

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de MÉDÉA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutiques

Thème

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE CERTAINS MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE BIOSURFACTANTS

Présenté par :
Hadjer Kihli

Proposé et Dirigé par :
B. Abed
N. Moulai Mostefa

Année universitaire 2011– 2012

Remerciements

En Premier lieu, Je remercie **ALLAH,** le Tout Puissant pour m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Fermentation au niveau du Complexe Antibiotical de Médéa sous la direction de *Monsieur Abed Belkacemi.* Je tiens à le remercier vivement pour m'avoir facilité le travail et pour m'avoir initié aux techniques utilisées en microbiologie malgré ces diverses occupations. J'ai beaucoup apprécié ses qualités scientifiques et humaines.

Je remercie également tout le personnel de Saidal Médéa, en particulier *Mr. Derga Khaled, Mr. Ghraba Mohamed, Mr. Slimani Rachid*, et *Mr Khalfi Mourad.*

Je remercie infiniment *Monsieur Moulai Mostefa Nadji*, Professeur à l'université de Médéa pour avoir assuré la co-direction de ce mémoire, pour ces conseils précieux le long de mon travail de mémoire. Je ne saurais trop le remercier pour l'intérêt qu'il a accordé à ce travail et pour les longues heures de discussion qu'il m'a réservé avec une patience inégale.

Je remercie également tous les membres de jury qui ont bien voulu examiner ce modeste travail. Je suis certaine de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leur esprit critique constructif pour m'aider, par leurs commentaires et leurs discussions, à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail de recherche.

Un remerciement spécial aux *Mm.Kerrach* et *Mm Zouanbia* et membres de la sale d'internet M2 de la bibliothèque des sciences et techniques; *Mr. Bettache Toufik* et *Mm. Zenati Sabrina* pour sa compétence, ses encouragements et ses précieux conseils durant le déroulement de ce travail.

Il est difficile, dans un petit espace, de remercier toutes les personnes qui ont eu une influence sur ma vie de tous les jours pendant la durée de réalisation de mon mémoire de fin d'études. Ces personnes se reconnaitront facilement et sauront combien ma tendresse et mon amitié sont grandes pour eux.

Ce travail n'aurait jamais pu se réaliser sans le soutien continu de ma famille et sans leur éducation basée sur des valeurs morales fondées sur le respect des autres et du travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mon cher papa qui a su se montrer patient, compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A mon frère Mohamed et sa femme Imen qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.

A mes frères Youcef et Idris et ma petite sœur Meriem

A ma tente Bahia et sa fille Lamia

A mes petits neveux Serine et Fahd

A ma famille, grande et petite

A mes chères copines

Djamila, Souria, Besma, Hadjer et Amina

À tous mes amies et mes collègues, pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

À tous ceux qui me connaissent, et surtout qui m'aiment.

Hadjer

Tables des matières

Introduction générale……1

Chapitre I : Etude bibliographique

I-1-Généralité……..……..…..3

I-1-1-Définition de biosurfactant……...…3

I-1-2-Organismes producteurs des biosurfactants…….4

I-1-3- Classification des biosurfactants et leurs origines microbiennes……..……...4

I-1-3-1- Les glycolipides…….……...…….....…..…..……5

I-1-3-2 -Les lipopeptides et des lipoprotéines……...……5

I-1-3-3-Les acides gras, les phospholipides, les lipides neuters……..……5

I-1-3-4- Les polymériques……...……5

I-2-Production des biosurfactants……..……..……7

I-2-1-Facteurs affectant la production des biosurfactants……..……...…….……8

I-2-1-1- Source de carbone…….……...…….……...8

I-2-1-2- Source d'azote…….……...……...…….....8

I-2-1-3- Sels minéraux et oligoéléments……..……...……..9

I-2-1-4-Facteurs physicochimiques…….....….....9

I-2-2-Mécanismes de production des biosurfactants ……..……...……...….10

I-3- Séparation des biosurfactants ……..……11

I-3-1-Extraction …….…….…….11

I-3-2-Précipitation …….……...…12

I-3-3-Fractionnement de la mousse ……..….12

I-3-4-Ultrafiltration…..……..……12

I-3-5-Adsorption …….…….……13

I-4- Caractéristiques physicochimiques des biosurfactants…….……...……..13

I-4-1-Pouvoir mouillant ……..…….…13

I-4-2-Pouvoir moussant……..……...……..…….……13

I-4-3-Pouvoir émulsifiant …….……..……..13

I-4-4-Pouvoir antimicrobien …….……...……..…..13

I-4-5-Pouvoir détergent …….…….....……14

I-4-6-Concentration micellaire critique (CMC) …….…….……14

I-4-7-Balance lipophile hydrophile (HLB).....15

I-4-8-Structure des surfactants et paramètres influençant leur micellisation …….……..15

I-5- Intérêts des biosurfactants ……...……16

I-6- Applications des biosurfactants ……..…17

I-6-1- Industrie pétrolière …….……..……..18

I-6-2-Biodégradation des contaminants d'hydrocarbures ……..……...……..…...19

I-6-3-Industrie alimentaire ……..……..…….…….….20

I-6-4-Industrie cosmétique et pharmaceutique ……..……...…….…….....20

I-6-5-Industrie d'agriculture ……....……..…..21

I-7-Microorganismes producteurs……...…….……..21

I-7-1-Les bactéries …….……....…21

a-Les Pseudomonas.....21

b-Bacillus 22

c-Nocardia 23

d-Rhodococcus.....23

I-7-2-les levures (candida).....23

I-8-Conclusion.....24

Chapitre II: Matériels et Méthodes

II-1-Objectif.....26

II-2-Matériels.....26

II-2-1- Matériel biologique.....26

II-2-2-Instruments et appareillage.....27

II-2-3-Verreries.....27

II-3-Les Méthodes 27

II.3-1-Prélèvement des échantillons.....27

II-3-2-Isolement des souches.....28

II-3-3-Identification.....29

a. Coloration de gram.....29

b. Etude physiologique.....30

II-4-Caractérisation des souches identifies.....32

II-4-1-La biomasse.....32

II-4-2- pH……..……..……...……..…….....33

II-4-3- Tension superficielle(γ)……...……...……..…….……....…..33

II-4-4-Indice d'émulsification (E24)……..…....……...……..33

II.5.Production du biosurfactant……..……..34

II.5.1.Préparation de l'inoculum……..…….34

II.5.2.Milieux de production ……34

II.5.3.Extraction des biosurfactants ……34

II-6-Caractérisation du Biosurfactant…….……..…….34

II-6-1-Caractérisation structural …….……. ……..……...…..34

a-Test de Rhamnose…….……..….34

b- Spectre Infra-rouge…….……...…….……..35

II-6-2-Caractérisation fonctionnelle……...…….....35

a-Pouvoir moussant …….……..…35

b-Pouvoir émulsifiant……..……...…….35

II-6-3- Caractérisation Physico-chimique…….…….…….……..…35

a-Stabilité thermique……..……..…..35

b-Stabilité chimique : Effet du pH……..….36

Chapitre III : Résultats et discussions

III-1- Isolement et identification des souches…….……...…..**37**

III-1-1-Coloration de gram……..……..37

III-2-2-Etude physiologique……...……..…..37

III.1.3. Caractérisation physicochimique……..40

III-3-Caractérisation du Biosurfactant……..….42

III-3-1-Caractérisation structural…….……...…….…….42

a. teste de Rhamnose……...…..……42

b. Spectre Infra-rouge……42

II-3-2-Caractérisation fonctionnelle……49

a. Pouvoir moussant……...……...49

b. Pouvoir émulsifiant……...…….…...49

II-3-3-Caractérisation Physico-Chimique……..…….....51

a. Stabilité thermique……...…….....51

b. Stabilité chimique : Effet du pH……...…….55

Conclusion Général ……...……...…59

Références Bibliographiques

Annexe

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

CAB : Cétrimide Agar

CMC : Concentration micellaire critique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

DDT : Di-chlorodiphenyltrichloroethane

E_{24} : Index d'émulsification

HLB : Balance hydrophile-lipophile

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

MCA : Mac Conkey Agar

MEOR : Récupération assistée du pétrole par voie bactérienne

PCA : Plate Count Agar

RAG-1: Gène activant la recombinaison

mg/l : milli gramme par litre

mN/m : milli newton par mètre

rpm : Tours par minute

Liste des figures

Figure I.1: Représentation schématique d'une micelle de surfactant……14

Figure I.2. : Structures de micelles à partir des molécules tensioactive……..……..16

Figure II.1 Représentation des étapes de filtration sur membrane et résultat après incubation …..28

Figure II.2. Présentation de la galerie API®20 E avant incubation (originale)…….....30

Figure II.3. Technique d'incubation de la galerie……..……...31

Figure II.4: Mesure de E_{24} …….…..…….……...33

Figure III.1: presentation de la galerie apré incubation pour la souche *Pseudomonas Spp1*…...37

Figure III.2: presentation de la galerie apré incubation pour la souche *Pseudomonas Spp2*…….38

Figure III.3: présentation de la galerie apré incubation pour la souche *Flavobactérieum*…..…...39

Figure III.4 : Présentation de la galerie après incubation pour la souche *serratia liquefaciens*….39

Figure III.5: Test Rhamnose…….……...…….42

Figure III.6: Spectres infrarouges des biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa*……..44

Figure III.7: Spectres infrarouges des biosurfactants produit par *Bcillus Subtils*…….....….45

Figure III.8: Spectres infrarouges des biosurfactants produit par *Pseudomonas Spp*…….46

Figure III.9: Spectres infrarouges des biosurfactants produit par *Flavobacterium*...……47

Figure III.10: Spectres infrarouges des biosurfactants produit par *Serratia liquefaciens*…….…...48

FigureIII.11: Pouvoir moussant du biosurfactant…...….……..……..….49

Figure III.12: Les variations de la tension superficielle γ en fonction de la température des biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis* …….52

Figure III.13: Les variations de la tension superficielle γ en fonction de la température des biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefacien*…..…52

Figure III.14 : Les variations de l'indice d'émulsification E 24 en fonction de la température des biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis*…..…53

Figure III.15 : Les variations de l'indice d'émulsification E 24 en fonction de la température des biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens*.....….53

Figure III.16: Les variations de la tension superficielle en fonction de pH des biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis* ……..……56

Figure III.17: Les variations de la tension superficielle en fonction de pH des biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens* ……56

Figure III.18 : Les variations de l'indice d'émulsification E 24en fonction de pH des biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis* ……...……..57

Figure III.19 : Les variations de l'indice d'émulsification E 24en fonction de pH des biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens* ……..…..57

Liste des tableaux

Tableau I.1: Structures et origines de quelque biosurfactants……..…..……6

Tableau I.2: Relations entre HLB et les propriétés fonctionnelles ……..……....15

Tableau I.3. Utilisations potentielles des biosurfactants ……..18

Tableau III.1 : coloration de gram de différentes souches isolées……..…….37

Tableau III.2. Les biomasses de différents microorganismes avant et après…….....…40

Tableau III.3: Le pH de différents microorganismes avant et après croissance……..……41

Tableau III.4 : La tension superficielle de différents microorganismes avant et après culture…...41

Tableau : III.5: groupements caractéristiques du biosurfactant……...……43

Tableau III.6 : l'indice d'émulsification de différentes souches……..…50

Tableau III.7: stabilité thermique du biosurfactant……..……51

Tableau III.8: Stabilité chimique du bisurfactant "Effet du pH"……...……..…….55

Résumé
L'objectif de cette étude est l'isolement, l'identification et la caractérisation de certains microorganismes producteurs de biosurfactants. L'étude est faite sur des prélèvements d'eau de process sur différents points du réseau de distribution d'une unité industrielle. Seules les souches ayant le pouvoir de production de biosurfactants ont été isolées identifiées en utilisant les techniques microbiologiques, par des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques (galerie de tubes). Parmi les souches existantes, trois ont été isolées : *Pseudomonas Spp* et *serratia liquifaciens, flavobacterium spp*. La meilleure production de biosurfactant été donné par la souche *flavobacterium spp,* sachant que la valeur de tension superficielle obtenue à partir de cette dernière est de 36.1 Nm/m et la valeur de l'indice d'émulsification est de 52.38 %.

Mots clés : Biosurfactant, *Pseudomonas Spp, Serratia liquifaciens, Flavobacterium spp,* Tension superficielle, Indice d'émulsification.

الملخص
الهدف من هذه الدراسة هو عزل، وتحديد وتوصيف الكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاج المفاعل السطحي الحيوي.
وأجريت الدراسة على عينات من المياه في نقاط مختلفة من شبكة التوزيع . تم عزل وتحديد السلالات القادرة على إنتاج المفاعل السطحي الحيوي باستخدام التقنيات الميكروبيولوجية، بواسطة الاختبار المورفولوجية والفسيولوجية والبيوكيميائية من بين السلالات الموجودة، تم عزل ثلاثة : *Pseudomonas Spp* et *serratia liquifaciens, flavobacterium*
افضل انتاج اعطي من *flavobacterium spp, مع العلم ان قيمة التوتر السطحى التى تم الحصول* عليها من هذا الأخير هى 36.1 ملي نيوتن/متر وقيمة مؤشر الاستحلاب هي 52.38 بالمئ

الكلمات الدالة : المفاعل السطحي الحيوي , *Pseudomona Spp, Flavobacterium Spp* *serratia liquefaciens*, *التوتر السطحي* , مؤشر الاستحلاب

Abstrat
The objective of this study was the isolation, identification and characterization of some microorganisms producing biosurfactants. The study was conducted on samples of process water at different points of the distribution of industrial plant. Only strains with the ability to produce biosurfactants were isolated identified using microbiological techniques, for testing the morphological, physiological and biochemical (gallery tubes). Among the existing strains, three types were isolated: *Pseudomonas and Serratia spp liquifaciens, flavobacterium spp*. The best production of biosurfactant was given by the strain of flavobacterium spp, knowing that the surface tension value obtained from the latter is 36.1 mN/m and the value of the emulsification index is about 52.38%.

Keywords: Biosurfactant, *Pseudomonas spp, Serratia liquifaciens, Flavobacterium spp,* Surface tension, Emulsification index

Introduction Générale

Depuis plusieurs décennies déjà, les industries de peinture et des détergents ont élaboré une réponse en développement des produits actifs appelées surfactants.

Les surfactants sont des molécules qui possèdent une partie hydrophile, qui peut-être non-ionique (oxydes, éthoxylates), cationique (sels d'ammoniums), anionique (sulfonâtes ou sulfates), amphotère et une partie hydrophobe, en général une chaine carbonée.

De nombreuses industries, pétrolière, chimique, cosmétique, agroalimentaire utilisent des surfactants pour maîtriser les phénomènes d'émulsion, de dispersion, d'adhérence ou de viscosité, de leurs produits.

Les surfactants synthétique actuellement utilisés risquent cependant de poser autant de problèmes environnementaux qu'ils n'en résolvent. Pour la plupart dérivée du pétrole, ces molécules sont on général toxiques et extrêmement persistant dans les milieux naturels, car non biodégradables. En outre, leur efficacité diminue dans des conditions physiques extrêmes de température, de pH et/ou de salinité.

Au cours des années 80, des chercheurs se sont intéressés à des molécules d'origine microbienne possèdent ce caractère amphiphile. Ces composés microbiens qui possèdent de telles propriétés sont dénommés « Biosurfactant ». Ces derniers ont des caractéristiques environnementales intéressantes comparés aux agents tensioactifs chimiquement et qui ont des caractéristiques techniques et une stabilité élevées dans les conditions extrêmes d'utilisation. Ils gardent dans ces conditions une sélectivité plus élevée, un pouvoir émulsifiant et des propriétés tensioactives assez stables. Les biosurfactants ont deux propriétés essentielles : l'adsorption aux interfaces, responsable de dispersion et du mouillage, favorisés par la diminution de la tension superficielle et l'auto agrégation ou micellisation qui gouverne les propriétés de solubilisation et de microémulsification. Le pouvoir émulsifiant d'un biosurfactant et l'une des caractéristiques très importantes, ce pouvoir aura comme conséquence une diminution de la tension superficielle.

L'industrie des tensioactifs est à la recherche de nouvelle molécules possédants des caractéristiques fonctionnelles bien précises et répondants aux exigences, de plus en plus strictes en termes de qualité environnementale

Les biosurfactants incluent un grand nombre de structures chimiques, comme les glycolipides, les lipopeptides, des complexes polysaccharide-protéines, les phospholipides et les acides gras.

Les bactéries les plus utilisées sont des *Rhodococus, Nocardia, Pseudomonas, Serratia, Bacillus* et *Corynebacterium.*

On s'est intéressé dans ce présent travail à la production de biosurfactants à partir de souches provenant des eaux contaminées. Il faut en effet souligner que les bactéries produisant les biosurfactants, sont en général issues des eaux contaminées par des molécules hydrophobes.

La source de carbone utilisé pour la croissance peut être des hydrocarbures ou des carbohydrates. Le choix de la source de carbone joue un rôle important sur le rendement et la structure du biosurfactant. Certains microorganismes se développent uniquement sur des hydrocarbures, d'autre exigent un milieu contenant des sucres et des acides aminés.

