

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté de Technologie

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MASTER II

Option : Pharmacie Industrielle

**Criblage des souches productrices
de biosurfactants.**

Présenté par :

ABDELMALEK Djihed

Soutenu le 12/11/2013, devant le jury composé de :

| | | |
|---------------------|------------|---------------------|
| N.CHRIET | Dr. | Président |
| H.BOUTOUMI | Dr. | Examineur |
| H.LAERIBI | Dr. | Examinatrice |
| K.EDDOUAOUDA | Dr. | Co-promoteur |

Année Universitaire 2012/2013

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA



Faculté de Technologie

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MASTER II

Option : Pharmacie Industrielle

**Criblage des souches productrices
de biosurfactants.**

Présenté par :

ABDELMALEK Djihed

Soutenu le 12/11/2013, devant le jury composé de :

| | | |
|---------------------|------------|---------------------|
| N.CHRIET | Dr. | Président |
| H.BOUTOUMI | Dr. | Examineur |
| H.LAERIBI | Dr. | Examinatrice |
| K.EDDOUAOUDA | Dr. | Co-promoteur |

Année Universitaire 2012/2013

Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH tout puissant de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail

Je remercie spécialement mon Promoteur Monsieur Badis A, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vie à ce travail et je suis très reconnaissante de tout ce qu'il m'a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel

Avec beaucoup de respect, je remercie mon Co-promoteur Dr Eddouaouda K. pour la qualité de son encadrement sa confiance, et ses conseils qui ont été pour moi une aide inestimable ; merci profondément pour le temps consacré.

Je remercie tous les membres de jury

J'adresse un remerciement tout particulier à Melle Mesbaiah F et Monsieur Saoudi Elyes pour leurs confiances et disponibilités, ses recommandations et ses conseils précieux et pertinents, qui n'ont pas cessés de me prodiguer le long de ce travail

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr Tafahi Djamel et l'équipe du laboratoire d'hygiène de Faroudja –Blida-, aux personnels de département de Chimie industriel

J'adresse également mes sincères remerciements, à tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science

Je remercie infiniment tous mes amies surtout Boudissa Sara pour son aide et sa générosité

Je touche aussi par mes remerciements tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail:

A Ma Chère Mère Ahmed Messaoud Cherifa

Les mots me manquent pour exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour mon bonheur et ma réussite. Que Dieu te protège et t'accorde-le bonheur, la santé et la longue vie. Pour ton grand amour, ta tendresse et tes longues prières qui m'on été la meilleure gage de réussite, je t'offre ce travail.

A Mes Chères frères Oualid, Chouaib et Ibrahim

Que dieu vous protège et vous offre tout le bonheur que vous méritez pour votre avenir.

A m' aimable grande mère Fatmazohra, mes chères tantes : Aicha et son marie Ali, Khadidja et son marie Mohamed, Hamida et son marie Elyes, Radia et ses enfants :

Abd Rahman et Hanane Rahimaha Allah

Pour vos soutiens moraux et matériels que vous avez consentis en ma faveur, Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et mon grand amour.

A Mes oncles : Ali, Yahya, Hassan et Lokman

A tous mes cousins et mes cousines.

A Toute ma famille et mes amis

Mes proches et mon entourage, qui n'ont pas arrêté de me pousser et de me soutenir.

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus sincère gratitude. J'espère que j'étais à la hauteur de ce que vous attendez de moi.

Résumé

Dans le présent travail, nous avons effectué une étude sur l'optimisation et la caractérisation d'un biosurfactant, issu d'une souche thermophile, criblée parmi sept souches isolées localement à partir d'un sol sableux anciennement contaminé par les hydrocarbures de la région de Hassi-Mesaoud (sud de l'Algérie).

Les résultats obtenus pour la souche performante révèlent que : **(a)** la souche thermophile K2N a montré une capacité productrice importante de biosurfactant traduit par la faible valeur de la tension de surface (25 mN/m), **(b)** le gasoil (0,5 %, v/v) présente la meilleure source de carbone, **(c)** le biosurfactant de la souche K2N détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [4 à 100 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 300 mg/l), **(d)** finalement, l'étude phénotypique a montré que la souche K2N est affiliée à l'espèce *Bacillus licheniformis*.

Mots clés: bactérie thermophile, biosurfactant, industrie pharmaceutique.

Abstract

In this work, we have conducted studies on the screening of bacterial strains producing biosurfactants, production and characterization of a biosurfactant, from a thermophilic strain isolated locally from a sandy soil previously contaminated by oil at Hassi Mesaoud region (southern of Algeria), for an application in the pharmaceutical industry.

The results show that: **(a)** the thermophilic strain K2N showed significant productive capacity of biosurfactant resulted in the low value of the surface tension (25 mN / m), **(b)** gasoil (0.5% v/v) is the best carbon source **(c)** of the biosurfactant from K2N has interesting surfactant properties and is very thermally stable in a wide temperature range [4-100 °C], it has very good resistance in acidic and basic media [pH 2-12], also, it is effective in very salty environments (up to 300 mg/l), **(d)** finally, the phenotypic study (API 50 CH) showed that strain K2N is attached to the genus *Bacillus*.

Keywords : thermophilic bacteria , biosurfactant , pharmaceutical industry.

ملخص

في هذا العمل قمنا بإجراء دراسة لإنتاج، توصيف والتطبيق في الصناعات الصيدلانية لمفاعل سطحي ناتج من سلالة محبة للحرارة المرتفعة المعزولة من تربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود، جنوب الجزائر).

وتبين النتائج المحصل عليها: (أ) أظهرت السلالة المحبة للحرارة المرتفعة K2N إنتاجا قويا للمفاعل السطحي معبر عنه بدرجة كبيرة من التوتر السطحي (25 mN/m). (ب) يمثل المازوت (0.5%) أفضل مصدر للكربون لعملية الإنتاج. (ج-) أظهر المفاعل السطحي المنتج خصائص هامة مثل الاستقرار الحراري في نطاق واسع من درجة الحرارة [4-100 م°]، لديه مقاومة جيدة في الوسط الحمضي والقاعدي [الاس الهيدروجيني = 2-12]، كما أظهر فعالية في الأوساط جد مالحة. (د) بينت نتائج التحديد المظهري وباستعمال (API 50 CH) أن السلالة K2N تنتمي إلى جنس *Bacillus*.

الكلمات المفتاحية: المفاعل السطحي - سلالة بكتيرية محبة للحرارة المرتفعة - الاستحلاب - الصناعات الصيدلانية

Sommaire

| CHAPITRE I : Généralités sur les biosurfactants | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.1 Introduction..... | 2 |
| I.2 Classification..... | 2 |
| I.3 Production des biosurfactants..... | 3 |
| I.4 Techniques de criblage des souches productrices de biosurfactants | 5 |
| I.5 Paramètres influençant la production | 7 |
| I.6 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance | 8 |
| I.7 Concentration Micellaire Critique | 8 |
| I.8 Conclusion | 10 |
| Biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique | |
| II.1 Introduction | 11 |
| II.2 Applications des biosurfactants dans les industries..... | 12 |
| II.3 Applications des biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique..... | 13 |
| II.4 Conclusion | 15 |
| CHAPITRE II : Matériel et Méthodes | |
| III.1 L'origine des souches bactériennes | 16 |
| III.2 Criblage des souches productrices de biosurfactant..... | 17 |
| III.3 Optimisation de la production de biosurfactant..... | 17 |
| III.4 Extraction du biosurfactant..... | 18 |
| III.5 Caractérisation structurale du biosurfactant..... | 18 |
| III.6 Etude de stabilité du biosurfactant | 18 |
| III.7 Identification de la meilleure souche productrice du biosurfactant..... | 19 |
| III.7.1 Etude morphologique | 19 |
| III.7.1.1 Aspect macroscopique..... | 19 |
| III.7.1.2 Aspect microscopique..... | 19 |
| III.7.2 Etude biochimique..... | 20 |
| III.7.2.1 Métabolisme énergétique | 20 |
| III.7.2.2 Métabolisme glucidique..... | 22 |
| III.7.2.3 Métabolisme protéique..... | 23 |
| CHAPITRE III : Résultats et Discussions | |
| IV.1 Croissance bactérienne..... | 24 |
| IV.2 Criblage de deux souches bactériennes productrices de biosurfactants..... | 24 |
| IV.3 Optimisation de la production du biosurfactant..... | 25 |
| IV.3.1 Effet de la source de carbone..... | 26 |
| IV.3.2 Effet de la concentration de la source de carbone..... | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------------------|----|
| IV.4 Extraction du biosurfactant..... | 27 |
| IV.5 Caractéristiques du biosurfactant | 27 |
| IV.5.1 Structure FTIR..... | 27 |
| IV.5.2 Etude de la stabilité du biosurfactant..... | 28 |
| IV.5.2.1 Effet du pH..... | 28 |
| IV.5.2.2 Effet de la salinité..... | 29 |
| IV.5.2.3 Effet de la température..... | 30 |
| IV.6 Identification de la souche bactérienne K2N..... | 30 |
| IV.6.1 Caractères macroscopique..... | 30 |
| IV.6.2 Caractères microscopique..... | 31 |
| IV.6.3 Résultats des tests biochimiques..... | 32 |
| Conclusion générale | 35 |
| Références bibliographiques | 36 |
| Annexe | 45 |

Liste des figures et des tableaux

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Représentation schématique d'un tensioactif | 11 |
| Figure 2 : Schématisation de l'organisation des tensioactifs | 12 |
| Figure 3 : Différents types de biosurfactants produits par les microorganismes en utilisant des substrats solubles et/ou insolubles l'eau | 15 |
| Figure 4 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant | 20 |
| Figure 5 : Localisation de la région de Hassi Messaoud..... | 25 |
| Figure 6 : Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) | 26 |
| Figure 7 : Capacité de croissance pour les deux souches productrices de biosurfactant... | 35 |
| Figure 8 : Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant..... | 36 |
| Figure 9 : Influence de la concentration de pétrole pour la souche NIJ..... | 37 |
| Figure 10 : Influence de la concentration du gasoil pour la souche K2N..... | 37 |
| Figure 11 : Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche K2N | 39 |
| Figure 12 : Influence de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant de K2N | 40 |
| Figure 13 : Influence de la variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant K2N | 41 |
| Figure 14 : Influence de la variation de la température sur la stabilité du biosurfactant.... | 42 |
| Figure 15 : Aspect microscopique de la souche K2N..... | 44 |
| Figure 16 : Résultat de la galerie biochimique API 50 CH..... | 46 |
| Figure 17 : Identification de la galerie biochimique API50CH..... | 46 |
| | |
| Tableau 1 : Principaux microorganismes producteurs de biosurfactants..... | 14 |
| Tableau 2 : Résultat de la TS du surnageant pour chaque souche bactérienne..... | 34 |
| Tableau 3 : Caractères macroscopique de la colonie isolée par la souche K2N sur la gélose nutritive..... | 43 |
| Tableau 4 : Caractères microscopique de la souche K2N..... | 43 |
| Tableau 5 : Résultats du test biochimique..... | 44 |

Liste des abréviations

CMC : Concentration micellaire critique

LB : Luria Bertani

MM : Milieu minimum

t_{incub} : Temps d'incubation

T_{incub} : Température d'incubation

TS : Tension superficielle

INTRODUCTION

La plupart des surfactants disponibles sur le marché sont d'origine chimique dont ils présentent un risque pour la santé humaine et l'environnement à cause de leur toxicité (Vilpulanandan et Ren (2000)). C'est pour cette raison que les recherches scientifiques s'orientent vers les surfactants biologiques, notamment produits par des microorganismes, appelés biosurfactants. Ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces dans des conditions extrêmes (températures, pH et salinité) (Banat *et al.*, 2000).

