République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Dr Yahia Farés Médéa



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procèdes et Environnement

Mémoire de fin d'étude on vue de l'obtention du diplôme on master en génie des Procèdes Pharmaceutique

Option : Génie des procèdes Pharmaceutiques

Thème

Synthèse et caractérisation d'un bio surfactant à partir d'une souche thermophile

Proposé par : Mme Ferhat Samira

Mme rahem

Présenté par :

Mr Mourad CHERROUGI

Mr Mouloud ROUIS

juin 2014

Sommaire

Lise des figures.

Liste des tableaux.

Introduction générale……1

Chapitre I. : Partie théorique

I.1 .Introduction ……2

I.2.Tensioactifs……..3

I.2.1.Les tensioactifs en général……..3

I.2.1.1.Introduction……3

I.2.1.2.Propriétés……3

I.2.1.3.Application……..4

I.2.1.4.Classification chimique……....5

A .Tensioactifs non anioniques……...5

B .Tensioactifs anioniques……5

C .Tensioactifs cationiques……...6

D .Tensioactifs amphotères……..6

I.2.1.5.Marché……7

A. Marché mondial……7

B. Marché européen……...7

I.2.1.6 .Cadre réglementaire……...8

I.2.2.Les bio tensioactifs……8

I.2.2.1.Définition……8

I.2.2.2.Matières premières renouvelables utilisées……8

A. Partie hydrophile……8

B. Partie hydrophobe……..9

I.2.2.3. Synthèse des bio surfactants……10

A. Synthèse à partir des alcools gras……11

B. Synthèse à partir des acides gras……...11

C. Synthèse à partir des amines grasses……12

Sommaire

D. Synthèse à partir des esters méthyliques d'acides gras…….12

I.3.Les bio surfactants……13

I.3.1.Définition……...13

I.3.2.Structure et classification des bio surfactants ……14

I.3.3.Biosynthèse et rôle physiologique…… .14

I.3.4.Rôle des bio surfactants dans la biodégradation des hydrocarbures……15

I.3.5.Potentiels des bio surfactants……..16

I.3.6.Les différentes applications des bio surfactants……..17

I.4.Notions d'écologie microbienne……..17

I.4.1.Définition……18

A. Les interactions entre les composants de l'écosystème……18

B.L'habitat naturel……18

I.4.2.Les méthodes classiques d'écologie microbienne……18

A. Les cultures d'enrichissement……...19

B.L'isolement……19

I.4.3.Intérêt des bio surfactants dans la caractérisation…….20

I.5.Microbiologie des sols pollués……..20

I.5.1.La composition chimique des polluants…….20

I.5.2.La communauté microbienne indigène……..20

I.5.3.Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures……20

A. Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne…….21

B. Métabolisme des hydrocarbures……22

I.6.Moisissures……22

I.6.1.Généralités……..22

I.6.2.Classification……..23

I.6.3.Mode de reproduction……24

I.6.4.Conditions de croissances……24

A. Eléments nutritifs……....24

B. Facteurs physicochimique……...25

Sommaire

I.6.5.Intérêts industriels des moisissures……27

A. Intérêts alimentaire……27

B. Intérêts chimique……27

C. Intérêts pharmaceutique……...28

D. Intérêts médical……....29

I.6.6.Isolement des moisissures……29

A. Choix d'échantillons naturels……...29

B. Addition des antibiotiques……....30

C. Choix des milieux de cultures sélectifs……30

D. Conditions d'isolement…… 30

E. Sélection des moisissures protéolytique……31

I.7.Activité protéolytique…….. 31

Chapitre II

II. 1.Introduction…….. 32

II.2.Optimisation de la production de bio surfactants……33

II.3.Etude de la stabilité du bio surfactant……33

II.4.Etude morphologique……...33

II.4.1Aspect macroscopique……...33

II.4.2.Aspect microscopique……..34

II.5.Caractérisation structural du bio surfactant ……36

II.6.Mesure de E_{24} ……38

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1Criblage des souches bactériennes productrices de bio surfactants……..39

III.2. Optimisation de la production du bio surfactant…… 39

III.2.1.Effets de la source de Carbonne…… 40

III.2.2.Effets de la concentration de la source de Carbonne……... 40

III.3.Récupération et caractérisation de bio surfactant produit par la souche 7A ……42

III.3.1 .Extraction du bio surfactant ……..42

III.3.2. Caractérisation du bio surfactant……42

Sommaire

III.3.2.1. Analyse par FTIR ……..42

III.3.2.2. Etude de stabilité du bio surfactant……43

III.3.2.2.1. Effet du PH……..44

III.3.2.2.2.Effet de la salinité……44

III.3.2.2.2.Effet de la température……..45

III.4.Identification de la souche 7A ……..46

III.4.1 .Caractère macromorphologiques……46

III.4.1 .Caractère micro morphologiques……...47

III.5.L'indice d'émulsification……...47

Conclusion générale……49

Nomenclature

Références bibliographiques

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE II

PROCEDURE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

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

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes ayant une capacité productrice élevée de bio surfactants. A cet effet une collection des souches bactériennes, isolées à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut et qui ont déjà montré des aptitudes à dégrader le pétrole et certains composés aromatiques, a été mise sur place afin d'investir sur le plan de la recherche appliquée dans le domaine de la biotechnologie environnementale et industrielle, très particulièrement dans les formulations pharmaceutiques.

Le présent travail a pour objectif d'étudier le criblage des souches bactériennes productrices de bio surfactants ainsi que la production et la caractérisation d'un bio surfactant produit par une souche thermophile. Des principaux facteurs affectant la production et la caractérisation de bio surfactant ont été étudiés à savoir : la nature de la souche, la nature et la concentration de la source de carbone et, la stabilité physico-chimique de bio surfactant (température, pH et salinité).

Ce mémoire se subdivise en trois parties : La première représente une partie théorique où sont exposées les données concernant les agents tensioactifs ainsi que les bio surfactants et leurs différentes applications industrielles. La seconde partie, contient la méthodologie adoptée pour la réalisation de ce travail. La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus et en enfin on termine avec une conclusion générale.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE II

PROCEDURE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Liste des figures

Figure 1- L'auramide diéthanolamine

Figure 2- Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche

Pseudomonas sp. SSC2 cultivé sur 2% de n-hexa- décane (S. S. Cameotra et coll., 2009)

Figure 3- Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadecane englouties par la souche Pseudomonas sp. SSC2, Morgagni TEM (S. S.Cameotra et coll., 2009)

Figure 4: Tensiometre de Kruss

Figure 5: La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

(ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) .

Figure 6: Influence de la concentration du pétrole brute(%) sur la TS pour la souche 7A

Figure 7: Influence de la concentration du mazot brute(%) sur la TS pour la souche 7A

Figure 8 : Spectre FTIR du bio surfactant produit par la souche 7A

Figure 9 : Influence de la variation du pH sur la stabilité du bio surfactant de 7A

Figure 10 : Influence de la variation de la salinité NACL (mg/l) sur la stabilité

Du bio surfactant de 7A.

Figure 11 : Influence de la variation de la température sur la stabilité du bio surfactant

Figure 12 : Aspect microscopique de la souche 7A (microscope optique, ×100)

Figure 13 : influence de la source de Carbonne(%) sur $\mathbf{E_{24}}$

Liste des tableaux

Tableau1: Valeurs de la TS du surnageant pour chaque souche bactérienne (T_{incub} = 45°C, pétrole brut (1%, v/v), t_{incub} = 48 h, 200tr/min

Tableau 2 : Caractères macroscopiques de la colonie isolée à partir de la souche 7A sur la gélose nutritive

Tableau 3 : Caractères microscopiques de la

Tableau 4 : Influence de la source d'azote sur l'E24

Nomenclature

CEN : Centre européen de Normalisation

HLB : hydrophile-lipophile du bio surfactant

E/H : huile dans eau

CMC :la concentration micellaire critique

REACH : Registration,Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

BTEX : Benzène, le Toluène L'Ethyle benzène et le Xylène

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

$\mathbf{E_{24}}$: Indice d'emulsification

I-1/ INTRODUCTION:

L'industrie chimique est aujourd'hui très fortement dépendante des ressources fossiles, dont elle tire la plupart de ses produits tels que les plastics, les lubrifiants, les tensioactifs et les solvants.

La raréfaction de ces ressources, la variabilité de leurs couts et les enjeux géopolitiques associes imposent de trouver des matières premières de substitution renouvelables parmi lesquelles figure prioritairement la biomasse. La chimie du végétal en particulier a un rôle majeur a jouer pour contribuer a réduire cette dépendance et mettre au point des produits bio bases, définis comme produits totalement ou partiellement bio bases, plus respectueux de l'environnement.

Pour la Commission européenne comme pour le CEN (Centre européen de Normalisation), les bios tensioactifs et les bios solvants forment deux catégories de produits distinctes dans l'ensemble des produits bio bases. Le bio polymère et les biolubrifiants constituent deux autres catégories de produits bio bases.

Les définitions utilisées par le CEN qui sont celles utilisées dans ce rapport sont les Suivantes :

* Bio base = dérive de la biomasse.

* Biomasse = matière d'origine biologique, a l'exclusion de la matière incorporée Dans des formations géologiques ou fossilisées.

*Produit bio base = produit totalement ou partiellement bio base.

Les termes bio polymères, biolubrifiants, bio tensioactifs et bio solvants sont, quant a eux, plus complexes a définir. Ainsi, un bio polymère ou un biolubrifiant peut être bio base, et/ou bio dégradable et/ou biocompatible.

Un bio tensioactif peut être biomasse (c.-a-d. dérive de la biomasse) ou peut n'avoir trait qu'aux molécules tensioactives produites certains micro-organismes. Dans ce rapport, nous avons défini bio tensioactifs comme des molécules bios basées. Les bios solvants sont de même définis comme des molécules bios basées.

Le CEN, mandate par la Commission européenne, a démarre ses travaux de normalisation avec les bio polymères et les biolubrifiants et les a ensuite étendus aux bio tensioactifs et aux bio solvants. La normalisation peut jouer un rôle important dans le décollage des produits bio bases.

Les normes pour les produits bio bases peuvent en effet aider a augmenter la transparence du marche en fournissant les méthodes de référence Communes et exigences pour vérifier les revendications concernant ces produits

(P. ex. Biodégradabilité, contenu bio base, reçyclabilité, durabilité) [1].

I-2/ Tensioactifs:

La consommation de tensioactifs et de bio tensioactifs dans l'Union européenne en 2008 a été estimée a respectivement 2,7 millions de tonnes et 1,52 millions de tonnes [2].

Le taux de pénétration des bio tensioactifs en Europe, estime supérieur a 50 %, dépasse largement celui des bioplastiques, des biolubrifiants et des bio solvants.

I-2-1 / Les tensioactifs en général:

I -2-1.1/ Introduction

Les tensioactifs sont des composes qui diminuent la tension superficielle d'un liquide, la tension inter faciale entre deux liquides ou celle entre un liquide et un solide.

Les tensioactifs sont généralement des composes organiques qui sont amphiphiles, c'est-a-dire qu'ils contiennent a la fois des groupes hydrophobes (apolaires) et des groupes hydrophiles (polaires) [3]. Des lors, une molécule tensioactive contient un composant insoluble dans l'eau (ou soluble dans l'huile) et un composant soluble dans l'eau. Les molécules de tensioactifs diffusent dans l'eau et s'adsorbent aux interfaces entre l'air et l'eau ou a l'interface entre l'huile et l'eau, dans le cas ou l'eau est mélangée avec l'huile.

Le groupe hydrophobe (aussi appelé queue) insoluble demeure en dehors de la phase aqueuse, dans l'air ou dans la phase huileuse, tandis le groupe hydrophile (aussi appelé Tété) demeure dans la phase aqueuse. L'alignement des molécules tensioactives à la surface modifie les propriétés de surface de l'eau à l'interface eau/air ou eau/huile [1].

I -2-1.2/ Propriétés:

Dans la phase aqueuse, les tensioactifs forment des agrégats, tels que des micelles, ou les queues hydrophobes forment le cœur de l'agrégat et les tètes hydrophiles sont en contact avec le liquide environnant [4].

Des micelles sphériques ou cylindriques ou des bicouches peuvent être formées.

La forme des agrégats dépend de la structure chimique des tensioactifs qui est elle-même fonction de l'équilibre existant entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile. Cet Équilibre peut être décrit par la balance hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif. Il existe différentes façons d'exprimer la valeur HLB. L'une d'entre elles classent les tensioactifs dans des valeurs allant de 0 à 40. Plus la valeur est élevée, plus la

solubilité dans l'eau est grande. Il existe des tables de HLB pour différents groupes classiques. Si la HLB est inferieure a 6, le tensioactif aura un caractère hydrophobe et donnera préférentiellement des émulsions inverses (eau dans huile, E/H) ; si la HLB est supérieure a 10, le tensioactif aura un caractère hydrophile et donnera préférentiellement des émulsions directes (huile dans eau, H/E).

I-2-1.3/ Applications:

Les tensioactifs sont parfois classes selon la fonction qu'ils remplissent [5] :

* Les détergents*:*

Les détergents sont des tensioactifs aptes à enlever des salissures sur un support solide. Leur pouvoir détersif découle essentiellement de leur pouvoir solubilisant et dispersant. Ils ont souvent des valeurs HLB comprises entre 13 et 15.

