

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Option : Procédés de Traitement des Effluents et Protection de
l'Environnement

Optimisation de la production d'un biosurfactant issu d'une souche bactérienne isolée localement

Présenté par :

Melle SAHEL Hafsa

Melle DJEBBAR Yasmine

Soutenu devant le jury :

Promoteur : Pr BADIS Abdelmalek

Co-Promotrice : Mme KHELOUIA Lamia

Laribi Hassiba

Djeghdjegh Abdelmalek

Ozane Slim

MCA, U-Blida 1

MAA, U-Blida 1

MAA, U-Blida 1

L'année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier vivement notre promoteur monsieur BADIS Abdelmalek, professeur à l'Université de Blida qui était à l'origine du choix de ce thème, pour avoir dirigé ce travail, nous lui devons beaucoup de respects, il a su se rendre disponible pour répondre à la moindre de nos incertitudes.

Nos plus sincères remerciements et gratitude s'adressent à notre Co-promotrice : Mme Khelouia Lamia pour ses conseils, et ses orientations judicieuses tout au long de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de nous faire l'honneur du juger ce travail.

En fin, à ceux qui n'ont pas été cités par omission involontaire de notre part et qui ont contribué de près ou de loin de la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Aux êtres les plus précieux au monde, qui sont le secret de mon existence, qui m'ont donné leur amour, leur tendresse et soutien ; ce mémoire est le fruit de leur seule patience : Maman et Ma sœur.

Je dédie ce modeste travail :

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

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

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorde-le bonheur, la santé, longue vie et bonheur.

A ma chère sœur Chaima, tu es mon repère dans cette vie, sans ta présence je ne serais jamais arrivé la.

A toutes la famille, Sahel, ghanem, et tante nabila

A toutes mes amies, Asma, Karima, Mérième, Ahlem et Hannane

A ma chère binôme yasmine

A toute la promotion PTEPE 2017

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

Sahel hafsa

Dédicaces

Avant toute dédicace, je tiens à remercier Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie le fruit de longues années d'études à tout qui me sont chers, en particulier :

*A la plus chère femme au monde, **ma mère** que Dieu la protège, elle est toujours présente avec tout son amour, sa tendresse et ses conseils.*

*A mon très **chère père** que Dieu le protège, dont cette réussite et également grâce à sa confiance, sa patience et ses encouragements*

*A mon plus beau cadeau de la vie que dieu m'a offert **mon mari***

C'est à eux que je dois toute réussite, je souhaite que Dieu leur prête vie le plus longtemps possible.

*A mes très **chères sœur et belles sœurs** : Djamila , Rahil, Hanane*

*A mes très **chers frères** : Ali, Yacine, Samy*

*A mes chers **beaux parents et beaux frères** : Raouf ,Rayane*

A tous mes amis sans exception

*A mes Collègues d'**PTEPE***

A tous qui me connaissent et m'aiment

DJEBBAR YASMINE

المخلص

لقد قمنا في هذا العمل بإجراء دراسة لإنتاج مفاعل بيولوجي ناتج من سلالة بكتيرية معزولة محليا من تربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود -الجنوب الجزائري)

تم عزل مئات السلالات البكتيرية في أعمال بحث سابقة، تم انتقاء السلالة المنتجة لهذه المادة الحيوية بينت النتائج المحصل عليها ما يلي :

(أ) قدرة إنتاج كبيرة من المفاعل الحيوي،

(ب) انخفاض في التوتر السطحي بقدر 32م.ن/م

(ت) زيت الزيتون أفضل مصدر للكربون بقيمة 1 بالمائة

(ث) نترات الصوديوم يمثل أفضل مصدر للزوت بقيمة 0.4غ/ل

(ح) استقرار حراري ودرجة حموضة في مجال كبير

[4 à 120°C], [2-12]

(خ) 15غ/ل من كلور الصوديوم

هدفنا في هذا العمل اختيار لسلالة دو سعة حرارية ملائمة تفي بإنتاج للمفاعل الحيوي القابل للتفكيك بيولوجيا في الطبيعة

الكلمات المفتاحية : سلالة بكتيرية - مفاعل بيولوجي - الشروط المثلى للإنتاج - وصف المفاعل البيولوجي

Résumé

Dans ce travail nous avons entrepris une étude sur l'optimisation de la production d'un biosurfactant issu d'une souche bactérienne isolée localement à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie).

Un isolement d'une centaine de souches a été réalisé dans des travaux antérieurs, et un criblage a été mené afin d'obtenir une souche performante productrice d'un biosurfactant.

Les résultats obtenus pour la souche performante affiliée à l'espèce *Bacillus amyloliquefaciens* révèlent que : **(a)** la souche a montré une capacité productrice importante de biosurfactants, traduite par une réduction remarquable de la tension de surface (32mN/m), **(b)** l'huile d'olive (1%v/v) représente la meilleure source de carbone, **(c)** NaNo₃ (0,4g/l) représente la meilleure source d'azote, **(d)** le biosurfactant de la souche détient des propriétés tensioactives intéressantes ; **(e)** il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [4 à 120 °C], et il présente une très bonne stabilité dans une large gamme du pH [2-12], également, **(f)** il tolère une salinité de 15g/l.

Notre but dans ce travail est de faire une sélection d'une souche thermophile performante, afin d'optimiser la production de son biosurfactant biodégradable dans la nature.

Mots clés : biosurfactant, bactérie thermophile, tension de surface, caractérisation, optimisation de la production.

Abstract

In this work, we have undertaken a study on optimizing the production of a biosurfactant from a bacterial strain isolated locally from a sandy soil contaminated by petroleum hydrocarbons (Hassi-Messaoud Region, south of Algeria).

An isolation of about 100 strains was carried out by the research team, and a screening was conducted to obtain a high-performance biosurfactant-producing strain.

The results obtained for the effective strain identified and belonging, to the genus *Bacillus* indicate that: (a) The strain showed a significant production capacity of biosurfactants, translated by a remarkable reduction in surface tension (32mN/m), (b) olive oil (1% V/V) represents the best source of carbon, (c) NaNO₃ (0.4 g/L) represents the best source of nitrogen, (d) The biosurfactant of the strain has interesting surfactant properties; (e) It is very stable thermally in a wide range of temperature [4 to 120 ° C], and has very good stability in a wide range of pH [2-12], also F) It tolerates a salinity of (15 g/L).

Our goal in this work is to make a selection of a high performance thermophilic strain, in order to optimise the production of its biodegradable biosurfactant in nature.

Keywords: biosurfactant-thermophilic bacteria-surface tension- characterization- optimizing of production

Tables des Matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION	1
CHAPITRE1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Définition des surfactants	3
1.2 Définition des biosurfactants.....	3
1.3 Microorganismes producteurs	4
1.4 Classification des biosurfactants	4
1.4.1 Glycolipides	5
1.4.2 Lipopeptides et lipoprotéines	5
1.4.3 Biosurfactants polymères	5
1.4.4 Phospholipides	6
1.4.5 Acides gras, lipides neutres.....	6
1.5 Production de biosurfactants	6
1.5.1 Tension de surface	7
1.5.2 Test de déplacement de pétrole	7
1.6 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	8
1.7 Paramètres influençant la production de biosurfactant.....	8
1.7.1 Influence de la source de carbone.....	9
1.7.2 Influence de l'azote.....	10
1.7.3 Influence du pH.....	10
1.7.4 Influence de la température.....	10
1.7.5 Influence des sels minéraux	10
1.8 Propriétés de biosurfactants	10

1.8.1	Activité à l'interface	10
1.8.2	Pouvoir émulsifiant	10
1.9	Applications des biosurfactants	11
1.10	Avantage des biosurfactants.....	11
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....		12
2.2	Isolement des souches bactériennes aérobies.....	13
2.3	Conservation des souches pures obtenus.....	14
2.4	Criblage des souches obtenues	15
2.4.1	Définition du criblage bactérien	15
2.4.2	Sélection de la souche performante	15
2.5	Identification de la souche performante	16
2.6	Optimisation de la production d'un biosurfactant	16
2.6.1	Choix de la meilleure source de carbone	16
2.6.2	Effet de la concentration de la source de carbone	16
2.6.3	Choix de la meilleure source d'azote.....	17
2.6.4	Effet du pH et salinité	17
2.6.5	Effet de la température.....	17
2.7	Indice d'émulsification(E24).....	17
2.8	Extraction de biosurfactant.....	18
2.9	Etude de la stabilité des biosurfactants.....	20
CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION.....		21
3.1	Résultats de l'isolement et criblage.....	21
3.2	Résultat de l'identification de la souche	24
3.3	Optimisation de la production des biosurfactants	25
3.3.1	Effet de la source de carbone.....	25
3.3.2	Effet de la concentration de la source de carbone.....	27
3.3.3	Effet de la source d'azote	28
3.3.4	Effet du pH et de la salinité	30
3.3.5	Effet de la Température.....	32

3.4 Extraction de biosurfactant.....	32
3.5 Pouvoir émulsifiant.....	33
CONCLUSION	36

Liste des illustrations, graphique et tableau

Figure 1.1 : Structure schématique d'un surfactant.....	3
Figure1.2 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.....	4
Figure 1.3 : Structure de la phosphatidylethanolamine produit par la souche acinetobacter sp HO1-N.R1 et R2 sont des chaines hydrocarbonées d'un acide gras	6
Figure 1.4 : Techniques de déplacement d'huile (Etape1 : souche huileuse de pétrole noir) (Etape2 : effet de l'ajout d'un biosurfactant sur le pétrole) « formation de halo-clair »	8
Figure 2.1 : sol contaminé par le pétrole brut (Hassi_Messaoud)	13
Figure 2.2 : Test d'émulsification (E_{24})	18
Figure 2.3 : les deux phases obtenues après la première étape d'extraction ...	19
Figure 2.4 : Récupération de biosurfactant par le Rotavapeur	20
Figure 3.1 : des tubes à essai muni de culture Bactérienne régénérée	21
Figure 3.2 : La culture de la souche K2E sur milieu LB solide.....	21
Figure3.3 : Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par la souche K2E	25
Figure 3.4 : test du déplacement de pétrole ave de l'huile d'olive	26
Figure3.5 : Croissance bactérienne en fonction des différentes concentrations de l'huile d'olive	27
Figure3.6 : Test de dépladement des huiles avec les différentes sources de carbone	28
Figure 3.7 : Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche K2E	29

