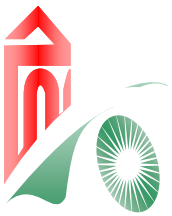
République Algérienne Démocratique et Populaire.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique

Université de Médéa.



Faculté des Sciences et Technologie

Département Génie des Procédés et Environnement.

MASTER EN GENIE DES PROCEDES.

Option : Génie des procédés pharmaceutiques.

Thème:

Criblage des souches thermophiles productrices de biosurfactants et optimisation de conditions opératoires.

Réalisés par *:*

- **BELFERRAH Rachida.**
- **BENHADJ meaamer Ahlem.**

Proposé et dirigés par :

- ***Dr : FERHAT. Samira.***
- ***M^{me} : RAHEM. F. zohra.***

JUIN 2014.

Remerciements :

Avant tous nous remercions ***ALLAH*** *maître de l'univers sans qui nous n'aurions jamais pu confectionner ce travail, et notre grand salut sur le premier éducateur notre prophète* ***MOHAMED (Sala Elah ailayhi wa salam).***

Nous tenons à remercier notre promotrice ***Dr: FERHAT .SAMIRA*** *d'avoir accepter de diriger ce travail.*

Nous tenons à remercier aussi notre Co-promotrice Meme : ***RAHEM.F*** *pour ses conseils, sa présence continuelle et son appui.*

Nous devons mentionner le soutien des membres du laboratoire de biologie I et d'analyses physico-chimiques du Hall Technologique pour leur aide, particulièrement Mr : ***ALOUAOUI. Redha*** *pour sa présence dans les moments les plus difficiles.*

Nous tenons à remercier aussi ***Pr*** *: Mr :* ***HANINI. S, Mr****:* ***Laîdi.M*** *et* ***Melle*** *:* ***zoumbiaya yamina*** *d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

Sans oublier de remercier :

Les médecins et Les technicien du laboratoire de bactériologie du– ***HOPITAL MOHAMED BOUDHIAF-MEDEA,*** *et surtout* ***Mr : benbakheta.KH.***

Et *Nous tenons à remercier aussi tous les agents du Hall Technologique pour leur aide, particulièrement responsable de la sécurité* ***Mr : MAZARI Soufiane.***

Enfin nous tenons à remercier tous les professeurs qui ont contribué pour nous former durant notre cursus universitaire.

Dedicaces

A la source de tendresse, de générosité, de bonheur, à celle qui a consacré sa vie pour que je réussisse dans tout ce que j'entretiens, à toi ma très chère mère ***FAYZA,*** *que je souhaite une longue vie.*

A celui qui a sacrifié beaucoup pour moi et qui m'a appris beaucoup de la vie à mon père ***MOHAMED.***

A mes frères YOUNES et AHMED.

A mes sœurs HAFSA ET AMIRA.

A mon marie 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 ex primer mes

Remerciements.

A ma grande famille, grands et petits.

A toutes mes amies surtout : IMEN, NAWEL, RAFIKA, NADIA et SOUMIA.

A ma promotion de MASTER 2 en particulier ceux avec qui j'ai passe de très bons moments.

A celle qui a partagé le bon et le pire dans la réalisation de ce travail, à ma chère amie

RACHIDA.

A mes enseignants …

AHLEM.

Dedicaces

A la source de tendresse, de générosité, de bonheur, à celle qui a consacré sa vie pour que je réussisse dans tout ce que j'entretiens, à toi ma très chère mère ***KHIARA,*** *que je souhaite une longue vie.*

A celui qui a sacrifié beaucoup pour moi et qui m'a appris beaucoup de la vie à mon père ***MOHAMED.***

A mes frères MUSTAPHA, ALI BEN SOUNA, et KHALED.

A mes sœurs KARIMA et sahra.

A toutes mes amies dans HAUL DE TCHNLOGIE du Médéa : AMINA. RADHIA ET RADHIA, LIALA, AMEL, NACIMA, AMINA, SOUAAD…

Et surtout M.MA3ZOUZ ET M.SEKANDER

A ma promotion de MASTER2 en particulier ceux avec qui j'ai passe de très bons moments.

A celle qui a partagé le bon et le pire dans la réalisation de ce travail, à ma chère amie ***AHLEM*** *BELHADJ.*

A mes enseignants …

Je dédie ce modeste travail.

A MON MARIE SOUFIANE ET
Ma PTITE FILLE AHLEM.

RACHIDA.

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces.

Résumé.

Table des matieres.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 les tensioactif. ……..1

I.1.1 Introduction. ……..1

I.1.2 Description. ……..1

I.1.3 Les différentes classes de tensioactifs. ……2

I.1.3.1 Les tensioactifs anioniques. ……2

I.1.3.2 Les tensioactifs cationiques. ……...4

I.1.3.3 Les tensioactifs zwitterioniques. ……5

I.1.3.4 Les tensioactifs non ioniques. ……5

I.1.3.5 Les tensioactifs naturels. ……7

I.1.4 Applications. ……8

I.2 les biosurfactant.

I.2.1 Introduction……..10

I.2.2 Définition ……10

I.2.3 Classification ……11

I.2.4 Production de biosurfactants……12

I.2.4.1 Microorganismes producteur……...13

I.2.4.2 Méthodes de criblage des souches productrices de biosurfactants. ...14

I.2.4.3 Paramètres influençant la production ….. ……..16

I.2.4.4 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance ……17

I.2.5 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants. ….. ……...18

I.2.6 Identification des biosurfactants. ……22

I.2.7 Avantage des biosurfactants. ……21

I.2.8 Biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique. ……22

I.2.9 Conclusion. ……24

CHAPITRE II: ETUDE EXPERIMENTALE.

II.1 Introduction. ……. ……25

II.2 Materials et produits utilises. ……25

II.2.1 Materials utilisés. ……25

II.2.2 Produits utilisés. ……..25

II.2.2.1 Microorganisms. ……25

II.2.2.2 Conservation des souches isolées. ……27

II.2.2.3 Conditions de culture. ……...27

II.2.2.4 Materials et réactifs utilisés. ……29

II.3 Méthodes de travail analytiques. ……..29

II.3.1 Identification des souches purifies. ……29

II.3.2 Criblage de la meilleure souche productrice de biosurfactant. ……31

II.4 Optimisation de la production de biosurfactant. ……33

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

II.6 Extraction du biosurfactant. ……...35

II.7 Caractérisation du Biosurfactant. ……37

II.7.1 Caractérisation structurale du biosurfactant. ……...37

II.7.2 Caractérisation physico-chimique. …….. ……37

II.8 Résultats et discussions. ……38

II.8.1 Criblage des produits utilisé. ……...38

II.8.1.1 Criblage une souche bactérienne productrice de biosurfactants. ….38
II.8.1.2 Criblage de milieu de la culture. ……39
II.8.1.3 Criblage des hydrocarbures ou des huiles pour d'index d'émuls. .. 40
II.8.2. Identification de la souche bactérienne Nij. ……...42
II.8.2.1 Caractères macromorphologiques. ……...42
II.8.2.2 Caractères macromorphologiques. ……...42