* Les agents de solubilisation*:*

A très faible concentration, les tensioactifs forment Des solutions vraies dans une phase aqueuse. Lorsque leur concentration dépasse Une certaine valeur (la concentration micellaire critique, CMC), les molécules tensioactives se regroupent en micelles. Par ce biais, certains tensioactifs font passer en solution des substances normalement insolubles dans le solvant utilise en les insérant dans les micelles. Les agents de solubilisation ont souvent une HLB comprise entre 18 et 20.

* Les agents moussants*:*

La formation de mousse, dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide, requiert la présence de tensioactifs qui s'adsorbent a l'interface eau-air. Les agents moussants ont souvent une HLB comprise entre 3 et 8.

Les agents mouillants:*

Le mouillage d'un solide par un liquide correspond à l'étalement du liquide sur le solide. En diminuant la tension superficielle solide liquide,

Les agents mouillants permettent un plus grand étalement du liquide. Les agents mouillants ont généralement une HLB comprise entre 6 et 8.

* Les agents dispersants*:*

Ils permettent de créer une dispersion en prévenant la floculation des particules.

* Les agents émulsifiants*:*

Ils facilitent la formation d'une émulsion entre deux liquides non miscibles.

Les tensioactifs peuvent aussi être classes suivant le secteur ou ils sont utilises :

►Traitement du cuir.

► Synthèse et formulation de matières plastiques.

►Nettoyage et dégraissage des matériaux.

► Extraction des minerais.

► Formulation des peintures et vernis.

► Operations de l'industrie pétrolière.

► Formulation de produits phytosanitaires et d'engrais.

►Traitement du textile [6].

I-2-1.4/ Classification chimique:

On distingue quatre types de tensioactifs suivant la nature de la partie hydrophile : non ioniques, anioniques, cationiques et amphotères.

A/Tensioactifs non ioniques:

Les tensioactifs non ioniques ne comportent aucune charge nette. Ils ne donnent aucun ion en solution aqueuse. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, de groupements polaires de type éther, alcool, carbonyle ou amine. Les tensioactifs non ioniques sont principalement :

***** Les dérivés éthoxylés. 90 % des tensioactifs non ioniques proviennent de l'addition de molécules d'oxyde d'éthylène $C_2 H_4O$ sur un compose tel qu'un alcool ou un phénol. [7]

La réaction entre un alcool ROH et l'oxyde d'éthylène peut s'écrire de la manière suivante (Equation 1) :

$$ROH + n\ C_2 H_4O \rightarrow R\ (O\ C_2 H_4)nOH \qquad (1)$$

Avec n typiquement compris entre 5 et 10.

***** Des esters de polyols tels que les esters de sorbitan, de glycérol et de poly glycérol :

- Les esters (mono esters, diester et triesters) de sorbitan et d'acides gras.

Le sorbitan est un compose issu de la déshydratation du

Sorbitol, qui est lui-même un alcool-sucre à six atomes de carbone obtenu

À partir du glucose.

Un mono ester de sorbitan typique est le mono stéarate (C_{18}) de sorbitan tandis qu'un triester de sorbitan typique est le tri stéarate de sorbitan.

-Les esters (mono esters et diester) de glycérol, appelés glycérides. Le mono stéarate de glycérol est un exemple classique de mono glycéride.

A noter que les triglycérides dans lesquels les trois groupements hydroxyle du glycérol sont estérifient par des acides gras sont des lipides hydrophobes (graisses)

- Les esters de poly glycérol, le poly glycérol résultant de la condensation du Glycérol sur lui-même en milieu acide.

*****Des éthers de polyol tels que des éthers de glucose qui sont des glucosides obtenus par condensation d'un alcool gras avec le glucose.

* Des alkylpolyglycosides (APG) obtenus a partir d'un carbo hydrate (tel que le glucose) et d'un alcool gras (ROH)

*****Des alcanolamines

B/Tensioactifs anioniques:

Les tensioactifs anioniques possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions charges négativement. Ils peuvent etre subdivises en trois principaux groupes :

* Les savons dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium d'un acide carboxylique.

*Les composés sulfonés de formule générale RS O_3-Na+ qui constituent la matière tensioactive la plus utilisée dans les formulations détergentes.

*Les composés sulfatés qui proviennent de la sulfatation d'un alcool. Ils ont un pouvoir moussant très élève mis a profit dans la préparation des shampooings et des bains moussants. Les alcools gras sulfates ont la formule générale ROS O_3-Na+. Un exemple typique est le lauryl sulfate de sodium

C/Tensioactifs cationiques:

Les tensioactifs cationiques possèdent un ou plusieurs groupements s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions tensioactifs charges positivement. Les plus répandus sont les dérives des amines quaternaires aliphatiques.

D/Tensioactifs amphotères:

Les tensioactifs amphotères contiennent a la fois des groupements acides et basiques. En conséquence, suivant le pH du milieu ou ils se trouvent, ils libèrent un ion positif ou un ion négatif. Les tensioactifs amphotères ont un HLB élève. Ils sont utilises

comme détergents. Ils présentent un caractère moins agressif que les tensioactifs anioniques et sont recommandes pour les peaux fragiles. Les dérives de la bêtine et les phospholipides sont les tensioactifs amphotères les plus répandus.

I-2-1.5/ Marché:

A/Marché mondial:

Le marche mondial des tensioactifs s'élève a environ 12,9 millions de tonnes par an [8].

On estime que le marche global des tensioactifs devrait générer des revenus de plus de 41 milliards de US$ en 2018, soit une croissance annuelle de 4.5 % [9].

Avec une part d'environ 37 % de la consommation mondiale, l'Asie-Pacifique est le plus grand débouche, suivi de l'Amérique du Nord et de l'Europe de l'Ouest.

La demande mondiale pour les tensioactifs anioniques a été d'environ 6,5 millions de tonnes en 2010.12 L'ensemble des tensioactifs anioniques et non ioniques représente environ 85 % de la demande mondiale de tensioactifs. Les tensioactifs non ioniques devraient connaitre la plus forte croissance dans les années a venir. En dépit de cette tendance pour les tensioactifs non ioniques, les anioniques devraient rester les Tensioactifs les plus utilisent.

Les plus importants acheteurs au niveau mondial incluent les fabricants de lessives et produits d'entretien ménagerie [9].

Leur demande de tensioactifs devrait croitre de 2,6 % par an jusqu'en 2018.

L'emploi de tensioactifs devrait connaitre la plus grande croissance dans les marches du soin corporel et des cosmétiques.

Les produits d'entretien industriel ont représente un peu moins de 9 % en 2010. Les produits de soin corporel et les cosmétiques ont eu une part de marche de 9,5 %. D'autres applications industrielles, telles que les produits agrochimiques, les produits chimiques, les matériaux de construction, les denrées alimentaires, les adhésifs, les lubrifiants, le travail des métaux, l'exploitation minière et les pates et papiers, ont représente environ 11 % de la consommation mondiale.

B/Marché européen:

Le marche européen des tensioactifs, quant a lui, s'élève a environ 2,5 millions de tonnes [10]. Il se décompose en deux sous-groupes principaux :

* Les applications caractérisées par des volumes importants, des produits standardises et une forte sensibilité aux prix (détergence).
* Un ensemble d'applications très nombreuses et très diversifiées ou le rôle de la formulation est primordial (cosmétiques, produits industriels et agricoles).

I-2-1.5/ Cadre réglementaire:

De nombreux tensioactifs sont concernes par la réglementation REACH (Registration,Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) :

- Les alkyl phénols éthoxyles.
- Les éthers sulfates.
- Les alkyl benzènes sulfonâtes linéaires [11].

De plus, les tensioactifs sont touches par les directives européennes ayant trait a la Biodégradabilité :

· Directive 73/404/CE (22/11/73) : Interdiction de mise sur le marche de détergents si la biodégradabilité moyenne des tensioactifs est inferieure a 90%.

· Directive 73/405/CE : Les tensioactifs anioniques doivent avoir une biodégradabilité supérieure a 80%.

· Directives 82/242/CE, 82/243/CE, 86/94/CE : Méthode normée commune pour déterminer la biodégradabilité.

I-2-2/ Les bio tensioactifs:

I-2-2.1/ Définition:

Les bios tensioactifs sont définis ici comme des tensioactifs totalement ou partiellement Biomasses.

I-2-2.2/ Matières premières renouvelables utilisées:

A/ Partie hydrophile:

La partie polaire est généralement constituée de carbohydrates, de polyols ou d'acides amines/peptides :

- Les carbohydrates, tels que le glucose, le saccharose, le lactose et le xylose, Peuvent provenir de l'industrie du sucre (betterave sucrière, canne à sucre) et de l'amidon (froment, mais, blé).
- Il existe une large gamme de polyols provenant soit de carbohydrates dérives

Principalement de l'amidon du mais ou du blé, soit d'huiles végétales dérivées d'oléagineux tels que le soja, le coton, le tournesol ou l'arachide: [12]

- Les polyols provenant de carbohydrates sont des carbohydrates hydrogènes [13]. L'hydrogénation de monosaccharides tels que l'érythrose, la xylose, le mannose et le glucose conduisent aux polyols, erythritol, xylitol, mannitol et sorbitol respectivement. L'hydrogénation du sirop de glucose conduit au sirop de sorbitol. L'hydrogenation de disaccharides tels que le lactose, le maltose conduit au lactitol et au maltitol respectivement.
- Le principal polyol issu d'huiles végétales est le glycérol (encore appelé propane-1, 2,3-triol, voir Equation 2), un coproduit de la fabrication du biodiesel.
- Les acides aminés et les petits peptides constituent une alternative intéressante aux sucres [4].

En effet, l'association d'une acide amine ou d'un peptide polaire et d'un compose a longue chaine non polaire permet l'obtention de molécules ayant une activité de surface élevée. Leurs propriétés permettent d'envisager leur utilisation dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques, ménagers et alimentaires. Ils sont dérives d'acides amines basiques, neutres ou acides ou d'hydrolysats de protéine.

B/Partie hydrophobe:

La partie hydrophobe est essentiellement issue d'huiles végétales obtenues par trituration des graines ou fruits des plantes oléagineuses [14].

Les huiles sont d'origine végétale, minérale ou animale. Dans les plantes, en général, L'huile est contenue dans la substance dure et ligneuse des graines ou du noyau et se trouve en fermée dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. Les huiles d'olive et de palme font exception dans la mesure où elles sont contenues dans L'enveloppe charnue du fruit. Les graisses animales sont également enfermées dans des Cellules formant le tissu adipeux. Les huiles végétales et les graisses animales contiennent 98 % de triglycérides.

L'hydrolyse des triglycérides conduit au glycérol et aux acides gras. Les acides gras Peuvent être classes en trois catégories : satures, mono insaturés et polyinsaturés. Le point de fusion des acides gras insaturés est d'autant plus haut que leur nombre d'atomes de carbone est élève. Une huile est constituée de différents acides gras présents en diverses proportions.

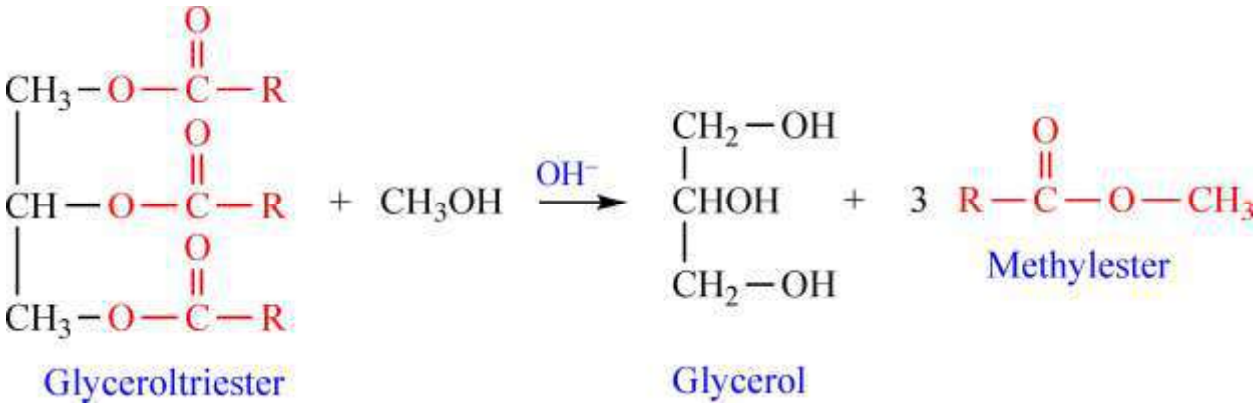
Les acides gras majeurs sont les acides l'aurique (C_{12}), myristique (C_{14}), palmitique(C_{16}), stéarique (C_{18}), oléique (C_{18} :1, c.-a-d. C_{18} avec une instauration), linoléique (C_{18} : $_2$), linoléique (C_{18} : $_3$). Les acides palmitiques, stéariques, oléiques et linoléiques sont parmi les plus courants. Il existe d'autres acides gras a chaines saturées, mono insaturées et polyinsaturées mais présents en moindre quantité dans les corps gras. A cote de ces acides, il y a aussi des acides gras polyinsaturés a doubles liaisons conjuguées ou Écartées, des acides acétyléniques ou encore des acides gras a fonction secondaire de Type alcool, cétone ou époxy.