Pour répondre à ces préoccupations, on a axé nos recherches dans ce projet de recherche sur l'isolement de certains microorganismes ayant un pouvoir producteur de biosurfactant. Cinq souches ont été sélectionnées et comparées du point de vue propriétés microbiologiques et physico-chimiques. A partir de ces souches, on a produit des biosurfactants qui ont été comparés du point de vue structural et physico-chimique, surtout les propriétés d'amphiphile.

Pour ce faire, on a subdivisé le présent travail en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une recherche bibliographique où sont exposées en premier lieu, les différentes classes de biosurfactants, leurs propriétés et caractérisation ainsi que leurs applications dans les différents domaines industriels. En second lieu, les microorganismes ayants le pouvoir de production et leurs mécanismes de biosynthèse ont été également décrits.

Le second chapitre est réservé à la description de la partie pratique à travers les différentes manipulations et protocoles de travail avec le matériel disponibles et utilisé pour 'isolement et l'identification des bactéries susceptibles de produire des biosurfactants ainsi qu'à la production de biosurfactant.

Le troisième chapitre a été consacré à la présentation et à la discussion des résultats.

Pour terminer, on a donné une conclusion et des perspectives pour la poursuite de ce projet.

I-1-Généralités

Les tensioactifs, ou "surfactants" ("surface active agent") sont des molécules capables de réduire les tensions interfaciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide [1, 2]. Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants ou dispersants.

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 3 millions de tonnes par année [3]. La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [4], C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants. Ces produits, appelés tensioactifs biologiques ou biosurfactants, possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces, dans le cas de micro-organismes extrémophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes [3].

I-1-1-Définitions de biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains micro-organismes. Leur nature tout comme leur pouvoir tensioactif est fortement dépendant du type de micro-organisme utilisé (bactéries, levures, champignons), de la souche testée ainsi que du substrat nutritif disponible pour le développement cellulaire. Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve aujourd'hui des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides [5].

Les biosurfactants sont encore défini comme des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di); le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés [6].

Les biosurfactants sont également caractérisés par leur capacité à réduire la tension superficielle ou la tension interfaciale entre phases fluides non miscibles et forment des micelles et des micelles inverses à des concentrations micellaires critiques.

I-1-2-Organismes producteurs des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs source de carbone comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces organismes sont généralement des bactéries, des levures, des champignons. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [4].

Le rôle physiologique d'un biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat rendant ce dernier plus facilement accessible. En outre, le biosurfactant offre aux bactéries la résistance physique et la protection contre les concentrations élevées d'hydrocarbures [7].

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes. Elles sont, donc, isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir le milieu de culture adéquat contenant la meilleure source de carbone afin d'obtenir un taux de production maximum [4].

Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées [4].

I-1-3-Classification des biosurfactants et leurs origines microbiennes

Contrairement aux tensioactifs issue de la synthèse chimique, qui sont généralement classés en fonction de la nature de leur groupement polaire, les biosurfactants sont classés principalement par rapport à leur composition chimique et leur origine microbienne [8].

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue quatres grandes classes de biosurfactants: les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipids, les liposaccharides et les lipides [9].

I-1-3-1-Les glycolipides

Les Biosurfactants les plus connus sont les glycolipides. Ce sont les hydrates de carbone en combinaison avec les acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides

hydroxyaliphatiques [4]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides [10].

I-1-3-2-Les lipopeptides et des lipoprotéines

Parmi les différentes catégories de biosurfactants, lipopeptides sont particulièrement intéressants en raison de leurs activités de surface élevées et le potentiel antibiotique. Les lipopeptides peuvent agir comme des antibiotiques, des antiviraux et antitumoraux, immunomodulateurs ou des toxines spécifiques et les inhibiteurs de l'enzyme. Cet aspect apparaît indispensable, en association avec les propriétés antifongiques de lipopeptides impliqués dans la lutte biologique contre les maladies des plantes. Morikawa et al.[11] ont identifié et caractérisé un biosurfactant, arthrofactin, produit par les espèces Arthrobacter, qui a été trouvé sept fois plus efficace que la surfactine.

I-1-3-3-Les acides gras, les phospholipides, les lipides neutres

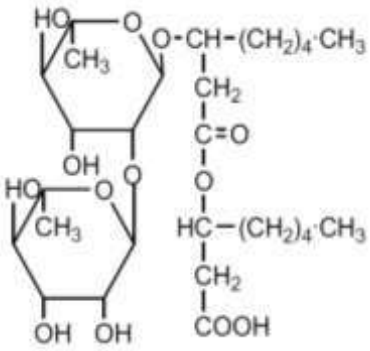
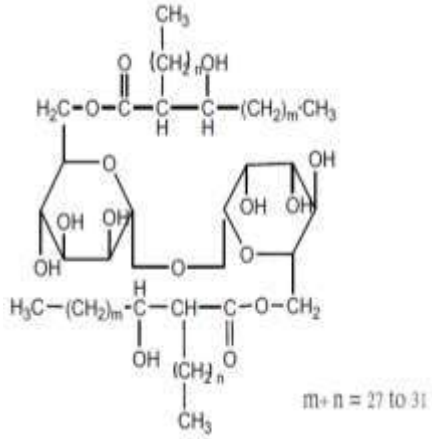
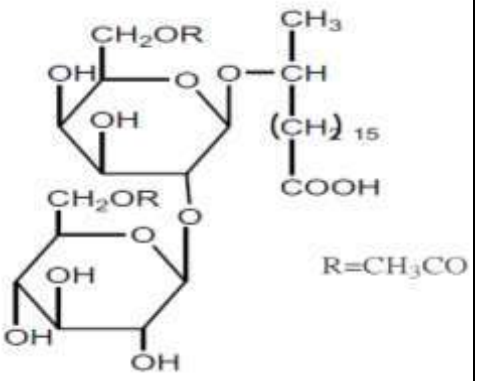
Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de tensioactifs phospholipidiques pendant la croissance sur n-alcanes**.** L'équilibre hydrophile et lipophile (HLB) est directement lié à la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans leur structure [8].

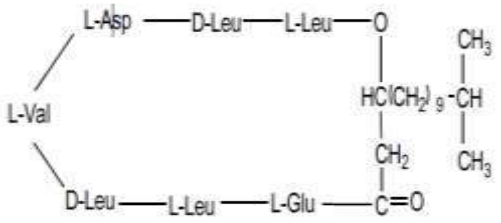
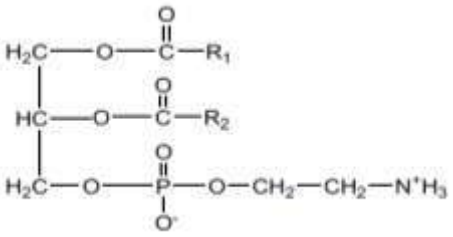
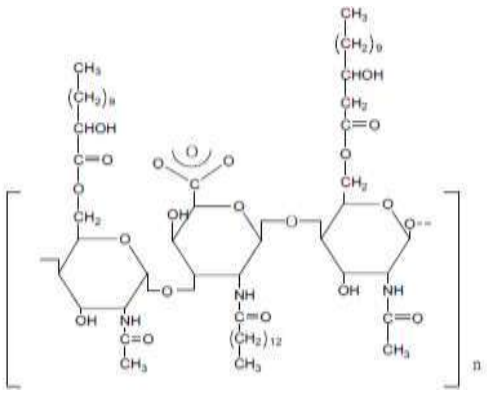
I-1-3-4-Les polymériques

Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont : émulsan, liposan, alasan, lipomanan et d'autres polysaccharides comme les protéines. Ainsi, l'acinetobacter calcoaceticus RAG-1 produit des extracellulaires puissants amphipathics polyanioniques hétéropolysaccharide bioemulsifier [8]. Ils sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras ; ils possèdent une masse moléculaire élevée [4].

Le tableau I.1 regroupe les origines et les propriétés de quelques biosurfactants.

Tableau I.1 : Structures et origines de quelque biosurfactants [6]

Groupe	biosurfactant	Microorganisme	Structure
Glycolipide	Rhamnolipide	Pseudomonas aeruginosa	
	Tréalolipides	Rhodoccous sp, Nocardia Mycobacterium	
	Sophorolipide	Torulopsis bombicola	

Lipopeptide et lipoprotéine	Surfactine	Bacillus Subtilis	
Phospholipide	Phospholipide	Corynebacterium	
Acide gras	Acide gras	Corynebacterium lepus	
Lipide neutre	Lipide neutre	Clostridium pastriamum	
Polymérique	Emulsan	Acinetobacter Calcoaceticus	

I-2-Production des biosurfactants

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, certains auteurs [12] indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées…). Une étude réalisée [13] montre qu'il est possible

de produire des rhamnolipides avec une concentration de 1,4 $g.L^{-1}$ pour des Pseudomonas cultivées sur des sous-produits industriels.

Les biosurfactants doivent concurrencer les agents tensioactifs chimiquement synthétisées sur les aspects suivants : coùt, fonctionnalité et capacité de production pour satisfaire les besoins d'applications prévues.

I-2-1-Facteurs affectant la production des biosurfactants

Le type et la quantité de biosurfactant produit varient avec la composition du milieu (source de carbone, d'azote et les concentrations de la composition des oligoéléments) ainsi que les conditions de culture (pH, température, agitation,…).

I-2-1-1- Source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres qui influt le plus sur la production des biotensioactifs, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite.

La revue bibliographique a montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides, cependant les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive [6].

Les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *pseudomonas aeruginosa* [14].

Desai et Banat [6] indiquent qu'un ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de D-glucose pendant la phase de croissance stationnaire provoque une augmentation de rendement.

I-2-1-2- Sources d'azote

De nombreuses études [6] ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices [15].

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant [4].

I-2-1-3- Sels minéraux et oligoéléments

Les sels minéraux influencent fortement la production des biosurfactants. Wei et Chu [6] ont montré que la production de surfactine par *Bacillus subtilis* ATCC21332 a été augmentée quand la concentration du fer dans le milieu de culture à été élevée de 4µM aux quelques mM.

Cependant, Guerra-santos et al. [16] ont démontré que la limitation des concentrations des sels de magnésium, calcium, potassium, sodium et des oligo-éléments donne une surproduction de rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*.

I-2-1-4-Facteurs physicochimiques

i) pH

Arino et al. [4] indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6.0 et 6.05. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactant chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynbacteroides* ne sont pas affectées par des pH variant de 6.5 à 8.0 [6]. Ishigami et al [4] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisent différemment. Par exemple, à un pH de 5.5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées.

ii)- Température

Yakimove et al. [17] indiquent que la gamme optimale de température est de 35°C à 45°C pour la production de biosurfactant par *Bacillus lichenformis*. Cependant dans d'autres travaux, on a montré que la température n'avait aucun effet sur la croissance et production du biotensionactif par *Bacillus strearothermophilus* VR-8 [6].

iii) Agitation et taux d'oxygène

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactants. Pour les bactéries, une augmentation de vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de

cisaillement et donc un rendement moindre, l'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures [4].

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur la croissance et sur l'activité cellulaire; il a été montré que le transfert d'oxygène est l'un des facteurs importants influençant la production de surfactine par *Bacillus* [6].

I-2-2-Mécanismes de production des biosurfactants

Quatre mécanismes de production peuvent être envisagés, et qui sont :

- *Production associée à la croissance*

La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel glycosyl catalysé par des transferts rhmnosyl spécifiques [4]. Le biodispersan produit par *Bacillus* LAF-343 suit encore cette cinétique [12].

- *Production dans des conditions de croissance limitées*

Ce mécanisme est caractérisé par une surproduction en raison de la limitation d'un ou plusieurs composants du milieu de culture tel que l'azote pour les rhamnolipides [18].

Guerra- Santos et al. [16] indiquaient qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* DSM2659.

- *Production avec l'addition de précurseurs*

Des recherches ont montré que l'addition des précurseurs au milieu de culture résulte à des changements quantitatifs et qualitatifs du biosurfactant produit. Ainsi, l'addition des trisaccharides dans le milieu contenant l'espèce *Nocardia corynebacter* a augmenté la production avec un rendement de 120 à 150 g/l, de même pour les espèces : *Nocardia sp, Brévibacter* et *Arthrobacter paraffineus* DSM2567 avec l'ajout de mono-, di-, ou trisaccharides au milieu de croissance [14].

- *Production des cellules immobilisées*

L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes fixées sur un support poreux dans un système de fermentation et d'obtenir ainsi des hautes densités de biomasse. Cette technique comporte plusieurs avantages, parmi lesquels une productivité élevée de la fermentation et une rétention des cellules, même avec des dilutions. De plus, une réutilisation est possible des cellules ainsi qu'une protection contre les forces de cisaillement et une stabilité biologique élevée lors de la fermentation en continu. Ainsi, il est possible que les systèmes avec des cellules immobilisées soient moins susceptibles aux attaques des bactériophages et à la contamination microbienne [19].

Plusieurs techniques d'immobilisation ont été développées. Toutes ces techniques imitent ce qui se passe dans la nature, où les cellules des micro-organismes croissent presque toujours dans un biofilm, associées entre elles et avec des surfaces [19].

Afin d'immobilisation des cellules, on peut les attacher à des surfaces de différents supports, les inclure dans des matrices poreuses tels que l'alginate de calcium et carraguenan, les retenir derrières ou les faire floculer [20].

I-3- Séparation des biosurfactants

La séparation du biosurfactant du milieu de culture est l'une des étapes les plus importante dans la valorisation du coût de production et qui peut atteindre jusqu'au 60 % du coût total de production [6].

La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (extracellulaires, intracellulaires ou liés aux cellules) [12].

Les techniques les plus utilisés sont :

I-3-1-Extraction

Pour extraire le biotensioactif du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de passer par une séparation des bactéries de ce milieu de culture (exemple: filtration).

Les techniques d'extraction les plus largement utilisées sont des extractions avec des solvants ou des mélanges de solvants organiques tels que le chloroforme-méthanol, le

dichloromé-thane-méthanol, le butanol, l'acétate éthylique, l'hexane, l'acide acétique, et l'éther [12].

I-3-2-Précipitation

La précipitation acide directe ou après séparation des cellules productrices est également utilisée pour la récupération du biosurfactant.

Makkar et Cameotra [12] ont séparé la surfactine produite par *Bacillus subtilis* par HCl jusqu'à pH égal à 2. Le biodispersan produit par *Acinétobacter calcoaceticus* est encore séparé par précipitation au sulfate d'ammonium [6].

Par ailleurs, il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le biotensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/ méthanol) comme l'on fait parra et al. [4]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du biosurfactant. Par la suite de cette précipitation, une étape de centrifugation puis un lavage sont nécessaire pour la récupération et la purification du produit désiré.

I-3-3-Fractionnement de la mousse

Cette technique est utilise pour la séparation de la surfactine en acidifiant la mousse rassemblée jusqu'à pH égale à 2 avec du HCl concentré puis la surfactine précipitée est extraite par le dichlorométhane [6].

I-3-4-Ultrafiltration

Le biosurfactant produit par *Acinétobacter* S7 a été extrait du milieu de culture après 24 heures de culture suite à une combinaison de technique incluant un traitement par l'hexane, une précipitation par l'acétone et une ultrafiltration [20]. Ainsi, une membrane XM-50 dont le seuil de retention est de 5kDa a été utilisée sur une surfactine pure à 97 % et un taux de récupération de 98 % a été obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de retention plus élevé (10kDa) fournit un rendement de récupération de 92 % [22].

I-3-5-Adsorption

Il existe des techniques de récupération en continu, impliquant les phénomènes d'adsorption sur l'Amberlite XAD-2 suivie de la purification et la lyophilisation donnant des rendements varient de 60 à 90 % en pureté [6].

I-4- Caractéristiques physicochimiques des biosurfactants

I-4-1-Pouvoir mouillant

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. Ce pouvoir mouillant participe à la mise en suspension de particules solides dans un liquide dans lequel elles sont insolubles [23].

I-4-2-Pouvoir moussant

La mousse est définie comme un ensemble de cellules gazeuses séparées par des lames minces de liquide.

La formation de mousse, dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide, nécessite la présence d'agents tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air [23].

I-4-3-Pouvoir émulsifiant

Un émulsifiant facilite la formation d'une émulsion entre deux liquides non miscibles (par exemple de l'eau et de l'huile). Dans une émulsion, le premier liquide (appelé phase discontinue) est dispersé dans le second liquide (appelé phase continue) sous forme de petites gouttelettes. Le rôle du tensioactif est de diminuer la tension de surface entre les deux phases liquides, en formant un film autour des gouttelettes dispersées [23].

I-4-4-Pouvoir antimicrobien

Les biosurfactants montrent un pouvoir antimicrobien qui peut être dû aux interactions avec les membranes lipidiques des cellules.

L'activité antimicrobienne d'un biosurfactant sur une souche bactérienne peut être évaluée par une donnée mesurable que l'on appelle « concentration minimale inhibitrice » (CMI) qui représente la concentration minimale en biosurfactant suffisante à inhiber la croissance de l'espèce microbienne, dans des conditions expérimentales bien précises [24].

I-4-5-Pouvoir détergent

La détersion est définie comme le déplacement à l'aide d'une solution aqueuse de toute sorte de contamination graisseuse rencontrée, généralement sur les surfaces solides [25].

