République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en chimie

Option : Normes et Contrôle Qualité

Thème

Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants produits sur diverses sources de carbone par *Pseudomonas aeruginosaATCC9027*

Proposé et dirigé par :

Dr. O. BENKORTBI

Mr. B. MAHAMADOU.H

Présenté par

Mlle Zoubida BENZID

Année universitaire 2015/2016

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en chimie

Option : Normes et Contrôle Qualité

Thème

Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants produits sur diverses sources de carbone par *Pseudomonas aeruginosaATCC9027*

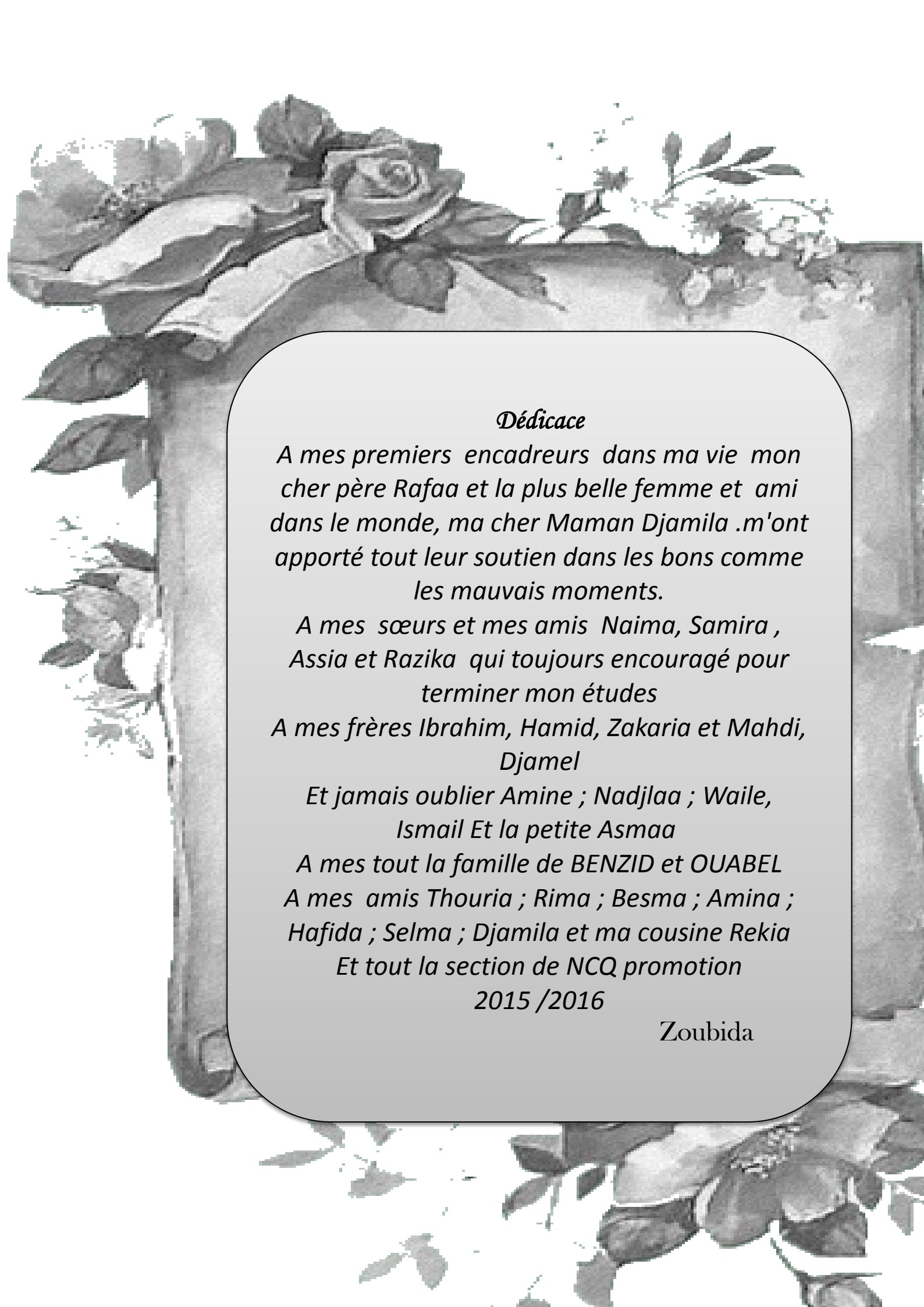
Présenté par :

Mlle.Zoubida BENZID

Le 16/06/2016, devant le jury composé de :

Dr. O. BENKORTBI	MCA	Rapporteur UYF-Médéa
Mr. B. MAHAMADOU.H	Doctorant	Co-rapporteur UYF-Médéa
Dr. L.KHAOUANE	MCB	Présidente UYF-Médéa
M. S. BETAM	MAA	Examinateur UYF-Médéa

Année universitaire 2015/2016



Dédicace

A mes premiers encadreurs dans ma vie mon cher père Rafaa et la plus belle femme et ami dans le monde, ma cher Maman Djamila .m'ont apporté tout leur soutien dans les bons comme les mauvais moments.

A mes sœurs et mes amis Naima, Samira , Assia et Razika qui toujours encouragé pour terminer mon études

A mes frères Ibrahim, Hamid, Zakaria et Mahdi, Djamel

Et jamais oublier Amine ; Nadjlaa ; Waile, Ismail Et la petite Asmaa

A mes tout la famille de BENZID et OUABEL

A mes amis Thouria ; Rima ; Besma ; Amina ; Hafida ; Selma ; Djamila et ma cousine Rekia

Et tout la section de NCQ promotion 2015 /2016

Zoubida

Remerciements

Mes premiers remerciements à ALLAH

Je remercie Monsieur BENKORTBI Othmane , Maître de conférences, à l'université de Médéa d'avoir accepté d'encadrer ce travail jusqu'à son aboutissement et pour la grande liberté qu'il m'a laissé dans mon travail, tant en recherche que pour la rédaction de ce mémoire.

Une mention spéciale est accordée à Monsieur Mahamadou Harouna Bassirou, Co promoteur qui a toujours été proche et à l'écoute, je lui présente toutes mes reconnaissances et mes amples remerciements pour sa disponibilité, ses orientations, ses remarques fructueuses, son soutien moral et scientifiques.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur ACHEK Rachid, Maître assistant à l'université de Médéa de m'avoir encouragé et soutenu tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens également à remercier Monsieur NABI Ibrahim, Maître assistant à l'université de Médéa pour son aide précieux.

J'adresse mes remerciements à Mme ATSAMNIA Soumia, Ingénieure de laboratoire au niveau du Hall Technologique pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Merci à tous les enseignants de l'université de Médéa

Merci aussi à toutes les personnes qui m'ont donné des conseils pour mener à terme ce travail.

دراسة تأثير مضادات الميكروبات من مخفضات التوتر السطحي الحيوي تنتج بمختلف أنواع مصادر الكربون بواسطة الزائفة الزنجارية ATCC9027

ملخص :

إن الهدف من هذه الدراسة تركز على إنتاج مخفضات التوتر السطحي الحيوي بواسطة الزائفة الزنجارية ATCC9027 على مصادر الكربون المختلفة في الوسط دفعة واحدة. مخفضات التوتر السطحي الحيوي هي عوامل سطحية مثل نظرائهم الكيميائية ولكن دون ضرر على الانسان . ومع ذلك، فإنها تظهر تسمم ملحوظ على الكائنات الحية الدقيقة الفطرية، البكتيرية و الطفيلية. في هذا العمل سوف يتم اختبار ثلاثة مصادر الكربون هم الكيروسين والديزل. وبالإضافة إلى ذلك، سوف تواجه نتائج تأثير كل من مصادرها الاثنين مع تأثير مخفضات التوتر السطحي الحيوي التي تنتجها نفس السلالة ولكن على الطين الهيدروكربونية الميتة. وأخيرا تأثير مضاد للميكروبات سيتم دراستها في العصوية الرقيقة، المكورات العنقودية الذهبية، اي كولاي.