I-2-2.3/ Synthèse des bio tensioactifs:

Les intermédiaires de base utilises pour la synthèse des bio tensioactifs sont Principalement les acides gras, les esters méthyliques, les amines grasses et les alcools gras. Les sels d'acides gras, de par leur nature amphiphile, sont eux-mêmes des tensioactifs, essentiellement utilises dans la fabrication de savons.

Les acides gras (RCOOH), obtenus par hydrolyse des triglycérides, peuvent être sépares par distillation en fonction de la longueur de chaine [15].

Les esters méthyliques d'acides gras (RCOOC H_3) sont obtenus par estérification des Acides gras ou directement par transesterification des huiles avec du méthanol (Equation 2).



(2) -Transesterification entre un triglycéride et le méthanol conduisant a des esters méthyliques et du glycérol

Les alcools gras (ROH) sont principalement synthétises a partir des esters méthyliques D'acides gras par hydrogénation catalytique a haute pression.

Les amines grasses (RN H_2) sont synthétisées essentiellement a partir d'acides gras par nitrilation puis ensuite hydrogénation.

Certains tensioactifs comme les alcanolamides ou les huiles éthoxylées peuvent être

Directement synthétises a partir de l'huile végétale.

A/Synthèse à partir des alcools gras:

La voie de synthèse a partir des alcools gras conduit a un grand nombre de bio-tensioactifs [14]. Les alkylpolyglucosides (APG) sont synthétises par condensation d'un alcool gras avec du glucose.

Les APG à chaine moyenne (C_{12} et C_{14}) sont moussants et détergents. Ceux préparées à partir d'alcools gras à 8 et 10 atomes de carbone possèdent un bon pouvoir mouillant.

Les alcools gras éthoxylés sont obtenus par condensation d'oxyde d'éthylène avec des Alcools gras. Les dérives des alcools de coprah ou de palmiste entrent dans la formulation de détergents commerciaux en poudre ou liquide.

Les alcools gras éthoxylés et propoxylés résultent de la condensation de l'oxyde de propylene sur un alcool gras ethoxyle.

Les alkyléthersulfates proviennent de la sulfatation d'alcools gras ethoxyles. Ils servent de base moussante cosmétique pour la formulation de shampooings et bains moussants ainsi que pour la préparation de détergents liquides pour lavages délicats.

Les alkylsulfates sont obtenus par sulfatation des alcools gras. Ils sont utilises dans les formulations de détergents doux destines aux lavages délicats.

Les sulfosuccinates sont des hemiesters de l'acide succinique ayant deux groupes Anioniques : carboxylique et sulfonique. Ils sont doux pour la peau et sont inclus dans la préparation des liquides vaisselles et des shampooings.

B/Synthèse à partir des acides gras:

Les acides gras peuvent etre esterifies pour donner notamment des esters de sucres (Equation 3) ou de glycerol [14].

$$ROH + R'COOH \rightarrow ROCOR' + H_2O \quad (3) \text{ (estérification)}$$

Les esters de sorbitan sont obtenus par réaction d'un acide gras sur les hydroxyles du sorbitan (voir Figure 2 et 3). Ces produits permettent la réalisation d'émulsions très Stables.

Les esters de glycérol et de poly glycérol proviennent de la réaction du glycérol ou du Poly glycérol et d'un acide gras. Ces esters sont des bases importantes pour la formulation de crèmes en cosmétique et en pharmacie.

Les acides gras éthoxylés sont issus de la réaction de l'oxyde d'éthylène avec des acides Gras (Equation 4) :

$$RCOOH + n\ H_2H_4O \rightarrow RCO\ (O\ C_2\ H_4)nOH \quad (4)$$

Les acides gras éthoxy-propoxylés sont obtenus a partir d'acide gras, d'oxyde d'éthylène Et d'oxyde de propylène.

Les condensats d'acides gras peptides ou acides aminés sont synthétises via la réaction de Peptides ou d'acides amines avec des chlorures d'acide gras. Ces molécules sont utilisées Dans les shampooings doux, les produits de lavage corporel et les crèmes et produits de Beauté.

Les alkylisothionates (isothionate = 2-hydroxyethane sulfonâtes) sont obtenus a partir des Chlorures d'acides gras. Doux pour la peau et peu solubles, ils trouvent des applications dans les crèmes ou liquides opacifies (shampooings, bains mousses) et les pains de Toilette.

Les dérivés de l'imidazoline résultent de la condensation d'un acide gras et d 'un dérive d'ethylenediamine, suivie d'une cyclisation. Ces agents de surface sont Employés couramment dans les shampooings car ils sont bien tolères par les muqueuses Et la peau.

C/Synthèse à partir des amines grasses:

Les amines peuvent être salifiées par un agent acide ce qui conduit aux sels d'amines : les chlorures d'amines avec HCl, les sulfates d'amines avec $H_2S\ O_4$. Les principales applications de ces sels sont la préparation de bitumes pour les revêtements routiers, l'antimottage des engrais et la flottation des minéraux.

Les amines éthoxylées sont obtenues par condensation d'oxyde d'éthylène et d'amines Primaires ou secondaires. Elles sont utilisées comme retardateur de teintures dans les Textiles.

Les monoxydes sont issus d'amines tertiaires âpres réaction avec de l'eau oxygénée. Ils Stabilisent les mousses et interviennent comme agents épaississants. Les sels d'ammonium quaternaire sont synthétises a partir d'amines tertiaires a l'aide d'un agent de quaternisation. Ils entrent essentiellement dans la composition D'assouplissement pour le linge.

D/Synthèse à partir des esters méthyliques d'acides gras:

Les esters gras de saccharose ou sucro esters sont obtenus par transe-estérification avec des esters méthyliques (Equation 5). Ce sont d'excellents agents mouillants et dispersants. Les sucro esters sont des additifs très recherches dans les Domaines de l'agro-alimentaire et de la cosmétique.

$ROH + R'COOC\ H_3 \rightarrow ROCOR' + C\ H_3OH$ (5) (trans éstérification)

Les alcano lamides d'acides gras sont prépares par condensation des esters méthyliques D'acides gras sur les amino-alcools. Ils servent de promoteur et stabilisateur de mousse et Ont des propriétés épaississantes, nacrâtes et adoucissantes. Un exemple typique est L'auramide diéthanolamine (Figure 1).

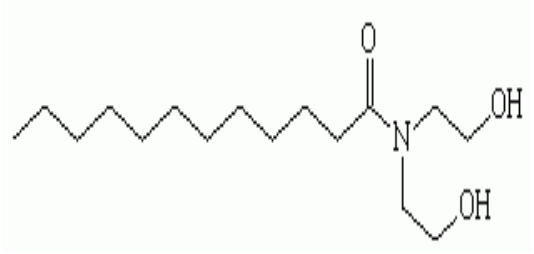


Figure 1- L'auramide diéthanolamine

Les alkyl glucosamides sont obtenus par réaction du glucose avec la mono-méthyle amine En présence d'hydrogène pour former la N-méthyle glucamine.22, 23 Ce produit est ensuite réagi avec un ester d'acide gras pour produire la glucosamide. L'exemple suivant donne la structure d'une glucosamide : $R\text{-}C\ H_2\text{-}CO\text{-}N(C\ H_3)\text{-}(CHOH)\ _4\text{-}C\ H_2OH$

Les méthyle- éther- sulfonâtes sont issus de la sulfonation de l'ester méthylique. Ils sont Utilises dans les poudres détergentes et dans les lessives liquides.

I-3/ Les bio surfactants: [15]

I-3.1/ Définitions:

Les surfactants (surface active agents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (bio surfactants) (Al- Arajil et coll., 2007).

Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non Miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système (Mulligan, 2009) et formant des Microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures (Prommachan, 2002).

La tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m en présence d'un surfactant, synthétique ou naturel (Christofi et coll., 2002) mais cette Capacité reste relative et varie d'un surfactant à un autre.

I-3-2/ Structure et classification des bio surfactants:

Il s'agit de molécules amphiphiles (Prommachan, 2002), constituées de deux pôles: un pôle hydrophile, qui peut être un ester, un hydroxyle, un phosphate, un Carboxyle, ou encore un groupe d'hydrates de carbone et peut avoir une charge neutre ou Négative, et un pôle hydrophobe qui est un acide gras (Maier, 2003, Marqués et coll., 2009) hydroxylé, saturé ou insaturé, et peut être aussi un peptide (Banat, 1995).
Selon plusieurs auteurs (Kosaric et coll., 1983, Rosenberg et coll., 1993, Desai et Coll., 1997, Prommachan, 2002, Al-Arajil et coll., 2007, Mulligan, 2009) les classes Majeures de bio surfactants sont différenciées essentiellement par leur composition Chimique et leur origine microbienne.

I-3-3/ Biosynthèse et rôle physiologique:

La production de bio surfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficiente (Pruthi et coll., 1995). Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux Liquides purs non miscibles (Krepsky et coll., 2007).
Cameotra (2009) explique ce phénomène comme étant l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats Hydrophobes, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau.
En effet, ces bactéries synthétisent les bio surfactants qui sont soit des molécules Intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et coll., 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Al-Arajil et coll., 2007).

Il est intéressant de savoir aussi que les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas dans le sol comme polluants, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par les même microorganismes prédominants, comme l'a révélé l'étude de Dashti et ces collaborateurs en 2008.

Cependant, les bio surfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'Acinetobacter), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de T. bombicola), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine,

surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de Pseudomonas), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

I-3-4/ Rôle des bio surfactants dans la biodégradation des hydrocarbures:

Il existe une relation claire entre l'activité d'émulsification, l'adhérence des Cellules à l'hydrocarbure, et le taux de croissance des isolats sur le pétrole brut (Mehdi Et coll., 2008).

Une étude très récente sur des bactéries (Pseudomonas sp.) capables de dégrader le n-héxadecane en produisant des bio surfactants était faite par Cameotra et ces Collaborateurs (2009) pour élucider ce mécanisme.

En présence de n-héxadecane dans le milieu de culture, les bactéries secrètent des substances qui forment un réseau de projections extracellulaires reliant les cellules les unes aux autres. Ce réseau est supposé être un complexe de bio surfactants et d'alcanes qui forme un site d'ancrage des cellules et un moyen de transport d'hydrocarbures à leur surface cellulaire. Le bio surfactant disperse l'héxa-décane en petites gouttelettes, et forme une couche autours de chacune, augmentant ainsi ça disponibilité aux organismes dégradants (Figure 2).

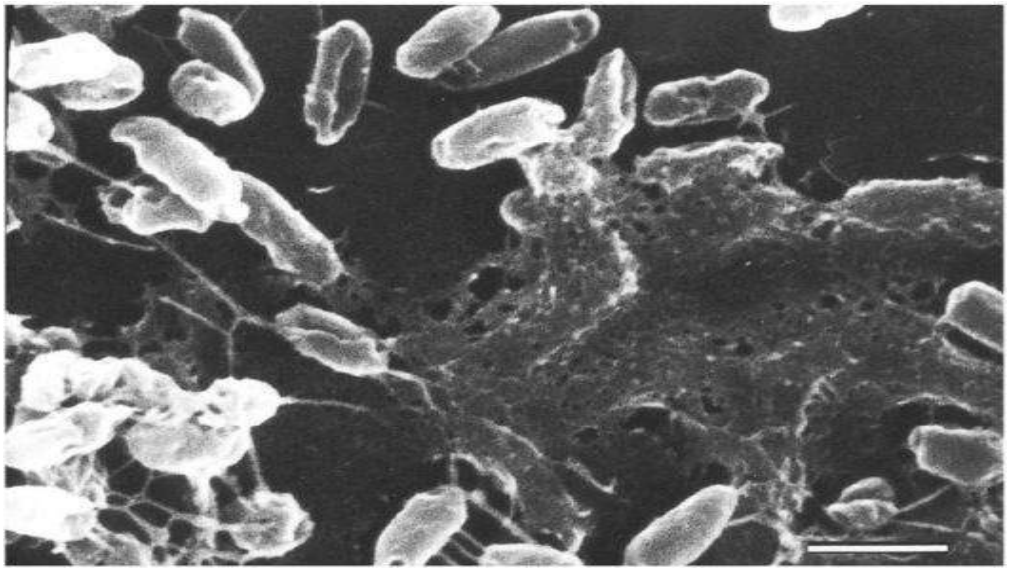


Figure 2- Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche Pseudomonas sp. SSC2 cultivé sur 2% de n-hexa- décane (S. S. Cameotra et coll., 2009)

L'étude ultra-structurale a montré qu'un processus semblable à la pinocytose Active prend place pour la pénétration des gouttelettes d'hydrocarbure à l'intérieur de la

Cellule bactérienne (Figure 3).