Figure 3.8: Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche K2E	30
Figure3.9 Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par la souche K2E	31
Figure 3.10: Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants de la souche K2E	32
Figure 3.11 : Teste de déplacement de pétrole pour le surnageant contenant le biosurfactant	33
Figure 3.12: Pouvoir émulsifiant du pétrole	34
Figure3.13: Pouvoir émulsifiant de l'huile d'olive	34
Figure3.14 : Pouvoir émulsifiant de l'huile de friture	35
Tableau 3.1 : SOUCHES THERMOPHILES	22
Tableau 3.2 : SOUCHES MESOPHILES	23
Tableau 3.3 : SOUCHES THERMO-TOLERANTE	23

Liste Des Abréviations

LB : Luria Bertani

MM: Milieu minimum

TS : Tension superficielle

DD P : Déplacement de pétrole

E24 : Emulsion pendant 24 heures

INTRODUCTION

Pendant de nombreux siècles, les tensioactifs chimiques ont été utilisés pour des technologies d'urgence, le marché mondial de la biotechnologie est en progression continue. Les surfactants constituent une classe importante de produits industriels largement utilisés dans divers secteurs, la demande sur les surfactants a été multipliée par 3 %. En raison de leur toxicité et faible biodégradabilité, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants appelés : biosurfactants [1]. Ceux-ci possèdent de nombreuses propriétés tels que la haute biodégradabilité, la non toxicité, la meilleure fonctionnalité dans des conditions extrêmes (pH acides, salinités et températures élevées, etc.)

Les biosurfactants sont utilisés dans plusieurs domaines industriels et environnementaux : industries pétrolières, pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, textiles, peinture, détergents, bioremédiation des sites contaminés (comme un solubilisant des composés hydrophobes et un dispersant des nappes de pétrole déversé dans le milieu marin), etc.

Le but de ce travail est d'optimiser la production d'un biosurfactant biodégradable dans la nature pour prévenir la toxicité, et réduire la pollution, ainsi prévoir une application dans un domaine donnée. Les principaux facteurs affectant la production de biosurfactants ont été étudiés à savoir : la nature de la souche, la nature et la concentration de la source de carbone et la source d'azote, la stabilité physicochimique des biosurfactants *vis-à-vis* la température, le pH du milieu et la salinité.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties :

*La première partie est une approche bibliographique où sont exposées les données relatives aux biosurfactants.

* La seconde partie, est réservée aux principaux matériel et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation.

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

Le manuscrit est achevé par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

➤ L'histoire

Les biotensioactifs, communément appelés agents tensio-actifs d'origine biologique, ont sculpté une niche pour eux-mêmes sur le marché en raison de leurs propriétés écologiques uniques. Ils ont fait beaucoup de chemin depuis que le premier biosurfactant .

1.1 Définition des surfactants :

Les surfactants sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscible réduisant ainsi l'énergie libre du système [2] et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbure . La structure schématique est représentée dans la figure 1.1.

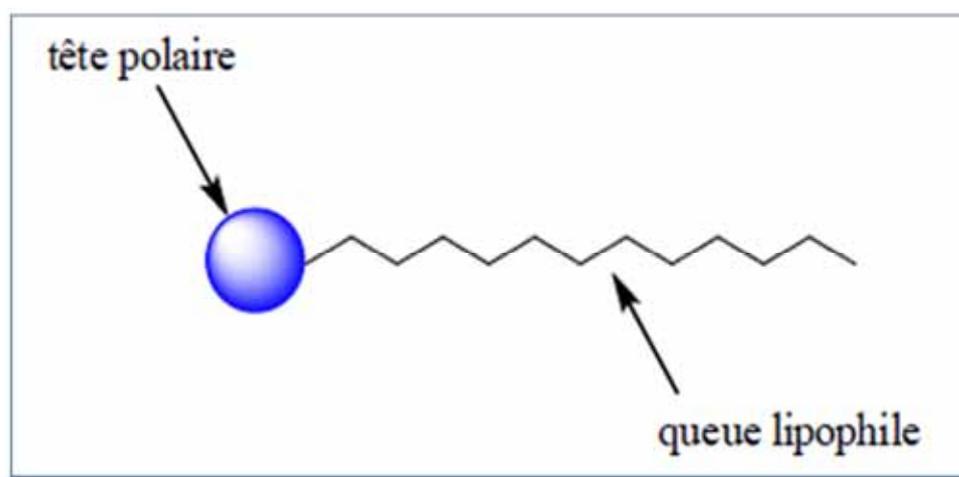


Figure 1.1 : Structure schématique d'un surfactant

1.2. Définition des biosurfactants :

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques) sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par les microorganismes : des levures, bactéries et champignons. Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature du substrat et des conditions de la production. Ils sont 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 [3]. La figure 1.2 montre micelle de biosurfactant.

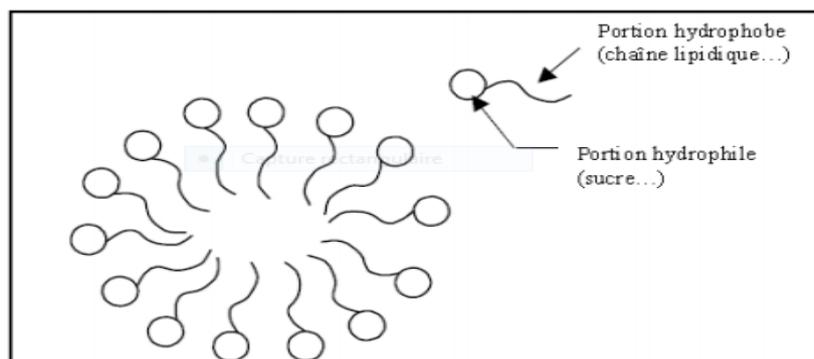


Figure 1.2: Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant [4].

1.3. Microorganismes producteurs :

Une variété de microorganismes principalement les bactéries, les champignons et les levures sont capables de produire des biosurfactants de diverse composition chimique (tableau I.3). Leur nature et la quantité produite dépendent du type de microorganisme produisant tel ou tel biosurfactant [5].

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, ...).

1.4. Classification des biosurfactants :

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

Selon leur poids moléculaire, les biosurfactants sont divisés en :

- Faible masse moléculaire y compris les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides.
- Haute masse moléculaire contenant des polysaccharides amphiphiles, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biospolymères.

Les biosurfactants de faible poids moléculaire sont plus efficaces pour diminuer la tension interfaciale et de surface, alors que les biosurfactants de haut poids moléculaire sont des stabilisants efficaces (émulsion huile dans l'eau). On distingue cinq grandes classes de biosurfactants :

1.4.1. Glycolipides

Ils sont formés des hydrates de carbone en combinaison avec des acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides hydroxyaliphatiques. Parmi les glycolipides, les plus connus sont :

- **Les Rhamnolipides**

Ce sont les glycolipides les mieux étudiés, dans lesquels une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules des β -hydroxydécanoïque, alors que le groupement OH de l'un des acides est lié à la portion glycosidique, le groupement OH du deuxième acide entre dans la formation d'un ester [6].

- **Les Tréhalolipides**

Ils sont composés par le tréhalose disaccharide, ce type de biosurfactant est produit dans la plupart des cas par les espèces de genres *Rhodococcus*, *Nocardia* et *Corynebacterium* .

- **Les sophorolipides**

Ils sont produits principalement par des levures telles que *Torulopsis bombicola* et *Torulopsis apicola*. Ce type de biosurfactant est composé d'un dimère sophorose glucide lié à une longue chaîne hydroxyle d'acides gras par une liaison glycosidique.

1.4.2. Lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides et les lipoprotéines sont généralement produits par les microorganismes sécréteurs d'antibiotiques. Le biosurfactant le plus connu est commercialisé est la surfactine.

1.4.3. Biosurfactants polymères

Les biosurfactants de nature polymères les plus étudiés sont : Emulsan, biodispersan et d'autres complexes polysaccharides-protéines. A titre d'exemple l'*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produit l'émulsan qui est un agent émulsifiant efficace pour les hydrocarbures dans l'eau.

1.4.4. Phospholipides

Ils sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique. Sachant qu'ils sont bien présents dans tous les microorganismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire [7].

1.4.5. Acides gras, lipides neutres

Ces biosurfactants sont produits par plusieurs bactéries et levures. La figure (1.2) montre une structure d'un biosurfactant (phosphatidyléthanolamine) qui a été produit par la souche *Acinetobacter* sp. HO1-N .

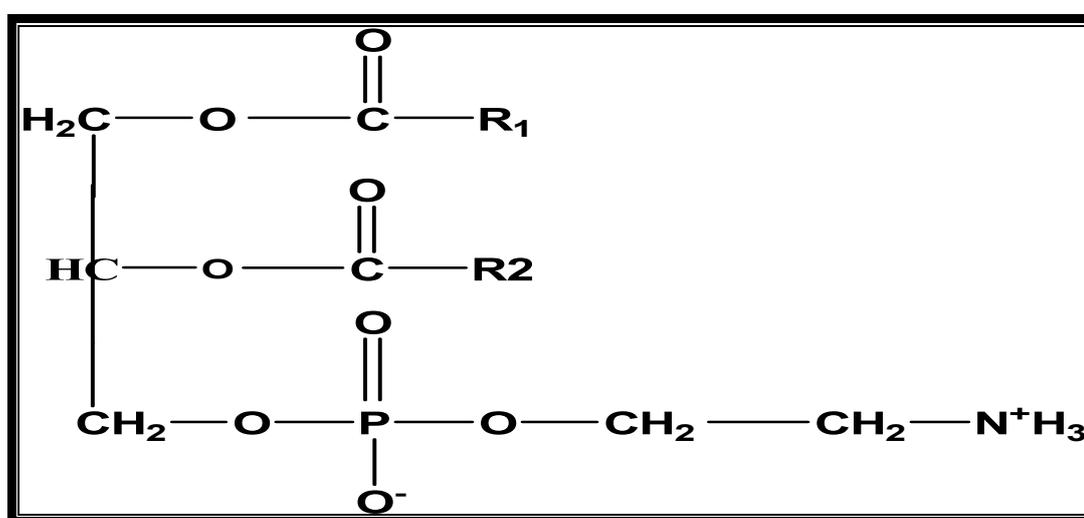


Figure 1.3 : Structure de la phosphatidylethanolamine produit par la souche *Acinetobacter* sp. HO1-N. R1 et R2 sont des chaînes hydrocarbonées d'un acide gras [8].