كلمات البحث: مخفضات التوتر السطحي الحيوي ، الزائفة الزنجاريةATCC9027، وتأثير مضاد الميكروبات، خصائص مخفضات التوتر السطحي الحيوي ومجالات التطبيق.

Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants produits sur diverses sources carbone par *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027.*

Résumé :

L'objectif de cette étude porte sur la production des Biosurfactants par la souche *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027* sur diverses sources de carbone en culture batch. Ainsi, Les biosurfactants sont des tensio-actifs au même titre que leurs homologues chimiques mais sans toxicité sur les êtres humains. Cependant, ils manifestent une toxicité remarquable sur les microorganismes du genre fongique, bactérien et parasitaire. Dans ce travail trois sources de carbone seront testés à savoir, le kérosène et le diésel. De plus, les résultats de l'effet de chacun de ses deux sources seront confrontés à l'effet des biosurfactants produits par la même souche mais sur une boue morte d'hydrocarbures. Enfin l'effet antimicrobien sera étudié sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Mots clés : Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027,* effet antimicrobien, propriétés des biosurfactants et potentiel d'application.

Study the antimicrobial effect of biosurfactant produced on various carbon sources by *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027.*

Abstract:

The objective of this study focuses on the production of Biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027* strain on various carbon sources in batch culture. The biosurfactants are surfactants as well as their chemical counterparts but without toxicity on humans. However, they show a remarkable toxicity of fungal microorganism kind, bacterial and parasitic. In this work three carbon sources will be tested namely kerosene and diesel. In addition, the results of the effect of each of its two sources will be faced with the effect of biosurfactants produced by the same strain but on dead hydrocarbon slurry. Finally the antimicrobial effect will be studied in *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli.*

Keywords: Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosaATCC9027,* antimicrobial effect, biosurfactants properties and potential applications.

Sommaire

Introduction generale..... 1

Chapitre I : Les Biosurfactants

I.1. Introduction 3

I.2. Généralités..... 3

I.2.1. Détergents..... 3

I.2.2. Surfactants..... 4

I.3. Biosurfactants 6

I.3.1. Types des biosurfactants..... 6

I.3.2. Classification suivant la composition chimique..... 6

I.3.2.1. Glycolipides..... 7

A. Rhamnolipides 7

B. Tréhalolipides 8

C. Sophorolipides 8

I.3.2.2. Lipopeptides 9

A. Surfactine 9

B. Lipoamino-acides (l'ornithine)..... 9

I.3.2.3.Phospholipides..... 9

I.3.2.4. Lipopolysaccharides ou polymériques..... 10

I.3.2.5. Acides gras et lipides neutres 10

I.4. Microorganismes producteurs des biosurfactants..... 11

I.4.1 .Pseudomonas aeruginosa..... 11

I.5. Production des biosurfactants 12

I.5.1. Métabolismes de production des biosurfactants 13

I.5.1.1. Production associée à la croissance..... 13

I.5.1.2. Production en phase de croissance en conditions limités..... 13

I.5.1.3. Production en phase stationnaire 14

I.5.1.4. Production stimulée par un précurseur..... 14

I.5.2. Facteurs influençant la production des biosurfactants 14
I.5.2.1 Source de carbone 14
I.5.2.2 Sources d'azote 15
I.5.2.3 Sels minéraux et oligoéléments 15
I.5.2.4 Influence du pH 16
I.5.2.5 Influence de la température 16
I.5.2.6 Influence de l'oxygène 16
I.5.2.7 Influence de la vitesse d'agitation 16
I.6. Conclusion 17

Chapitre II : Physicochimie des biosurfactants et potentiels

II.1. Introduction 18
II.2. Extraction et Purification des biosurfactants 18
II.3. Biosurfactants et Activités potentiels 20
II.3.1. Abaissement de la tension superficielle et Interfaciale 20
II.3.1.1. Tension superficielle 20
II.3.1.2. Tension interfaciale 20
II.3.2. Mesure de la tension de surface 20
II.3.2.1. Méthode du tube capillaire : loi de Jurin 20
II.3.2.2. Méthode de l'arrachement de l'anneau 21
II.3.2.3. Concentration micellaire critique (CMC) 22
II.3.2.3.1. Détermination de la CMC par tensiométrie 23
II.3.2.3.2. Conductimétrie 23
II.3.3. Pouvoir mouillant 24
II.3.4. Pouvoir émulsifiant 25
II.3.5. L'indice d'émulsification EI_{24} 25
II.3.6. Pouvoir moussant 25
II.4. Potentiel d'application des biosurfactants 26
II.4.1. Pouvoir antimicrobien 26

II.4.2. Avantages des biosurfactants 27
II.4.3. Applications majeures des biosurfactants 29
II.5. Conclusion 31

Chapitre III : Procédure Expérimentale

III.1. Objectif 32
III.2. Matériel et Méthodes 32
III.2.1.1. Matériel 32
III.2.1.2. Liste des produits 33
III.2.2. Méthodes 33
III.2.2.1. Phase d'activation 33
III.2.2.2. Phase d'adaptation 34
III.2.2.3. Production des biosurfactants 35
III.2.2.3.1. Suivi cinétique de la croissance 36
III.2.2.3.2. Extraction des biosurfactants 36
III.2.2.4. Etude physicochimiques et biologique des biosurfactants 37
III.2.2.4.1. Indice d'émulsification EI_{24} 37
III.2.2.4.2. Activité moussante 38
III.2.2.4.3. Détermination de la concentration micellaire critique CMC 38
III.2.2.5. Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants 39
III.2.2.5.1. Etude en milieu Solide (test d'antibiogramme) 39
III.2.2.5.2. Détermination de la CMI 40

Chapitre VI : Résultats et Discussion

IV .1. Phase de L'activation 42
IV.2. Phase d'adaptation 42
IV.3. Production des biosurfactants 43
IV.3.1. Cinétique de production des biosurfactants 44
IV.3.2. Cinétique d'émulsification 45

IV.3.3. Détermination de la concentration micellaire critique CMC 47
IV.3. 4. Activité moussante 48
IV.4. Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants 49
IV.4.1. Effet antimicrobien en milieu Solide 49
IV.4.2. Détermination de la CMI 52
IV.4.2.1. Diffusion sur gélose 52
IV.4.2.2. Dilution successive 55
IV.5. Conclusion 57
Conclusion générale 58
Références Bibliographiques 60
Annexes

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

BS : biosurfactant

C° : degré Celsius.

CMC : Concentration micellaire critique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CM : La capacité moussante

E24 : Index d'émulsification

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques .

IR : infra rouge .

MS : spectrométrie de masse .

MM : masse molaire .

M : molarité .

pH : potentiel d'hydrogène .

RMN : la résonance magnétique nucléaire.

rpm : Tours par minute .

r : rayon.

SDS : sodium dodecyl sulfate.