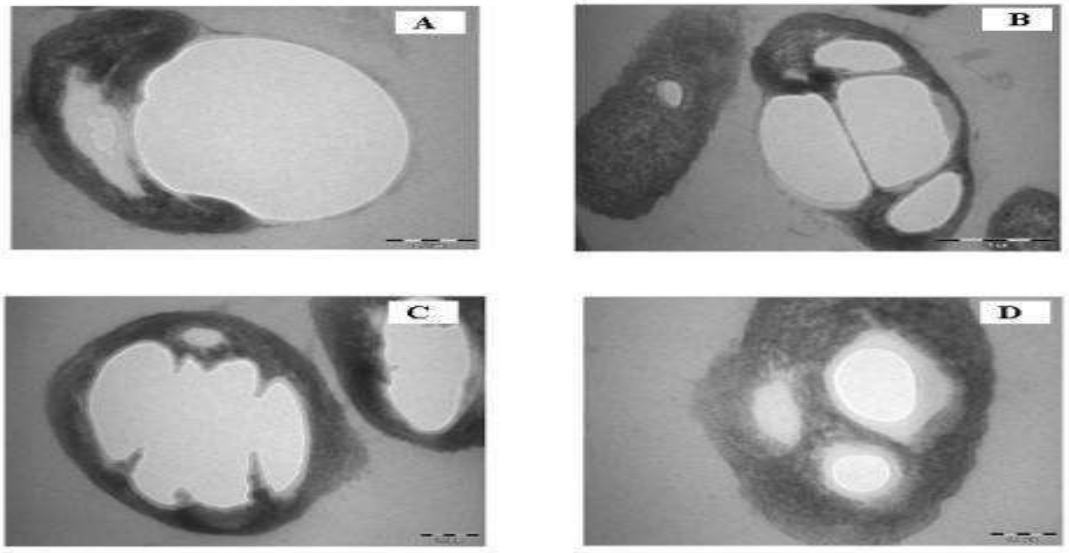


Figure 3- Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadecane englouties par la souche Pseudomonas sp. SSC2, Morgagni TEM (S. S.Cameotra et coll., 2009)

I-3-5/ Potentiels des bio surfactants:

Les bio surfactants peuvent être aussi efficaces et plus avantageux que les Surfactants synthétiques. Ils sont hautement spécifiques, biodégradables, biocompatibles Avec l'environnement (Mulligan, 2009), moins sensibles aux biotopes de températures, PH et salinité extrêmes (Suwansukho et coll., 2008), moins toxiques et peuvent être Synthétisés en grandes quantités, sur des sources d'énergie coûteuses, comme les Produits pétroliers (Sarubbo et coll., 2006), mais aussi sur des ressources renouvelables. Un autre avantage des bio surfactants, est la possibilité de leur modification par Biotransformation à fin de générer de nouveaux produits pour des besoins spécifiques (Samadi et coll., 2007). Avec l'introduction de certains groupements fonctionnels, les Bio surfactants fournissent de nouvelles propriétés, surpassant ainsi les surfactants Chimiques dans beaucoup d'applications (Huang et coll., 2010).

Ces biomolécules présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines (Prommachan, 2002). Cependant, il n'est pas facile de rationaliser la différence entre leurs rôles naturels et nos applications (Cameotra et coll., 2004; Hamme et coll., 2006, Marqués et coll., 2009).
Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et leur auto-assemblage en micelles ou autres nanostructures est cruciale pour plusieurs processus industriels tels

que la formation de couches, la diffusion, la formation de mousse, la détergence, la catalyse micellaire, etc. (Xiaoyang et coll., 2009).

Ces biomolécules peuvent aussi induire la formation d'émulsion, la séparation de Phases, la solubilisation, le mouillage, la réduction de viscosité (Ochsner et coll., 1995), La floculation, l'agrégation, la désorption (Karanth et coll., 1999) ainsi que la Stabilisation et la déstabilisation d'émulsions (Huang et coll., 2010).

I-3-6/ Les différentes applications des bio surfactants:

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les bio surfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que :

- la bio remédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants Organiques et les métaux lourds (Tableau 2), (Raza et coll., 2007) et dans le traitement Des eaux usées (Samadi et coll., 2007).
- l'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupération Transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du Pétrole (Banat, 1995, Meylheuc et coll., 2001).
- l'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces Zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) (Hultberg et coll., 2008).
- l'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la Boulangerie et la charcuterie (Prommachan, 2002).
- l'industrie du cosmétique (Suwansukho et coll., 2008) et dans les procédés de teinture Du textile (Savarino et coll., 2009).
- l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités Antibactériennes, antifungiques et antivirales pour combattre les différentes maladies Infectieuses (Rodrigues et coll., 2006).
- le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement Magnétique, la micro-électronique (Marqués et coll., 2009) ainsi que dans les Nanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO, Etc. (Mulligan, 2009).

I-4/ Notions d'écologie microbienne:[16]

L'écologie microbienne est une discipline située au carrefour de deux grands champs de recherche: l'écologie et la microbiologie. Elle a pour objectif d'étendre la compréhension des relations entre la biodiversité des microorganismes, l'activité

microbienne, et les facteurs écologiques du milieu, de l'échelle individuelle à celle des communautés microbiennes. Il s'agit donc d'une modélisation des écosystèmes (eau, air, sol) ou les microorganismes sont des acteurs majeurs du fonctionnement.

Face aux demandes sociétales vis-à-vis des changements globaux, du développement durable, de l'extension industrielle, de la préservation de la santé humaine et animale, et de la biodiversité et ressources naturelles, cette discipline est actuellement en plein essor, se devant d'apporter des réponses aux perturbations anthropiques de l'environnement.

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, sensu inventaire des espèces et sous-espèces d'un environnement, se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxonomie (Alain, 2003). Toutefois, les techniques d'analyse restent en évolution permanente pour établir une classification stable et pallier les déficiences des voies classiques.

I-4-1/ Définitions:

Un écosystème est un ensemble dynamique au sein du quel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques (individu, population, communauté…) et abiotique (facteurs physico-chimiques) (Begon et coll., 1996).

A/Les interactions entre les composants de l'écosystème:

La nature d'une communauté microbienne est soumise à des fluctuations Temporelles et spatiales qui correspondent à des phases de colonisation de nouveaux Milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée. Nous savons Qu'un grand nombre de facteurs peut modifier la composition de la communauté microbienne : la disponibilité en sources de carbone, d'énergie et en accepteurs d'électrons, la température, le pH, la teneur en eau ou encore la lumière.

Pour survivre et se propager, les microorganismes ont développé des adaptations structurales et nutritionnelles correspondant à différentes stratégies qui restent fonction des conditions physico-chimiques aux quelles ils sont exposés.

Aux facteurs extérieurs s'ajoutent les fortes interactions qui peuvent se produire au sein d'une population (coopération ou compétition) ou entre populations (synergie, symbiose et antagonisme).

B/L'habitat naturel:

L'étude de l'habitat microbien est à mettre en rapport avec la taille du Microorganisme (une distance de 3mm pour une cellule de 3µm, correspond à l'équivalent d'une distance de 2Km pour l'homme) (Begon et coll., 1996). Même si les cellules seules n'existent pas ou très peu dans la nature (on parle de micro-colonies) des microenvironnements de l'ordre du millimètre peuvent être le siège de très fortes variations physico-chimiques (c'est le cas notamment dans les particules de sol). De plus les cellules colonisent souvent les surfaces sous forme d'un biofilm. Cette structure complexe permet aux microorganismes d'accéder plus facilement aux nutriments nécessaires à leur croissance et de les stocker (Amann et coll, 1998).

L'étude des populations microbiennes dans leur environnement devra donc répondre aux questions de la composition, de la structure et de la fonction de cette population. Dans ce but, les premiers microbiologistes disposaient de méthodes fondées sur leur capacité à recréer le plus fidèlement possible les conditions de croissance in situ. Par la suite, le développement des techniques moléculaires a permis de s'affranchir partiellement des étapes de mise en culture.

I-4-2/ Les méthodes classiques d'écologie microbienne:

A/Les cultures d'enrichissement:

La plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement. Cet isolement est précédé par une phase d'enrichissement qui va favoriser la croissance d'un type donné de Microorganismes, sélectionné en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du Milieu.

B/L'isolement:

A partir de l'enrichissement il est possible d'isoler des espèces pures. Pour ce faire on dispose de techniques classiques qui sont : l'isolement sur boite, la dilution successive en milieu liquide ou dans l'agar. Pour chacune des méthodes plusieurs repiquages successifs des souches isolées sont nécessaires pour s'assurer de la pureté de l'isolat.

Une fois la souche isolée il convient de la caractériser, c'est-à-dire de définir les caractères phénotypiques et génotypiques qui permettront de la comparer avec d'autres microorganismes préalablement isolés. On réalise alors une taxonomie.

I-4-3/ Intérêt des bio surfactants dans la caractérisation:

L'étude des biomolécules bactériennes, qu'elles soient intracellulaires ou Extracellulaires est considérée comme méthode phénotypique mais qui rapportent des Informations relatives aux gènes bactériens. De cette manière, elles peuvent être proposées comme un lien entre l'approche phénotypique et l'approche génotypique dans la taxonomie bactérienne, participant au criblage des souches sauvages, et leur attribution aux taxons. C'est le cas notamment des bio surfactants qui présentent l'intérêt d'être synthétisés par un nombre restreins de microorganismes, à différents taux, avec différentes natures chimiques, et appartenant à des classes variées.

I-5/Microbiologie des sols pollués aux hydrocarbures: [16]

I-5-1/La composition chimique des polluants:

Du fait de l'utilisation massive des produits pétroliers, les hydrocarbures Constituent les polluants organiques les plus fréquents des sols (Vandecasteele, 2002). La composition chimique des pétroles bruts varie énormément selon leur origine Géographique et géologique. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre Familles principales qui sont présentes en proportions variables: 30 à 70 % d'hydrocarbures saturés (alcanes cycliques, chaines de n-alcanes) 20 à 40 % D'hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (BTEX pour : Benzène, le Toluène, L'Ethyle benzène et le Xylène, et HAP pour: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Qui sont le Naphtalène, le Phénanthrène, le Pyrène ainsi que le Benzopyrène), 5 à 25 % De composés polaires et 0 à 10 % d'asphaltènes (Soltani, 2004, Shao, 2009).

I-5-2/La communauté microbienne indigène:

Dans l'environnement, la dégradation de la matière organique n'est jamais Assurée par un seul microorganisme, mais le plus souvent par une communauté microbienne. Cette dernière est constituée d'une collection de différentes populations Occupant le même habitat et interagissant positivement ou négativement (Vandecasteele, 2008).

Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs microorganismes (bactéries, levures et moisissures) ont le pouvoir de dégrader les hydrocarbures au sein d'un consortium où chaque membre contribuait selon ces capacités enzymatiques.

Des recherches portant sur les bactéries isolées à partir de sites contaminés par les hydrocarbures (Kasai, 2002; Okoh, 2003; Okerentugba, 2003 ; Ojo, 2006; Emtiazi, Shakarami, 2004) ont montré la capacité des populations bactériennes natives à minéraliser le pétrole brut et ces produits raffinés (Sepahi et coll., 2008) en CO_2, H_2O et biomasse, sous les conditions idéales (Celik et coll., 2008).

I-5-3/Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures:

Les hydrocarbures peuvent servir de sources de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Head et coll., 2006, Shao, 2009) et vue leur large distribution Dans l'espace et dans le temps, il n'est pas surprenant de trouver que les bactéries capables de les dégrader sont ubiquitaires (Shao, 2009).

Il y'a deux étapes dans le processus de biodégradation : la première est L'assimilation du substrat par la cellule et la seconde est le métabolisme du substrat. Quand la présence d'une voie métabolique appropriée est assumée, la dégradation peut Se faire rapidement à condition que le substrat soit disponible sous une forme soluble Dans l'eau. Or, les hydrocarbures sont insolubles donc ils vont former un système Diphasique avec l'eau du sol (Maier et coll., 2009).

A/Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne:

Il y'a quatre modes d'assimilation bactérienne de l'hydrocarbure liquide, soit :

- par l'utilisation de composés organiques préalablement solubilisés.
- par contacte direct de la cellule avec le composé organique. Cela peut être facilité par des modifications cellulaires telles que la formation de fimbriae (Rosenberg et coll., 1982, Maier et coll., 2009) ou l'augmentation de L'hydrophobicité de la surface cellulaire (Zhang et coll., 1994, Maier et coll., 2009) qui favorise l'attachement de la cellule au composé organique.
- Par contacte direct avec les microgouttelettes dispersées dans la phase aqueuse.
- une assimilation améliorée via la synthèse des bio surfactants, qui augmentent la Solubilité des hydrocarbures dans l'eau, ou peuvent encore faciliter l'attachement

Des cellules aux hydrocarbures (Maier et coll., 2009), et c'est ce mode de dégradation qui nous intéresse dans cette étude.

B/Métabolisme des hydrocarbures:

Pour initier la biodégradation et permettre le déroulement des autres étapes, la molécule d'hydrocarbure doit être activée. La première étape dans la dégradation Aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène Dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (Hayaishi et coll., 1955, Ollivier et coll., 2005).