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes ayant une capacité productrice élevée de biosurfactants. A cet effet une collection des souches bactériennes, isolées à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut et qui ont déjà montré des aptitudes à dégrader le pétrole et certains composés aromatiques, a été mise sur place afin d'investir sur le plan de la recherche appliquée dans le domaine de la biotechnologie environnementale et industrielle, très particulièrement dans les formulations pharmaceutiques. Ces souches ont été isolées dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de biomolécules au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioMol) de l'université Saad Dahlab de Blida.

Le présent travail a pour objectif (1) d'étudier le criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants et (2) la production et la caractérisation d'un biosurfactant produit par une souche thermophile. Des principaux facteurs affectant la production et la caractérisation de biosurfactant ont été étudiés à savoir : la nature de la souche, la nature et la concentration de la source de carbone et, la stabilité physicochimique de biosurfactant (température, pH et salinité).

Ce mémoire se subdivise en trois parties : La première représente une analyse de la littérature scientifique où sont exposées les données relatives aux biosurfactants et leurs différentes applications industrielles. La seconde partie, est réservée à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de notre travail. La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Introduction

Les tensioactifs sont des molécules capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement (Banat *et al.*, 2000 ; West et Harwell, 1992) .

En 2001, toutes les applications des tensioactifs représentent, à travers le monde, une consommation de 11 millions de tonnes par an. La plupart des surfactants disponibles sur le marché sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour la santé publique et l'environnement, car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (Vilpulanandan et Ren, 2000). C'est pour cette raison que les recherches scientifiques s'orientent depuis plusieurs années vers les tensioactifs biologiques, produits notamment par microorganismes, appelés biosurfactants. Ces derniers ont un nombre illimité d'utilisations qu'implique chaque industrie et chaque aspect de la vie, ils sont utilisés dans les industries : pétrolière, pharmaceutique, d'hygiène, cosmétique, ciment, agroalimentaire, textiles, peinture, détergents et nettoyage, etc. (Banat *et al.*, 2000 ; Desai et Banat, 1997).

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (figure 1). Généralement, le groupement hydrophile est constitué de glucides, acides aminés, cyclopeptides, alcools ou de polysaccharides (mono ou disaccharides) ; le groupement hydrophobe est constituée de longue chaîne d'acides gras saturés ou insaturés (Vilpulanandan et Ren, 2000).

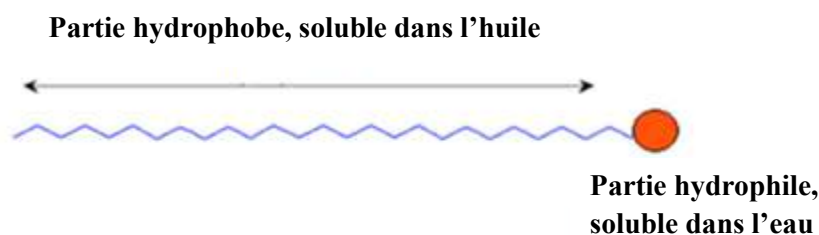


Figure 1 : Représentation schématique d'un tensioactif (Vilpulanandan et Ren, 2000)

A la surface d'un liquide, les tensioactifs s'organisent de telle sorte que la tête hydrophile soit au contact de l'eau et la chaîne hydrophobe orientée vers l'extérieur (figure 2).

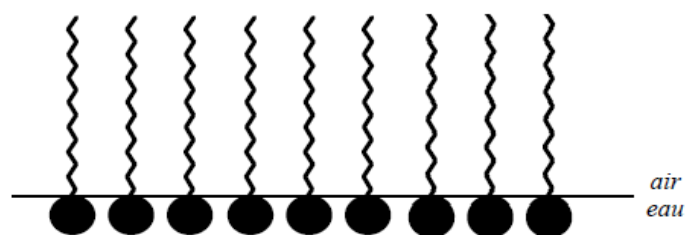


Figure 2. Schématisation de l'organisation des tensioactifs

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants :

- tensioactifs anioniques : leur partie hydrophile est chargée négativement ;
- tensioactifs cationiques : leur partie hydrophile est chargée positivement ;
- tensioactifs non ioniques : la molécule ne comporte aucune charge nette ;
- tensioactifs zwitterioniques ou amphotères : leur partie hydrophile comporte une charge positive et une charge négative, la charge globale est nulle. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre.

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre d'atomes de carbone ou son degré de ramification (Desai et Bana, 1997).

I. 2. Classification

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure de dissociation dans l'eau (cationique, anionique, nonionique et amphotères), les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

Selon la nature biochimique (composition chimique) du biosurfactant, on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres (Ron et Rosenberg, 2002 Healy *et al.*, 1996 ; Bognolo, 1999).

Les glycolipides, sont constitués de glucides en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides .

Les lipopeptides, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornitine sont les plus connus.

Les phospholipides, sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaîne lipidique et indique bien que présents dans tous les microorganismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire.

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

Les acides gras et lipides neutres, sont les biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.

On note que les biosurfactants de types glycolipides et phospholipides sont les plus connus et les plus étudiés.

I.3. Production de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes, notamment les bactéries, se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone. Le tableau 1 rassemble quelques microorganismes producteurs de biosurfactants.

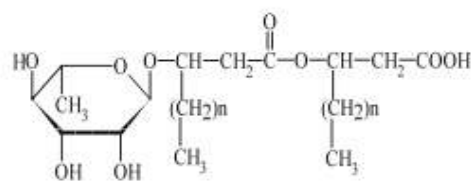
Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (Makkar et Cameotra, 2002).

Les bactéries utilisées pour produire de biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des composés insolubles (hydrocarbures). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de sélectionner les souches productrices de biosurfactants et d'optimiser les paramètres abiotiques influençant la production (sources de carbone et d'azote, température, salinité, pH, ...).

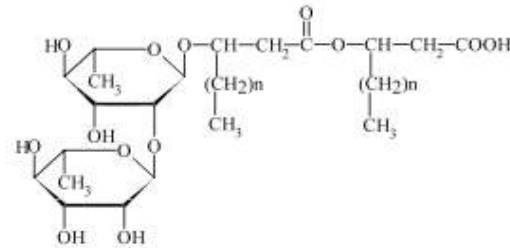
Tableau 1 : Principaux microorganismes producteurs de biosurfactants (Desai et Banat, 1997)

| Microorganisme | Type de biosurfactant |
|------------------------------------------|----------------------------------------|
| <i>Torulopsis bombicola</i> | Glycolipides |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Glycolipides |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | Lipoprotéines |
| <i>Pseudomonas sp. DMS 2847</i> | Lipoprotéines |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Glycolipides |
| <i>Arthrobacter paraffineus</i> | Glycolipides de sucrose et de fructose |
| <i>Arthrobacter</i> | Glycolipides |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Lipides de rhamnose |
| <i>Pseudomonas sp. MUB</i> | Lipides de rhamnose |
| <i>Torulopsis petrophilum</i> | Glycolipides et/ou protéines |
| <i>Candida tropicalis</i> | Acides gras complexes Polysaccharides |
| <i>Corynebacterium lepus</i> | Acides de corynomycoliques |
| <i>Acinetobacter sp.</i> | Acides gras, mono et diglycérides |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus Rag-1</i> | Lipoheteropolysaccharide, (Emulsane) |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus 2CAC</i> | Cellules entières (lipopeptide) |
| <i>Candida lipolytica</i> | Liposane (hydrate de carbone) |
| <i>Candida petrophilum</i> | Peptidolipides |
| <i>erythropolis Rhodococcus</i> | Lipides neutres |
| <i>eryithropolis Nocardia</i> | Dimycolates de Tréhalose |
| <i>Corynebacterium salvonicum SFC</i> | Lipides neutres |
| <i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i> | complexe de Polysaccharides-protéines |

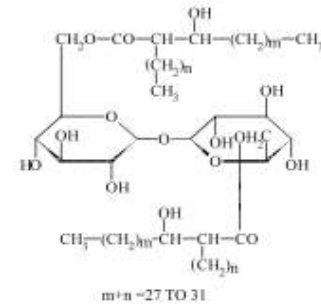
Généralement, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux rhamnolipides (Van dyke *et al.*, 1993). Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat *et al.*, 2000). Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi sécrétées dans le milieu. Les différentes structures de biosurfactants sont portées dans la figure 3.



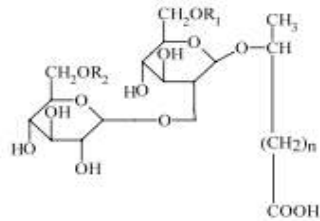
Monorhamnolipide



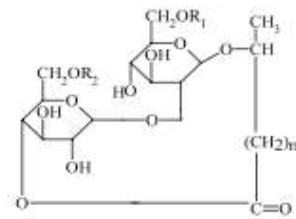
Dirhamnolipide



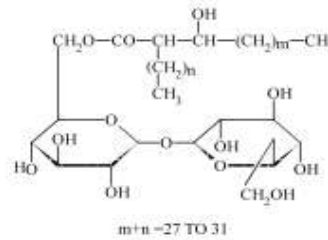
Trehalose dimycolates



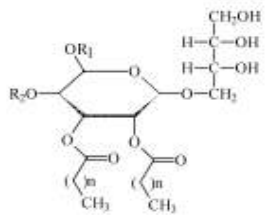
Acide Sophorolipide



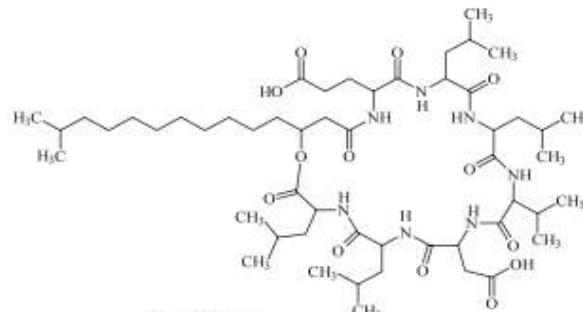
Lactonic Sophorolipide



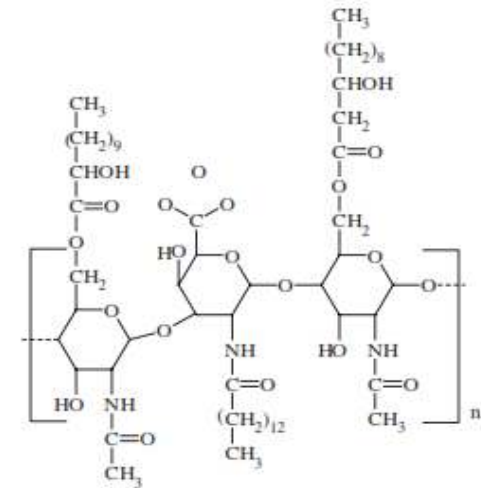
Trehalose monomycolates



Mannosylerythritol lipid



Surfactine



Emulsan

Figure 3 : Différents types de biosurfactants produits par les microorganismes en utilisant des substrats solubles et/ou insolubles dans l'eau (Banat *et al.*, 2000)

I.4. Méthodes de criblage des souches productrices de biosurfactants

La production du biosurfactant est estimée par plusieurs méthodes : test d'hydrophobicité de la surface cellulaire, test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et mesure de la tension de surface.

a. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

L'hydrophobicité de la surface cellulaire est un facteur important pour prédire l'adhésion des microorganismes aux surfaces hydrophobes (hydrocarbures). Le caractère hydrophobe de la surface externe des cellules microbiennes pourrait être utilisé pour mesurer le potentiel de l'affinité des cellules pour les substrats hydrophobes. Si l'hydrophobicité cellulaire est élevée, les microorganismes ont plus de chance d'adhérer aux gouttelettes d'huile, et par suite en améliorant leurs pouvoir biodégradatif des hydrocarbures. Pruthi et Cameotra (1997) ont trouvé une corrélation directe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la production de biosurfactant.