SM : La stabilité moussante .

t : temps.

TA : tensioactif

ρ: masse volumique du liquide.

γ: tension superficielle.

Liste des figures

Figure I.1 : structure d'un surfactant 4
Figure I.2 : surfactant anionique 4
Figure I.3 : surfactant cationique 5
Figure I.4 : surfactant amphotèreFigure 4Figure I.4 : surfactant amphotère 5
Figure I.5 : surfactant non ionique 5
Figure I.6 : Structure de rhamnolipide R1, R2, R3, R4 produit par Pseudomonas aeruginosa, Lang and Wullbrandt (1999). 7
Figure I.7 : structure de tréhalolipides 8
Figure I.8 : structure des sophorolipides produit par Torulopsis et C.bombicola. 9
Figure I.9 : Structure de lipopeptide cyclique de surfactine produit par Bacillus subtilis 9
Figure I.10 : Structure d'un acide gras produit par Corynebacterium lepus. 10
Figure I.11 : Pseudomonas aeruginosa 12
Figure II.1 : méthode du tube capillaire. 21
Figure II.2 : tensiomètre 22
Figure II.3 : les 2 sortes de micelle. Les formes possibles de micelle 22
Figure II.4 : détermination de la CMC par la variation de la tension de surface en fonction de logarithme de concentrationgure 23
Figure II.5 : Pouvoir mouillant en présence et en absence de tensioactif 25
Figure II.6 : Pouvoir émulsifiant. 25
Figure III.1 : Incubation lors de la phase d'adaptation a 37°C pendant 48 h de Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027. 34
Figure III.2 : Incubateur agitateur type VWR. 35
Figure III.3 : Précipitation des biosurfactants à l'éthanol absolu 99 % à froid. 36
Figure III.4 : Formulation de l'émulsification du milieu acellulaire à l'aide d'un vortex. 37
Figure III.5 : Etapes de mesure de la tension superficielle par arrachement de l'anneau de Nouy. 39
Figure III.6 : La détermination de la CMI sur le milieu liquide. 41
Figure IV.1 : Activation de Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 sur gélose au cétrimide 43

Figure IV. 2 :a) le milieu avant l'incubation de la souche ; **b)** le milieu après adaptation. 43
Figure IV. 3 : Suivi de la croissance en fonction de temps par DO. 45
Figure IV. 4 : Les étapes de détermination de l'index d'émulsification. a) avant agitation, b) après agitation directe et c) après 24h de repos. 46
Figure IV.5 : Suivi de l'indice d'émulsification du milieu acellulaire. 47
Figure IV. 6 :Détermination de la CMC par conductimétrie 48
Figure IV. 7 : Capacité moussante des biosurfactants produits par Pseudomonas aeruginosa. 49
Figure IV. 8 : Test de diffusion sur gélose portant sur les trois bactéries avec les trois biosurfactants à 10 g/l pendant 24 h à 37°C. 51
Figure IV. 9 :Détermination de la CMI par diffusion sur gélose 54
Figure IV. 10 : Effet antimicrobien du biosurfactant issu du kérosène (A) du Diesel(B) et la boue morte (C). DO24h = f (C). 56

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Quelque exemple sur les surfactants. 5
Tableau I.2: Quelques exemples des biosurfactants. 10
Tableau II.1 : Les principaux types de biosurfactants et leurs applications. 19
Tableau II.2 : préparation de la solution 24
Tableau II.3 : les applications majeures des biosurfactants. 29
Tableau III.1 : listes des produits utilisés 33
Tableau IV.1 : Suivi de l'activité moussante et la stabilité de la mousse en fonction du temps. 48
Tableau IV.2: Activité antimicrobienne de biosurfactant produit par Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 à une concentration de 10 g/l. 49
Tableau IV.3 : Les valeurs de CMI en milieu solide 51

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les tensioactifs sont l'une des substances les plus importantes pour de nombreux domaines de l'industrie pharmaceutique, de l'industrie alimentaire, la conception des produits de lavage, de l'industrie pétrolière, l'agriculture… 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, aussi leur efficacité diminue dans des conditions physiques extrêmes comme élévation de la température, le pH et la salinité, (Para et *al.*, 1989).

Face à cela la cherche s'est intéressée à des molécules d'origine microbienne possèdent des caractères amphiphile et les mêmes propriétés que les surfactant chimique et répondant aux exigences c'est-à-dire l'avantage d'être biodégradable et non toxique même utilisé en milieu extrême (Banat et *al.*, 2000). Ces composés microbiens qui possèdent de telles propriétés sont dénommés « Biosurfactant ».

Les biosurfactants sont des tensioactifs synthétisé par vois biologique par des microorganismes appartenant à différentes genres et espèces. Des bactéries sont à l'avant-garde (61%), suivies par les espèces de levures sélectionnées (21%) (Kosaric 2014). Les avantage des biosurfactants résident dans leur utilisation dans plusieurs procédés industrielles telles que dégraissage, mouillage, ramollissement, la fixation de colorants, émulsions, dispersions, stabilisation, moussage, prévention de la mousse, ainsi que dans les aliments, l'industrie biomédicale et pharmaceutique, et la bioremédiation des sols contaminés par des produits organiques ou inorganiques.

Les biosurfactants incluent un grand nombre de structures chimiques, comme les glycolipides, les lipopeptides sont les biosurfactants les plus importants à des raisons commerciales, des complexes polysaccharide-protéines, les phospholipides et les acides gras (Desai et Banat,1997). La nature de biosurfactant est spécifique au microorganisme producteur et à la source de carbone de croissance.

Cette étude présente l'évaluation de l'activité antimicrobienne des biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027* sur plusieurs sources de carbone à savoir la boue morte d'hydrocarbure, le diesel et le kérosène en milieu liquide. L'évaluation de l'activité antimicrobienne s'est effectuée sur trois microorganismes

pathogènes avec des potentialités différentes selon le type d'infections provoquées ; les techniques d'évaluation sont la dilution successive en milieu liquide, le test de disque d'antibiogramme en milieu solide. De plus une étude de quelques propriétés physicochimiques des biosurfactants est aussi présentée dans ce mémoire.

CHAPITRE I

I.1. Introduction

La consommation mondiale annuelle de tensioactifs chimiques est estimée de l'ordre de 13 millions de tonnes, (Marchant and Banat (2012)). 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, (Para and *al.*,1989); (Healy and *al.*,1996); (Page and *al.*,1999); (Vipulanandan and Ren., 2000).

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 : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Qui ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et sont également efficaces, dans le cas de micro-organismes, à des températures, des pH et des salinités variables, (Banat and *al.*, 2000).

I.2. Généralités

Parmi tous les tensioactifs que nous connaissons aujourd'hui, le plus ancien est le savon. Les premiers utilisateurs de savon sont les Sumériens en 2500 av. J.C. Ils fabriquaient les pains de savon à partir d'huiles végétales ou animales, de cendre d'os ou de bois et d'extraits de plantes parfumées. L'apparition du savon, tel que nous le connaissons aujourd'hui, aurait eu pour cadre la ville de Savone, en Italie, d'où il tire son nom. Pendant des siècles, le savon servait d'onguent, de cosmétique, de remède. Il faut attendre le Moyen-âge pour que le savon soit utilisé pour laver le linge. Il restera pendant longtemps un produit de luxe et deviendra accessible à toutes les bourses qu'au tournant du XXème siècle. C'est en 1916 que le premier détergent complètement synthétique, le « Nekala », fut créé en Allemagne, Mathis (1992). A partir des années 50, le savon se voit remplacer par des tensioactifs de synthèse dans les formulations détergentes, (Noiret and *al.*, 2002).