Typiquement, les hydrocarbures sont hydroxylés à l'alcool primaire correspondant et seront plus loin oxydés par un alcool ou aldéhyde déshydrogénase. Les acides gras qui en résultent entrent en β-oxydation ou sont incorporés dans les lipides cellulaires. Des fois, la dégradation est complète, générant du CO_2, c'est le cas pour certaines bactéries et levures (Broadway et coll., 1993, sheller et coll., 1998, Ollivier et coll., 2005). Dans la dégradation anaérobie, l'accepteur final d'électrons est autre que l' O_2, du C O_2 par exemple. Le mécanisme d'activation initiale des molécules d'hydrocarbure implique soit une carbo-xylation, une méthyle-ation, une hydroxylation, une déshydrogénation soit une réaction d'addition (fumarate surtout) (Singh et coll., 2001

I-6/Moisissures : [17]

I-6-1/Généralités:

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique (Nicklin et al. 2000). Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993). Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores (Bourgeois, 1989).

I-6-2/Classification:

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes.

- **Zygomycètes**

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,…) comme Rhizopus et Mucor (Guiraud, 1998).

- **Ascomycètes**

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microscales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est Endothia et Neurospora (Bourgeois, 1998).

- **Basidiomycètes**

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de Agaric us et Coprin us (Botton et al. 1999).

- **Deutéromycètes**

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par

Simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes

conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : Trichoderma, Cephalosporium, Fusarium, Geotrichum, cette classe regroupe aussi les Penicillium et les Aspergillus (Frazier, 1967; Punt et al. 2002).

I-6-3/Mode de reproduction:

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle de façon générale spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au coté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures.

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments Préexistants.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction Préexistante du thalle.
- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion Préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) (Guiraud, 1998).

I-6-4/Conditions de croissance:

A/ Eléments nutritifs:

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes.

Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

· **Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent êtres utilisés comme source de Carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le Glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et al. 2000). Certaines d'entres elles produisent des lipases Extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras qui peuvent êtres assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol (Boiron, 1996).

· **Source d'azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ($N H_4$ +) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformée en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides Aminés par transe-ami-nation (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le Nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt et al. 2000).

· **Eléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la Croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de Sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (Uchicoba et al. 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (Boiron, 1996).

B/ Facteurs physicochimiques:

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

· **Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient Également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton et al., 1999 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermo tolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, Aspergillus fumigatus en est un bon exemple (Botton et al. 1999 ; Nicklin et al. 2000).

D'autres sont des psychrophiles ou psychro tolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que Helicostylum pulchrum, Chrysosporium pannorum et Cladosporium herbarum, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Botton et al. 1999).

· **Humidité**

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par apport aux autres Microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le Développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989). Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur Développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au dessous de - 4 MPa (méga Pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'a – 10 MPa. Cependant, les Aspergillus et les Penicillium peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de – 20 MPa (Davet, 1996).

· **PH**

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (Botton et al., 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide .C'est le cas de Fusarium culmorum, Trichoderma harzianum et Aspergillus oryzae. (Urbanek et al. 1984 ; Delgado-Jarana et al., 2002). Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton et al. 1999).

Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux Assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par

ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de C O_2 ou de N H_3 ou par production d'acides (Boiron, 1996).

· Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de Développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions Périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme Fusarium oxysporum et Aspergillus fumigatus. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme Neocallimastix (Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999).

· Lumière

Les radiations du spectre visible (380 – 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et al. 1999).

I-6-5/Intérêt industriel des moisissures:

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines D'applications ; elles sont utilisées dans l'industrie alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992).

A/ Intérêt alimentaire:

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par Aspergillus niger, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et al. 1999).

La production de biomasse peut être une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'Aspergillus niger, de Fusarium graminearum et de Trichoderma harzianum (Botton et al., 1999 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Delgado-Jarana et al., 2002)

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. Aspergillus niger est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons. Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

B/ Intérêt chimique:

Il s'agit essentiellement de l'utilisation des protéases alcalines d'Aspergillus oryzae et de Stachybotrys chartarum dans les détergents (Miller, 2002).
La production de cellulase par Aspergillus niger et Trichoderma harzianum présente une Diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre Penicillium est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado- Jarana et al. 2002).

Certains genres fongiques tels qu'Aspergillus, Mucor et Penicillium sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (Botton et al. 1999).

En biolixiviation seules les bactéries présentent un intérêt industriel. Cependant, certaines moisissures possèdent d'intéressantes propriétés ; Aspergillus ochraceus, Penicillium funiculosum et Rhizopus arrhizus sont capables d'absorber de l'uranium du minerai. Les milieux de culture carencés en facteurs de croissance et en sels minéraux, diminuent le taux de croissance, mais stimulent ce phénomène (Boiron, 1996 ; Larpent- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton et al. 1999).

En biotransformation les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par Penicillium chrysogenum et Fusarium entraînant la formation d'acide amine-6-pénicillinique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxy-cilline (Durand et Monson, 1988).

C/ Intérêt pharmaceutique:

La production industrielle en vitamines se limite à une partie de la synthèse de la riboflavine produite spécialement par Eemothecium ashbyii cultivé en milieu agité et

Supplémenté en lipides. La vitamine A pourrait faire l'objet d'une production microbiologique par les champignons notamment les espèces de l'ordre des mucorales (Botton et al. 1999).

Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre Penicillium et la céphalosporine produite par Cephalosporium (Larpend- Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton et al., 1999). Cependant les acides organiques d'origine fongique n'ont pas une application pharmaceutique importante (Divies, 1984).

D/ Intérêt médical:

Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton et al., 1999).

La découverte de la cyclosporine, puissant agent immunodépresseur, puis la mise en Évidence de corrélation entre l'activité de certaines enzymes et diverses pathologies ont Permis de donner un grand essor aux sciences médicales et pharmaceutiques (Botton et al. 1999 ; Richard, 2005).

I-6-6/Isolement des moisissures:

La plupart des milieux naturels air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (Clark et al. 1985 ; Karam, 2000 ; Julien, 2002), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisé en le combinant traitement des milieux de cultures par un antibiotique avec le choix et le contrôle des conditions de culture. Il est important du choisir un échantillon aussi important que le permet la mise en évidence du microorganisme désiré (Ulacio et al. 1997).

A/ Choix d'échantillons naturels:

Le choix de l'échantillon naturel est déterminant pour la mise en évidence du microorganisme recherché. Initialement, les souches microbiennes ont souvent été isolées du sol ou d'éléments naturels (Julien, 2002). Généralement, les microorganismes producteurs des hydrolases sont localisés là où ces substances sont abondantes. Par exemple, les microorganismes sécrétant des cellulases sont nombreux dans les sols des

forêts (Scriban, 1999) tandis que les espèces protéolytiques, elles sont localisées dans les débris de fromageries (Peppler et Perlman, 1979 ; Fuke et Matsuoka, 1993 ; Punt et al. 2002).

B/ Addition des antibiotiques:

L'isolement des moisissures est réalisé le plus souvent à partir de produits contenant également des bactéries et des levures, donc il est nécessaire d'employer des inhibiteurs spécifiques pour les détruire. L'addition d'antibiotiques aux milieux de cultures est utilisée pour empêcher le développement des bactéries. Les antibiotiques utilisés sont : le chloramphénicol 0,5 mg/ml, l'oxy-tétracycline 0,1 mg/ml, la streptomycine 30 à 40 µg/ml, la colistine 0,08 mg/ml, la novo-biotine 0,1mg/ml ou des colorants (rose Bengale 35 à 67mg/l, cristal violet 10mg/l) (Guiraud, 1998). En raison de leur stabilité, la gentamycine et la chloramphénicol peuvent êtres stérilisés avec le milieu ; leurs larges spectres d'action en font des antibiotiques très utilisés (Botton et al., 1999).

Lorsque les levures sont très abondantes dans le milieu, il est parfois possible d'utiliser de l'actidione mais à faible concentration de façon à ne pas inhiber la croissance des Champignons filamenteux recherchés (concentration á 2 mg/l) (Guiraud, 1998 ; Waller, 2004).

C/Choix des milieux de cultures sélectifs:

Le choix des milieux de cultures est également déterminant dans l'isolement des moisissures (Harrigan et McCance, 1976). Les milieux d'isolement de base (et de numération des spores) sont souvent communs à ceux décrits pour les levures tels que Czapec, le milieu malté (voir annexe 01) (Chakraborty et al. 1995 ; Biezen et al. 1977) ou le milieu de Mossel (Botton et al. 1999). Lors des isolements, ce dernier inhibe la prolifération des bactéries en raison de leur acidité.

D/ Conditions d'isolement:

Pour permettre l'expression la plus complète possible des microorganismes recherchés, il convient de retenir au laboratoire les facteurs et paramètres de l'environnement naturel qui ont pu favoriser l'implantation d'une flore particulière. La plupart des moisissures requièrent pour leur développement de l'oxygène et croissent bien en l'absence de lumière. Leur tolérance à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides. Concernant la température, leur gamme compatible avec la croissance est très large et diffère selon les espèces (Botton et al. 1999 ; Julien, 2002 ; Coulibaly et Agathos, 2003).

E/ Sélection des moisissures protéolytiques:

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers microorganismes nécessite un milieu de culture protéiné, où les protéines jouent le rôle d'une source azotée et même d'une source du carbone. Parfois, elles constituent un inducteur de la synthèse de protéases par les microorganismes (Durand et Monson, 1998). Les différentes protéases peuvent présenter une spécificité vis-à-vis de certaines protéines natives ou dénaturées telles que l'albumine, la caséine, la globuline, l'élastine, l'insuline, etc. L'observation d'une zone claire autour de la colonie microbienne prouve la production d'une ou de plusieurs protéases (Colwell et Grigorova, 1989 ; Richard, 2005).

I-7/ Activité protéolytique: [17]

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999).

Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés (Pelmont, 1995 ; Scriban, 1999). Même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets, de courges, etc (Alais, 1975).

La kératinase, une autre protéase qui dégrade les cheveux et les laines est produite par quelques groupes de plantes (Rao et al. 1998).

II-1 INTRODUCTION:

L'étude expérimentale a été répartie en plusieurs étapes:

- Etude d'optimisation de conditions opératoires « source de carbone et d'azote »
- Etude de la production du bio surfactant
- Etude de caractérisation du bio surfactant.

Les experiences ont été réalisé dans des erleyn Meyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu de pré-culture , additionné de 1% du pétrole brute comme source unique du carbone et énergie. Ce milieu liquide est inoculé avec 1% d'une culture bactérienne . L'incubation s'éffectue à 45 °C sous une agitation de 200 tr/min pendant 2 jours.
Le criblage est basé sur la mesure de la TS du surnageant après centrifugation à 60 tr/min pendant 20 minutes. La TS a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre manuel de Krüss:
Le tensiomètre Krüss a tous les avantages pour une détermination rapide et simple de la tension superficielle des liquides, le principe de mesure est basée sur la méthode de l'anneau.
Dans la méthode de l'anneau le liquide est amené vers la sonde jusqu'à la détection de contact avec la surface. L'échantillon est alors de nouveau déplacé, dans la direction opposée cette fois, conduisant à l'étirement d'un film au-dessous de l'anneau.

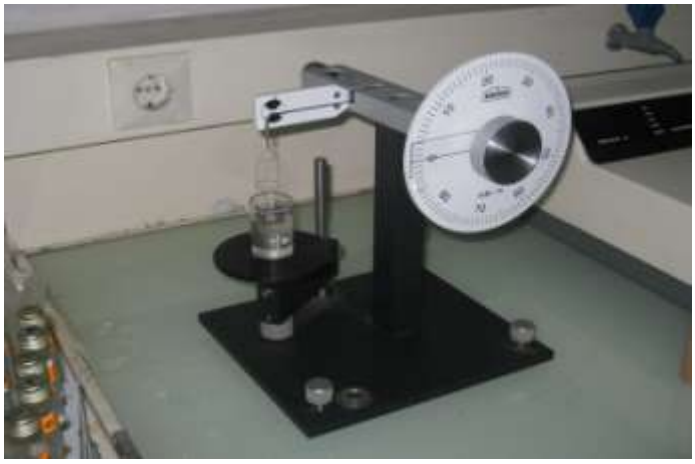


Figure 4: Tensiometre de Kruss

L'instrument est calibré avec l'eau ultra pure (72 mN/m) et avec l'éthanol pur (22, 7 mN/m).Avant l'utilisation, l'anneau de platine est séquentiellement lavé avec l'acéton

II-2 Optimisation de la production de bio surfactant :

Deux facteurs intéressants ont été testés sur la production du bio surfactant : nature de la source de carbone et sa concentration. De ce fait quatre sources de Carbone ont été utilisé à différentes concentrations (0,25 % ; 0,5% ; 1% ; 2 % et 3%) : gasoil , huile d'olive, huile de moteur et pétrole. La sélection de la source optimale est basée sur la mesure de la tension superficielle.

II.3 Etude de la stabilité du bio surfactant

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

- ***Stabilité chimique***

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

- ***Stabilité thermique***

Afin d'évaluer la thermostabilité du biosurfactant, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 22, 45, 70 et 100 °C pendant 24 h [16].