D'après les études de Lee et Yii (1996), il est permis de dire qu'une bactérie est hydrophobe quand le pourcentage d'adhésion est supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe quand le pourcentage est entre ces deux valeurs.

c. Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices de biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheimer et Avigad (Cameotra et Makkar, 1998), elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine (Lang et Wullbrandt, 1999) et les rhamnolipides (Gabet, 2004).

d. Tension de surface

Le phénomène de tension de surface peut être expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coûte de l'énergie, pour minimiser cette dernière, la plupart des liquides prennent la forme de la plus petite de surface. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation suivante :

$$\sigma_L = \frac{\sigma_w \cdot N_w \cdot \rho_L}{N_L \cdot \rho_w}$$

σ_L est la tension superficielle du liquide, σ_w est la tension superficielle de l'eau, N_L est le nombre de gouttes de liquide, N_w est le nombre de gouttes de l'eau, ρ_L est la densité du liquide, ρ_w est la densité de l'eau.

Le criblage des microorganismes producteurs de biosurfactants repose sur la mesure de tension superficielle du milieu de croissance, un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle.

I.5. Paramètres influençant la production

Le type et la quantité de biosurfactants produits varient avec la composition du milieu (source de carbone ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc).

a. Source de carbone

Généralement, la source de carbone est divisée en trois catégories à savoir: les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales. En effet, le type, la qualité et la quantité de biosurfactant sont influencés par la nature du substrat (Rahman et Gakpe, 2008). Les composés solubles (glucose, saccharose et glycérol) peuvent être utilisés comme source de carbone pour la production de biosurfactants (Desai et Banat, 1997). Cependant, la quantité produite en biosurfactant est inférieure à celle obtenue avec des substrats non miscibles tels que les n-alcanes et l'huile d'olive (Robert *et al.*, 1989).

b. Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactant. L'azote peut être apporté sous différentes formes (les sels d'ammonium, nitrates, l'urée, ...) selon les bactéries productrices (Patel et Desai, 1997). L'optimisation du rapport C/N est indispensable afin d'obtenir un bon rendement de production. Khopade *et al.*, (2012) ont trouvé un rapport optimale (C/N = 20) pour une production maximale de biosurfactant .

c. pH

Généralement, les milieux acido-basiques sont défavorables pour la production de biosurfactants. Par exemple, pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 (Haigh, 1996).

d. Sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitée en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (Gabet, 2004).

e. Oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (Abalos *et al.*, 2001).

f. Vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (Edwards *et al.*, 1991).

I.6. Propriétés de biosurfactants

Les biosurfactants ont de meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes comme la température, le pH et la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes.

a. Réduction des tensions superficielle et interfaciale

Les biosurfactants diminuent considérablement les deux tensions. Un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS) de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale (TI) eau/hexadécane de 40 à 1 mN/m (Mulligan, 2005).

b. Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables (Mulligan, 2005 ; Mohan *et al.*, 2006).

c. Faible toxicité

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux.

Il est à noter que la toxicité dépend de la structure des surfactants et non pas de leur origine. En générale, la toxicité est corrélée avec la chaîne grasse hydrophobe de surfactant ; plus la chaîne grasse est longue, plus l'hydrophobicité est élevée et par suite le tensioactif est plus toxique.

d. Pouvoir émulsifiant

Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants). Les biosurfactants à haut poids moléculaire sont en général mieux que ceux à faible poids moléculaire. A titre d'exemple, les Sophorolipides de *Torulopsis bombicola* ont montré leur capacité à réduire les tensions de surface et interfaciale, mais ils ne sont pas de bons émulsifiants (Cooper et Paddock, 1983). Par contre, le liposane a montré une mauvaise réduction de la tension de surface, mais il est utilisé avec succès pour émulsionner les huiles comestibles (Cirigliano et Carman, 1985).

e. Activité biologique

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les bactéries, champignons, algues et virus. D'autres utilisations médicalement appropriées des biosurfactants incluent leur rôle en tant qu'agents anti-adhésifs aux microbes pathogènes, les rendant utiles pour traiter beaucoup de maladies et en tant qu'agents thérapeutiques et probiotique. Un biosurfactant de glycolipide, a exercé l'inhibition de croissance et la différenciation en induisant des activités contre des variétés de cellules humaines de leucémie directement affecté par la transduction intracellulaire (Zhao *et al.*, 2010).

L'étude de l'activité antimicrobienne de biosurfactant produit par *Bacillus subtilis* R14 contre 29 contraintes bactériennes a démontré que les lipopeptides ont un large spectre d'action, y compris l'activité antimicrobienne contre des micro-organismes avec des profils résistants de multi-drogue (Tabatabaee *et al.*, 2005). Le biosurfactant (nature lipopeptidique) produit par la *Staphylococcus sp.* 1E a montré une activité bactéricide contre les bactéries *Staphylococcus aureus* (3,374 mg/ml), *Escherichia coli*, (6,75 mg/ml) *Pseudomonas aeruginosa* (6,75 mg/ml) et *Bacillus subtilis* (3,374 mg/ml), en revanche, aucune activité fongique n'a été observée contre la souche *Aspergillus niger* (Eddouaouda *et al.*, 2012). Les rhamnolipides inhibent la croissance des espèces nuisibles de bloom algale (*Heterosigma akashivo* et *Protocentrum dentatum*) pour des concentrations variant de 0,4 à 10 mg/l (Wang *et al.*, 2005).

f. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est définie comme étant la concentration au-delà de laquelle les molécules de tensioactifs s'associent et s'arrangent sous forme d'agrégats particuliers appelés micelles (Desai *et al.*, 1994). En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (Figure 4). La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale. La CMC d'un biosurfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (Abouseoud *et al.*, 2008).

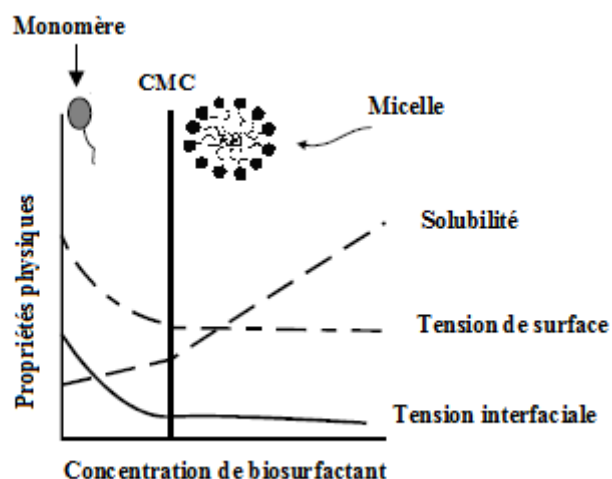


Figure 4 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant

I.7. Avantage des biosurfactants

Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont plusieurs avantages :

- Bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), salinité (jusqu'à 30%) et de température (jusqu'à 100 °C),
- Biocompatibilité et la digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels,
- Caractéristiques écologiques : biodégradables et non toxiques,
- Temps de stockage long,
- Production à partir des déchets industriels (substrat effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon, ...) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production.

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité, antiadhésive contre plusieurs microorganismes pathogènes. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, antitumeur et antimycoplasique. Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines comme agricoles, de nourriture, cosmétiques, pharmaceutiques (Hirata *et al.*, 2009 ; Velikonja J. and Kosaric, 1993 ; Ascì *et al.*, 2010). Récemment, les biosurfactants ont suscité beaucoup d'attention dans des critères de nanobiotechnologie (Joshi *et al.*, 2007).

I.8. Biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique

1.8.1. Principaux constituants des préparations pharmaceutiques

Devant la diversité des préparations pharmaceutiques existant sur le marché et les caractéristiques esthétiques qu'on leur demande, l'industrie chimique est obligée de produire une grande variété de matériaux de base qui peuvent être utilisés pour la formulation de ces préparations. Des principaux constituants les plus utilisés sont :

a- Constituants huileux

- Huiles Minérales, Vaselines et Cires Minérales,
- Huiles et Graisses Végétales et Animales.
- Cires Animales et Végétales.
- Alcools Gras et Stérols
- Huiles et Cires de Silicones

b- Eau et constituants polaires

Ils sont utilisés pour la préparation de produits sans huile, ainsi que dans les formulations contenant plus ou moins de composants apolaires : eau, alcools, Agents viscosants (mucilages, alginates, les dérivés de la cellulose, gélatine et bentonite).

c- Agents tensioactifs

Par la diversité de leurs fonctions, ils sont des constituants de première importance dans l'industrie pharmaceutique.

I.8.2. Implications biologiques de l'utilisation des tensioactifs chimiques

Les tensioactifs sont des substances chimiques qui peuvent interagir avec des membranes cellulaires, pouvant produire des effets indésirables. Ils peuvent altérer leur perméabilité et leur intégrité et par conséquent le processus de transport des solutés au travers de ces membranes. Ce processus semble dépendre d'interactions complexes avec les protéines de la paroi cellulaire et de la solubilisation de certains composés lipidiques.

En ce qui concerne l'épiderme, ils peuvent réduire son contenu en substances hydrosolubles et hygroscopiques, et aussi en lipides, altérant sa capacité naturelle à retenir l'eau, réduisant sa flexibilité et son élasticité et produisant une peau sèche et rêche.

Ils peuvent également augmenter la perméabilité de l'épiderme en dénaturant les protéines de la couche cornée et faciliter la diffusion de molécules polaires dans l'épiderme. Ils sont aussi capables de modifier le métabolisme de l'épiderme, tant des lipides (réduisant la synthèse des phospholipides) que des acides nucléiques et nucléotides, et de réduire son activité

respiratoire (Attwood et Florence, 1983). C'est pour cette raison, qu'on s'oriente vers l'augmentation importante de la production des biotensioactifs.

1.8.3. Applications des biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique

Les applications des biosurfactants les plus significatifs ont été étudiées dans la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures (Zhang *et al.*, 2010). En outre de tous ces avantages, les biosurfactants ont un grand nombre de bioactivités : empêcher la croissance bactérienne (Inoh *et al.*, 2001), inhiber la croissance de tumeur, c'est un antibiotique, il a les effets sur la migration des neutrophiles humaines, l'activité anti-asthme, il aide dans la digestion de nourriture (Kitamoto *et al.*, 2002), inhibe la synthèse de paroi cellulaire et ils ont les propriétés fongicides (Rodrigues *et al.*, 2006b).

