement, moins toxiques et biodégradables. Ils sont doués des activités anti-microbienne, anti-virale, anti-tumorale, anti-adhésive, anti-biofilm, etc... Certains peuvent être actifs à des pH, des températures et des salinités extrêmes (**Santos et al., 2016**).

Les principales caractéristiques des surfactants dérivés des microorganismes sont discutées ci-dessous :

- **Activité de surface et d'interface** : Le tensioactif aide à réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Des biosurfactants sont plus efficaces que les

tensioactifs chimiques en raison de leur faible CMC (**Desai et Banat, 1997**) ;

- **Tolérance à la température, au pH et à la salinité** : La plupart des biotensioactifs sont résistants aux facteurs environnementaux extrêmes tels que la température, la salinité et le pH (**Banat et al., 2000**) ;
- **Biodégradabilité** : Ils sont facilement dégradés par les bactéries et autres organismes microscopiques ; par conséquent, ils ne posent pas beaucoup de menace pour l'environnement (**Mohan et al., 2006**) ;
- **Faible toxicité** : Bien que peu de recherches soient disponibles dans le sujet de la toxicité des biosurfactants, ces biomolécules sont généralement considérées comme des produits non ou faiblement toxiques et sont appropriées pour les utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**)
- **Disponibilité des matières premières** : Les biosurfactants peuvent être produits à partir de déchets renouvelables et des sous-produits utilisés comme sources de carbone. Cette caractéristique rend la production de biosurfactants économique et permet l'utilisation des déchets en les valorisant et en réduisant leur effet polluant en même temps permettant une diminution significative du coût de la production (**Banat et al., 2000**) ;
- **Autres avantages** : Les biosurfactants sont caractérisés par leur biocompatibilité et leur digestibilité, ce qui garantit leur application dans des produits alimentaires et des produits cosmétiques (**Santos et al., 2016**).

8.2 Classification

On distingue sept classes de biosurfactants selon la structure chimique : les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, les phospholipides, les lipides neutres, les tensioactifs polymériques et les surfactants particuliers (**Santos et al., 2016**).

8.2.1 Les glycolipides

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés (**Rosenberg et Ron, 1999**).

8.2.1.1 Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent d'excellentes propriétés tensioactives et qui ont été exhaustivement étudiés depuis leur découverte par Jarvis et Johnson, 1949. Ils sont produits principalement par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (**Abdel-Mawgoud et al., 2010**). Leur composition est dominée par la présence d'une combinaison di-rhamnolipide de L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-hydroxydécanoate (Rha-Rha-C10-C10) et L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- hydroxydécanoate (Rha-Rha-C10), ainsi que leur congénères mono-rhamnolipide (Rha- C10- C10). Des techniques analytiques ont conduit à la découverte d'autres congénères et homologues de nature rhamnolipidique (environ 60) moins abondants, produits à différentes concentrations par cette espèce de *P. aeruginosa* (**Abdel-Mawgoud et al., 2010**).

Les rhamnolipides sont principalement produits par *Pseudomonas aeruginosa*. Toutefois, d'autres microorganismes tels que *P. chlororaphis*, *P. plantarii*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *Burkholderia thailandensis* ont été également décrits pour leur capacité à produire ces biomolécules. Le **tableau 2** ci-dessous, présente les principales souches isolées capable de synthétiser des rhamnolipides, en indiquant la source de carbone utilisée (**Chong et Li, 2017**).

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2: Exemples des souches bactériennes produisant des rhamnolipides, en utilisant différentes sources de carbone (Chong et Li, 2017).

Microorganisme	Source de carbone	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Huile de tournesol (2,5%, m/v)	Muller <i>et al.</i> , 2011.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NRRL B-30761	Glucose (2%, m/v)	Gunther <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HW-6	Hexadécane (1,5%, m/v)	Vasileva-Tonkova <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudomonas indica</i> MTCC 3714	Son de riz + son de riz déshuilé + glucose (4%, m/v)	Abouseoud <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas luteola</i> B17	Mélasses (5%, m/v)	Onbaslil <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas putida</i> B12	Mélasses (5%, m/v)	Onbaslil <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	Glucose (4%, m/v)	Onwosi <i>et al.</i> , 2012
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Mannitol (1%, m/v) + charbon (1%, m/v) Charbon	Singh <i>et al.</i> , 2013
<i>Burkholderia glumae</i>	Huile de canola (2%, m/v)	Costa <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23 ^T	Glycérol (3%, m/v)	Tavares <i>et al.</i> , 2013
<i>Burkholderia plantarii</i> DSM 9509 ^T	Glucose (1%, v/v)	Hörmann <i>et al.</i> , 2010
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 10274	Glycérol (4%, v/v)	Hausler <i>et al.</i> , 1998
<i>Acinetobacter</i> sp. YC-X 2	<i>n</i> -hexadécane (0,186%, m/v)	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>Enterobacter asburiae</i> NRRL B-59189	Citrate de sodium (2%, m/v)	Rooney <i>et al.</i> , 2009
<i>Nocardioides</i> sp. A-8	<i>n</i> -paraffine (2%, v/v)	Vasileva-Tonkova <i>et al.</i> , 2005
<i>Pantoea stewartii</i>	Glycérol (1%, v/v)	Rooney <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Mannitol (2%, m/v)	Nayak <i>et al.</i> , 2009
<i>Renibacterium salmoninarum</i> 27BN	<i>n</i> -hexadécane (2%, m/v)	Christova <i>et al.</i> , 2004
<i>Serratia rubidaea</i> SNAU02	Mannitol (2,931%, m/v)	Nalini <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomyces</i> sp. ISP2-49 ^E	Glucose (0,4%, m/v)	Yan <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetragenococcus koreensis</i> sp. nov.	Glucose (1%, m/v) + acétate de sodium (1%, m/v)	Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>Thermus aquaticus</i> CCM 3488	Huile de tournesol (0,2%, m/v)	Řezanka <i>et al.</i> , 2011
<i>Meiothermus ruber</i> CCM 2842	Huile de tournesol (0,2%, m/v)	Řezanka <i>et al.</i> , 2011

8.2.1.2 Les sophorolipides

Les sophorolipides (SLP) sont des glycolipides produits principalement par certaines levures appartenant au genre *Candida* (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013). Parmi les microorganismes (champignons) qui ont été identifiés comme des producteurs des sophorolipides, on peut citer : *Candida bombicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*, *Candida riodocensis*, *Candida rugosa*,

Candida kuoi, *Candida stellata*, *Candida apicola*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Cyberlindnera samutprakarnensis*, *Torulopsis gropengiesseri*, *Torulopsis petrophilum* et *Wickerhamiella domercqiae* (de Oliveira et al., 2015). Parmi ces espèces, *Candida bombicola* se distingue comme la levure productrice de SLP la plus étudiée, avec un rendement et une productivité les plus élevés (de Oliveira et al., 2015). Ses sophorolipides purifiés sont caractérisés par une diminution de la tension de surface de l'eau ultra-pure (73 mN/m) à 33 mN/m et une diminution de la tension interfaciale n- hexadécane/eau de 40 à 5 mN/m (Abdel-mawgoud et al., 2008 ; Díaz De Rienzo et al., 2015). Ces glycolipides sont constitués d'un dimère d'hydrate de carbone sophorose (2-O-β-D- glucopyranosyl-β-D-glucopyranose), lié à un acide gras hydroxylé à longue chaîne à travers une liaison glycosidique. Les sophorolipides possèdent des applications médicales vu leurs propriétés anti-microbiennes et anti-cancérigènes remarquables (Callaghan et al., 2016). Ils sont également appliqués dans des autres domaines tels que l'agronomie, la cosmétologie, les industries agroalimentaires et l'environnement (de Oliveira et al., 2015).

8.2.1.3 Les lipides mannosylerythrioles (LME) et les lipides à tréhalose

Les lipides mannosylerythrioles (LME), qui sont des glycolipides de levures, sont produits par *Pseudozyma antarctica* après croissance sur des huiles végétales, comme l'huile de soja (Lang, 2002). Les lipides à tréhalose sont produits par des espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus*. Ces biomolécules purifiées sont caractérisées par une diminution de la tension de surface de l'eau ultrapure à 25 mN/m (Vijayakumar et Saravanan, 2015).

8.2.2 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des molécules amphiphiles composés d'un cycle peptidique attaché à une chaîne d'acide gras. La synthèse des lipopeptides est effectuée par une voie indépendante du ribosome, en utilisant de grands complexes multi-enzymatiques appelés synthétases ou « Non Ribosomal Peptides Synthétase (NRPS) ». Ce sont des enzymes remarquables par leur masse élevée (5.106 Da) et organisées en modules. Elles représentent à la fois la matrice et jouent un rôle comparable à celui de l'ARNm dans la voie classique, mais aussi dans la machinerie biosynthétique, une fonction réalisée par les ARNt et les ribosomes au sein de la synthèse protéique classique (Ongena et Jacques, 2008).

Les lipopeptides peuvent être linéaires ou bien cycliques, en se basant à la topologie de la chaîne

peptidique. Les polymyxines, la daptomycine, la surfactine, l'iturine, la fengycine, la lichenysine, la paenibactérine, et la pseudofactine sont des lipopeptides cycliques (**Patel et al., 2015**). La tridecaptine A1, la tridecaptine B1, les gageostatines A et C sont tous des exemples des lipopeptides linéaires (**Patel et al., 2015**).

Ces lipopeptides cycliques sont synthétisés par de nombreuses espèces à Gram positif, telles que *Bacillus*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*. Certaines espèces à Gram négatif, y compris *Pseudomonas* et *Serratia*, sont également connues par leur production des lipopeptides (**Henkel et al., 2017**). Le genre *Bacillus* est connu comme le producteur le plus populaire et le plus efficace des lipopeptides, et en particulier : les surfactines, les iturines et les fengycines, différentes en fonction de leur séquence d'acides aminés (**de França et al., 2015**).

8.2.2.1 Les surfactines

La surfactine est l'un des biotensioactifs le plus intéressant et le plus étudié en raison de son efficacité remarquable avec une capacité de diminuer la tension de surface de l'eau ultra-pure de 72 à 27 mN/m, ainsi que des activités anti-microbienne, anti-virale et anti-tumorale importantes (**de França et al., 2015 ; Reis et al., 2013**). La surfactine est un lipopeptide anionique cyclique composé d'un heptapeptide (L-asparagine, L-leucine, acide glutamique, L-leucine, L-valine et deux D-leucines) lié à un acide gras de longueur variable allant de 12 à 16 atomes de carbone avec une liaison hydroxyle entre le groupement OH du carbone N° 3 de l'acide aminé N° 7 (**de França et al., 2015**). Plusieurs variantes de surfactine ont été décrites telles que la pumilacidine de *Bacillus pumilus* ou la lichénysine de *Bacillus licheniformis* (**Hamley, 2015**).

8.2.2.2 Les lichenysines

Des souches de *Bacillus licheniformis* produisent principalement huit types de lichenysines, de structure proche de celle de la surfactine, et qui sont plus efficaces en tant qu'agent de surface.

En effet, la concentration micellaire critique (CMC) de la lichenysine purifiée est inférieure à celle de la surfactine (**Yakimov et al., 1995**). Ils s'agissent de la lichenysine A, la lichenysine B, la lichenysine C, la lichenysine D, la lichenysine G, [val7] lichenysine G, [Ile] lichenysine G et [Ile2, 4] lichenysine D (**Li et al., 2008**). Structuralement, la partie lipidique est formée d'un acide gras linéaire ou bronché avec une liaison β -hydroxy. La partie protéique est composée de 7 acides aminés : acide glutamique à l'extrémité N-terminale, asparagine, valine, 3 * leucine, et isoleucine à l'extrémité C-terminale (**Cochrane et Vederas, 2016**).

8.2.2.3 Les iturines

La famille des iturines comporte les groupes suivants : les iturines, les mixirines, la subtulene A, la mycosubtiline, la mojavensine, et les bacillomycines. Structuralement, l'iturine A est un lipopeptide cyclique à 7 acides aminés avec un seul acide aminé lié par une liaison β - aminoacide à l'acide gras adjacent (Cochrane et Vederas, 2016). Les iturines sont connues comme des agents de lutte biologique très puissants contre les agents phytopathogènes tels que *Xanthomonas campestris* pv. *Cucurbitae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, etc... (Patel et al., 2015).

8.2.2.4 Les fengycines

Structuralement, ce groupe est caractérisé par une liaison ester entre l'extrémité C- terminale du résidu Ile et le groupe phénolique du D-tyrosine, l'acide aminé N°3 dans la chaîne peptidique. Comme la majorité des lipopeptides, les fengycines contiennent des chaînes d'acide gras variant de C14 à C21, liées à l'extrémité N-terminale avec une liaison β - hydroxyle de l'acide gras (Cochrane et Vederas, 2016). Le groupe de la fengycine comporte deux familles, les fengycines et les plipastatines. La différence entre ces molécules est au niveau de la position de la D-tyr qui se trouve en position 3 dans le cas des fengycines et en position 9 dans le cas des molécules de plipastatine (Hussein, 2011). Les fengycines sont moins hémolytiques que les iturines et les surfactines mais elles conservent une forte activité antifongique, en particulier contre les champignons filamenteux (Hofemeister et al., 2004).