II.8.3. Optimisation des parameters opératoires de la production de biosurfactant. ……...43

II.8.3.1 Effet de la Source Carbone. ……43

II.8.3.2 Effet de la concentration de la source de Carbone. ……....45

II.8.3.3 Effet de la Source d'azote. ……. ……47

II.8.3.4 Effet de la concentration de la source d'azote. ……48
II.8.3.5 Etude la cinétique de la production. ……...50
II.8.4 Separation du biosurfactant. ……..52
II.8.5 Caractérisation du Biosurfactant . ……. ……52
II.8.5.1 Caractérisation structurale. …….....52
II.8.5.2 Caractérisation fonctionnelle. ……54
II.8.5.3 Caractérisation physico-chimique. …… …55

CONCLUSION GENERALE… ……
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.
ANNEXES.

Liste des Figures

Chapitre I:

Figure I.1: Structure simplifiée d'un tensioactif. ……1
Figure I.2: Exemple de savon à base d'acide l'aurique. …… .3
Figure I.3: Exemple de tensioactif anionique sulfoné ……..3
Figure I.4: Exemple de tensioactif sulfate: le dodecyle sulfate de sodiume……..4.
Figure I.5: Exemple de tensioactifs cationiques. ……4
Figure I.6: Enchainement de réactions permettant d'obtenir un tensioactif ammonium quaternaire. ……4
Figure I.7: Exemples de tensioactifs zwitterioniques. . ……..5
Figure I.8: Exemple de polyoxyéthyléne POE. ……...6
Figure I.9 : Exemples de tensioactifs à base de polyols. ……7

Figure I.10: Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant……20

Chapitre II:

Figure II.1: Localisation de la region de Hassi -Messaoud. ……26

Figure II.2: Sols contaminés par le pétrole brut. ……....26

Figure II.3: Incubateur secoueur pour Cultivation de la souche. ……28

Figure II.4: Tensiomètre à anneau. ……....32

Figure II.5: Mesure d'$E_{24.}$. ……..33

Figure II.6: Procédure de production et extraction de biosurfactant. ……36

Figure II.7: Criblage une souche bactérienne productrice de biosurfactants. ……..38

Figure II.8 : Criblage un milieu producteur de biosurfactants. ……40
Figure II.9: Choix d'hydrocarbure et huile. ……41

Figure II.10: Influence de la source de Carbone sur la production de biosurfactant par la souche Nij. ……..44

Figure II.11: Influence de la concentration du pétrole brut sur la production de biosurfactant par la souche Nij. ……..46

Figure II.12: Influence de la source d'azote sur la production de biosurfactant par la souche Nij (source de Carbone). ……..47

Figure II.13: Influence de la concentration du NH_4Cl sur la production de .biosurfactant par la souche Nij. …… …..49

Figure II.14: Effet de la concentration de NH_4Cl sur l'E_{24}. ……49

Figure II.15: Variation de la tension superficielle et l'indice d'émulsification en Fonction du temps. ……..51

Figure II.16: Pouvoir emulsification d'E_{24} pendant la cinétique. ……...51

Figure II.17: Spectre infrarouge du biosurfactant produit par la souche Nij. ……..53

Figure II.18: Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant. ……55

Figure II.19: Variation de la tension superficielle TS (dyn/cm) en fonction du pH….57

Figure II.20: Influence de la concentration du NaCl sur la tension superficielle TS..58

Figure II.21: tension de surface en function de la concentration en biosurfactant…60

Liste des Tableaux

Chapitre I:

Tableau I.1: Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire. ……6

Tableau I.2: Principaux types de surfactants biologique. ……13

Chapitre II :

Tableau II.1: Valeurs de la TS du surnageant pour chaque souche bactérienne…38

Tableau II.2: Valeurs de la TS du surnageant pour chaque milieu. ……..39

Tableau II.3: Valeurs de la E_{24} du surnageant pour chaque hydrocarbures. ……40

Tableau II.4: Pouvoir émulsification sur hydrocarbures et l'huiles. …… 41

Tableau II.5: Caractères macroscopiques de la colonie isolée à partir de la souche Nij Sur la gélose nutritive (LB). ……..42

Tableau II.6: Caractères microscopiques de la souche Nij. ……42

Tableau II.7: Production du biosurfactants à partir de divers sources de carbone……43

Tableau II.8: Production du biosurfactants avec des différentes concentrations du pétrole brut. ……45

Tableau II.9: Production du biosurfactants à partir de divers sources d'azote. …..47

Tableau II.10: Production du biosurfactants des concentrations du NH_4Cl ……..48

Tableau II.11: Cinétique de production du biosurfactant. ……50

Tableau II.12: Groupements caractéristiques du biosurfactant. ……53

Tableau II.13: Stabilité thermique du biosurfactant. ……55

Tableau II.14: Stabilité chimique du biosurfactant <<effet de pH >>. ……56

Tableau II.15: Stabilité chimique du biosurfactant <<effet de NaCl>>. ……..58

Tableau II.16: variation de la tension superficielle en function de la concentration de biosurfactant……..59

Listes des symboles et des abbreviations

°C:	Degré Celsius
CMC:	Concentration micellaire critique.
Dyne/cm:	Dynes par centimètre.
E_{24}:	Indice d'emulsification.
g/l:	gramme par litre.
h:	heure.
H.M:	Huile d'moteur.
HLB:	Balance hydrophile lipophile**.**
l:	litre.
LB:	Milieu nutritive.
m3:	mètre cube.
mg/g:	milligramme par litre.
mg/ml:	milligramme par millilitre.
min:	minute.
ml:	millilitre.
M.M:	Milieu de minimum.
mM:	milli Mole.
M.P:	Milieu de production.
nm:	nanometer.
p/p:	Poids par Poids.
S.C:	Source carbone.
S.O:	Condition optimum.
tr/min:	tour par minute..
TS:	Tension superficielle.
µ M:	micro Mole..
Vol:	Volume.
v/v:	Volume par Volume.
%:	pourcentage.

Résumé

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

Les résultats obtenus pour la souche performante révèlent que : (**a**) la souche thermophile **Nij** a montré une capacité productrice importante de biosurfactant traduit par la faible valeur de la tension de surface (30 dyn/cm), (**b**) l'huile de moteur (2 %, v/v) présente la meilleure source de carbone, (**c**) le biosurfactant de la souche **Nij** détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [4 à 100 °C], (**d**) finalement, l'étude phénotypique a montré que la souche **Nij** est affilée à l'espèce Bacille sporulé.