1.9. Conclusion

Les composés tensio-actifs chimiquement synthétisés sont employés couramment dans les industries alimentaires pharmaceutiques, cosmétiques, de pétrole, etc. Cependant, avec les avantages de la biodégradabilité, la non toxicité et de la production sur des substrats de ressource renouvelable, les biosurfactants peuvent remplacer les agents tensioactifs qui sont chimiquement synthétisés.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1. Origine des souches bactériennes

Le biotope utilisé, pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie (figure 5). Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs. La méthode d'adaptation progressive, en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, a permis d'isoler des souches à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures et leurs dérivés. Les différentes caractéristiques de ce biotope sont données en annexe I (Eddouaouda, 2012).

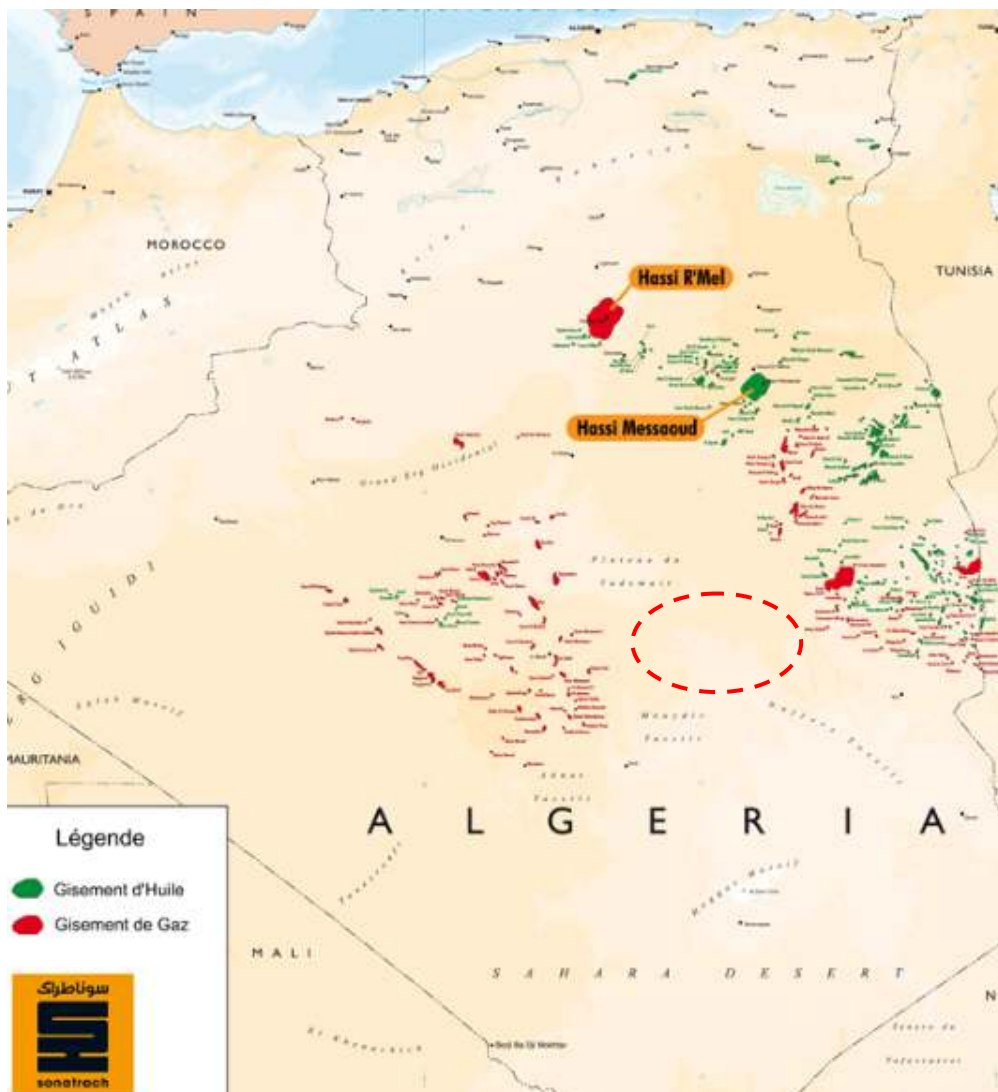


Figure 5 : Localisation de la région de Hassi Messaoud

La figure 6 montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes à fort potentiel de dégradation hydrocarbures et productrices de biosurfactants. L'annexe I donne la caractérisation physicochimique de biotope utilisé pour l'isolement.



Figure 6 : Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) (Eddouaouda, 2012)

II.2. Isolement des souches bactériennes

Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées dans le cadre de travaux de thèse de doctorat de Mr. Eddouaouda (2012) (voir annexe II).

II.2. Criblage des souches productrices de biosurfactant

Repiquage : Les souches bactériennes utilisées dans cette étude (sept souches) ont été repiquées sur milieu solide en boîtes de Pétri. Après l'incubation à 45 °C pendant 24 heures, les souches sont conservées à 4 °C pour une durée de 4 à 6 semaines, afin de pouvoir toujours disposer des souches viables (Joshi *et al.*, 2008).

Préparation de la culture bactérienne : Les souches conservées à 4 °C ont étéensemencées sur milieu liquide LB (voir composition en annexe II) et puis incubées à 45 °C pendant 16 h pour avoir un bon trouble de croissance. Ces dernières cultures ont servi à inoculer les milieux qui seront employés pour suivre la production de biosurfactants.

Sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant : Les expériences ont été réalisées dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu minimum MM (voir composition en annexe II), additionné de 1% du pétrole brute comme source unique du carbone et énergie. Ce milieu liquide est inoculé avec 1% d'une culture bactérienne issue de

l'étape précédente. L'incubation s'effectue à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 2 jours.

Le criblage est basé sur la mesure de la TS du surnageant après centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes. La TS a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre manuelle de Krüss (Annexe III). L'instrument est calibré avec l'eau ultra pure (72 mN/m) et avec l'éthanol pur (22,7 mN/m). Avant l'utilisation, l'anneau de platine est séquentiellement lavé avec l'acétone.

II.3. Optimisation de la production de biosurfactant

Deux facteurs intéressants ont été testés sur la production du biosurfactant : nature de la source de carbone et sa concentration. De ce fait, cinq sources de carbone ont été utilisées (liquides hydrophobes insolubles dans l'eau) à différentes concentrations (0,25 % ; 0,5 % ; 1 % ; 2 % et 3 %) : gasoil, huile de friture, huile d'olive, huile de moteur et pétrole. La sélection de la source optimale est basée sur la mesure de la TS.

II.4. Extraction du biosurfactant

Après 48 heures d'incubation, le bouillon de culture a été centrifugé à 7000 tr/min pendant 20 min. Le surnageant dépourvu de cellules correspond au biosurfactant brut, ce dernier a été ajusté à un pH de 2 au moyen d'une solution de HCl (3 N). Ensuite, il est laissé au repos pendant une nuit à 4 °C. Le précipité est récupéré par centrifugation à 7000 tr/min pendant 20 min. L'extraction a été effectuée une fois (v : v) à l'aide d'acétate d'éthyle. Le solvant a été ensuite enlevé à l'aide d'un rotavapeur (Singleton, 1999).

II.5. Caractérisation structurale du biosurfactant

La caractérisation structurale du biosurfactant a été effectuée au moyen d'analyse spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de la poudre sèche de biosurfactant en le balayant dans la gamme de 500 - 4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} . Le spectrophotomètre à transformée de Fourier IRTF est de marque Jasco type IRTF-8900 (Voir l'annexe IV).

II.6. Etude de la stabilité du biosurfactant

Cette étude a été réalisée sur le surnageant correspondant au biosurfactant brut. Le contrôle s'effectue après 24 heures par la mesure de la tension superficielle.

➤ *Stabilité chimique*

Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions HCl ou NaOH. Pour examiner également l'effet de la salinité, le biosurfactant a été soumis à différentes concentrations en chlorure de sodium (NaCl) : 20, 50, 100, 200 et 300 % (p/v). Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24 h avant de mesurer la TS.

➤ *Stabilité thermique*

Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 22, 45, 70 et 100 °C pendant 24 h.

II.7. Identification de la souche performante productrice de biosurfactant

L'identification de la souche performante productrice de biosurfactant est réalisée en se basant sur les études morphologique et biochimique.

II.7.1. Etude morphologique

II.7.1.1. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, les critères d'identifications macroscopiques sont (Singleton *et al.*, 2001):

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La chromogénèse: couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc.

II.7.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de GRAM, l'état frais permet de déterminer la forme, l'arrangement et la

mobilité des bactéries. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100 (Marchal et Bourdon, 1982). La coloration de GRAM est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Gram+ ou Gram -) (Tortora *et al.*, 2003).

II.7.2. Etude biochimique

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique Api 50 CH appliquée à la meilleure souche productrice de biosurfactant. La galerie biochimique permet en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Bodour *et al.*, 2004).

Tous les tests du métabolisme énergétique, glucidique et protéique sont réalisés en utilisant la galerie Api 50 CH (Annexe V).

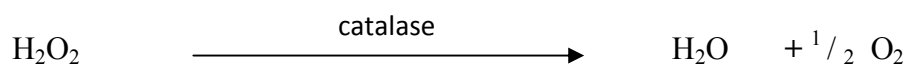
II.7.2.1 Métabolisme énergétique

Étude du type respiratoire : Le type respiratoire est mis en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande-foie) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1 cm.

Après incubation des milieux à 30°C pendant 24 heures, 4 types respiratoires peuvent être distingués :

- Croissance en surface: bactéries aérobies strictes.
- Croissance en profondeur: bactéries anaérobies strictes.
- Croissance le long du tube: bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- Croissance dans la partie supérieure proche de la surface: bactéries microaérophiles.

Recherche de la catalase : La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante:



Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par

l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspond à l'oxygène dégagé (Singleton, 1999).

Recherche de l'oxydase : Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-dimethylparanitrophénylène-diamine, qui aura été préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (Tortora *et al.*, 2003).

Recherche du nitrate réductase : L'étude de la réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réduction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote moléculaire (N₂).

A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30 °C en bouillon nitraté ensemencé avec la souche étudiée, cinq gouttes de réactif de Griess sont ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est rose ou rouge ; les nitrates sont réduits en nitrites, on parle de nitrate réductase positive (NR⁺).
- Lorsque le milieu reste incolore ; de la poudre de zinc est ajoutée (réducteurs des nitrates) ; après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés : Si le milieu devient rose ou rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie, donc la bactérie est de nitrate réductase négative NR⁻. Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites: nitrate réductase positive NR⁺ (Tortora *et al.*, 2003).

II.7.2.2 Métabolisme glucidique

L'étude de la voie d'attaque des glucides permet de distinguer les bactéries à métabolisme oxydatif ou fermentatif (Singleton, 1999).

Étude des différentes voies fermentatives intermédiaires : L'étude des différentes voies fermentatives intermédiaires permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges Proskauer, VP) (Marchal et Bourdon, 1982).

Recherche de la β -galactosidase : Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la galactosidase. Le test ONPG permet de mettre en évidence la β -galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl -D-galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est composé d'une molécule de glucose et une molécule de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

Utilisation des sucres : La voie d'utilisation des sucres permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz), du lactose, du saccharose et d'autre part, la production d'hydrogène de sulfate (H_2S) (Singleton, 1999)

Utilisation du citrate comme source de carbone : Le milieu utilisé ne contient que le citrate comme seule source de carbone. Seules les bactéries possédant un citrate perméase seront donc capables de se développer sur ce milieu en provoquant la libération des OH qui alcalinisent le milieu, donc il y aura virage au bleu (Joffin et Leyral, 2006).