8.2.3 Les Phospholipides

Les phospholipides sont des lipides amphiphiles constituées d'une tête polaire et deux queues hydrophiles. La plupart des phospholipides sont des phosphoglycérides, dont la tête s'organise autour d'un résidu glycérol-3-phosphate estérifié par une molécule polaire, et les deux queues sont les chaînes aliphatiques de deux acides gras (McClements et Gumus, 2016). Bien qu'ils soient présents dans tous les microorganismes dans la membrane cellulaire, il y a peu d'exemples de production extracellulaire des phospholipides. Des phospholipides extracellulaires, produits par la souche KJ564272 de *Staphylococcus hrominis*, ont révélé des activités physiologiques de stimulation immunologique d'une espèce de poisson, *Oreochromis mossambicus* (Rajeswari et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'application des phospholipides s'avère très intéressante en aquaculture pour faire face aux maladies et par conséquent pour augmenter la production (Rajeswari et al., 2016).

8.2.4 Les acides gras

Les acides gras considérés comme des agents tensioactifs résultent de l'oxydation microbienne des alcanes (**Rehm et Reiff, 1981**). Ces biomolécules sont douées des activités de surface et des activités biologiques notables (**McClements et Gumus, 2016**). A titre d'exemple, l'acide spiculisporique qui est produit par *Pebicillium spiculisporum* avec un rendement de production important (110 g/l) et contribue à l'élimination de certains métaux lourds (**Mulligan, 2005**). Les acides corynomycoliques, des acides gras complexes contenant des groupes hydroxyle et des branches d'alkyle, sont également décrits comme des tensioactifs puissants (**MacDonald et al., 1981**).

8.2.5 Les lipides neutres

Plusieurs microorganismes sont capables de produire des lipides neutres doués des propriétés tensioactives (**Santos et al., 2016**). Des bactéries marines hydrocarbonoclastes, par exemple, sont capables de stocker des lipides neutres (Exemple : des triacyglycéroles, diacyglycéroles, des cérides et des polyhydroxycanoates) qui peuvent être utilisés comme des sources d'énergie en cas de l'appauvrissement en nutriments du milieu (**Nakano et al., 2012**). Une souche *Marinobacter sp.* PAD-2 est montrée capable de produire un céride, sur l'hexadécane comme substrat, réduisant la tension de surface de l'eau à 33 mN/m (**Nakano et al., 2012**). Les lipides neutres de la souche ATCC 4277 de *Nocardia erythropolis* (**MacDonald et al., 1981**) ont pu réduire la tension de surface à 37 mN/m en montrant des activités émulsifiantes importantes.

8.2.6 Les biosurfactants polymériques

Ce sont généralement des polymères d'hétéro-saccharides contenant des protéines. Le plus connu est l'émulsane. Les sous-classes les plus connues des biosurfactants polymériques sont présentées ci-dessous :

- **Emulsane:** C'est un polysaccharide sur lequel sont greffés des acides gras. Une souche RAG-1T de *Acinetobacter venetianus* a montré ses potentialités de produire un emulsane (masse moléculaire > 34,5 KDa) possédant des applications en biorémediation (émulifications des hydrocarbures) (**Fondi et al., 2012**).
- **Alasane:** Il s'agit d'un complexe anionique d'hétéro-polysaccharide et protéine. Un isolat bactérien KA53 d'*Acinetobacter radioresistens* a été décrit pour sa capacité à synthétiser l'alsane, un complexe de polysaccharide et de protéine de poids moléculaire élevé (**Salehizadeh et**

Mohammadizad, 2009).

- **Liposane:** C'est un complexe de polysaccharide et lipide. Une étude par (**Cirigliano et Carman, 1984**), a montré la capacité de la souche *Candida lipolytica* ATCC 8662 à produire le liposane, un émulsifiant extracellulaire hydrosoluble composé de 83% de glucides et de 17% de protéines.
- **Biodispersane:** C'est un polysaccharide extracellulaire anionique. Un tensioactif de type biodispersane produit par *Acinetobacter calcoaceticus* A2, a montré son efficacité à disperser le calcaire (**Rosenberg et al., 1989**).
- **Glycolipo-protéine :** Il s'agit d'un complexe de lipides, protéines et polysaccharides. Une recherche faite par (**Camacho-Chab et al. 2013**), a démontré que la souche MC3B-10 de *Microbacterium sp.* Synthétise une glycolipoprotéine non-ionique respectueuse de l'environnement capable d'émulsionner des hydrocarbures aromatiques et des huiles. La nature chimique et la stabilité de ce bioémulsifiant suggèrent son application potentielle dans la biorestauration des environnements marins et dans les cosmétiques.

8.2.7 Surfactants particuliers

On trouve deux types de biosurfactants particuliers (**Shekhar et al., 2015**) :

- Des vésicules extracellulaires : Certains microorganismes secrètent des métabolites extracellulaires vésiculaires, appelés des biosurfactants particuliers, qui contribuent dans l'adsorption des n-alcanes par la membrane cellulaire (**Mnif et Ghribi, 2015**). A titre d'exemple, la souche HO1-N de *Acinetobacter sp.* Est capable de produire des vésicules, doués d'une activité de surface et composés par des protéines, des phospholipides, et des lipopolysaccharides, qui sont impliqués dans l'adhérence des cellules aux hydrocarbures. Ces molécules sont souvent connues comme des agents bio-émulifiants (**Mnif et Ghribi, 2015**).
- Des cellules bactériennes entières peuvent jouer parfois le rôle d'un surfactant.

8.3 Production de biosurfactants

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, (**Makkar et Cameotra 2011**), indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts,

mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...).

8.3.1 Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible aux cellules **(Mata Sandoval et al., 2000)**.

Les microorganismes producteurs de biosurfactants ont été isolés à partir d'une grande diversité de milieux, notamment le sol, l'eau de mer, les sédiments marins, les champs de pétrole **(Yakimov et al., 1995)** et même des environnements extrêmes **(Cameotra et Makkar, 1998)**.

Nombreux microorganismes extrêmophiles se retrouvent dans plusieurs milieux marins extrêmes, tels que les événements hydrothermaux, des sources chaudes, des lacs salés et les planchers en haute mer. La capacité de ces microorganismes pour tolérer des températures extrêmes, la salinité et la pression, démontre leur grand potentiel pour des procédés biotechnologique

(Dalmaso et al., 2015).

Les genres bactériens connus pour leur production des biosurfactants comprennent : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, et *Halomonas* **(Bodour et al., 2003 ; Mnif et al., 2011)**. Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont les bactéries les plus étudiées **(Banat et al., 2000)**.

8.3.2 Applications

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les surfactants biologiques sont largement utilisés dans de nombreux domaines d'applications tels que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique et la cosmétique. Ces dernières années, les

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

biotensioactifs ont été utilisés comme des solutions de rechange pour les tensioactifs chimiques et devraient trouver de nombreuses applications environnementales et industrielles, tels que la biorestauration des polluants, la récupération améliorée du pétrole, la lubrification, la détergence, la solubilisation et la dispersion (**Singh et al., 2007**). L'application de biosurfactants a été également augmentée dans les produits cosmétiques (les crèmes antirides, crèmes hydratantes, et les cosmétiques de nettoyages) (**Kanlayavattanakul et Lourith, 2010**) et les produits de santé et de soins (la lutte contre de nombreuses maladies, agents thérapeutiques conduisant à une réduction d'un grand nombre d'infections sans l'utilisation de produits chimiques de synthèse et de médicaments) (**Tableau 3**) (**Rodrigues et al., 2006**).

Tableau 3: Différents domaines d'application des biosurfactants (**Banat et al., 2000 ; Santos et al., 2016**).

Domaine	Application
Environnement	Bioremédiation : Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures ; Assainissement et rinçage du sol ; Solubilisation des huiles.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole (MEOR).
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds : Elimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments.
Aliments	Solubilisation des huiles aromatisées ; Amélioration de la texture des produits à base de matières grasses.
Médicaments	Agents antiadhésifs ; antifongiques ; antibactériens ; antiviraux ; anticancéreux, cicatrisants.
Agriculture	Biopesticides ; fongicides ; antiparasites.
Cosmétiques	Nettoyant ; Préparation des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles, les crèmes antirides
Chimie	Détergent domestique et industriel ; Peinture : dispersant, émulsifiant. Textile : agent de mouillage.

8.3.2.1 Environnement

Dans le domaine environnemental, les biosurfactants sont capables de solubiliser les composés xénobiotiques tels que les hydrocarbures, améliorant ainsi leur biodégradabilité et de chélater les métaux lourds (exp. le zinc, le plomb, le cadmium et le cuivre) permettant ainsi leur élimination des sites contaminés (**Mulligan, 2005**). Les principales utilisations sont la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, la dispersion des nappes de pétrole et une meilleure récupération du pétrole (**Gassara et al., 2017**).

Bien qu'utilisés dans de nombreux domaines, les biotensioactifs voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sites contaminés (**Ron et Rosenberg, 2014**). La remédiation assistée par les biosurfactants présente de nombreux avantages. En effet, le biosurfactant augmente les surfaces des composés hydrocarbonés peu solubles en diminuant les tensions interfaciales et superficielles, ce qui entraîne une biodisponibilité accrue et une mobilité des polluants (**Mahanty et al., 2006**). Par conséquent, en introduisant des surfactants d'origine biologique dans un site contaminé, une biodégradation améliorée peut être obtenue grâce à la solubilisation, à la mobilisation, ou à l'émulsification d'hydrocarbures (**Ron et Rosenberg, 2014**). En général, grâce aux procédés de récupération du pétrole, les puits pétroliers produisent un tiers à la moitié du pétrole initialement présent dans le gisement. Les résidus d'huile contenus dans les petits pores des réservoirs pétroliers représentent 50 à 65% de la quantité exploitée, qui sont piégés par des forces de capillarité, ainsi que par la présence d'une tension interfaciale entre l'hydrocarbure et la phase aqueuse (**Santos et al., 2016**). Des réductions de la tension interfaciale sont nécessaires pour la mobilisation de ces hydrocarbures emprisonnés en utilisant des agents tensioactifs (**Austad et Taugbøl, 1995**). Dans la récupération du pétrole, l'utilisation de la chaleur, des agents tensioactifs, des processus microbiens et l'injection de gaz conduisent à la récupération d'une partie importante de l'huile retenue (**Santos et al., 2016**).

Les agents tensioactifs biologiques ont été utilisés pour réduire la tension interfaciale entre l'huile/eau et huile/roche, conduisant à une réduction des forces capillaires qui empêchent l'huile de se déplacer à travers les pores des roches. Les biosurfactants forment également une émulsion à l'interface huile-eau, stabilisant l'huile désorbée dans l'eau, ce qui permet son élimination par l'injection d'eau dans le puits pétrolier (**Pacwa-Plociniczak et al., 2011**).

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

Matériel et méthode

1 Sites d'étude et échantillonnage

D'après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). Deux sites qui ont été fréquemment exposés à des déversements d'hydrocarbures dans la région delta du Niger au Nigeria ont été sélectionnés pour cette étude. Ces sites étudiés comprenaient Yorla-10 (latitude 4°39'45.340 N et longitude sept °26'11.230 E) et Effurun (latitude 5°34'49.2600 N, longitude 5°46'56.1100 E)

Des échantillons de sol (100 g chacun) ont été prélevés à partir de 30 points d'échantillonnage sur chaque site à une profondeur de 5 à 20 cm des surfaces du sol. Les échantillons ont été conservés dans des tubes cryovial stériles et amenés au laboratoire pour l'isolation des champignons.

1.1 Isolement des champignons

D'après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). Des souches fongiques ont été isolées de chaque échantillon de sol dans des boîtes de Pétri, sur de la gélose stérile au dextrose de pomme de terre (PDA) additionné d'ampicilline (100 mg/L) pour supprimer les interférences bactériennes. Les échantillons du sol ont été soumis à une dilution en série à dix puissance moins six à l'aide d'eau stérile, inoculés sur du PDA préparé, puis incubé à 30 °C, dans l'obscurité, pendant trois jours pour permettre la croissance fongique. Les cultures pures étaient fabriquées à partir de plaques PDA primaires en sélectionnant soigneusement et en inoculant chaque colonie dans une nouvelle plaque.

Les souches isolées ont été regroupées en fonction de la morphologie de la plaque, tandis que le nombre d'échantillons à partir desquels une souche particulière a été isolée, a été utilisée pour calculer son pourcentage d'incidence dans ce site.

La souche fongique ayant l'incidence la plus élevée a été considérée comme la souche dominante et a été sélectionnés dans chaque site pour des études ultérieures.

D'autre part (Nada K. Alharbi et al., 2022). Ont cultivé *Aspergillus terreus* KC462061 dans un laboratoire à l'aide d'un milieu gélosé au dextrose de pomme de terre (PDA) (Difco, Visalia, Californie, États-Unis) à 22 °C pendant sept jours, et les plaques ont été entreposées à une température de 2 à 8 °C. Elles ont été sous-cultivées tous les 15 jours et la viabilité a été testée.

Après sept jours d'incubation. Ils ont coupé des bouchons de mycélium de la plaque de PDA et les ont inoculés dans un erlenmeyer contenant 100 ml (Wertheim, Bade-Wurtemberg, Allemagne) de bouillon de dextrose de pomme de terre (**PDB**). Les flacons de culture ont été incubés pendant sept jours à 28 C dans un incubateur à agitateur orbital à 180 tours par minute. La préculture a été complètement homogénéisée à l'aide d'un homogénéisateur en verre et centrifugée à 5 000 tr/min pendant 5 min.