1.5. Production de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes qui se prolifèrent de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [9]. Une variété des matières premières et des substrats recyclés tels que les huiles végétales, des déchets d'huiles, des substances à base d'amidon, du lactosérum et des déchets de distillation sont communément employés comme substrats à bon marché pour la culture des microorganismes producteurs.

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat

insoluble. Le principal rôle physiologique du tensioactif 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 [10]. Les tests d'indication de la production des biosurfactants dans le milieu de culture sont cités ci-dessous.

1.5.1. 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 plus part des liquides prennent la forme de la plus petite des surfaces. 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 ; (W : travail ou l'énergie qu'il faut fournir (à température et pression constantes) pour accroître la surface du liquide d'une quantité. ΔA : La tension de surface s'exprime en J/m^2 ou mN/m).

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

1.5.2. Test de déplacement de pétrole

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices des biosurfactants. Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. Les solutions contenant plusieurs biosurfactants sont incapables de former des gouttes stables et par la suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactants vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [11]. La figure ci-dessous montre le test de la technique de déplacement d'huile.



Figure 1.4 : Technique de déplacement d'huile (*Etape 1 : Couche huileuse de pétrole noir*)
(*Etape 2 : Effet de l'ajout d'un biosurfactant sur le pétrole*) « formation du halo-clair ».

1.6. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer la biomasse bactérienne de ce milieu de culture (par centrifugation).

La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. [12] ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant.

Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices. Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le biosurfactant par un mélange dissolvant (chloroforme/méthanol) [13]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du biosurfactant. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

1.7. Paramètres influençant la production de biosurfactant

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

1.7.1. Influence de la source de carbone

De nombreux travaux ont montré que le type, la qualité et la nature du biosurfactant sont affectés par la nature de la source de carbone. Le gasoil et le pétrole ont été trouvés comme une bonne source de carbone [14]. D'autres auteurs ont signalé que les composés solubles dans l'eau comme le glucose et le glycérol sont aussi convenables pour la production du biosurfactant. Notons positivement que les substrats hydrophobiques comme l'huile d'olive, l'huile de maïs et les longues chaînes d'alcool maximisent la production du biosurfactant (100 – 165 mg/g de substrat). Ces auteurs rapportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone. En effet, certains travaux indiquent que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production.

1.7.2. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitant. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices. Pour avoir des rendements de production optimaux, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal [15].

1.7.3. Influence du pH

Généralement, les milieux acido-basiques sont défavorables pour la production de biosurfactants. Par exemple, la souche *Bacillus* 7G, est active dans des pH du milieu de culture situés entre 6.8-7.10. D'autres souches comme *Nocardia* et *Corynebacteroides* ont été affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0.

1.7.4. Influence de la température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques (tensions de surface et interfaciale, et E24) des biosurfactants, produits par *Bacillus* à des températures supérieures à 40 °C, restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 20 min [16].

1.7.5. Influence des sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium et sodium ou éléments traces induise une augmentation de production.

1.8. Propriétés de biosurfactants

Les biosurfactants sont d'un intérêt croissant pour un usage commercial sans cesse. Il y a plusieurs avantages de biosurfactants par rapport à leurs homologues chimiques. La concentration micellaire critique (CMC) de biosurfactants est d'environ 10-40 fois inférieur à celui des tensioactifs chimiques. 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. Les principales caractéristiques distinctives de biosurfactant sont données ci-dessous.

1.8.1. Activité à l'interface

En présence d'un biosurfactant issu de la souche *Bacillus* sp., certains chercheurs ont montré que la diminution de la tension interfaciale (TI) eau/pétrole brut était entre 12,5 et 0,05 m.Nm⁻¹. Également, le biosurfactant produit par *Bacillus licheniformis* TT42 a abaissé la TS de l'eau à 28 mN.m⁻¹ et la TI (eau/pétrole brut) jusqu'à 0,05 mN.m⁻¹ à 80 °C.

1.8.2. Pouvoir émulsifiant

Les émulsions en termes généraux, sont des dispersions de gouttelettes d'huile dans gouttelettes d'eau ou d'eau dans l'huile (liquide est dispersé dans l'autre), ils sont classés comme des macro-émulsions dans la nature et avec une gamme de taille des gouttelettes de 0,2- 50 µm). On distingue deux types d'émulsions : Des gouttelettes d'huile dispersées dans l'eau qui est connus comme émulsion huile-dans-eau (huile/eau ou H/E), et la dispersion des gouttelettes d'eau dans l'huile (eau/huile ou E/H). Cette solubilisation est basée sur le revêtement de l'interface avec un agent tensioactif qui ne permet pas la coalescence des gouttelettes de la phase dispersée. La présence des tensioactifs peuvent stabiliser l'émulsion en réduisant la tension superficielle et diminue du taux de coalescence. 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.

1.9. Applications des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes. C'est pourquoi aujourd'hui sont utilisés dans différents domaines d'application tels :

- La biorémediation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds.
- L'agriculture; jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces zoospores dans les systèmes de culture sans sol.
- L'industrie alimentaire; comme additifs alimentaires et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie.
- L'industrie du cosmétique et dans les procédés de teinture du textile [17].
- L'industrie pharmaceutique; comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales.
- Le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique et la micro-électronique.

1.10. Avantage des biosurfactants

L'application de biosurfactants est plus avantageuse par rapport aux surfactants chimiques du fait :

- D'une bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), salinité (jusqu'à 30%) et de température (jusqu'à 100 °C) ;
- D'une biocompatibilité et la digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels ;
- D'excellentes caractéristiques écologiques : biodégradabilité et absence de toxicité ;
- D'un temps de stockage long ;
- D'éventuelle 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'émulsification, la séparation de phases, le mouillage, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la

diminution de la viscosité et antiadhésivité. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, anti-tumeur et anti-mycoplasme. Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines en l'occurrence agricoles, cosmétiques, pharmaceutiques [18]. Récemment, les biosurfactants ont suscité beaucoup d'attention dans le domaine de nanobiotechnologie .

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1 L'objectif du travail

L'objectif principal de ce travail de mémoire de master est la recherche des meilleures conditions de production d'un bioémulsifiant produit par une souche *Bacillus* hydrocarbonoclaste à partir des substrats diversifiés.

Les expérimentations ont été effectuées conjointement au niveau du laboratoire de microbiologie et de biochimie, département de Génie des procédés de l'université de Blida 1, ainsi qu'au laboratoire de L'ISTA, Université de Blida 1 et au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules Université de Blida 1. Une identification de la souche a été réalisée en collaboration avec le centre de biotechnologie de Sfax en Tunisie.

2.2. Isolement des souches bactériennes aérobies

Le biotope utilisé pour isoler des souches bactériennes aérobies est un sol sableux provient d'un borbier pétrolier contaminé par les hydrocarbures de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie). La figure 2.1 montre l'état du de ce biotope qui est contaminé par le pétrole brut.



Figure 2.1 : Sol contaminé par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) [19].

Le milieu de culture liquide utilisé (MM)(g/l), est à base de sels minéraux et sa composition est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), Na Cl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml da la solution d'oligoéléments. Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5 avec une solution de soude NaOH (0.1N).

NB : la préparation du (MM) des témoins est de même composition sauf l'ajout de souche qui manque.

Après l'autoclavage, à 120 °C pendant 20 min de stérilisation de milieu MM et à différentes températures d'incubation qui ont été utilisées pour l'isolement des souches : 30, 45 et 55 °C.

En effet, l'isolement adaptatif des souches est réalisé dans des erlenmeyers de 250 ml contenant : 100 ml du milieu MM, 2% (p/v) de sol contaminé du pétrole brut et 1% (v/v) de pétrole (source de carbone). Le milieu est incubé pendant une semaine, sous une agitation de 180 tr/min. 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, 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.

Trois types de souches ont été ciblés :

Souches mésophiles (incubation à 30 °C).

Souches thermo tolérantes ou thermophiles moyennes (incubation à 45 °C).

Souches thermophiles (isolées à 55 °C). [20]

2.3. Conservation des souches pures obtenues

Conservation à courte durée : Les souches pures ont été repiquées sur milieu Luria Bertani (LB) solide et conservées à +4 °C. La composition de milieu LB (g/l est : 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl.

Conservation à longue durée : A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, les souches sont conservées dans du bouillon LB en présence de 25% de glycérol à - 80 °C.

2.4. Criblage des souches obtenues

2.4.1. Définition du criblage bactérien :

C'est une sélection d'une souche bactérienne performante, à partir d'un lot de souches données, sur un critère de choix. Dans notre étude, nous avons ciblé la production d'une biomolécule.

2.4.2. Sélection de la souche performante :

A partir d'une centaine de souches isolées dans des travaux antérieurs, nous avons réalisé un criblage, en visant la recherche de la production du biosurfactant, en utilisant le test de déplacement de pétrole.

En vue d'une régénération de la population bactérienne en phase de latence, nous avons réalisé un repiquage sur milieu LB liquide pour l'obtention d'une culture fraîche, dont le protocole est précisé ci-dessous. Un autre repiquage sur milieu LB solide aura lieu.

a) Préparation du 1^{er} milieu de culture LB liquide :

- Dans un erlenmeyer de 1l rincé à l'eau distillée et séché préalablement, mettez après pesée les composés suivants exprimés en g/l :

Extrait de levure	5
Na Cl	23
Peptone	10

- Ajuster le volume à 1l d'eau distillée à l'aide d'une éprouvette graduée.
- Faire agiter le milieu (+chauffage~ 50 °C).
- Retirer le barreau magnétique.
- Fermer l'erlenmeyer avec du coton cardé roulé de gaze, le bout est enveloppé de papier aluminium.
- Stérilisation à 120 °C/ 20min.
- Retirer de l'autoclave, et laisser refroidir pour un court temps.

b) Ecoulement sur boîtes de Pétri :

- Stériliser la paillasse à l'aide d'eau de javel.