II.7.2.3 Métabolisme protéique

Recherche des décarboxylases : Les décarboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondante avec la libération de CO_2 . Il s'agit d'enzymes induites, dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH = 3,5 - 5,5) et des conditions d'anaérobiose (Singleton, 1999).

Recherche de l'uréase : toutes les bactéries hydrolysent l'urée (Joffin et Leyral 2006).

Production d'indole : La production d'indole est mise en évidence par utilisation de tryptophane exempt d'indole (Singleton, 1999).

Recherche du tryptophane désaminase (TDA) : La désaminase agit sur le L tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer une coloration brune (Joffin et Leyral, 2006).

Recherche des protéases : En pratique, une seule protéase est recherchée ; la gélatinase ou collagénase, qui hydrolyse le collagène en acides aminés ou en peptides. La mise en évidence de la gélatinase utilise comme substrat la gélatine fabriquée à partir du collagène (Soberón-Chávez et Maier, 2011).

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les souches bactériennes aérobies utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). Deux types de souches thermophiles ont été isolés à 45 et à 55 °C (Eddouaouda, 2012).

Selon la bibliographie, peu de travaux ont été réalisés à des températures supérieures à 40 °C, ceci montre l'importance des souches thermophiles utilisées dans notre cas d'étude.

III.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

Le criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants a été examiné par la mesure de la tension superficielle du surnageant ; la faible TS indique la présence du biosurfactant, le tableau 2 donne les différentes valeurs de la TS du surnageant pour les souches bactériennes testées.

Tableau 2 : Valeurs de la TS du surnageant pour chaque souche bactérienne ($T_{incub} = 40^{\circ}C$, pétrole brut (1%, v/v), $t_{incub} = 48$ h, 150 tr/min)

| Souche bactérienne | K1A | K1J | K2C | K7A | K7H | K2N | NIJ |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TS (mN/m) | 45 | 48 | 41 | 40 | 43 | 38 | 29 |

D'après les valeurs de la TS, on peut dire que les deux souches bactériennes NIJ et K2N montrent une production de biosurfactants en utilisant le pétrole brute comme source de carbone. Par contre, les autres souches n'ont pas la capacité de production du biosurfactant à cause de leurs TS qui sont supérieurs ou égaux à 40 mN/m. Notons qu'un biosurfactant plus actif peut réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 30 mN/m et la tension interfaciale eau/hexadécane de 40 à 1 mN/m (Persson *et al.*, 1988).

La figure 7 montre la capacité de deux souches bactériennes choisies à croître sur un substrat insoluble (pétrole brut) traduit généralement par la production de biosurfactant. A cet effet, ces deux souches NIJ et K2N sont retenues comme souches performantes productrices de biosurfactants pour poursuivre le travail.

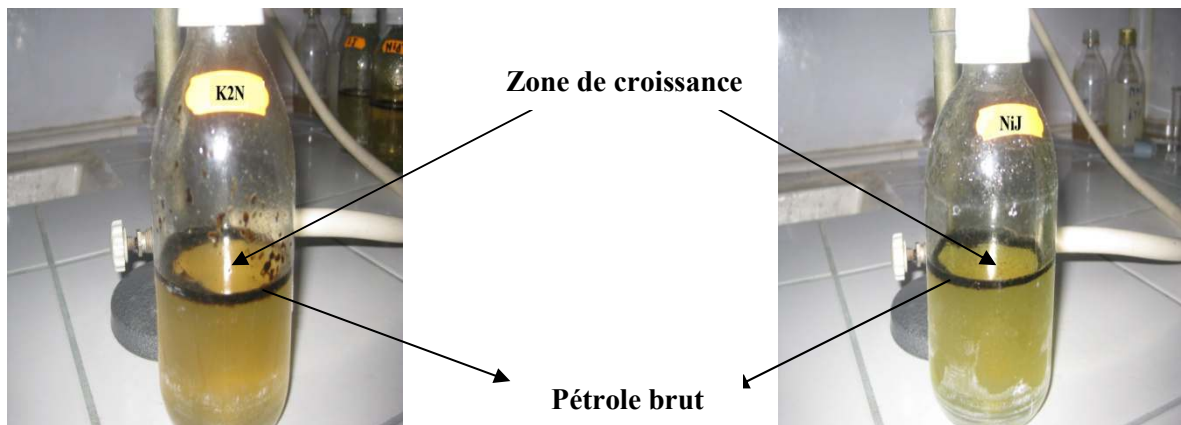


Figure 7 : Capacité de croissance de deux souches bactériennes sur le pétrole brut

III.2. Optimisation de la production du biosurfactant

Afin d'évaluer l'effet de la nature de la source de carbone sur la production du biosurfactant par les deux souches performantes (K2N et NIJ), Cinq types de substrats (liquides hydrophobes insolubles dans l'eau) ont été utilisés : huile d'olive, huile de friture, huile de moteur, gasoil et pétrole brut. La concentration utilisée est de 1% (v/v).

III.2.1. Effet de la source de carbone

L'étape de l'optimisation a prouvé qu'il y a des conditions spécifiques pour produire le maximum de biosurfactant. La souche NIJ (figure 8a) donne une meilleure production de biosurfactant en présence du pétrole brut traduit par une valeur minimale de la TS (30,4 mN/m). En revanche, l'utilisation du gasoil entraîne une bonne réduction de la TS (29,3 mN/m) pour la souche bactérienne K2N (figure 8b). D'après ces résultats, on a sélectionné le pétrole brut et le gasoil comme sources de carbone optimales respectivement pour les souches NIJ et K2N.

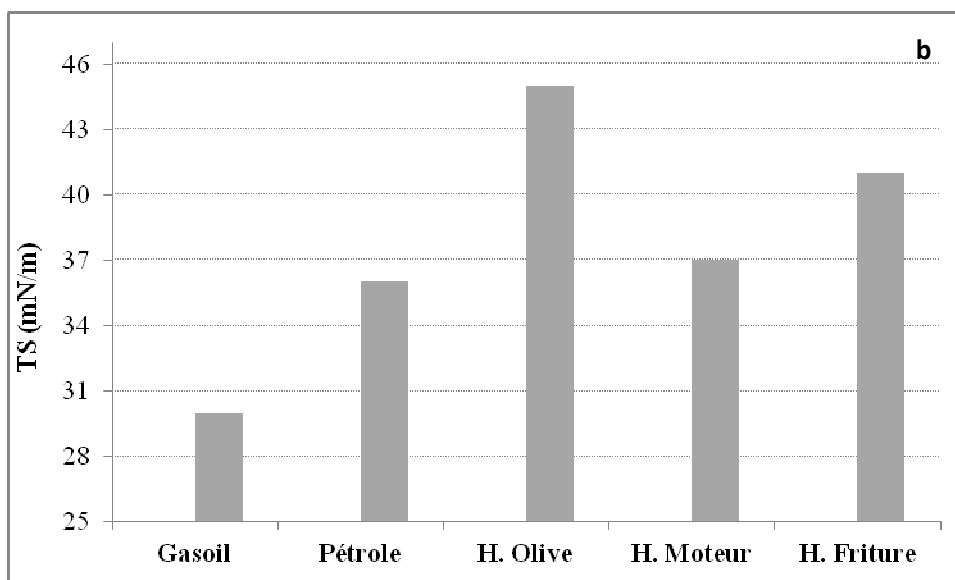
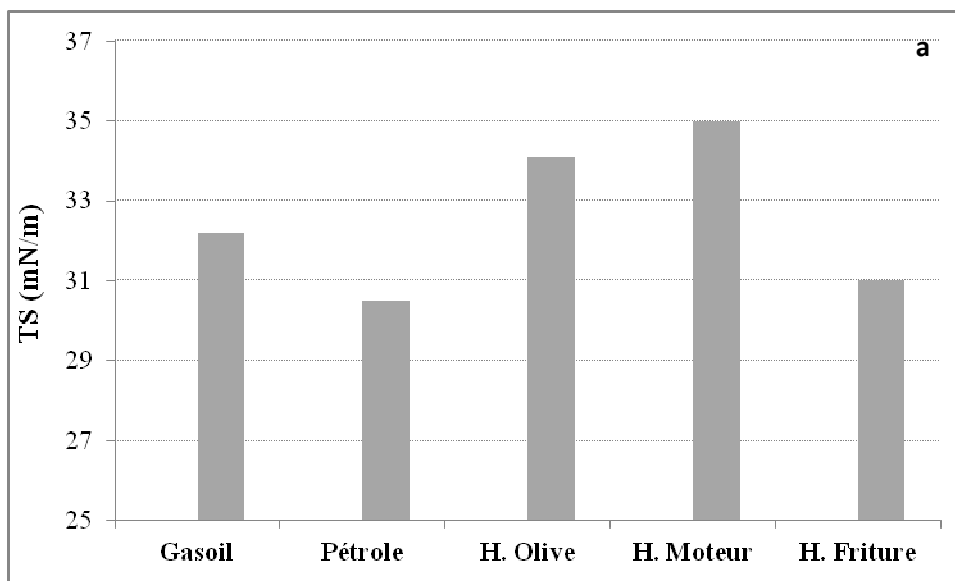


Figure 8: Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant
 (source de carbone : 1%, v/v, $T_{incub} = 45^{\circ}C$, $t_{incub} = 48$ h, 150 tr/min)
 a- souche NIJ , b- souche K2N

Plusieurs travaux ont sélectionné une variété de sources de carbone pour une meilleure production de biosurfactant, le gasoil et le pétrole (Ilori *et al.*, 2005), l'hexadécane (Ferhat *et al.*, 2011 ; Abousaoud, 2008), l'huile de tournesol résiduelle de friture (Sadouk *et al.*, 2008), l'huile d'olive (Eddouaouda *et al.*, 2012), le pétrole et l'huile d'olive (Rahmani, 2013).

III.2.2. Effet de la concentration de la source de carbone

L'optimisation de la concentration de la source de carbone est une étape importante pour augmenter la quantité en biosurfactant. Les figures 9 et 10 montrent l'effet de la concentration du substrat sur la réduction de la TS.

D'après les résultats obtenus, les faibles concentrations en substrat améliorent la production en biosurfactant. Par exemple, une concentration de 1% (v/v) de pétrole brut a réduit la TS jusqu'à une valeur de 29 mN/m pour la souche bactérienne NIJ. En présence de la souche K2N, le gasoil a significativement abaissé la TS (25 mN/m) pour une concentration de 0,5 %. On note que très peu de travaux ont arrivé à réduire la TS à des valeurs inférieures à 25mN/m. Donc, en présence du gasoil, le biosurfactant produit par la souche K2N a montré un pouvoir exceptionnel de réduction de la TS.