La biomasse fongique a été lavée à plusieurs reprises avec de l'eau double-distillée et inoculée dans du MSM moyen sans pétrole brut (groupe 1) et l'autre groupe a été incorporé avec 1 % de pétrole brut (groupe 2). Pour l'analyse enzymatique, les deux groupes ont été incubés à 28 °C pendant 10 jours. Les échantillons ont été mesurés les 3e, 7e et 10e jours de traitement. Un ml de culture a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 5 min, et le surnageant de culture a été utilisé comme échantillon brut pour déterminer l'activité enzymatique. Pour analyser les impacts des différents inducteurs sur la production de laccases, on a utilisé l'ABTS (2,2 -azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), l'acide férulique et le gaïacol et deux ions, Zn²⁺ et Cu²⁺ (sulfate de zinc et sulfate de cuivre). Les composés aromatiques et les ions ont été ajoutés individuellement et combinés à une concentration de 0,5 mM, ainsi que les MSM complétés par la combinaison de divers inducteurs et d'ions aromatiques. Une fiole de l'isolat fongique sans inducteur a été utilisée comme témoin. MSM frais comprenait KH₂PO₄ (0,4 g/L), K₂HPO₄,3H₂O (1,0 g/L), MgSO₄,7H₂O (0,025 g/L), NaNO₃ (0,2 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,1 g/L) et NaCl (0,5 g/L), avec un pH de 7,0.

1.2 Activités enzymatiques des champignons dominants sélectionnés

D'après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). Les enzymes analysées comprenaient le peroxyde de manganèse (**MnP**) (peroxyde de lignine) (**Lip**) et le laccase (**Lac**), qui ont été sélectionnés en raison de leurs activités à potentiel redox largement reconnues sur un large éventail de composés d'hydrocarbures. Ces dernières enzymes appartiennent au système oxydatif ligninolytique naturel qui a été signalé dans de nombreux champignons associés à la dégradation de plusieurs polluants. L'analyse enzymatique colorimétrique a été effectuée en faisant pousser les champignons sur des plaques de Petri contenant 15 mL de gélose à l'extrait de malt stérile (**MEA**). La MEA a été préparée en trois groupes ; un groupe sans substrat chimique, un autre groupe a été complété avec 0,05 % de gaïacol et 1 mM CuSO₄ comme substrats enzymatiques

tandis que le dernier groupe a été complété avec 0,5 mM 2,2-Azino-bis-3-benzothiazoline-6-sulfonic acide (ABTS) et 1 mM CuSO₄.

D'autre part (Nada K. Alharbi et al., 2022). Ont analysé l'enzyme laccase en utilisant le surnageant de culture pour déterminer son activité ils sont mélangés environ 0,1 mL d'échantillon avec 2,0 mL de 10 mM (2,2-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) préparé dans un tampon d'acétate de sodium (0,1 M ; pH 4,5). Elle a été incubée pendant 30 minutes et l'oxydation de l'ABTS a été déterminée en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 415 nm par rapport au témoin réactif.

1.3 Teste de biodégradation

D'après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). La capacité de certaines souches fongiques à dégrader l'huile moteur usagée a été étudiée dans un bouillon de BH. 20 mL de ce milieu a été complété par l'huile moteur usagée à une concentration de 1 % (v/v) dans des fioles coniques et inoculés avec chaque champignon, tandis que les flacons sans champignon inoculé ont été traités comme témoins.

Des fragment Mycelial (5 mm de diamètre) ont été prélevés dans des cultures fongiques pures de 4 jours et transférés dans les 20 mL Mélange BH-Hydrocarboné conservé dans un incubateur à 80 rpm et 30 C.

Le témoin a été analysé pour teneur en hydrocarbures à l'aide de CG-SM au moment (T₀) et comparée au milieu traité avec chaque champignon au 15e jour de l'incubation. Pour déterminer la quantité d'hydrocarbures dégradés, 1 mL de solution aliquote a été prélevé de chaque traitement et analysé pour la teneur en hydrocarbures au moment de l'inoculum et après 15 jours d'incubation. La solution aliquote de 1 mL a été dissoute dans 1 mL de dichlorométhane (CH₂Cl₂) et vortexée vigoureusement pendant 1 min, puis laissé sur la grille pendant 5 min pour laisser la couche organique séparé. La couche organique a été soigneusement pipetté dans un autre tube, centrifugé pendant 3 min à 3000 rpm puis analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (Thermos Système GC/MS DSQII scientifique à quadripôle unique, Austin, Texas, États-Unis).

Les conditions GC/MS étaient en mode split avec injection à 250 C, la température du four était de 70 C pour 1 min, 70-120 C à 5 C/min, 120-260 C à 8 C/min, et maintenu à 260 C pendant 5

min. A Restek Rxi-5Sil MS 30 m 0,25 mm 0,25 μm épaisseur du film colonne capillaire a été utilisé avec de l'hélium comme le gaz porteur à un débit constant de 1,0 mL/min. La température de la ligne de transfert était de 270 C et la source d'ions, température était de 250 C. Le mode d'ionisation électronique a été utilisé avec 70 eV, et les ions ont été enregistrés en mode d'acquisition complète dans une plage de masse de m/z 35–800 amu. Acquisition chromatographique, détection de masse.

Les pics spectraux et le traitement des formes d'onde ont été réalisés à l'aide de Xcalibur MS Software Version 2.1 (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, États-Unis). L'affectation des structures chimiques à la chromatographie les pics ont été établis en fonction de la comparaison avec les bases de données de l'Institut national de normalisation GC/MS Mass Spectral Library (NIST 08) et Wiley Registry of Mass Spectral Data (8e édition). Le pourcentage de contenu de chaque composante a été calculé directement à partir des zones de pointe dans le chromatogramme GC/MS.

D'autre part (Nada K. Alharbi et al., 2022). Ont réalisé Le potentiel de biodégradation du pétrole brut dans une fiole d'erenmeyer (250 mL) contenant du pétrole brut (1 %) comme seule source de carbone et d'énergie. Le milieu de culture a été stérilisé et du pétrole brut a été inoculé. Au total, quatre bouchons d'agar (5 mm de diamètre) d'*A. terreus* KC462061 ont été prélevés sur la plaque de PDA. Elle a été transférée aseptiquement dans le milieu de culture contenant l'erenmeyer. Toutes les fioles d'erenmeyer ont été incubées pendant deux semaines à 30 C.

(Nada K. Alharbi et al., 2022). Ont aussi fait d'autre testes :

1.4 Les Amorces spécifiques des gènes laccase :

Les amorces qPCR (PCR quantitative) pour les huit gènes Lcc (laccase) (Lcc1-8) et le gène GAPDH (glycéréhyde-3-phosphate déshydrogénase) comme gène d'entretien ménager ont été conçues par GeneLink (Orlando, FL, USA). Les amorces qPCR sélectionnées étaient spécifiques et ont été évaluées à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Le potentiel d'amplification des amorces sélectionnées a été évalué à l'aide de l'ADNc synthétisé de chaque isoforme testé à différentes dilutions (1 :10). Les efficacités d'amplification calculées étaient de 93,5 à 99,4 % (R2 0,98) et la taille de l'amplicon variait entre 102 et 199 bps pour les gènes codant le Lcc.

1.5 La Transcription de gènes laccase à l'aide de qRT-PCR :

Les profils de transcription des gènes Lcc ont été évalués dans le cadre de la biodégradation du pétrole brut en présence de cinq inducteurs afin de comprendre la nature de la relation entre les cinq inducteurs qui a une incidence sur les niveaux de transcription de différents Lcc à différents moments pendant la période de biodégradation du pétrole brut. qPCR expérience a été réalisée en mélangeant 5 μ L SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal, 1 μ L amorces (avant et arrière), modèle cDNA (2 μ L) et Millipore eau double distillée. qRT-PCR a été réalisé comme décrit précédemment. La méthode de quantification relative de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a été utilisée pour calculer les quantités relatives des gènes laccase. Chaque réaction a été effectuée en triple.

Résultats

1 Résultat d'isolement des champignons

D'après (Michael Dare Asemoloye et *al.*, 2020). L'analyse chimiques des deux sols contaminés au pétrole brut utilisés pour l'isolement fongique dans cette étude confirme les concentrations élevées d'hydrocarbures et de métaux toxiques présentées dans les tableaux 4 et 5.

Quatorze souches fongiques ont été isolées dans des sols pollués et soumises à un test d'incidence en pourcentage pour déterminer les souches dominantes (**tableau 4**). Dans le premier site pollué (Yorla-10), la souche fongique B est apparue dans 20 échantillons sur 30, étant ainsi le champignon dominant avec une incidence de 66,67 %. Le deuxième pétrole brut site pollué (Effurun) d'autre part avait la souche C comme champignon dominant, apparaissant dans 17 sur 30 échantillons prélevés, avec une incidence de 56,67 %.

Tableau 4: Incidence et souches fongiques dominantes isolées de sites pollués par le pétrole brut.

Strain Code	B-Yorla10		C-Effurun	
	Incidence (N = 30)	% Incidence	Incidence (N = 30)	% Incidence
A	9	30	1	3.33
B	20	66.67	13	43.33
C	13	43.33	17	56.67
D	0	0.00	0	0.00
E	5	16.67	11	36.67
F	3	10.00	2	6.67
G	0	0.00	3	13.33
H	11	36.67	0	0.00
I	1	3.33	1	3.33
J	5	16.66	11	36.67
K	2	6.67	3	10.00
N1	9	30.00	0	0.00

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

N2	6	20.00	5	16.67
N3	11	36.67	0	0.00

D’après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). La réponse et la tolérance de ces champignons dominants au mélange d’hydrocarbures complexes (huile de moteur usagé) est présenté dans le **tableau 5**. Il a été observé que les deux champignons sélectionnés ont survécu au mélange élevé d’hydrocarbure 20 % de concentration dans le milieu de croissance. Leur capacité à tolérer la présence d’hydrocarbures a été calculé en fonction de la réponse à l’inhibition de la dose (DIR). La DIR de la souche B était de 75,52, 59,96, 51,24 et, 45,85 DIR sur milieu complété avec 5, 10, 15, et 20% d’hydrocarbures respectivement, tandis que la souche C avait un DIR de 53,97, 46,69, 39,07 et 39,40 respectivement. Les champignons étudiés ont été identifiés d’après méthodes morphologiques et moléculaires, comme *Mucor irregularis* (souche B-Yorla10) et *Aspergillus oryzae* (C-Effurun).

Tableau 5: Tolérance aux hydrocarbures et inhibition de la dose par deux souches fongiques sélectionnées provenant de sites pollués par du pétrole brut.

Fungal Strain	Oil Concentration	Growth Rate (cm/day)	DIR (%)
B	0%	4.82	100.00
B	5%	3.64	75.52
B	10%	2.89	59.96
B	15%	2.47	51.24
B	20%	2.21	45.85
C	0%	3.02	100.00
C	5%	1.63	53.97
C	10%	1.41	46.69
C	15%	1.18	39.07
C	20%	1.19	39.40

1.1 Résultat de l’activité enzymatique

D’après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020), il a été démontré que les deux souches fongiques isolées, *Mucor irregularis* (B-Yorla10) et *Aspergillus oryzae* (C-Effurun) possèdent la capacité de produire des enzymes ligninolytiques (LiP, MnP et Lac). Le test sur plaque a montré des sécrétions enzymatiques par les deux souches. En effet, le mycélium analysé a formé une

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

couleur brun rougeâtre significative sur les plaques complétées par différents substrats par rapport au témoin (**Figure 8**). En général, les deux champignons ont montré des activités enzymatiques en milieu non enrichi d'huile (témoin) mais en faible quantité (**figures 9 et 10**). Ils ont également observé que les souches étudiées produisaient des enzymes en réponse aux concentrations d'huile dans leur milieu de croissance et, de toute façon, elles présentaient toutes deux une production plus élevée de Lac que de LiP et MnP, comme le montrent les figures 9 et 10. *M. irregularis* (B-Yorla10) au 13^e jour de l'incubation, les activités de Lac les plus élevées étaient de 15,00, 13,90, 11,07 U/mL dans le milieu BH, complétées respectivement par 1,5%, 1,0% et 0,5% d'huile moteur (**figure 9**). *A. oryzae* (C-Effurun) a affiché les activités les plus élevées de 36,0 et 27,37 U/mL au jour 9 et au jour 6 respectivement, tandis que son activité la moins élevée de 2,11 U/mL a été enregistrée au jour 3. La souche C-Effurun a montré les activités MnP les plus élevées de 12,40 et 11,38 U/mL dans le milieu, complétées par 1,5 et 1,0 % d'huile respectivement (**figure 10**). Les deux champignons ont montré une certaine activité peroxydase ; la souche B-Yorla10 a montré la plus forte expression de 2,70 U/mL de LiP en milieu additionné d'huile à 0,5 % et 1 % respectivement au jour 3, alors que la souche C-Effurun a montré la plus forte expression de 3,73 U/mL de LiP dans un milieu complété par 1 % d'huile également au jour 3 (**figures 9 et 10**). Généralement, les deux souches ont grandi dans le milieu BH sans supplément d'huile (témoin), mais ils ont montré une meilleure activité enzymatique dans les milieux complétés par l'huile comme la seule source de carbone.