Mots clés: bactérie thermophile, biosurfactant, optimisation, caractérisation, Bacille sporulé.

Abstract

In this work, we conducted a study on the optimization and characterization of a biosurfactant, from a thermophilic strain, screened from seven strains isolated locally from a sandy soil previously contaminated by oil from the region Hassi Mesaoud (south of Algeria).

The results obtained for the effective strain show that: **(a)** the thermophilic strain **Nij** showed significant productive capacity of biosurfactant translates the low value of the surface tension (30 dyn / cm), **(b)** engine oil (2%, v / v) has the best carbon source, **(c)** the biosurfactant of the strain has **Nij** interesting surface active properties; it is thermally stable in a very wide temperature range [4 to 100 ° C], **(d)** finally, the phenotypic study showed that the strain is **Nij** row to the species Bacille sporulated

Keywords: thermophilic bacteria, biosurfactant, optimization, characterization, Bacille sporulated.

ملخص

في هذه العمل قمنا بإجراء دراسة لإنتاج وتوصيف مفاعل سطحي ناتج عن سلالة محبة للحرارة المرتفعة معزولة من تربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود، جنوب الجزائر) منتقاة من بين سبعة سلالات .
النتائج المتحصل عليها: **(ا)** أظهرت السلالة المحبة للحرارة المرتفعة **Nij** إنتاجا قويا للمفاعل السطحي معبر عنه بدرجة كبيرة من التوتر السطحي (30 dyn/cm) ، **(ب)** يمثل زيت المحرك (2%) أفضل مصدر للكربون لعملية الإنتاج. **(ج)** أظهر المفاعل السطحي المنتج خصائص هامة مثل الاستقرار الحراري في نطاق واسع من درجة الحرارة [4-100 م°]، لديه مقاومة جيدة في الوسط الحمضي والقاعدي [الاس الهيدروجيني= 2-12]. **(د)** بينت نتائج التحديد المظهري و باستعمال (API 50 CH) أن السلالة **Nij** تنتمي إلى جنس *Bacillus*.

<u>الكلمات المفتاحية:</u> المفاعل السطحي ـ بكتيرية محبة للحرارة المرتفعة - توصيف و خصائص المفاعل السطحي- بكتيريا Bacillus.

Introduction générale

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

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

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

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

1ère *PARTIE :* LES TENSIOACTIFS.

I.1 les tensioactifs

I.1.1. Introduction

Durant les années 20 et 30, les développements en chimie ont permis des progrès dans le domaine des tensioactifs et des détergents en augmentant le nombre de familles de matériaux utilisables. Très importants aux niveaux économique et commercial, mais aussi les applications aussi diverses que les produits pharmaceutiques et la récupération du pétrole brut qui ont accentué la nécessité de compréhension et de manipulations d'interfaces par le biais de l'action de tensioactifs. ***Vipulanandan C. et Ren X., (2000)***

I.1.2. Description

Les tensioactifs ou agents de surface sont des molécules synthétiques ou naturelles possédant une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) liée à un groupement à caractère hydrophile (appelée tête polaire) comme illustré sur la **Figure I.1**. Ces molécules constituées de deux parties d'affinité opposée sont dites amphiphiles. (***Tensamani K. R,2007)***

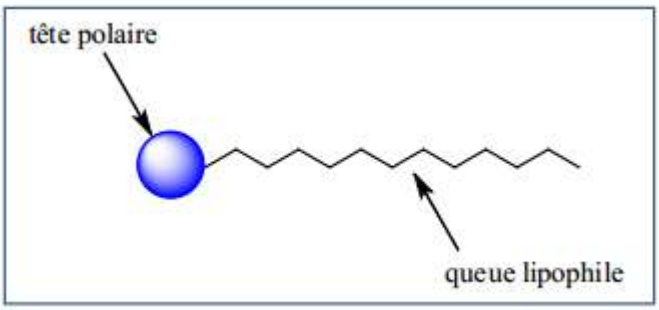


Figure I.1 : Structure simplifiée d'un tensioactif.

Leur structure particulière permet aux agents de surface de se concentrer :

- aux interfaces liquide-liquide à cause de l'amphiphilie qui les caractérise. Chaque groupement se dirige vers le liquide pour lequel il a le plus d'affinité.

- aux interfaces liquide-gaz et liquide-solide, le liquide repoussant vers l'extérieur les groupements qui ont une affinité opposée.

L'ambivalence de la structure et la diversité des propriétés d'usage des tensioactifs font partie depuis 1950 de notre quotidien : tantôt comme matières actives pour notre hygiène corporelle, pour le nettoyage de nos vêtements et notre vaisselle, tantôt comme auxiliaire de formulation dans la fabrication du textile et des fibres, des peintures et plastiques, dans l'industrie du papier, des pesticides et dans d'autres secteurs variés, entre autres du cuir, de la métallurgie et pour la formulation des engrais ***Schorsch G.2008*** Leur intérêt intrinsèque, leur large production et leurs applications justifient la recherche sans cesse croissante de nouvelles structures, propriétés et performances, ainsi qu'une conscience accrue de leur impact sur l'environnement (procédés de synthèse à écotoxité réduite, tensioactifs biodégradables, …) (***Noiret N.,*** ***Benvegnu T****. and* ***Plusquellec D. 2002)***

I.1.3. Les différentes classes de tensioactifs

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés en fonction :

- de la nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère)

I.1.3.1. Les tensioactifs anioniques :

Les tensioactifs anioniques possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels. Ces composés sont les plus utilisés à l'échelle industrielle, on les retrouve principalement dans les produits cosmétiques comme le savon, les shampooings et les gels de douche, Ils ont un fort pouvoir moussant et émulsionnant, mais leur efficacité diminue en eau dure. Ils peuvent être subdivisés en trois principaux groupes **(*Larpent C, 1993)***:

- les savons dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium d'un acide carboxylique. Ils sont obtenus par saponification des triglycérides d'origine animale ou végétale **Figure I.2**

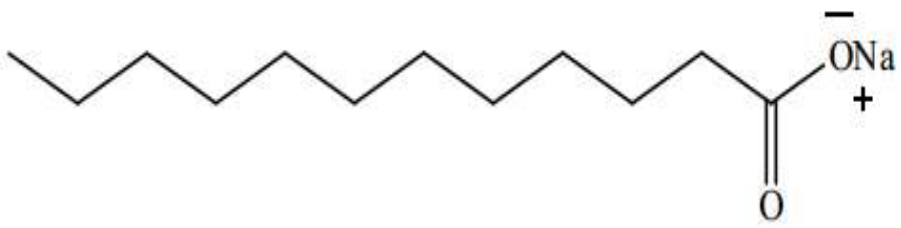


Figure I.2 : Exemple de savon à base d'acide l'aurique.