II.4 Etude morphologique

II4.1. Aspect macroscopique

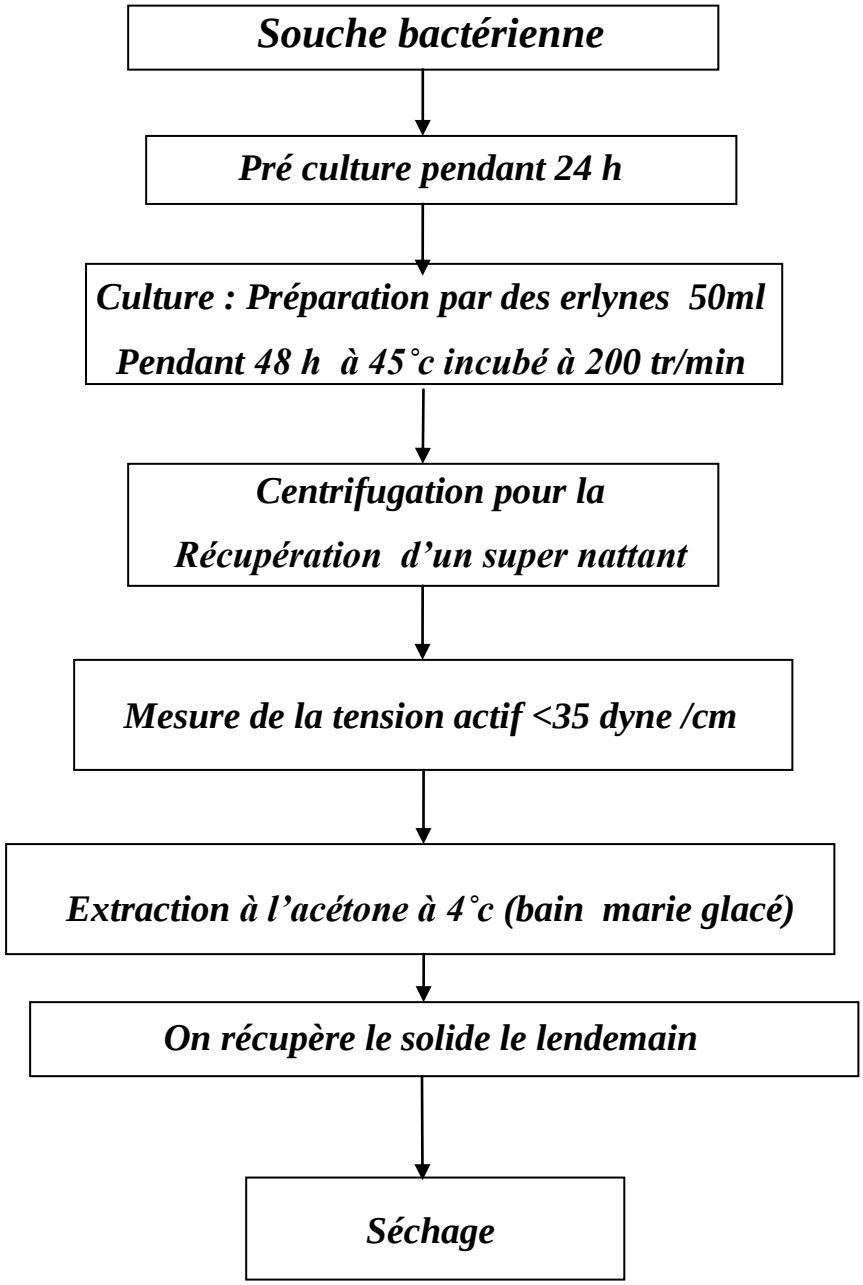
L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification**,** les critères d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies: rondes, irrégulières…etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La chromogénèse: couleur de la colonie.

- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,…etc.

II.4.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de GRAM, l'état frais permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100 (Marchal et Bourdon, 1982). La coloration de GRAM est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Gram+ ou Gram -) .



Cet organigramme récapitule le mode opératoire de la production du bio surfactant à partir de la souche 7A des :

-***Souche bactérienne :*** on a utilisé des souches thermophiles d'origine pétrolière

-***Pré culture pendant 24 h*** : ces souches sont mises dans un milieu de pré-culture

Dont la composition est :

Extrait de carne……3.0g/l

Peptone de gélatina …….5.0 g/l

ph =6.8 ± 0.2

ces milieux sont stérilisés par autoclave à 121 ˚c pendant 20 minute.

-milieu de culture pendant 48 h : Préparation dans des erlynes de 50 ml

Exemple de milieu de culture

Na_2Hpo_4(2.2) ,$MGSO_4.7H_2O$(0.06),NACL(0.05) ,KH_2PO_4(1.4) ,$FESO_47H_2O$(0.01) ,$CACL_2$(0.02),extrait de levure(0.02).

Solution d'oligoéléments :

ce milieu est additionné par 1 ml d'une solution d'oligoélément composés de 2 mg $ZNSO_4.7H_2O$(525), $CUSO_4.5H_2O$(705), $CACL_2.6H_2O$(200), $MnSO_4.4H_2O$(200), $NISO_4.6H_2O$(27),H_3BO_3 (5)

Le milieu est stérilisé par autoclave à 121 ˚c pendant 20 minutes.

-centrifugation : pendant 20 minutes à une vitesse maximale.

-mesure de la tension actif <35 dyne /cm : on mesure la tension superficielle à l'aide d'un tensio- mètre manuel de Krüss.

-séparation à l'acétone : à 4˚C dans un bain marie glacé

-on récupère le solide le lendemain ;

-séchage : **dans une étuve.**

II.5. Caractérisation structural du bio surfactant

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

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR: Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau. Analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, D'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 – 25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on

peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.
Par consequent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.
L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption.
Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

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



Figure 5: La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

(ou FTIR : Fourier Transformed Infra Red spectroscopy) .

II.6 mesure de E_{24}:

***/ Principe:**

On utilise des tubes à essais, un agitateur de tube a essai du type (vortex)

***/ Mode opératoire:**

Dans des tubes a essai on met 2 ml de source de carbone + 2 ml du super nattant , puis on ferme les tubes a essais avec des bouchons et on les met dans un agitateur de tubes a essai (vortex) pendant 2 minutes à une vitesse maximale ,puis on les laissent pendant 24 heures et on calcule le E_{24} .

Selon la bibliographie, peu de travaux ont été réalisés à des températures supérieures à 40 °C, ceci montre l'importance des souches thermophiles utilisées dans notre cas d'étude, elles ont été isoles à partir de sols contaminés par le pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud.

III.1. Criblage des souches bactériennes productrices de bio surfactants :

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

Tableau 1 : Valeurs de la TS du surnageant pour chaque souche bactérienne (T_{incub} = 45°C, pétrole brut (1%, v/v), t_{incub} = 48 h, 200tr/min)

Souche bactérienne	**1A**	**K1J**	**K2C**	**7A**	**7H**	**K2N**	**NIJ**
TS (mN/m)	45	48	41	40	43	38	29

D'après les valeurs de la TS, on peut dire que les souches bactériennes NIJ , K2N et 7A montrent une production de bio surfactants en utilisant le pétrole brute comme source de carbone. Par contre, les autres souches n'ont pas la capacité de production du bio surfactant

à cause de leurs TS qui sont supérieurs ou égaux à 40 mN/m. Notons qu'un bio surfactant plus actif peut réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 30 mN/m et la tension inter faciale eau/hexa décane de 40 à 1 mN/m.

. A cet effet, ces souches NIJ, K2N **et** 7A sont retenues comme souches performantes productrices de bio surfactants. Notons que la souche qui nous a été attribué est la souche 7A.

III.2. Optimisation production du bio surfactant :

Afin d'évaluer l'effet de la nature de la source de carbone sur la production du bio surfactant par la souche 7A, quatre types de substrats (liquides hydrophobes insolubles dans l'eau) ont été utilisés : huile d'olive, huile de moteur, gasoil et pétrole brut. La concentration utilisée est de 1% (v/v).

III.2.1. Effet de la source de carbone :

L'étape de l'optimisation a prouvé qu'il y a des conditions spécifiques pour produire le maximum de bio surfactant. La souche 7A (figure 8) donne une bonne production de bio surfactant en présence du pétrole brut traduit par une valeur minimale de la TS (42 mN/m). En revanche, l'utilisation du gasoil entraine une bonne réduction de la TS (38 mN/m). D'après ces résultats, on a sélectionné le pétrole brut et le gasoil comme sources de carbone optimales respectivement pour la souche 7A.

Plusieurs travaux ont sélectionné une variété de sources de carbone pour une meilleure production de bio surfactant, le gasoil et le pétrole [18] l'hexa décane [19] ; [20] ; l'huile de tournesol résiduelle de friture , l'huile d'olive [21] , le pétrole et l'huile d'olive .

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

L'optimisation de la concentration de la source de carbone est très importante pour augmenter la quantité en bio surfactant. Les figures 6 et 7 montrent l'effet de la concentration du substrat sur la réduction de la TS.

D'après les résultats obtenus, les faibles concentrations en substrat améliorent la production en bio surfactant. Par exemple, une concentration de 1% (v/v) de pétrole brut a réduit la TS jusqu'à une valeur de 37 mN/m pour la souche bactérienne 7A.

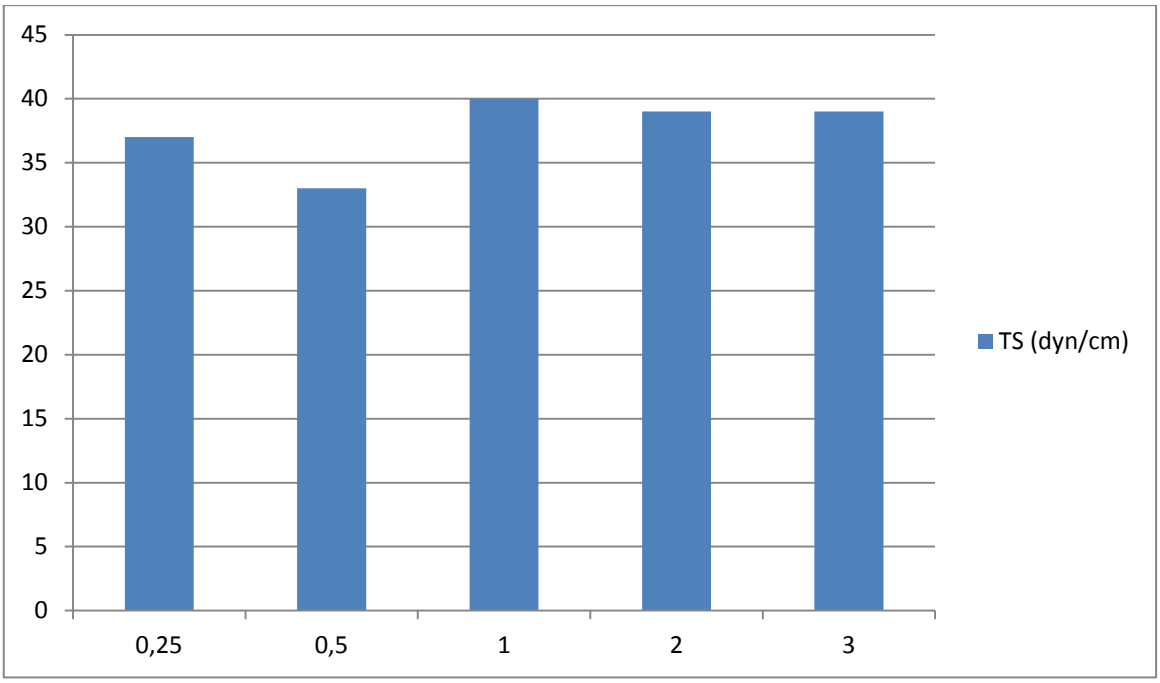


Figure 6: Influence de la concentration du pétrole brute(%) sur la TS pour la souche 7A

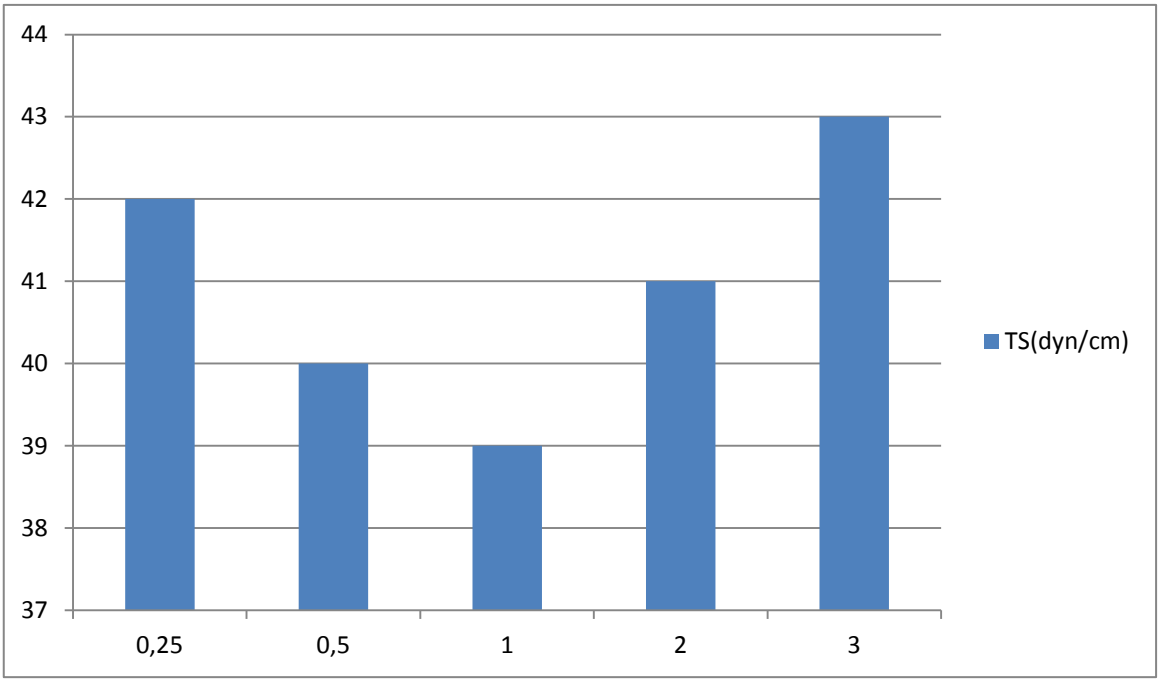


Figure 7: Influence de la concentration du mazot brute(%) sur la TS pour la souche 7A

III.3. Récupération et caractérisation du bio surfactant produit par la souche thermophile 7A.