I.2.1. Détergents

Le mot détergent provient du latin «detergere » qui signifie nettoyé. Les détergents sont donc des produits capables d'éliminer les souillures grâce à leur aptitude à abaisser la tension superficielle du liquide dans lequel ils sont dissous. Ils sont composés généralement d'un tensioactif qui représente la matière active et d'un ensemble de produits chimiques appelés adjuvants .

I.2.2. Surfactants

Les tensioactifs, ou "surfactants en anglais " ("Surface Active Agent") sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire et d'une queue ou chaîne hydrocarbonée apolaire capables de réduire les tensions superficielle et interfaciale 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, (Fiechter, 1992); (West and Harwell, 1992); (Banat and *al.*, 2000) .Ils sont principalement utilisés en tant qu'agents émulsifiants, émulsionnants, moussants ou dispersants .

La composition amphiphile est constitué de deux parties de polarités différentes dont l'une constituée d'une chaîne hydrocarbonée qui présente un caractère hydrophobe ou lipophile ; l'autre présente un caractère hydrophile et contient des hétéroatomes (O, P, S ou N) est représentée par la **figure I.1**.

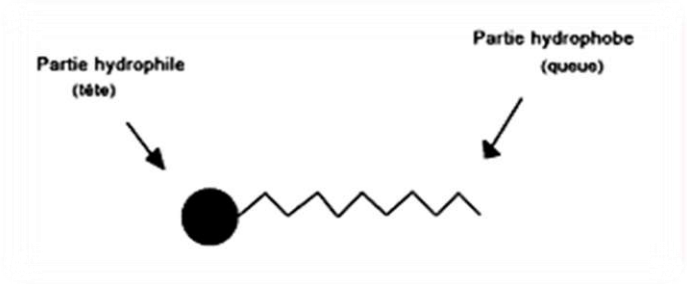


Figure I.1 : structure d'un surfactant . (ZELMAT, .2008)

Dans la littérature, on rencontre diverses structures de tensioactifs, variant notamment selon la nature de la partie hydrophile qui peut être :

- **Les tensioactifs anioniques :** la partie hydrophile est chargée négativement. (**figure I.2)** .



Figure I.2 : surfactant anionique (HAMAMOUCHE ., 2014)

- **Les tensioactifs cationiques :** la partie hydrophile est chargée positivement. (**figure I.3)**.



Figure I.3 : surfactant cationique (HAMAMOUCHE ., 2014)

- **Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères :** la partie hydrophile comporte une charge positive et la partie hydrophile une charge négative, la charge globale est nulle. (**figure I.4)** .



Figure I.4 : surfactant amphotère (HAMAMOUCHE ., 2014)

- **Les tensioactifs non ioniques :** la molécule ne comporte aucune charge nette. (**figure I.5)**.



Figure I.5 : surfactant non ionique (HAMAMOUCHE ., 2014)

La partie hydrophobe, quant à elle, est la plus souvent sous forme d'une chaîne aliphatique de longueur variable, ramifiée ou non.

Tableau I.1 : Quelque exemple sur les surfactants.

Nom	**Formule chimique**	**Classe**
sodium dodecylsulfate (SDS)	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-Na^+$	Anionique
dodecyltrimethylammonium bromide (DDAB)	$C_{15}H_{34}N^+Br^-$	Cationique
Dérivé de betaïne (R: chaine alkyl)	$RN^+(CH_3)_2CH_2COO^-$	zwitterioniques
Polyoxyéthylène alkyl éthers (C_mE_n)	$C_mH_{2m+1}(OC_2H_4)_nOH$	non ioniques

I.3. Biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés biologiques actifs des détergents (synthétisés par des micro-organismes**)** ; qui possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques. Ce sont des molécules amphiphiles constitués 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 and Banat.,1997).

I.3.1. Types des biosurfactants

Contrairement aux surfactants synthétisés chimiquement, qui sont généralement classés en fonction de la nature de leurs groupes polaires. Les biosurfactants sont généralement classés principalement par leur composition chimique et leur origine microbienne.(Rosenberg and Ron., 2002) ont classés les biosurfactants en deux classes :

- Les biosurfactants à faible poids moléculaire qui sont efficace dans l'abaissement de la tension superficielle et interfaciale. Les principales classes de ce type des biosurfactants sont : les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides.
- Les biosurfactants à poids moléculaire élevé qui sont très efficace comme agents émulsifiants et stabilisateurs, (Kappeli and Finnerty, 1979). Cette classe des biosurfactants comprend également les polymériques.

La plupart des biosurfactants issus de diverses souches microbiennes sont soit anionique, cationique ou neutre et la fraction hydrophobe est basée sur une longue chaîne d'acides gras ou dérivés d'acides gras, tandis que la portion hydrophile peut être un glucide, un acide aminé phosphaté ou peptide cyclique, (Nitschke and Coast,2007).

I.3.2. Classification suivant la composition chimique

Les biosurfactants sont classés suivant la nature chimique de leur composition, la composition biochimique de leur structure, la source de carbone et la type de micro-organisme producteur. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres, (Healy and *al.*,1996).

I.3.2.1. Glycolipides

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques, (Healy and *al*., 1996) ; (Ron and Rosenberg,2002).Les glycolipides les plus étudiés sont les *rhamnolipides*, les *tréhalolipides* et les *sophorolipides*. Le préfixe attaché au mot lipide est caractéristique de l'hydrate de carbone de l'extrémité hydrophile du surfactant. Il s'agit des sucres à savoir le *rhamnose*, le *sophorose* ou le *tréhalose*.

A. Rhamnolipides

Ce sont des glycolipides constitués d'un ou de deux molécules de *rhamnose* qui sont liées à une ou deux molécules d'acide β hydroxydécanoique, mono-rhamnolipide ou di-rhamnolipide. Les rhamnoses dans le cas du di-rhamnose sont liés par des liaisons osidiques caractéristiques d'un polysaccharide. Ainsi les liaisons acides gras rhamnose sont effectuées entre le groupement carboxylique d'un polyacide qui réduit les fonctions alcools du sucre. Un autre cas peut s'opérer entre un groupement carboxylique primaire ou d'un deuxième acide formant ainsi une fonction ou groupement ester **(figure I.6)**. La production des rhamnolipides comme glycolipides a été décrite pour la première fois dans par Jarvis and Johnson, (1949) *Pseudomonas aeruginosa*.

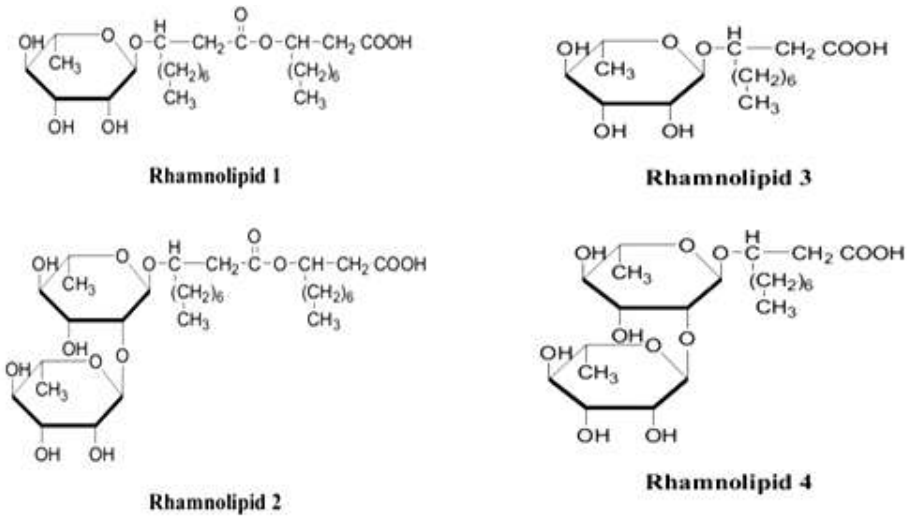


Figure I.6 : Structure de rhamnolipide R1, R2, R3, R4 produit par *Pseudomonas aeruginosa*, Lang et Wullbrandt (1999).

