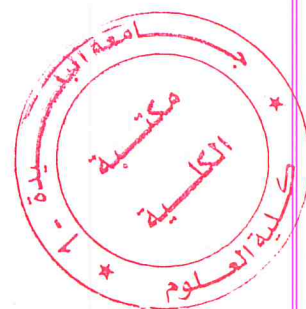


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie
Laboratoire de recherche Chimie des Substances Naturelles et de
Biomolécules de l'université de Blida 1



Mémoire présenté par
BELKACEM Djahida

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Naturelles

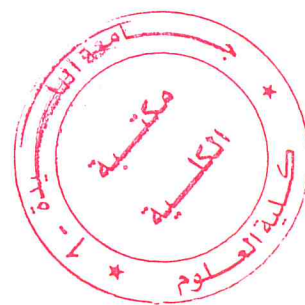
Titre

**Etude des activités microbiennes chez des souches marines
(Bactéries, actinobactéries et champignons) : extraction et
caractérisation chimique de l'activité à fort potentiel
industriel**

M. El Hattab	Pr	Président	Université de Blida 1
A. Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida 1
Z.F Ferradji	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1

PROMOTION 2017/2018

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie
Laboratoire de recherche Chimie des Substances Naturelles et de
Biomolécules de l'université de Blida 1



Mémoire présenté par
BELKACEM Djahida

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Naturelles

Titre

**Etude des activités microbiennes chez des souches marines
(Bactéries, actinobactéries et champignons) : extraction et
caractérisation chimique de l'activité à fort potentiel
industriel**

M. El Hattab	Pr	Président	Université de Blida 1
A. Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida 1
Z.F Ferradji	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1

PROMOTION 2017/2018



REMERCIEMENT

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin, de nous avoir aidées tout au long de nos années d'étude.

Je tiens particulièrement à remercier mon encadreur Mr A. BADIS, pour avoir accepté de diriger la réalisation de ce mémoire, pour son aide et son conseil.

J'adresse mes sincères remerciements à mon Co-promotrice Dr. F. FERRADJI. Pour leur aide et suivi au long de l'établissement de notre travail.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer mes sincères remerciements et tout ma gratitude à monsieur le professeur M. EL HATTAB, pour sa gentillesse et ses grandes qualités humaines ont fait de lui un responsable très spécial.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury qu'ils ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance.

Je souhaite adresser mes remerciements à tout l'ensemble du personnel de laboratoire de chimie en particulier M^{elle} Beichi Madjda et M^{elle} Saidani Fatiha pour son aide précieuse.

Sans oublier tous mes enseignants.

Enfin, ma profonde gratitude va à l'égard de toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.





DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,
A ceux qui me sont les plus chers, a ceux qui m'ont toujours encouragé*

Aussi, c'est tout simplement que...

Je dédie ce travail ...

*Aux être les plus chers, à ceux qui ont consacré leur vie pour mon éducation et ma
réussite :*

A Mes très chers parents

*Vous avez été pour moi au long de mes études le plus symbole d'amour, de
dévouement qui ont ni cessé ni diminué. J'espère de tout mon cœur qu'on ce jour vous
soyez fière de moi, et que je réalise l'un de vos rêves.*

Ames chères sœurs : Hadjila, Nadjet, Lamia et Soumia.

A mon chère frère : Mohamed Abdelhak,

A mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, a tous les membres de la famille.

*A mes très chères amies, je dédie ce travail à toute notre préparation,
les jours et les nuits blanches, nos larmes et nos fous rires, nos déception et nos éclat
de joie. A notre belle amitié.*

*En fin à touts les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un
moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis aujourd'hui.*



Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1. Les algues.....	3
I.1.1. Les grands groupes des algues marines.....	3
I.2. Les microorganismes marins	4
I.2.1. Les bactéries marines.....	5
I.2.2. Les Actinomycètes	5
I.2.2.1. Définition.....	5
I.2.2.2. Le genre <i>Streptomyces</i>	6
I.2.3 .Champignons.....	8
I.3.4.2. Généralité sur le biosurfactants.....	
I.2.3.2. Les champignons marins.....	10
I.3. Les activités microbiennes	11
I.3.1. Activité antimicrobienne	11
I.3.1.1. Généralités.....	11

I.3.1.2. Les antibiotiques.....	12
I.3.1.3. Antibactérienne.....	12
I.3.2. Activités protéolytique.....	12
I.3.3. Activité hémolytique	12
I.3.4. Activité émulsifiante	13
I.3.4.1. Pouvoir émulsifiant	13
I.3.4.2. Généralité sur le biosurfactants.....	13
A. Définition.....	13
B. Classification des biosurfactants.....	13
C. Applications de biosurfactants.....	15

Chapitre II :Partie expérimentale

II.1. Introduction.....	17
II.2. Matériel et méthodologie expérimentale.....	17
II.2.1. Origine des souches microbiennes	17
Récolte et isolement.....	17
Conservation.....	18
II.2.2. Repiquage	18
II.2.3. Identification phénotypique des souches	18
II.2.3.1. Etude morphologique.....	18
II.2.3.2. Études physiologiques.....	19
II.2.4. Milieux de culture.....	19
II.2.5. La mise en évidence des activités antimicrobienne pour les bactéries.....	22

II.2.5.1. Microorganismes cibles.....	22
II.2.5.2. Préparation des suspensions bactériennes.....	23
II.2.6. Mise en évidence des activités antimicrobienne pour les streptomycètes..	23
II.2.6.2. Technique des cylindres d'Agar.....	24
II.2.7. Activité antimicrobienne pour les champignons.....	24
II.2.8. Mise en évidence des activités protéolytique.....	25
II.2.9. Mise en évidence des activités hémolytique	25
II.2.10. Mise en évidence des activités émulsifiant.....	26
II.2.10.1. Activités émulsifiant des bactéries	26
II.2.10.2. Activités émulsifiant des streptomycètes.....	27
II.2.10.3. Activités émulsifiant des champignons.....	27
II.2.11. Production de biosurfactante.....	28
II.2.12. Extraction du biosurfactante.....	28
II.2.13. Spectroscopie FTIR.....	29

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Identification phénotypique des souches bactériennes	31
III.1.1. Etude morphologique et observation microscopique.....	31
III.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	33
III.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique	37
III.4. Mise en évidence de l'activité émulsifiante	39
III.4.1. Sélection de la meilleure souche bactérienne productrice de biosurfactant.....	39
III.4.3. Sélection du meilleur champignon producteur de biosurfactant.....	45

III.5. Production et extraction des biosurfactants..... 47

III.5. Spectre de FTIR des biosurfactants..... 48

Conclusion..... 52

Références bibliographique

Annexes

Résumé

Le présent travail porte l'étude des activités microbiennes chez des souches marines : Emulsifiante, Protéolytique, Antibactériennes nouvellement isolée à partir des deux algues brune et rouge *Zonaria tournefortii* et *Asparagopsis armata* récoltée au niveau de la Corned'Or à Tipaza. Le criblage des souches bactériennes isolées a permis de sélectionner les souches performante, ce criblage a été réalisée par trois activités. L'étude de l'activité antimicrobiennes des souches bactériennes a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar, et a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches vis-à-vis de dix bactéries cibles ainsi sélectionnez des bactéries productrices des antibiotiques.

L'activité protéolytique Permettre de savoir la souche productrice de protase, la présence d'un halo transparent dans le milieu indique la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait, la troisième activité consiste à l'activité émulsifiante qu'est la détermination de la production de biosurfactant

Ces trois activités nous ont permis de sélectionner 10 performant souches bactériennes (bactérie, actinomycète et champignons)

L'analyse chimique des biosurfactants produites a été analysées par FTIR .Les spectres obtenu a permis de savoir les principales fonctions existant dans notre Boisurfactants .

Mots clés : *Zonaria tournefortii* , *Asparagopsis armata*, Boisurfactants, actinomycète

Abstract

The present work deals with the study of microbial activities in Marine strains: Emulsifier, Proteolytic, Antibacterial newly isolated from two brown and red algae *Zonaria tournefortii* and *Asparagopsis armata* harvested at Corned'Or in Tipaza. The screening of isolated bacterial strains made it possible to select the efficient strains, this screening was carried out by three activities. The study of the antimicrobial activity of the bacterial strains was carried out by the Agar cylinder method, and it was possible to detect the inhibitory effect of the strains with respect to ten target bacteria and thus select bacteria that produce the antibiotics. .

Proteolytic activity To know the protease producing strain, the presence of a transparent halo in the medium indicates the secretion of proteases by the strains and the hydrolysis of milk proteins, the third activity consists of the emulsifying activity which is the determination of biosurfactant production

These three activities allowed us to select 10 high performing bacterial strains (bacterium, actinomycete and fungi)

Key words: *Zonaria tournefortii* , *Asparagopsis armata* biosurfactant, actinomycete

Liste des abréviations

°C	: degré Celsius
µl	: Microlitre
µm	: Micromètre
ATCC	: American Type Culture Collection
DDP	: Diamètre du déplacement du pétrole brut
FTIR	: Infra Rouge Transformé de Fouries
g	: Gramme
GLM	: glucose -extrait de levure -extrait de malte
GN	: Gélose Nutritive
GNL	: Gélose nutritive au lait
HO	: Huile d'olive
HO	: Huile de table
ISP	: International Streptomyces Project
L	: Litre
LB	: Milieu Luria Bertani.
MH	: Muler-Hintan
min	: Minute
ml	: Millilitre
MM	: Milieu Minimum
mm	: Millimètre
P	: Pétrole

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : Potentiel Hydrogène.

Sab : Sabouraud

tr/min : tour/minute

UV : Ultra-Violet

Vit : Vitamine

VNSS : Vaätanen Nine Salt Solution

Liste des tableaux

Tableau n° 01 : les résultats de l'activité antimicrobienne des souches bactériennes ..	33
Tableau n° 02 : les résultats de l'activité antimicrobienne des streptomycètes	35
Tableau n° 03 : les résultats de l'activité antimicrobienne des champignons	36
Tableau n° 04 : les résultats de l'activité protéolytique des bactéries.....	37
Tableau n° 05 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur le test de déplacement d'huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps.....	39
Tableau n° 06 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur le test de déplacement d'huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps.....	44
Tableau n° 07 : Sélection de champignons producteur de biosurfactant basée sur le test de déplacement d'huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps..	46

Liste des figures

Figure n° 01 : Structure d'un tensioactif	13
Figure n° 02 : le prélèvement des cylindres de gélose et déposition sur le milieu MH étales par les bactéries-tests.....	22
Figure n° 03 : les suspensions bactérienne	23
Figure n° 04 Nappe de pétrole.....	27
Figure n° 05 déplacement de pétrole.....	27
Figure n° 06 : Observation microscopique des cellules bactériennes après fixation	31
Figure n° 07 : résultats de teste de catalase pour quelque souches bactérienne	32
Figure n° 08 : résultats de teste de mannitol-mobilité de quelque souches bactérienne...	32
Figure n° 09 : Activité antibactérienne des souches K1, AAR1, AAR2, AAZ3, AAZ9 contre <i>Micrococcus luteus ATCC 14110</i>	36
Figure n° 10 : Activité antibactérienne des champignons CAR2, CAR7, CAR 8 et CAR 9 contre les bactéries-testes.....	36
Figure n° 11 : Activité protéolytique des quelques souches bactérienne	38
Figure n° 12 : Activité protéolytique des streptomycètes K1, AAR1, AAR2, AAZ3 et AAZ9.....	38
Figure n° 13 : les diamètres de déplacement d'huiles des déférentes souches bactériennes avec l'huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps.....	41
Figure n° 14 : les diamètres de déplacement d'huiles des déférentes souches bactériennes avec l'huile de table comme source de carbone en fonction de temps.....	42
Figure n° 15 : les diamètres de déplacement d'huiles des déférentes souches bactériennes avec le pétrole comme source de carbone en fonction de temps.....	42
Figure n° 16 : la cinétique de production du biosurfactant par les streptomycètes avec l'huile de table comme source de carbone en fonction de temps	44
Figure n° 17 : la cinétique de production du biosurfactant par les streptomycètes avec l'huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps.....	45
Figure n° 18 : la cinétique de production du biosurfactant par les champignons avec l'huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps.....	46

Figure n° 19: la cinétique de production du biosurfactant par les champignons avec le pétrole huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps.....	47
Figure n° 20: Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche 17 R.....	49
Figure n° 21: Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche K1.....	49
Figure n° 22: Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche CAR 7.....	50

INTRODUCTION

GENERALE

L'environnement marin est un écosystème rendu unique en raison de la diversité des organismes qu'il abrite, il est extrêmement complexe et contient une grande diversité de formes de vie [1], Parmi ses organismes, les algues font preuve d'une incroyable richesse, de nouvelles espèces sont identifiées perpétuellement et des projections estimaient que les 36 000 espèces [2].

Les algues marines sont utilisées dans le monde depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives, depuis plusieurs années un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles substances d'intérêts biotechnologiques. Ainsi, sur le marché pharmaceutique et cosmétique, 30% des substances actives ont été développées à partir de substances naturelles dont 10 % ont été isolées à partir d'organismes marins.

Les microorganismes marins jouent un rôle clé dans tout processus écologique marin, d'où l'intérêt croissant pour l'étude de leurs populations et de leurs fonctions. Les communautés microbiennes sur les algues restent toutefois sous-explorées, malgré leur énorme biodiversité et le fait qu'elles diffèrent nettement de celles vivant librement dans l'eau de mer. [3]

L'objectif principal de notre travail dans le cadre de ce mémoire est le criblage des souches performantes à partir une collection microbienne isolé à l'algue brune *Asparagopsis armata*, qui produisant les antibiotiques et les protéases plus que la production des biosurfactantes, sa dans la première étape.

La deuxième étape concerne la production et l'extraction des biosurfactantes produites pas les bactéries, actinomycètes et les champignons

Cette mémoire est structurée en trois chapitres : le premier chapitre présente une synthèse bibliographique, le second décrit le matériel et les méthodes utilisées, et un troisième chapitre consacré aux résultats et discussion qui sera suivi d'une conclusion et des perspectives de cette recherche.