- les composés sulfonés de formule générale $RSO^{3-}Na^{+}$ qui constituent la matière première tensioactive la plus utilisée dans les formulations détergentes. Les plus connus sont les alkylbenbène sulfonates linéaires ou ramifiés. Ils entrent dans la composition des pesticides en améliorant l'efficacité de traitement de lavage de sol **Figure I.3**. (***Wang P. 2009)***

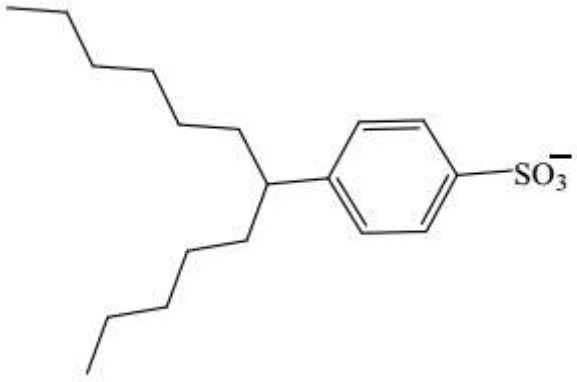


Figure I.3 : Exemple de tensioactif anionique sulfoné : alkyl benzène sulfonate.

- Les composés sulfatés proviennent de la sulfatation d'un alcool **Figure I.4**. Leur intérêt résulte dans la possibilité de synthétiser une large gamme de molécules à l'hydrophobicité variable. La plus connue est le dodécylsulfate de sodium (SDS) dérivé du dodécanol. Ils ont un pouvoir moussant très élevé, mis à profit dans la préparation des shampoings et des bains moussants.



Figure I.4 : Exemple de tensioactif sulfate : le dodecyle sulfate de sodium.

I.1.3.2. Les tensioactifs cationiques :

Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par une partie hydrophile chargée positivement. Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaire triméthylés ou des sels de pyridinium **Figure I.5**. (***E. Jungerman***) :

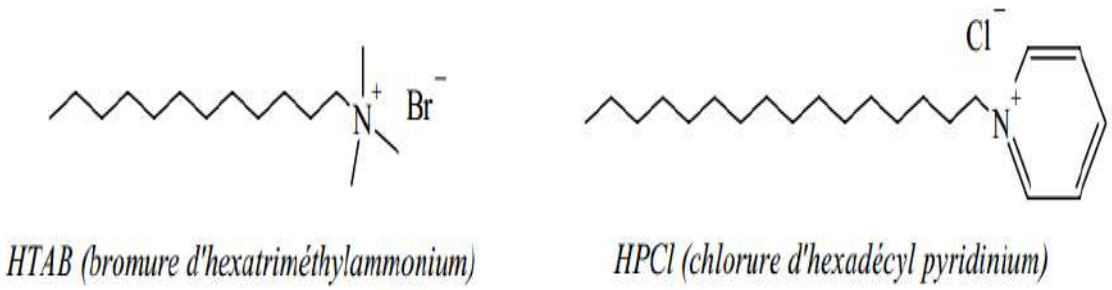


Figure I.5 : Exemple de tensioactifs cationiques : le HTAB et le HPC.

D'un point de vue industriel, leur fabrication se fait à partir d'un acide gras sur lequel on opère les transformations décrites ci-dessous **Figure I.6** :

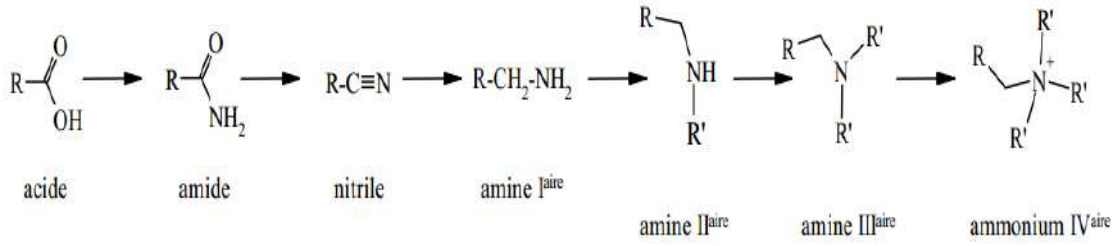


Figure I.6 : Enchainement de réactions permettant d'obtenir un tensioactif ammonium quaternaire.

De nombreuses réactions chimiques étant nécessaires pour obtenir cette famille de tensioactifs, leur coût de fabrication est nettement plus élevé. C'est principalement pour cette raison qu'ils ne sont utilisés que dans le cas où on ne peut les substituer par des composés anioniques ou non ioniques.

I.1.3.3. Les tensioactifs zwitterioniques :

Les tensioactifs zwitterioniques, ou amphotères, possèdent sur la partie hydrophile à la fois une charge positive et une charge négative **Figure I.7**. Ce type de tensioactifs peut alors aisément devenir cationique ou anionique selon le pH de la solution dans laquelle ils sont solubilisés. Cette structure dipolaire s'apparente à celle des phospholipides naturels et conduit à une famille de produits généralement non irritants et peu agressifs sur le plan biologique.

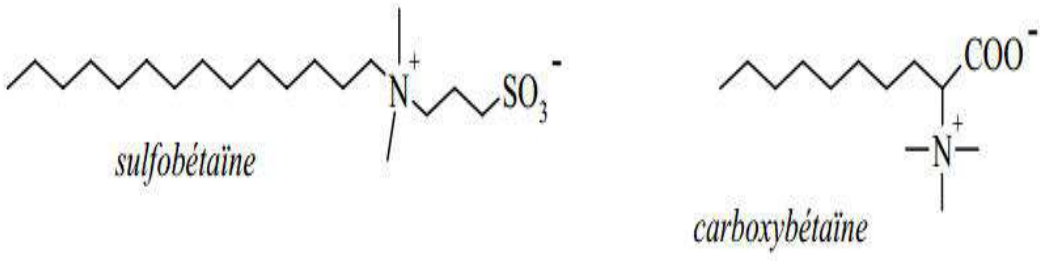


Figure I.7 : Exemples de tensioactifs zwitterioniques : la sulfobétaine et la caboxybétaine.

I.1.3.4. Les tensioactifs non ioniques :

Les tensioactifs non ioniques (***M.J. Schick,1988***) constituent la classe la plus récente de surfactants. C'est la société Dupont de Nemours qui a produit dans les années après-guerre les polyoxyéthylènes (POE) issus de la polymérisation d'unités oxyde d'éthylène sur des alcools gras **Figure I.8**. De faible coût, ils sont rapidement utilisés pour leurs performances tensioactives à faible concentration. Peu moussants ils rentrent dans la composition des lessives.