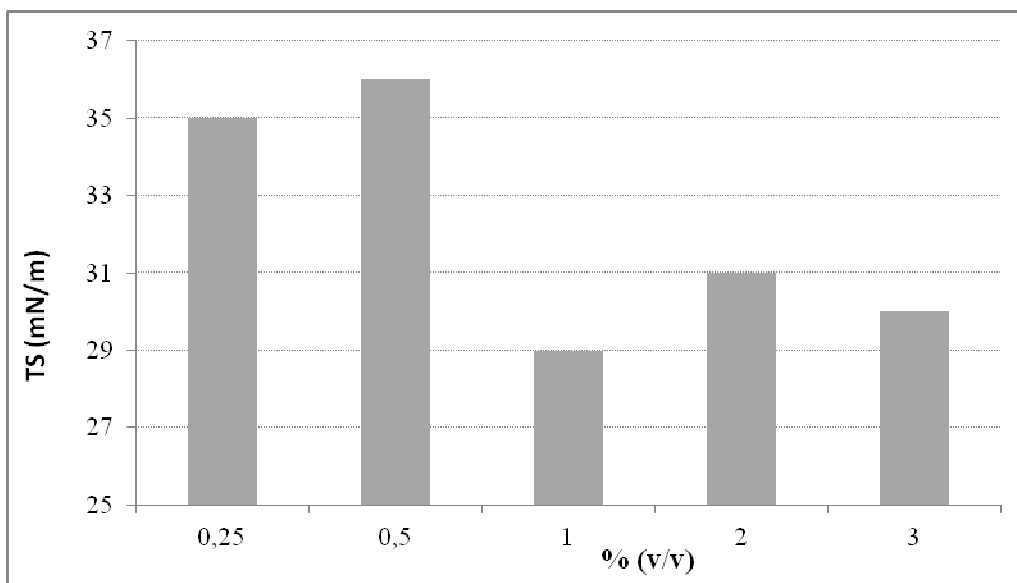


Figure 9 : Influence de la concentration du pétrole sur la TS pour la souche NIJ

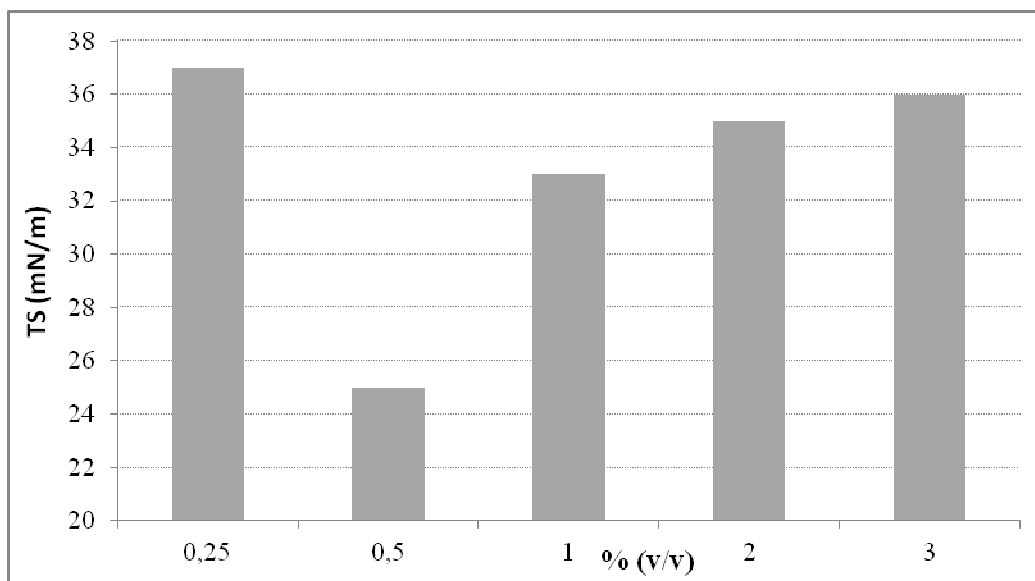


Figure 10 : Influence de la concentration du gasoil sur la TS pour la souche K2N

En conclusion, on peut dire que la nature et la concentration de la source de carbone jouent un rôle primordial dans l'amélioration de la production de biosurfactant traduit par la réduction de la tension de surface.

III.3. Récupération et caractérisation de biosurfactant produit par la souche thermophile K2N

Nous avons choisi la souche K2N pour la production de biosurfactant et également étudier ses caractérisation.

Les conditions de production sont :

- Milieu de culture : milieu minimum (MM),
- Source de carbone : diesel (0,5%, v/v),
- Température d'incubation est fixée à 45 °C,
- Temps d'incubation est de 48h,
- pH = 7,0,
- Agitation est de 150 tr/min.

III.3.1. Extraction du biosurfactant

La récupération du biosurfactant dépend principalement de : la charge ionique, la solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques et de la localisation (extracellulaire, intracellulaire ou lié à la cellule). La majorité des biosurfactants sont secrétés dans le milieu.

Le biosurfactant obtenu par la souche K2N, en présence de gasoil (0,5%) comme source de carbone a été soumis à l'extraction par l'acétate d'éthyle. Le rendement obtenu est de 3,2 g/l.

III.3.2 Caractérisation du biosurfactant

III.3.2.1. Analyse par FTIR

L'analyse de spectre d'absorption FTIR (enregistré en absorbance) a permis d'identifier la totalité des bandes d'absorption correspondant à la présence des différents groupements chimiques dans le biosurfactant. Par suite, de prédire les constituants concernés comme le montre la figure 11. Les résultats obtenus montrent que :

- Les bandes situées à 3545,59 , 3468,55 et 3415,60 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons O-H dans les alcools.
- Les bande située à 2953,13 et 2858, 40 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons -C-H dans les alcanes (-CH₃ et -CH₂-).
- Le pic d'élongation situé à 1261,70 cm^{-1} est affecté aux liaisons de C-O dans les alcools.
- Une bande intense située à 1627,16 cm^{-1} résulte probablement des vibrations d'élongation des liaisons C=C dans alcènes ou des liaisons C=O dans les acides carboxyliques.
- Les deux pics situés à 1458,58 et 1387,14 cm^{-1} résultent de vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcanes et
- Les deux bandes 1096,23 et 1024,83 cm^{-1} sont probablement dues aux vibrations déformation des liaisons C-O dans les alcools secondaires C-O-C dans les éthers.
- Le pic situé à 804,73 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcènes (C=C).

D'après ces observations, le biosurfactant de la souche KN2 est probablement de nature glycolipidique (combinaison entre les glucides et chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides

hydroxyaliphatiques). Cependant, d'autres types d'analyses sont nécessaires pour une identification plus détaillée, telles que les analyses biochimique (identification des lipides, glucides et protéines) et LC-MS (détermination de la masse moléculaire du produit et des masses des fragments (ions)).

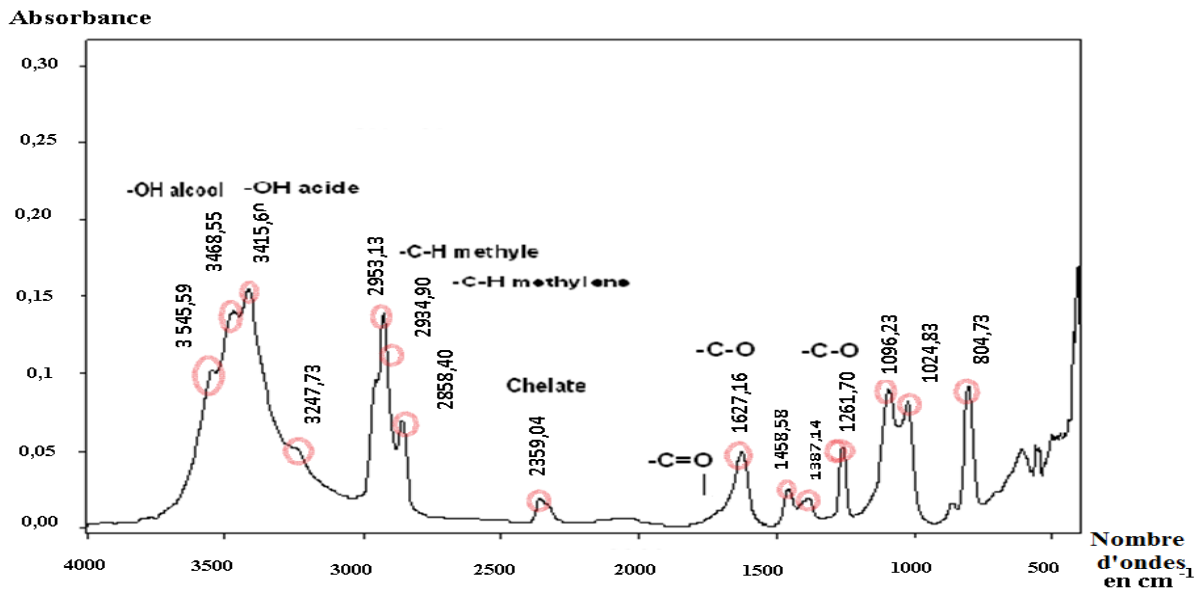


Figure 11 : Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche K2N

III.3.2.2. Etude de stabilité du biosurfactant

L'application industrielle du biosurfactant dépend de sa stabilité aux différentes variables telles que le pH, la température et le degré de la salinité.

III.3.2.2.1. Effet du pH

Selon les résultats obtenus (figure 12), le biosurfactant montre une grande stabilité aux changements de pH de 2 à 12. A titre d'exemple les valeurs de la tension de surfaces aux pH : 2, 6 et 12, sont 27, 25 et 26 mN/m respectivement. Ces résultats obtenus montrent l'intérêt de son application des les milieux acido-basiques.

Haddad *et al.* (2009) ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN/m. A un pH = 3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN/m) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide.

En variant le pH de 2 à 12, le biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E garde son activité tensioactive (30 – 31,5 mN/m) (Eddouaouda *et al.*, 2012).

Egalement, les travaux réalisés par Danyelle *et al.* (2013) ont montré que le biosurfactant issu de la souche *Candida lipolytica* présente une bonne résistance (TS = 33,8 mN/m) dans les milieux acides (pH = 2), cependant une légère augmentation de la TS (35,1 mN/m) a été enregistrée dans les milieux alcalins (pH = 12)

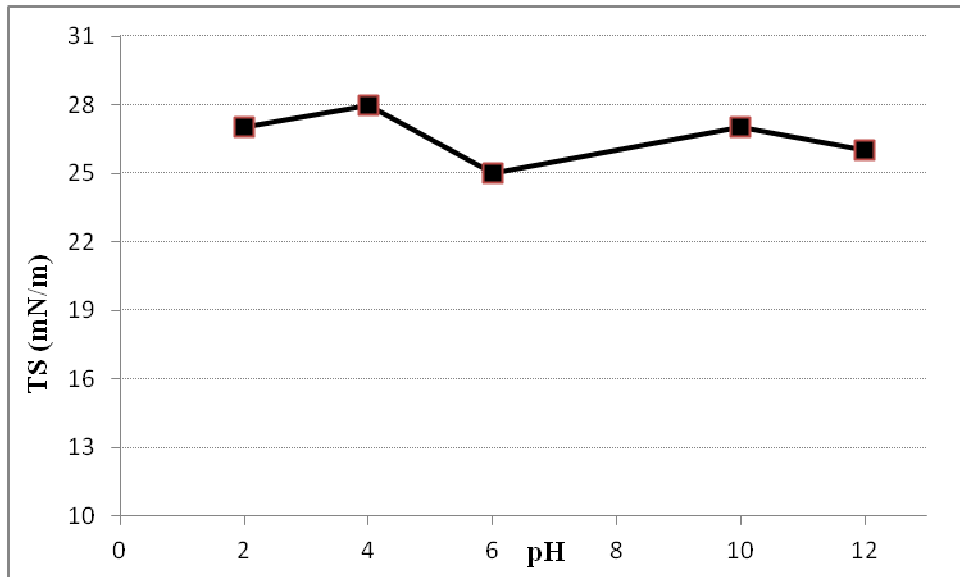


Figure 12 : Influence de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant de K2N

III.3.2.2.2. Effet de la salinité

Le biosurfactant de la souche K2N montre une stabilité remarquable dans les milieux salés dont la salinité allant jusqu'à 100 g/l. Au delà, une légère augmentation de la TS a été observée. Cependant, la différence entre les valeurs de la tension de surface ne dépasse pas les 6 mN/m dans la gamme de la salinité étudiée. La tension de surface minimale enregistrée était de 25 mN/m comme le montre la figure 13.