- Allumer les becs benzène.
- Disposer un nombre adéquat de boîtes de pétri.
- Faire écouler le milieu à 3mm d'épaisseur.
- Laisser les boîtes semi ouvertes pour éviter l'accumulation de la vapeur.
- Fermer et placer les boîtes à l'envers.

c) Ensemencement :

- L'ensemencement se fait par strie à l'aide d'une pipette Pasteur à partir de notre culture.
- Faire incuber à 45 °C

NB : pour la préparation du LB solide nous rajoutons de l'agar à raison de 15 g/l.

2.5. Identification de la souche performante

Une identification de la souche la plus performante, en utilisant la technique ARN 16S, a permis d'attacher cette souche à l'espèce *Bacillus amyloliquifaciens* avec un pourcentage de similitude de 99% *vis-à-vis* la souche de référence (travaux antérieurs).

2.6. Optimisation de la production d'un biosurfactant

Afin de déterminer les meilleures conditions pour une production maximale du biosurfactant, plusieurs facteurs ont été choisis et testés.

2.6.1. Choix de la meilleure source de carbone :

Cinq sources de carbone ont été testées à savoir : l'huile d'olive, l'huile de friture, l'huile de vidange, pétrole et le glucose.

La sélection de la source optimale est basée sur la mesure de la tension de surface et la mesure du diamètre de la surface halo claire (test de déplacement de pétrole).

La production de biosurfactants est suivie par le DDP, ainsi que la croissance est estimée par la mesure de la DO à 600 nm après 24h d'incubation à 45 °C sous une agitation de 180 tr/min [21].

2.6.2. Effet de la concentration de la source de carbone :

Différentes concentrations de l'huile d'olive ont été testées (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 5 g/l).

2.6.3. Choix de la meilleure source d'azote :

Cinq sources d'azote à (0,4 g/l) ont été évaluées avec la meilleure source de carbone : NH_4Cl (chlorure d'ammonium), NaNO_3 (nitrate de sodium), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfate d'ammonium) et NH_4NO_3 (nitrate d'ammonium) et l'urée. Le milieu de production a été incubé à 45 °C sous une agitation de 180 tr/min.

2.6.4. Effet du pH :

L'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH du milieu MM additionné séparément d'une seule source de carbone l'huile d'olive 1% (v/v), et la source d'azote NaNO_3 0.4%(v/v). Les valeurs du pH sont ajustées comme suit : 2 ; 4 ; 7 ; 8 ; et 12.

2.6.5. Effet de la salinité :

L'effet de la salinité a été déterminé par l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) au milieu de production avec différentes teneurs (5 ; 15 ; 23 ; 30 et 35 g/l)

2.7. Indice d'émulsification (E_{24})

À fin d'estimer l'activité d'émulsification, nous pouvons calculer une valeur appelée indice d'émulsion ou E_{24} . Nous ajoutons un volume de 4 ml de surnageant de culture mélangé avec 4 ml de substrat hydrophobe. Le tout est vortexé à la vitesse maximale pendant 2 minutes. Les mesures sont prises 24h après [22]. L'indice d'émulsion représente la hauteur de l'émulsion formé (H_e) divisée par la hauteur totale du liquide dans le tube (H_t) multipliée par 100 :

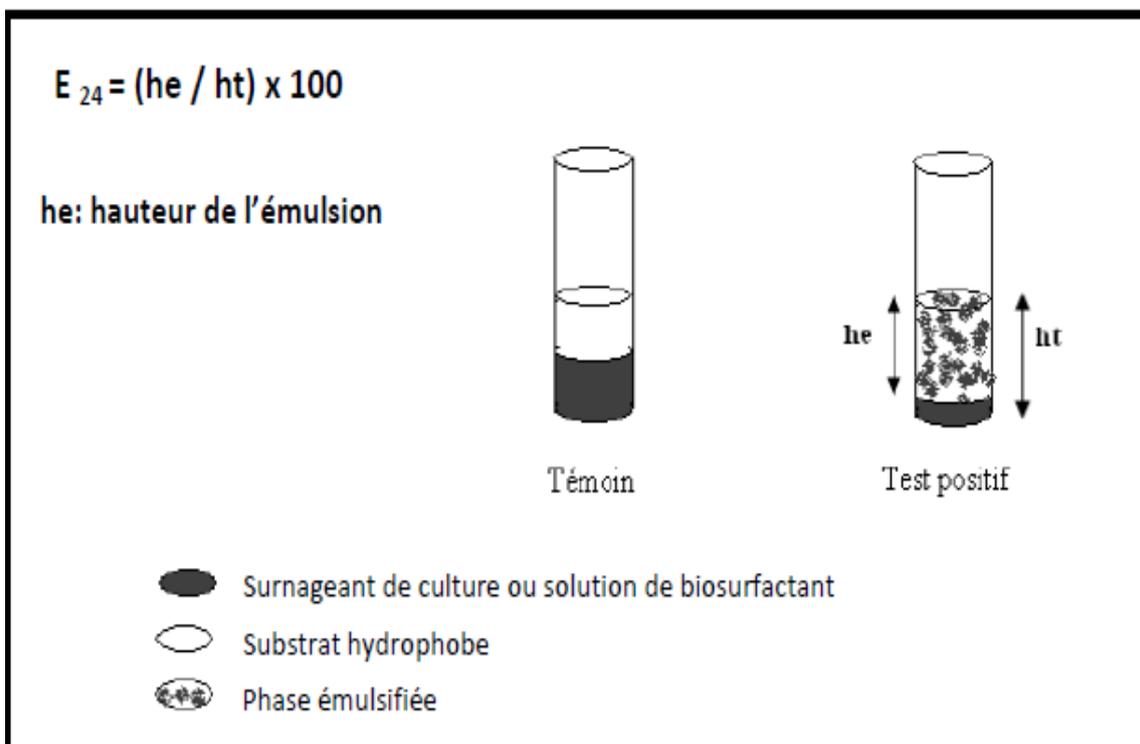


Figure 2.2 : Test d'émulsification (E_{24}).

2.8. Extraction de biosurfactant

Pour l'extraction de biosurfactant, nous utilisons la méthode de l'extraction par solvant.

a. Précipitation acide :

Dans une éprouvette nous mettons 400 ml du milieu minimum MM plus 8 ml de la souche plus 4 ml, de l'huile d'olive après la centrifugation et la filtration nous obtenons 400ml de surnageant, nous mesurons la tension de surface. Dans une autre éprouvette de 500ml on met 400ml de surnageant, puis on a acidifié le milieu jusqu'à pH=2 avec HCl (3N) et nous le gardons dans le réfrigérateur pendant 24h à 4 °C.

Après une nuit de réfrigération nous séparons les deux phases (précipité et surnageant) et nous récupérons notre précipité par centrifugation. Le précipité possède une activité après un test de déplacement de pétrole (DDP).

b. Extraction par solvant :

Pour l'extraction du solvant qui se fait par un solvant : Acétate d'éthyle (1/1 V/V).

Dans une ampoule à décanter nous prenons notre surnagent et nous ajoutons 100ml d'acétate d'éthyle (1/1 V/V) et nous mélangeons très bien, ensuite laisser reposer 10min pour séparer les deux phases puis faire évaporer le surnagent en utilisant le rotavapeur (Figure2.3).

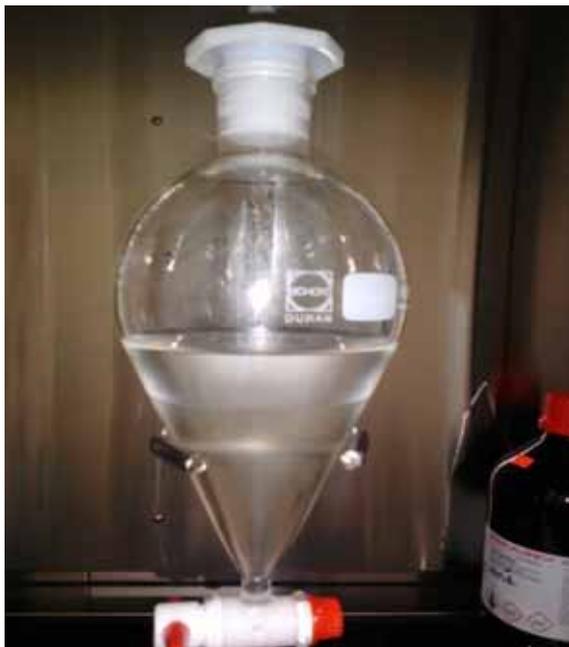


Figure 2.3 : les deux phases obtenues après la première étape d'extraction

Nous pesons le ballon avant l'étape de l'évaporation à 40°C. Le ballon contient l'acétate d'éthyle dont le biosurfactant est piégé et nous récupérons le biosurfactant après l'évaporation.



Figure 2.4 : Récupération de biosurfactant par le Rotavapeur

2.9. Etude de la stabilité de biosurfactant

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

- **Stabilité chimique :** Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (2 à 12) en utilisant des solutions HCl ou NaOH.
- **Stabilité thermique :** Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4 ; 25 ; 35 ; 45 ; 70 ; 100 et 120 °C pendant 24 h.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats de l'isolement et le criblage

Les photos suivantes montrent des tubes à essai muni de culture bactérienne régénérée, et une boîte à Pétri avec une culture de la souche K2E après ensemencement à partir de milieu liquide.



Figure 3.1 : Tubes à essai muni de culture après ensemencement à partir des tubes de conservation à long terme en milieu liquide LB



Figure 3.2 : La culture de la souche K2E sur milieu LB solide

Les tableaux cités ci-dessous résument les tests de déplacement de pétrole, du lot de souches livrées par l'équipe de recherche de biomolécules du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule de l'université de Blida 1.