B. Tréhalolipides

Plusieurs types structurels de tréhalolipidiques ont été signalés, produits généralement par des microorganismes du genre Mycobactérie. Le disaccharide tréhalose est lié à l'acide mycolique impliqué dans la structure des tréhalolipides de part sont carbone C-6 ou C-6' chez la plupart des espèces Mycobactéries, *Nocardia, Corynebacterium, Rhodoccocus erytropholis*... Les acides mycoliques ont une longue chaîne, α-ramifiées-β-hydroxyle acides gras **(figure I.7)**. Les tréhalolipides provenant de différents organismes diffèrent par la taille et la structure de l'acide mycolique qu'ils contiennent, le nombre d'atomes de carbone et le degré d'instauration, (Asselineau., 1978).

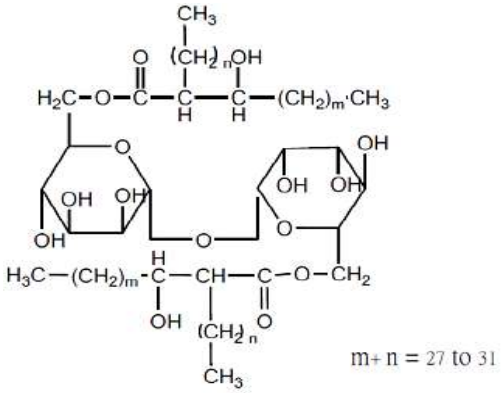


Figure I.7 : structure de tréhalolipides (Desai,et Banat 1997)

C. Sophorolipides

Les sophorolipides sont produits par *Candida bombicola* et *Torulopsis* après leur culture dans un milieu à base de glucose et de composés lipophiles, (Wagner and Lang, 1996). Les sophorolipides sont produits sous forme d'un mélange de composés à base de dérivés de sophoroses acylés dont chacun est lié à un acide gras hydroxylé **(figure I.8)**. D'après Stuawer and *al.*, (1987), la modification de la composition du milieu de culture par un apport d'un substrat comme le n-hexadecane, conduit à l'augmentation de la productivité de 0,46 g de sophorolipides constitué en majorité d'acide gras, en utilisant la levure *Candida apicola Met 43747* .

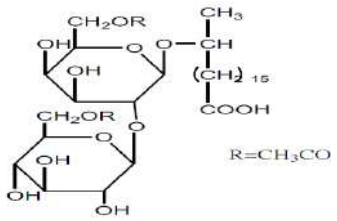


Figure I.8 : structure des sophorolipides produit par *Torulopsis* et *C.bombicola*.
(Desai,et Banat 1997)

I.3.2.2. Lipopeptides

A. Surfactine

Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide, (Rosenberg and Ron, 1999). On distingue .La surfactine est une lipopeptide cyclique produites par *Bacillus subtilis ATCC 21332.* Elle est l'une des plus puissants biosurfactants. Elle est composée de sept acides aminés : L-Glu1-Leu2-D-Leu 3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6–L-Leu7 structurés en anneau couplé à une chaîne d'acide gras suivant un cycle lactonique. (**figure I.9)**.

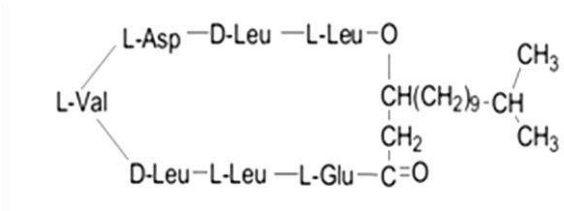


Figure I.9 : Structure de lipopeptide cyclique de surfactine produit par *Bacillus subtilis.*
(Desai,et Banat 1997)

B. Lipoamino-acides (l'ornithine)

C'est un lipide qui contient un seul acide aminé, l'ornithine produit par *Pseudomonas rebescens* (Laurila, (1985)). possédant toutes les propriétés des biosurfactants microbiens, émulsification, moussage, émulsionnant etc.

I.3.2.3.Phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupements alcools, phosphates et des chaînes lipidiques. (Bognolo 1999) indique que, bien qu'ils soient présents dans tous les micro-

organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire. La composition et le type de phospholipides produits par les différentes espèces bactériennes et champignons dépendent de la source de carbone utilisée pour la croissance et des conditions de culture à savoir le pH, la température du milieu de culture.

I.3.2.4. Lipopolysaccharides ou polymériques

Les lipopolysaccharides ou polymériques sont généralement constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras, (Healy and *al.*, 996).

I.3.2.5. Acides gras et lipides neutres

Les acides gras et lipides neutres sont aussi considérés de par leur source d'origine comme des biosurfactants. Ces composés caractérisés par une masse moléculaire très élevée, (Healy and *al* ., 1996) ont des propriétés similaire que les biosurfactants lors qu'ils sont produit par des microorganismes et les végétaux (**Figure I.10)**.

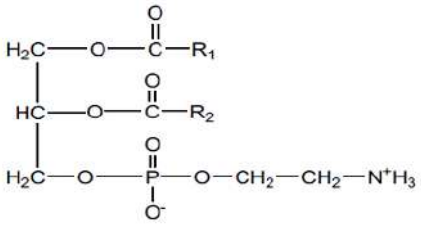


Figure I.10 : Structure d'un acide gras produit par *Corynebacterium lepus*.

(Desai,et Banat 1997)

Tableau I.2: Quelques exemples des biosurfactants.

Les classes	**Biosurfactants**	**Microorganisme**
Glycolipide	Rhamnolipides tréhalolipides sophorolipides.	*Pseudomonas aeruginosa Rhodococcus erithropolis Arthobacter sp. Candida bombicola, C. apicola*
Lipopeptide et lipoprotéine	Surfactin , ornithine	*Bacillus subtilis, Pseudomonas rebescens*
Phospholipide	Phospholipide	*Corynebacterium*
Acide gras	Acide gras	*Corynebacterium lepus*
Lipide neutre	Lipide neutre	*Clostridium pastriamum*
Polymérique	Emulsan	*Acinetobacter , Calcoaceticus*

I.4. Microorganismes producteurs des biosurfactants

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 des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures, (Bognolo, 1999) ; (Mulligan and *al.*,2001) . Les microorganismes produisant les biosurfactants sont :

- Genre bactérien: *Rhodococcus, Arthrobacter, Brevibacterium, Mycobacterim, Corynebacterium, Acinetobacter, Pseudomonas, Bacillus.*
- Genre fongique : *Torulopsis, Candida, Pseudozyma, Yarrowia, Kluyveromyces et Saccharomyces.*

I.4.1 .Pseudomonas aeruginosa

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires.