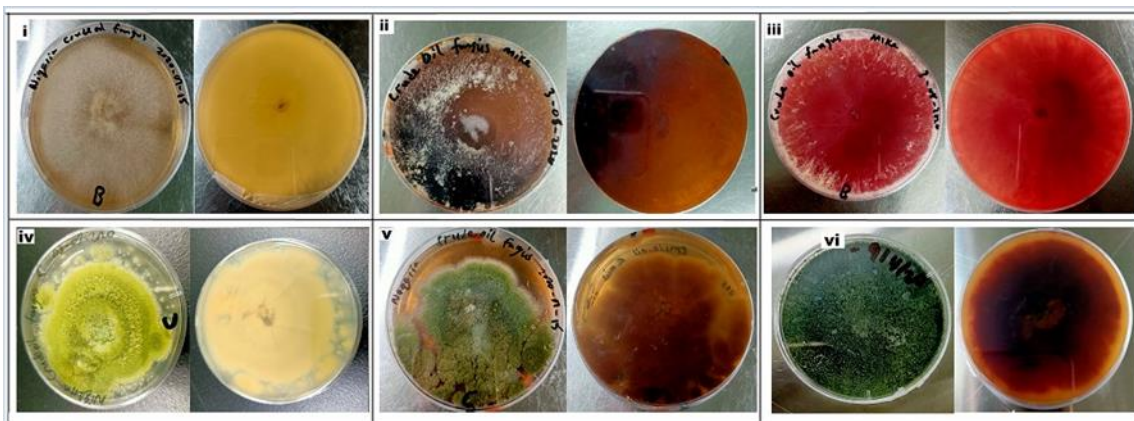


Figure 8: Essai sur plaque pour le criblage colorimétrique des enzymes ligninolytiques Produites par les champignons isolés.

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

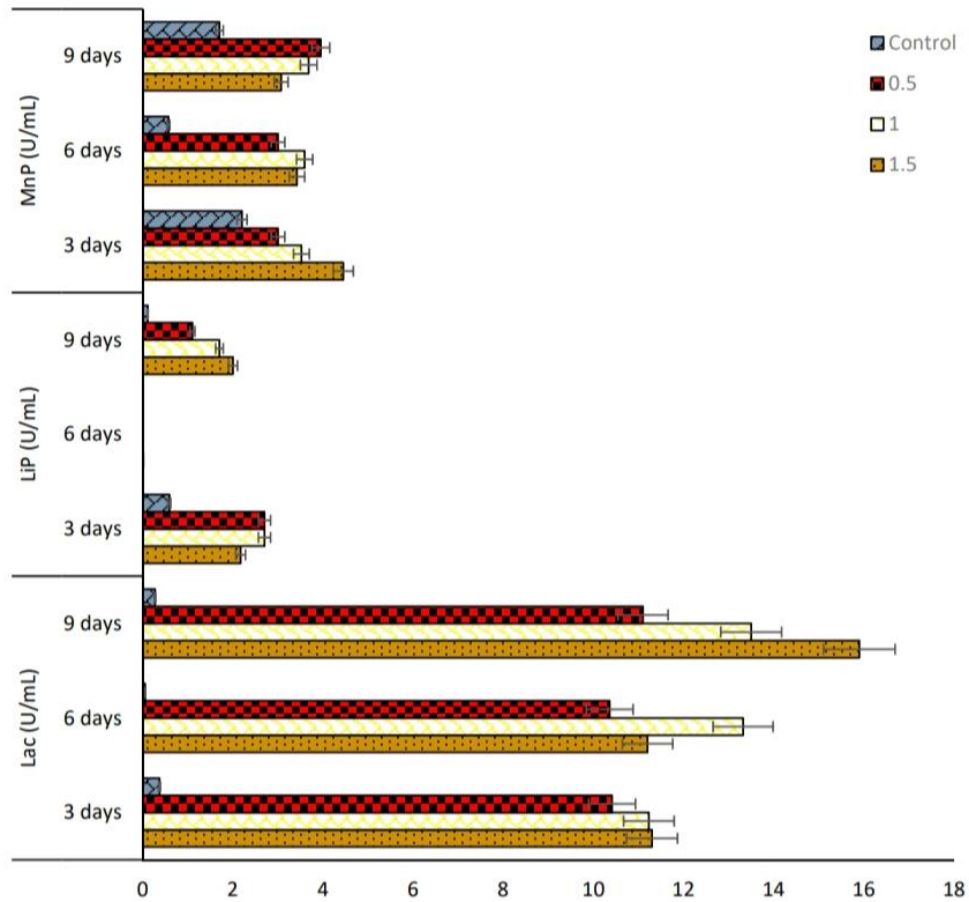


Figure 9: Activités d'enzymes extracellulaires produites par *Mucor irregularis* B-Yorla10 isolées d'un site pollué par le pétrole brut au Nigeria.

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

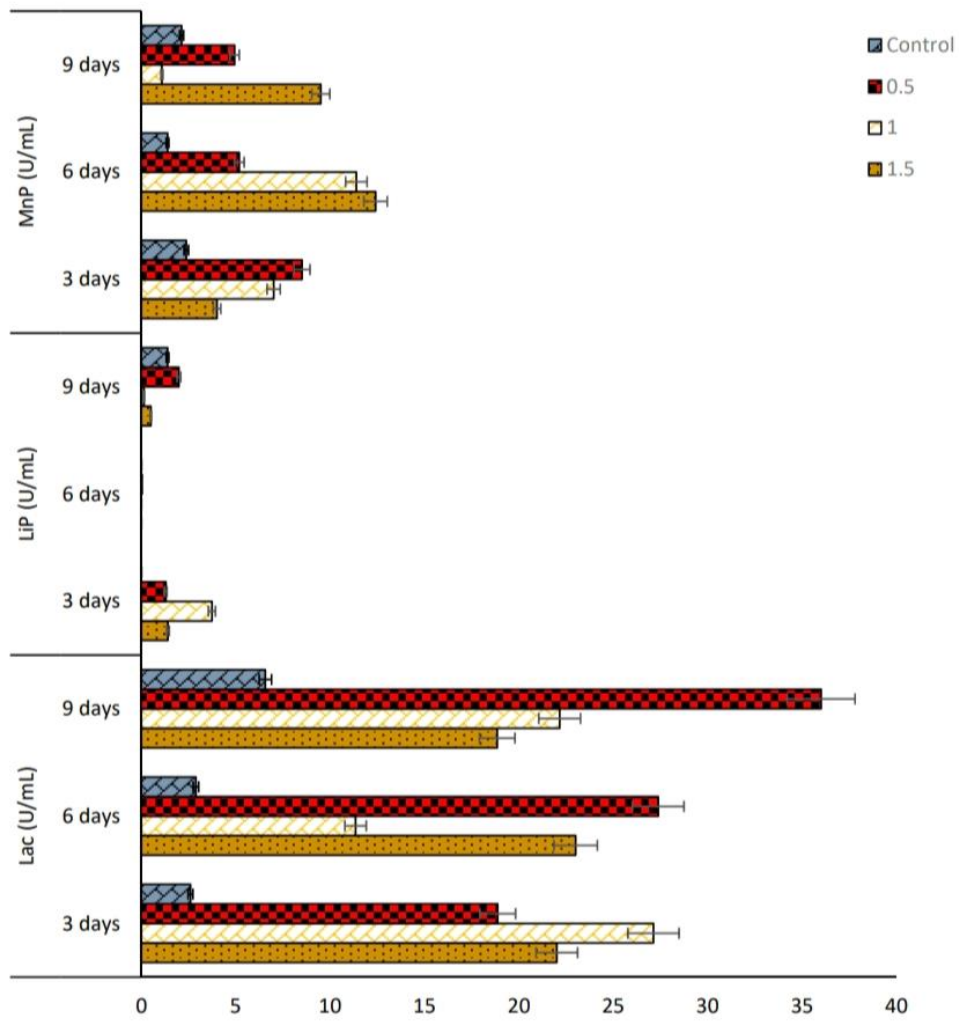


Figure 10: Activités d'enzymes extracellulaires produites par *Aspergillus oryzae* (C-Effurun) isolées d'un site pollué par le pétrole brut au Nigeria.

D'autre part (Nada K. Alharbi et al., 2022) ont démontré :

1.2 Les Effets des cinq inducteurs sur la production de l'enzyme laccase :

Il a été démontré que l'isolat fongique *A. terreus* KC462061 avait la capacité de produire du Lcc avec ou sans pétrole brut soutenu par cinq inducteurs (**Figure 11**). En général, l'*A. terreus* KC462061 a montré une activité enzymatique Lcc dans un milieu sans pétrole brut (témoin), mais en quantité moindre au cours des 3e, 7e et 10e jours. Bien que les résultats de l'analyse en même temps aient montré que l'activité enzymatique de Lcc avec du pétrole brut avait une quantité plus élevée, qui a augmenté progressivement au cours de l'expérience, les réponses d'induction d'activité enzymatique les plus élevées sont apparues après 10 jours d'incubation avec du pétrole brut. Les profils chronologiques de l'activité du Lcc dans le milieu de culture contenant du pétrole brut étaient très indiqués en raison des cinq inducteurs, individuels ou combinés, ayant un effet très positif sur l'activité du Lcc. Dans le cas du pétrole brut, l'ajout d'ions cuivre induit une activité Lcc jusqu'à 15 fois (98,1 U/mL), tandis que l'effet synergique du Cu-ABTS a provoqué une augmentation des niveaux de laccase jusqu'à 22 fois (130,4 U/mL) par rapport à la condition de référence au 10e jour (**Figure 11**).

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

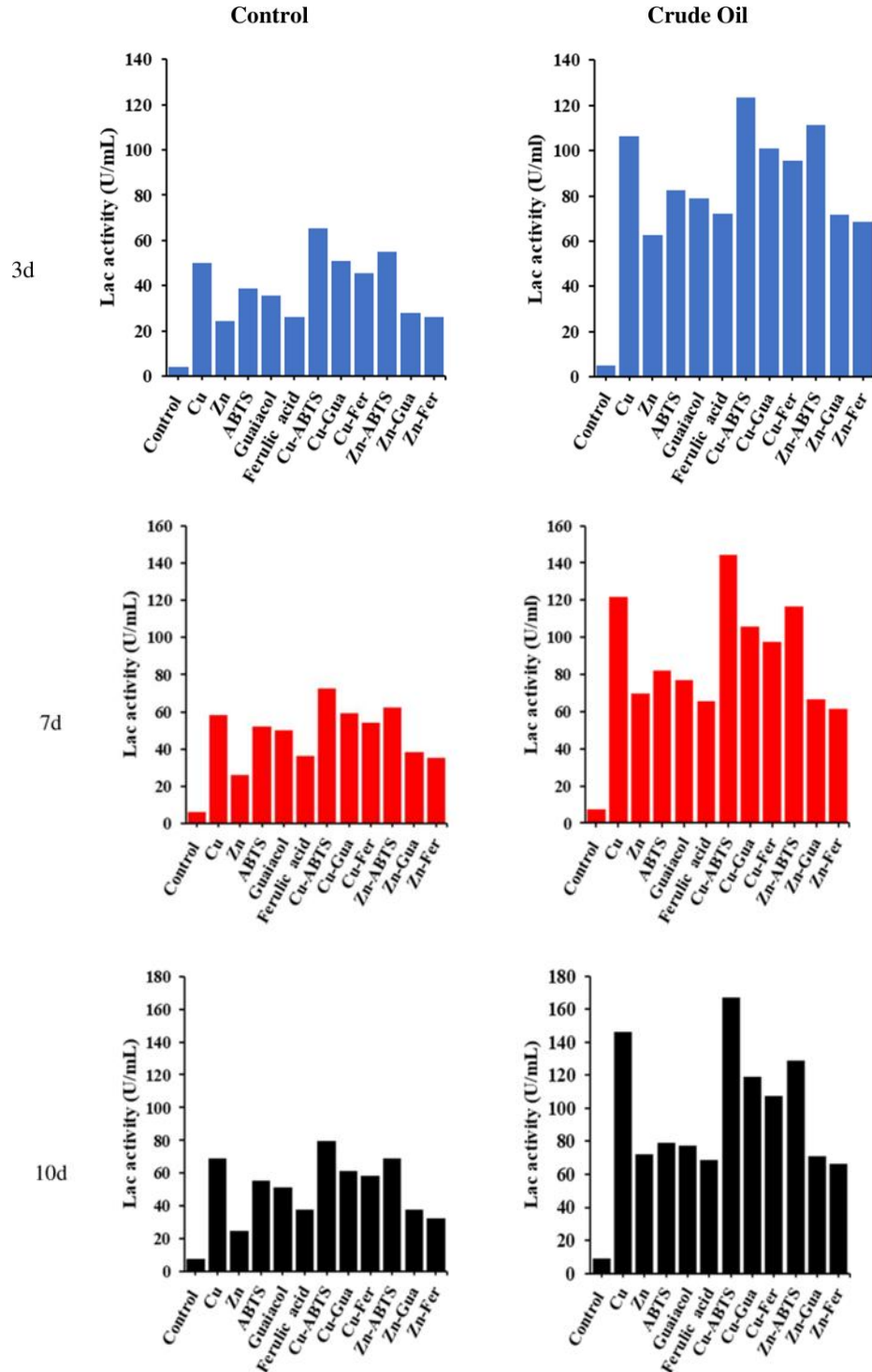


Figure 11: Suivi de l'activité laccase dans le milieu MSM avec cinq inducteurs (individuels et combinés) (témoin) et les mêmes conditions 1 % de pétrole brut et les mêmes inducteurs (traitement).