Tableau 3.1 : Souches thermophiles après le test DDP

Nom de la souche	Résultat	Nom de la souche	Résultat
K2O	+	K7E	+
K2G	+	K2F	+
K1F	+	K1B	+
K7G	+	K7B	+
K1D	+	K1G	+
K1K	+	K2M	+
K7N	+	K1M	+
K7F	+	K7L	+
K2C	+	K7I	+
K1E	+	K7T	+
K7D	+	K2E	+++
K7C	+	K2A	+
K2D	+	K7K	+
K2N	+	K1C	+
K2B	+	K7D	+
K7P	+	K2I	+
K1H	+	K1L	+
K1A	+	K1N	+
K7A	+	K1I	+
K2L	+	K7R	+
K7J	+	K7H	+
K2H	+		

Tableau 3.2 : Souches mésophiles après le test DDP

Nom de la souche	Résultat
N1F	+
N1H	+
N1B	+
N1A	+
N1C	+
N1J	+
N1I	+
N1D	+
N1G	+
N1E	+

Tableau 3.3 : Souches thermotolérantes après le test DDP

Nom de la souche	Résultat	Nom de la souche	Résultat
T7J	+	T1C	+
T1D	+	T7C	+
T7H	+	T1I	+
T2A	+	T7A	+
T7E	+	T1J	+
T7B	+	T1B	+
T2E	+	T2I	+
T2F	+	T7G	+
T1A	+	T7I	+
T2J	+	T1F	+
T2G	+	T1G	+
T1E	+	T1H	+
T7D	+		

3.2. Résultat de l'identification de la souche

Une identification de la souche la plus performante, en utilisant la technique ARN 16S, a permis d'attacher cette souche à l'espèce *Bacillus amyloliquifaciens* avec un pourcentage de similitude de 99% vis-à-vis la souche de référence.

3.3. Optimisation de la production des biosurfactants

Le type, la qualité et la quantité de la production du biosurfactant dépend fortement de :

- Type de microorganisme utilisé (bactéries, levures ou champignons);
- Substrat nutritif disponible pour le développement cellulaire;
- Nature des sources de carbone et d'azote;
- Conditions de culture à savoir le pH, la température, la salinité et l'oxygène

3.3.1. Effet de la source de carbone

❖ Les résultats obtenus sont représentés dans les Figures 3.3 et 3.4.

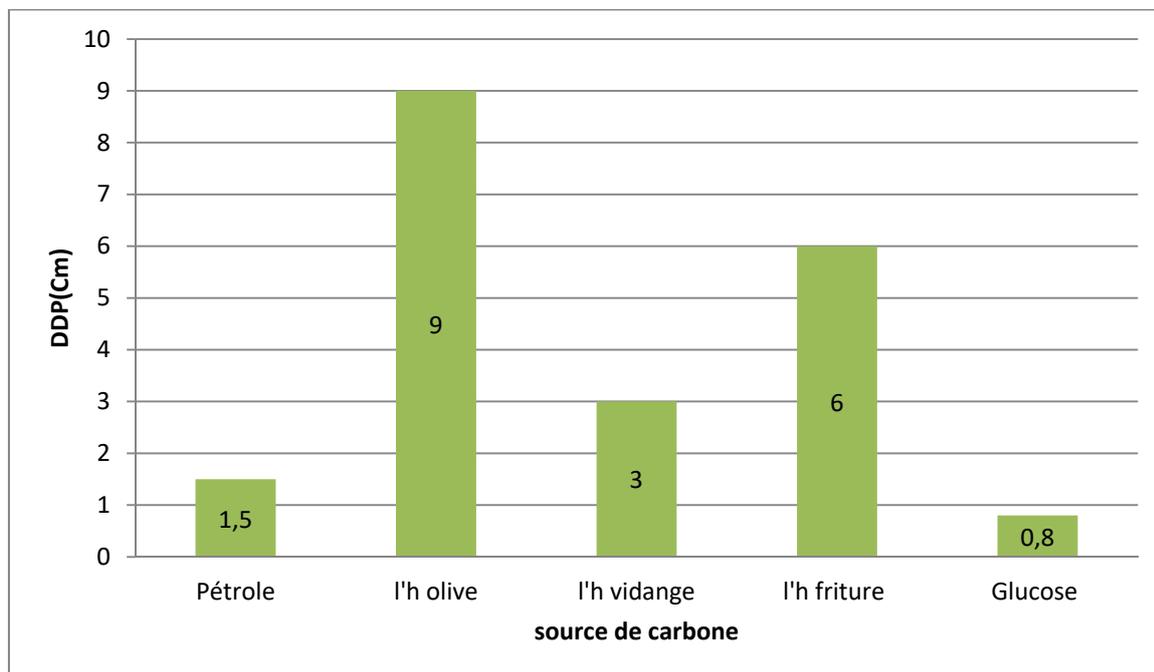


Figure3.3: Influence de la source de carbone sur la production des biosurfactants par la souche K2E



Figure 3.4: test du déplacement de pétrole avec de l'huile d'olive

- ❖ Les résultats obtenus révèlent que l'huile d'olive est la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactant par la souche K2E. Avec un diamètre de déplacement de pétrole de 9 cm. D'après les résultats obtenus, l'huile d'olive a été sélectionnée comme meilleur substrat pour la production de biosurfactant, et qui est utilisé pour la poursuite de travail.
- ❖ Des résultats similaires ont été rapportés par Abousaoud *et al.*[23] où l'huile d'olive était la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactants par la souche *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 [24]. La souche *Staphylococcus* sp. 1E utilise l'huile d'olive pour la production de biosurfactants comme rapporté Eddouaouda et al. [25].
- ❖ Les huiles végétales comestibles sont les plus utilisées pour la production des biosurfactants, ce qui est le cas pour notre étude [26].
- ❖ Des résultats proches ont montré qu'une production maximale de biosurfactants a été observée lors de l'utilisation de la souche *Bacillus subtilis* SK320 cultivée à 37 °C et à 120 tr/min dans le milieu de base Bushnell Hass Broth (BHB) et 0,5% d'huile d'olive (Olio di Oliva, Sasso, Milan, Italie) comme source de carbone [27].
- ❖ La régulation de la production de biosurfactants par *Bacillus subtilis* SK320, cultivée sur un milieu de base contenant différents substrats, suivie d'une croissance et d'une activité de production, a été obtenue à une concentration de 0,5%, v/v. Ce qui met en valeur nos résultats obtenus en utilisant une concentration d'huile d'olive à 1% [27].
- ❖ Nous pouvons dire que le germe mis en évidence possède une influence sur la production du biosurfactant.

3.3.2. Effet de la concentration de la source de carbone :

L'huile d'olive a été choisie comme meilleure source de carbone. La concentration de l'huile d'olive est variée pour la production des biosurfactants est illustrée dans les figures 3.5.

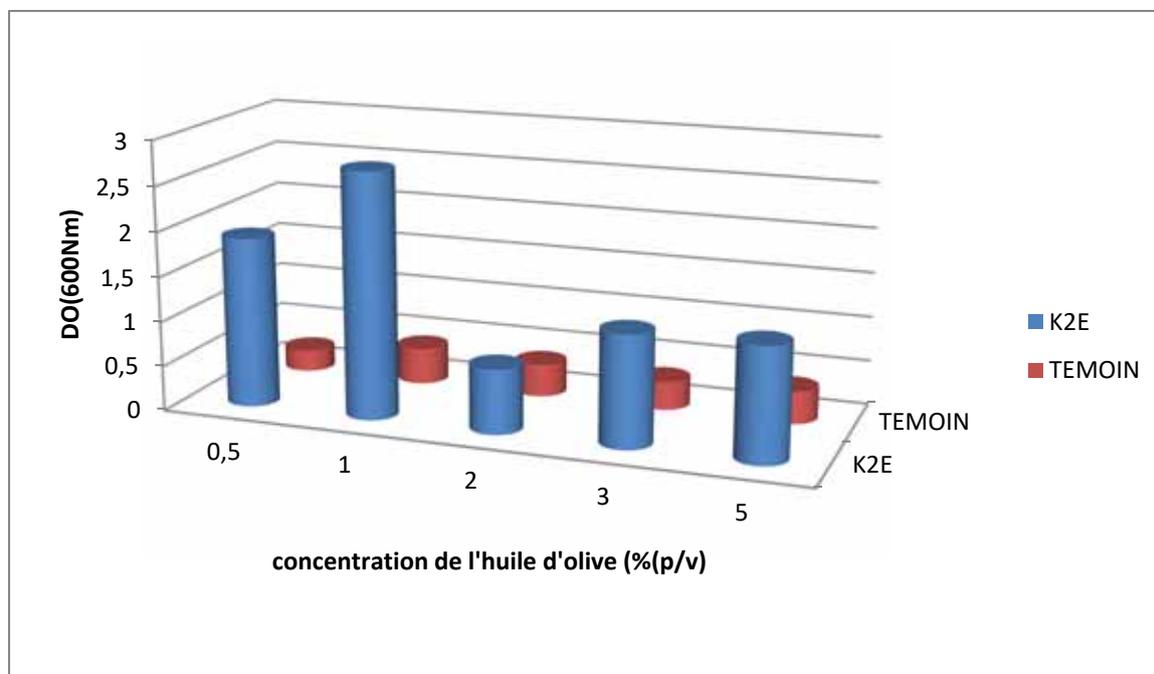


Figure 3.5: Croissance bactérienne en fonction des différentes concentrations de l'huile d'olive

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la concentration de 1% donne le meilleur déplacement de pétrole et qui est de 9 cm (figure 3.5).