I-4-6-Concentration micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [4].

En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau **(Figure I.1)**

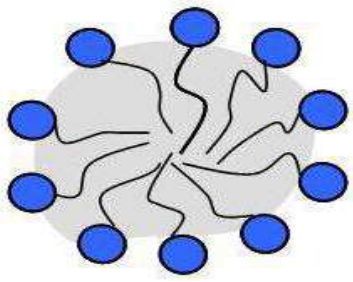


Figure I.1 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN.m-1 en solution aqueuse). Pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques : leur

efficacité est donc meilleure. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 $mg.L^{-1}$ [4].

I-4-7-Balance lipophile hydrophile (HLB)

Le HLB est calculé en mesurant de différentes façons l'importance relative des groupements hydrophiles et hydrophobes (ou lipophiles) de la molécule. Le HLB représente une échelle arbitraire (de 1, très peu soluble à 20, très soluble) de la solubilité d'un composé dans l'eau. Peterson [26] indique que les composés dont le HLB se situe entre 8 et 14 sont les plus efficaces en ce qui concerne la détergence puisqu'ils sont relativement solubles dans l'eau tout en possédant un caractère lipophile important, favorable à l'émulsification. Kaler [27] souligne que le HLB est déterminé à une température donnée et qu'il peut varier de façon importante lorsque les conditions changent, particulièrement pour les tensioactifs non ioniques (cas du nettoyage à haute température par exemple). Les valeurs de HLB ci-dessous sont présentées en regard des fonctions principales associées aux tensioactifs caractérisés par ces valeurs dans le tableau I.2

Tableau I.2 : Relations entre HLB et les propriétés fonctionnelles [25]

HLB	**Propriétés**
1.5 - 3	Anti moussant
3 - 6	Emulsifiant (l'eau dans l'huile)
7 - 9	Moussant
8 - 13	Emulsifiant (l'huile dans l'eau)
13 - 15	Détergent
15 – 20	solubilisant

I-4-8-Structure des surfactants et paramètres influençant leur micellisation

Les micelles de surfactants s'arrangent en différentes micro-structures sphériques, globulaires ou cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bi-couches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées.

Le volume intérieur des micelles dépend de la forme des micelles et du nombre d'agrégation (nombre de monomères constituant la micelle). Généralement, il faut de 50 à 100 monomères pour former une micelle [4].

Les différentes structures de micelles sont représentées sur la figure I.2.

				
Micelles sphériques	Micelles cylindriques	Bicouches planes	Bicouches sphériques	Bicouches sphériques inverses

Figure I.2. : Structures de micelles à partir des molécules tensioactives

I-5- Intérêts des biosurfactants

Les biosurfactants sont d'un intérêt croissant pour un usage commercial à cause du spectre sans cesse croissant de substances disponibles. Il ya de nombreux avantages de biosurfactants par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement.

Un bon agent tensioactif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale eau/hexadécane à 40 mN/m [14]. Ainsi, le Surfactine de *B. subtilis* peut réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN/m et la tension interfaciale eau/hexadécane à <1 mN/m [32]. Les Rhamnolipides de *P.aeruginosa* peuvent diminuer la tension superficielle de l'eau à 26 mN/m et la tension interfaciale eau/hexadécane à <1 mN/m [33]. En général, les biosurfactants les plus efficaces et les plus efficients sont les agents dont leur CMC est environ 10-40 fois inférieur à celle des tensioactifs chimiques.

Les propriétés des tensioactifs sont dues à leur structure amphiphile. Cette structure leur confère une affinité particulière pour les interfaces de type huile/eau et eau/huile et donc, par là même, leur donne la capacité d'abaisser l'énergie libre de ces interfaces. Ce phénomène est à la base de la stabilisation de systèmes dispersés [23].

En tant qu'agents émulsifiants ou stabilisants, on peut détailler leur action en trois points:

- ils facilitent la formation de gouttes en diminuant cette tension de surface, car l'énergie nécessaire à leur formation est directement proportionnelle à la tension de surface. Ils permettent également d'empêcher la recombinaison immédiate de gouttes nouvellement créées via l'effet Marangoni, ce qui rend possible l'émulsification.
- ils stabilisent les gouttes formées en diminuant le gradient de pression au niveau de l'interface
- ils stabilisent les gouttes vis-à-vis de l'agrégation, en apportant des répulsions électrostatiques ou stériques entre les gouttes [23]

Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais, ils sont avantageux vu leurs :

- Biodégradabilité élevée : les biosurfactants sont biodégradables à pas moins de 99.96% et ne génèrent aucun résidu nocif, alors que les tensioactifs laissent toujours 4 à 5 % de résidus nocifs dans l'eau et le sol.

- Toxicité basse : les biosurfactants se sont avérés 10 fois moins toxiques pour les puces d'eau et les algues que les tensioactifs chimiquement synthétisés.

- Stabilité élevée dans le cas des micro-organismes extrémophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes [27].

- Large gamme de caractéristiques structurales grâce aux modifications génétiques.

- Effet antimicrobien sur divers microbes.

- Production sur des substrats renouvelables.

I-6- Applications des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes. C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines (industrie : pétrolière, pharmaceutique, alimentaire, ...) comme il est indiqué dans le le Tableau I.3.

Tableau I.3. Utilisations potentielles des biosurfactants [4]

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures
Solubilisant et microémulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie
Agent moussant	Cosmétiques, articles de toilette
Agent épaississant	Peintures
Dé-émulsifiant	Traitement de déchets
Agent réducteur de viscosité	Transport par pipeline
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole

I-6-1- Industrie pétrolière

Les biosurfactants sont principalement utilisées dans l'industrie pétrochimique. Ils ont un usage capital dans les opérations de nettoyage des réservoirs de stockage, la mobilisation du pétrole et l'extraction du pétrole adsorbé sur les roches (Microbial Enhanced Oil Recovery, MEOR) [13].

Banat et al. [3] ont testé à l'echelle pilote la capacité des biosurfactants à nettoyer un réservoir et récupérer les hydrocarbures dans la boue émulsifiée. Ils ont utilisé deux tonnes de culture de *pseudomonas* contenant des rhamnolipides pour traiter (850 m3) de boue. Ils ont pu récupérer environ 94 % de cette dernière sous forme de pétrole brut valorisable, le reste étant formé de matériaux divers ne contenant pas d'hydrocarbures, et qui peut être évacué manuellement.

Les biosurfactants servent encore à la mobilisation du pétrole brut lourd et son transport dans les les pipelines en diminuant sa viscosité [28].

Le caratère de stabilité des biosurfactants dans les conditions extrêmes de température, pH et salinité leur confère le pouvoir d'intervenir dans les procédés d'extraction dans les champs de pétrole dans le désert [13].

I-6-2-Biodégradation des contaminants d'hydrocarbures

La revue bibliographique a montré que les tensioactifs biologiques avaient un fort potentiel pour remédier des sols pollués par les hydrocarbures.

Ce type de traitement est encore peu utilisé sur le terrain et nécessite d'être optimisé.

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques issues de la combustion incomplète de matières carbonées, et représentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et mutagènes [4].

Le traitement assisté par les biosurfactants présente de nombreux avantages. West et Harwell [4] indiquent que les tensioactifs cationiques se sorbent fortement aux sols. Or, les molécules d'origine biologique ont le plus souvent un caractère non ionique ou anionique qui les rend moins sensibles à la sorption sur les sols. De plus, ils ont des CMC moindres que leur homologues chimiques, ce qui les rend efficaces à de plus faibles concentrations.

En outre, le caractère peu toxique et biodégradable des biotensioactifs facilite leur utilisation.

De nombreuses expériences montrent que les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* augmentent la mobilité et donc facilitent l'extraction du pyrène absorbé sur des soles pollués [4].

Les biosurfactants produits par *Flavobacter sp* et les rhomnolipides de *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ont le pouvoir d'augmenter la solubilité apparente du naphtalène de 32 à plus de 500 mg/l [4].

Une étude réalisée par Bai et al. [29] Avec un biosurfactant a montré que la solubilité de l'hexadécane était favorisée par l'ajout de cations (Na+ ou Mg2+). En effet, ces ions permettent de réduire les répulsions électrostatiques entre les portions hydrophiles du biotensioactif anionique, permettant ainsi d'augmenter le volume interne des micelles et donc le nombre de monomères de surfactant dans les micelles.

Bai et al [29] ont également fait varier le pH de la solution : la diminution d'une unité de pH (7 à 6) permet d'éliminer 13 % d'hexadécane supplémentaire.

Eliseev et al [30] ont montré que la capacité de biosurfactant produit par Bacillus sp à une concentration de 0.04 g/l de libérer à partir d'un sable contaminé.

Des souches microbiennes telles que *Sphyngomonas pansimobilis* et *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 sont choisies comme biosurfactants pour le bioremédiation des sols contaminés par des produits chimiques nocifs pour la santé comme le di-chlorodiphenyltrichloroethane (DDT), l'héxachlorocyclohexane (HCH) (inseticide chloré) et le paranitrophénol (pesticide nitromatique),…. [31].

Afin de valider l'efficacité des tensioactifs d'origine biologique, il est nécessaire de comparer les rendements obtenus à ceux de leurs homologues chimiques.

I-6-3-Industrie alimentaire

La lécithine et ses dérivés sont actuellement utilisés dans les industries alimentaires à travers le monde entier [6].

Ils réduisent la viscosité du chocolat pour faciliter son étalement et ralentissent la séparation de phases et la cristallisation du sucre.

Dans les crèmes glacées, les biosurfactants stabilisent l'émulsion, limitant la cohésion des matières grasses lors de la congélation. Ils améliorent le caractère onctueux du produit.

Ils améliorent l'émulsion dans les laits concentrés et les boissons lactées.

Ces molécules sont très efficaces en tant qu'émulsifiant dans les margarines, les émulsions de types eau dans huile, même si le contenu en matières grasses est limité. Ils sont également utilisables dans les émulsions de types huile dans l'eau [31].

Le bioémulsifiant produit par *Candida utilis* a montré une efficacité lors de son utilisation dans les sauces de salade [6].

I-6-4-Industrie cosmétique et pharmaceutique

Les produits de beauté et les industries de santé emploient une grande quantité d'agents tensioactifs pour une grande variété de produits. Ceux-ci sont employés comme émulsifiants, moussants, agents solubilisants, agents mouillants et décapants.

Divers produits exigent les agents tensioactifs dans leurs formulations tels que : les crèmes, les pates dentifrices, les produits de soin d'ongle et les garnitures d'acné. Les biosurfactants, et grâce à leur effet antimicrobien, représentent un remplaçant intéressant des

surfactants synthétiques surtout qu'ils sont plus biodégradables et moins toxiques. Par exemple, des tests de toxicité (oculaires et dermiques) réalisés par Haba et al. [33].

I-6-5-Industrie d'agriculture

L'activité antibiotique du *Bacillus subtilus* BS 107 a été démontrée in vitro et in vivo contre *Erwinia carotovora subsp, atroseptica* et *Erwinia carotovora subsp, carotovora,* les agents responsables de la jambe noire de la pomme de terre et de la pourriture molle des tubercules. L'application d'un antagoniste ou de l'antibiotique sur des coupes de pomme de terre a empêché ou diminué les symptômes des malades. L'antibiotique était actif in vitro contre un large spectre d'espèces de champignons et de bactéries [34].

Ainsi, stanghellini et ses collègues [28] ont montré l'efficacité de quelques agents tensioactifs synthétiques dans le contrôle de la dégradation des racines de concombres et de poivres causée par *Pythium aphanidermatum* et *Phytophthora capsici*. Dans une de leurs expériences, ils ont montré l'activité antibiotique des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*

I-7-Microorganismes producteurs

Parmi les microorganismes producteurs de biosurfactants, on trouve une grande variété.

I-7-1-Les bactéries

1. Les Pseudomonas

Les *Pseudomonas* forment un large groupe colonisant le sol, les plantes et l'eau. Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobes obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le NO_3 comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elle ont un métabolisme mésophile et chimioorganothorphe, la plupart étant saprophytes [35]**.** Quelques espèces comme *P. syringae* , sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa* , reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique [36]**.** Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescens* , ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars[35]**.**

Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces* . On les retrouve sous tous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes. Les différentes espèces de *Pseudomonas* qui colonisent la rhizosphère possèdent plusieurs charactéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Premièrement, leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable[37] **.**Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exudats racinaires [38]. De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques[39,40].

2. Bacillus

Les Bacillus sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires.

La résistance des spores, constitue un problème majeur en médecine et l'épidémiologie de certains infections repose sur la sporulation. Dans le domaine industriel (industries agro-alimentaires, industries du médicament, production de matériel stérile à usage unique) se surajoutent au phénomène de résistance les problèmes posés par l'adhésion des spores. En effet, certaines espèces de *Bacillus* produisent des spores dont la surface est hydrophobe ce qui leur permet d'adhérer fortement à divers matériaux et de résister aux procédés de nettoyage. C'est le cas notamment des spores de Bacillus cereus qui s'attachent très bien aux surfaces en acier inoxydable et qui posent de graves problèmes dans les industries alimentaires. Les structures impliquées dans l'adhésion sont encore imparfaitement connues. Dans le cas de Bacillus cereus on implique la présence de filaments semblables à des pili, pour d'autres espèces telles que Bacillus licheniformis on fait jouer un rôle à des appendices très fins formant une sorte de feutrage autour de la spore [41].

3. Nocardia

Le genre Nocardia est classé dans la famille des Nocardiaceae (sous-ordre des Corynebacterineae, ordre des Actinomycetales, sous-classe des Actinobacteridae, classe des Actinobacteria, division ou phylum des "Actinobacteria", domaine ou empire des "Bacteria").

La systématique du genre est complexe (voir Nocardia in List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) et ce genre s'enrichit régulièrement de nouvelles espèces.

Les *Nocardia* spp sont essentiellement présentes dans l'environnement : plantes, sol, eau, air et poussières. Il est également possible de les isoler de la peau, de la région oropharyngée et du tractus digestif de l'homme et des animaux.

Les infections sont souvent d'origine pulmonaire et peuvent conduire à des infections systémiques ou à localisations secondaires après dissémination de la bactérie dans l'organisme. Moins fréquemment, on observe des infections localisées à la peau ou aux tissus sous-cutanés résultant d'un traumatisme local ou d'une infection des plaies par le sol.

4. Rhodococcus

Rhodococcus est un genre d'aérobie, non sporulante, non motiles bactéries Gram-positives étroitement liés à *Mycobactéries* et *corynébactéries*. Même si quelques espèces sont pathogènes, la plupart sont bénignes et ont été trouvés à prospérer dans un large éventail d'environnements, y compris le sol, l'eau et les cellules eucaryotes. Entièrement séquencé en Octobre 2006, le génome est connu sont de 9,7 megabasepairs de long et 67% G/C.

Les souches de *Rhodococcus* sont dus applicably important de leur capacité à cataboliser une large gamme de composés bioactifs et produire des stéroïdes, l'acrylamide, l'acide acrylique, et leur implication dans biodésulfuration combustibles fossiles. Cette diversité génétique et catabolique n'est pas seulement en raison de la grand chromosome bactérien, mais aussi à la présence de trois grands plasmides linéaires. *Rhodococcus* est aussi une raison expérimentalement système avantageux pour un taux de croissance relativement rapide et simple cycle de développement. Cependant, dans son état actuel, *Rhodococcus* n'est pas bien caractérisée [43].

I-7-2-les levures (candida)

Candida est un genre de levures (dont la plus importante espèce est Candida albicans) qui est répandu dans tout le monde habité et forme normalement un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, sur la peau, dans le système digestif et dans la flore vaginale. Il devient pathologique et provoque parfois des mycoses (candidiase ou candidose) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli.

Au laboratoire médical, la culture en boîte de Pétri des *Candida* donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème. C'est un champignon unicellulaire qui se trouve dans le tube digestif et dans la bouche de la plupart des humains. Il ne provoque cependant aucune pathologie chez les individus ayant un système immunitaire normal. Il peut se trouver sous plusieurs formes : levure, pseudohyphe ou hyphe.

Les espèces de *Candida* peuvent provoquer des infections assez bénignes, comme le muguet buccal chez l'enfant ou la candidose vulvo-vaginale chez la femme. Chez les patients dont le système immunitaire est affaibli, par exemple les patients recevant une chimiothérapie contre le cancer ou les patients atteint par le SIDA, les *Candida* peuvent provoquer des infections plus graves, comme des septicémies ou des candidoses digestives.

Dans l'immense majorité des cas pathologiques, c'est *Candida albicans* qui est en cause, mais sont également importants : *Candida pseudotropicalis*, cosmopolite comme le premier, *Candida tropicalis* plus fréquemment à l'origine des candidoses des zones intertropicales chaudes et humides, *Candida parapsilosis* et *Candida guillermondii*[44].

I.8. Conclusion

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains micro-organismes. Leur nature tout comme leur pouvoir tensioactif est fortement dépendants du type de micro-organisme utilisé (bactéries, levures, champignons), de la souche testée ainsi que du substrat nutritif disponible pour le développement cellulaire. Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve aujourd'hui des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides. Tout comme leurs homologues de synthèse chimique, ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes, mais également des propriétés plus spécifiques. Certaines de ces propriétés peuvent, de plus, être conservées dans des

conditions extrêmes d'utilisation telles que pH acides, températures élevées, etc. Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, ils sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie ou encore la cosmétologie et devraient rapidement trouver leur place dans de nouveaux secteurs d'applications tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques.