Selon Desai et Banat (1997), des concentrations en sel supérieures à 2% sont suffisantes pour inactiver les tensio-actifs synthétiques.

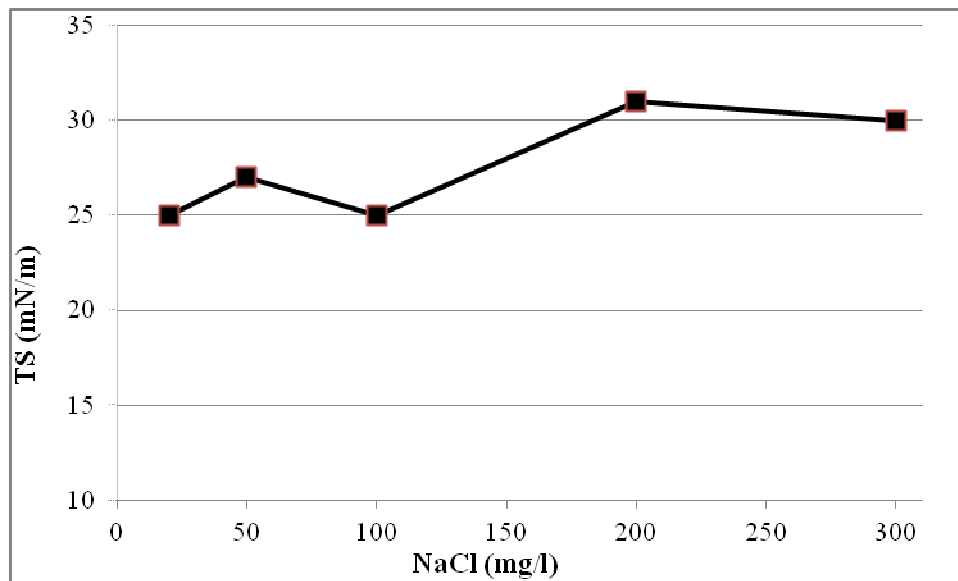


Figure 13 : Influence de la variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant K2N

III.3.2.2.3. Effet de la température

Selon les résultats présentés dans la figure 14, nous avons observé que le biosurfactant présente une excellente stabilité dans la gamme de température variant de 20 à 100 °C. Dans cette gamme, la TS reste presque constante (aux alentours de 25,5 mN/m). Notons que les eaux froides (4 °C) augmentent la TS de la solution en biosurfactant de K2N jusqu'à 30 mN/m. Cependant, à cette valeur de TS et d'après la littérature le biosurfactant est considéré efficace. Donc, on peut dire que ce biosurfactant maintient ses propriétés tensioactives dans la gamme de température de 20 à 100 °C.

Les résultats obtenus par Brown (1999) indiquent que l'exposition de biosurfactant, produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique de biosurfactant. D'autre part, Makkar et Cameotra (2002) ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C. Egalement, Khopade *et al.* (2102) ont trouvé que le biosurfactant issu de la *Nocardiopsis sp.* B4 a montré une résistance aux températures élevées (jusqu'à 100 °C).

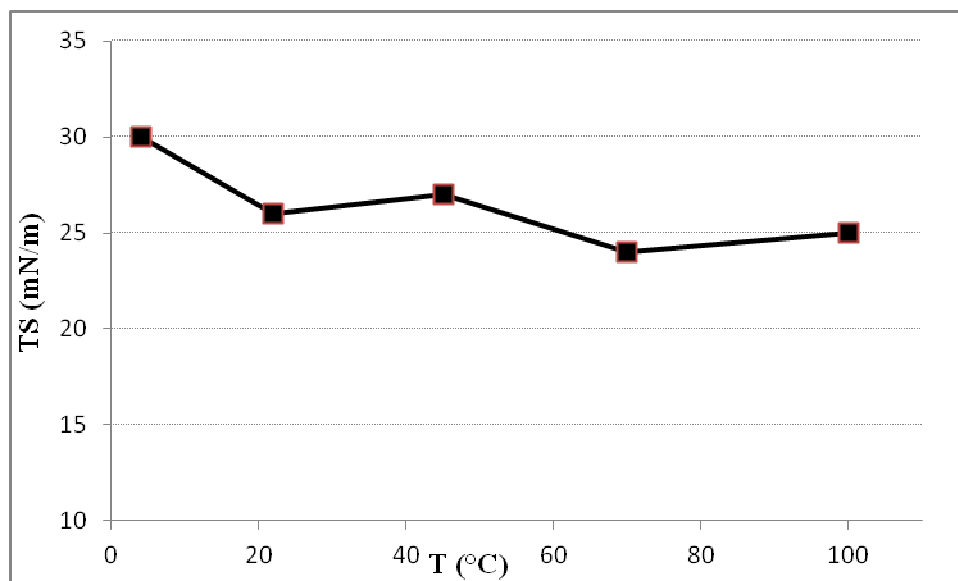


Figure 14 : Influence de la variation de la température sur la stabilité du biosurfactant

Ces résultats montrent l'avantage de l'utilisation des tensioactifs biologiques par rapport aux leurs homologues chimiques.

III.4. Identification de la souche bactérienne K2N

III.4.1. Caractères macromorphologiques

Les caractères macroscopiques de la souche K2N sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères macroscopiques de la colonie isolée à partir de la souche K2N sur le gélose nutritive

| Souche | K2N |
|--------------------|----------------|
| Critères | |
| Diamètre | 2 mm |
| Chromogènes | Blanc jaunâtre |
| Forme | Circulaire |
| Élévation | Bombée |
| Contour | Régulier |
| Surface | Granulaire |
| Consistance | Crémeuse |

III.4.2. Caractères micromorphologiques

D'après nos observations, il ressort que la bactérie isolée de la souche K2N est mobile et à GRAM positif, sa forme est de coccobacille. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractères microscopiques de la souche K2N

| Critères Souche | Après Coloration de GRAM | | |
|--------------------|--------------------------|---------|----------|
| | Forme | Gram | Mobilité |
| K2N | Coccobacilles | Positif | Mobile |

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram, elle est visualisée sur la figure 15.

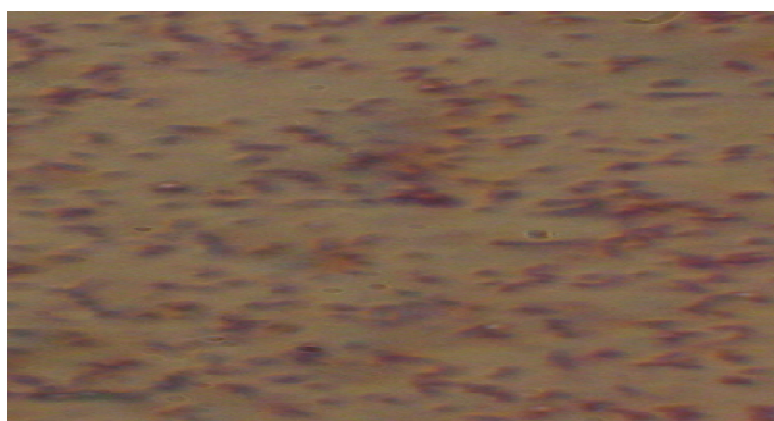


Figure 15 : Aspect microscopique de la souche K2N (microscope optique, $\times 100$)

III.4.3. Résultats des tests biochimiques

Les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des tests biochimiques après lecture de l'API CH 50

| | Abréviations | Sucre | Après 48 h | | Abréviations | Sucre | Après 48 h |
|----|---------------------|---------------------------|-------------------|----|---------------------|---------------------------|-------------------|
| 0 | 0 | Témoin | Négatif | 31 | SAC | D-Saccharose | Positif |
| 1 | GLY | Glycérol | Positif | 32 | TRE | D-Tréhalose | Positif |
| 2 | ERY | Erythritol | Négatif | 33 | INU | Inuline | Négatif |
| 3 | DARA | D-Arabinose | Négatif | 34 | MLZ | D-Mélézitose | Négatif |
| 4 | LARA | L-Arabinose | Positif | 35 | RAF | D-Raffinose | Négatif |
| 5 | RIB | D-Ribose | Positif | 36 | AMD | Amidon | Positif |
| 6 | DXYL | D-Xylose | Positif | 37 | GLYG | Glycogène | Positif |
| 7 | LXYL | L-Xylose | Négatif | 38 | XLT | Xylitol | Négatif |
| 8 | ADO | D-Adonitol | Négatif | 39 | GEN | Gentiobiose | Positif |
| 9 | MDX | Méthyl-βD-Xylopyranoside | Négatif | 40 | TUR | D-Turanose | Positif |
| 10 | GAL | D-Galactose | Positif | 41 | LYX | D-Lyxose | Négatif |
| 11 | GLU | D-Glucose | Positif | 42 | TAG | D-Tagatose | Positif |
| 12 | FRU | D-Fructose | Positif | 43 | DFUC | D-Fucose | Négatif |
| 13 | MNE | D-Mannose | Positif | 44 | LFUC | L-Fucose | Négatif |
| 14 | SBE | L-Sorbose | Négatif | 45 | DARL | D-Arabitol | Négatif |
| 15 | RHA | L-Rhamnose | Négatif | 46 | LARL | L-Arabitol | Négatif |
| 16 | DUL | Dulcitol | Négatif | 47 | GNT | Potassium Gluconate | Positif |
| 17 | INO | Inositol | Négatif | 48 | 2KG | Potassium 2-CétoGluconate | Négatif |
| 18 | MAN | D-Mannitol | Positif | 49 | 5KG | Potassium 5-CétoGluconate | Négatif |
| 19 | SOR | D-Sorbitol | Positif | 31 | SAC | D-Saccharose | Positif |
| 20 | MDM | Méthyl-αD-Mannopyranoside | Négatif | 32 | TRE | D-Tréhalose | Positif |
| 21 | MDG | Méthyl-αD-Glucopyranoside | Positif | 33 | INU | Inuline | Négatif |
| 22 | NAG | AcétylGlucosamine | Positif | 34 | MLZ | D-Mélézitose | Négatif |
| 23 | AMY | Amygdaline | Positif | 35 | RAF | D-Raffinose | Négatif |
| 24 | ARB | Arbutine | Positif | 36 | AMD | Amidon | Positif |
| 25 | ESC | Esculine | Positif | 37 | GLYG | Glycogène | Positif |
| 26 | SAL | Salicine | Positif | 38 | XLT | Xylitol | Négatif |
| 27 | CEL | D-Cellobiose | Positif | 39 | GEN | Gentiobiose | Positif |
| 28 | MAL | D-Maltose | Positif | 40 | TUR | D-Turanose | Positif |
| 29 | LAC | D-Lactose | Négatif | 41 | LYX | D-Lyxose | Négatif |
| 30 | MEL | D-Melibiose | Négatif | 42 | TAG | D-Tagatose | Positif |

Selon la morphologie macroscopique et microscopique, les caractères biochimiques de la souche bactérienne K2N, et surtout selon le tableau d'identification de la galerie biochimique API CH 50, la souche bactérienne thermophile **K2N** a été affiliée à l'espèce *Bacillus Licheniformis*. Les figures 16 et 17 montrent les tests biochimiques par la galerie biochimique API 50.