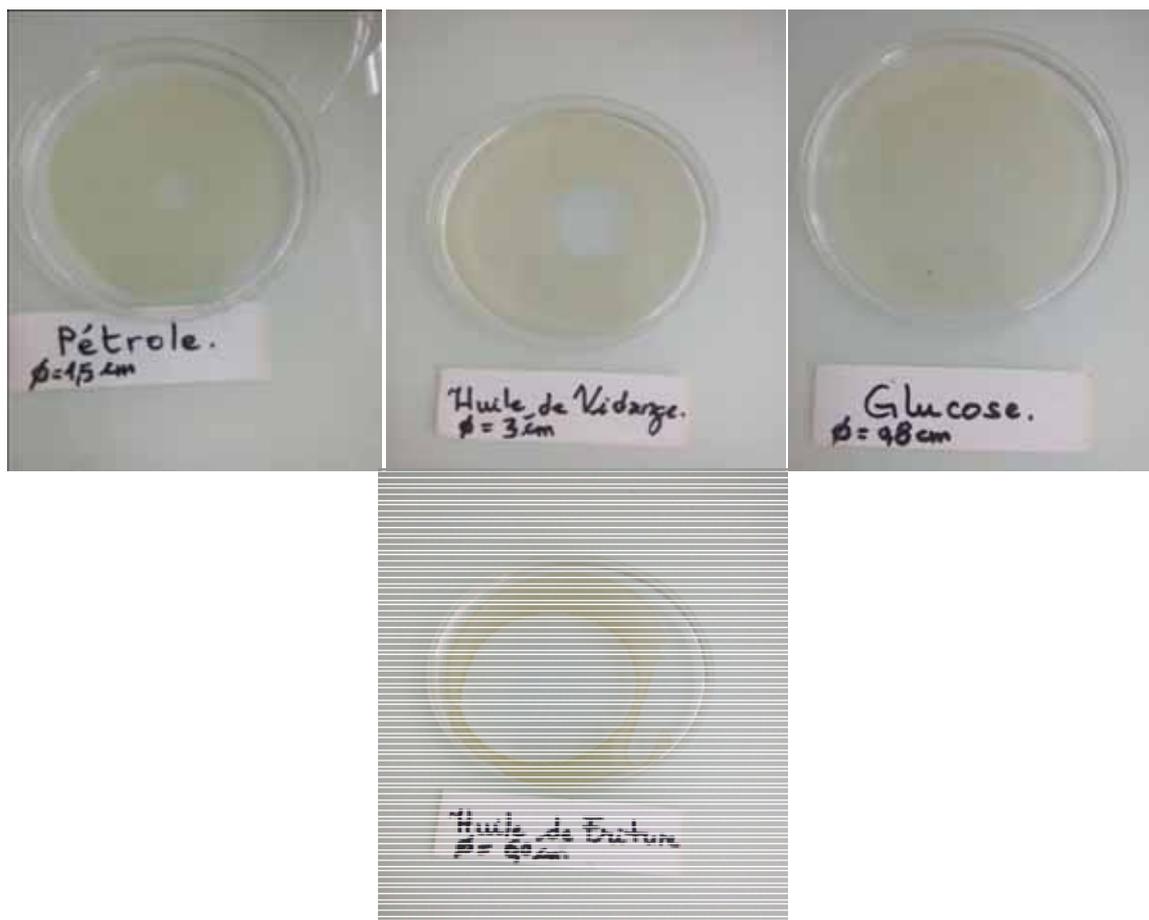


Figure 3.6 : Test de déplacement des huiles avec les différentes sources de carbone

3.3.3. Effet de la source d'azote :

- ❖ Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (3.7).

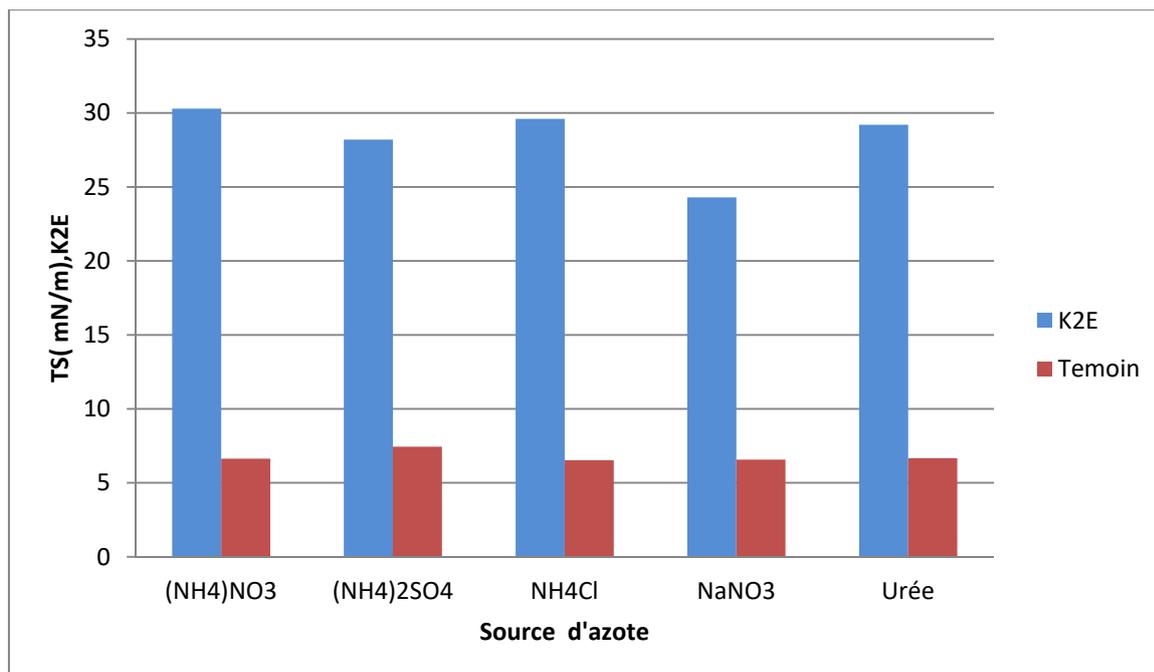


Figure 3.7 : Effet de la source d'azote sur la production des biosurfactants par la souche K2E

- ❖ En utilisant l'huile d'olive en tant que source de carbone optimale, le choix de la source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse des biosurfactants notamment par sa nature et aussi par la limitation de sa concentration dans le milieu de culture.
- ❖ D'après les résultats obtenus, nous remarquons un abaissement remarquable de la tension de surface, et qui est de 24.3mN/m avec NaNO₃.
- ❖ Des résultats similaires ont été trouvés par Dubey et Juwarkar où la limitation d'azote a augmenté la production du biosurfactant par la souche *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 et *Ustilago maydis* [28].
- ❖ L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries : par exemple, la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates. Par contre, Ruiz-Garcia et *al.* indiquaient que la production de biosurfactants à partir de *Pseudomonas* sp. 44T1 cultivée sur l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium.
- ❖ L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries : par exemple, la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates.

- ❖ Par contre, Ruiz-Garcia *et al.* indiquaient que la production de biosurfactants à partir de *Pseudomonas* sp. 44T1 cultivée sur l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium. Hommel *et al.* [29] ont indiqué que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium.
- ❖ Dans notre cas, nous pouvons dire que la teneur de 0,4g/l de NaNO_3 est optimale pour la production du biosurfactant.

3.3.4. Effet du pH et de la salinité :

Nous avons mesuré le pH de notre milieu pendant quatre jours de culture et les résultats sont indiqués dans les figures (3.8) et (3.9).

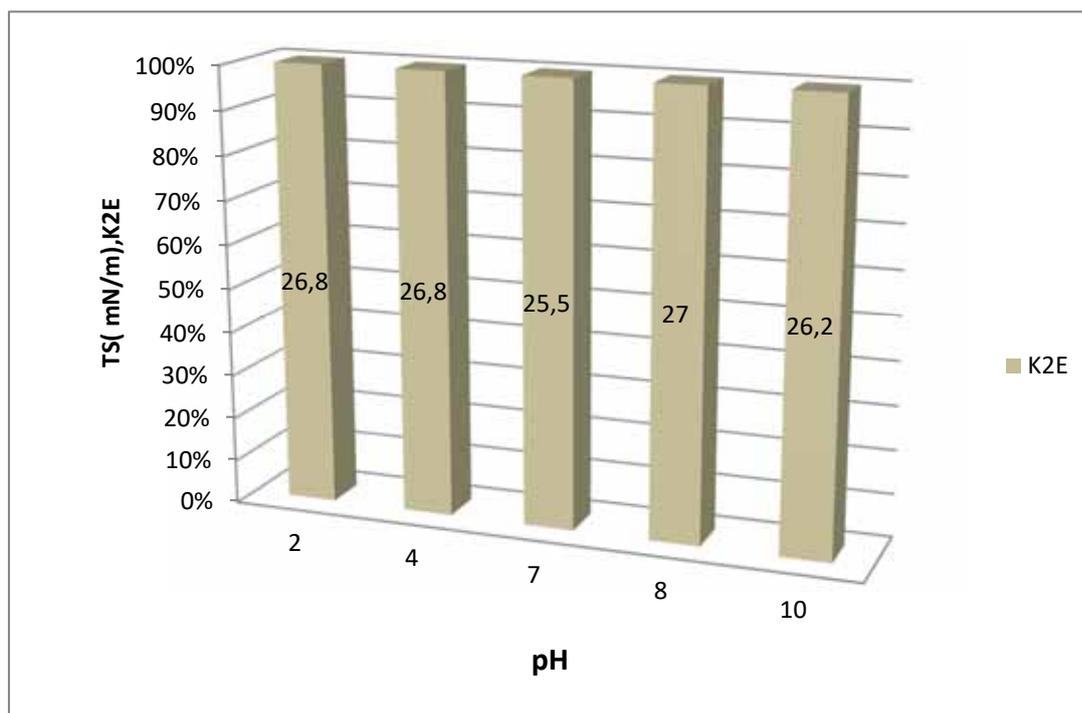


Figure 3.8: Effet du pH du milieu sur la production des biosurfactants par la souche K2E

Nous pouvons dire que le biosurfactant présente une stabilité vis-à-vis d'une large gamme de pH, comme il est bien indiqué dans la bibliographie.

La salinité influence sur la production des biosurfactants. Les résultats obtenus sont représentés sur dans la figure (3.9).