Les conditions de production sont :

- Milieu de culture : milieu minimum (MM),
- Source de carbone : diesel (0,5%, v/v),
- Température d'incubation est fixée à 45 °C,
- Temps d'incubation est de 48h,
- pH = 7,0,
- Agitation est de 200 tr/min.

III.3.1. Extraction du bio surfactant

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

Le bio surfactant obtenu par la souche 7A en présence de gasoil (0,5%) comme source de carbone a été soumis à l'extraction par l'acétate d'éthyle. Le rendement obtenu est de 1,2 g/l.

III.3.2 Caractérisation du bio surfactant

III.3.2.1. Analyse par FTIR

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

- Les bandes situées à 3545,59, 3468,55 et 3415,60 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons O-H dans les alcools.

- Les bande située à 2953,13 et 2858, 40 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons -C-H dans les alcanes ($-CH_3$ et $-CH_2-$).

- Le pic d'élongation situé à 1261,70 cm^{-1} est affecté aux liaisons de C-O dans les alcools.

- Une bande intense située à 1627,16 cm^{-1} résulte probablement des vibrations d'élongation des liaisons C=C dans alcènes ou des liaisons C=O dans les acides carboxyliques.

- Les deux pics situés à 1458,58 et 1387,14 cm^{-1} résultent de vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcanes et

- Les deux bandes 1096,23 et 1024,83 cm^{-1} sont probablement dues aux vibrations déformation des liaisons C-O dans les alcools secondaires C-O-C dans les éthers.

- Le pic situé à 804,73 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcènes (C=C).

D'àprès ces observations, le bio surfactant de la souche 7A est probablement de nature glycolipidique (combinaison entre les glucides et chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatiques). Cependant, d'autres types d'analyses sont nécessaires pour une identification plus détaillée, telles que les analyses biochimique (identification des lipides, glucides et protéines) et LC-MS (détermination de la masse moléculaire du produit et des masses des fragments (ions)).

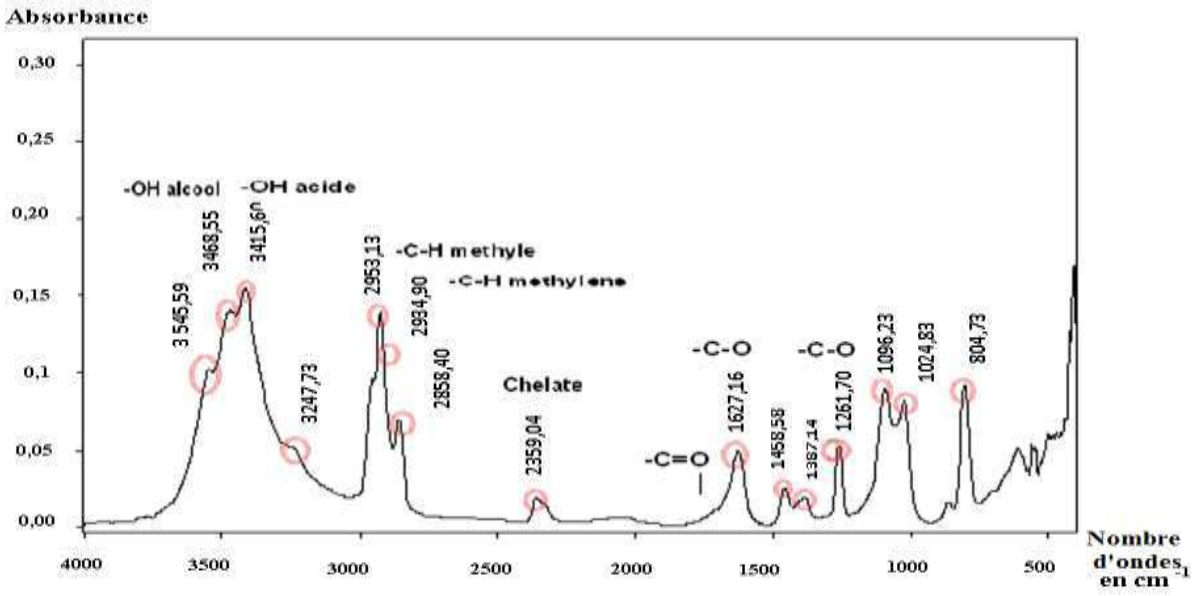


Figure 8 : Spectre FTIR du bio surfactant produit par la souche 7A

III.3.2.2. Etude de la stabilité du bio surfactant :

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

III.3.2.2.1. Effet du pH :

Selon les résultats obtenus (figure 12), le bio surfactant montre une grande stabilité aux changements de pH de 2 à 12. A titre d'exemple les valeurs de la tension de surfaces aux pH : 2, 6 et 12, sont 38, 39 et 42 mN/m respectivement, donc il représente un grand intérêt pour son application dans les milieux acido-basiques.

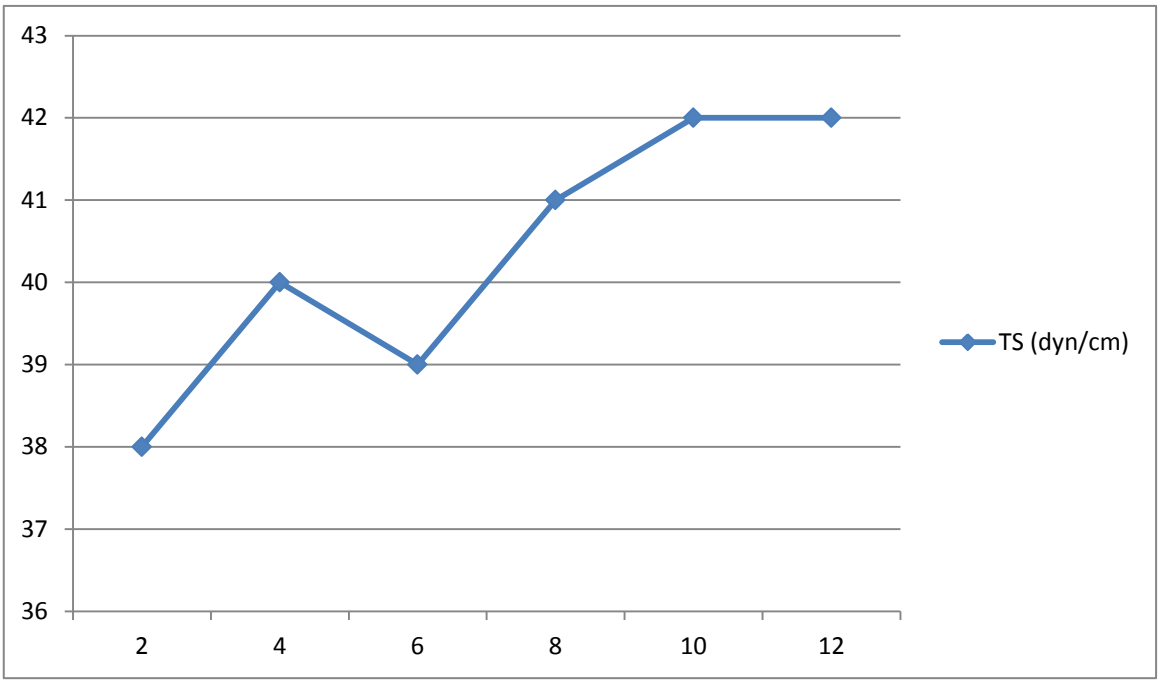


Figure 9 : Influence de la variation du pH sur la stabilité du bio surfactant de 7A

III.3.2.2.2. Effet de la salinité :

Le bio surfactant de la souche 7A montre une stabilité remarquable dans les milieux salés dont la salinité allant jusqu'à 100 g/l. Au delà, une légère augmentation de la TS a été observée. Cependant, la différence entre les valeurs de la tension de surface ne dépasse pas les 6 mN/m dans la gamme de la salinité étudiée. La tension superficielle minimale enregistrée était de 37 mN/m comme le montre la figure 13.

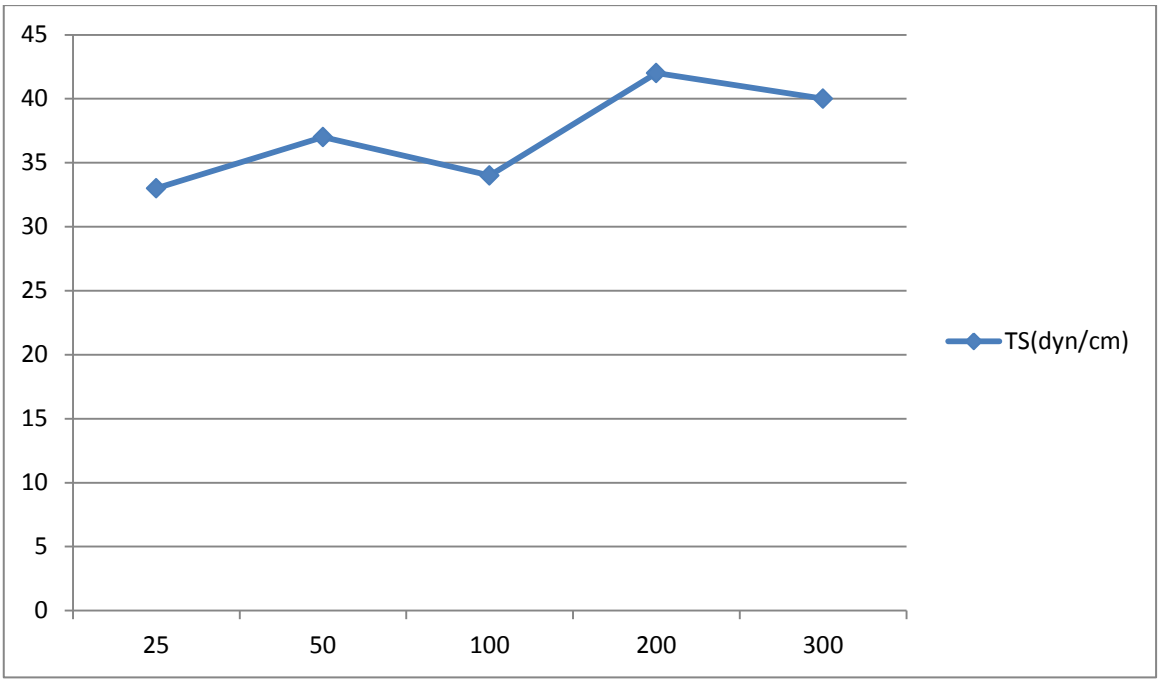


Figure 10 : Influence de la variation de la salinité NACL (mg/l) sur la stabilité

Du bio surfactant de 7A.

III.3. 2.2.3. Effet de la température :

Selon les résultats présentés dans la figure 14, nous avons observé que le bio surfactant présente une excellente stabilité dans la gamme de température variant de 20 à 45 °C. Dans cette gamme, la TS reste presque constante (aux alentours de 39 mN/m) au delà de 45 C on voit une légère augmentation. Notons que les eaux froides (4 °C) augmentent la TS de la solution en bio surfactant de 7A jusqu'à 43 mN/m. Cependant, à cette valeur de TS et d'après la littérature le bio surfactant est considéré moyennement efficace. Donc, on peut dire que ce bio surfactant maintient ses propriétés tensioactives dans la gamme de température de 20 à 100 °C .Les résultats obtenus par Brown (1999) indiquent que l'exposition de bio surfactant, produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique de bio surfactant. D'autre part, [22] ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de bio surfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C. Egalement, [23] ont trouvé que le bio surfactant issu de la Nocardiopsis sp. B4 a montré une résistance aux températures élevées (jusqu'à 100 °C).