Synthèse

bibliographique

I.1. Les algues

Les algues sont un groupe diversifié d'organismes photosynthétiques des formes unicellulaires (Microalga) aux formes multicellulaires (Macroalgae), ils ont la chlorophylle comme pigment photosynthétique primaire et font pas d'ancêtre commun. [4]

I.1.1. Les grands groupes des algues marines

En général, les algues regroupent quatre groupes qui sont différenciées par rapport à la couleur, Chaque groupe contient des classes, et chaque classe contient des centaines d'espèces. [5]

A. Les algues vertes (Chlorophycées)

Elles sont de formes très variées, uni-ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles, auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures, la plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieux marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre. Elles jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux, favorisant ainsi la vie animale. [5]

B. Les algues brunes (Phéophycées)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance du pigment xanthophylle, la fucoxanthine, qui masque les autres pigments, toutes possèdent une structure pluricellulaire, mais leurs dimensions varient depuis les éléments microscopiques jusqu'aux très grands spécimens. La grande majorité des algues brunes sont marines. [5]

C. Les algues rouges (Rhodophycées)

Les rhodophytes ou algues rouges forment un groupe très diversifié. Ces algues doivent leur couleur à la présence de plastes roses dans lesquels un pigment rouge, la phycoérythrine, est associé à plusieurs autres pigments dont les chlorophylles. La plupart de ces algues rouges sont pluricellulaires et marines, mais il

existe quelques formes unicellulaires et quelques unes vivent également en eau douce.[5]

D. Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries ou les algues bleues sont constituées des colonies de taille, de forme et de couleur très variables. Comme les algues rouges, elles possèdent des pigments surnuméraires bleus (Phycocyanines) et rouges (Phycoérythrine) qui masquent la chlorophylle, en dépit de leur nom ancien d'algues bleues, elles sont rarement bleues mais plus souvent rouges, vertes avec des reflets bleutés, violets, bruns, jaunes ou orangés. La plupart d'entre elles ont une consistance gélatineuse voire gluante en raison des mucilages qu'elles sécrètent. [5]

I.2. Les microorganismes marins

Les micro-organismes sont une composante essentielle de la biosphère terrestre [6], leur nombre dans les environnements aquatiques est énorme, l'eau de mer contient jusqu'à 107 virus, 106 bactéries, 103 champignons, 103 microalgues, et 10 à 100 larves microscopiques[7], l'environnement aquatique favorise le développement des microbes et la formation des biofilms sur les surfaces[8].

De plus, les surfaces algales fournissent un habitat riche en matériau organique. Les macro-algues libèrent de grandes quantités de carbone organique dans l'environnement, fournissant des nutriments pour les micro-organismes [9] et le déclenchement du comportement chimiotactique des bactéries [10].

Les bactéries et champignons marins sont d'un grand intérêt en tant que sources nouvelles et riches de produits biologiquement actifs.

Ils vivent en étroite association avec les organismes marins à corps mou, qui manquent des mécanismes de défense structuraux évidents, et comptent ainsi sur le produit chimique de défense par la production de métabolites secondaires bioactifs, soit seuls soit par la microflore survivre dans leur habitat extrême. [11]

I.2.1. Les bactéries marines

Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes les plus nombreux sont les microorganismes, les bactéries forment la composante majoritaire

Le terme bactérie est un nom vernaculaire qui désigne certains organismes vivants microscopiques et procaryotes présents dans tous les milieux. Le plus souvent unicellulaires, elles sont parfois pluricellulaires (généralement filamenteuses), la plupart des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces au sein d'un gel muqueux [12]

Les bactéries marines diffèrent physiologiquement de celles qui ont des habitats non marins, elles sont très adaptées aux conditions très spéciales offertes par le milieu marin (salinité, pH, oxygénation réduite, basses températures et des pressions souvent considérables) [13]

Les bactéries servent de nourriture à de nombreux organismes marins, elles favorisent la fixation d'algues ou de larves sur certains substrats, elles permettent également la dégradation de certains polluants tels que naphthalène, pesticides, cellulose, hydrocarbures, etc, mais Certaines bactéries ont la capacité de concentrer des polluants tels que les métaux lourds (mercure). [14]

I.2.2. Les Actinomycètes**I.2.2.1. Définition**

Les actinomycètes sont des bactéries Gram positive formant des colonies à la morphologie complexe, [15] ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant.

Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression "ray fungi" ou "champignons rayonnants". [16]

I.2.2.2. Le genre *Streptomyces*

A. Définition et caractéristiques principales

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production de métabolites secondaires importants.

Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse. Cela explique leur dénomination : Du Grec *Strepto*.myces : *Streptos* : tordu ou courbé et *myces* : champignons. [17]

À cause de leur structure filamenteuse, les actinomycètes y compris les *Streptomyces* ont longtemps été sujets à controverse à propos de leur nature : certains les considérant comme des bactéries filamenteuses, d'autres comme des champignons.

Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre *Actinomycetales* de la classe *Actinobacteria*. [18]

B. Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels, [19] la grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc.) et dans des zones géographiques variées : l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts. [20]

Ils sont généralement saprophytes (genre *Frankia*). Certains sont pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*), d'autres pour les animaux (*Actinomyces bovis*) ou pour les végétaux (*Streptomyces scabies*, agent de la galle de la pomme de terre). [21]

C. Les actinomycètes marins

Certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins [22], dans des sédiments situés à plus de 4000m de profondeur [23].

Ils sont présents dans les fonds fluviaux ou lacustres. La colonisation normale du milieu marin est un point controversé, selon les uns, il existerait une flore d'actinomycètes spécifique aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible ; selon d'autres, les actinomycètes isolés de ces milieux correspondraient à des souches terricoles adaptées à la salinité marine [24].

Les actinomycètes sont également présents dans les lacs extrêmement alcalins, les lacs salés, en revanche il semblerait qu'ils sont absents dans les eaux minières très acides ($\text{pH} < 1$) et les sources thermales très chaudes d'origine volcaniques. [25]

D. Importance des actinomycètes

La principale raison derrière l'engouement pour les actinomycètes vient du fait qu'ils possèdent des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes, [26] mais également pour la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique. Il a été estimé que sur 16500 antibiotiques connus, 8700 (53%) sont produits par les actinomycètes dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces*. [27]

En plus de la production d'antibiotiques, les actinomycètes produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activités, tels que des inhibiteurs d'enzymes, immunosuppresseurs, toxines et pesticides.[28]

➤ Dans les domaines médical, vétérinaire et industriel

Les actinomycètes ont fourni un nombre considérable de composés bioactifs de haute valeur commerciale, et sont recherchés de façon routinière dans le but de découvrir de nouvelles substances bioactives. [29]

Les antibiotiques ont aussi trouvé une application dans les élevages industriels d'animaux.

Ils sont utilisés non seulement pour combattre les maladies des animaux et des plantes, mais aussi dans l'alimentation pour augmenter les rendements zootechniques. [30]

➤ **Dans le domaine agronomique**

En plus de la production d'un grand nombre de métabolites d'importance commerciale, les actinomycètes possèdent d'autres potentiels intéressants tels que leur implication dans le processus de recyclage. En effet, ils sont vitaux pour le recyclage des nutriments et comptent parmi un nombre réduit d'organismes utilisés en bioremédiation, capable de dégrader des composés organiques complexes tels que la chitine[31] et grâce à un potentiel enzymatique riche ainsi que des spores résistantes à la dessiccation. [32]

Ils ont la possibilité de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Ils sont aussi capables de dégrader des hydrocarbures chlorés ainsi que des composés organiques complexes. [33]

I.2.3 .Champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes apparentés aux végétaux, ont des formes de vie très variées , les plus simples sont unicellulaires, mais la plupart sont pluricellulaires, ils se nourrissent des matières organiques de leur environnement en sécrétant des enzymes qui « digèrent » les divers composés organiques qui les entourent et les réduisent en petites molécules solubles, celles-ci diffusent au travers des parois de leurs cellules.

Comme les bactéries, beaucoup de champignons sont des organismes saprophytes : ils assurent la décomposition de la matière organique morte, animale et végétale, de déchets de toutes sortes. Nombreux sont aussi les champignons qui, en s'attaquant à la matière vivante elle-même, sont responsables de maladies plus ou moins graves, appelées mycoses, chez les animaux, dont l'Homme, et chez les végétaux. L'étude des champignons est la mycologie. [34]

I.2.3.1. Biologie**A. Structure**

Les champignons les plus simples, constitués d'une cellule unique, sont groupés dans l'ensemble des levures, les autres sont pluricellulaires. Pour la plupart, ils ont la forme de filaments. Chez les champignons primitifs, ces filaments ne sont pas cloisonnés, chez les champignons supérieurs, ces filaments, appelés hyphes, sont divisés par des cloisons et constitués de longues files de cellules contenant chacune un ou deux noyaux. La cloison entre deux cellules est perforée en son centre par un minuscule pore qui permet la circulation de substances d'une cellule à l'autre.

Comme les végétaux, la plupart des champignons possèdent une paroi qui protège leurs cellules et constitue la frontière avec le milieu extérieur. Le principal constituant de cette paroi cellulaire n'est pas la cellulose, polysaccharide constitué de glucose, mais la chitine, polysaccharide dont l'unité de base, azotée, dérive du glucose. La cellulose ne se rencontre que chez quelques groupes, principalement les oomycètes. [34]

B. Physiologie

Les champignons sont des organismes aérobies : ils ont besoin d'oxygène libre, élément de base nécessaire à la respiration.

Les spores, éléments de survie, sont moins hydratées, le développement des champignons exige donc beaucoup d'eau et d'oxygène, mais également une source de carbone organique, puisqu'ils ne peuvent effectuer la photosynthèse. La plupart des champignons utilisent des sucres simples comme le glucose ou le lévulose (ou fructose), mais, dans la nature, ils se trouvent fréquemment en présence de polysaccharides, sucres complexes qu'ils doivent d'abord dégrader avant de les absorber. Pour cela, ils sécrètent dans le milieu extérieur des enzymes digestives qui dégradent ces sucres complexes en sucres simples, assimilables pour l'organisme.

Parmi les autres éléments nécessaires au développement des champignons, on notera des éléments minéraux comme le phosphore, le potassium, le magnésium, le soufre, des traces de fer, manganèse, cuivre, molybdène, zinc, gallium et de petites

quantités de substances de croissance (vitamines) que certains champignons sont incapables de synthétiser eux-mêmes.

Certains champignons ou levures peuvent également survivre en situation anaérobie (absence d'oxygène). Ils transforment alors le sucre des fruits en alcool (éthanol) et en gaz carbonique grâce à un ensemble d'enzymes excrétées, permettant la fermentation alcoolique. [34]

I.2.3.2. Les champignons marins

Les champignons marins sont un groupe diversifié d'organismes opportunistes et obligatoires isolés des milieux marins. [35]

Ils sont un groupe écologique plutôt que taxonomique et comprennent environ 1500 espèces, ils se rencontrent dans la plupart des habitats marins et ont généralement une distribution pantropicale ou pantempérée. Les champignons marins sont des décomposeurs majeurs des substrats ligneux et herbacés dans les écosystèmes marins. Leur importance réside dans leur capacité à dégrader agressivement la lignocellulose. Ils peuvent être importants dans la dégradation des animaux morts et des parties d'animaux. [36]

❖ Utilisation

Les champignons ont de multiples utilisations, soit à cause de leur mode de vie, soit à cause des enzymes qu'ils excrètent, soit encore à cause des autres substances qu'ils produisent.

➤ Agroalimentaire

Les levures sont principalement employées pour leur capacité à transformer les sucres simples en alcool (fermentation alcoolique), par exemple au cours de la vinification, de l'élaboration de la bière et de toutes les boissons alcoolisées. Elles servent également à la fabrication des pâtes levées, dont le pain est le principal exemple. Des levures, mais surtout diverses moisissures (deutéromycètes) sont essentielles dans la fabrication des fromages : *Penicillium camemberti* pour le camembert, *Penicillium roqueforti* pour le roquefort, etc.

➤ Industrie

Divers champignons produisent des enzymes qui sont ensuite purifiées et utilisées dans l'industrie. C'est le cas des amylases, qui permettent la digestion de l'amidon et sa transformation en dextrines (pour l'alimentation des jeunes enfants, par exemple), en fructose (pour la préparation de boissons sucrées et de confiseries) et en de nombreux autres sucres simples. Diverses protéases sont utilisées comme présure dans la fabrication des fromages, à la place de la présure intestinale du veau.

Les champignons sécrètent d'autres substances d'intérêt économique, comme les acides citrique, gluconique, gallique, ou encore l'acide fumarique produit par une moisissure du pain et utilisé dans la fabrication de résines synthétiques. Un champignon parasite du riz produit l'acide gibberellique, qui favorise la croissance des plantes. Diverses vitamines sont obtenues grâce à des champignons : l'ergostérol, molécule que l'on peut extraire des restes de levures de fermentation, permet d'obtenir la vitamine D, mais aussi la riboflavine (Vit. B2) et la biotine (Vit. H). [34]

➤ Médecine

L'utilisation médicale des champignons remonte à l'Antiquité ; ils étaient alors utilisés comme purgatifs. Actuellement, une substance produite par le *Claviceps* de l'ergot des graminées (le seigle, par exemple) est encore employée pour provoquer les contractions utérines. Cependant, la plupart des alcaloïdes de l'ergot sont extrêmement dangereux et peuvent provoquer des intoxications mortelles. Des champignons de grande taille produisent également des substances utilisées dans l'industrie pharmaceutique, mais ne sont pas comestibles. . [34]

I.3. Les activités microbiennes**I.3.1. Activité antimicrobienne****I.3.1.1. Généralités**

Un microbe, ou micro-organisme fait partie d'un groupe large et extrêmement divers d'organismes, ils ne peuvent être visualisés sans l'aide d'un microscope.

Les microbes sont indispensables à la vie. Parmi leurs nombreux rôles, ils sont nécessaires au cycle géochimique et la fertilité de sols. Ils sont utilisés pour produire des aliments ainsi que des composants pharmaceutiques et industriels.

D'un autre côté, ils peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires, ils sont aussi largement utilisés dans les laboratoires de recherche pour étudier les processus cellulaires. [38]

I.3.1.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des produits élaborés par des micro-organismes, la thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. [39]

I.3.1.3. Antibactérienne

Une substance antibactérienne ou bactéricide est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

I.3.2. Activités protéolytique

C'est un test microbiologique qualitatif et préliminaire qui est utilisé comme moyen de criblage, nous a permis de sélectionner la souche qui possède une activité protéolytique.