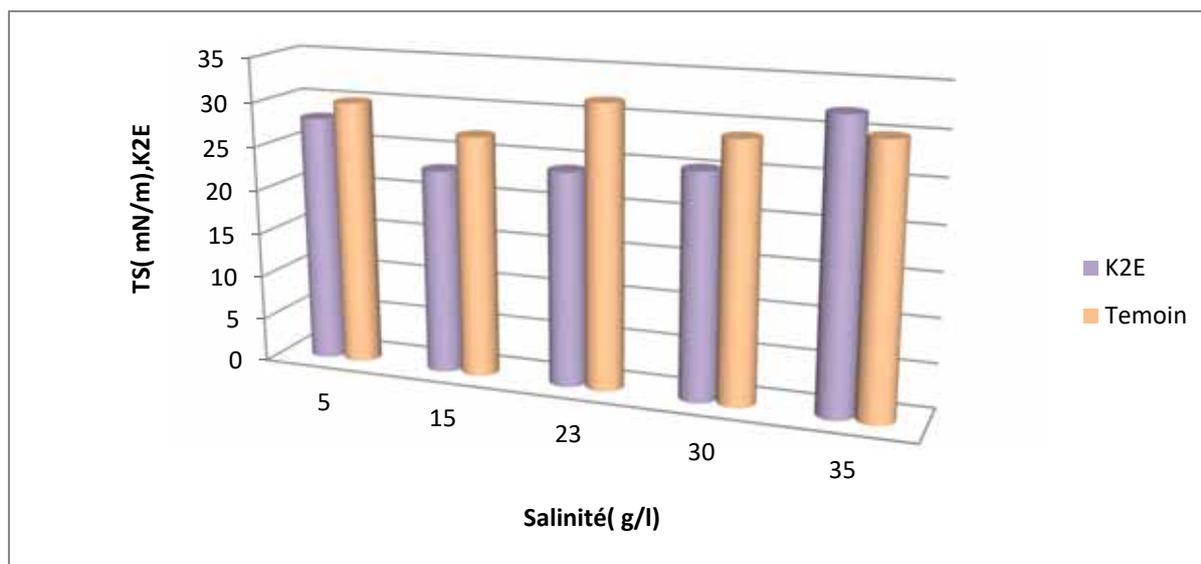


Figure3.9 : Effet de la salinité sur la production des biosurfactants par la souche K2E.

- ❖ Les résultats obtenus montrent que la souche K2E est capable de résister à des salinités dans une TS de 23,1 (mN/m). La meilleure concentration de la salinité est de 15(g/l).
- ❖ Les résultats obtenus montrent que la production des biosurfactants est stable (TS= 25.5 mN/m) lorsque le pH du milieu est neutre.
- ❖ Desai et Banat [30] ont indiqué que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. À des pH inférieurs ou supérieurs, la production des biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Gobbert *et al.* [31] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure est de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules sont formées. Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipides.

3.3.5. Effet de la température :

L'influence de la température sur la production des biosurfactants. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure (3.10).

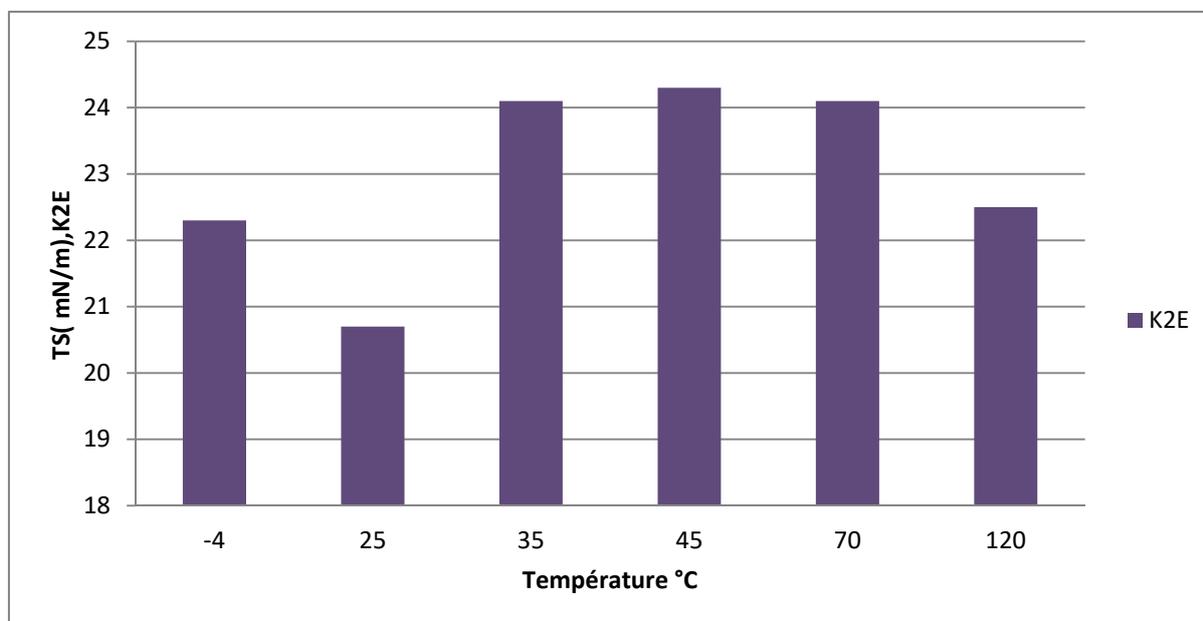


Figure 3.10: Effet de la température sur la stabilité des biosurfactants de la souche K2E

Nos résultats montrent que la production des biosurfactants est maximale lorsque la température du milieu est fixée à 25 °C.

3.4. Extraction de 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 productrice). La majorité des biosurfactants sont secrétés dans le milieu de culture. Nous avons remarqué que la précipitation n'a pas eu lieu, par contre une formation d'un surnagent est observée.

Nous avons pris la mesure du déplacement de pétrole, et nous avons noté la valeur de 6,8 cm comme le montre la figure suivante (3.11).



Figure 3.11: Teste de déplacement de pétrole pour le surnageant contenant le biosurfactant

La récupération du biosurfactant issu de la souche se fait après l'extraction et le séchage. Le précipité (biosurfactant brut) le résidu est un liquide visqueux soluble. Il est de couleur jaune-marron.

3.5. Pouvoir émulsifiant

Le teste a été réalisé contre l'huile d'olive, l'huile de vidange, l'huile de friture, et le pétrole brut de l'activité émulsifiante de biosurfactant produit par la souche K2E. Les résultats obtenus sont regroupés dans les figures (3.12) ;(3.13) ;(3.14).



Figure 3.12: Pouvoir émulsifiant du pétrole



Figure3.13: Pouvoir émulsifiant de l'huile d'olive



Figure3.14 : Pouvoir émulsifiant de l'huile de friture

D'après les résultats obtenus le pouvoir émulsifiant est acceptable avec le pétrole contrairement avec l'huile d'olive et l'huile de friture.

Mukesh *et al.* ont rapporté que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du biosurfactant et du microorganisme producteur et que l'activité d'émulsification du biosurfactant produit par *Bacillus* spp., testée avec différents hydrocarbures, a montré que l'indice le plus élevé a été obtenu avec l'huile de maïs, suivi par le kérosène et l'huile de tournesol.

Nous pouvons dire que le biosurfactant peut faire l'objet d'une application environnementale.

CONCLUSION

Les biosurfactants sont synthétisés par les microorganismes (notamment les hydrocarbonoclastes) en utilisant plusieurs sources de carbone. Afin de réduire le coût de production, les recherches actuelles s'intéressent de plus en plus à la production de biosurfactants en utilisant des substrats non conventionnels à savoir divers sous-produits agricoles et déchets industriels.

Dans ce travail, nous avons étudié l'isolement le criblage, et l'optimisation de la production de biosurfactant par une souche thermophile isolée à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud.

Les résultats obtenus révèlent que :

- L'isolement a donné la mise en évidence d'une souche thermophile performante à fort potentiel de production d'un biosurfactant.
- A partir du criblage, nous avons pu faire la sélection de la souche performante.
- L'examen morphologique montre que la souche K2E appartient au genre de *Bacillus* est identifiée au moyen de la technique de l'ARN 16 comme *Bacillus amylolequifaciens*K2E.
- Parmi les quatre substrats testés, l'huile d'olive présente la meilleure source de carbone conduisant à un diamètre d'halo-claire de pétrole de 9 cm
- La culture de la souche K2E sur 1%(v/v) de l'huile d'olive et avec différentes sources d'azote a révélé une activité de surface importante avec le nitrate de sodium (NaNO₃).
- Le biosurfactant reste efficace pour un pH 7 et une température de 25.5°C.
- La teneur de 15g/l de NaCl s'avère la meilleure salinité pour une bonne production du biosurfactant.

En perspectives, nous recommandons vivement de continuer ce travail avec une étude de la caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant produit et faire une application dans les différents domaines, à savoir, dans le domaine environnemental et en agroalimentaire.

REFERANCE

- [1] Valorisation des substrats non conventionnels pour la production de biosurfactant par une souche thermophile p : 8
- [2] mulligan , c.n., yong . r.n gibbs b., surfactant enhanced remediation of contaminated soil. *eng.geologie* (2001. **60**: p. 371-380).
- [3] S.S, B.e.a.m.R.S.C., potentiel commercial applications of microbial surfactants. *Appl microbiol,biotechnol* 2000. **53**: p. 495-508
- [4] S., G., Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique in *Chimie et Microbiologie de l'Eau2004*, Limoges. p. 177.
- [5] mata-sandoval j. c., k.j.e.t.a., Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environ. Sci.Technol*, 2000. **23**(34): p. 4923-4930.
- [6] karanth n. g. k., p.g.d.a.n.k.v., Microbial production of biosurfactants and their importance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999. **31**: p. 473-479.
- [7] champion j. t., g.j.c., lamparski h., retterer j. , Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmiun and octadecane. *J .Environ .Qual*, 1995. **24**: p. 19-28.
- [8] Corsaro, M.M., Lanzetta, R., Parrilli, E., Parrilli, M., Tutino, M.L. et Ammarino, S., Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas Bacteriol*, January 2004. **186**(1): p. 29-34.
- [9] Bognolo G., "Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons *Colloids and Surfaces*". 152, (1999), 41-52.
- [10] MATA-SANDOVAL.J.C, KARNS. J. et TORRENTS. A(2000), «Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides», *Environ. Sci.Technol.*,Vol.34,n°23, p 4923-4930.
- [11] F., M., biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et production de biosurfactants par des souches bacteriennes thermophiles isolees a partir d'un sol contaminé par le petrole brut de la region de Hassi Messaoud, 2015: blida. p. 49-112.
- [12] DESAI. J.D, BANAT. I.M. (1997). «Microbial production of surfactants and their commercial potential». *MicrobiolMolBiol Rev* Vol.61, p47-64.
- [13] parra. j.l, guinea. j, manresa. m. a, robert. m, mercadé. m.e,comellesand. f, bosch. m.p.(1989).«chemical characterization and physicochemicalbehavior of biosurfactants». *j. am. oil chem. soc.* vol66, p 141-145.