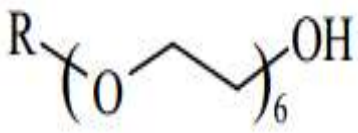


Figure I.8 : Exemple de polyoxyéthyléne POE.

Le tableau ci-dessus indique les différents tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire.

Tableau I.1 : Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire. ***(Noiret and al. 2002)***

	Exemples de tensioactifs	Principales propriétés et applications
Anioniques	savons ($RCOO^-$) carboxylates (RCO_2^-) sulfonates (RSO_3^-)	agents nettoyants (détergents) agents moussants
Non ioniques	éthoxylates polyols alkylpolyglucosides (APG)	émulsifiants mouillants non irritants (produits de soin de la peau)
Cationiques	amines (R_3NH^+) ammoniums quaternaires (R_4N^+) esters d'ammonium quaternaire	adoucissants textiles émulsionnants, bactéricides shampoings
Amphotères	bétaïnes phospholipides	moussants détergents peu irritants (hygiène corporelle)

- de la longueur de la partie lipophile qui permet de classer les tensioactifs en agents mouillants (C_8 -C_{10}), détergents (C_{12}-C_{16}), émulsionnants ou adoucissants (C_{18}-C_{22}) ***(Noiret and al. 2002)*.**
- de leur origine, naturelle ou synthétique.

I.1.3.5. Les tensioactifs naturels :

Le terme de tensioactif naturel est ambigu. Pris au sens strict, un tensioactif naturel est issu de ressources naturelles. Cette source peut être d'origine animale ou végétale.

Les termes de tensioactif naturel et de biotensioactif sont donc souvent utilisés dans un sens plus large. En effet, les tensioactifs synthétisés à partir de matière première naturelle sont généralement qualifiés de naturels. Ainsi un tensioactif dont l'une de ses parties, hydrophobe ou hydrophile, est obtenue à partir d'une source naturelle est appelé tensioactif naturel ou biotensioactif. Par la suite, ces termes seront utilisés au sens large ***(Noiret and al. 2002)***

Les principaux tensioactifs naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkylpolyglucosides (APG), les sucroesters et les alkylglucamides **Figure I.9**; soit dérivés d'acides aminés. Les tensioactifs dérivés de polyol sont non ioniques, contrairement aux dérivés d'acides aminés.

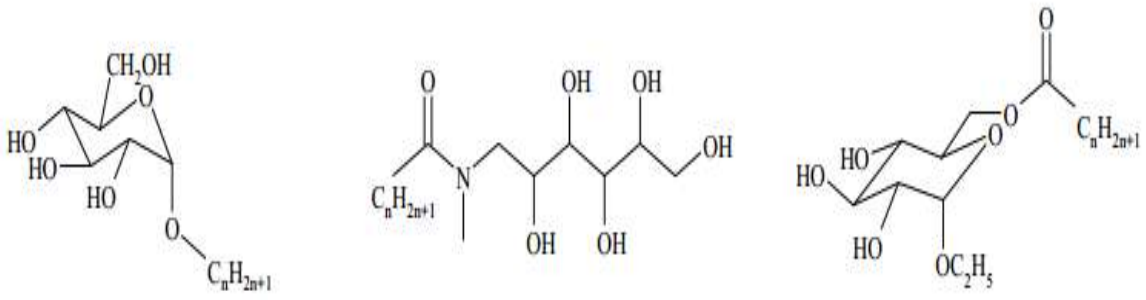


Figure I.9 : Exemples de tensioactifs à base de polyols.

I.1.4. Applications

- Les tensioactifs sont parfois classés selon la fonction qu'ils remplissent(***wikipidia)***:

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

- Les agents de solubilisation. A très faible concentration, les tensioactifs forment des solutions vraies dans une phase aqueuse. Lorsque leur concentration dépasse une certaine valeur (la concentration micellaire critique, CMC), les molécules tensioactives se regroupent en micelles. Par ce biais, certains tensioactifs font passer en « solution » des substances normalement insolubles dans le solvant utilisé en les insérant dans les micelles. Les agents de solubilisation ont souvent une HLB comprise entre 18 et 20.
- Les agents moussants. La formation de mousse, dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide, requiert la présence de tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air. Les agents moussants ont souvent une HLB comprise entre 3 et 8.
- Les agents mouillants. Le mouillage d'un solide par un liquide correspond à l'étalement du liquide sur le solide. En diminuant la tension superficielle solideliquide, les agents mouillants permettent un plus grand étalement du liquide. Les agents mouillants ont généralement une HLB comprise entre 6 et 8.
- Les agents dispersants. Ils permettent de créer une dispersion en prévenant la floculation des particules.
- Les agents émulsifiants. Ils facilitent la formation d'une émulsion entre deux liquides non miscibles.

- Les tensioactifs peuvent aussi être classés suivant le secteur où ils sont utilisés :

- Traitement du cuir.

- Synthèse et formulation de matières plastiques.
- Nettoyage et dégraissage des matériaux.
- Extraction des minerais.
- Formulation des peintures et vernis.
- Opérations de l'industrie pétrolière.
- Formulation de produits phytosanitaires et d'engrais.
- Traitement du textile.

I.2 Les biosurfactants

I.2.1. Introduction

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

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

I.2.2. Définition

Les biosurfactants sont 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 constituée d'acides gras saturés ou non saturés ***(DESAI et BANAT, 1997)*.**

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants: les cationiques qui possèdent une charge positive ; les

anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre ***(WEST et HARWELL, 1992).***

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification ***(WEST et HARWELL, 1992)*.**

I.2.3. Classification

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. La revue bibliographique révèle que la majorité des biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique ***(DESAI et BANAT, 1997).*** Il existe peu de structures cationiques (**Mulligan C.N, (2005))**: cependant et dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule, ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (**Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R**, **(1996)).**

I.2.3.1. Les glycolipides

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

I.2.3.2. Les lipopeptides

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

I.2.3.3. Les phospholipides

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

I.2.3.4. Les lipopolysaccharides ou polymériques

Sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras.

I.2.3.5. Les acides gras et lipides neutres

Sont les biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.
On note que les biosurfactants de types glycolipides et phospholipides sont les plus connus et les plus étudiés.

I.2.4. Production de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes, notamment les bactéries, se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone. Le **Tableau I.2** rassemble quelques microorganismes producteurs de biosurfactants.