II.1.Objectifs

L'objectif principal de ce travail est l'isolement, l'identification et la caractérisation de certains microorganismes producteurs de biosurfactants.

L'étude est faite sur des prélèvements de l'eau de process à différents points du réseau de traitement, distribution et d'alimentation des différentes unités de fabrication de produits pharmaceutiques de l'usine Antibiotical de Médéa.

Seules les souches présumées productrices de biosurfactants ont été retenues après l'isolement et l'identification en utilisant les techniques microbiologiques.

La capacité et les conditions de production de biosurfactant par ces souches a été déterminé à travers des essais physico-chimiques à savoir, le taux de la biomasse sèche, le pH, la mesure de la tension superficielle et l'indice d'émulsification. Ces tests ont été suivis d'une étude de caractérisation du produit obtenu après extraction à partir des cultures en batch par des tests de Rhamnose, l'identification par infrarouge, la stabilité thermique et chimique.

II.2.Matériels

II.2.1.Matériel biologique

Deux souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Bacillus Subtilis* ATCC 6633 sont utilisées comme souches de référence.

Ces souches ont été conservées sur des tubes à essais contenant de l'agar nutritif à 4°C et réactivées chaque mois pour constituer un stock de travail et les manipulations ultérieures.

Les milieux de cultures utilisées pour l'isolement et l'identification sont des milieux sélectifs selon les besoins et les exigences nutritives des souches à traiter.

II.2.2.Instruments et appareillage

On a utilisé le matériel suivant pour la conduite des expériences :

- Etuve
- Bec bunsen
- Autoclave
- Agitateur secoueur
- PH mètre
- Vortex
- Microscope optique
- Tensiomètre
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre UV-Visible Mini 1240 (Shimadzu)
- Balance
- Spectrophotomètre Infrarouge FT-IR System (Perkin Elmer, Spectrum BX)

On a utilisé également de la Verrerie classique (bécher, éprouvette, erlenmeyer, pipette gradué...), ainsi que les outilles usuels de base de microbiologie telles que l'anse et boite de pétri.

II.3. Méthodes

L'étude est réalisée sur des échantillons de l'eau de process prélevée selon un protocole usuel d'échantillonnage de l'eau, allant d'une qualité d'eau brute jusqu'à l'eau déminéralisée et/ou distillée. Il s'agit d'une eau utilisée dans une fabrication de produits pharmaceutiques qui doit répondre à certaines exigences normatives et réglementaires [45].

Il est bien connu que la qualité de l'eau a une grande influence sur le développement des différents microorganismes. Une eau male traité et présentant une charge de source nutritive peut être à l'origine d'une croissance bactérienne même les moins exigeantes tels que les *Pseudomonas* dont les conséquences sont néfastes sur les installations, les équipements ainsi que le produit fini.

- Une eau adoucie est une eau appauvrie en cations Ca^{2+} et Mg^{2+}.
- Une eau déminéralisée est une eau sans ions.
- Une eau distillée est une eau pure qui ne contient pas de substances dissoutes.

On s'est intéressé à l'eau déminéralisé et on a fait les tests en amont de l'osmose inverse et en aval.

II.3.1.Prélèvement des échantillons

Le protocole de prélèvement et de filtration des échantillons s'effectuent en plusieurs étapes :

❖ **Le prélèvement :**

- S'assurer que le matériel utilisé a été bien préparé (lavé, emballé et stérilisé) ;
- Avec une flamme, flamber la sortie de la vanne à son point de prélèvement et laisser couler les premières quantités d'eau sous cette flamme pour éviter toute contamination ;
- Effectuer le prélèvement d'une quantité suffisante pour analyse dans une fiole ou Erlenmeyer stérile;

❖ **Filtration:**

- Dans une salle propre, moyennant de la rompe et un dispositif à filtration avec le système ou la pompe à vide, sous une hotte à flux laminaire vertical, filtrer les échantillons d'eau à

travers des membranes filtrede type GSWP 0,22 µm, fractionner en trois parties à volumes différents selon le types germes recherché;

- Déposer avec une pince stérile la membrane sur la surface d'une plaque gélosée (milieu de croissance approprié pour l'isolement) comme suit [45]:

- Filtration de 100 ml du prélèvement, la membrane est déposée avec une pince stérile sur le milieu solide (boite pétri) PCA pour le dénombrement des germes totaux.
- Filtration de 100 ml du prélèvement, la membrane est déposée avec une pince stérile sur le milieu solide (boite pétri) MCA spécifique pour l'identification des entérobactéries.
- Filtration de 800 ml de prélèvement, la membrane est déposée avec une pince stérile sur le milieu solide (boite pétri) CAB spécifique pour la recherche des *Pseudomonas*.

Les trois boites contenant les milieux de cultures appropriés et les trois membranes sont portées en incubation pendant 48 heurs à 37°C pour le dénombrement des germes totaux et la recherche des *Pseudomonas* et à 44°C pour les entérobactéries (Figure II.1).



Filtration sur membrane Filtre avant incubation et développement Filtre après incubation et développement

Figure II.1 : Représentation des étapes de filtration sur membrane et résultats après incubation

II.3.2.Isolement des souches

Divers milieux sont utilisés afin de satisfaire les besoins nutritifs et énergétiques des bactéries à cultiver. En pratique, plusieurs milieux solides sont utilisés (gélosés) avec une technique particulière d'ensemencement permettant l'isolement de clones bactériens sous la forme de colonies.

Certaines bactéries peuvent avoir des difficultés à se développer sur une gélose. Pour cela il faut toujours associer un bouillon anaérobie à un milieu gélosé. Ce bouillon est repiqué sur des géloses sélectives.

II.3.3.Identification

L'identification est réalisée grâce à des techniques usuelles de microbiologie sur des souches isolées.

a. La coloration de gram

Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères:

- leur forme,
- Leur affinité pour les colorants.

Principe

- Les bactéries sont imprégnées par une première solution colorante, le violet de gentiane.
- Les bactéries sont fixées par un mordant (solution de Lugol : solution d'iode dans l'iodure de potassium).
- On fait ensuite agir un décolorant (alcool, le plus souvent).

Suivant la composition de leur paroi:

- Certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet. Elles sont dites Gram positif.
- D'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine, ou safranine, colorants rouges). Ces bactéries apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif.

Techniques de coloration

- Coloration par le violet de gentiane
  - Laisser la solution sur la lame pendant 1 minute.
  - Rincer à l'eau.
- Coloration par le Lugol
  - Laisser le Lugol pendant 1 minute.
  - Rincer à l'eau
- Décoloration par l'alcool
  - Laisser l'alcool pendant 30 secondes. Si la coloration reste violette, remettre de l'alcool pendant 30 secondes.
  - Rincer à l'eau.
- Recoloration par la fuchsine

- Laisser la fuchsine 10 à 20 secondes.
- Rincer et sécher.

b. Etude physiologique

L'étude physiologique porte sur des tests biochimiques de confirmation du genre et l'espèce.

- L'identification précise de la majorité des bactéries se fait désormais à l'aide de galeries biochimiques d'identification manuelles (galeries API®20 E) comme le montre la figure II.2.
- Ces galeries permettent de tester un grand nombre de réactions chimiques, c'est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autre bacilles à gram négatif comprenant les testes biochimiques miniaturisés.
- Elles comportent vingt micro-tubes contenant des substrats déshydratés.
- Les micro-tubes sont incubés avec une suspension bactérienne qui se dissout dans les substrats déshydraté.
- Les réactions produites pendants la période d'incubation se traduisent par des visages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.
- La lecture des réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique (Annexe II).



Figure II.2. Présentation de la galerie API®20 E avant incubation (originale)

- **Mode d'utilisation de la galerie API®20 E**

i)-Préparation des suspensions : A partir d'une culture pure de l'isolat, on prépare une suspension bactérienne homogène dans un tube stérile contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

ii)-Inoculation de la galerie : Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis appuyée à l'intérieur et sur le cote pour éviter la formation de bulle, en notons que:

- ❖ Pour les tests CIT, VP, GEL; les tubes doivent être remplis avec la suspension bactériennes
- ❖ Pour les testes ADH, LDC, ODC, H_2S et URE, les cupules doivent être remplis avec de l'huile de paraffine afin d'obtenir une anaérobiose (Annexe II).
- ❖ Incubé à 37°C pendant 24 heurs.

La figure II.3 résume les techniques d'incubation utilisées.



Remplir le tube et recouvrir d'huile de paraffine Remplir de suspensions le tube et la cupule

Figure II.3. Technique d'incubation de la galerie

iii)-Test d'oxydase

Le test d'oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabriquant. Le test est constitué de 21 tests d'identification.

- **Principe**

Sous l'action de l'oxydase du cytochrome C de la chaine respiratoire des bactéries aérobie strictes et des anaérobies facultatives, le diméthyle para phényline diamine (sous sa forme réduite, coloré en rose) est oxydée en dérivé coloré en violet en contact de l'air (O_2) due à la formation d'indole-phényle.

- **Technique**

  - Déposer le disque d'oxydase sur une lame et imbiber d'une goutte d'eau distillée avec une pipette Pasteur.
  - Déposer au dessus du disque une colonie de la souche à tester prélevée à partir d'une culture jeune de 24 h.

- **Lecture**

La présence de l'oxydase se manifeste par une coloration noir ou violette.

II.4.Caractérisation des souches identifiées

Différentes techniques ont été utilisées pour la caractérisation des souches identifiées à savoir :

II.4.1.La biomasse

La détermination de la biomasse a été réalisée par la méthode de spectrophotométrie UV-visible en mesurant la densité optique à une longueur d'onde 600 nm du milieu de culture. Une lecture a été faite sur des échantillons de culture en milieu liquide avant et après la croissance. La relation fondamentale utilisée en spectrophotométrie est présentée sous la forme

$$DO = C \varepsilon L \rightarrow C = DO / \varepsilon L$$

Rappeler la loi de Beer –Lambert et calculer la concentration de la biomasse, Où ε est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance (L mol^{-1} cm^{-1}), L=1cm est l'épaisseur de la cuve et C la concentration de la biomasse (mol/L).Sachant que le coefficient d'extinction molaire est $\varepsilon_\lambda = 2{,}2 \times 10^5$ L.mol^{-1}.m^{-1}. De $\lambda = 600$ nm.

II.4.1. pH

La mesure du pH a été réalisée sur le surnageant et les milieux de culture, avant et après croissance, à l'aide d'un pH- mètre.

II.4.3. Tension superficielle (γ)

La masure de tension superficielle a été réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine

Le bouillon de fermentation est centrifugé à 8000tr/min pendant 30 minutes, afin de séparer la biomasse. Le surnageant séparé est le liquide dont ont mesure la tension superficielle.

II.4.4. Indice d'émulsification (E_{24})

La stabilité de l'émulsion a été déterminée après 24 h. L'indice d'émulsion (E24) a été calculé, en mesurant la couche d'émulsion formée. Le résultat est exprimé comme du pourcentage de la couche d'émulsionnée.

On met des volumes égaux de surnageant et de gasoil (4ml) dans un tube à essai, et on mélange avec un vortex à une vitesse maximal pendant 2 min [46].

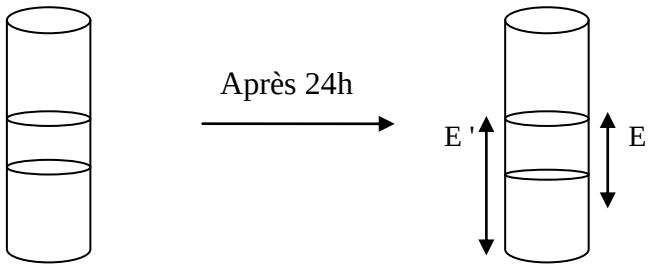


Figure II.4. Mesure de E_{24}

Le calcul de l'indice E_{24} est le rapport de le volume de l'émulsionnée sur le volume totale du mélange multiplié par 100:

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

Où E est le volume de la couche émulsionnée et E', le volume totale du mélange.

II.5.Production du biosurfactant

II.5.1.Préparation de l'inoculum

Dans un environnement stérile, et à partir d'une culture sur gélose nutritive on prélève une surface, au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un Erlenmeyer 250 ml de bouillon nutritif préalablement autoclavé (voir Annexe I).

II.5.2. Milieux de production

La production de biosurfactant s'effectue dans un Erlenmeyer contenant les milieux préalablement autoclavé (les compositions et conditions de culture sont dans l'annexe I)

Afin de la production en mesuré; la Biomasse ; le pH, l'indice d'émulsion E_{24} ; La tension superficielle (γ).

II.5.3. Extraction des biosurfactants

Après avoir séparé la biomasse par centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes à 4°C, l'opération s'effectue en versant de trois volumes d'acétone glacial goutte à goutte dans un volume de surnageant disposé sous agitation dans la glace pilée, le mélange (surnageant-acétone) est laissé dans le frigo pendant 2heures, il se forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par filtration sous vide. Le filtrat récupéré a été séché à température ambiante, la poudre obtenue est l'extrait de biosurfactant issue de ces souche qui nos soin.

II.6. Caractérisation du Biosurfactant

II.6.1. Caractérisation structurelle

1. Test de Rhamnose

Dans un tube à essai, on introduit 1 ml de surnageant et 2 ml de réactif phénol à 5% puis on ajoute 5 ml d'acide sulfurique pur à l'aide d'une burette. On mélange légèrement le tube à la main et on l'incube pendant 1h à 65°C.

On remarque après l'incubation du mélange appariation d'une coloration rouge violacée.

2. Spectre Infrarouge

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été utilisée pour déterminer la nature chimique des biosurfactant en identifiant les types de groupes fonctionnels et des liaisons chimiques présentes dans la fraction purifiée de la station de base. Les échantillons (1-5 mg) ont été broyés avec 80 mg de KBr pour former une poudre très fine.

Cette poudre est ensuite comprimée en une mince pastille qui pourrait être analysé par FT-IR. Les mesures spectrales ont été réalisées en mode d'absorbance. Les spectres ont été normalement acquis à 25°C à l'aide de 2 cm^{-1} Une résolution de 1 cédant traces IR dans la gamme de 350 à 4400 cm^{-1}.

II.6.2. Caractérisation fonctionnelle

1. Pouvoir moussant

Une quantité du précipité séparé a été dissoute dans l'eau distillée. Le mélange est agité manuellement pendant 30 secondes et laissé au repos pendant 5 min.

On remarque un ensemble des bulles gazeuses.

2. Pouvoir émulsifiant (voir L'indice d'émulsification (E24))

Des quantités de surnageant ont été mélangés avec des volumes égaux des hydrocarbure comme: Gasoil, Kérosène, Heptane, et Huile d'olive, puis agitées pendant 2 min à une vitesse maximale et laissées au repos pendant 24 h pour tester le pouvoir émulsifiant du biosurfactant envers les différents hydrocarbures et huiles.

II.6.3. Caractérisation Physico-chimique

1. Stabilité thermique

Le surnageant a été incubé à différentes températures: 20, 50 et 120°C pendant 15 min. la tension superficielle et l'indice d'émulsification ont été mesuré avec trois températures afin d'apprécier la stabilité thermique.

2. Stabilité chimique (effet du pH)

On a varié le pH du surnageant à 2, à 6 et à 11 en utilisant respectivement des solutions de l'HCl et le NaOH. Après un temps de repos de 10 min, la tension superficielle et l'indice d'émulsification ont été évalués.

III.1. Isolement et identification des souches

Sur les six échantillons prélevés et traités, quatre souches ont été isolées et retenues comme étant des souches présumées à produire des biosurfactants. Ces souches ont subi une série d'analyses.

III.1.1. Coloration de gram

Les résultats de la coloration sont présentés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 : coloration de gram de différentes souches isolées

Numéro de la souche	Résultat coloration de Gram
Souche 1	négatif -
Souche 2	négatif -
Souche 3	négatif -
Souche 4	négatif -

III.1.2. Etude physiologique

- ***Pseudomonas Spp1***

Après l'incubation de la mini galerie API®20 E pour l'identification du genre, on procède à la lecture des réactions en appliquant le tableau principal (Annexe II). Les résultats sont présentés dans la figure III.1.



Figure III.1. Présentation de la galerie après incubation pour la souche *Pseudomonas Spp1*

A partir de la fiche (Figure III.1), on détermine le profil numérique à 8 chiffres de la souche et l'identification à l'aide du catalogue analytique.

Le profil numérique de cette identification est 00000046, ce qui correspond sur le catalogue analytique de la galerie à l'espèce *Pseudomonas Spp1* (Annexe III).

- ***Pseudomonas Spp2***

La lecture de cette galerie est représentée dans la figure III.2.



Figure III.2: présentation de la galerie après incubation pour la souche *Pseudomonas Spp2*

Pour l'identification de ces résultats, on doit se référer comme précédemment au tableau de la lecture API®20 E.

A partir de la fiche (Figure III.2), on détermine le profil numérique à 8 chiffres de la souche et l'identification à l'aide du catalogue analytique (Annexe II).