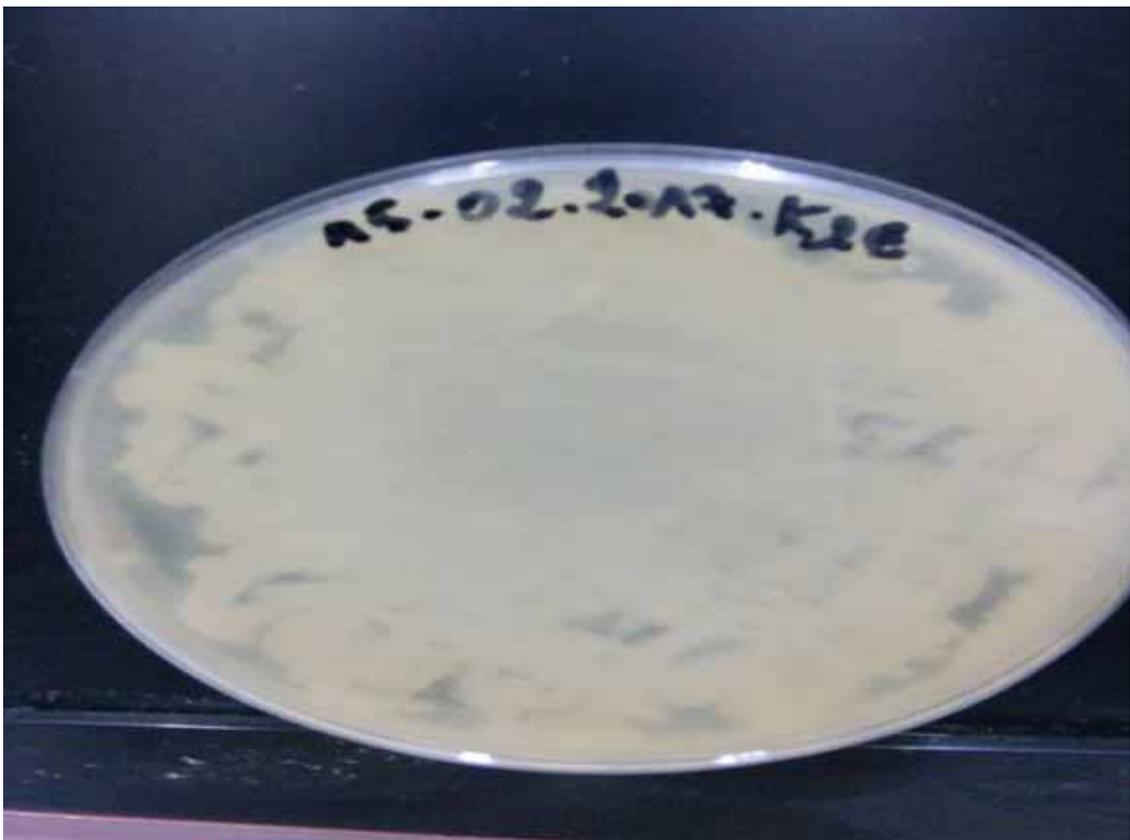
- [13] E.M., étude fonctionnelle d'un centre d'interaction protéiques chez bacillus subtilus par une souche intégré: France. p. 15-90.
- [14] m., d.j.d.e.b.i., microbial production of surfactants and their commercial potential. microbiology and molecular biology reviews, 1997. 1(61): p. 47-64.
- [15] D, L.S.e.W., Rhamnose lipids biosynthesis- Microbial production and application potential. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1999(51): p. 22-32.
- [16] eddouaouda, k., etude du potentiel biodegradatif de souches isolees du sol de hassi messaoud contamine par du petrole : criblage, biodegradation de hap et production de biosurfactant, in chimie industrielle2012, saad dahleb: blida. p. 146-163.
- [17] abouseoud m., m.r., amrane a., boudergua s., evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by pseudomonas fluorescens. desalination, 2008. 223: p. 143-151.
- [18] sikkema, j., de bont, j.a.m., poolman, b., *mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons*. microbiol. rev, 1995. 59: p. 201-222.
- [19] Eddouaouda K, M.S., Badis A, Ben Younes S, Cherif S, Ferhat S, Mhiri N., Characterization of a novel biosurfactant produced by Staphylococcus sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites. Journal of Basic Microbiology, 2012. 52(4): p. 408-18
- [20] Imhoff-Stuckle D. and Pfenning N., "Isolation and characterisation of nocotinic aciddegrading sulfate reducing bacterium, Desulfococcus niacini sp. Nov", *Archives of Microbiology*. 136, (1983), 194 - 198.
- [21] Mnif S., Chamkha M. and Sayadi S., "Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100 a hydrocarbon degrading bacterium under hypersaline conditions". J. Appl. Microbiol., 107, (2009), 785 - 794.100.
- [22] D.A., C.D.G.a.P., *Torulopsis petrophilum* and surface activity. Applied and Environmental Microbiology, 1983: p. 1426 - 1429.
- [23] Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite, I., Nakajima, M. & Sunairi, M., "Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzenetolerant bacterium, Rhodococcus sp". 33. Carbohydr Res, 341, (2006), 616-623.
- [24] Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H. & Nuhi, A., "Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, Rhodococcus sp. strain TA6". Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, 82,(2011),477-482

- [25] Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. & Quesada, E., "Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons". *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, (2002),347-351.
- [26] Eddouaouda kamal, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkhal and Sami Sayadi.. "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites". *Journal of Basic Microbiology*, 51, pp. (2012) 1 – 11.
- [27] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT., "Bacterial biocatalysts: molecular biology,three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases". *Annual Rev Microbiol*, 53, (1999)315-351.
- [28] Déziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lépine, F., et Bisailon, J.G., "Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons". *App. Environ. Microbiol*, V. 62, n° 6, (June 1996), 1908–1912
- [29]FIECHTER.A. (1992). *Biosurfactants: moving towards industrial application*, Tibtech, Vol.10,p3-12.
- [30] Mukesh Kumar DJ, Kalaichelvan PT, Suresh Chander CR and Lohitnath T. "Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food biopreservative". *Advances in applied science research*, 3(3), (2012),1827-1831.
- [31] Hommel R.K.and Ratledge C., "Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules", In *N. Kosaric* (ed.), NewYork, N.Y,Dekker, Inc., , *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel, (1993), 3 – 63.

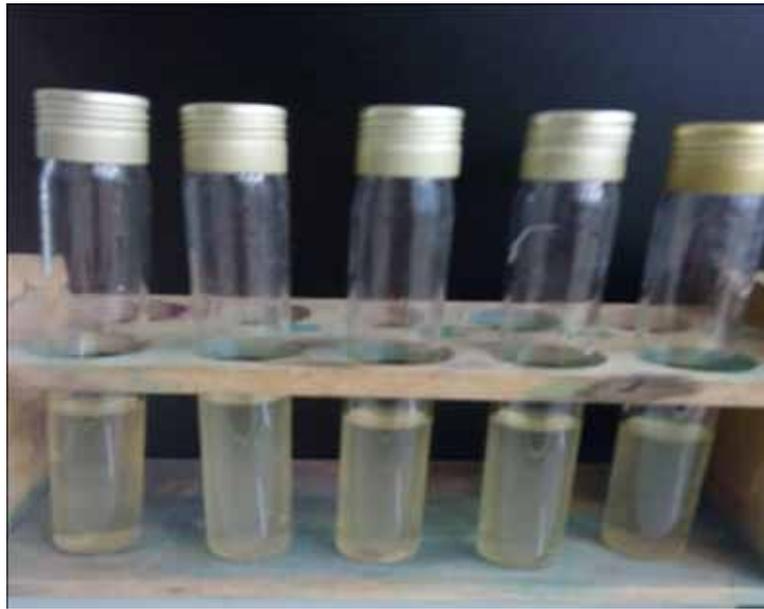
APPENDICE A ENCEMENCEMENT



Distribution du milieu LB solide dans les boîtes pétri.



La souche *K2E* après 48h d'incubation.



Répartition du milieu LB dans les tubes à essai



Repiquage de la souche K2E dans le milieu LB solide



L'apparition de la souche dans le milieu LB après 48h d'incubation dans le sheker à 45°C

APPENDICE B : DEROULEMENT DES ESSAIS



Filtration des huiles a l'aide d'un filtre 0.22 μ m



La centrifugation du milieu MM a l'aide d'une centrifugeuse



Filtration du milieu MM après la centrifugation

APPENDICE C : EQUIPEMENT UTILISE

Étuve (memmert)
Autoclave (AESCULAP),
pH mètre (inolab)
Agitateur Magnétique-plaque chauffante(Stuart)
Balance (KERN ALS 220-4N)
Bec Bunsen
Bain Marie(memmert)
Shaker Wise Cube (Fuzzy Control System)
Incubateur (memmert)
Centrifugeuse (SIGMA 2-6E)
Rotavapeur
Réfrigérateur (condor)

APPENDICE D : VERRERIE ET CONSOMMABLES UTILISES

Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml
Eprouvette graduées de 10ml, 20ml, 15ml,25ml, 50m,100ml, 250ml, 500ml,
Bécher de 80ml, 100m, 250m, 500m
Boîtes de Pétri en plastique (D=80mm)
Pipettes Pasteur,
Anse de platine,
Tubes à essai de 20ml,
Seringue,
Micropipettes (200 μ L ,1000 μ)
Ampoule à décanner de 250ml
Ballon de 250ml
Barreau magnétique,
Coton cardé,
Papier Aluminium,
Papier Film,
Papier Filtre ordinaire,
Spatules,
Flacons en verre de200ml,
Entonnoirs