1.3 Résultat de biodégradation

D'après (Michael Dare Asemoloye et al., 2020). La composition de l'huile à moteur utilisée dans cette étude a été analysée par GC/MS (**figure 12**). L'huile comprenait des composants aliphatiques (p. ex., C1–C20 et C20–C50), des aromatiques (p. ex., benzène, toluène, éthylbenzène et isomères du xylène (BTEX), des benzènes alkyles, des indenes alkyles, des tétralines alkyles, des biphényles alkyles, des aromatiques polycycliques (HAP)) et d'autres composés, comme les esters méthyliques. Les composés les plus abondants dans l'huile moteur usagée étaient les BTEX, les aliphatiques C20 à C50 et les HAP, qui représentaient ensemble 67 % du mélange total (**figure 12**). On a observé que les deux champignons modifiaient la composition en hydrocarbures de l'huile à moteur usagée selon les indications de la (**figure 13**). Après une incubation de 15 jours, on a observé que *A. oryzae* (C-Effurun) réduisait de façon significative plusieurs composants de l'huile moteur usagée par rapport à *Mucor irregularis* B-Yorla10. Plus précisément, *A. oryzae* (C-Effurun) a réduit tous les hydrocarbures contenus dans l'huile moteur usagée, tandis que la souche *Mucor irregularis* B-Yorla10 n'a montré qu'une activité de dégradation significative des alcanes à longue chaîne et du BTEX. Cependant, la dégradation des alcanes à longue chaîne par ce dernier champignon a entraîné une augmentation des alcanes à chaîne courte dans le traitement par rapport au témoin.

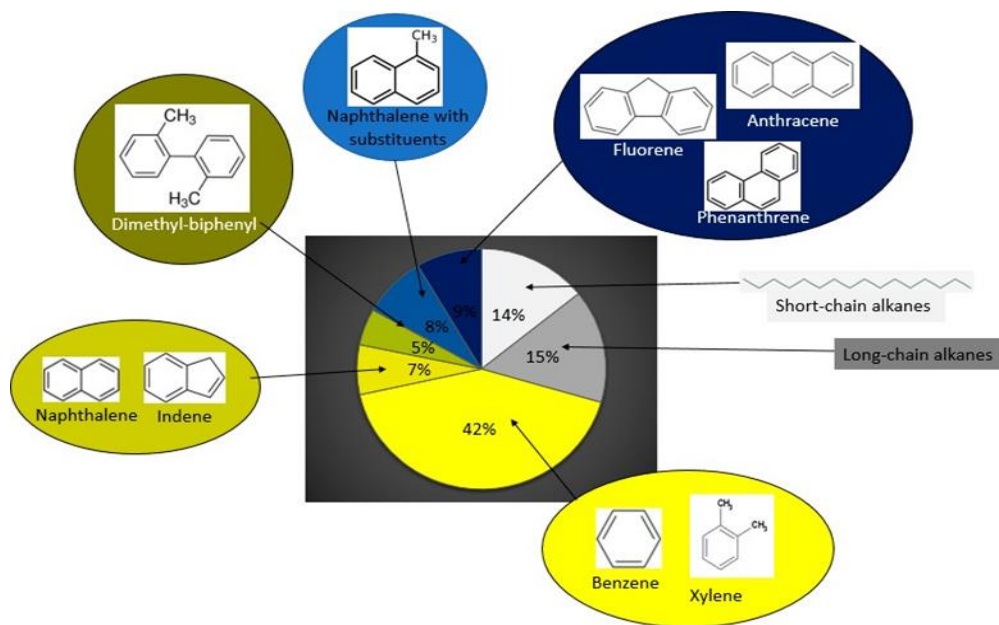


Figure 12: Composition de l'huile moteur usagée révélée par l'analyse GC/MS.

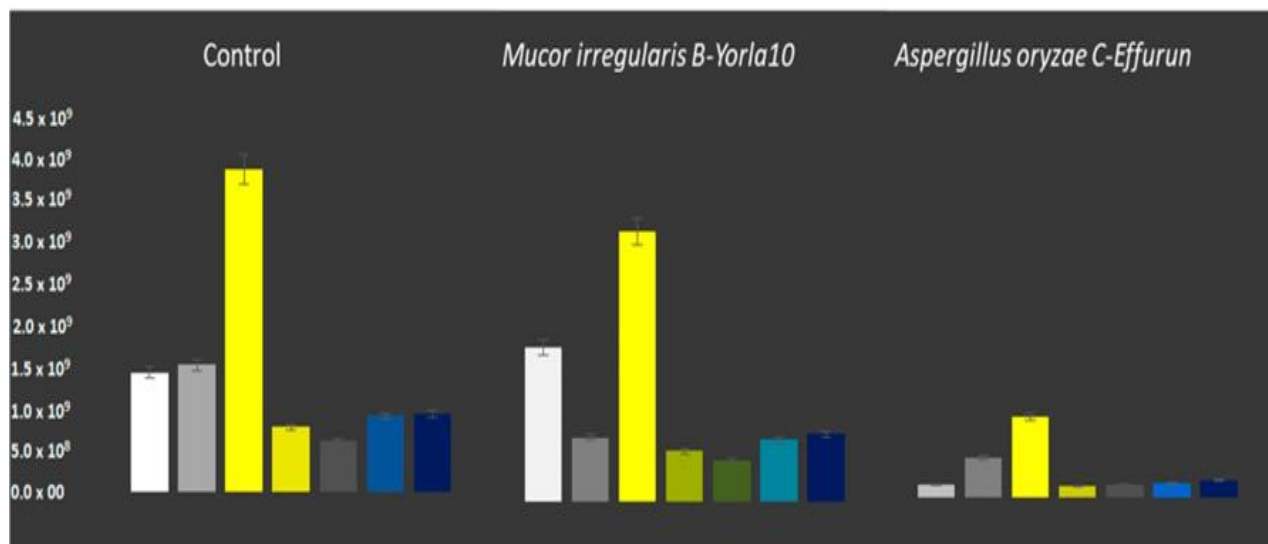


Figure 13: Dégradation des fractions d'hydrocarbures dans l'huile de moteur usée par certains champignons filamenteux. (*Mucor irregularis* et *Aspergillus oryzae*)

(Nada K. Alharbi et al., 2022). Ont démontré les résultats de :

1.4 La Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques du pétrole lourd :

L'analyse CG-SM (Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse) a révélé que *A. terreus* KC462061 soutenu par le Cu-ABTS présentait un potentiel de biodégradation important sur les n-alcanes du pétrole brut. Au 10^e jour du processus de biodégradation par *A. terreus* KC462061 soutenu par Cu-ABTS, l'efficacité de biodégradation du C12 à C20 a augmenté rapidement à 80% (moyenne). Toutefois, pour la biodégradation d'*A. terreus* KC462061, le potentiel de dégradation des C12 à C20 a atteint un maximum de 53,3 % (moyenne). Le Cu-ABTS a soutenu *A. terreus* KC462061 en augmentant la plage de biodégradation et le taux de biodégradation des n-alcanes. La disponibilité de n-alcane dans le pétrole brut a effectivement diminué principalement en raison du potentiel de biodégradation. L'efficacité de biodégradation de *A. terreus* KC462061 soutenue par le Cu-ABTS pour C12 à C16 était de 80,9 % à 83,1 %. Par rapport à *A. terreus* KC462061 seul, l'efficacité de biodégradation de C12 à C16 a été significativement augmentée, et l'efficacité de biodégradation améliorée dans la gamme de 49,1% à 55,4%.

1.5 La Biodégradation des hydrocarbures aromatiques du pétrole brut :

L'analyse CG-SM a indiqué que la présence de divers HAP dans le pétrole brut avait effectivement diminué en raison du potentiel de biodégradation. Au 10^e jour du processus de biodégradation de *A. terreus* KC462061 induit par le Cu-ABTS, l'efficacité de biodégradation

des hydrocarbures aromatiques a atteint un maximum de 80,1%. Comparé à *l'A. terreus* KC462061 seul, le potentiel de biodégradation a atteint 52,6 %. Chez *l'A. terreus* KC462061 induit par le Cu-ABTS, l'efficacité de la biodégradation des HAP était de 75,6 % à 82,9 %. Dans le cas de *l'A. terreus* KC46206 seul, l'efficacité de biodégradation variait de 48,7 % à 58,8 %.

1.6 Profil de transcription de huit gènes de laccase d'*A. terreus* KC46206

Les profils transcriptionnels des huit gènes laccase, Lcc1, Lcc3, Lcc5, Lcc6, Lcc8, Lcc10, Lcc11 et Lcc12, ont été évalués le deuxième, quatrième, sixième, huitième, dixième et douzième jour de développement fongique, soutenus par les ions Cu, Zn, Cu-ABTS, Zn-ABTS et 1 % de pétrole brut, et les résultats sont présentés à la (**figure 14**). Il a été démontré que tous les gènes Lcc étaient stimulés dans les conditions analysées, les niveaux d'induction variant de deux à quinze fois plus élevés que dans les conditions de référence.

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

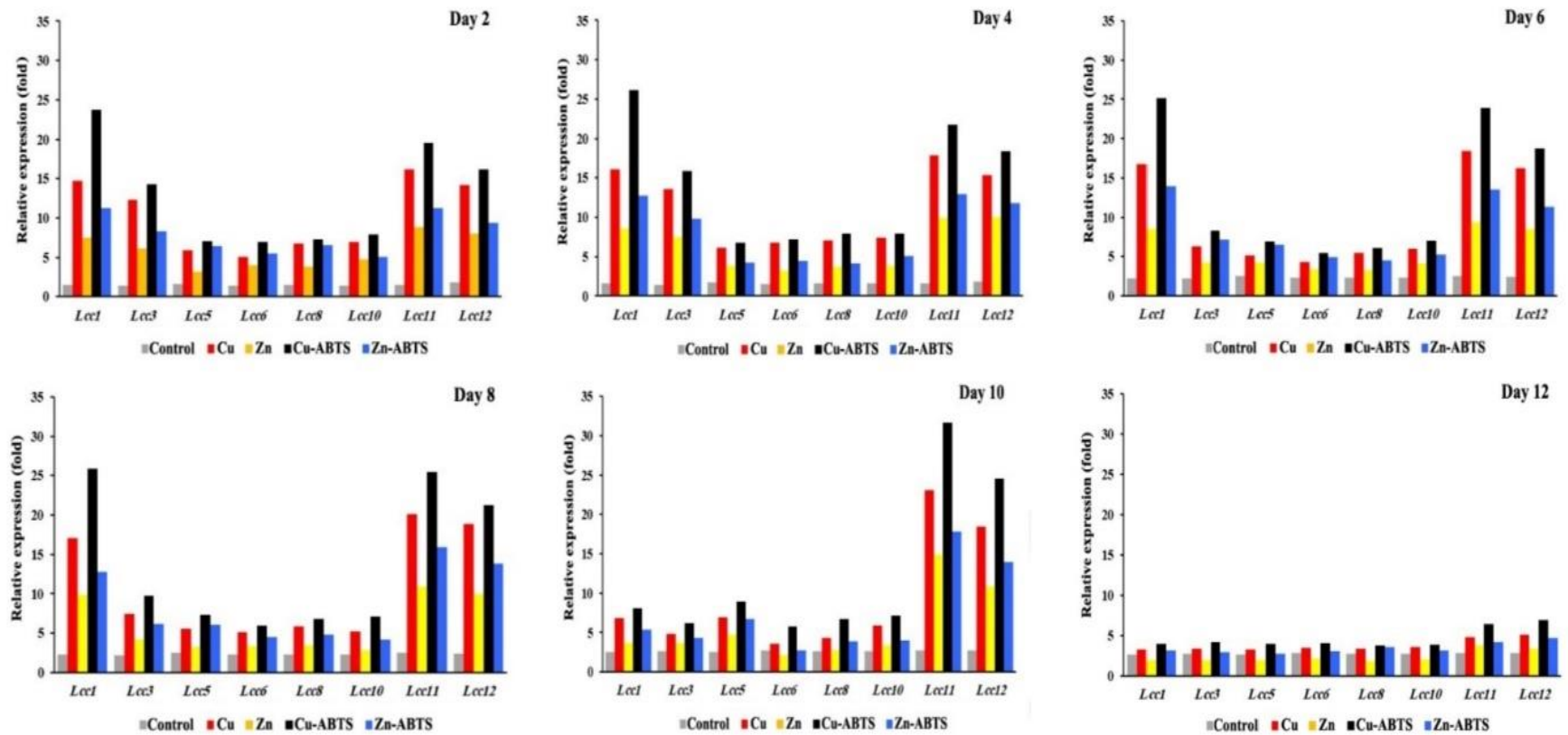


Figure 14: Profil de transcription des gènes de codage de laccase pendant la croissance d'*A. terreus* KC46206 dans les cultures liquides, supporté par 1% de pétrole brut à différents moments de croissance.