Dans ce test, on met une piqure centrale des souches dans les boîtes de Pétri qu'est coulé avec le gélose nutritive au lait (GNL), les boîtes de Pétri sont incubées à 30 °C de 24 à 48 h. [40]

L'activité protéolytique se manifeste par la diffusion d'un halo transparent dans le milieu qui indique la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait (caséines).

I.3.3. Activité hémolytique

C'est la distraction des globules rouges libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguine

I.3.4. Activité émulsifiante

I.3.4.1. Pouvoir émulsifiant

L'émulsion est un système hétérogène composé au moins d'un liquide non miscible intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse en général 0,1 mm (microémulsion). [41]

I.3.4.2. Généralité sur le biosurfactants

A. Définition

Les biosurfactants sont des produits naturels dérivés de bactéries, de levures ou de champignons [42], se sont des molécules amphiphiles produites dans la vie constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe apolaire (figure n°01) Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [43] .

Les fragments hydrophobes et hydrophiles qui confèrent la capacité de s'accumuler entre les phases fluides, réduisant ainsi la surface et l'interface tension à la surface et à l'interface respectivement [44]

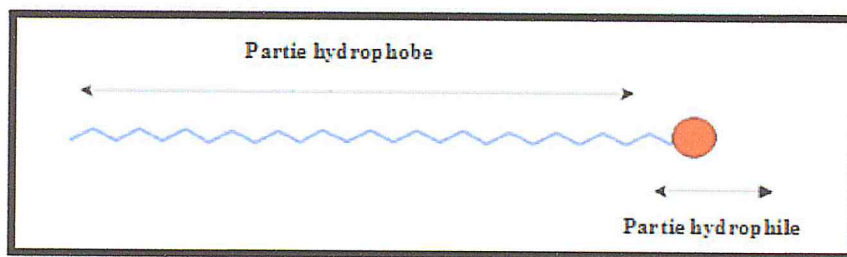


Figure n° 01 : Structure d'un tensioactif

B. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés sur la base de leur poids moléculaire et sur la base de leur composition chimique. [45]

➤ **Classification basée sur le poids moléculaire**

✓ **Biosurfactants de faible poids moléculaire:**

Ces composés réduisent la tension superficielle et interfaciale aux interfaces air / eau [45] les biosurfactants de bas poids moléculaire sont généralement des glycolipides ou des lipopeptides. [46]

Biosurfactants de poids moléculaire élevé:

Ce sont des émulsifiants très efficaces qui fonctionnent à de faibles concentrations (efficaces pour stabiliser les émulsions d'huile dans l'eau) [45], sont généralement les polysaccharides amphiphile, protéines, lipopolysaccharides et lipoprotéines [46]

➤ **Classification basée sur la structure chimique**

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : glycolipides, lipopeptides, phospholipides, lipopolysaccharides et lipides neutres [46]

✓ **Glycolipides**

Les biosurfactants les plus connus sont des glycolipides [45], sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatiques. Cette liaison est au moyen d'éther ou d'un groupe ester [47].

✓ **Lipopolysaccharides**

Sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras [48] qui ont normalement une masse moléculaire élevée et sont solubles dans l'eau [45].

✓ **Lipopeptides**

Sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique, Les lipides d'ornitine sont les plus connus [48].

✓ **Phospholipides**

Sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique [49], et sont des composants majeurs des membranes microbiennes.

✓ **Acides gras et lipides neutres**

Sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée [48].

➤ **Biosurfactant particulaire**

Il existe des bactéries qui produisent des vésicules membranaires extracellulaires qui séparent les hydrocarbures formant une micro-émulsion. Les microémulsions qu'elles forment jouent un rôle essentiel dans l'absorption d'alcane par les cellules microbiennes, par exemple dans le cas d'*Acinetobacter* sp [50].

C. Applications de biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non-toxiques, biodegradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes [51], c'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines:

- environnement, récupération assistée du pétrole, le taux de récupération est 60-95 % dans des conditions extrêmes [52].
- agriculture, élimination des pesticides à partir des plantes et des sols, amélioration de la photosynthèse, croissance des plantes [52].
- agroalimentaire, amélioration de la texture et de la saveur des aliments[52].
- antiadhésive, élimination des biofilms bactériens par adsorption de couche de biosurfactant sur la surface (verre, polymère, acier...)[52].
- chimie, détergent domestique et industriel [52].
- cosmétique, préparation de crèmes hydratantes, préparation de shampoings et savons riches en huiles essentielles [52].
- industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses[53].

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

II.1. Introduction

Notre travail expérimental porte le criblage des souches performantes à partir d'une collection microbiennes nouvellement isolé aux algues brune en se basant sur des mesures qualitatives.

La partie expérimentale comporte cinq étapes :

- Repiquage des souches microbiennes ;
- criblage des activités microbiennes ;
- sélection des souches performantes ;
- la production et l'extraction des biosurfactantes ;
- Caractérisation structurale des biosurfactantes.

Le travail a été effectué au niveau du laboratoire de chimie des produits naturels (département de Chimie de l'Université Saad Dahlab Blida1)

II.2. Matériel et méthodologie expérimentale

II.2.1. Origine des souches microbiennes

➤ Récolte et isolement

Les souches microbiennes ont été nouvellement isolée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida 1 à partir de l'algue brune *Asparagopsis armata*.

25 souches bactériennes, 5 souches streptomycétales et 10 champignons ont été isolé à partir cette algue

- Conservation
- ✓ Conservation à court durée

Les différente souches ont été repiquée sur des milieux solide dans des tubes inclinés, après l'incubation les tubes sont conservée à +4 °C, Les milieux utilises sont :

- VNSS, LB et GN pour les bactéries ;
- ISP2 pour les streptomycètes;
- Sab, PDA pour les champignons .

✓ **Conservation à longue durée**

Les souches sont mises en culture dans un milieu liquide approprié (VNSS pour les bactéries, ISP2 liquide pour les streptomycètes et GLM pour les champignons), la suspension est mélangée avec 30% du glycérol stérile, elles sont répartie dans des cryotubes puis conservée à -80 °C.

II.2.2. Repiquage :

✓ Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été repiquées et ensemencé sur milieu solide Gélose nutritif en boîtes de Pétri et incubé 30 ° C pendant 24 heures.

✓ Les streptomycètes ont été repiquées sur milieu solide ISP 2 et incubé à 30°C pendant 7 jours.

✓ les champignons ont été repiquées sur milieu solide (PDA) et incubé à 28°C pendant 24 à 4 jours.

II.2.3. Identification phénotypique des souches

L'identification des souches a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques.

II.2.3.1. Etude morphologique

✓ **Caractéristiques microscopiques**

La coloration de Gram a été utilisée pour classer les bactéries selon leur Gram et leur morphologie sous microscope optique.

✓ **Coloration de Gram**

La coloration de Gram permet la mise en évidence des propriétés de la paroi bactérienne afin de les utiliser pour la distinction et la classification. Ceci permet de

donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la forme.

Le test est réalisé par étalement sur une lame en verre propre d'une suspension bactérienne qui est séchée et fixée par une flamme. La lame est recouverte pendant une minute du Violet de gentiane, puis lavée doucement à l'eau.

La lame est ensuite recouverte par la solution Lugol pendant une minute et de même lavée doucement à l'eau. On ajoute par la suite l'alcool pour la décoloration.

On recouvre enfin la lame par le réactif Fuschine pendant une minute et on réalise un lavage doux avant séchage, puis on observe au microscope optique.

II.2.3.2. Études physiologiques

✓ Test de la catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède le catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène.

L'activité catalytique consiste à déposer sur une lame en verre propre à l'aide d'une pipette pasteur, une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (H₂O₂)

Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène. [54]

✓ Test de mannitol-mobilité

Ce test permet de déterminer la mobilité, le tube est ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit et incubé pendant 24 h à la température adéquate, la lecture de la mobilité est comme suit:

- Envahissement du milieu : La bactérie est dite mobile.
- Croissance concentrée autour de la piqure centrale : La bactérie est dite immobile.

II.2.4. Milieux de culture

Tous les milieux préparés dans le but de la réalisation de cette étude sont stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

II.2.4.1. Milieu Luria Bertani (LB) liquide

Le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préculture des souches bactériennes. Il est composé de 10 g peptone, 5 g NaCl et 5 g extrait de levure.

II.2.4.2. Milieu Luria Bertani (LB) solide

Il est obtenu après l'addition de 15 g d'agar au milieu LB liquide. Il est souvent utilisé pour la conservation des souches bactériennes.

II.2.4.3. Milieu Gélose nutritive au lait (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches bactériennes en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu.

Il se compose de: 5 g peptone, 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH, après stérilisation et refroidissement jusqu'à une température de 40 °C, 250 ml du lait écrémé sont ajoutés.

Après homogénéisation du milieu, il est coulé dans des boîtes de Pétri. Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le criblage des souches productrices de protéases.

II.2.4.5. Milieu International *Streptomyces* Project 2 solide (ISP2)

Sa composition est de : 4 g Extrait de levure, 10 g Extrait de malte, 4 g Glucose, dans 1 L l'eau distillée

II.2.4.6. Milieu Vaatanen Nine Salt Solution (VNSS)

Le milieu VNSS est utilisé pour la préculture des souches bactériennes, il est composé de 17.6 g NaCl, 1.47 g Na₂SO₄, 0.08 g NaHCO₃, 0.25 g KCl, 0.04 g KBr, 1.87 g MgCl₂.6H₂O, 0.41 g CaCl₂. 2 H₂O, 0.01 g SrCl₂.6 H₂O, 0.010 g H₃BO₃, 1 g Peptone, 0.5 g Extrait de levure, 0.5 g Glucose, 0.5 g Amidon soluble, 0.01 g FeSO₄.7 H₂O, 0.01 g Na₂HPO₄, dans 1 L d'eau distillée.

II.2.4.7. Milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA)

La gélose dextrosée à la pomme de terre est un milieu de culture microbiologique pour les champignons courant produit à base d'infusion de pomme de terre.

Se prépare en faisant bouillir 200 g de pommes de terre tranchées dans 300 ml de l'eau pendant 30 minutes puis en laissant décanter le bouillon obtenu ou en le filtrant à travers un coton à fromage. On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre. Puis on ajoute 20 g d'agar avant une stérilisation par autoclave à 120 °C pendant 20 min

II.2.4.8 Milieu Glucose -extrait de Levure -extrait de Malte(GLM)

Il se compose de : 3 g extrait de levure, 3 g extrait de malte, 5 g peptone, 10 g glucose dans 1 L d'eau distillée.

II.2.4.9. Milieu CZAPEK

3 g NaNO_3 , 1 g K_2HPO_4 , 0.5g MgSO_4 , 0.5g KCl , 0.01g FeSO_4 , dans 1l eau de mère filtrée.

II.2.4.10. Milieu Sabouraud (Sab)

15 g agar, 10 g peptone, 40 g glucose dans 1 l d'eau distillée et on ajuste le pH à 7.

II.2.4.11. Muller-Hinton(MH)

300g infusion de viande, 17.5 g hydrolysate de caséine, 1.5 g amidon, 17 g agar .

II.2.4.12. Milieu Minimum (MM)

C'est un milieu qui comportant les éléments chimiques strictement nécessaires à la croissance d'un organisme, sa composition est de : 0.4 g NH_4Cl , 0.3 KH_2PO_4 , 0.3 K_2HPO_4 , 10g NaCl , 0.33 g MgCl_2 , 0.05g extraie de levure, 0.5 g glucose dans 1 L d'eau distillée.

II.2.5. Mise en évidence des activités antimicrobienne pour les bactéries

L'activité antimicrobienne des bactéries s'effectue par la méthode des cylindre d'agar, Les souches bactériennes sont ensemencées en stries serrées à la surface de la boîte de Pétri, après l'incubation de 24 à 48 heures à 30°C, des cylindres de gélose sont découpés stérilement à partir de ce milieu et déposés sur le milieu Muller-Hinton ensemencé par les bactéries-tests comme est dans la figure suivante .

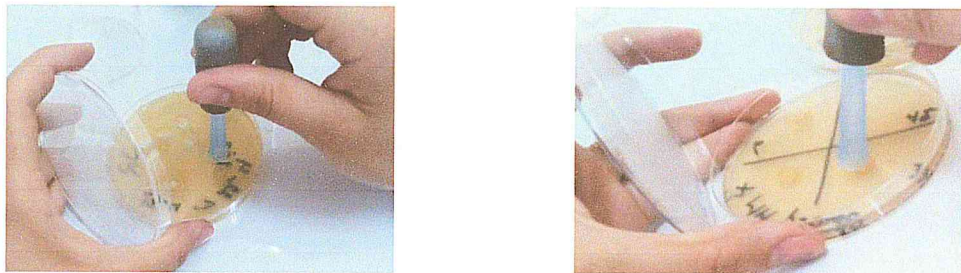


Figure n° 02 : le prélèvement des cylindres de gélose et déposition sur le milieu MH étales par les bactéries-tests

II.2.5.1. Microorganismes cibles

Dans le but d'effectuer un criblage préliminaire, les souches conservés ont été reprises et testés pour leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis des microorganismes cibles de référence.

L'activité antimicrobienne a été testée contre les bactéries suivantes :

Bactéries à gram positives :

- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *micrococcus luteus* ATCC 14110
- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 49594

Bactéries à gram négatives :

- ✓ *Pseudomonas aeroginosa* ATCC 25843
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ *salmonella enterica* ATCC 14028

Levures :

- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

II.2.5.2. Préparation des suspensions bactériennes

Pour chaque souche, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures sur GN, à partir de cette culture, une suspension est préparée dans de l'eau physiologique dans les tubes à essai, une dilution 1/10 de cette suspension sert d'ensemencer une gélose molle Mueller-Hinton.



Figure n° 03 : les suspensions bactérienne

II.2.5.3. Lecture

Après incubation, la présence de zone d'inhibition est observée autour des disques des souches produisant des antibiotiques contre la souche test.

Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée, l'absence de zones d'inhibition claires autour des disques d'agar, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries sont résistantes aux substances produites par les différentes souches, plus cette zone est grande, plus l'activité antimicrobienne est importante.

II.2.6. Mise en évidence des activités antimicrobienne pour les streptomycètes

L'activité antimicrobienne des streptomycètes est évaluée par la méthode des cylindres d'agar.