Pseudomonas aeruginosa (en latin : aeruginosus signifiant recouvert de rouille) est un des membres de la famille des *Pseudomonaceae* .

C'est une bactérie pathogène opportuniste actuellement connue sous le nom de *P. aeruginosa* a reçu plusieurs noms à travers son histoire sur la base de ses cultures de coloration bleu-vert caractéristique produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, ainsi que son odeur aromatique caractéristique (seringat).

C'est un germe ubiquitaire, que l'on retrouve partout, mais de manière privilégiée dans les milieux humides ou aqueux, tels les sols, les plantes, les végétaux.

Il s'agit d'un bacille à Gram négatif en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large. *P. aeruginosa* est une bactérie dépourvue de spores et de capsules, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire **(figureI.18)**. C'est une bactérie mésophile capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C avec une température optimale de croissance entre 30 et 37°C. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie possédant un métabolisme oxydatif, mais en absence d'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons.

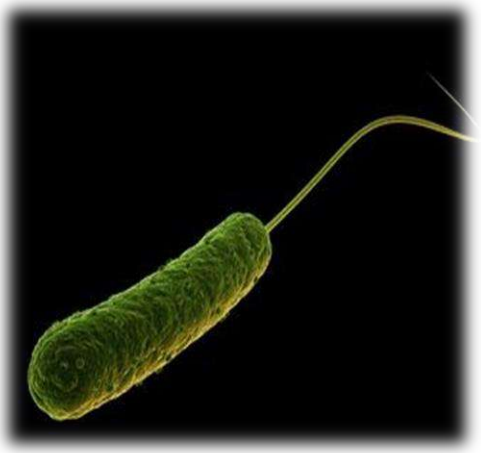


Figure I.11 : *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, hautement induits dans l'infection et s'expriment préférentiellement sur les terrains immunodéprimés.

En fait cette bactérie est décrite comme le prototype du germe hospitalier et est responsable d'un nombre important d'infections nosocomiales diverses et pouvant être sévères. C'est d'une part, un des germes le plus fréquemment retrouvé dans les cas de pneumonies associées à l'emploi d'une ventilation mécanique; d'autre part, il est responsable d'infections urinaires et de bactériémies; il est moins fréquemment associé à des infections de plaies chirurgicales ou de brûlures, d'otites malignes externes chez le patient diabétique, d'infections de la sphère gastro-intestinale tel qu'abcès intra-abdominal, cholangite, péritonite, pancréatite; enfin d'ostéomyélite, de kératite (panophtalmite) et finalement d'endocardite chez les patients toxicomanes.

Malgré le *Pseudomonas aeruginosa* est pathogène opportuniste ; mais sont utilisés dans la production des rhamnolipides des propriétés tensio-actives (Parra et al ., 1989).

I.5. Production des biosurfactants

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme de manière aérobie par respiration anaérobie (Mulligan *et al.,* 2001) sur des substrats insolubles ou solubles dans l'eau, constitués d'une ou plusieurs sources de carbone. Les paramètres indicatifs de cette production sont la réduction de la

tension superficielle du milieu de culture par abaissement de la conductivité ainsi que l'émulsification du milieu, (Pruthi et *al.*, 1995).

En effet, les bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et *al*., 2003) pour faciliter la diffusion des substrats hydrophobes en générale à l'intérieur de l'espace péri-plasmique membranaire comme les hydrocarbures ou leurs dérivés jusqu'à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader, (Al-Arajil et *al.*, 2007).

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants sont relatifs à l'obtention des substrats et des coûts de production optimaux. La valorisation des déchets et substrats issus des rejets industriels divers permettra d'établir un équilibre entre la quantité produite, le coût et la qualité des biosurfactants pour leur utilisation comme alternative aux tensioactifs synthétiques.

I.5.1. Métabolismes de production des biosurfactants

I.5.1.1. Production associée à la croissance

Lorsque la biosynthèse des biosurfactants est associée à la croissance d'un microorganisme. La division cellulaire est accompagnée à chaque par une production des biosurfactants en tant que barrière physique contre divers types de stress pouvant affecter la survie cellulaire. Cette production chez *Pseudomonas aeruginosa* fait intervenir plusieurs enzymes à savoir les rhamnotransférases de type I et II. *Pseudomonas aeruginosa* produit ses biosurfactants en réponse aux stimuli qui sont les hydrocarbures. (Desai and Banat, 1997) ; établissent une cinétique décrivant la consommation du substrat carboné, la limitation de l'azote, la croissance bactérienne et la production des biosurfactants par des microorganismes producteurs des *rhamnolipides Pseudomonas* et *Acinetobacter calcoacetitus*.

I.5.1.2. Production en phase de croissance en conditions limités

En conditions limités, bien que la masse cellulaire augmente, la production de biosurfactants n'est engagée que lorsqu'un ou plusieurs des composants du milieu est épuisé ou présent à une concentration limite .**(**Guerra- Santos and *al.,*1986) ont indiqué qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou

éléments traces induise une augmentation de production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa DSM2659.*

I.5.1.3. Production en phase stationnaire

La production en phase stationnaire a lieu lorsque le taux de multiplication cellulaire égale au taux de décès cellulaire. L'utilisation de la source de carbone est exclusivement dû à la synthèse de biosurfactants comme facteur de virulence et barrière physique le cas de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce genre de production est intéressant au niveau de la récupération du produit puissent que les périodes de croissance et de production peuvent être séparées (Desai and Desai, 1993). Plusieurs microorganismes obéissant à cette cinétique ont été étudiés, notamment *Pseudomonas aeruginosa CFïR-6* (rhamnolipides) et *Candida bombicola* (sophorolipides).

I.5.1.4. Production stimulée par un précurseur

L'addition des précurseurs au milieu de croissance peut parfois entrainer des changements quantitatifs et qualitatifs sur la production des biosurfactants. Ainsi, l'addition de composés lipophiles aux milieux de culture de *Torulopsis magnoliae*, *Candida bombicola* et *Torulopsis apicola* ont favorisé de façon significative la production de biosurfactants, (Cooper and Paddock, 1984) ; (Desai and Banat, 1997) ; (Lee and Kim, 1993) ;(Syldatk and Wagner, 1987). Par ailleurs, la nature des glycolipides peut être directement influencée par la source d'hydrates de carbone, (Syldatk and Wagner, 1987).

I.5.2. Facteurs influençant la production des biosurfactants

La production des biosurfactants est influencée par des conditions de culture telles que la composition du milieu de culture et les conditions physicochimiques (pH, température, agitation etc…)

I.5.2.1 Source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres qui influe le plus souvent la production des biosurfactants, soit par augmentation, soit par diminution de la quantité produite du fait de la spécificité des biosurfactants à la source de carbone. 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 les n-alcanes ou l'huiles d'olive (Desai et Banat, 1997). En effet, plusieurs bactéries et champignons ont la capacité de s'accroître sur des substrats hydrophobes comme les hydrocarbures totalement insoluble dans l'eau (Cameotra and Makkar, 1998).

Les premières bactéries capables de croître en utilisant des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs comme seule source de carbone pour la production des biosurfactants ont été isolées des milieux contaminés par les hydrocarbures ou des anciens gisements épuisés d'hydrocarbures. Les souches de type *Pseudomonas aeruginosa* possèdent la capacité de produire des biosurfactants ainsi que de modifier l'hydrophobicité de leur surface externe. Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont été utilisées pour produire les rhamnolipides possédant des propriétés tensioactives. **(**Sekhon and *al.,* (2009), (2011) et (2012)), ont utilisé l'huile d'olive comme source de carbone. L'étude a permis d'avoir une production accrue de lipopeptides par les recombinants de *B. subtilis SK320* .