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

Les bactéries utilisées pour produire de biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des composés insolubles (hydrocarbures). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de sélectionner les souches productrices de biosurfactants et d'optimiser les paramètres

abiotiques influençant la production (sources de carbone et d'azote, température, salinité, pH, …).

Tableau I.2 : Principaux microorganismes producteurs de biosurfactants ***(Desai et Banat, 1997).***

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

I.2.4.1. Microorganismes producteurs :

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, les huiles ou les

hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries.

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de quatre rhamnolipides ***(VAN DYKE et al, 1993).***

Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées ***(BANAT et al., 2000).*** La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance. Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu ***(THANGAMANI et SHREVE, 1994)*.**

I.2.4.2. Méthodes de criblage des souches productrices de biosurfactants :

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

a. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

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

Cameotra ,1997) ont trouvé une corrélation directe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la production de biosurfactant.

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

b. Activité hémolytique

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

c. Tension de surface

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

$$\sigma L = \frac{(\sigma W * Nw * \rho L)}{(NL * \rho w)}$$

$\boldsymbol{\sigma_L}$ est la tension superficielle du liquide, $\boldsymbol{\sigma_W}$ est la tension superficielle de l'eau, $\mathbf{N_L}$ est le nombre de gouttes de liquide, $\mathbf{N_w}$ est le nombre de gouttes de l'eau, $\boldsymbol{\rho_L}$ est la densité du liquide, $\boldsymbol{\rho_W}$ est la densité de l'eau.

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

I.2.4.3. Paramètres influençant la production :

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

a. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les 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 ***(DESAI et BANAT, 1997).*** En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes ***(CAMEOTRA et MAKKAR, 1998).***

b. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices ***(LANG et WULLBRANDT, 1999).***

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 ***(GABET, 2004).***

c. Influence du pH

Arino et al.indiquent que pour une souche de Pseudomonas aeruginosa, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6.0 et 6.5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactant qui chute rapidement. D'autres souches comme

Norcardia corynbacteroidessont inaffectées par des pH varient de 6.5 à 8.0 ***(DESAI et BANAT, 1997)*.** (***Ishigami et al(1987)),*** 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 **(*Chompion J.T; Gilkey (1995)).***

d. Influence des sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (***GUERRA SANTOS et al, 1986).***

e. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance ***(GABET, 2004).***

f. Influence de la vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures ***(DESAI et BANAT, 1997)*.**

I.2.4.4. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. ou des techniques reposant sur

la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices ***(DESAI et BANAT, 1997)*.**

I.2.5. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants :

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

a. Réduction des tensions superficielle et interfaciale

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

b. Biodégradabilité

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

c. Faible toxicité

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

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

d. Pouvoir émulsifiant

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

e. Activité biologique

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

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

f. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est définie comme étant la concentration au-delà de laquelle les molécules de tensioactifs s'associent et s'arrangent sous forme d'agrégats particuliers appelés micelles ***(Desai et al, 1994)*.** En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau **Figure I.10**. La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale. La CMC d'un biosurfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques ***(Abouseoud et al, 2008)*.**

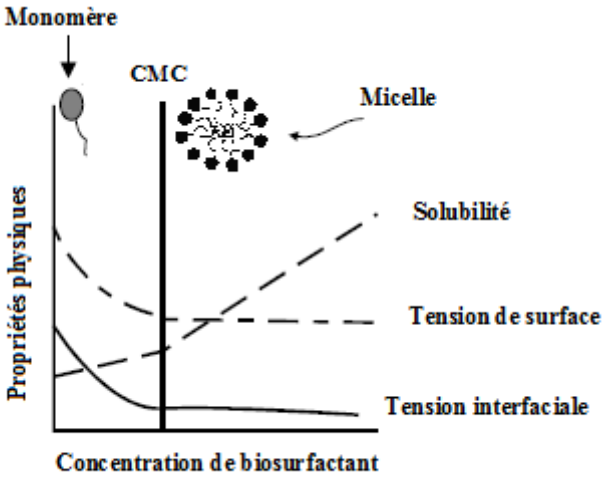


Figure I.10 : Variation de la tension interfaciale, de la tension de surface et la solubilité en fonction de la concentration du biosurfactant ***(Abouseoud et al, 2008)***.

I.2.6. Identification des biosurfactants

Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquemment :

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore ***(spoechner et al. 1999).***
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels ***(Peypoux et al, 1999).***
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule ***(Daniels et al, 1999)*.**

- La résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser ***(Daniels et al, 1999).***

I.2.7. Avantage des biosurfactants

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

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

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

I.2.8. Biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique

I.2.8.1. Principaux constituants des préparations pharmaceutiques :

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

a. Constituants huileux

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

b. Eau et constituants polaires

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

c. Agents tensioactifs

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

I.2.8.2. Implications biologiques de l'utilisation des tensioactifs chimiques :

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

En ce qui concerne l'épiderme, ils peuvent réduire son contenu en substances hydrosolubles et hygroscopiques, et aussi en lipides, altérant sa capacité

naturelle à retenir l'eau, réduisant sa flexibilité et son élasticité et produisant une peau rêche et sèche.

Ils peuvent également augmenter la perméabilité de l'épiderme en dénaturant les protéines de la couche cornée et faciliter la diffusion de molécules polaires dans l'épiderme. Ils sont aussi capables de modifier le métabolisme de l'épiderme, tant des lipides (réduisant la synthèse des phospholipides) que des acides nucléiques et nucléotides, et de réduire son activité respiratoire ***(Attwood et Florence, 1983)*.** C'est pour cette raison, qu'on s'oriente vers l'augmentation importante de la production des biotensioactifs.

I.2.8.3. Applications des biosurfactants dans l'industrie pharmaceutique :

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

I.2.9. Conclusion

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

Conclusion générale

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

Les résultats obtenus ont révélé que : Parmi les sept souches testées, une seule souche **Nij** montré une capacité productrice de biosurfactant remarquable traduit par la faible valeur de la tension de surface. Le pétrole brut (2%, v/v) comme source de carbone et NH_4Cl (4%, m/v) comme source d'azote présentes des bonnes sources pour la souche NIJ et cette dernière souche a été choisie comme performante.

La cinétique de dégradation de production maximale du biosurfactant a été obtenue après 40h à 25°C, avec une tension superficielle minimale de 30 dyn/cm et un indice d'émulsification égale à 80%.

Les résultats obtenus sur les caractéristiques physicochimiques et structurales de biosurfactant issu de la souche thermophile **Nij** ont montré que : le biosurfactant détient des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [4 à 100 °C], il présente une très bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12], également, il est efficace dans les milieux très salés (jusqu'à 65 mg/l).