II.2.6.1. Microorganismes cibles

L'activité antimicrobienne a été testée contre les bactéries suivantes :

Bactéries à gram positives :

- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Micrococcus luteus* ATCC 14110
- ✓ *Bacillus cereus* ATCC 14975

Bactéries à gram négatives :

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25843
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922

Levures :

- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

II.2.6.2. Technique des cylindres d'Agar [55]

Les souches de *Streptomycètes* sont ensemencées en stries serrées à la surface de 15 ml de ISP2, après 14 jours d'incubation à 30°C, des cylindres de gélose de 6mm de diamètres sont découpés stérilement à partir de ce milieu et déposés sur le milieu Muller-Hinton qu'est préalablement ensemencé à l'aide d'un écouvillonne par les bactéries-tests.

Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives, ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h d'incubation à 28°C [56]

II.2.7. Activité antimicrobienne pour les champignons

L'activité antimicrobienne des champignons est réalisée par la méthode des cylindre d'agar, se sont repiquées sur le milieu PDA à la surface de la boîte de Pétri, après l'incubation de 48 heures jusqu'à 3 jours à 28°C, des cylindres de gélose sont découpés stérilement à partir de ce milieu et déposés sur le milieu Muller-Hinton ensemencé par les bactéries-test.

II.2.7.1. Microorganismes cibles

L'activité antimicrobienne des champignons a été testée contre les bactéries suivantes :

Bactéries à gram positives :

- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 49594

Bactéries à gram négatives :

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25843
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308

II.2.8. Mise en évidence des activités protéolytique

L'activité protéolytique des souches microbiennes se fait comme la suite :

Le milieu GNL est préparé et autoclavé puis coulé dans les boîtes de Pétri, après solidification du milieu, on met une piqûre centrale des souches microbiennes dans ce milieu et l'incubée à 30° C pendant 24 à 48 heures pour les souches bactériennes et à 28°C pour les champignons.

Les streptomycètes sont repiqués à la surface de milieu GNL et incubés pendant 7 jours à 30°C pour déterminer l'activité protéolytique

Lecteur des résultats

Après incubation, la présence d'un halo transparent dans le milieu indique la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait.

Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée, l'absence de l'halo clair autour des piqûres centrale, indique un résultat négatif, plus cette zone est grande, plus l'activité protéolytique est importante.

II.2.9. Mise en évidence des activités hémolytique

L'activité hémolytique a été déterminée sur milieu GN solide additionné de sang humain (5%). Les souches ont été repiquées sur ce milieu par piqûre centrale.

Le milieu de culture a été incubé à 30 °C pendant 24 à 48 heures, ensuite, il a été examiné par l'apparition d'une zone transparente autour des colonies (teste visuel) [57, 58].

Lecteur des résultats

Après incubation, la présence d'un halo transparent dans le milieu indique la distraction des globules rouges libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguine

Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée, l'absence de l'halo claires autour les piqûres centrale, indique un résultat négatif, plus cette zone est grande, plus l'activité est importante.

II.2.10.Mise en évidence des activités émulsifiant

l'activité émulsifiant à été mesuré selon la méthode de Cooper et Goldenberg[59]

II.2.10.1. Activités émulsifiant des bactéries

Dans cette étude on utilise le milieu VNSS comme un milieu de préculture des bactéries, cette expérience été réalisée dans des flacons de volume 50 ml contenant 25 ml de milieu liquide qu'est inoculé de 2 % d'une culture bactérienne et incubé à 30°C sous agitation de 150 tr /min pendant 24 à 48 heures.

Après, la culture est fait dans des flacons de 50 ml aussi remplir avec un volume de 25 ml du milieu MM plus un volume de 500 µl de source du carbone, le milieu a été inoculé avec 1% de préculture âgée préparé précédemment.

On utilise l'huile d'olive, l'huile de table et le pétrole comme source de carbone, ces derniers doivent être stérilisés sur des filtres de 0.45µm, ensuite, on à suives cinétique de la production du biosurfactante par le teste de déplacement d'huile

✓ Test de déplacement de l'huile

On remplir une boîte de Pétri d'eau distillée puis 1 ml de pétrole brut est déposé à la surface, une fine couche d'huile se forme immédiatement.

Par la suite, 200 µl de milieu ont été déposés doucement au centre de la couche d'huile, entraînant la formation d'un halo clair, le diamètre du cercle formé a été mesuré en cm.



Figure n° 04 Nappe de pétrole

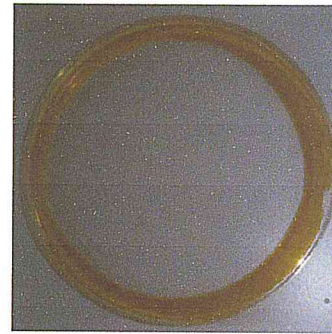


Figure n° 05 déplacement de pétrole

II.2.10.2. Activités émulsifiant des streptomycètes

On utilise le milieu ISP2 liquide comme un milieu de préculture des streptomycètes, les flacons de volume 50 ml remplis à 25 ml milieu liquide qu'est inoculé de 2 % d'une culture bactérienne et incubé à 30°C sous agitation 150 tr /min pendant 7 jours.

la culture est faite dans le milieu MM comme les bactéries, dans des flacons de 50ml contenant 25 ml du milieu plus 1% de préculture préparé déjà avec un volume de 500 µl de source du carbone qu'est l'huile d'olive et l'huile de table et on a suivies cinétique de la production du biosurfactante par le teste de déplacement d'huile aussi.

II.2.10.3. Activités émulsifiant des champignons

Le milieu GLM utilisé comme un milieu de préculture de champignons, dans des flacons de 50 ml on verse un volume de 25 ml du milieu liquide qu'est inoculé de 2 % des champignons et incubé à 28°C sous agitation 150 tr /min pendant 3 jours pour assuré la croissance des champignons.

La culture se fait dans le milieu CZAPEK, dans des flacons de 50ml contenant 25 ml du milieu plus 1% de préculture préparé déjà avec un volume de 500 µl de source du carbone qu'est l'huile de table et le pétrole puis on suivies la cinétique de production du biosurfactante par le teste de déplacement d'huile .

II.2.11. Production de biosurfactante**✓ Préparation de préculture**

Dans cette étude on utilise le milieu VNSS, ISP 2 liquide, GLM comme des milieux des précultures pour les bactéries, les streptomycètes et les champignons respectivement, cette expérience été réalisée dans des flacons de volume 50 ml contenant 25 ml des milieux.

Ces milieux liquide sont inoculées de 2 % d'une culture microbiennes et incubé à 30°C sous agitation 150 tr /min pendant 24h pour les bactéries, 7 jours pour les streptomycètes et à 28°C pendant 24 à 48 h pour les champignons.

✓ Préparation de milieu de production

L'huile d'olive est utilisée comme une source de carbone et énergie pour la production de biosurfactants à partir des bactéries et l'huile de table pour les champignons et les streptomycètes.

La production s'effectuer dans 5 flacons de volume 500 ml (pour que le volume finale égale à 1l), qui contiennent un volume de 200 ml du milieu MM (qu'est a été stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min après l'ajustement du pH à 7,2) additionnée à 1% de source de carbone (2.5ml) et un volume de préculture égale à 2.5 ml, ces flacons sont incubé à 30°C sous agitation 150 tr /min pendant 24 heures.

II.2.12. Extraction du biosurfactante

Généralement l'extraction du biosurfactante est utilisée pour éliminer les composés hydrophiles qui constitué dans le produit. Les solvants individuels ou mixtes les plus employés sont : Acétate d'éthyle, chloroforme/méthanol (2/1), butanol, hexane et acide acétique .

L'extraction a été effectuée après 48 h d'incubation lorsque la production est maximale dans le surnageant (Mesure de DDP), le milieu de culture a été centrifugé à 4000 tr /min pendant 20 min afin d'éliminer la biomasse.

Ce dernier est filtré et acidifié à un pH=2 avec la solution d'HCl (2 N). Ensuite, il est laissé au repos une nuit à 4 °C, le précipité est récupéré par centrifugation et remis en solution dans un tampon pH=8.

L'extraction liquide liquide a été réalisée en utilisant le solvant l'acétate d'éthyle (v/v) pour les biosurfactantes produites par la bactérie et le champignon et le chloroforme/méthanol (2/1) pour celle produite par streptomycète.

La phase organique ainsi obtenue contenant le biosurfactant, séchée par l'évaporateur rotatif à 40.

II.2.13. Spectroscopie FTIR

Les absorptions dans l'infrarouge permettent de déterminer la présence de groupements et fonctions au sein d'une substance inconnue, à l'aide de tables de corrélations. [60]

La méthode utilisée est celle de la pastille de bromure de potassium (KBr), pour les échantillons solides, 1 mg de biosurfactants secs est broyé avec 100 mg de KBr, le mélange homogène est placé dans un dispositif spécial permettant la réalisation d'une pastille circulaire translucide sous haute pression.

Par contre les échantillons huileux, la pastille de KBr formée vide puis on prend une petite quantité du biosurfactant à l'aide d'une pipette Pasteur et on le dépose sur la pastille qui est ensuite analysée à l'aide d'un appareil de type JASCO FT/IR.

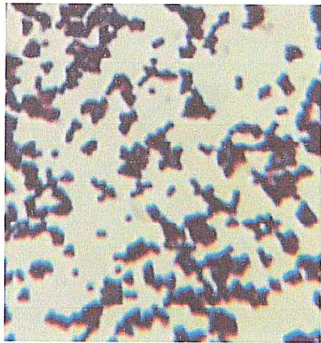
Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm^{-1} et enregistrés. Le logiciel Specamp a été utilisé pour le traitement des spectres obtenus.

Résultats et discussion

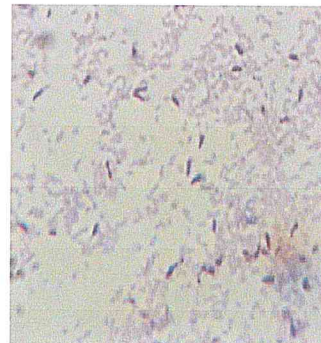
III.1. Identification phénotypique des souches bactériennes

III.1.1. Etude morphologique et observation microscopique

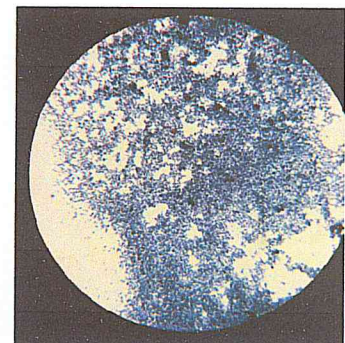
L'observation microscopique a été réalisée après coloration de Gram au microscope optique à l'objectif à immersion (G×40), les résultats obtenus ont montré que les souches sont des *Bacillus* ou bien *Staphylococcus* à coloration de gram positive.



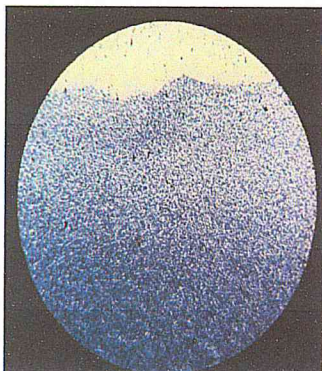
21 R



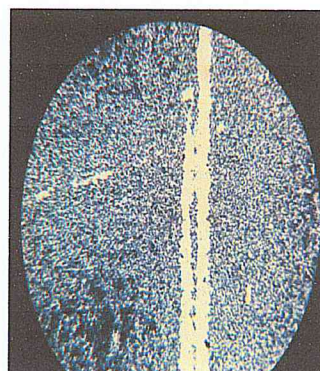
18 R



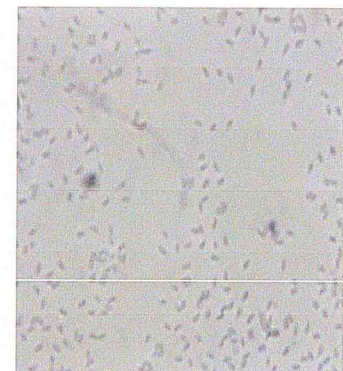
6 R



K 4



K '4



17 R

Figure n° 06 : Observation microscopique des cellules bactériennes après fixation (coloration de gram)

Etudes physiologiques

Les testes physiologique utilisées dans notre étude sont le teste de catalase et le teste de mannitol-mobilité

Teste de catalase

D'après la **Figure n° 07** nous remarquons que le résultat du test catalase est positif pour tout les bactéries , il est basé sur le dégagement immédiat de bulles gazeuses qui est du à l'élimination du peroxyde d'hydrogène issue de la voie respiratoire oxydative par l'enzyme catalase.

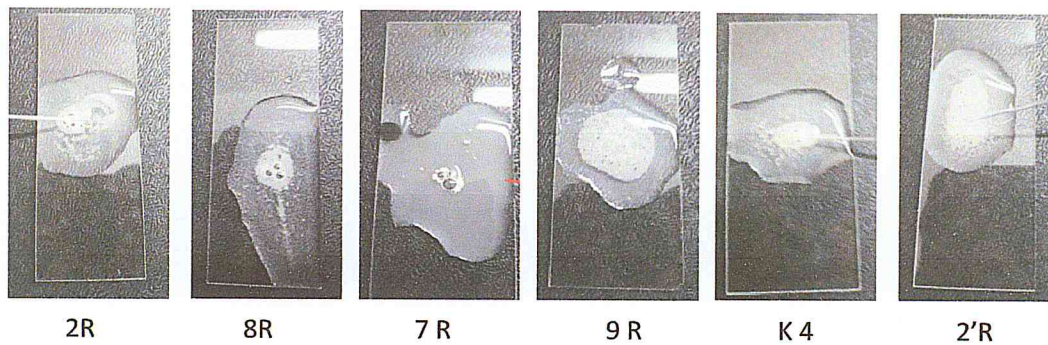


Figure n° 07: Résultats du test de catalase pour quelque souches bactérienne

Teste de Mannitol-mobilité

Une bactérie est dite mobile quand on voire Envahissement du milieu, les souches bactérienne sont ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit et incubé pendant 24 h à la température adéquate, les résultats obtenue montrent que la collection des souches bactérienne est mobile.