Le profil numérique de cette identification est 00000045, ce qui correspond sur le catalogue analytique de la galerie à l'espèce *Pseudomonas Spp2* (Annex III).

- ***Flavobactérieum Spp***

La lecture de cette galerie est représentée dans la figure III.3.



Figure III.3. Présentation de la galerie après incubation
pour la souche *Flavobactérieum spp*

Pour l'identification de ces résultats, on doit se référer comme précédemment au Tableau de la lecture API®20 E. (Annexe II)

A partir de la fiche (Figure III.3), on détermine le profil numérique à 7 chiffres de la souche et l'identification à l'aide du catalogue analytique (Annexe II).

Le profil numérique de cette identification est 0042000, ce qui correspond sur le catalogue analytique de la galerie à l'espèce *Flavobactérieum spp.* (Annexe III).

- ***Serratia Liquefaciens***

La lecture de cette galerie est dans la figure III.4.



Figure III.4. Présentation de la galerie après incubation
pour la souche *serratia Liquefaciens*.

Pour l'identification de ces résultats, on doit se référer comme précédemment au Tableau de la lecture API®20 E. (Annexe II).

A partir de la fiche figure III.4, on détermine le profil numérique à 7 chiffres de la souche et l'identification à l'aide du catalogue analytique (Annexe II).

Le profile numérique de cette identification est 1306563, ce qui correspond sur le catalogue analytique de la galerie à l'espèce *Serratia Liquefaciens*. (Annexe III).

III.1.3. Caractérisation physicochimique

i)-La Biomasse

Le taux de biomasse a été évalué pour les différents microorganismes, et ce pour contrôler la croissance des ces souches bactériennes.

La mesure de la DO a été opérée avant incubation (à l'inoculation des milieux de cultures) et après un temps de culture.

Le Tableau III.3 illustre les résultats de la mesure de la DO pour les différentes souches traitées.

Tableau III.2. Les biomasses de différents microorganismes avant et après croissance

Microorganismes	**DO à t_0**	**DO à t**	**[Biomasse] mol/l**
Pseudomonas aeruginosa	0.792	1.052	4.78×10^{-6}
Bacillus Subtilis	0.736	2.185	9.93×10^{-6}
Pseudomonas spp1	0.191	2.385	10.8×10^{-6}
Pseudomonas spp2	0.721	0.80	3.36×10^{-6}
Flavobacterium spp	0.190	1.653	7.51×10^{-6}
Serratia liquefaciens	1.736	2.820	12.8×10^{-6}

t_0 : à l'inoculation des milieux de cultures.
t : après une période de culture mentionnée sur le tableau ci-dessus.

A partir du Tableau III.3, on constate qu'il y a une augmentation de la biomasse après les cultures des différentes souches, sauf pour le cas de *Pseudomonas Spp2*, où l'on observe une stabilité sur la valeur de la DO.

ii)- pH

Les résultats de mesure du pH des différents microorganismes avant et après culture sont présentés dans le Tableau III.4.

Tableau III.3. pH des différents microorganismes avant et après culture.

Microorganismes	pH avant culture	pH après culture
Pseudomonas aeruginosa	6.80	6.51
Bacillus Subtilis	7.01	4.50
Pseudomonas spp1	6.80	6.00
Pseudomonas spp2	6.84	6.80
Flavobacterium spp	6.82	5.70
Serratia liquefaciens	6.78	5.22

A partir du Tableau III.4, on constate une nette diminution du pH après les cultures des souches :*Pseudomonas Spp* , *Flavobacterium Spp* et *Serratia liquefatienc*. Ceci peut être interprété par une production et la libération des acides en l'occurrence de biosurfactants.

iii)- Tension superficielle

On a mesuré la tension superficielle du surnageant de chaque souche après la croissance, les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau III.5.

Tableau III.4. Tension superficielle de différents microorganismes après culture

Microorganisme	(γ) mN/ m
Pseudomonas aeruginosa	45.6
Bacillus Subtilis	39.0
Pseudomonas spp1	56.4
Pseudomonas spp2	61.0
Flavobacterium spp	36.1
Serratia liquefaciens	41.4

On remarque à partir de ce tableau, que toutes les valeurs de la tension superficielle (γ) enregistrés, reflètent de bons résultats, sauf le cas de *Pseudomonas Spp2* qui exprime une valeur qui dépasse la valeur théorique limite de (γ), ce qui nous conduit a négliger cette souche. Les

autres souches semblent donner des tensions de surface relativement basses par rapport à la souche *Pseudomonas Spp2*.

III.2.Caractérisation des Biosurfactants

III.2.1.Caractérisation structurale

1. Test de Rhamnose

La figure III.5 indique l'apparition d'une coloration rouge violacée. C'est un indice de l'existence d'un groupement Rhamnose après l'incubation du mélange à 65 °C pendant une heure.



Avant incubation Après incubation

Figure III.5. Test Rhamnose

2. Spectre Infrarouge

Le spectre IR du biosurfactant à l'état solide a été pris à l'aide d'un spectrophotomètre. Les pics détectés par le spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourrier sont résumés dans le Tableau III.6.

Tableau : III.5. Groupements caractéristiques du biosurfactant

Nombre d'onde	Groupement	Intensité %	Microorganisme
1654,07	C=C (acide)	53	***Pseudomonas aeruginosa***
1085,81	C-O (ester)	50,5	
983,16	C-H (alcène)	54,2	
1638	C=C (acide)	61	***Bacillus Subtilis***
1459	CH_2 ou CH_3 (ester)	63	
617	N-C=O (amide)	63.5	
1653,84	C=C (acide)	43,7	***Pseudomonas Spp***
1101,67	C-C (alcane)	45.9	
1654	C=C (acide)	42	**Flavobacterium spp**
1083,25	C-O (ester)	23	
864,99	C-H (alcéne)	45	
598	C=O (amide)	30	
1655,89	C=C (acide)	26	**Serratia liquefaciens**
1085,99	C-O (ester)	21	
982,54	C-H (alcéne)	25	

Les spectres IR des biosurfactants sont représentés dans les figures III.6, III.7, III.8, III.9 et III.10.

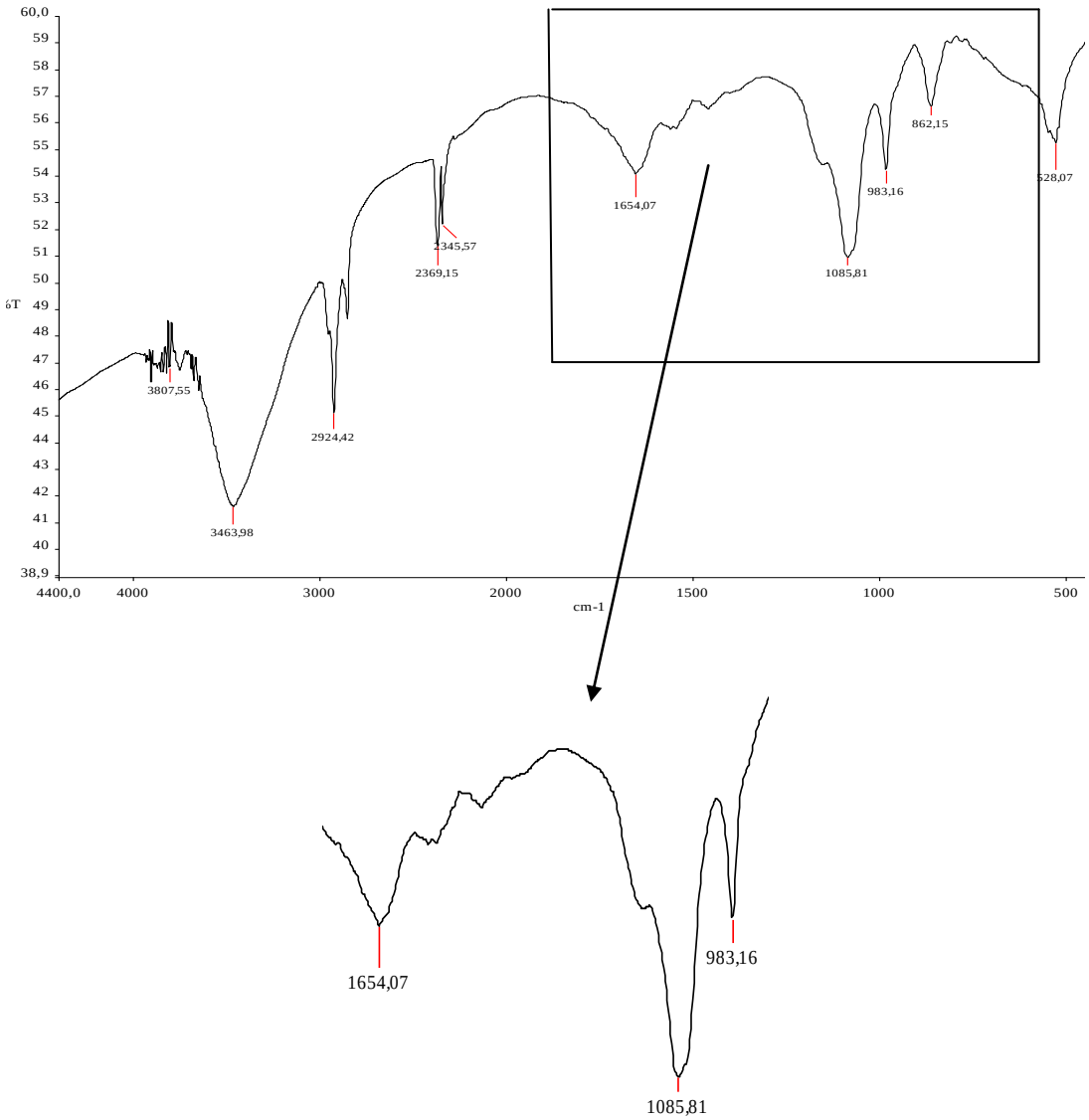


Figure III.6. Spectre infrarouge du biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa*

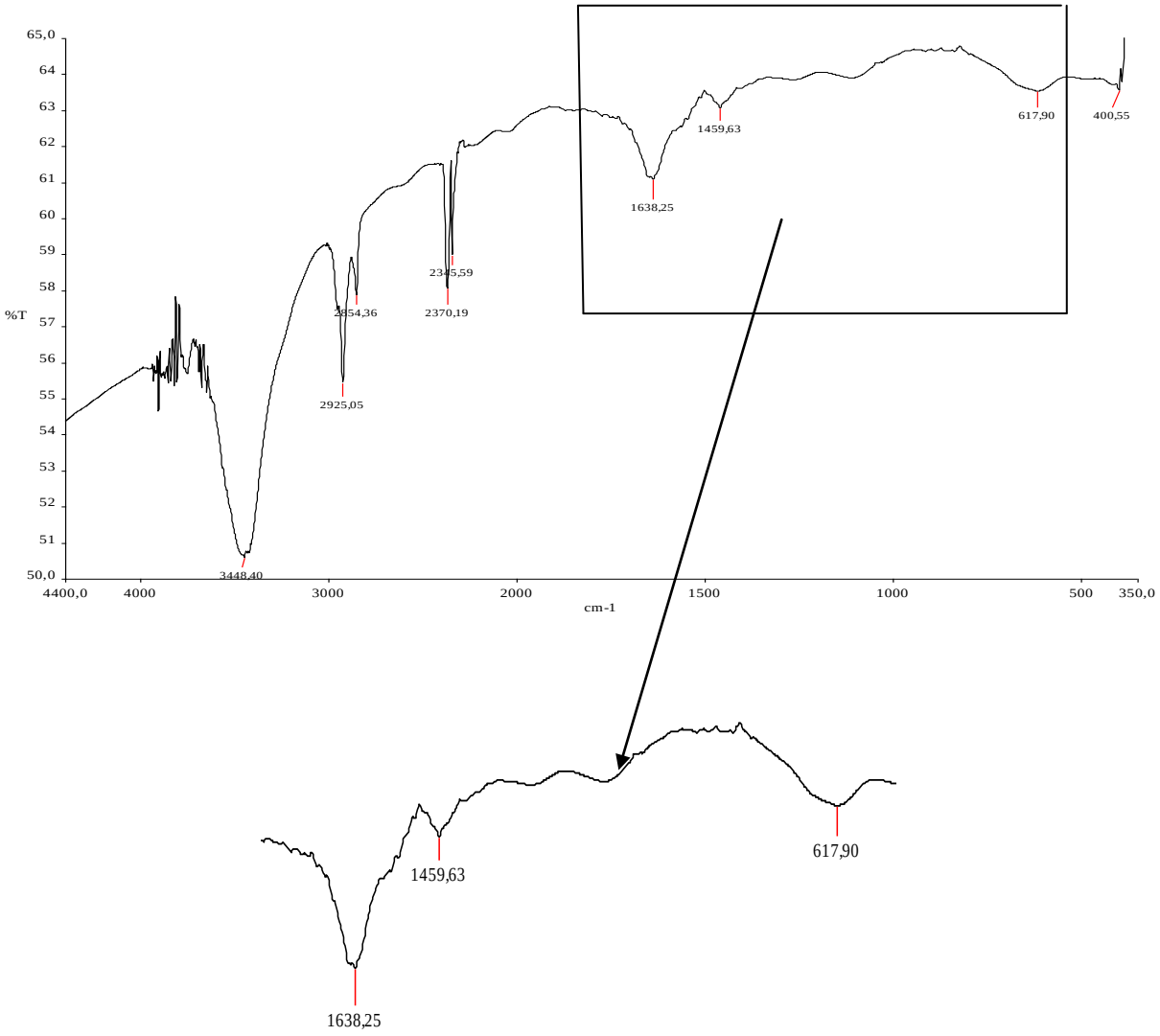


Figure III.7. Spectre infrarouge du biosurfactant produit par *Bacillus Subtils*

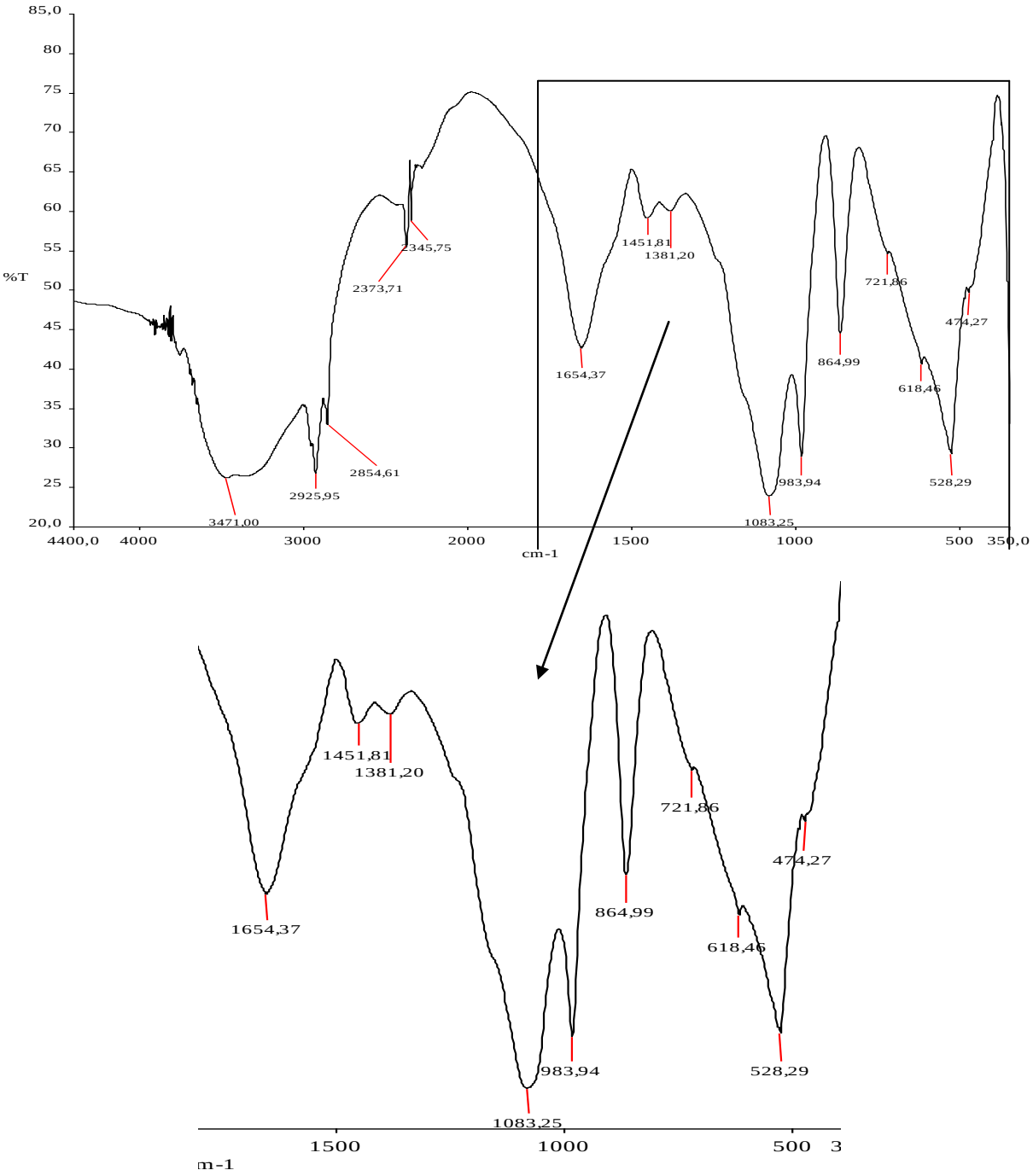


Figure III.8. Spectre infrarouge du biosurfactant produit par *Flavobacterium spp*