Références Bibliographiques

- **Vipulanandan C. et Ren X., (2000).** Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (7): 629- 634.
- **Banat M., Makkar R. S. et Cameotra S. S., (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 53 : 495-508.
- **Tensamani K. R**.***2007****, Les technologies de laboratoires*, *5*, 19-24
- **Schorsch G***.**2008**, Actualité chimique*, n° 323-324, 6-8.
- **Noiret N**., **Benvegnu T**. and **Plusquellec D**. **2002**, *Actualite Chimique*, *n°258-259*, 70-75.
- **Larpent C**, **1993**, Techniques de l'ingénieur. 342, 1-15.
- **Wang P**. **2009**,, Keller A.A., Water Research, 43, 706-714.
- Pour revue, voir : **E. Jungerman**, dans "Cationic Surfactants", M. Dekker Eds., New York.
- pour revue : **M.J. Schick**,**1988** dans "Nonionic Surfactants",2 nd Edn, M. Dekker, New York.
- **West C.C. and Harwell J.H., (1992)**"Surfactants and subsurface remediation", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (12),), 2324 - 2330.
- **Desai J. D. et Banat I. M., (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1) : 47-64.
- **Sung-chyr et Hong-Jyh Jiang**, **(1997).** << Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of Bacillus subtilis by ultrafiltration >> . Biotechnology techniques 11(6): 413-416,
- **Bognolo. G**, **(2000)**<<Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A >>. Physico-Chemical and Engineering Aspects, 152, (1-2), 41-52.
- **Mulligan C.N, (2005)**<< Environmental application for biosurfactants >> . Environ. Pollut. 133 (2), 183-198.

- **Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R**, **(1996)**<< Microbial production of biosurfactants >> . Resources, Conservation and Recycling, 18, 41-57,

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

- **Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (2002).** "An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications", *Applied and Microbiological Biotechnology*, 58, (2002), 428 - 434.
- **MATA-SANDOVAL J. C., KARNS J. et TORRENTS A., (2000).** Effect of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on the solubilization of pesticides, Environ. Sci.Technol. , 34 (23) : 4923-4930.

- **VAN DYKE M. I., COUTURE P., BRAUER M., LEE H. et TREVORS J. T., (1993).**Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipidbiosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol., 39 : 1071-1078.

- **THANGAMANI S**. et **SHREVE G. S**., **(1994)**. Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, Environ. Sci. Technol. , 28 (12) : 1993-2000.

- **Pruthi V. and Cameotra S.S. (1997).** Rapid Identification of Biosurfactantproducing Bacterial Strains Using a Cell Surface Hydrophobicity Technique. Biotecnology Techniques. 11: 671 - 674.
- **Lee K.K. and Yii K.C. (1996)**. A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios", *Lett Appl Microbiol* 23, (1996), 343 - 346.

- **Cameotra S. S. et Makkar R. S., (1998)**. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 50 : 520-529.

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

- **Gabet S., (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine

biologique. *Thèse de doctorat de l'universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p. 177.

- **Arino. S, Marchal.R** et **Vandecasteele. J.P**, **(1996)** <<Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a Pseudomonas species >>. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 162-168,

- **Ishigami .Y, Gama.Y, Nagahora. H, Yamaguchi .M, Nakahara. H Et Kamata. T**, **(1987)** <<The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant>>. Chemistry Letters, 763-766,

- **Chompion J.T; Gilkey J.C; Lamparski H; Retterer J et Miller R.M**. **(1995)** <<Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morfology effect of pH, cadmium and octadecane>> J. Environ-qual, 24, 19-28,

- **Guerra-Santos L.H., Kapelli O. et Fiechter A**, **(1986)**<<Dependence of Pseudomonas aeruginosa contonuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors >>. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 443-448,.

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

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

- **Cirigliano M.C. and Carman G.M. (1985).** "Purification and characterization of liposan a bioemulsifier from candida lipolytica", *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 846 - 850.

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

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

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

- **Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y (2005).** Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by Pseudomonas aeruginosa". *Harmful Algae*. 4, 433 - 443.
- **Abouseouda, M., R. Maachib, A. Amranec, S. Bouderguaa and A. Nabia, (2008).** Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens.* Desalination, 223: 143-151.

- **Spoeckner S., V. Wray, M. Nimtz** et S. Lang **(1999).** Glycolipids of the smut fungus Ustilago maydis from cultivation on renewable resources. App.Microbiol. Biotechnol, 51 : 33-39.
- **Peypoux F., Bonmatin J.M et Wallach J**. **(1999)**. Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review App. Microbiol. Biotechnol. 51. Pp :553-563.
- **Daniels, C.J., J. D. Hofman,J. G. Mac William, W. F. Doolittle, C. R. Woese, K. R. Luehrsen, (1985).** & G. E., Fox Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archaebacterium Halobacterium volcanii. Mol Gen Genet 198 :0270-274.
- **Hirata Y. S., M. Ryu, Y. Oda, K Igarashi, A Nagatsuka, T. Furata and Sugiura M, (2009).** Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low foaming surfactants. J. Biosci. Bioeng., 108: 142-146.
- **Joshi, C. Bharucha, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, A.J. Desai, (2008)** Biosurfactant produc- tion using molasses and whey under thermophilic conditions, Bioresour. Technol. 99 195–199.

- **Attwood D. and Florence A.T. (1983).** Surfactant Systems : Their Chemistry, Pharmacy and Biology. Chapman and Hall, London.

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

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

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

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

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

- **MARTINEAU B., (1996).** Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. Edition DECLARIE ; Montréal **.**
- **LAPOINTE M., (1996).** Mobilisation en colonne d'un hydrocarbure Aromatique polycyclique (pyrène) adsorbé au sol au moyen d'un biotensioactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. *Mémoire de Maîtrise es Sciences, Université de Québec,Sainte-Foy*. P. 164.

- **Abu-Ruwaida.A.S, Batat.I.M, Salem.A, Haditirto.S, Kadri.M**, , **(1991).** <<Isolation of biosurfactant-producin bacteria product characterization, and evaluation>>.Acta.Biotechnologicq 11, vol 4, 315-324

- **Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L. and Whitman W.B., (1999)(2001)**, "Quantitative comparisons of 16Sr RNA genesequence libraries from environmental samples", *Appl. Environ. Microbiol*., 67, 4374

- **Marchal N. et Bourdon J. L., (1982).** Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris
- **Tortora G .J., Funke B.R. et Case C. L., (2003).**Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc*. pp : 157- 355.
- **DJERBAOUI Amina Nesrine M.MAGISTER (2011) :<<**UTILISATION DE SOUCHES BACTERIENNES AUTOCHTONES DANS LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANT ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS DE HASSI MESSAOUD CONTAMINES PAR LES HYDROCARBURES >>, s. Microbiologie Appliquée, UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA.