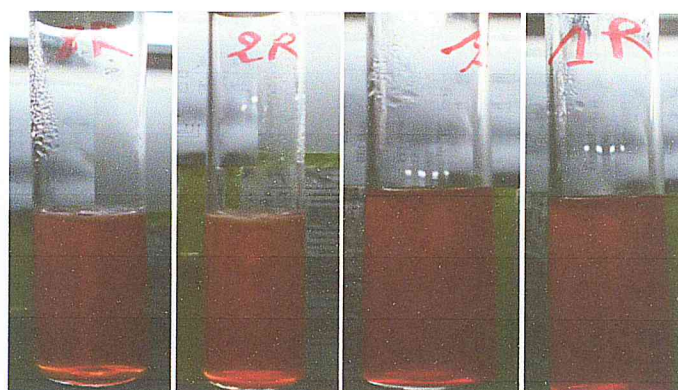


Figure n° 08: résultats de teste de mannitol-mobilité de quelque souches

III.2.Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de nos souches a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches envers les bactéries-tests utilisées [61]

La croissance de la bactérie-test ensemencée sur la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Le choix du milieu Muller Hinton a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries-tests et offrant des résultats claires grâce à sa limpidité.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n°11, tableau n°2, tableau °3 pour les bactéries, streptomycètes et champignons respectivement.

Tableau n° 01 : les résultats de l'activité antimicrobienne des souches bactériennes

	<i>Ba.sub</i>	<i>Staph</i>	<i>micro</i>	<i>E.coli</i>	<i>Sacca</i>	<i>Pseudo</i>	<i>candid</i>	<i>salmo</i>	<i>LM</i>
1 R	-	-	-	-	/	-	-	/	/
2 R	-	+	+	-	-	+	-	-	-
2 'R	-	-	-	-	/	-	-	-	/
3 R	-	-	-	-	/	-	-	-	/
3'R	-	-	+	+	+	+	+	-	-
K 4	-	-	+	-	/	-	-	-	/
K' 4	-	-	-	-	/	-	-	-	/
5 R	-	-	-	-	/	-	-	-	/
6 R	-	-	-	-	/	+	-	-	+
7 R	+	-	+	+	+	-	+	-	+
8 R	+	+	-	-	+	+	-	-	-
9 R	-	+	-	-	+	+	-	-	-
12 R	-	-	-	-	/	-	-	/	/
14 R	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16 R	+	+	-	-	-	-	-	/	-
17 R	+	-	+	+	+	+	+	+	+

17' R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18 R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 R	+	-	-	-		-	-	-	+
23 R	+	-	-	+	-	-	-	-	-

+ : présence de l'activité antimicrobienne des souches bactériennes

- : absence de l'activité antimicrobienne des souches bactériennes.

L'activité antibactérienne diffère d'une bactérie à l'autre et il diffère d'une bactérie test à l'autre.

Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture

On peut constater d'après les résultats représentés dans le tableau n° 01 que les bactéries 3'R, 7 R, 17R et 17' R ont une activité antimicrobienne contre la majorité des bactéries-teste.

La différence en composition de la paroi entre les bactéries à coloration de Gram positive et négative peuvent être responsables de leurs différences de sensibilité, les autres souches restantes ne montrent pas une importance activité .

Du point de vue qualitatif la souche 17'R est la meilleure en ce qui concerne la variété de leurs molécules bioactives (inhibant tout les bactéries-tests) : Gram+ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 14110, *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 et Gram- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25843, *Escherichia coli* ATCC 25922, *salmonella enterica* ATCC 14028 et les levures *Candida albicans* ATCC 10231 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

La souche 17R active contre tout les bactéries-tests sauf *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

En troisième position la souche 7R a inhibée la majorité des bactéries-tests de Gram+ : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 14110 et *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 par contre elle inhibé juste *Escherichia coli* ATCC 25922 comme bactéries à Gram- .

On peut constater d'après les résultats précédente que les deux souches bactérienne 17 R et 17'R sont les meilleur souches productrices des métabolites secondaire

Tableau n° 02: les résultats de l'activité antimicrobienne des streptomycètes

	<i>Ba.sub</i>	<i>Staph</i>	<i>Micro</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>candida</i>	<i>Ba.ceru</i>	<i>saccaro</i>
K 1	-	-	+	-	-	-	-	-
AAR1	-	-	+	-	-	-	-	-
AAR2	-	-	+	-	-	-	-	-
AAZ3	-	-	-	-	-	-	-	-
AAZ9	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : présence de l'activité antimicrobienne des streptomycètes

- : absence de l'activité antimicrobienne des streptomycètes

Les actinomycètes appartenant au genre *Streptomyces* sont connus comme étant de grands producteurs d'antibiotiques, pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des cinq souches étudiées, il est nécessaire de les cultiver sur le milieu de culture ISP 2 pour streptomycètes puis les mettre en présence des divers microorganismes-tests.

D'après le tableau n° 02, les isolats K1, AAR1, AAR2 ont montré une activité antibactérienne contre *Micrococcus luteus ATCC 14110*, les autre souches ne sont pas actives contre des bactéries testé.

La zone d'inhibition la plus grand a été obtenu par la souche AAR2 contre *Micrococcus luteus ATCC 14110*.

Comme il est connu, les streptomycètes ont une grande production des métabolites secondaires, notre résultats montre que les souches n'ont pas une activité antibactérienne, dans ce cas la on est besoin de suivre la cinétique de la production des métabolites secondaires pare-ce-que on ne c'est pas quelle jours d'incubation se fait ils, après 1, 2, jusqu'à 14 ème d'incubation et on va utilisée déférentes milieux de culture (optimisation du milieu de culture et le temps)

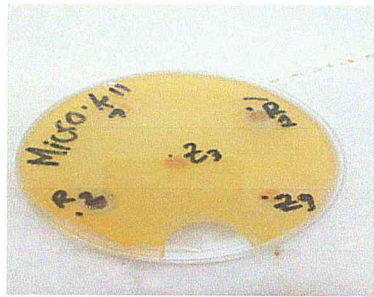


Figure n° 09 : Activité antibactérienne des souches K1, AAR1, AAR2, AAZ3, AAZ9 contre *Micrococcus luteus* ATCC 14110.

Tableau n° 03 : les résultats de l'activité antibactérienne des champignons

	<i>Ba.sub</i>	<i>Agro</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudo</i>	<i>Staph</i>	<i>LM</i>
CAR 2	-	-	-	-	-	-
CAR 7	-	+	+	-	+	-
CAR 8	-	-	-	-	-	-
CAR 9	-	-	-	-	+	-

d'après les résultats représentés dans le tableau n°03, le champignon CAR7 à une activité antimicrobienne contre les souches pathogène à Gram – suivante : *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 23308, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bactérie à Gram +

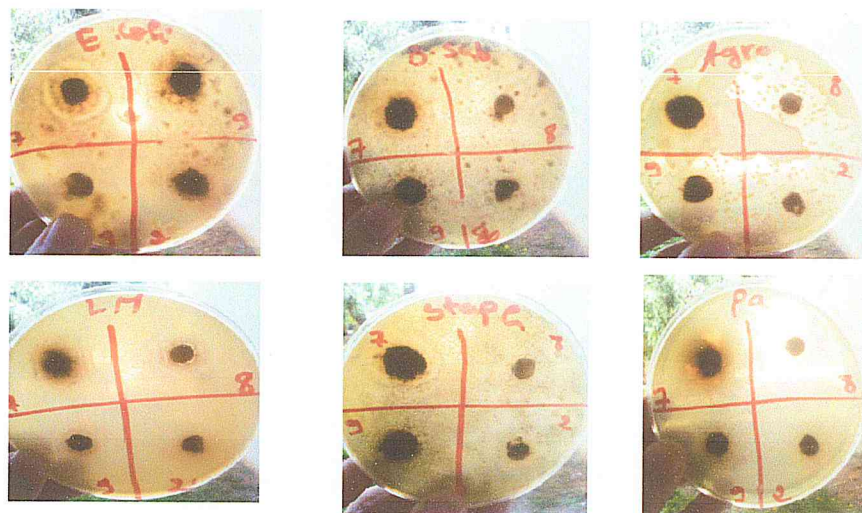


Figure n° 10 : Activité antibactérienne des champignons CAR2, CAR7, CAR 8 et CAR 9 contre les bactéries-testes

III.3. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Tableau n° 04 : les résultats de l'activité protéolytique des bactéries

	protéolytique		
		24 H	120 H
1 R	-	/	/
2 R	++	1.18	2.07
2 'R	++	1.24	3.3
3 R	+	1.8	1.9
3'R	++	1.38	2.13
K 4	-	/	/
K' 4	-	/	/
5 R	-	/	/
6 R	-	/	/
7 R	++	1.04	1.11
8 R	+	1.13	1.66
9 R	++	1.18	1.89
10 R	+	/	/
11 R	+	/	/
12 R	-	/	/
14 R	++	1.35	1.74
16 R	++	1.25	1.71
17 R	++	1.10	1.33
17 ' R	++	1.07	1.95
18 R	++	1.15	1.25
19 R	-	/	/
21 R	-	/	/
23 R	+	1.09	1.37

+ : présence d'activité protéolytique des bactéries

++ : Fort activité protéolytique des bactéries

- : absence d'activité protéolytique des bactéries

L'activité protéolytique des souches bactériennes se fait dans Le milieu GNL qu'est préparé et autoclavé puis coulé dans les boites de Pétri, on met une piqûre centrale des bactéries dans ce milieu et l'incubée à 30° C pendant 24 à 48 heures et on peut aussi suivre la cinétique.

Après incubation, la présence d'un halo transparent dans le milieu indique que la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait se fait.

Le diamètre d'inhibition est mesuré en centimètre, moyennant une règle graduée, l'absence de l'halo claires autour les piqûres centrale, indique un résultat négatif, plus cette zone est grande, plus l'activité protéolytique est importante.

D'après le tableau suivante, on voit que les souches 2R, 2'R, 3R, 3'R, 7R, 9R, 14R, 16R, 17R, 17'R, 18 R et 23R possèdent un caractère protéolytique, le diamètre de l'halo est croître en fonction de temps

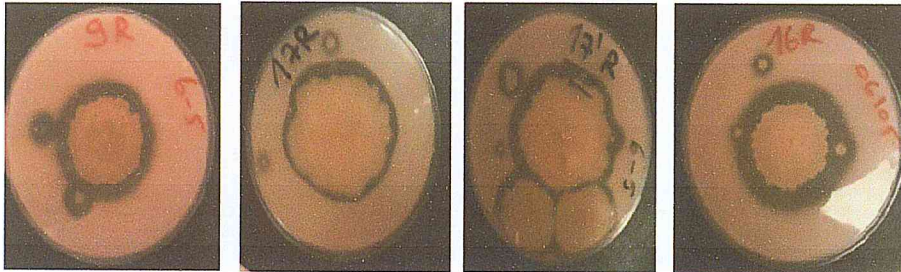


Figure n° 11 : Activité protéolytique des quelques souches bactérienne

Pour les streptomycètes, on ensemence les souches sur le milieu GNL, après incubation on voit les résultats suivante :



Figure n° 12 : Activité protéolytique des streptomycètes K1, AAR1, AAR2, AAZ3 et AAZ9

D'après les résultats, les souches K1, AAR1, AAR2, AAZ3 et AAZ9 ont un pouvoir protéolytique très intéressant, elles faisant l'hydrolyse des protéines du lait

III.4. Mise en évidence de l'activité émulsifiante

III.4.1. Sélection de la meilleure souche bactérienne productrice de biosurfactant

La cinétique de croissance des souches sur milieu MM additionné de 500 μ l de HO, HT et P comme sources des carbone a été suivi par le test de déplacement d'huile en mesurant le diamètre de déplacement du pétrole ce qui nous a permis de tracer les diagrammes représentées par les Figures 13, 14 et 15.

Le déplacement d'huile est une technique rapide et efficace pour la détection de la production du biosurfactant, l'activité a été observée chez nos souches par l'apparition d'une zone claire à la surface d'huile-eau.

Les résultats obtenus (Tableau n° 05) montrent que les souches 2R, 3'R, 8R, 9R, 14R et 21 R possèdent un potentiel producteur de biosurfactant très intéressant avec l'huile de table comme une source de carbone et les bactéries 3'R, 8R, 9R, 17R, 17'R, 18R et 21R avec l'huile de table comme une source du carbone

Tableau n° 05 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur le test de déplacement d'huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps.

	Temps	t= 0h	t= 24h	t= 48h	t= 72h	t= 140h
		Diamètre de la surface halo clair (cm)				
Source de carbone						
témoin	HO	2.5	4.5	4.5	4.5	4.5
	HT	1.5	4	1.5	3	3
	P	0.5	1	1.5	2	1.5
1 R	HO	0.5	0.5	2	2.4	2
	HT	0.5	0.5	1	2	7.5
	P	0.5	0.5	1	1.3	2
2 R	HO	3	2	1.5	4	1
	HT	0.5	8	8	8	6
	P	1.5	4	5	2.6	2
2 'R	HO	1.5	3	1	1	0.5
	HT	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	P	0.5	0.5	1	0.5	0.5

3 R	HO	0.5	3.5	3	2.3	1.5
	HT	0.5	1.5	1.5	0.5	1.5
	P	0.5	2.5	3	3	2.5
3'R	HO	4	7	8	8	8
	HT	0.5	8	7.5	7.5	7
	P	3	7	7.5	3.5	2.5
K 4	HO	/	/	/	/	/
	HT	1	1.5	7	8.5	8.5
	P	/	/	/	/	/
K' 4	HO	/	/	/	/	/
	HT	0.5	0.5	7.5	8	8.5
	P	/	/	/	/	/
5 R	HO	0.5	0.5	0.5	1	0.5
	HT	0.5	2.5	2	7.5	7.5
	P	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
6 R	HO	0.5	6	5	4.5	3
	HT	0.5	1.5	2.5	1	8.5
	P	0.5	0.5	1	2	1.5
7 R	HO	2.5	3	3.5	5	3
	HT	1.5	3	2.5	4	3.5
	P	0.5	2	2.5	4	3
8 R	HO	3	7	8	8	7
	HT	0.5	8	7.5	7.5	7
	P	0.5	1	1.5	3	2
9 R	HO	2.5	7	8	7.5	7
	HT	1	8	8	7.5	7.5
	P	/	/	/	/	/
10 R	HO	0.5	0.5	1	2.5	1.5
	HT	1.5	5	5	7	6.5
	P	0.5	0.5	1	2	1.5
11 R	HO	0.5	2	1	2	3
	HT	1.5	2	1	2.5	3
	P	/	/	/	/	/
12 R	HO	/	/	/	/	/
	HT	1.5	1.5	1.5	2	1.5
	P	/	/	/	/	/
14 R	HO	3.5	4.5	7.5	7.5	7
	HT	1.4	1	1	3	1
	P	0.5	2	1.5	0.5	0.5
16 R	HO	4.5	3	3	1.5	3
	HT	1	2	1	0.5	0.5
	P	0.5	1	1.5	2	1.5