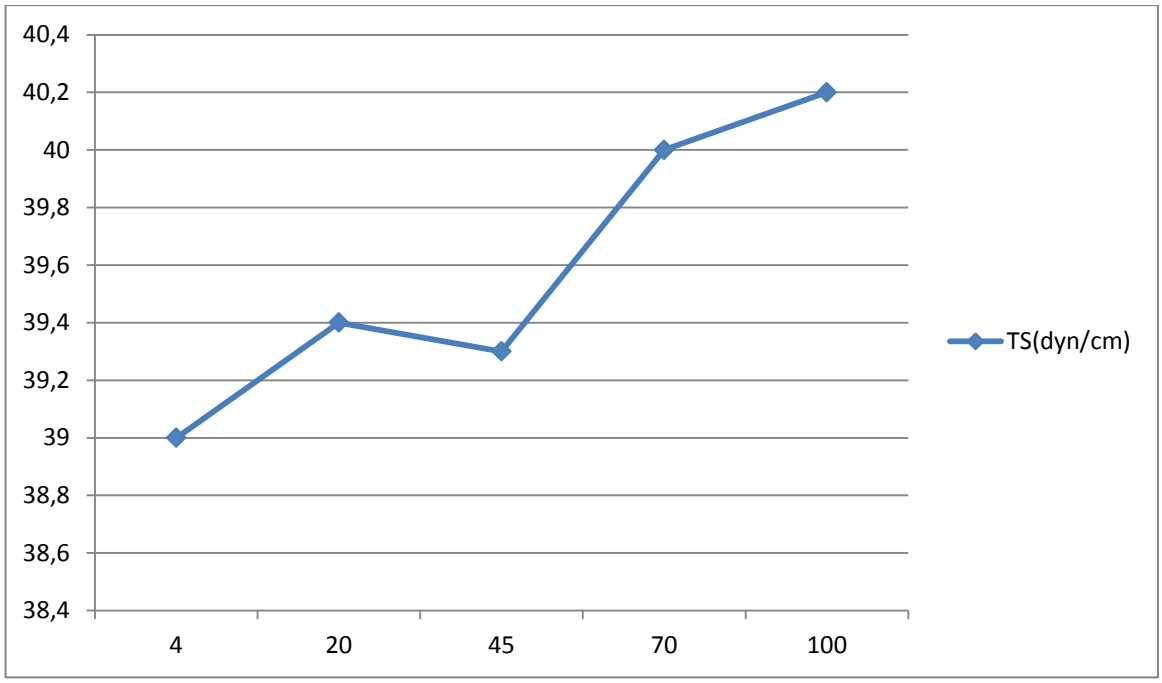


Figure 11 : Influence de la variation de la température sur la stabilité du bio surfactant.

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

III.4. Identification de la souche bactérienne 7A:

III.4.1. Caractères macromorphologiques :

Les caractères macroscopiques de la souche 7A sont regroupés dans le tableau 3.

Tableau 2 : Caractères macroscopiques de la colonie isolée à partir de la souche 7A Sur le gélose nutritive

Souche / Critères	7A
Diamètre	2 mm
Chromogènes	Blanc jaunâtre
Forme	Circulaire
Elévation	Bombée
Contour	Régulier
Surface	Granulaire Crémeuse
Consistance	

II.4.2. Caractères micro morphologiques

D'après nos observations, il ressort que la bactérie isolée de la souche **7A** est mobile et à GRAM positif, sa forme est de coccobacille. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractères microscopiques de la

Critères / Souche	Après Coloration de GRAM		
	Forme	**Gram**	**Mobilité**
NIJ	Coccobacilles	Positif	Mobile

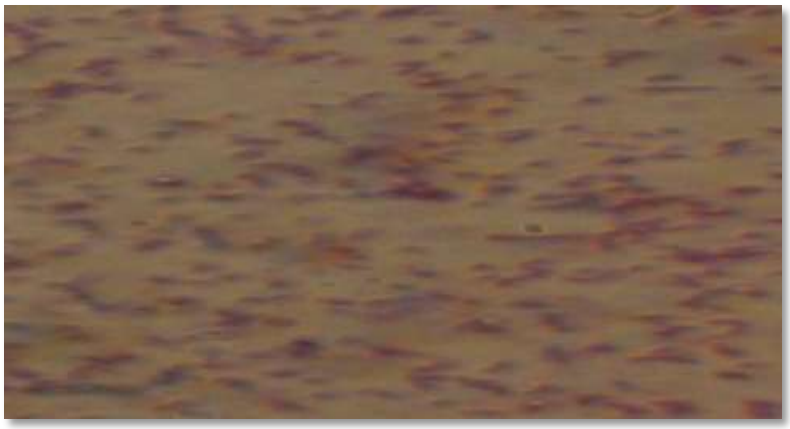


Figure 12 : Aspect microscopique de la souche 7A (microscope optique, ×100)

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram.

III.4.3. L'indice d'émulsification (E_{24})

L'émulsification est basée sur la tension superficielle (inter faciale). Elle est estimée pratiquement par l'indice d'émulsification E24 , ou on met des volumes égaux de super nattant et du kérosène (4 ml) dans un tube à essai, est en mélange avec un vortex a une vitesse maximale pendant 2 min .

L'indice (E_{24}) est calculer après 24 heures en divisant la longueur de la couche émulsionnée par tout la longueur du mélange est en multiplions par 100.

Le calcul de l'indice (E_{24}) est donné par la relation suivante :

$$E_{24} = E / E' * 100$$

Avec E : la longueur de la couche émulsionnée

E' : longueur total du mélange

Source de Carbonne%	Gasoil	huile de moteur	mazot	huile d'olive	Kérosène	Pétrole
E_{24}(%)	30.21	54.54	43.4	47.6	54.54	42.01

Tableau 4 : Influence de la source d'azote sur l'E24

On voit bien que pour le kérosène et l'huile d'olive indice d'émulsification est supérieur à 50%.

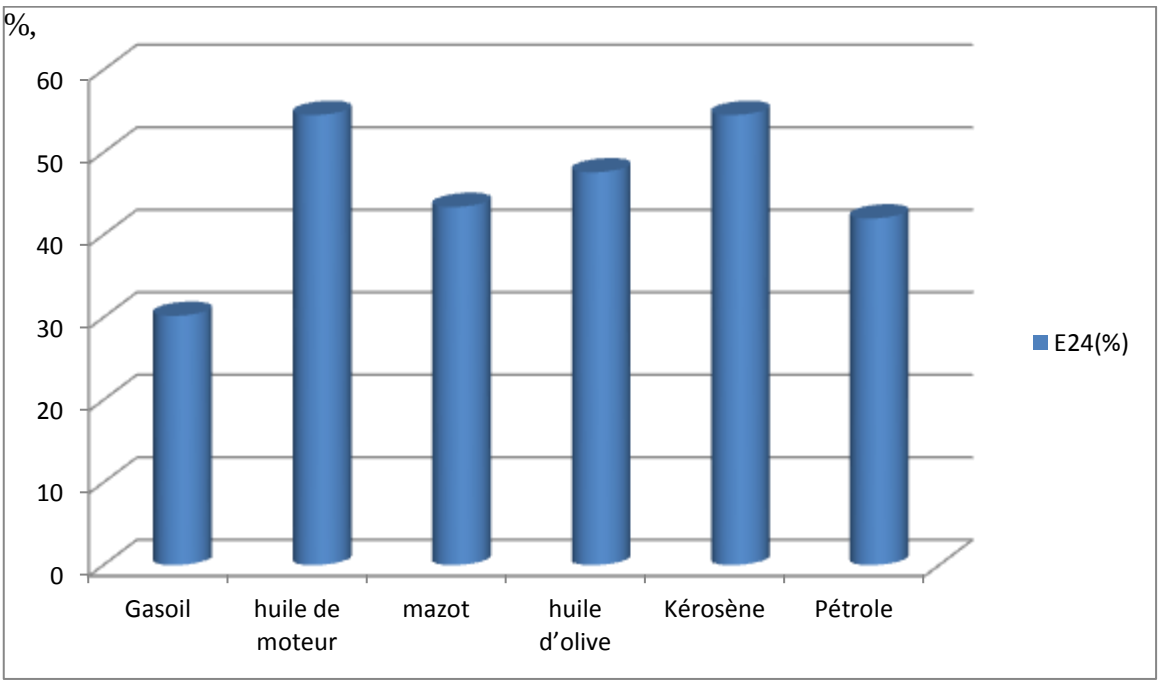


Figure 13 : influence de la source de Carbonne(%) sur l'E24

Conclusion générale

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

Parmi les sept souches testées, trois souches (K2N, NIJ et 7A) ont montré une capacité productrice de bio surfactant remarquable traduit par la faible valeur de la tension superficielle. Le pétrole (1%, v/v) présente la bonne source de carbone pour la souche NIJ (29 mN/m). Tandis que, le gasoil (0,5 %) donne une bonne production de bio surfactant en présence de la souche K2N (25 mN/m) et pur la souche 7A on a trouve que le pétrole brut et l'héxa-décane présentent de bonne sources de carbone avec des tentions de surfaces de (32mN/m) et(40 mN/m) . Par voie de conséquence, ces souches ont été choisie comme performante.

Les résultats obtenus sur les caractéristiques physicochimiques et structurales de bio surfactant issu de la souche thermophile 7A ont montré que : le bio surfactant détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [20 à 100 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 100 mg/l).

Finalement, l'identification phénotypique (Api 50 CH) de la souche performante montre que la souche bactérienne thermophile 7A est affilée à l'espèce *Bacillus licheniform*is.

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

- Etudier d'autres caractéristiques de bio surfactant issu de la souche thermophile 7A comme l'activité antimicrobienne et la détermination de la concentration micellaire critique (CMC),
- Utiliser d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et LC-MS) pour caractériser structuralement le bio surfactant,
- Application de ce bio surfactant dans la préparation des formes galéniques à usage pharmaceutique.

- Identification de la souche performante 7A par les outils de la biologie moléculaire.

Conclusion générale

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

Parmi les sept souches testées, trois souches (K2N , NIJ et 7A) ont montré une capacité productrice de bio surfactant remarquable traduit par la faible valeur de la tension superficielle. Le pétrole (1%, v/v) présente la bonne source de carbone pour la souche NIJ (29 mN/m). Tandis que, le gasoil (0,5 %) donne une bonne production de bio surfactant en présence de la souche K2N (25 mN/m) et pur la souche 7A on a trouve que le pétrole brut et l'héxa-décane présentent de bonne sources de carbone avec des tentions de surfaces de (32mN/m) et(40 mN/m) . Par voie de conséquence, ces souches ont été choisie comme performante.

Les résultats obtenus sur les caractéristiques physicochimiques et structurales de bio surfactant issu de la souche thermophile 7A ont montré que : le bio surfactant détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [20 à 100 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 100 mg/l).

Finalement, l'identification phénotypique (Api 50 CH) de la souche performante montre que la souche bactérienne thermophile 7A est affilée à l'espèce *Bacillus licheniform*is.

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

- Etudier d'autres caractéristiques de bio surfactant issu de la souche thermophile 7A comme l'activité antimicrobienne et la détermination de la concentration micellaire critique (CMC),
- Utiliser d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et LC-MS) pour caractériser structuralement le bio surfactant,
- Application de ce bio surfactant dans la préparation des formes galéniques à usage pharmaceutique.
- Identification de la souche performante 7A par les outils de la biologie moléculaire.

Conclusion générale

[1]Aperçu sur les bios tensioactifs et les bios solvants Note de synthèse (03 octobre 2012) Jean-Luc WERTZ Document ValBiom – Gembloux Agro-Bio Tech

[2] Van OS, N.M, HAAK, J.R, RUPERT, LA.M, Physico-chemical properties of selected anionic,cationic and noanionic surfactants ED Elsevier 1993

[3] Belaroui F, thèse : Distribution d'espèces de faibles masses moléculaires hydrosolubles et tensioactives dans les films de latex acrylique, Mulhouse, 2002

[4] Désorption forcée de tensioactifs à l'interface polymére-eau,Maryline clausel,2006

[5] ANONYM. Loi canadienne sur la protection de l'environnement, rapport d'évaluation .hydrocarbures aromatiques polycycliques

[6] ADEME, Tensioactifs et oléagineux, Etude sur les matières premières oléagineuses disponibles Sur le marché européen, 2001

[7]Etude sur les matières premières oléagineuses disponible sur le marché européen, 2001

[8] Chahrazed Ghezouali : Interactions des poly électrolytes complexes tensioactifs, 2010

[9]M. ROCHER, Segmentation des utilisations des agro-surfactants et de leurs marchés potentiels, ADEME/BIO Intelligence Service/Aria Consult

[10] VAN DYKE MI LEEH et TREVORS JT, 1991, Application of microbial surfactants biotechnol

[11] Letizia Fracchia,Massimo Cavallo,Biosurfactants and Biomemulsifiers Biomedical

[12]L. GUERIN-DEREMAUX, Dietary fibres and polyols, International Symposium on "Carbohydrates for Healthy Future: Lifestyle to product Development", Roquette, 2012

[13] Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des bio surfactants Mémoire Présenté par: Melle GUERGOURI Ibtissem
En vue de l'obtention de diplôme de Magistère en Microbiologie Option : Ecologie MicrobienneUniversité Mentouri de Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biochimie-Microbiologie

[14] Isolement et identification de moisissures productrices de protéases à partir de milieux extrêmes. Extraction et étude des propriétés de la protéase produite **:*Dendouga Wassila 2006***

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

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

[27]Abouseouda, M , R. Maachib, A. Amranec, S. Bouderguaa and A. Nabia, (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens.* Desalination, 223: 143-151.

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

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

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