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

Les laccase1, 3, 8 et 11 présentaient les changements les plus importants dans les niveaux de transcription (>10 fois). Les autres gènes, Lcc5, 6, 8 et 10, ont de faibles niveaux de signification les jours 2 et 4. Les gènes ont de nouveaux niveaux de signification les jours 6 et 8, où les niveaux de transcription de Lcc1 (11,1 et 11,5 fois, respectivement), Lcc11 (9,6 et 10,2 fois, respectivement) et Lcc12 (7,8 et 8,9 fois, respectivement) basés sur l'induction par Cu-ABTS, en comparant les niveaux d'expression correspondants les jours 6 et 8. Le jour 10, les profils transcriptionnels de Lcc11 et 12 étaient les plus significatifs à ce stade. Le 12ème jour, le processus de traduction était très légèrement régulé à la baisse pour tous les gènes Lcc. Par conséquent, les niveaux d'expression des gènes ont été modifiés dans tous les gènes Lcc jusqu'à deux fois ou moins, et quatre inducteurs n'ont pas produit une induction puissante pour tous les gènes Lcc, de sorte que la transcription a presque cessé à ce stade. En général, les Cu-ABTS ont le plus haut niveau d'induction du processus de transcription. Parmi les huit gènes Lcc, les gènes Lcc1, 11 et 12 étaient principalement exprimés de 2 à 8 jours, mais le 10e jour, seuls les gènes Lcc 11 et 12 étaient principalement exprimés (figure 6a). Les Lcc1, 11 et 12 ont été les plus abondants, exprimés à 17 %, 22 % et 18 %, pendant la transcription pendant 12 jours (**figure 15a**), mais la transcription d'autres gènes Lcc était négligeable par rapport aux gènes abondants (**figure 15b**).

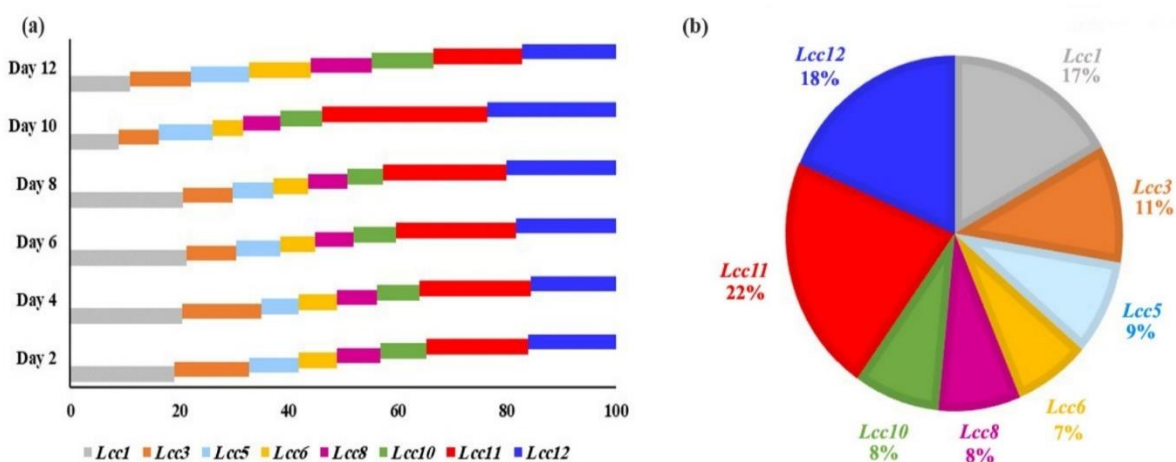


Figure 15: Abondance relative des transcriptions (exprimée en pourcentage) des gènes de laccase. (a) Abondance relative des transcriptions des huit gènes de laccase au cours de chaque jour. (b) Abondance relative de la transcription des huit gènes de laccase pendant tous les jours. Le niveau de transcription total de tous les gènes Lcc a été considéré comme étant de 100%.

Discussion

Dans l'étude de (Michael Dare Asemoloye et al., 2020), les deux champignons les plus fréquents, *Aspergillus oryzae* et *Mucor irregularis*, ont été isolés dans des sites contaminés au pétrole brut dans la région du delta du Niger, au Nigéria. La souche isolée de *Mucor* (B-Yorla10) était très phylogénétiquement proche de *Mucoromycotina* sp. Découverte par Aban et al. Comme champignon symbiotique de la racine de la fougère épiphyte, *Drynaria quercifolia* aux Philippines étant l'espèce dominante avec un taux de colonisation élevé. Dans une autre étude réalisée plus tard par les mêmes auteurs, cette souche fongique isolée de la fougère a montré une capacité significative à protéger les semis de riz contre la sécheresse.

M. irregularis trouvé à partir de riz par Cai. W. dans une étude inédite a également révélé une relation étroite avec leur souche *Mucor* isolée. Ce résultat prouve la large distribution écologique de *Mucor* dans le sol et en tant qu'associé végétal, et peut indiquer la potentialité de *Mucor* à appliquer dans le domaine de la protection de l'environnement et de l'industrie agricole. Chukwura et al. ont signalé des potentiels de dégradation des hydrocarbures de *M. racemosus* isolés d'échantillons de sol prélevés dans un atelier de mécanique à Awka, dans l'État d'Anambra, au Nigeria. Les résultats de cette étude représentent un nouveau record du potentiel de dégradation des hydrocarbures de *M. irregularis* isolé des sols pollués par le pétrole au Nigeria.

Dans cette étude, on a constaté que les deux champignons pouvaient tolérer des concentrations variables d'huile moteur usagée et utilisent les hydrocarbures comme seule source de carbone. Alors que *M. irregularis* a augmenté plus rapidement sur le milieu solide de BH complété par 20% d'huile moteur usée, les *A. oryzae* ont tendance à croître plus lentement. Au contraire, les résultats de la dégradation des hydrocarbures ont montré qu'*A. oryzae* avait un potentiel de dégradation plus élevé que *M. irregularis*, confirmé par sa production d'enzymes plus élevée. Leurs résultats confirment que la tolérance fongique aux hydrocarbures complexes n'est pas en fonction de leur capacité de dégradation, et aussi que la capacité de sécrétion enzymatique des champignons améliore la dégradation des hydrocarbures plus rapidement que la tolérance.

Bien que cette étude ait démontré qu'*A. oryzae* dégradait plus d'hydrocarbures que *M. irregularis*, on a constaté que cette dernière espèce fongique agit plus spécifiquement sur les

hydrocarbures à longue chaîne, ce qui entraîne une augmentation des concentrations d'hydrocarbures à chaîne courte après 15 jour 'incubation par rapport à la concentration initiale dans l'huile de moteur usagée. Srinivasan et Viraraghavan ont confirmé l'application de *Mucor rouxii* et d'*Absidia coerulea* pour la production de biomatériaux chitosan (une molécule naturelle, d'origine marine, provenant de plusieurs crustacés et mollusques utilisé comme complément alimentaire) et de coquille de noix pour l'élimination de l'huile des solutions aqueuses.

Il a été démontré que les enzymes produites par de nombreux champignons filamenteux contribuent à la dégradation/minéralisation des hydrocarbures. Les enzymes laccase et peroxydase sont produites par les champignons comme métabolites secondaires. Par conséquent, la production de ces enzymes peut être affectée par les concentrations de carbone ou d'azote disponibles dans les substrats où les champignons poussent. Cela concorde avec notre observation selon laquelle la concentration et la nature chimique de l'huile moteur supplémentée en milieu de culture comme seule source de carbone a eu une incidence significative sur la croissance fongique et leur capacité de sécrétion enzymatique. On a également observé que les deux champignons analysés produisaient plus de laccase que de peroxydase. Laccase est une enzyme phénolique multi-cuivre dont on a signalé qu'elle jouait différents rôles dans l'oxydation de plusieurs composés aminés phénoliques aromatiques. Cette enzyme agit en oxydant plusieurs composés phénoliques et aromatiques, en utilisant l'oxygène comme accepteurs d'électrons terminaux, comme indiqué dans différentes espèces de champignons. Laccase est de plus en plus populaire dans le biotraitement de différents matériaux récalcitrants et les effluents de déchets de nombreuses industries. Il a été bien signalé pour de nombreuses applications comme l'élimination des composés phénoliques aromatiques, la désoxydation de nombreuses huiles d'hydrocarbures, le traitement des eaux usées, l'élimination des colorants et le bio-blanchiment de la pâte.

En contre partie (**Nada K. Alharbi et al., 2022**). En démontre dans leur étude que l'isolat fongique *A. terreus* KC462061 a la capacité de produire du Lcc avec un inducteur (pétrole brut) et sans pétrole brut, soutenu par cinq inducteurs. L'action synergique de Cu-ABTS a augmenté les niveaux de laccase jusqu'à 22 fois dans le milieu de culture contenant l'inducteur par rapport à la condition de référence.

Dans la présente étude, l'efficacité de la biodégradation de *A. terreus* KC462061 appuyé par le Cu-ABTS pour les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, a augmenté jusqu'à 83,1 et 80,1%,

respectivement. Il a été démontré que de nombreux enzymes présents dans les champignons filamenteux contribuent à la biodégradation et à la minéralisation du carbone. Par exemple, la biodégradation du pétrole brut a été très efficace avec une production élevée d'enzymes Lcc à partir de *A. terreus* KC462061.

Il était démontré que Les 9ème et 6ème jour de culture, *Aspergillus oryzae* avait les plus grandes activités de Lcc 36,0 et 27,37 μmL , respectivement, tandis que le troisième jour elle avait la plus faible activité de Lcc 2,11 μmL . *A. oryzae* a obtenu les meilleurs résultats en matière de biodégradation de tous les hydrocarbures dans l'huile à moteur usée. *Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae* ont démontré qu'ils amélioraient la dégradation du pétrole brut dans le milieu de Bushnell Haas et ont obtenu une dégradation du pétrole de 54 % et 99 % respectivement dans le milieu optimisé.

Dans la présente étude, les intensités de bande de huit Lcc individuels ont été remarquées à cause des variations significatives. Après le traitement avec huit inducteurs pour la culture fongique, ces composés ont été affectés pour développer une quantité plus élevée de bandes Lcc putatives, c.-à-d., sa surproduction. Le Cu-ABTS a été l'inducteur le plus efficace parmi toutes les autres offrant une surproduction de Lcc.

Il a été signalé que la variation de l'expression des gènes Lcc est basée sur les polluants environnementaux. Dans l'environnement naturel, la quantité et la nature du substrat variaient considérablement et dépendait du temps. Les polluants de l'environnement entraînent un stress oxydatif et ces polluants participent à la régulation de l'expression du gène Lcc.

Dans cette étude De multiples localisations régulatrices potentielles de transcription ont été découvertes à l'intérieur des promoteurs des gènes Lcc, ce qui indique que chaque gène Lcc a été stimulé par un ou plusieurs facteurs. Par exemple, les promoteurs de Lcc1, 4, 7 et 8 devaient être des éléments de réponse aux métaux (MRE).

Dans une étude antérieure il a été prouvé que Le gène Lcc7 était le gène prédominant de tous les gènes Lcc exprimés dans la culture de *Cerrena sp.*, et sa quantité de transcription a été associée à des inducteurs LCC tels que Cu, Zn, ABTS et guaiacol. Les niveaux de transcription du Lcc7 ont été multipliés par 1000 lorsque les ions Cu^{+2} ont été incorporés au milieu de culture. En présence d'ions Cu^{2+} dans le milieu de culture, le niveau de transcription a été plus faible pour

SYNTHÈSE EXPÉRIMENTALE

les gènes *Lcc4*. L'expression de gènes *Lcc* tels que *Lcc2*, *Lcc3*, *Lcc5*, *Lcc6* et *Lcc8* a été considérablement supprimée par la présence d'ions Zn^{2+} dans le milieu de culture.

Des études antérieures sur la biodégradation aromatique, en particulier des HAP par *Aspergillus fumigatus*, ont révélé une biodégradation considérable de l'anthracène. Après 5 jours, l'efficacité de biodégradation a pu être maintenue à environ 60 %. *Aspergillus terreus* a été caractérisé par un sol pollué contaminé par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et du pyrène et du benzo pyrène métabolisés. **Benguenab et Chibani** ont confirmé l'application d'*Aspergillus ustus* sur la biodégradation du pétrole brut et du diesel, affichant le plus haut niveau de dégradation à 30,43 % et 21,74 %, respectivement

CONCLUSION

Conclusion et perspective

Le milieu marin subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (effluents urbains et industriels, déversements de pétrole...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques).

Les hydrocarbures, et en particulier les HAPs, sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes marins à cause de leur caractère récalcitrant et leur activité mutagène et/ou cancérigène (**Duran et Cravo-Laureau, 2016**). La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est considérée comme le processus principal d'élimination de ces contaminants (**Nikitha et al., 2017**). Les sites contaminés par ces composés (hydrocarbures) sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes doués des potentialités biodégradatives intéressantes.

Dans cette étude, les souches fongiques dominantes isolées de deux sites pollués par le pétrole brut ont été identifiées comme *Aspergillus oryzae* et *Mucor irregularis*. Les deux champignons ont montré une grande tolérance à diverses concentrations d'un mélange complexe d'hydrocarbures (huile de moteur usagée) et ont démontré des capacités de dégradation des hydrocarbures. Les différentes expressions et activités enzymatiques démontrées par les champignons analysés pourraient être utiles pour leur survie dans des environnements contaminés, en leur permettant d'utiliser les hydrocarbures présents dans le substrat comme éléments nutritifs. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre, d'un point de vue génétique et biochimique, les mécanismes de dégradation des hydrocarbures de ces champignons, et donc améliorer leur performance de dégradation. D'après les chercheurs ceci peut être réalisé grâce à l'utilisation de la technologie traditionnelle de l'ADN recombinant et des outils avancés de manipulation génétique tels que les systèmes CRISPR-Cas.