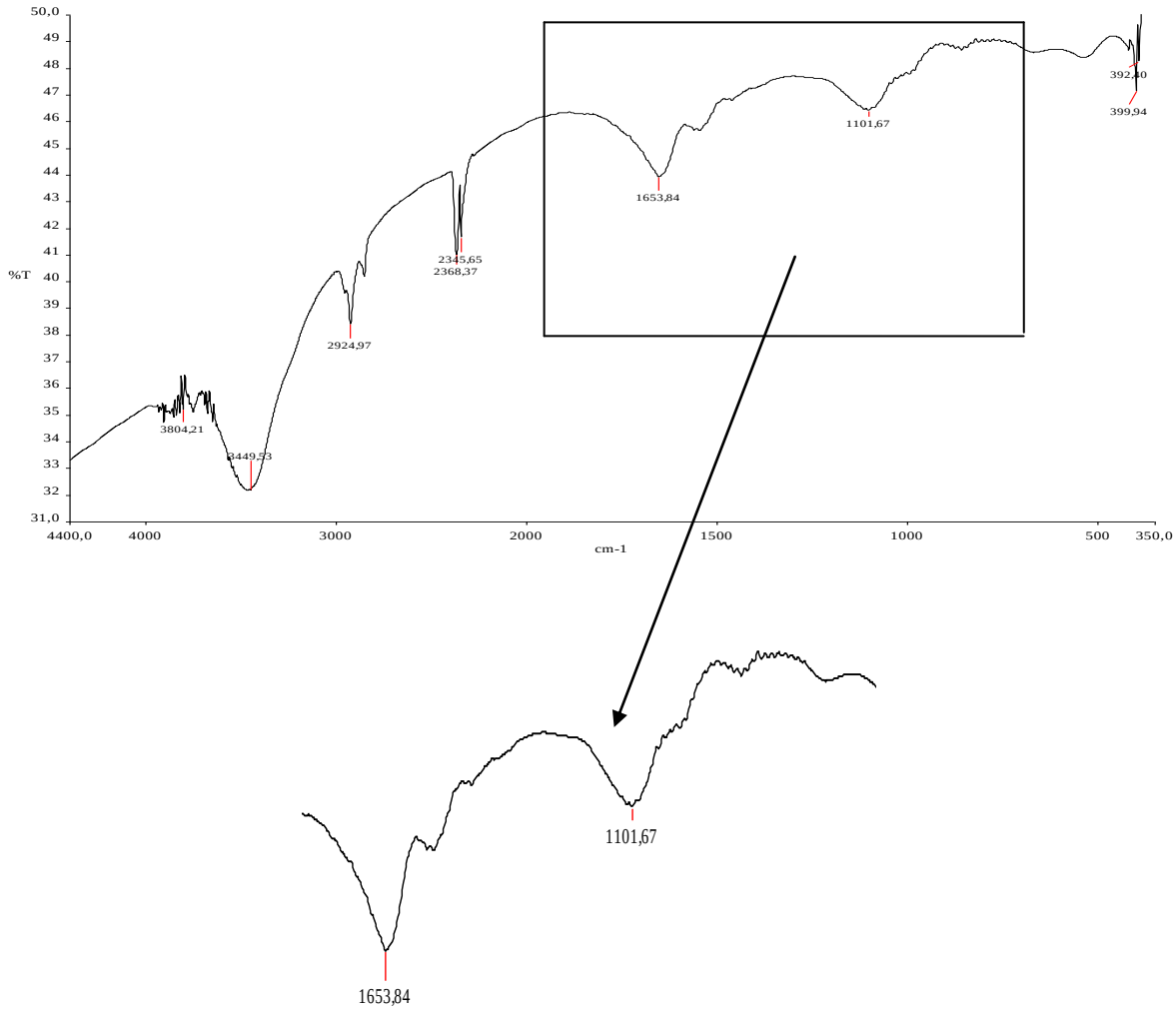


Figure III.9. Spectre infrarouge du biosurfactant produit par *Pseudomonas Spp*

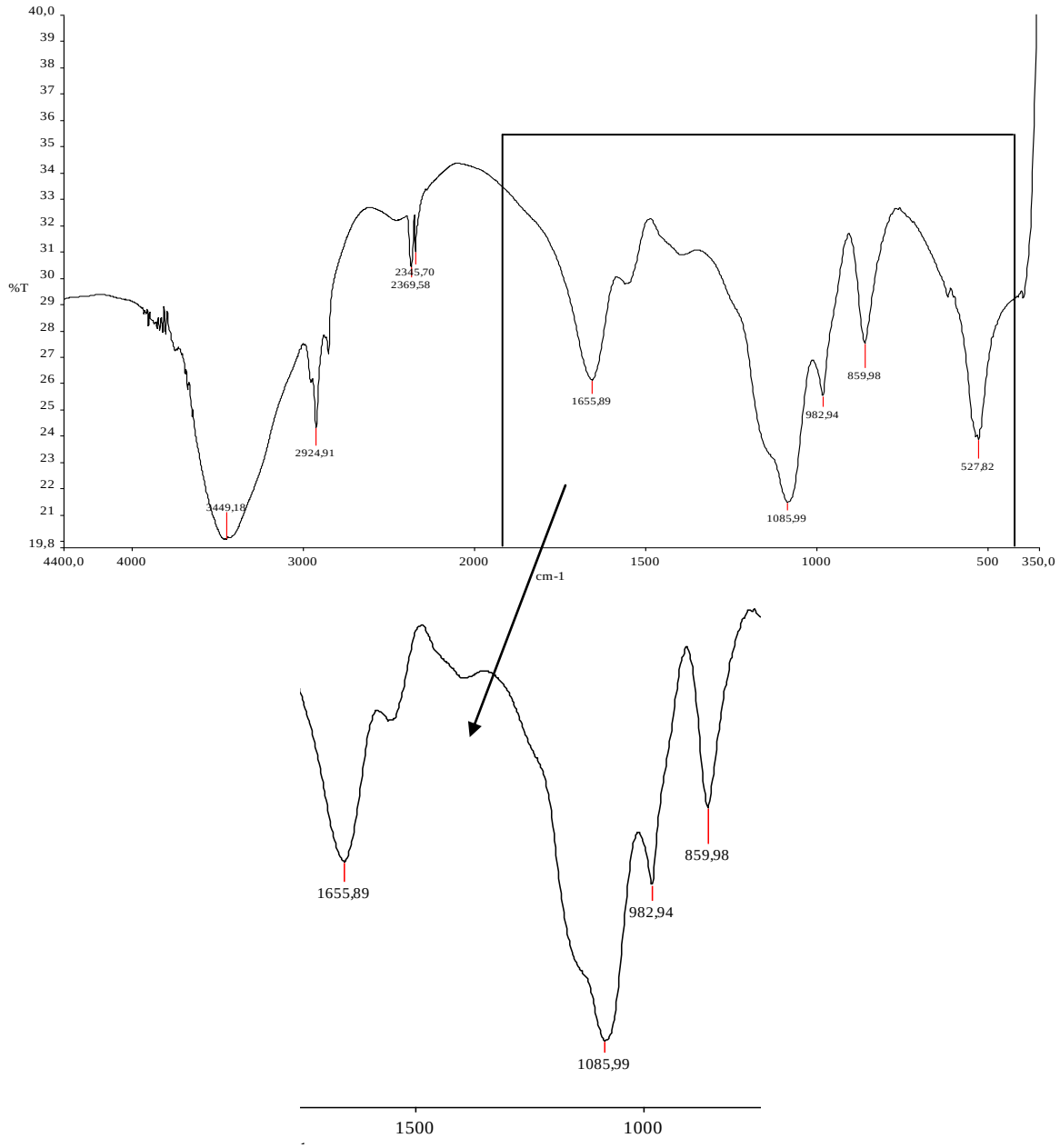


Figure III.10. Spectre infrarouge du biosurfactant produit par *Serratia liquefaciens*

En analysant les différents spectres, on remarque la présence d'un pic à (1653-1655cm^{-1}) pour toutes les souches signifiant qu'il existe des groupements C=C d'acide. On remarque aussi la présence des groupements d'esters qui peuvent être exprimés par la présence d'un pic entre la gamme (1083-1085 cm^{-1}) pour le *PS aeruginosa*, *Serratia liquefaciens*, *Flavobacterium spp et Pseudomonas Spp1*, et aussi à 1438cm^{-1} pour le *Bacillus Subtilis* confirmant ce que Desai et Banat [6] ont prouvé. Presque tous les biosurfactants ont un groupement ester ou acide carboxylique dans leurs structures.

Les pics (864-983cm^{-1}) pour le *P.aeruginosa*, *S. liquefaciens* et *Flavobacterium* montrent qu'il existe des groupements alcène.

Comme on Remarque qu'à 528 cm^{-1} la présence d'un grand pic du groupement C=O d'amide pour le *Flavobacterium Spp* et un pic à 617cm^{-1} pour le *Bacillus Subtilis* du groupement C=O d'amide aussi.

III.2.2.Caractérisation fonctionnelle

1. Pouvoir moussant

La mousse est un ensemble des bulles gazeuses séparées par des lames minces de liquide et formée par la juxtaposition de bulles que donne un gaz dispersé dans un liquide. Le biosurfactant a un pouvoir moussant démontré sur la figure III.11.



Figure III.11. Pouvoir moussant de biosurfactants

2. Pouvoir émulsifiant

Le tableau III.6 indique la capacité des biosurfactants de différents microorganismes à émulsifier le gasoil.

Les émulsions sont des dispersions liquides thermodynamiquement instables, leur instabilité nécessite une minimisation de l'énergie libre de surface, créée lors de la fabrication par la dispersion mécanique de la phase dispersée aqueuse.

L'uniformité des bulles confirment le pouvoir émulsifiant du biosurfactant sur les hydrocarbures.

Tableau III.6: Indice d'émulsification des différentes souches

Les microorganismes	**E_{24} (%)**	**Vue avant agitation**	**Vue des émulsions après 24h**
Pseudomonas aeruginosa	55.42		
Bacillus Subtilis	59.09		
Serratia liquefaciens	43.40		
Pseudomonas spp	56.09		
Flavobacterium spp	52.38		

III.2.3.Caractérisation Physico-chimique

1. Stabilité thermique

Le Tableau III.7 illustre les résultats obtenus de γ et E_{24} quand le surnageant subit un traitement thermique à 25, 50 et 120°C respectivement.

Tableau III.7: stabilité thermique du biosurfactant

Les microorganismes	Température (°C)	(γ) mN/ m	E_{24} (%)
Pseudomonas aeruginosa	25	50.76	51.87
	50	51.53	51.21
	120	54.75	50.00
Bacillus Subtilis	25	49.10	54.32
	50	49.10	52.43
	120	43.43	50.00
Pseudomonas Spp1	25	55.78	50.00
	50	54.77	51.21
	120	56.76	51.16
Flavobacterium Spp	25	55.78	50.00
	50	57.20	49.36
	120	56.70	50.00
Serratia liquefaciens	25	55.78	50.23
	50	55.90	50.00
	120	55.90	50.00

Les variations de la tension de surface γ et de l'indice d'émulsification E_{24} en fonction de la température sont illustrées sur les figures III.12, III.13, III.14 et III.15 respectivement.

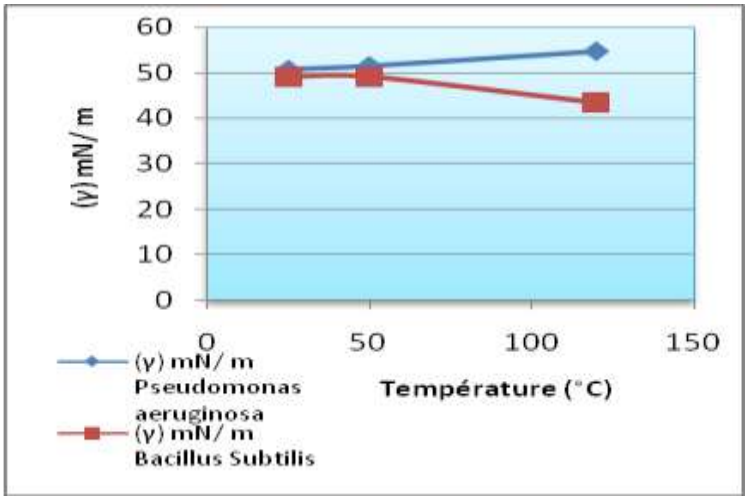


Figure III.12. Variations de la tension superficielle γ en fonction de la température
Biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis*

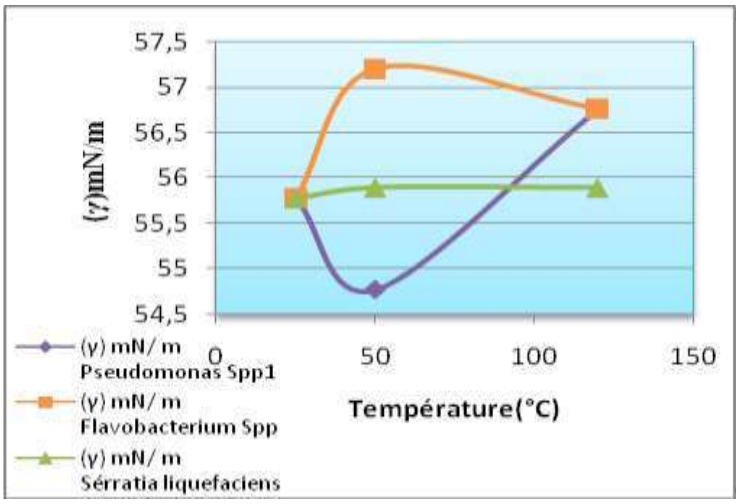


Figure III.13. Variations de la tension superficielle γ en fonction de la température
Biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens*

L'examen de la figure III.12 montre qu'entre 25 et 50°C, la tension superficielle est stable pour les deux produits issus des deux souches de référence. Cependant, audelà de 50°C, la tension superficielle pour le biosurfactant issu de la *Bacillus Subtilis* a diminué sous l'influence de la température. On considère que cette diminution est favorable puisque la bonne qualité du biosurfactant dépend des faible tensions superficielles, par contre la relation entre la tension superficielle du produit issu de la *Pseudomonas aeruginosa* est proportionnelle à la température, ce qui confirme que la température influe sur la qualité du biosurfactant de façon négative.

Par ailleurs, l'examen de la figure III.13 montre qu'entre 25 et 50°C, la tension superficielle de la *Flavobacterium Spp* est proportionnelle à la température jusqu'à ce qu'elle atteigne des valeurs supérieures reflétant un mauvais comportement du biosurfactant. Cependant, pour la tension superficielle (γ) du biosurfactant issu de la *Pseudomonas Spp*, on note une légère diminution sous l'influence de la température (inversement proportionnelle). Par contre pour le (γ) de *Serratia liquefaciens*, on remarque une légère augmentation vers 55.2 mN/m. Au-delà de 50°C, on remarque que seule la tension superficielle du surnagent extrait de la culture de *Serratia liquefaciens* présente une stabilité des valeurs représentées sur l'allure de la courbe. Ceci montre que la température n'a pas d'influence sur le comportement du biosurfactant.

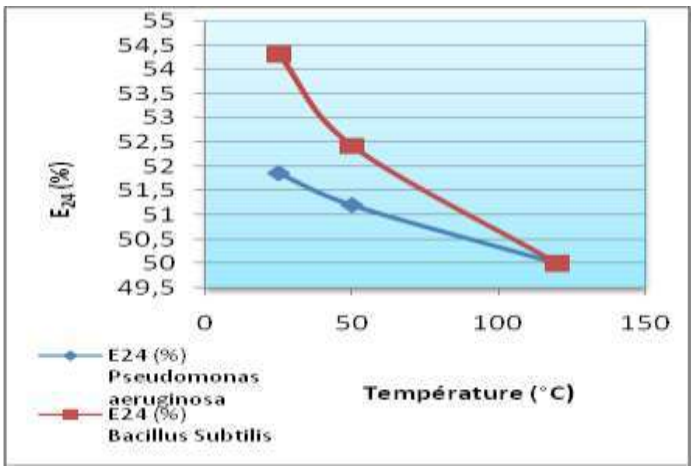


Figure III.14. Variations de l'indice d'émulsification (E_{24}) en fonction de la température

Biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis*

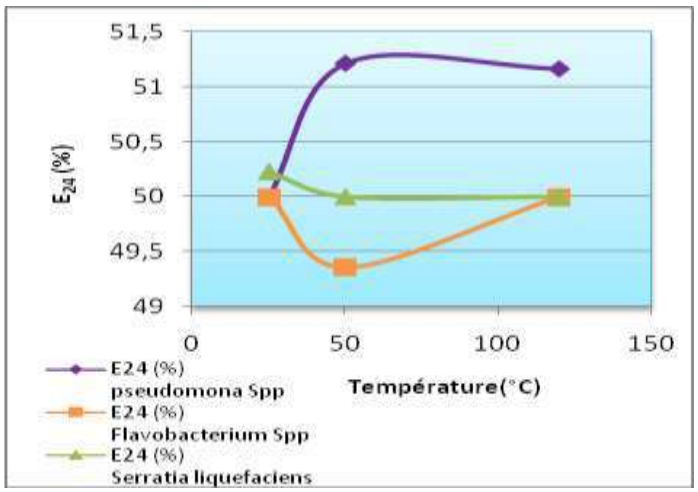


Figure III.15. Variations de l'indice d'émulsification (E_{24}) en fonction de la température

Biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens*

L'examen de la figure III.14 montre que lorsque la température varie entre 25 et 50°C, l'indice d'émulsification (E_{24}) diminue légèrement. On notre presque le même écart pour les deux produits issus des deux souche de réferences, tandis qu'au delà de 50°C, on note une chute considérable pour le biosurfactant issu de *Bacillus Subtilis*, par contre la diminution de E_{24} dans le cas du *Pseudomonas aeruginosa* est de moitié. À la température de 120°C, les deux biosurfactants ont pris la même valeur en indice d'émulsification représenté par une décroissance de l'ordre de 50%. On peut considérer que la relation entre l'indice d'émulsification et la température est inversement proportionnelle, par conséquence ont peut qualifier que les deux biosurfactants sont thermolabiles.