17 R	HO	2	6.5	6.5	6.5	6.5
	HT	1.5	3.5	2	2	6
	P	0.5	2.5	3	3	3
17 ' R	HO	2	6.5	6.5	6.5	6.5
	HT	1	2.5	2.5	3.5	5
	P	0.5	2.5	3	3	3
18 R	HO	3.5	1.5	6.5	7	6.5
	HT	1.5	5	2	0.5	3
	P	0.5	0.5	1.5	2	1.5
19 R	HO	3	7.5	3	3	7.5
	HT	2	5	2.5	2.5	4
	P	/	/	/	/	/
21 R	HO	3	8	6.5	8	7.5
	HT	1.5	6	6	8	6.5
	P	/	/	/	/	/
23 R	HO	3.5	3.5	2.5	0.5	0.5
	HT	0.5	2.5	1	0.5	0.5
	P	0.5	0.5	1.5	2.5	1.5

HO : Huile d'Olive

HT : Huile de Table

P : Pétrole

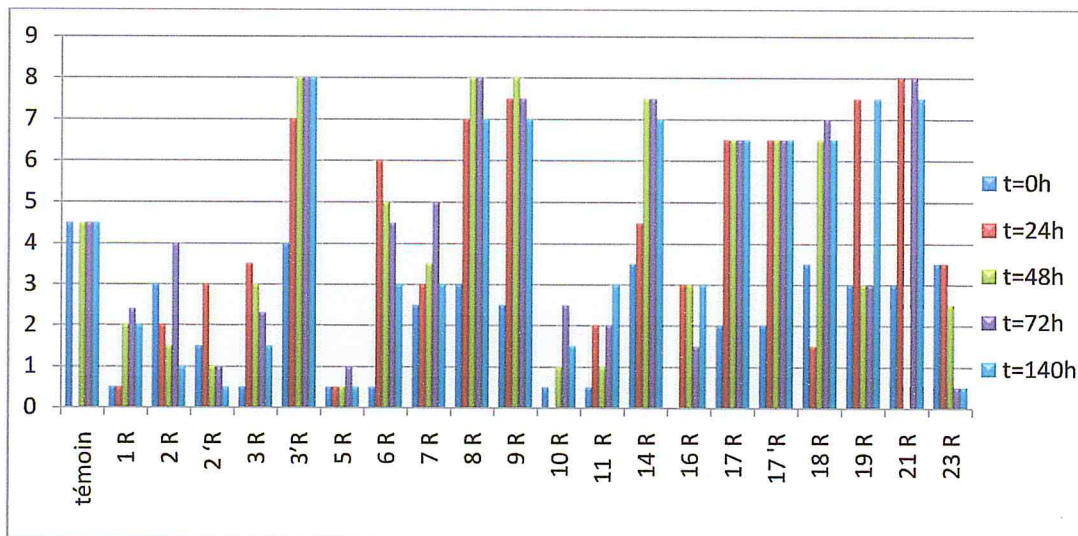


Figure n° 13 : les diamètres de déplacement d'huiles des différentes souches bactériennes avec l'huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps

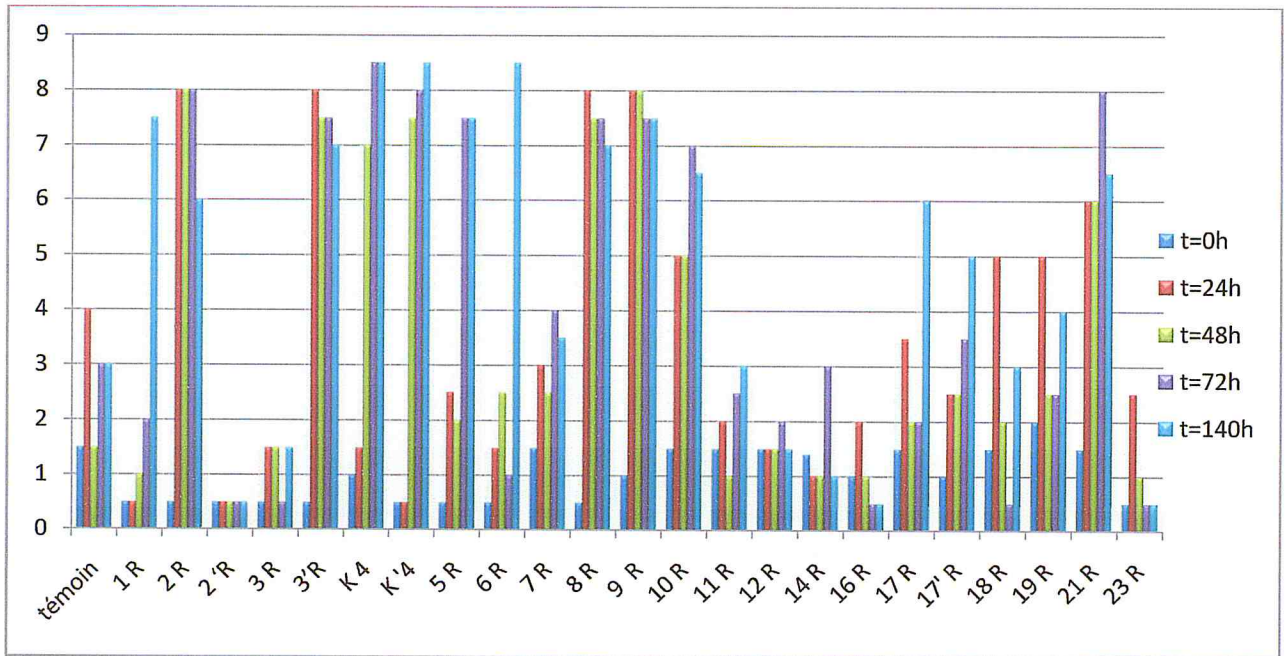


Figure n° 14: les diamètres de déplacement d’huiles des déférentes souches bactériennes avec l’huile de table comme source de carbone en fonction de temps

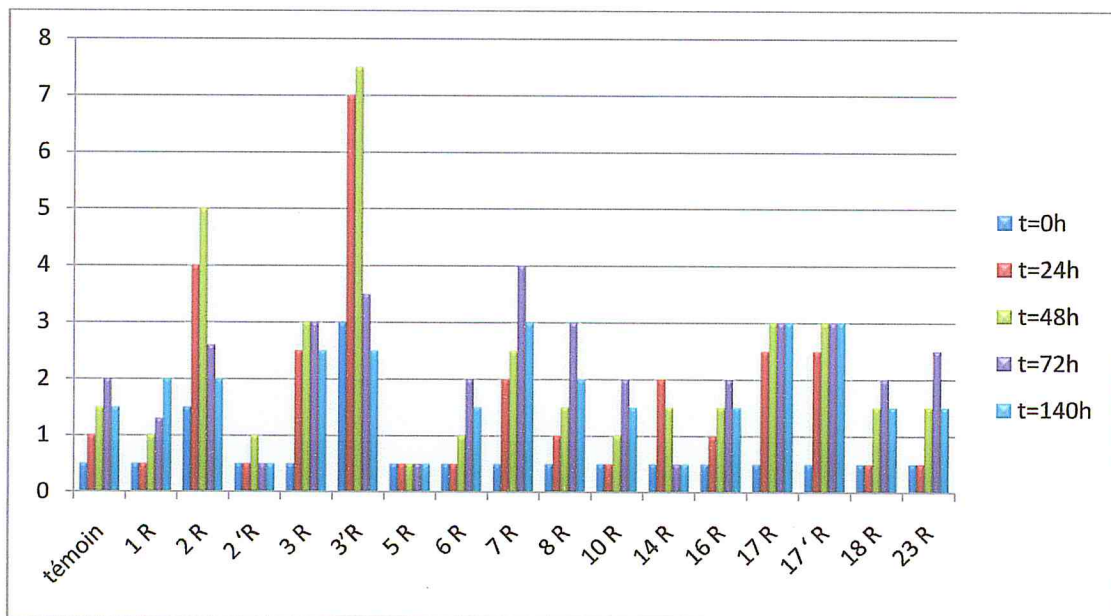


Figure n° 15 : les diamètres de déplacement d’huiles des déférentes souches bactériennes avec le pétrole comme source de carbone en fonction de temps

L'étude de la capacité productrice de biosurfactant par les souches bactériennes avec différentes sources de carbones est basée sur la mesure du diamètre de la surface halo claire (test de déplacement de pétrole).

Les résultats expérimentaux montrent que la plus grande production de biosurfactantes avec l'huile d'olive est obtenue après premier jour d'incubation pour les souches 6R, 17R, 17'R, 19R et 21R, les valeurs des diamètres de la surface halo clair sont : 6, 6.5, 6.5 ; 7.5, 8 respectivement

Dans le deuxième jour d'incubation, les souches 3' R, 8R, 9R et 14R attendent leur maximum de production avec un DDP de 8, 8, 8, 7.5 respectivement.

Par contre quand à utilisé l'huile de table comme source de carbone, la production maximale varie de premier jusqu'à 4^{ème} jours d'incubation sa dépend des souches, dans le premier jour 2R, 3'R, 8R et 9R ont le maximum de DDP qu'est le comme suite : 8, 8, 8.5, 8.

K'4 et K4 ont un diamètre de 7.5 et 7 dans le deuxième jour, 5R, 7R, 10R et 21R dans le 3^{ème} jour ont le maximal de production et les souches 6R, 17R et 17'R sont retardées au 4^{ème} jour.

Le pétrole comme source de carbone ne donne pas un grand résultat, en voire que les souches 2R et 3'R sont les seuls qui donnent DDP élevée de 5 et 7.5.

III.4.2. Sélection de la meilleure souche streptomycètes productrice de biosurfactant

Les résultats obtenus dans le tableau n° 06 montre que l'huile de table est une bonne source de carbone pour la production de biosurfactant à partir de la souche K1.

La cinétique de production du biosurfactant des streptomycètes sur milieu MM additionné de 500 µl de huile de table ou huile d'olive comme source de carbone a été suivie en mesurant le diamètre de déplacement de pétrole en fonction du temps, ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par les figures 16 et 17.

Tableau n° 06 : Sélection de la souche productrice de biosurfactant basée sur le test de déplacement d'huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps.

		Temps					
		t=0 h	t=24 h	t= 48 h	t=72 h	t=120h	t= 192h
Source de carbone							
témoins	HO	0.5	2	1.5	2	3.5	3
	HT	0.5	0.7	1	1.5	1.5	1
K 1	HO	1	5	3	2.5	1	1.5
	HT	0.5	6	7.5	7	6	7.5
AAR 1	HO	1.5	3	3	2.5	2	6
	HT	0.5	3	1	1.5	1	1.5
AAR 2	HO	0.5	0.5	1	2	2.5	3.5
	HT	0	0	0	0.5	1.5	2
AAZ 3	HO	1.5	3.5	3.1	5	2.5	2
	HT	0.5	2.5	3	5.5	3.5	3.5
AAZ 9	HO	0.5	5	2	1.5	1	1
	HT	0.5	0.5	0.7	1	1	4.5

HO : Huile d'Olive

HT : Huile de Table

On peut constater d'après les résultats précédents que la souche K1 possède un grand potentiel producteur de biosurfactant avec l'huile de table comme une source de carbone

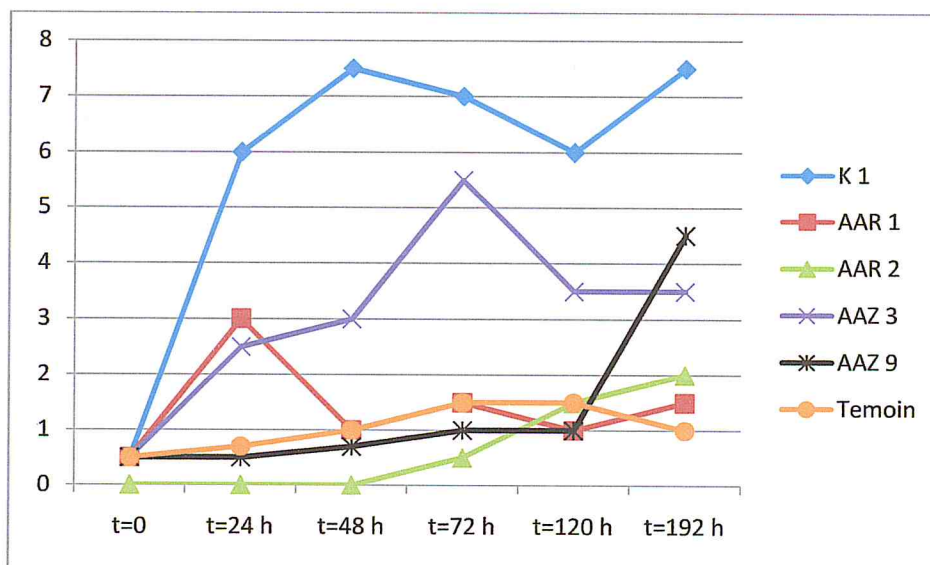


Figure n° 16 : Cinétique de production du biosurfactant par les streptomycètes avec l'huile de table comme source de carbone en fonction de temps

La courbe représentée dans la figure 16 montre que la souche AAR1 fait la production dans le 1^{er} jour d'incubation mais une quantité faible, K1 produite la biosurfactante dans le deuxième jour d'incubation, et la souche AAZ9 dans le 3^{ème} jour.