Figure 16 : Résultat de la galerie biochimique Api 50 CH



Figure 17 : Identification de la galerie biochimique Api 50 CH pour *Bacillus licheniformis*

Conclusion générale

L'objectif de ce travail était d'étudier la capacité des souches bactériennes thermophiles, isolées à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région Hassi-Messouad, de produire de biosurfactants en vue d'une application pharmaceutique.

Les résultats obtenus ont révélé que : Parmi les sept souches testées, deux souches (K2N et NIJ) ont montré une capacité productrice de biosurfactant remarquable traduit par la faible valeur de la tension de surface. Le pétrole (1%, v/v) présente la bonne source de carbone pour la souche NIJ (29 mN/m). Tandis que, le gasoil (0,5 %) donne une bonne production de biosurfactant en présence de la souche K2N (25 mN/m). Par voie de conséquence, cette dernière souche a été choisie comme performante.

Les résultats obtenus sur les caractéristiques physicochimiques et structurales de biosurfactant issu de la souche thermophile K2N ont montré que : le biosurfactant détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [20 à 100 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 100 mg/l).

Finalement, l'identification phénotypique (Api 50 CH) de la souche performante montre que la souche bactérienne thermophile K2N est affiliée à l'espèce *Bacillus licheniformis*.

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

- Etudier d'autres caractéristiques de biosurfactant issu de la souche thermophile K2N comme l'activité émulsifiante (E24), l'activité antimicrobienne et la détermination de la concentration micellaire critique (CMC),
- Utiliser d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et LC-MS) pour caractériser structurellement le biosurfactant,
- Application de ce biosurfactant dans la préparation des formes galéniques à usage pharmaceutique.
- Identification de la souche performante K2N par les outils de la biologie moléculaire.

REFERENCES

- Abalos A., Pinazo A., Infante M. R., Casals M., Garcia F. and Manresa A. (2001)**, "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes". *Langmuir*, 17 (5), 1367 – 1371.
- Abouseouda, M., R. Maachib, A. Amranec, S. Bouderguaa and A. Nabia, (2008)**. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223: 143-151.
- Asci, Y., M. Nurbas and y.s. Acikel, 2010**. Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metals ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. *J. Environ. Manage.*, 91: 724-731.
- Attwood D. and Florence A.T. (1983)**. *Surfactant Systems : Their Chemistry, Pharmacy and Biology*. Chapman and Hall, London.
- Banat M., Makkar R. S. et Cameotra S. S., (2000)**. Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.
- Bognolo G., (1999)**. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152 (1-2) : 41-52.
- Bodour A. A, Gerrero-Barajas C. et Maier M. (2004)**. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.*, 10 (6): 1114-20.
- Brown M. J. (1991)**. Biosurfactants for cosmetic applications, *International Journal of Cosmetic Science*, 13, (1991), 61 - 64.
- Cameotra S. S. et Makkar R. S., (1998)**. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50 : 520-529.
- Cirigliano M.C. and Carman G.M. (1985)**. "Purification and characterization of liposan a bioemulsifier from candida lipolytica", *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 846 - 850.
- Cooper D.G. and Paddock D.A. (1983)**. "*Torulopsis petrophilum* and surface activity", *Applied and Environmental Microbiology*, 46, (1983), 1426 – 1429
- Danyelle K. F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna,Valdemir A. Santos, Alexandra A. Salgueiro, Leonie A. Sarubbo (2013)**. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105. 43–50

Desai, A.J., Patel R.M. and Desai J.D (1994). "Advances in production of biosurfactants and their commercial applications", *J. Sci. Indus. Res.*, 53, 619 - 629.

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

Eddouaouda kamal (2012). Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminé par du pétrole : Criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant. Thèse de Doctorat, Université Saad Dahlab-Blida. 210p

Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, Ben Younes S, Cherif S, Ferhat S, Mhiri N, Chamkha M and Sayadi S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites. *Journal of Basic Microbiology*. 52(4) : 408-18.

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

Ferhat samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, pp.1182 – 88.

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

Haddad N. I. A., Ji Wang and Bozhong Mu (2009). Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein & Peptide Letters*, 16, 7-13.

Haigh S.D., (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*, 185 :161-170.

Healy, M.G., C.M. Devine and R Murphy, (1996). Microbial production of biosurfactants. *Resour Conserv. Recy.*, 18: 41-57.

Hirata Y. S., M. Ryu, Y. Oda, K Igarashi, A Nagatsuka, T. Furata and Sugiura M, (2009). Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low foaming surfactants. *J. Biosci. Bioeng.*, 108: 142-146.

Inoh, Y., D. Kitamoto, N. Hirashima and M. Nakanishi, 2001. Biosurfactants of MEL: A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. *Biochem. Biophysic Res. Commun.*, 289: 57-61

Ilori O. M., Amobi C. J. and Odocha A. C. (2005). Factors affecting the production of oil degrading *Aeromonas sp.* Isolated from a typical environment. *Chemosphere*, 61(7) : 985 - 992.

Joffin J. N. et Leyral G., (2006). Microbiologie technique, Tome1 : Dictionnaire des techniques, 4ème édition. *Edition CRDP d'aquitaine*. P368.

Joshi, C. Bharucha, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai, Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 195–199.

Joshi S. Yadav S, Nerurkar and Desai A.J. J. Microbiol. Biotechnol. 17 (2007) 313. [8] M.O. Ilori, S.A. Adebusoye, A.C. Ojo, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2008).

Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L and Kokare C. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* B4. *Desalination* 285. 198 – 204.

Kitamoto, D, Isoda H. and Hara T. N. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants—from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Bio. Sci. Bio. Eng.*, 94: 187 - 201.

Lang S. et Wulbrandt D, (1999). Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.

Lee K.K. and Yii K.C. (1996). A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios", *Lett Appl Microbiol* 23, (1996), 343 - 346.

Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (2002). "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications", *Applied and Microbiological Biotechnology*, 58, (2002), 428 - 434.

Marchal N. et Bourdon J. L., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris

Mohan P. K., Nakhla G. and Yunful E. K. (2006). Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, 40: 533 - 540.

Mulligan C.N. (2005). "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133, (2005), 183 - 198.

Patel R. M. et Desai A. J., (1997). Surface active properties of rhamnolipides from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.

Persson A, E. Österberg, M. Dostalek (1988), Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 (1), 1– 4.

Pruthi V. and Cameotra S.S. (1997). Rapid Identification of Biosurfactantproducing Bacterial Strains Using a Cell Surface Hydrophobicity Technique. *Biotechnology Techniques.* 11: 671 - 674.

Rahman, K.S.M. and Gakpe, E. (2008). Production, characterization and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology* 7.2: 360-370.

Rahmani M'hamed, (2013). Production de biosurfactant par une souche bactérienne thermophile isolée, localement en vue d'une application en agroalimentaire. Mémoire de Maser, université Saad Dahlab, Blida.

Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnology Letter* 11: 871-874.

Rodrigues, L., I.M. Banat, J. Teixeira and R. Oliveira, 2006b. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 609-618.

Ron E. Z. et Rosenberg E., (2002), Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3 : 249-252.

Sadouk, Z., Hacene, H. & Tazerouti, A. (2008). Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* Strain. *Oil & Gas Science and Technology.* 63: 747-753.

Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L. and Whitman W.B., "Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, (2001), 4374 - 4376.

Soberón-Chávez, G. and Maier, R.M., "Biosurfactants": a General Overview. In *Biosurfactants*; Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, (2011), 1 - 11.

Singleton P., (1999). Bactériologie, *Edition Duodot 4ème édition Paris.* P. 415.

Tabatabaee, A., M.A. Mazaheri, A.A. Noohi and V.A. Sajadian, 2005. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.*, 2: 6-12.

Tortora G. J., Funke B.R. et Case C. L., (2003). Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc.* pp : 157- 355.

Vandyke M. I., Couture P., Brauer M., Lee H. et Trevors J. T., (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.*, 39 : 1071-1078.

Velikonja J. and Kosaric N., "Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York : Marcel Dekkar. Biosurfactant : Production, properties and applications, (1993). 419 - 449.

Vipulanandan C. et Ren X., (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (7) : 629- 634.

Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *Harmful Algae*. 4, 433 - 443.

West C.C. and Harwell J.H., "Surfactants and subsurface remediation", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (12), (1992), 2324 - 2330.

Zhang, Y., H. Li, J. Sun, J. Gao, W. Liu, B. Li, Y. Guo and J. Chen, 2010. Dc-cholliDope cationic liposomes: A comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and Si RNA gene delivery. *Int. J. Pharm.*, 390: 198-207.

Zhao, Z., Q. Wang, K Wang, K Brian, C. Liu and Y. Cou, 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallis mortis* ZZ 185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour. Technol.*, 101: 292-297.

ANNEXE II

Isolement des souches bactériennes

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min (Eddouaouda, 2012).

Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

- ✓ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).
- ✓ La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- ✓ Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

Milieu de culture

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre): H_3BO_4 (0,25g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g), NaMoO_4 (0,06g), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,7g). Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

Composition du milieu LB (g/l)

peptone (10) , extrait de levure (5) et chlorure de sodium (5)

Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

Annexe III : Tensiomètre Krüss

Le tensiomètre Krüss a tous les avantages pour une détermination rapide et simple de la tension superficielle des liquides, le principe de mesure est basée sur la méthode de l'anneau.

Dans la méthode de l'anneau le liquide est amené vers la sonde jusqu'à la détection de contact avec la surface. L'échantillon est alors de nouveau déplacé, dans la direction opposée cette fois, conduisant à l'étirement d'un film au-dessous de l'anneau.



Annexe IV :

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau

Analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, D'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de L'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 – 25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va

correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.

Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme, c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier.



Annexe V : La galerie biochimique API 50 CH

Les substrats peuvent être métabolisés par plusieurs voies :

- * assimilation : se traduit par une croissance du microorganisme dans la cupule quand le substrat est utilisé comme seule source de carbone présente.
- * oxydation : se traduit par un changement de couleur dans la cupule, dû à une production d'acide en aérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.
- * fermentation : se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi.

- **Inoculation de la galerie** : Chaque galerie est constituée de 5 bandes comprenant chacune 10 tubes numérotés.

Répartir environ 10 ml d'eau distillée.

Répartir la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette stérile dans les 50 tubes de la galerie.

Incuber les galeries à la température optimum de croissance des microorganismes étudiés.

Lecture de la galerie :

Deux paramètres comptent pour la lecture des réactions observées :

- *l'intensité (croissance ou acidification).
- *la vitesse d'apparition.

La lecture des galeries doit se faire :

- à des temps d'incubation définis (3h, 6h, 24h, 48h par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié (fermentation ou assimilation).
- de façon semi-quantitative : on donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 1, 2, 3 ou 4 sont données aux réactions intermédiaires (3, 4 et 5 sont considérées comme positives).
- les résultats sont notés sur les fiches de résultats comme indiqué dans l'exemple. Ils constituent le profil biochimique du microorganisme.

Parmi les galeries utilisées, on cite les API 50 CHB : pour l'identification des *Bacillus*, il est composé de Sulfate d'ammonium (2 g), extrait de levure (0.5 g), tryptone (1 g), rouge de phénol (0.18 g), base minérale (Cohen-Bazire, 10 ml), tampon phosphate (1000 ml) (Figarella et Leyral, 2006).