Signalant que le caractère amphiphile est encore conservé puisque ce dernier est vérifié si l'indice d'émulsification est superieur à 40 %.

L'examen de la figure III.15 montre que lorsque la température varie entre 25 et 50°C, l'indice d'émulsification (E_{24}) de *Pseudomonas Spp* augmente pour atteindre une valeur de 51.2%, ce qui implique que l'augmentation de la température a amélioré son caractère amphiphile. Tandis que le biosurfactant issu de *Flavobacterium* a enregistré une diminution flagrante d'E24 due à l'augmentation de la température d'environ 49.3% révélant le caractère thermolabile de ce produit. Par contre le caractère amphiphile du biosurfactant issu de *Serratia liquefaciens* reste presque intact, ce qui nous ramène à conclure que ce produit est thermorésistant.

Au delà du 50°C**,** l'E_{24} de la *Pseudomonas Spp* a presque conservé la valeur de 51.2% sans aucun changement malgré l'élévation de la température. Ceci implique que l'amélioration de l'indice E_{24} ne dépond pas seulement de la température, mais d'autre facteures, ou que l'E_{24} de ce produit est limité et ne peut pas donc atteindre des valeurs supérieures.

Pour le biosurfactant issu de *Serratia liquefaciens*, l'indice E_{24} est encore stable malgré l'augmentation de la température, de tel sorte qu'on peut considérer que la température n'a aucune influence sur le E_{24} de *Serratia liquefaciens* d'où le qualificatif de thermorésistant.

Par ailleurs, on a aperçu que la variation de l'E_{24} de *Flavobacterium Spp* ne dépend pas de la température mais d'autre facteurs physico-chimiques puisque le E_{24} de *Flavobacterium Spp est revenu* à sa valeur initiale de 50% malgré l'augmentation de la température.

On peut notons par ailleurs, que l'indice d'émulsification E_{24} des nos extraits est toujours inferieur ou égal à la valeur minimale des référence sauf pour le cas du produit de *Pseudomonas Spp* qui a enregistré une valeur de 51.2%.

En effet, les produits extraits à partir de nos cultures des différentes souches ont conservé le caractère amphiphile malgré le changement de la température de tel sorte que le E_{24} n'a pas chuté en dessous de 49%.

2. Stabilité chimique-Effet du pH

Le tableau III.8 indique les résultats des mesures de γ et E_{24} obtenus lors de la variation du pH du surnageant.

Tableau III.8. Effet du pH sur la **s**tabilité chimique du biosurfactant

Microorganismes	**pH**	**(γ) mN/ m**	**E_{24} (%)**
Pseudomonas aeruginosa	2	55.9	51.21
	6	47.81	51.09
	11	38.12	50
Bacillus Subtilis	2	45.86	50
	6	45.86	52.5
	11	41.40	51.21
Pseudomonas spp1	2	58.95	51.21
	6	60.2	52.43
	11	51.05	50
Flavobacterium Spp	2	51.05	48.78
	6	49.42	48.78
	11	43.75	47.67
Serratia liquefaciens	2	55.10	48.78
	6	61.58	48.56
	11	50.24	50

Les variations de la tension de surface γ et de l'indice d'émulsification E_{24} en fonction du pH sont illustrées sur les figures III.16, III.17, III.18 et III.19 respectivement.

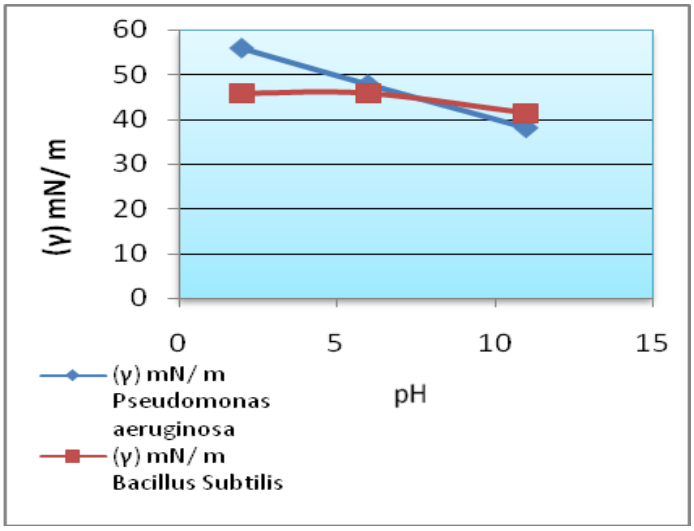


Figure III.16. Variations de la tension superficielle en fonction du pH

Biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis*

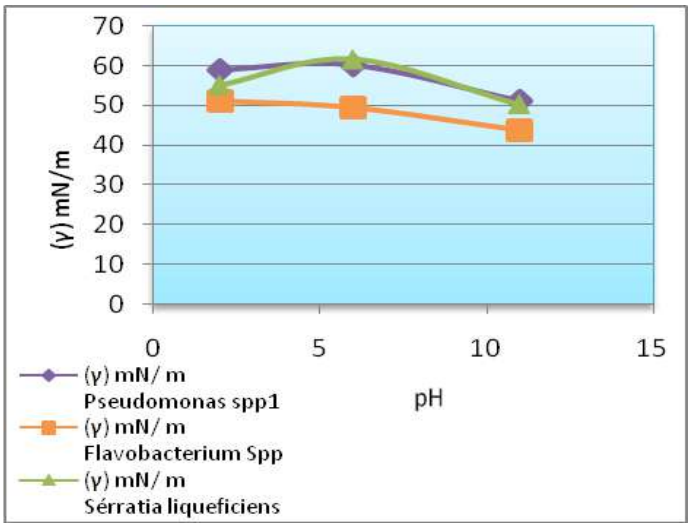


Figure III.17. Variations de la tension superficielle en fonction du pH

Biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens*

L'examen de la figure III.16 montre que le pH basique induit une diminution de la tension superficielle des biosurfactants pour les produits issus des souches de référence. Ainsi une varaiation du pH allant de 2 à 11 entraîne une diminution de la tension superficielle allant de 55 à 45 mN/m pour le produit de référence et une légère diminution pour le produit issu de *Bacillus subtilus*. Le pH semble avoir un effet notable sur la diminution de la tension superficielle.

L'examen de la figure III.17 montre également le même pour les biosurfactants issus des *Pseudomona spp, Flavobacterium spp* et *Serratia liquefaciens.* Ces résultats révèlent que le pH

basique oriente la tension superficielle vers des valeurs inferieures, ce qui est favorable et avantageux, afin d'avoir un biosurfactant renfermant une activité supérieure.

A l'issue de résultats, on peut conclure que la tension superficielle est inversement proportionnelle au pH pour tous les biosurfactants. Cette diminution peut être due à l'ajout du NaOH qui semble avoir un effet sur l'activité tensioactive du biosurfactant.

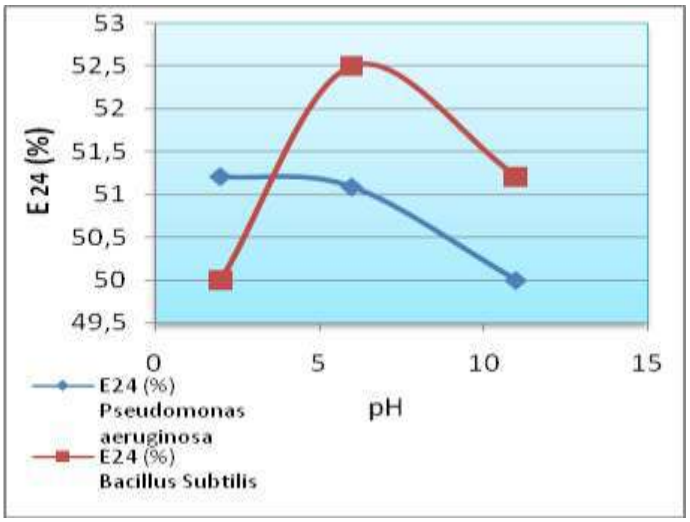


Figure III.18. Variations de l'indice d'émulsification E_{24} en fonction du pH
Biosurfactants issus de *Pseudomonas et bacilius subtilis*

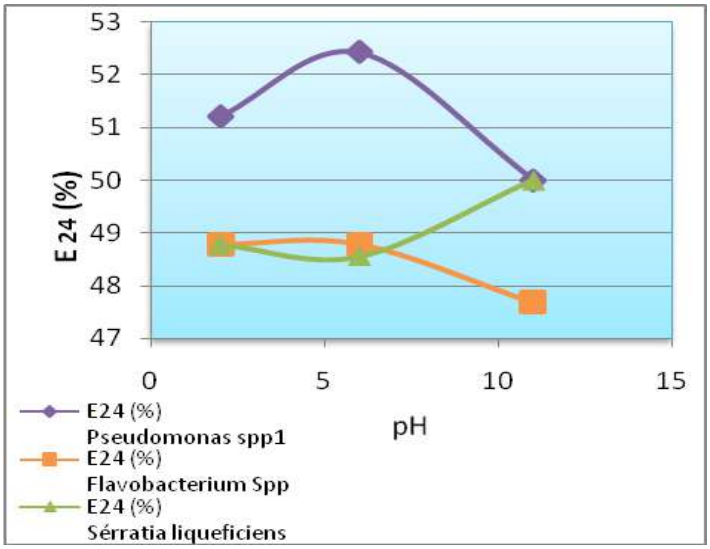


Figure III.19. Variations de l'indice d'émulsification E_{24} en fonction du pH
Biosurfactants issus de *Pseudomonas Spp1, Flavobacterium et Serratia liquefaciens*

L'examen de la figure III.18 montre que pour les deux biosurfactants de référence, le pH acide représente un milieu adéquat conservant la qualité physicochimique des deux composés qui se reflète sur la valeur minimale de l'indice d'emulsification dépassant fortement les 40%.

Vers le pH basique, on aperçoit une légère diminution du E24 pour les deux composés, mais tout en conservant la spécificité amphiphile, puisqu'à un pH fortement basique, le E24 atteint encore plus des valeurs supérieures.

L'examen de la figure III.19 que les E24 des biosurfactants issus de *Pseudomonas spp* et celui de *Flavobactérium spp* donnent une meilleure activité au pH=6 considérant que le pH basique représente un milieu hostile pour ces biosurfactants.

Néanmoins, l'E24 du biosurfactant issu de *Sérratia lequefaciens* donne de meilleurs résultats à un pH basique. Aux pH basiques, on obtient une bonne émulsification.

Le pH basique est mis à profit autant par le biosurfactant issu de la Serratia que par les E_{24} issus de la Pseudomonas et de la Flabobacterium. Le pH basique a conduit à l'obtention à la fois d'une valeur supérieure à l'indice d'émulsification et une valeur inférieure et convenable en tension superficielle.

Selon les résultats et d'une façon générale, on peut conclure qu'il ne s'agit pas du même biosurfactant produit par l'ensemble des souches, que ce soit des souches de référence, ou celles isolées et identifiées.

Conclusion Générale

Dans ce présent travail, nous avons fixé comme objectifs l'isolement, l'identification et la caractérisation de certains microorganismes producteurs de biosurfactants. Pour cela, nous avons effectué en premier lieu, une recherche bibliographique sur les biosurfactants et les moyens de leur production. Nous avons exposé la classification des souches productrices, les différentes méthodes analytiques effectuées pour l'estimation et l'analyse de biosurfactant, la physiologie, les mécanismes de production de biosurfactant, les facteurs affectant la production, la synthèse de biosurfactant et leurs séparation, et en fin les divers domaines d'application de ces molécules biologique.

En deuxième lieu, une étude expérimentale a été réalisée sur des prélèvements de l'eau de process à différents points du réseau de traitement, distribution et d'alimentation des différentes unités de fabrication de produits pharmaceutiques de l'usine Antiobiotical de Médéa. Seules les souches présumées productrices de biosurfactants ont été retenues, en utilisant les différentes méthodes physico-chimiques pour mettre en évidence quantitativement et qualitativement la production de biosurfactant. On a utilisé comme techniques, la mesure de la biomasse, le pH, la tension superficielle et l'indice d'émulsification.

Les résultats expérimentaux ont montré que les espèces que nous avons utilisé à savoir, les *Pseudomonas Spp, Flavobacterium Spp,* et *Serratia liquefaciens* peuvent produire des biosurfactants.

Les biosurfactants produits ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques indiquant clairement qu'ils ont un pouvoir moussant et émulsifiant. Par ailleurs, nous avons démontré que les biosurfactants produits des différentes souches ont presque les mêmes groupements fonctionnels, comme les groupements d'acide et esters.

La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant a été effectuée en se basant sur son grand pouvoir émulsifiant et sur la valeur minimale de la tension superficielle atteinte.

Selon les résultats et d'une façon générale, on peut conclure qu'il ne s'agit pas du même biosurfactant produit par l'ensemble des souches, que ce soit des souches de référence, ou celles isolées et identifiées.

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

- Le développement de méthodes avancées pour l'identification chimique du biosurfactant
- L'étude des propriétés physicochimiques du biosurfactant produit, pour mieux connaitre sa nature, sa structure, sa concentration micellaire critique et les paramètres influençant sa micellisation.
- La réalisation des analyses qualitatives des hydrocarbures après la biodégradation et après la remobilisation pour connaitre les fractions biodégradées et remobilisées à l'aide de notre biosurfactants
- En fin, il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs à grande échelle et prouver leur efficacité dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures.

Références Bibliographiques

[1] Fiechter A., Biosurfactants: moving towards industrial applications, Tibtech 10, 3-12, 1997.

[2] West C.C., Harwel J.H., Surfactants and subsurface remediation, Environ. Sci. Technol. 36, 2324-2330, 1992.

[3] Banat M., Makkar R.S., Cameotra S.S., Potential commercial applications of microbial surfactants, Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 495-508, 2000.

[4] Gabet S., Remobilisation d'hydrocarburs Aromatique polycyclique biologique, These de doctorat, Université de Limoges, 2004.

[5] http://catinist.fr/2 a modele=affiche

[6] Desai J.D., Banat I.M., Microbial production of surfactants and their Commercial potential, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 47-64, 1997.

[7] www.eau-seine-normantik.fr
Degradation des hydrocarbures par les bactéries isolées des eaux superficielles du basin prisien,

[8] http://biosurfactant, blogs-pot.com (2011/08)
Gujarat J., Biosurfactant properties and classification", India

[9] Healy M.G., Devine C.M., Murphy R., Microbial production of biosurfactants, Res. Conserv. Recycl. 18, 41-57, 1996.

[10] Ron E.Z., Rosenberg E., Biosurfactants and oil remediation, Curr. Op. Biotechnol. 3, 249-252, 2002.

[11] Morikawa M., Beneficial biofilm formation by industrial bacteria Bacillus subtilis and related specie, J. Biosci. Bioeng. 101, 1–8, 2006.

[12] Makkar R.S., Cameotra S.S., An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 428-434, 2002.

[13] Mercade M.E., Manresa M.A, The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, J.A.O.C.S. 71, 61-64, 1994.

[14] Mata-Sandoval J.C, Karns J., Torrents A., Effect of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on the solubilization of pesticides, Environ. Sci. Technol. 34, 4923-4930, 2000.

[15] Lang S., Wullbrandt D., Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potentiall, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 22-32, 1999.

[16] Guerra-Santos L.H., Kappeli O., Fiechter A., Dependence of Pseudomonas aeruginosa contonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, Appl. Microbiol. Biotechnol. 24, 443-448, 1986.

[17] Yakimov,M.M, Golyshhin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N., Alcanivrax borkumensis gen.nov, sp ; nov, a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producingmarine bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 339-348-285, 1998.

[18] Rosero N.G., Pimiento A.L., Dugarte F., Carvajal F.G., Paramaters examination of a biosurfactant production at laboratory scal, Gencia Technol. Future, 2, 35-41, 2003.