Les autres souches AAR1 et AAR2 ont des diamètres de DDP faible par rapport les autres souches sa pour l'huile de table comme source de carbone

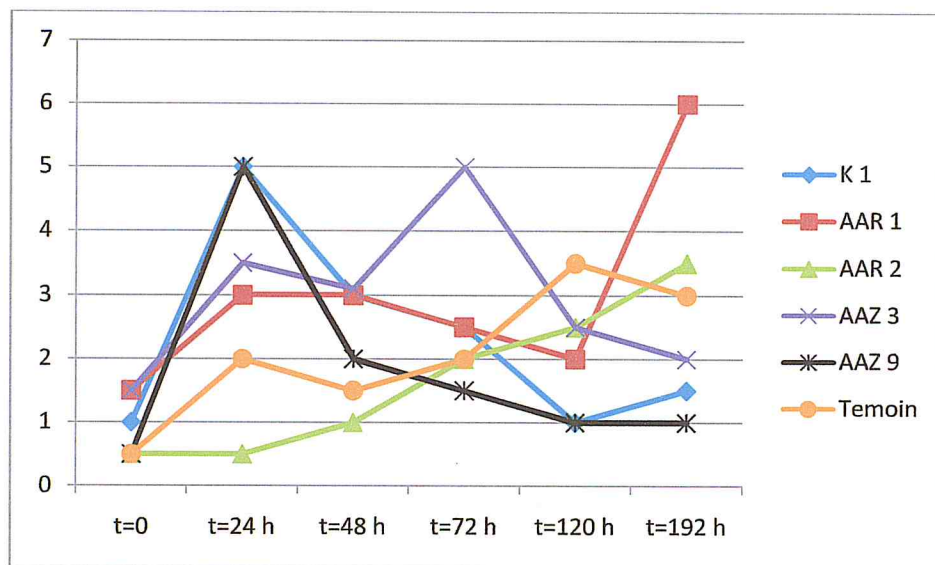


Figure n° 17: la cinétique de production du biosurfactant par les streptomycètes avec l'huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps

Quand on a utilisé l'huile d'olive comme source de carbone, la souche AAZ9 a un DDP élevée dans la 1^{er} 24h, les autres souches aussi ont un maximum de DDP dans le 1^{er} jour mais n'est pas élevée comme la 1^{er} expérience.

On peut choisir la souche K1 comme une souche performante de production de biosurfactant avec l'huile de table comme source de carbone à cause des résultats précédentes et d'utiliser cette souche pour la poursuite de travail qui porte la production de biosurfactant.

III.4.3. Sélection du meilleur champignon producteur de biosurfactant

Tableau n° 07 : Sélection de champignons producteur de biosurfactant basée sur le test de déplacement d’huile avec différentes sources de carbone en fonction de temps.

champ		t=0	t=24h	t=48h	t=72h	t=120h
CAR 2	HO	2.5	7	7.5	7.5	7.5
	P	0.5	1.5	2	1	1.5
CAR 7	HO	4.5	7.5	9	8.5	8.5
	P	0.5	0.5	1	1	1
CAR 8	HO	5.5	7.5	8.5	8	8
	P	1	0.5	1.5	0.9	2
CAR 9	HO	5.5	6.5	7	8.5	8.5
	P	0.5	0.5	1	1	7.5
Témoin	HO	4	1.5	2.5	2	1.5
	P	0.5	0.3	0.5	1	0.5

HO : Huile d’Olive

P : Pétrole

L’activité émulsifiante des 5 champignons basés sur le test de déplacement d’huile, ce dernier varié de source de carbone à un autre et aussi en fonction de temps, les résultats montrent dans le tableau n°7

on traces les courbe de production du biosurfactant par les champignons avec l’huile d’olive comme source de carbone en fonction de temps et avec le pétrole comme source de carbone en fonction de temps aussi

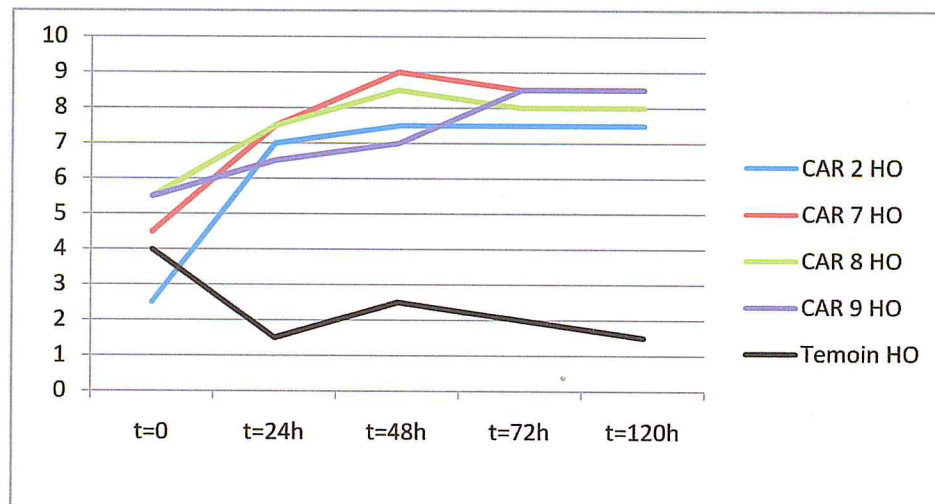


Figure n° 18: Cinétique de production du biosurfactant par les champignons avec l’huile d’olive comme source de carbone en fonction de temps

Les champignons faire la production maximale dans le 2^{ème} jour d'incubation d'après le graphe, avec une valeur maximale correspond au CAR 7 ensuite CAR 8, CAR2 et CAR 9 respectivement.

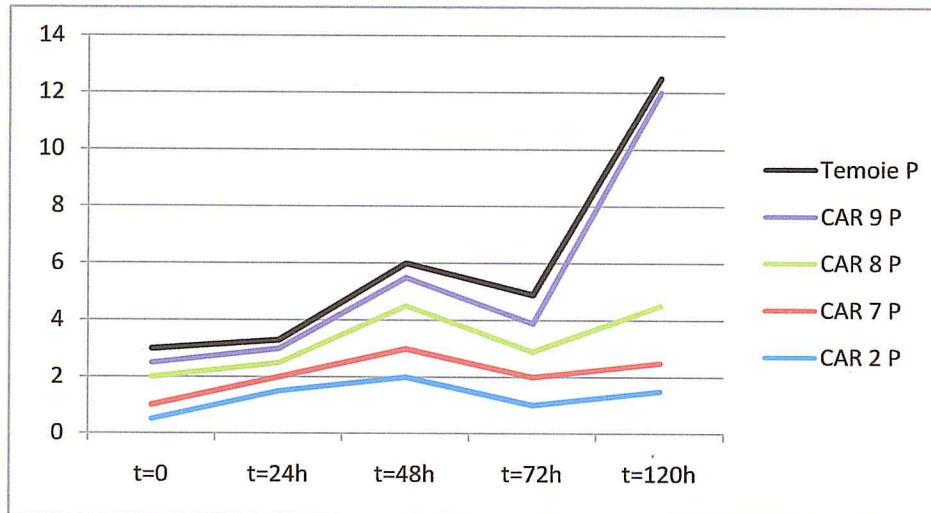


Figure n° 19: Cinétique de production du biosurfactant par les champignons avec le pétrole huile d'olive comme source de carbone en fonction de temps

La courbe représentée dans la figure 19 montre que le champignon CAR9 fait la production dans le 2^{er} jour d'incubation mais une quantité faible, les autres aussi produisant les biosurfactants dans le deuxième jour d'incubation mais avec une quantité faible par rapport celle des produisant par l'huile d'olive.

On peut choisir le champignon CAR 7 comme un bon producteur de biosurfactant dans le milieu qui est contenant l'huile d'olive comme source de carbone à cause des résultats obtenus dans le criblage de l'activité émulsifiante.

III.5. Production et extraction des biosurfactants

La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée.

Les résultats montrent que l'huile d'olive présente une bonne production de biosurfactant avec un grand diamètre de déplacement de pétrole par rapport la bactérie 17 R et l'huile végétale également utilisée comme une source de carbone de production par rapport la souche de streptomycètes K1 et le champignon CAR7.

Le milieu de culture utilisé est MM (dans un litre) de 10 ml d'huile d'olive l'incubation est effectuée à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 48 heures pour la bactérie 17 R

Le milieu utilisé est MM (dans un litre) de 10 ml d'huile de table l'incubation est effectuée à 28 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 48 heures pour le champignon CAR7 et à 30°C pour la souche K1.

Après 48 heures les milieux de production sont centrifugée et filtrée, la précipitation a été acidifier à pH final de 2 par une solution de HCl (2N).

Le surnageant a été laissé au repos pendant une nuit à 4 °C, puis il remit en solution dans un tampon à pH 7,2, Enfin, le précipité a été récupéré par centrifugation

L'extraction de biosurfactant de la souche K1 a été effectuée à l'aide d'un mélange de solvant chloroforme: méthanol (2:1, v:v). La phase organique ainsi obtenue, contenant le biosurfactant, a été séchée par l'évaporateur rotatif, puis le précipité a été considéré comme un biosurfactant brut .

L'extraction de biosurfactant de la souche 17 R et le champignon CAR7 a été effectuée à l'aide du acétate d'éthyle , la phase organique a été séchée par rotavap pour obtient le biosurfactant brut .

III.5. Spectre de FTIR des biosurfactants

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans le biosurfactant.

L'analyse des spectres d'absorption FTIR (enregistrés en transmittance) a permis d'identifier quelques bandes d'absorption présentes dans un spectre d'infrarouge.

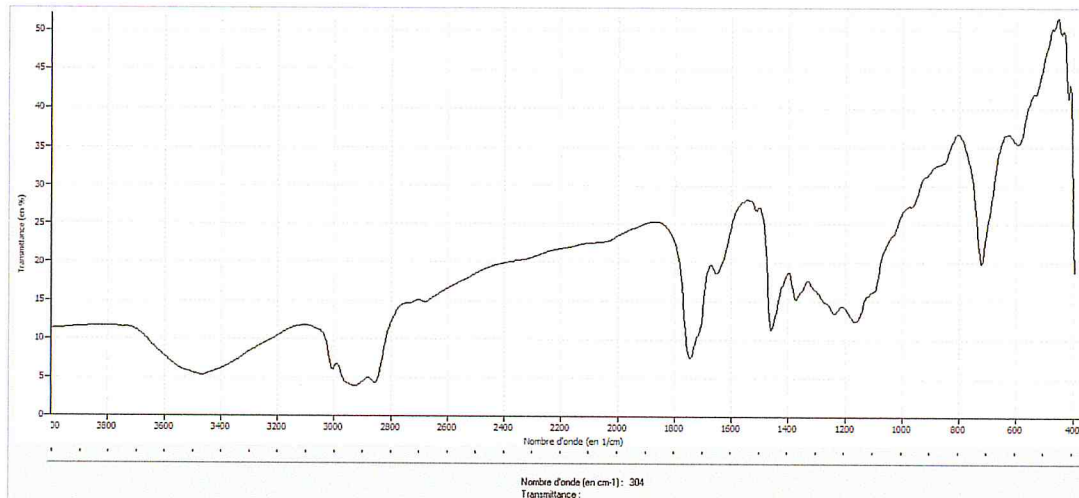


Figure n° 20: Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche 17 R

- La bande située à 1700cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=O.
- Une bande située à 1400 cm^{-1} correspond au liaisons O-H.
- les bandes situées entre 607 et 980 cm^{-1} sont affectées aux vibrations des liaisons : $-\text{CH}_2-$ de longue chaîne dans les alcanes.

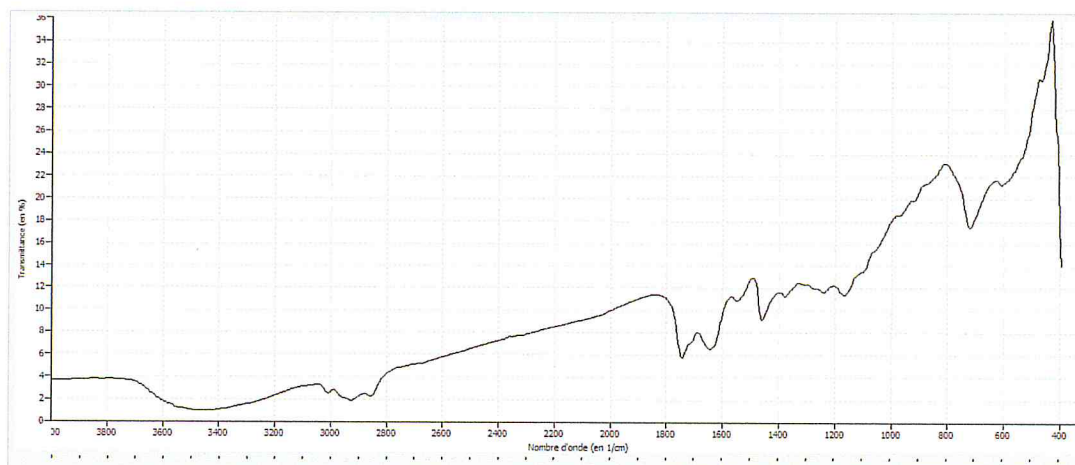


Figure n° 21: Spectre de FTIR du biosurfactant de la souche K 1

- une bande de haute absorbance située à 1743 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=O dans les esters, les aldéhydes ou l'acide carboxylique, l'absorbance dans cette région signifie la présence de groupement carbonyle .

- La bande située à 1372 cm⁻¹ est due aux vibrations de déformations du groupe -CH₂ dans les esters carboxyliques : (-CH₂-COO-).

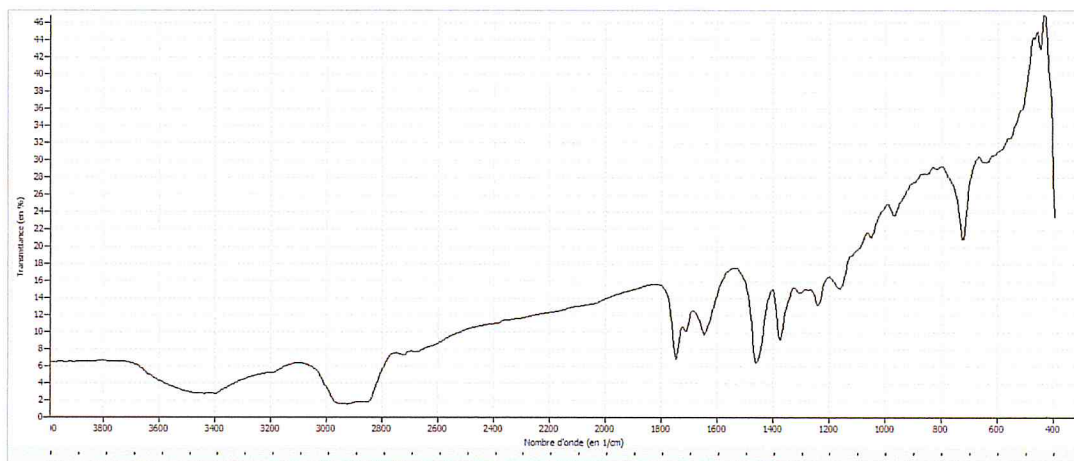
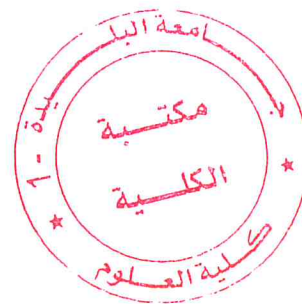


Figure n° 22: Spectre de FTIR du biosurfactant de champignon CAR 7

- La bande située à 1747 cm⁻¹ correspond aux vibrations d'élongation des liaisons C=O dans les cétones.
- La bande située à 1377 cm⁻¹ est due aux vibrations de déformations du groupe -CH₃.
- La bande de forte intensité située à 1240 cm⁻¹ est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons dans O-C dans les acides carboxylique.