I.5.2.2 Sources d'azote

La nature et la concentration de la source d'azote affectent également la production des biosurfactants. De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitant. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices, (Lang and Wullbrandt, 1999).

Pour avoir des rendements de production optimaux 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 biosurfactants . Chez *Pseudomonas fluorescens,* la meilleure production des biosurfactants a été obtenue en utilisant l'huile d'olive et le nitrate d'ammonium comme source de carbone et d'azote, respectivement, avec un rapport C/N de 10.

I.5.2.3 Sels minéraux et oligoéléments

Les sels minéraux influencent fortement la production des biosurfactants. (Wei and Chu 1998) 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 passée de 4µM à quelques mM. Cependant, (Guerra-santos and *al.* 1986) ont montré que la limitation des concentrations des sels de magnésium, calcium, potassium, sodium et des oligo-éléments donne une surproduction des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* .

I.5.2.4 Influence du pH

Pseudomonas aeruginosa, produit des rhamnolipides a des pH du milieu de culture variant entre 6 et 7 voire 7,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production des biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynbacteroides* ne sont pas affectées par des pH variant de 6.5 à 8.0. (Ishigami and *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.

I.5.2.5 Influence de la température

Yakimove and *al.*, (1998*)* ont indiqué que la gamme optimale de température est de 35°C à 45°C pour la production des biosurfactants par *Bacillus licheniformis.* Cependant d'autres travaux ont montré que la température n'avait aucun effet sur la croissance et la production du biotensioactif produit par *Bacillus stearothermophilus VR-8*.

I.5.2.6 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. Il a été montré que le transfert d'oxygène est l'un des facteurs importants influençant la production de surfactine par *Bacillus*.

I.5.2.7 Influence de la vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de tensioactifs par les microorganismes afin de favoriser le contact entre les cellules et les substrats. 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 and Banat, 1997).

I.6. Conclusion

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles ayant des propriétés de tensioactifs synthétisés biologiquement par des microorganismes (levures, champignons, bactéries). La classification des biosurfactants est faite selon leurs compositions biochimiques et selon leur origine microbienne; on distingue des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides. La source de carbone est les facteurs qui influence la production des biosurfactants .Le choix de la source de carbone joue un rôle important pour l'amélioration du rendement ; la structure et l'effet antimicrobien des biosurfactants.

CHAPITRE II

II.1. Introduction

Les biosurfactants sont potentiellement des challengers des tensioactifs synthétiques dans plusieurs procédés industriels, telles que graissage, mouillage, ramollissement, la fixation de colorants, émulsions, dispersions, stabilisation, moussants, prévention de la mousse, ainsi que dans les aliments, l'industrie biomédicale et pharmaceutique, et la bioremédiation des sols contaminés par des produits organiques ou inorganiques. Les Glycolipides et les lipopeptides sont les biosurfactants les plus importants (BS) à des raisons commerciales (tableau II.3). (Shete et al. 2006) cartographiaient les brevets sur les biosurfactants et les bioémulsifiants (255 brevets délivrés dans le monde) indiquant le nombre élevé de brevets dans l'industrie du pétrole (33%), les cosmétiques (15%), agent antimicrobien pour la médecine (12%) et la bioremédiation (11%). Les Sophorolipides occupent 24%, la surfactine 13% et Rhamnolipides 12% représentent une grande partie des brevets. Cependant, cela peut être sous-estimé car de nombreux brevets ne précisent pas l'organisme producteur limité à l'utilisation spécifique de BS seulement.

II.2. Extraction et Purification des biosurfactants

Les biosurfactants en tant que agent tensioactifs d'origine microbienne, végétale ou animale (surfactants) se caractérisent par des activités potentiels dans plusieurs domaines de la science et de la technologie y compris de la médecine par leur activité antimicrobienne, antifongique… La récupération des biosurfactants à partir du milieu de culture est l'une des étapes les plus importantes et les plus chers dans leur production, représentant près de 60% du coût total de production. La récupération des biosurfactants dépend principalement des facteurs comme leur charge ionique, leur solubilité dans le milieu, et leur localisation métabolique (intracellulaire, extracellulaire ou liés à la cellule). Les principaux biosurfactants connus sont présentés dans le Tableau II.1 ainsi que leurs applications.

Les méthodes utilisées pour la récupération des biosurfactants comprennent la cristallisation, la centrifugation et le fractionnement de la mousse. L'ultrafiltration et la chromatographie sur couche mince sont couramment utilisées pour la récupération des biosurfactants, (Satpute et *al.*,2010). A ceux-là s'ajoute l'extraction par solvant ou des mélanges de solvants organiques tels que chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle ; dichloro-méthane-méthanol, l'hexane, l'acide acétique, l'éthanol et l'éther par précipitation.

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol), (Parra et *al* .,1989). Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif à la suite de la précipitation. Une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

Makkar et Cameotra (2002) ont séparé la surfactine produite par *Bacillus subtilis* par addition du HCl jusqu'à pH 2. Le bio dispersent produit par *Acinétobacter calcoaceticus* est encore séparé par précipitation au sulfate d'ammonium. Le biosurfactant de type rhamnolipide, produit par *Pseudomonas fluorescens* a été récupéré par précipitation à l'acétone froid, comme décrit par Pruthi et Cameotra (1995). Trois volumes d'acétone froid ont été ajoutés et laissés au repos pendant 10 h à 4 °C. Il existe plusieurs méthodes de détermination de la structure chimique des biosurfactants après extraction et purification. Parmi ces méthodes, la spectrométrie d'adsorption UV-Visible pour la détection du chromophore, la spectrométrie infrarouge (IR) pour la détermination des groupements fonctionnels, la spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire et des indications sur la structure lorsque celle-ci est effectuée à haute résolution, elle fournit l'analyse moléculaire par élément fragmenté, (Peypoux et *al.*, 1999); (Daniels et *al.*, 1999) et la résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés suivant l'environnement atomique, (Daniels et *al.*, 1999).

Tableau II.1 : Les principaux types de biosurfactants et leurs applications.

Classe des biosurfactants		**Microorganismes**	**Application**
.	Rhamnolipids	*P. aeruginosa and P. putida*	Bioremediation
		P. chlororaphis	Biocontrol agent
		Bacillus subtilis	Antifungal agent
		Renibacterium salmoninarum	Bioremediation
	Sophorolipids	*Candida bombicola and C. apicola*	Emulsifier, MEOR, alkane dissimilation
Glycolipids	Trehalose lipids	*Rhodococcus spp.*	Bioremediation
		Tsukamurella sp. and Arthrobacter sp.	Antimicrobial agent
	Mannosylerythritol lipids	*Candida antartica*	Neuroreceptor antagonist, antimicrobial agent
		Kurtzmanomyces sp	Biomedical application
Lipopeptides	Surfactin	*Bacillus subtilis*	Antimicrobial agent, biomedical application
	Lichenysin	*B. licheniformis*	Hemolytic and chelating agent

II.3. Biosurfactants et Activités potentiels

II.3.1. Abaissement de la tension superficielle et Interfaciale

II.3.1.1. Tension superficielle

La tension superficielle ou énergie de surface est une grandeur caractéristique des phénomènes physico-chimiques de surface et interface lié aux interactions moléculaires d'un fluide. Elle résulte de l'augmentation de l'énergie à la surface qui en augmente localement la cohésion moléculaire. L'unité de mesure de la tension superficielle est le newton par mètre ($N.m^{-1}$), l'équivalent du Joule par mètre carré ($J.m^{-2}$). Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées ; jusqu'à une valeur appelée concentration micellaire critique ou CMC. Au-delà de la CMC, la valeur de la tension superficielle reste constante, et on note que l'interface est saturée en molécules tensioactives. Les molécules en excès forment des agrégats appelés micelles, (Tanford,1972) ; (Israelachvili et *al.*, 1976) .