[19] Willaert R.G., Barron G.V., Gel entrapment and micro-encapsulation: Methods, application and engineering. Rev chem. Eng. 12, 1986.

[20] www.iwt.fr; Technologie des cellules immobilisées

[21] Sumpantant A., Prasertsan P., Hanpongkittikun, A., Characterization of biosurfactant produced by Acinotobacter S7. www.knowledge.Biotec.or th/doc

[22] Sung C., Hong-Jyh J., Recovery and puuuuuuof the lipopeptide biosurfactant of Bacillus subtilis by ultrafiltration. Biotechnol. Tech. 11, 413-416, 1997.

[23] Davies J.T., A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent, Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity. 426-438, 1957.

[24] Vollenbroich D., Pauli G., Zel M., Vateri J., Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis. Appl. Env. Microbiol. 63, 44-49, 1997.

[25] Boukhelkhal F., Kerrat N., Optimisaation de la formulation d'une crème cosmitique, approche Rhéologique, PFE Ingénieur, Université de Medea, 2000.

[26] Parivin Shakeri Far D., Production and purification of biosurfactant and stydy of their influence on surface properties of Stainles steel and Teflon, Thèses, Université de Lille 1, 2010.

[27] Van Dyke M.I., Couture P., Brauer M., Lee H., Trevors J.T., "Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol. 39, 1071-1078, 1993.

[28] Banat M., Makkar R.S., Cameotra S.S., Potential commercial application of microbial surfactants, Appl. Microbial. Biotechnol. 53, 495-508, 2000.

[29] Bai G., Brusseau M.L., Miller R.M., Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, J. Contam. Hydrol. 25, 157-170, 1997.

[30] Nabi A., Synthèse et caractérisation d'un agent tensioactif biologique, PFE Ingénieur, Université de Médéa, 2004.

[31]Jacobucci D.F.C., Vasconcellos C.K., Matsuura A.B., Falconi A.F., Durrant L.R., Degradation of diesel oil by biosurfactant producing bacterial strains, www.aehsmag.com.htm

[32] Piccicuto S., Deroane C., Brohée J.C., Mbampara A., Lognay G., Blecher C., Paquot M., Marlier M., Les esters de Sucre: vois de syntheses et potentialities d'utilisation, Biotechnol. Agron. Soc. Environ.

[33] Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A., Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044, Biotechnol. Bioeng. 81,316-322, 2003.

[34] Sharga B.M, Lyon G.D., Bacillus subtilis B5 107 as anatagoniste of potato blackleg and softrat bacteria, Rev. Com. Microbial. 77, 777-787, 1998.

[35] Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L., The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status ans need for revision, Agronomie 20, 51-53, 2000.

[36] Mavrodi D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J. Phillips, G., Thomashow L.S., Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1". J. Bacteriol. 183, 6454-6465, 2001.

[37] Haas D., Keel C., Regulation of antibiotic production in root-colonizing Pseudomonas spp. and relevance for biological control of plant disease, Ann. Rev. Phytopathol. 41, 117-153, 2003.

[38] Benincasa M., Accorsinif R., Pseudomonas aeruginosa LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate, Biores. Technol. 99, 3843–3849, 2008.

[39] Chin-A-Woeng T.F., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J., Bloemberg G.V., Introduction of the phzH gene of Pseudomonas chlororaphis PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing Pseudomonas spp. Strains, Mol. Plant. Microb. Inter. 14, 1006-1015, 2001.

[40] Franennec J.P., Leprince P., Trembouze P., Favennec J.P., Le raffinage de pétrole : Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication. Ed Technip, Paris, 1998.

[41] http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html

[42] http://www.bacteriologie.net/medicale/nocardia.html

[43] Lang S, Philp J.C., Surface-active lipids in rhococci, Antonie van Leeuwenhoek 74, 59–70, 1998.

[44] Cirigliano M.C., Carman G.M., Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from Candida lipolytica, Appl. Environ. Microbiol. 50, 846–850, 1984.

[45] Protocole Usuel, Antiobiotical Saidal Médéa, 2010.

[46] Akmouci-Toumi S., Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelque souche microbiennes à dégrader le gasoil, Mémoire de Magister, Université de Boumerdes, 2009.

Annexe I : Milieux de cultures et réactifs

1. Composition des milieux

a. Bacillus Subtilis

- **Bouillon nutritive**

Ingrédients	Quantité
Peptone	10 g
Ca Cl	0,1 g
Na Cl	5 g
Eau distillée	1000 ml

100 ml dans un erlenmeyer de 250 ml

Incubée à 37°C pendant 24 h sous agitation 200 rpm

- **Milieu de production**

Ingrédients	Quantité
NH_2HPO_4 $2H_2O$	7g
K2HPO4	3g
NH_4HCl	1g
NaCl	0,5g
glucose	4g
$MgSO_4$	0,25g
$CaCl_2$	0,02g
Eau distillée	1000 ml
pH	**7**

5 ml de préculture + 100 ml de bouillon dans un erlenmeyer de 250 ml

Incubée à 37°C pendant 48 h sous agitation 200 rpm

b. Pseudomonas et les autres

- **Bouillon nutritive**

50 ml de Soja bouillon dans un erlenmeyer de 250 ml

Incubé à 28 °C pendant 10 à 14 h sous agitation 150 rpm

- **Milieu de production**

Ingrédients	Quantité
K_2HPO_4	1 g
K_2HPO_4	1 g
$Mg\ SO_4 7H_2O$	0,2 g
$Ca\ Cl_2$	0,02 g
$Fe\ Cl_3 6H_2O$	0,05 g
$NaNO_3$	2 g
glycerol	30 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8

2 ml de préculture + 100 ml de bouillon dans un erlenmeyer de 500 ml

Incubé à 28 °C pendant 120 h sous agitation 150 rpm

2. Les réactifs

- Alcool,
- Acétone,
- acide sulfurique,
- phénol,
- Disques d'oxydases,
- Eau distillée,
- Eau oxygénée,
- Fuchsine,
- Poudre de Zinc,
- Solution de lugol,
- Violet de gentiane,
- HCl,
- NaOH,
- Réactif de TDA,
- Réactif VP 1 et VP 2.

Annexe II: Présentation des galeries API 20 E

1. Principe

La galerie API 20 E, commercialisée par la société « bioMérieux,» est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. La galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Un fond et un couvercle complètent la galerie et permettent de constituer une boîte d'incubation. La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants : ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons(CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H_2S), synthèse d'une uréase (URE),recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides" : glucose(GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose(MEL), amygdaline (AMY), et arabinose (ARA). La galerie permet également la recherche du nitrate réductase qui se fait dans le microtube "GLU".

2. Technique

- Placer de l'eau dans les alvéoles présents dans le fond de la boite afin de créer une atmosphère humide.
- Retirer la galerie de son emballage et la placer dans le fond de la boîte.
- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée.
- Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de "suspension Medium".
- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir les microtubes de la galerie. Au sein
- des microtubes, le fabriquant distingue deux parties, le tube et la cupule. Selon les Annexe tests, la suspension bactérienne doit être placée uniquement dans le tube ou dans le tube et la cupule.
- Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.

- Lorsque que le sigle du test est souligné (ADH, LDC, ODC, URE, H_2S), la suspension doit remplir uniquement le tube. Après ensemencement complet de la galerie, la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné (ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA), la suspension doit remplir uniquement le tube.
- Refermer la boîte d'incubation, écrire les références du prélèvement sur la languette du fond de la boîte et placer la boîte à 37 °C durant 18 à 24 heures.

3. Lecture

- Sortir la boîte de l'étuve et noter sur la fiche de lecture les résultats obtenus pour les tests à lecture spontanée (voir ci-dessous le tableau de lecture).
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir ci-dessous le tableau de lecture) :
- TDA : ajouter une goutte du réactif TDA
- IND : ajouter une goutte du réactif de James
- VP : ajouter une goutte du réactif VP 1 et une goutte du réactif VP 2
- Nitrate réductase : après avoir noté le résultat obtenu pour l'acidification du glucose, ajouter une goutte du réactif NIT 1 et une goutte du réactif NIT 2. Si aucune coloration rouge n'est obtenue (attendre deux à trois minutes), ajouter une petite quantité de poudre de zinc.
- Noter les résultats sur la fiche de lecture.

Tableau 1: Lecture d'une galerie API 20 E

Test	Réactions	Composants actifs	Ajout de réactif	Résultat	
				négatif	positif
ONPG	Bêta-galactosidase	2-nitrophényl-bêta-Dgalactopyranoside	Non	Incolore	Jaune
ADH	Arginine dihydrolase	L-arginine	Non	Jaune	Orange ou Rouge
LDC	Lysine décarboxylase	L-lysine	Non	Jaune	Orange ou rouge
ODC	Ornithine décarboxylase	L-ornithine	Non	Jaune	Orange ou rouge

CIT	Assimilation du citrate	Citrate trisodique	Non	Vert pâle ou jaune	Bleu-vert ou bleu
$\underline{H_2S}$	Thiosulfate réductase	Thiosulfate de sodium	Non	Incolore ou grisâtre	Dépôt noir
<u>URE</u>	Uréase	Urée	Non	Jaune	Orange ou rouge violacé
TDA	Tryptophane désaminase	L-tryptophane	TDA	Incolore ou jaune	marron ou brun foncé
IND	Production d'indole	L-tryptophane	James	Incolore ou Jaune	Rose ou rouge
VP	Production d'acétoïne	Pyruvate de sodium	VP1 VP2	Incolore	Rose ou rouge
GEL	Gélatinase	Gélatine de boeuf	Non	Non diffusion du charbon	Diffusion du charbon
GLU	Glucose	D-glucose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MAN	Mannitol	D-mannitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Inositol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SOR	Sorbitol	D-sorbitol	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
RHA	Rhamnose	L-rhamnose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
SAC	Saccharose	D-saccharose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
MEL	Mélibiose	D-mélibiose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Amygdaline	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune
ARA	Arabinose	L-arabinose	Non	Bleu ou bleu vert	Jaune

Pour les tests dont les sigles sont écrits en lettres noires, seul le tube doit être ensemencé.

- Pour les tests CIT, VP et GEL, le tube et la cupule doivent être ensemencés.
- Pour les tests dont les sigles sont soulignés, seul le tube doit être ensemencé.
- Aprèsensemencement, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine pour créer une Anaérobiose

Annexe III: Les figures des Profiles numériques

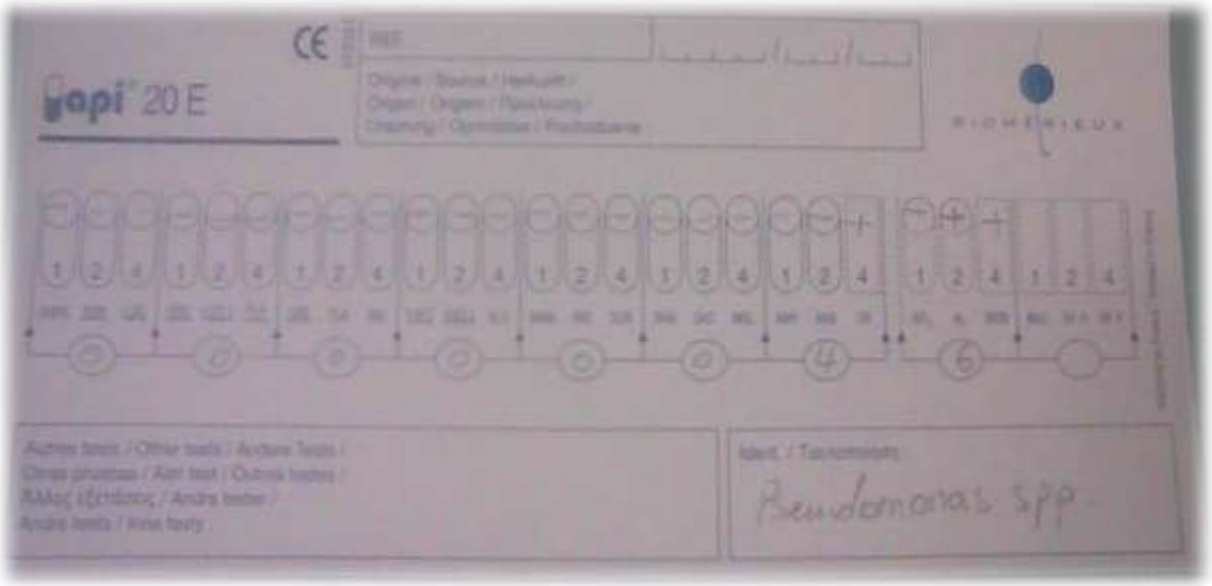


Figure III.1. Profile numérique pour l'identification de *Pseudomonas Spp1*

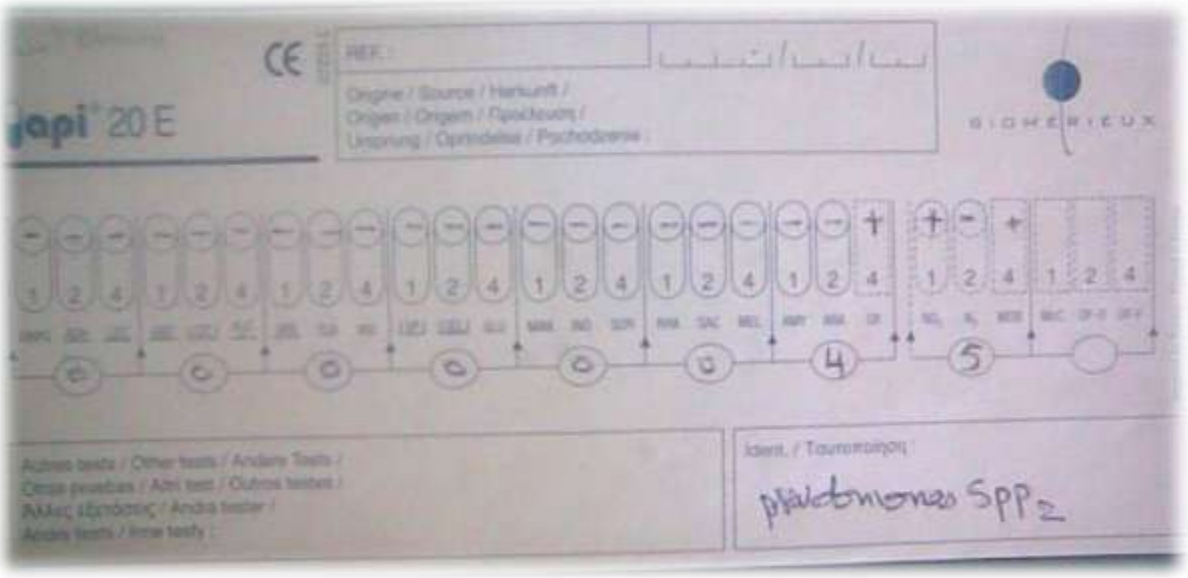


Figure III.2: Profile numérique pour l'identification de *Pseudomonas Spp2*

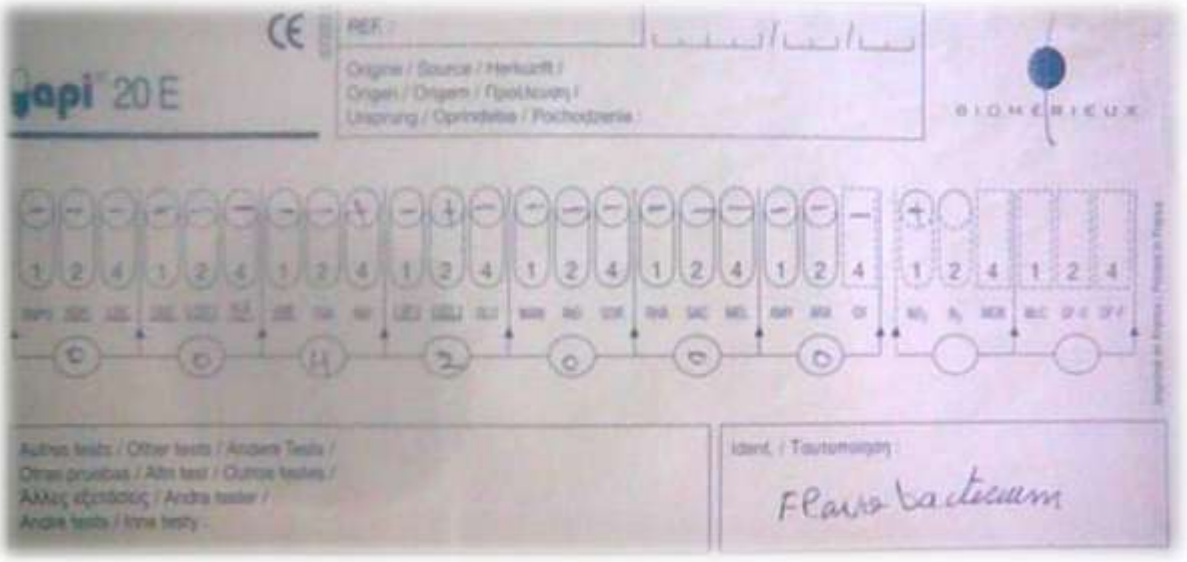


Figure III.3. Profile numérique pour l'identification de *Flavobactérieum*



Figure III.4. Profile numérique pour l'identification la souche *serratia liquefaciens*