Conclusion générale

Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'étude des activités microbiennes des souches d'origines marines (bactéries, streptomycètes et champignons), nouvellement isolée à partir des deux algues brune et rouge *Zonaria tournefortii* et *Asparagopsis armata* récoltée au niveau de la Corned'Or à Tipaza.

Le criblage par les activités microbiennes : antimicrobienne, protéolytique et émulsifiante des souches microbiennes isolées a permis de sélectionner les souches performantes qui sont produisent les antibiotiques, protéase et la production de biosurfactant.

Les résultats obtenus ont révélé que la production de biosurfactant dépend de plusieurs paramètres comme le genre de microorganisme et la nature de substrat carboné, cette dernière peut diminuer considérablement le coût de production.

L'analyse chimique des biosurfactants produits a été analysée par FTIR. Les spectres obtenus ont permis de savoir les principales fonctions existant dans nos biosurfactants.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Hagström et al, 2002, Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi.
- [2] Radmer, R.J., Parker, B.C,1994. Commercial application of algae: opportunities and constraints. J. Phycol. 6, 93-98.
- [3] M. Martin, D. Portetelle, G. Michel, M. Vandenberg, 2014, « Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications », Appl. Microbiol. Biotechnol, 98(7), 2917-35.
- [4] Demirbas A. Production of biodiesel from algae oils. Energy Sources Part A 2009;31:1638.
- [5] Garon-Lardiere, S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Université De Bretagne Occidentale.
- [6] Whitman et al., 1998, Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria.
- [7] Cole 1982, Jensen & Fenical 1994, Engel et al. 2002, Harder 2009, Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria.
- [8] Weinberger 2007, Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria.
- [9] Khailov & Burlakova 1969, Kong & Chan 1979, Bouvy et al. 1986, Armstrong et al. 2001, Lane & Kubanek 2008, Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria.
- [10] Bell & Mitchell 1972, Paul et Puglisi 2004, Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria.
- [11] Jensen et Fenical, 1994, Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi.
- [12] George O'Toole, Heidi B. Kaplan & Roberto Kolter, « Biofilm Formation as Microbial Development », Annual Review of Microbiology, vol. 54, 2009, p. 49-79 (DOI 10.1146/annurev.micro.54.1.49)
- [13] MORITA et COLWELL, 1974: Effect of the ocean environment on microbial activities. Edit. Colwell et Morita. Univ. Park Press, Baltimore. 587p.
- [14] MORITA et COLWELL, 1974: Effect of the ocean environment on microbial activities. Edit. Colwell et Morita. Univ. Park Press, Baltimore. 587p.
- [15] Colombié. V. 2005, Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.

- [16] Lamari L, 2006, Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. pp153.
- [17] Williams S.T., Goodfellow M. et Alderson G. (1989) Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (volume 4). *Williams & Wilkins, USA*: 2452-2492.
- [18] Stackebrandt E., Rainey F. A. et Ward-Rainey N. L. (1997) Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 479-491.
- [19] Larpent JP, Sanglier JJ. (1989). In: Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p.481.
- [20] Lacey J. (1997) Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med.* 4: 113-121.
- [21] Loria R., Bukhalid R.A., Fry B.A. et King R.R. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease.* 81(8): 836-846.
- [22] Singh. S.L; Baruah.I; and Bora.T.C. (2006). Actinomycetes of Lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol.*, 5 (2), 217- 221.
- [23] Khattabi A, Hilali L, Dari K, Assobhei O, Gavini F. (2002). Isolement demicroorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. *Rev. Biol. Biotech.*;2:28-32.
- [24] Larpent JP, Sanglier JJ. (1989). In: Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p.481.
- [25] Lechevalier M.P. (1981). Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, 11, 159-166.
- [26] Conn. V.M. (2005). Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. Thèse de Doctorat. Flinders University. pp 297.
- [27] Choulet. F. (2006). Evolution du génome des *Streptomyces*: transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210
- [28] Dairi. T. (2005). Studies on Biosynthetic Genes and Enzymes of Isoprenoids Produced by Actinomycetes. *J. Antibio.*, 58 (4), 227-243.
- [29] Vijayakumar. R; Muthukumar.C; Thajuddin.N; Panneerselvam.A; and Saravanamuthu.R. (2007). Studies on the diversity of actinomycetes in the Palk Strait region of Bay of Bengal, India. *Actinomycetologica*, 21 (2), 59-65

- [30] Khachatourians. G.G. (1998).Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria.Can. Med. Assoc. (CMAJ) 159 (9), 1129-1136.
- [31] Zaitlin. B; and Watson.S.B. (2006).Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, *tenets and truths*. 40 (9), 1741-1753.
- [32] Pizzul.L. (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes.Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39.
- [33] El-Shatoury. S; Mitchell.J; Bahgat.M; and Dewedar.A. (2004).Biodiversity of Actinomycetes in a Constructed Wetland for Industrial Effluent Treatment. *Actinomycetologica*, 18 (1), 1-7.
- [34] <http://www.espace-etudiant.net>
- [35] Ji N.Y & Wang B.G (2016) *Mycochemistry of marine algicolous fungi*. Fungal Diversity, 1-42 .
- [36]K.D. Hyde, E.G. Jones, E. Leñaño, S.B. Pointing, A.D. Poonyth et L.L.P. Vrijmoed, « *Role of fungi in marine ecosystems* », *Biodiversity & Conservation*, vol. 7, n° 9, 1998, p. 1147-1161.
- [37] Biémont E. spectroscopie moléculaire: structures moléculaires et analyse spectrale. De boeck Edition.2008. ISBN-10:2804150658
- [38] Nicklin J., Graeme K-Cook., Paget RT., Killingtons R., 2000. Essentiel en microbiologique .Berti édition .paris. P : 3,75.
- [39] Bergogne-Berezin E., Dellamonica P., 1995. Antibiothérapie en pratique clinique. Ed Masson, Paris, 486 p.
- [40] Jaouadi, B., et al., Biochemical and molecular characterization of a detergentstable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalyticefficiency. *Biochimie*, 2008. 90(9): p. 1291-305.
- [41] Smith, M.R., "The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria", *Biodegradation Journal*, V.1, (1990), 191-206.
- [42] Humberto B.S. Sobrinho, Juliana M. Luna, Raquel D. Rufino,Ana Lúcia F. Porto And Leonie A. Sarubbo,(2014), "Biosurfactants: Classification, Propertiesand Environmental Applications",*Biotechnology Bioremediation* Vol. 11:1-32
- [43]Kedidi Amel, "Effets de salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence du gasoil ",*MASTER ACADIMIQUE, UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA*, 2014, p :05-22.

- [44] Cunha CD, Do Rosario M, Rosado AS, Leite SGF (2004) *Serratia sp* SVGG 16: "A promising bio-surfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline". *Process Biochem* 39: 2277-2282.
- [45] Nikhil Shah, Rohit Nikam, Shikha Gaikwad, Vaijayanti Sapre, Jaspal Kaur, "Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications", *Indian J Microbiol Res* 2016;3(1):5-10
- [46] Rosenberg E. and Ron E.Z., (1999), "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 2154 - 162,
- [47] RON E.Z. et ROSENBERG E, (2002), "Biosurfactants and oil remediation". *Current Opinion in Biotechnology*, 3 : 249-252.
- [48] HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996), "Microbial production of Biosurfactants". *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
- [49] BOGNOLO G, (1999). "Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons", *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152 (1-2) : 41-52.
- [50] Desai JD, Banat IM (1997). "Microbial production of surfactants and their commercial potential". *Micro and Mole Bio Revi*; 61:47-64.
- [51] Banat, I.-M. Makkar, R.-S. et Cameotra, S.-S. (2000). *Potential commercial applications of microbial surfactants*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, vol. 53, p. 495-508.
- [52] Abouseoud, M. (2008). *les biosurfactants biomolécules a multiusages, conférence sur les bioprocédés*, Media, 12-13 octobre 2008 ; résumé, le centre universitaire Dr. yahiafares, Media.
- [53] Guergouri, I. (2010). *Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants*. Mémoire de magister. Université Mentouri, Constantine.
- [54] AHMAD FARIS MOHD ADNAN, IRENE K.P. TAN, 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98: 1380-1385.
- [55] Tortorano A.M., Cabrini E. et Viviani M.A. (1979) Sensibilité *in vitro* des levures acinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med*. 8: 69-74.
- [56] Bastide A., M. de Méo, M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.

[57] Kokare C.R., Kadam S.S., Mahadik K.R., Chopade B.A., "Studies of bioemulsifier production from marine *Streptomyces* sp. S1", Biotechnology Journal, V.6, (2007),.78–84.

[58] Deepika K., Kannabiran K., "Biosurfactant and Heavy Metal Resistance Activity of *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan Soil", Pharmacology and Toxicology British Journal, V.1, n°1, (2010), 33-39.

[59] DG Cooper, BG Goldenberg , Surface-Active Agents from two *BACILLUS* Species– Applied and environmental Microbiologie. Feb.1987, 53(2), p 224-229.

[60] Williams S.T. and Fleming I., (1989). Spectroscopic methods in organic chemistry. 4th Ed. :McGraw Hill book company, London, p 264.

[61] Titora A.M., Cabrini E. et Viviani M.A. 1979. Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I en gélose et méthode des disques. bull.Soc.Fr.Myc.Méd. 8 : 69 - 74

Annexes

Annexe 01 : appareillages



balance



schécker

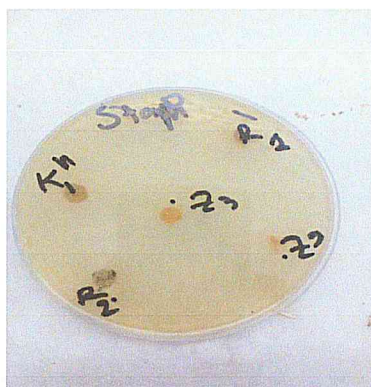
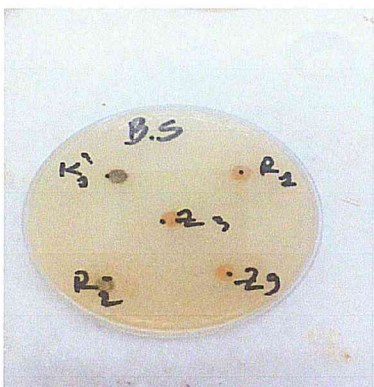
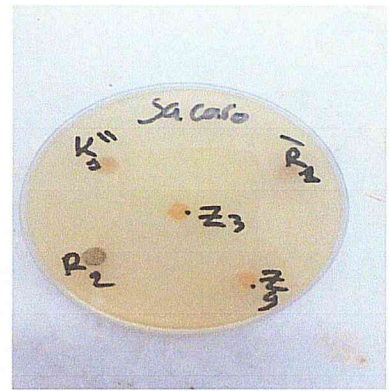
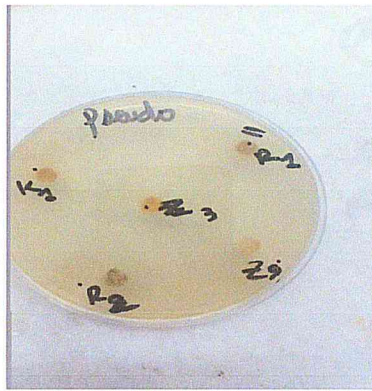
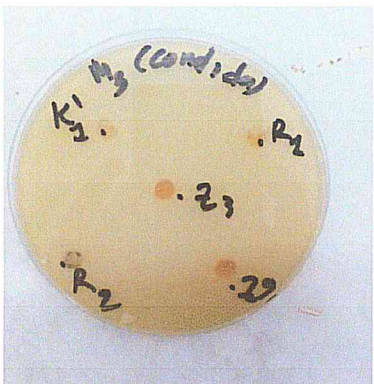
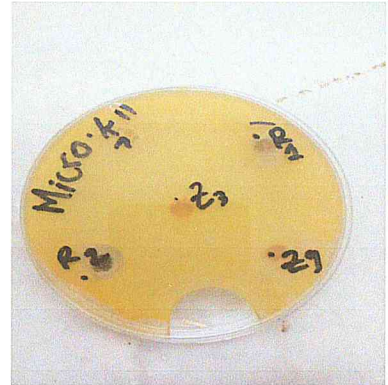
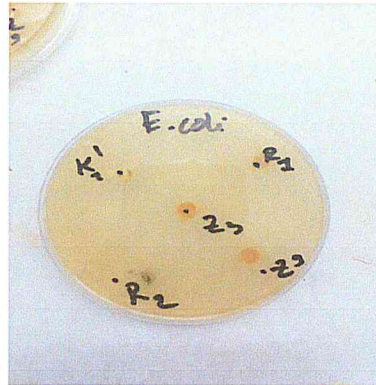
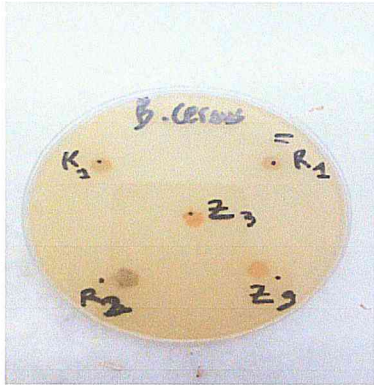


Autoclave



Bec BENSEN

Annexe 02 : les résultats d'activité antimicrobiennes des souches AAR1, AAR2, K1, AAZ3et AAZ9 contre les bactéries_teste



Annexe 03 : les résultats d'activité antimicrobiennes des souches bactériennes