- **Bodour A. A, Gerrero-Barajas C. et Maier M. (2004)**. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp**.** Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.,* **10** (6): 1114-20.

- **Montreuil.J et Verbert.A << Analyse des glucides et des glycoproteines>**>. **(1994)**Techniques de l'ingénieur, Traité Analyse et caracterisation, p 3320 (1-24),.

- **MARTINEAU B., (1996)**. Systématique bactérienne, Guide d'identification des bactéries aérobies. *Edition DECLARIE ; Montréal*.
- **Persson A, E. Österberg, M. Dostalek (1988),** Biosurfactant production by Pseudomonas fluorescens 378: growth and product characteristics, Appl. Microbiol. Biotechnol.29 (1), 1– 4.

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

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

- **Brown M. J. (1991).** Biosurfactants for cosmetic applications, *International Journal of Cosmetic Science*, 13, (1991), 61 - 64.

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

- **ABDELMALEK Djihed : M.MASTER II (2012)**,<< Criblage des souches productrices de biosurfactants en vue d'une application pharmaceutique >>.

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

- **Kim.H.S, Yoon.B.D, Lee.C.H, Suh.H.H, Oh.H.M.M, Katsuragi.T and Tani.Y, (1997) <<** Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from Bacillus subtilis C9 >>..J. Fermen.Bioeng. 84: 41-46 133.

- **Gabet S., (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p. 177.**Q**
- **LI J. et CHEN B.H**, **(2002)**.<< Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants >>. *Chemical Engineering Science*, **57**, (14), 2825-2835,

LES SITES INTERNET / :

- **http://www.europeinnova.eu/c/document**_library/get_file?folderId=177014&name =DLFE- 11072.pdf.

- http://fr.wikipedia.org/wiki/Tensioactif.

- *http://www.agrobiobase.com/IMG/pdf/Fiche3agrotensioactifs.pdf*

ANNEXE N°1

Listes Matériels utilisés :

a) **Incubateur (SHIKER VWR)** : c'est un incubateur électrique qui fonctionne sous agitation continue avec une température maximale de 65 °C.

b) **Etuve** : appareil de séchage de température maximale de 120°C.

c) **pH-mètre** : de type INOLAB muni d'une cellule WTW Sen Tix 41 qui peut mesurer le pH de 1 à 14 à une température de 0 à 80°C.

d) **Autoclave** : C'est un autoclave électrique permettant de stériliser, par utilisation de la chaleur et de la vapeur d'eau sous pression.

e) **Tensiomètre (à anneau)-KRUSS K6** : pour mesurer la tension superficielle.

f) **Plaque chauffante agitateur** : pour chauffer et agiter les milieux préparer.

g) **Bec –benzen** : utilisée pour stérilisation la zone de milieux.

h) **Spectrophotomètre** FTIR-8400 : c'est un spectrophotomètre infra rouge à transformée de Fourier (FTIR) adapté aux mesures des bandes d'absorption entre 400 et 4000 cm^{-1}, de type SHIMADZU-Japon.

i) **Microscope optique-OPTECN** : centrifugeuse : de type LM 312.06.DB 005001, NertZ : 230 V/50 Hz/2.8 kw.

j) **Secoueur vortex** : utilisé pour agitation du tube a essai (calcule E24)

k) **Incubateu**r : utilisé pour le développement des souches à 37°C et 42°C, de type LABCO.

l) **Balance** : pour peser le produit chimique.

ANNEXE N°2

Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches productrices de biosurfactants

Echantillon N° / Paramètres	01 Puits OMOZ #472	02 Puits OMKZ #32	03 Puits OMKZ#502
COT (%)	2,30	7,1	3,5
N_T (‰)	0,42	1,18	0,51
COT/N_T	54,7	60,1	68,6
HPT (g/*kg* du sol)	27,83	59,07	36,05
Conductivité (*mS/cm*)	17,32	13,06	13,95
pH (1 : 2,5) H_2O	7,50	7,57	7,25

COT: Carbone Organique Total ; N_T : Azote total Kjeldahl

HTP : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

- Sol non salin CE < 2
- Sol légèrement salin 2 < CE < 3
- Sol salin 3 < CE < 5
- Sol très salin 9 < CE < 16
- Sol extrêmement salé CE > 16

Le biotope utilisé pour la sélection des hydrocarbonoclastes peut être classé comme sol très salin. Cela est justifié par la composition chimique des fluides de forage contenant une quantité importante de sels notamment le KCl.

ANNEXE N°3

Isolement des souches bactériennes

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 200 ml contenant 50 ml de milieu de culture (MP), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 200 tr/min

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

- ✓ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).

- ✓ La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.

- ✓ Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

ANNEXE N°4

* *Réactifs utilisés*

Réactif	Forme chimique	Pureté	Origine
Chlorure d'Ammoniac	NH_4Cl	98%	Riedel-de Haen
Nitrate d'Ammoniac	NH_4NO_3	98%	Riedel-de Haen
Dihydrogéno Phosphate de Potassium	KH_2PO_4	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Cuivre	$CuSO_4$	98%	Riedel-de Haen
Hydroxyde de Sodium	NaOH	98%	Riedel-de Haen
Heptane	C_7H_{16}	-	Riedel-de Haen
Gasoil /		98%	Riedel-de Haen
Chlorure de Calcium	$CaCl_2$	98%	Riedel-de Haen
Acétone	C_3H_6O	99%	Fluka
Kérosène /		99%	Fluka
Dihydrogéno Phosphate de Sodium	Na_2HPO_4	98%	Fluka
Chlorure de sodium	NaCl	99.9%	Nen Tech LTD
Huile d'olive /		100%	Algérie
Pétrole brut	-	100%	hassi-Massoud
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	99%	Sigma
Acide chlorhydrique	HCl	35.5%	Riedel-de Haen
Hexadecane	$C_{16}H_{34}$	99%	Prolabo
Nitrate de Sodium	$NaNO_3$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Zinc hydraté	$ZnSO_4.7H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Fer hydraté	$FeSO_4.7H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Magnésium	$MgSO_4.7H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Chlorure de Cobalt	$CoCl.6H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Manganèse	$MnSO_4.4H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Sulfate de Nickel	$NiSO_4.H_2O$	98%	Riedel-de Haen
Acide Borique	H_3BO_3	98%	Riedel-de Haen

ANNEXE N°5

Tensiomètre manuelle de Krüss

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

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

ANNEXE N°6

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR: Fourier TransformedInfra Red spectroscopy) EST basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau.Analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, D'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le domaine infrarouge entre4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 – 25 µm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

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

Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

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

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

deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

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

ANNEXE N°7

L’activité inhibitrice contre l’espèce bactrienne cultivée**.**