Dans une étude plus approfondie sur les *Aspergillus* il a été démontré que *Aspergillus terreus* KC462061 produit l'enzyme laccase en présence du pétrole brute, deux ions, Zn^{2+} et Cu^{2+} , et trois composés aromatiques, ABTS, acide férulique et guaiacol, ont exercé une influence remarquable sur ses rendements en laccase, en particulier Cu-ABTS. Leur résultat démontre que la Laccase d'*A. terreus* KC462061 joue un rôle essentiel dans l'adaptation des champignons aux conditions environnementales difficiles telles que la biodégradation du pétrole brut.

Cette étude a établi le profil de transcription complet de huit gènes Laccase de *A. terreus* KC462061 pendant le processus de biodégradation du pétrole brut. L'effet synergique du composé Cu-ABTS a le plus haut niveau d'induction du profil de transcription. Lcc11 et 12 étaient les principaux gènes de Laccase dans les profils de transcription tout au long du cycle de vie de *A. terreus* KC462061, et leur abondance de transcription a été corrélée avec le composé Cu-ABTS avec un gène de référence validé. Cela indique qu'il existe une grande possibilité de trouver d'autre espèce d'aspergillus possédant un pouvoir de biodégradation encore plus élevé avec un équipement enzymatique très puissant capable de biodégrader les hydrocarbures les plus résistant bien sûr cette biodégradation peut être amélioré en utilisant des biosurfactant et la manipulation des gènes pour une production d'enzyme plus élevé.

Au bout du compte, les résultats obtenus dans cette analyse, nous ont poussés à suggérer que les champignons dont quelques espèces peuvent être une solution partielle de remédiation de cette douleur mondiale planétaire. De plus, il vaut mieux commencer à prendre des mesures pour arrêter la pollution marine maintenant plus que jamais.

Pour conclure, nous signalons que cette étude était très excitante pour nous et nous espérons donner suite à cette recherche mais avec notre propre expérience pour avoir de meilleurs résultats.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.-H. 2008.** Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 289-303.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E. 2010.** Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins, and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1323-1336.
- Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., Radwan, S.S. 2010.** Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles*, 14(3), 321-328.
- Anderson, J.W., Lee, R.F. 2006.** Use of biomarkers in oil spill risk assessment in the marine environment. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12(6), 1192-1222.
- Anpe, Agence nationale de protection de l'environnement 2012.** Manuel de procédures du pniu pour lutter contre les évènements de pollution marine. Réf : AF 02-10. P 30-59.
- Arris, S, 2008.** Étude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sur des sous-produits de céréales, thèse de doctorant université de constantine.
- Asia, L., (2012).** Analyse des hydrocarbures dans des sédiments superficiels de zones côtières Méditerranéennes (Golfe de Fos, Rade de Marseille et Massif des Calanques). Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université d'Aix-Marseille en Chimie Analytique. 175 p.
- Atlas R.M. (1981).** Microbial-degradation of petroleum-hydrocarbons— an environmental perspective. *Microbiol Rev.* 45(1) :180–209.
- Austad, T., Taugbøl, K. 1995.** Chemical flooding of oil reservoirs 2. Dissociative surfactant-polymer interaction with a negative effect on oil recovery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 103(1-2), 73-81.
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. 2016.** Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

B

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

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

Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., Nyayanit, N.V. 2014b. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5, 697.

Benguenab, A.; Chibani, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. *Acta Ecol. Sin.* **2021**, 41, 416–423.

Bertrand J.C. & Mille G., (1989). Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In : *Microorganismes dans les Ecosystèmes océaniques* (eds. Bianchi M, Marty D, Bertrand JC, Caumette P & Gauthier MJ), pp. 343-385. Masson, Paris, France.

Bertrand, J.C., Doumenq, P., Guyoneaud, R., Marrot, B., Martin-Laurent, F., Matheron, R.,Moulin, P., Soulas, G., (2012). Écologie microbienne appliquée et dépollution - les micro-organismes acteurs majeurs de l'élimination des pollutions. Chap. 16, 705-790. Presses Universitaires de Pau et des pays de l'Adour qui affectent l'environnement en écologie microbienne ; *Microbiologie des milieux naturels anthropisés*. Ed. Bertrand Jean Claude.

Bocard C., 2006. Marées noires et sols pollués par les hydrocarbures et traitement.

Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3280-3287.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

Caldwell M. E., R. M. Garrett R. C. Prince. et J. M. Suflita. (1998). Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology*, 32(14) : 2191-2195.

Callaghan, B., Lydon, H., Roelants, S.L., Van Bogaert, I.N., Marchant, R., Banat, I.M., Mitchell, C.A. 2016. Lactonic Sophorolipids increase tumor burden in Apcmin[±]-mice. *PloS one*, 11(6), e0156845.

Cameotra, S.S., Makkar, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 520-529.

Cébron, A., Norini, MP., Beguiristain, T., Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH- ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram-negative Bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73, 148–159.

Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(3), 331-338.

Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B. 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 2079-2110.

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

Chong, H., Li, Q. 2017. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories*, 16(1), 137.

Cirigliano, M.C., Carma, G.M. 1984. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, 48(4), 747-750.

Cochrane, S.A., Vederas, J.C. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*, 36(1), 4-31.

Colombano, S., V. Guerin, A. Saada, D. Hiez et H. Bomer. (2008). Journée technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. *Les Diagnostiques Objectifs*,

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

enjeux & moyens. IN Gouvernement de France, ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf.

Colombo, J.C., Cabello, M., Arambarri, A.M. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. *Environmental pollution*, 94(3), 355-362.

Cortés-Sánchez Ade, J., Hernández-Sánchez, H., Jaramillo-Flores, M.E. 2013. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, 168(1), 22-32.

D

Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W.A., Méjanelle, L., Eisenreich, S.J., Jones, K.C., (2002).

Das, N., Chandran, P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011.

Dalmaso, G., Ferreira, D., Vermelho, A. 2015. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, 13(4), 1925-1965.

de França, Í.W.L., Lima, A.P., Lemos, J.A.M., Lemos, C.G.F., Melo, V.M.M., de Sant'ana, H.B., Gonçalves, L.R.B. 2015. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10-15.

de Oliveira, M.R., Magri, A., Baldo, C., Camilios-Neto, D., Minucelli, T., Celligoi, M.A.P.C. 2015. Sophorolipids A promising biosurfactant and it's applications. *Int J Adv Biotechnol Res*, 6, 161-174.

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

Díaz De Rienzo, M.A., Banat, I.M., Dolman, B., Winterburn, J., Martin, P.J. 2015. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*, 32(6), 720-726.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Djerbaoui A.N., (2011). Utilisation de soche bactériennes autochtons dans la production de biosurfactant etla bioremédiation des sols de HESSI MESAUD contaminés par les hydrocarbures. Mémoire magister. Université KASDI MERBAH OUARGLA.

Dooley, S., Heyne, J., Won, S.H., Dievert, P., Ju, Y., Dryer, F.L. 2014. Importance of a Cycloalkane Functionality in the Oxidation of a Real Fuel. *Energy & Fuels*, 28(12), 7649-7661.

Duran, R., Cravo-Laureau, C. 2016. Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 814-830.

F

Fang, X., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L. 2013. Benzo [a] pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), 40-50.

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

Fondi, M., Orlandini, V., Emiliani, G., Papaleo, MC., Maida, I., Perrin, E, Vaneechoutte, M, Dijkshoorn, L, Fani, R. 2012. Draft Genome Sequence of the Hydrocarbon-Degrading and Emulsan-Producing Strain *Acinetobacter venetianus* RAG-1T. *Journal of Bacteriology*, 194(17), 4771-4772.

G

Gassara, F., Suri, N., Voordouw, G. 2017. Nitrate-mediated microbially enhanced oil recovery (N- MEOR) from model upflow bioreactors. *Journal of hazardous materials*, 324, 94-99.

Geetha, S., Banat, I.M., Joshi, S.J. 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

Gesamp, 1989. United nation group of experts on the scientific aspect of marine pollution. Article premier, paragraphe 1.

Gillespie, I.M.M., Philp, J.C. 2013. Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends in Biotechnology*, 31(6), 329-332.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Goeury, C. 2012. Numerical modelling of oil spill drifts in continental and estuarine waters, Université Paris-Est.

Goeury, D. 2014. LA POLLUTION MARINE. in: Mers et océans, (Ed.) R. Woessner, Atlante. Paris. Grand View Research, 2015. <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/biosurfactants-industry>. Accessed March 8, 2018.

H

Haddock, J.D., Horton, J.R., Gibson, D.T. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Journal of bacteriology*, 177(1), 20-26.

Hamley, I.W. 2015. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*, 51(41), 8574-8583.

Harayama Shigeaki, Kishira Hideo, Kasai Yuki et Shutsubo Kazuaki. (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 63-70.

Haritash A K., Kaushik C P, (2009). Biodégradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous –Materials.*169 (1-3) p. 1-15.

Hassanshahian M. et Cappello S. (2013). Crude oil biodegradation in the marine Environments. *Biodegradation - Engineering and Technology.* <http://dx.doi.org/10.5772/55554>.

Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 173.

Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., Hausmann, R. 2017. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology journal*, 12(7), 1600561.

Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A. 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non- ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4), 363-378.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hussein Amin Mohamed Abdelwahed, W. 2011. Study on the regulation and biosynthesis of fengycin and plipastatin produced by *Bacillus subtilis*, Lille 1.

I

ITOPF, 2011. Effects of Oil Pollution on the Marine Environment. Technical Information Paper (TIP) No. 13, International Tanker Owners Pollution Federation.

ITOPF, 2012. Effects of Oil Pollution on the Marine Environment. Technical Information Paper (TIP) No. 13, International Tanker Owners Pollution Federation.

J

Jeanbille, M., Gury, J., Duran, R., Tronczynski, J., Agogué, H., Ben Saïd, O., Ghiglione, J.-F., Auguet, J.-C. 2016. Response of Core Microbial Consortia to Chronic Hydrocarbon Contaminations in Coastal Sediment Habitats. *Frontiers in Microbiology*, 7(1637).

Jeannot. R, Bemiére. B et Chivon. S, avec la collaboration de Augustin. F, Dannendriale. D, 2001. guides méthodologiques pour l'analyse des sols pollués. Sd.

Johnsen, A.R., Karlson, U. 2005. PAH degradation capacity of soil microbial communities—does it depend on PAH exposure? *Microbial ecology*, 50(4), 488-495.

K

Kanlayavattanakul, M., Lourith, N. 2010. Lipopeptides in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, 32(1), 1-8.

Kirso, U., Irha, N. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 41(1), 83-89.

L

Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D., Jain, R. 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. in: *Environmental bioremediation technologies*, Springer, pp. 409-443.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Landos, M., Lloyd-Smith, M., and Immig, J. April 2021. Aquatic Pollutants in Oceans and
Leahy, J., Colwell, R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment.
Microbiology Reviews, 54(3), 305-315.

Lang, N., Delichere, P., Tuel, A. 2002. Post-synthesis introduction of transition metals in
surfactant- containing MCM-41 materials. Microporous and mesoporous materials, 56(2), 203-
217.

Lecomte P., (1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Édition
Lavoisier, TEC & DOC, p. 198. Fisheries. International Pollutants Elimination Network (IPEN)

Lefebore. G, 1986. Notion de chimie du pétrole, ED : TECHNIP, paris efebore G, 1986-nosion de

Lei, A.-P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y. 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by
different microalgal species. Bioresource technology, 98(2), 273-280.

Léon. Met Michel. V, 1982. bactériologie médicale. Ed. Printed France.

Li, Y.-M., Haddad, N.I., Yang, S.-Z., Mu, B.-Z. 2008. Variants of lipopeptides produced by
Bacillus licheniformis HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-
MS. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 14(3), 229-235.

M

Mahanty, B., Pakshirajan, K., Dasu, V. 2006. Production and properties of a biosurfactant
applied to polycyclic aromatic hydrocarbon solubilization. Applied Biochemistry and
Biotechnology, 134(2), 129-141.

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

Maneerat, S., Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and
characteristics of selected biosurfactant. Songklanakarin J Sci Technol, 29(3), 781-791.

Manhan S. E, 2007. environnement science and technology, Edition. Taylor and Francis, New
York.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Marchant, R., Banat, I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology, 30(11), 558-565.

Markets and Markets, 2016. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>. Accessed March 8, 2018.

Mata Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A. 2000. The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 16(4).

McClements, D.J., Gumus, C.E. 2016. Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. Advances in Colloid and Interface Science, 234, 3-26.

Mearns, A.J., Reish, D.J., Bissell, M., Morrison, A.M., Rempel-Hester, M.A., Arthur, C., Rutherford, N., Pryor, R. 2018. Effects of Pollution on Marine Organisms. Water Environment Research, 90(10), 1206-1300.

Michael Dare Asemoloye 1 , Solveig Tosi 2 , Chiara Daccò 2 , Xiao Wang 1 , Shihan Xu 1, Mario Andrea Marchisio 1, , Wenyuan Gao 1, Segun Gbolagade Jonathan 3 and Lorenzo Pecoraro 1, 30 November 2020.

Michael. T et John. M, 2007. Brock biologie des microorganismes. Sd.

Mnif, I., Ghribi, D. 2015. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. Peptide Science, 104(3), 129-147.

Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S. 2011. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. Journal of applied microbiology, 111(3), 525-536.

Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E.K. 2006. Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. Journal of Environmental Engineering, 132(2), 279-283.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Morgan P., Waykinson R.J., (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC crit. Rev. Biotechnol* 8: 305-333.

Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.

Muncaster S.P. et al., (2016), Effects of MV Rena heavy fuel oil and dispersed oil on yellowtail kingfish early life stages, *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 50:1, 131-143. DOI : 10.1080/00288330.2015.1078821.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current science*, 736-747.

N

Nada K. Alharbi 1, Mayasar I. Alzaban 1, Fawziah M. Albarakaty 2, Abeer R. M. Abd El-Aziz 3, Ahlam H. AlRokban 1 and Mohamed A. Mahmoud. 7 April 2022.

Nakajima, K., Sato, A., Takahara, Y., Iida, T. 1985. Microbial Oxidation of Isoprenoid Alkanes, Phytane, Norpristane and Farnesane. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(7), 1993- 2002.

Nakano, M., Iehata, S., Tanaka, R., Maeda, H. 2012. Extracellular neutral lipids produced by the marine bacteria *Marinobacter* sp. *Biocontrol science*, 17(2), 69-75.

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

O

Ongena, M., Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

P

Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants : recent advances. International journal of molecular sciences, 12(1), 633-654.

Padmapriya, B., Suganthi, S., Anishya, R. 2013. Screening, optimization and production of biosurfactants by Candida species isolated from oil polluted soils. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 13(2), 227-233.

Patel, S., Ahmed, S., Eswari, J.S. 2015. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(8), 1177-1193.

Pelmont, J, 2005-biodégradation et métabolisme, Ed. EDP. France

Potters, G. 2013. Marine Pollution.1st edition, Dr. Geert Potters ISBN 978-87-403-0540-1, <http://bookboon.com/en/marine-pollution-ebook>.

Prince R. C., R. M. Garrett, R. E. Bare, M. J. Grossman, T. Townsend, J. M. Suffita, K. Lee, E. H. Owens, G. A. Sergy, J. F. Braddock, J. E. Lindstrom et R. R. Lessard. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils ». Spill Science & Technology Bulletin. 8(2) : 145-156.

Prince, R.C., Gramain, A., McGenity, T.J. 2010. Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. in: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 1669-1692.

R

Rajeswari, V., Priyadarshini, S.K., Saranya, V., Suguna, P., Shenbagarathai, R. 2016. Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from Staphylococcus hominis in Oreochromis mossambicus. Fish & shellfish immunology, 48, 244-253.

Rehm, H., Reiff, I. 1981. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. in: Reactors and Reactions, Springer, pp. 175-215.

Rehmann, K., Noll, H.P., Steinberg, C.E., Kettrup, A.A. 1998. Pyrene degradation by Mycobacterium sp. strain KR2. Chemosphere, 36(14), 2977-2992.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Reis, R., Pacheco, G., Pereira, A., Freire, D. 2013. Biosurfactants: production and applications. in:Biodegradation-Life of Science, InTech.

Richir, J., Gobert, S. 2016. Trace elements in marine environments: occurrence, threats and monitoring with special focus on the costal mediterranean. Journal of Environmental and Analytical Toxicology, 6(1).

Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(4), 609-618.

Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. Current Opinion in biotechnology, 27, 191-194.

Rosenberg, E., Ron, E. 1999. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 52(2), 154-162.

Rosenberg, E., Schwartz, Z., Tenenbaum, A., Rubinovitz, C., Legmann, R., Ron, E.Z. 1989. A MICROBIAL POLYMER THAT CHANGES THE SURFACE PROPERTIES OF LIMESTONE: EFFECT OF BIODISPERSAN IN GRINDING LIMESTONE AND MAKING PAPER. Journal of Dispersion Science and Technology, 10(3), 241-250.

S

Salehizadeh, H., Mohammadizad, S. 2009. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. Iranian Journal of Biotechnology, 7(4), 216-223.

Salihu, A., Abdulkadir, I., Almustapha, M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 4(5), 111-117.

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

Scriban. R, 1993.biotechnologie 4eme Edition.Ed.Lavoisier (TOC et DOC), p (731).

Shahidul Islam, M., Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Marine Pollution Bulletin, 48(7), 624-649.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522-1554.

Singh, P., Patil, Y., Rale, V. 2007. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 1, 12

Soltani .M, 2004. distribution lipidiques et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes, variation en fonction de la source de carbone, thèse de doctorat, université de paris 6.

Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S. 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 174- 181.

T

Tapilatu, Y.H., Grossi, V., Acquaviva, M., Milton, C., Bertrand, J.-C., Cuny, P. 2010. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, 14(2), 225-231.

Tissot, B., Welte, D. 1978. Petroleum formation and occurrence: A new approach to oil and gas exploration. Springer.

Tissot B.P. et Welte D.H. (1984). Petroleum formation and occurrence. A new approach to oil and gas exploration. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp 120-128.

Tortella, G.R., Diez, M.C., Durán, N. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, 31(4), 197-212.

Tuffery, G. 1980. ÉLÉMENTS DE GESTION ÉCOSANITAIRE DES ÉTANGS. La pisciculture en étang : actes du Congrès sur la Pisciculture en Étang, Arbonne-la-Forêt, France, 11-12-13 mars 1980, 373.

V

Vikas, M., Dwarakish, G. 2015. Coastal pollution: a review. *Aquatic Procedia*, 4, 381-388.

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A.M., Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5497-5505.

Vijayakumar, S., Saravanan, V. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181.

W

Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., Schneider, J. 1995. Biotransformation of benzo [a] pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-biological interactions*, 97(2), 131-148.

Y

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and environmental microbiology*, 61(5), 1706-1713.

Z

Zobell.CE., (1946). Action of micro-organisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.



Article

Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites

Michael Dare Asemoloye ¹, Solveig Tosi ², Chiara Daccò ², Xiao Wang ¹, Shihan Xu ¹, Mario Andrea Marchisio ^{1,*}, Wenyuan Gao ¹, Segun Gbolagade Jonathan ³ and Lorenzo Pecoraro ^{1,*}

¹ School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, 92 Weijin Road, Nankai District, Tianjin 300072, China; asemoloyemike@gmail.com (M.D.A.); wang_xiao1996@163.com (X.W.); xsh1007@126.com (S.X.); pharmgao@tju.edu.cn (W.G.)

² Laboratory of Mycology, Department of Earth and Environmental Sciences, University of Pavia, Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia, Italy; solveig.tosi@unipv.it (S.T.); chiara.dacco01@universitadipavia.it (C.D.)

³ Mycology & Applied Microbiology Group, Department of Botany, University of Ibadan, Ibadan 200284, Oyo State, Nigeria; Gbolagadejonathan@gmail.com

* Correspondence: mamarchisio@yahoo.com or mario@tju.edu.cn (M.A.M.); lorenzo.pecoraro@gmail.com (L.P.); Tel.: +86-185-2642-9643 (M.A.M.); +86-185-2082-4550 (L.P.)

Received: 4 November 2020; Accepted: 28 November 2020; Published: 30 November 2020



Abstract: Many free-living saprobic fungi are nature recruited organisms for the degradation of wastes, ranging from lignocellulose biomass to organic/inorganic chemicals, aided by their production of enzymes. In this study, fungal strains were isolated from contaminated crude-oil fields in Nigeria. The dominant fungi were selected from each site and identified as *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* based on morphological and molecular characterization, with site percentage incidences of 56.67% and 66.70%, respectively. Selected strains response/tolerance to complex hydrocarbon (used engine oil) was studied by growing them on Bushnell Haas (BH) mineral agar supplemented with the hydrocarbon at different concentrations, i.e., 5%, 10%, 15%, and 20%, with a control having dextrose. Hydrocarbon degradation potentials of these fungi were confirmed in BH broth culture filtrates pre-supplemented with 1% engine oil after 15 days of incubation using GC/MS. In addition, the presence of putative enzymes, laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP) was confirmed in culture filtrates using appropriate substrates. The analyzed fungi grew in hydrocarbon supplemented medium with no other carbon source and exhibited 39.40% and 45.85% dose inhibition response (DIR) respectively at 20% hydrocarbon concentration. An enzyme activity test revealed that these two fungi produced more Lac than MnP and LiP. It was also observed through the GC/MS analyses that while *A. oryzae* acted on all hydrocarbon components in the used engine oil, *M. irregularis* only degraded the long-chain hydrocarbons and BTEX. This study confirms that *A. oryzae* and *M. irregularis* have the potential to be exploited in the bio-treatment and removal of hydrocarbons from polluted soils.

Keywords: pollutants; dose inhibition response; extracellular enzymes; fungi; hydrocarbon degradation; tolerance; bio-treatment

1. Introduction

An increase in anthropogenic activities has affected the natural environment in many ways. Studies have been reported on the occurrence of several pollutants and their various products in different environments [1–3]. In particular, the extraction, refinement, and transportation of petroleum oil and

Article 2:



Article

Transcriptome Profiling Reveals Differential Gene Expression of Laccase Genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during Biodegradation of Crude Oil

Nada K. Alharbi ¹, Mayasar I. Alzaban ¹, Fawziah M. Albarakaty ², Abeer R. M. Abd El-Aziz ^{3,*}, Ahlam H. AlRokban ¹ and Mohamed A. Mahmoud ^{4,*}

- ¹ Department of Biology, College of Science, Princess Nourah bint Abdulrahman University, P.O. Box 84428, Riyadh 11671, Saudi Arabia; nkalharbi@pnu.edu.sa (N.K.A.); mialzaban@pnu.edu.sa (M.I.A.); ahalrokban@pnu.edu.sa (A.H.A.)
- ² Department of Biology, Faculty of Applied Science, Umm Al-Qura University, P.O. Box 715, Makkah Al Mukarramah 21955, Saudi Arabia; fmbarakati@uqu.edu.sa
- ³ Botany and Microbiology Department, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Saudi Arabia
- ⁴ Molecular Markers Laboratory, Plant Pathology Research Institute, Agricultural Research Center, Giza 12619, Egypt
- * Correspondence: aabdelaziz@ksu.edu.sa (A.R.M.A.E.-A.); m.a.mahmoud75@gmail.com (M.A.M.)



Citation: Alharbi, N.K.; Alzaban, M.I.; Albarakaty, F.M.; Abd El-Aziz, A.R.M.; AlRokban, A.H.; Mahmoud, M.A. Transcriptome Profiling Reveals Differential Gene Expression of Laccase Genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during Biodegradation of Crude Oil. *Biology* **2022**, *11*, 564. <https://doi.org/10.3390/biology11040564>

Academic Editors: Tingyi Wen and Yun Zhang

Received: 7 March 2022
Accepted: 5 April 2022
Published: 7 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The Kingdom of Fungi is one of the most significant microorganism kingdoms, especially for soil fungi, which are still unexplored. Soil fungi play an extremely crucial role in the biodegradation of pollutants, mainly hydrocarbons. In this paper, molecular analysis delivers insights into laccase production by *Aspergillus terreus* KC462061 in the existence of crude oil, which is supported by the presence of five inducers, including aromatic compounds and metal ions. This paper established that the laccase of *A. terreus* KC462061 plays an essential function in the biodegradation of crude oil, and the synergistic effect of the Cu-ABTS compound caused an increase in laccase yields up to 22-fold after 10 days. This study confirmed that gas chromatography–mass spectrometry was a very accurate tool to demonstrate the biodegradation efficiency of *A. terreus* KC462061 for crude oil. The synergistic effect of the Cu-ABTS compound has the highest induction level of the transcription profile. *Lcc11* and *12* were the main *Lcc* genes in transcription profiles throughout the life cycle of *A. terreus* KC462061, and their transcript abundance was correlated with the Cu-ABTS compound. A quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used for the analysis of the transcription profile of eight laccase genes in *A. terreus* KC462061. Cu-ABTS was highly effective for efficient laccase expression profiling, mainly via *Lcc11* and *12* transcription induction.

Abstract: Fungal laccases have high catalytic efficiency and are utilized for the removal of crude oil because they oxidize various aliphatic and aromatic hydrocarbons and convert them into harmless compounds or less toxic compounds, thus accelerating the biodegradation potential of crude oil. Laccases are important gene families and the function of laccases genes varied widely based on transcription and function. Biodegradation of crude oil using *Aspergillus terreus* KC462061 was studied in the current study beside the transcription level of eight laccase (*Lcc*) genes have participated in biodegradation in the presence of aromatic compounds, and metal ions. Time-course profiles of laccase activity in the presence of crude oil indicated that the five inducers individual or combined have a very positive on laccase activity. In the status of the existence of crude oil, the synergistic effect of Cu-ABTS compound caused an increase in laccase yields up to 22-fold after 10 days than control. The biodegradation efficiencies of *A. terreus* KC462061 for aliphatic and aromatic hydrocarbons of crude oil were $82.1 \pm 0.2\%$ and $77.4 \pm 0.6\%$, respectively. The crude oil biodegradation efficiency was improved by the supplemented Cu-ABTS compound in *A. terreus* KC462061. Gas chromatography–mass spectrometry was a very accurate tool to demonstrate the biodegradation efficiencies of *A. terreus* KC462061 for crude oil. Significant differences were observed in the SDS-PAGE of *A. terreus* KC462061 band intensities of laccase proteins after the addition of five inducers, but the Cu-ABTS compound highly affects very particular laccase electrophoresis. Quantitative real-time polymerase chain