II.3.1.2. Tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire qui sépare deux liquides immiscibles s'sévissant à la surface, (Neindre,1993). La tension interfaciale entre l'eau et un alcane (par exemple le n-octane) est de l'ordre de 50.81 mN/m à 20°C, en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m, (Holmberg et *al.*,2002) .

II.3.2. Mesure de la tension de surface

L'activité surfacique ou interfaciale des biosurfactants peut être estimée suivant la mesure de la tension superficielle ou interfaciale des solutions aqueuses des biosurfactants. Les biosurfactants agissent en très faible quantité pour réduire la tension de surface ou interfaciale, les techniques physique ou physicochimique de mesure de la tension de surface sont employé afin de suivre l'activité de surface des biosurfactants.

II.3.2.1. Méthode du tube capillaire : loi de Jurin

Lorsqu'un tube capillaire ayant les deux extrémités ouverte est plongé dans une solution aqueuse des biosurfactants, celui-ci "monte" par ascension sous l'effet de la pression le long de la paroi du tube si l'angle de contact $\theta < 90$ ° jusqu'à la formation d'un ménisque résultant

du rapport des forces intérieures et extérieurs ou "descend" cas du mercure à l'exception si l'angle de contact θ > 90 ° (**figure II.1)**. Ce phénomène d'ascension ou descente est à l'origine de la loi de Jurin reliant la force s'exerçant à la hauteur du tube et à l'angle de contact du liquide à la paroi, équation II.1.

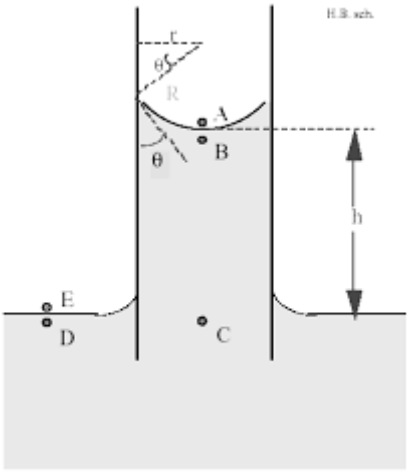


Figure II.1 : méthode du tube capillaire.

$$h = \frac{2\gamma cos\theta}{r\rho g} \qquad \text{(II.1)}$$

r : rayon intérieur du tube, ρ: masse volumique du liquide, g : intensité de la pesanteur, γ: tension superficielle du liquide et θ: angle de raccordement liquide/solide.

II.3.2.2. Méthode de l'arrachement de l'anneau

Outre la technique du tube capillaire la méthode de l'arrachement d'un anneau immergé dans le liquide ou méthode de Noüy permet aussi d'estimer la tension superficielle d'une solution aqueuse des biosurfactants. Le principe de la méthode de Noüy est basé sur un soulèvement graduel de l'anneau jusqu'à son arrachement de la surface de la solution d'immersion en utilisant un tensiomètre ou tensiomètre de Noüy **(figure II.2)**.

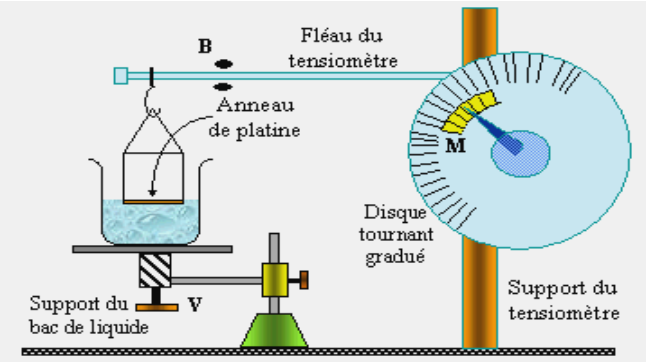


Figure II.2 : tensiomètre : **B** : butée du fléau ; **V** : vis sans fin permettant le déplacement vertical de l'échantillon ; **M** : système de vernier pour une lecture fine de la tension superficielle.

II.3.2.3. Concentration micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique représente la concentration où la première micelle de surfactant est formée, (Margaritis et *al* .,1979). En faibles concentrations, les surfactants peuvent se présenter sous forme de monomères ou sous la forme de leurs ions. Au fil de l'augmentation de la concentration en surfactants, les molécules se répartissent sur les interfaces disponibles dans le milieu (parois, interface gaz-liquide, solide, etc.), jusqu'à l'atteinte d'un point de saturation où elles forment des micelles, qui caractérise la concentration micellaire critique (CMC) . Il existe deux sortes de micelles :

- Dans l'eau, les micelles sont dites directes, les queues (hydrophobes) sont à l'intérieur et les têtes (hydrophiles) à l'extérieur.
- Lorsque la concentration de la graisse est supérieure à celle de l'eau, les micelles sont dites inverses, les queues (hydrophobes) sont à l'extérieur et les têtes (hydrophiles) à l'intérieur **(figure I.15)**.

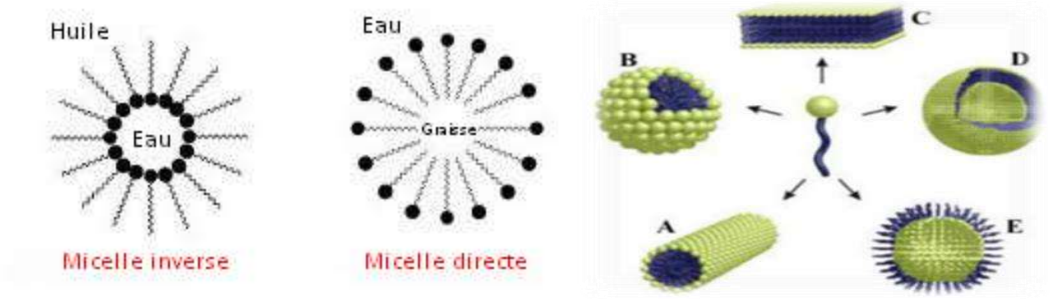


Figure II.3 : les 2 sortes de micelle. Les formes possibles de micelle (A) : Micelle cylindrique, (B) : structure micellaire, (C): structure lamellaire, (D) : structure vésiculaire et (E) : micelle inverse **(**ABEL,. 2007).

II.3.2.3.1. Détermination de la CMC par tensiométrie

La CMC est déterminée avec un tensiomètre en mesurant la tension de surface d'une série de concentrations. Avec des agents tensioactifs purs, la tension superficielle est linéairement dépendante du logarithme de la concentration sur une large plage. Au-dessus de la CMC, la tension superficielle est largement indépendante de la concentration. La CMC résulte de l'intersection entre la droite de régression de la région dépend linéairement et la ligne droite passant par le plateau **(Figure II.4)**.

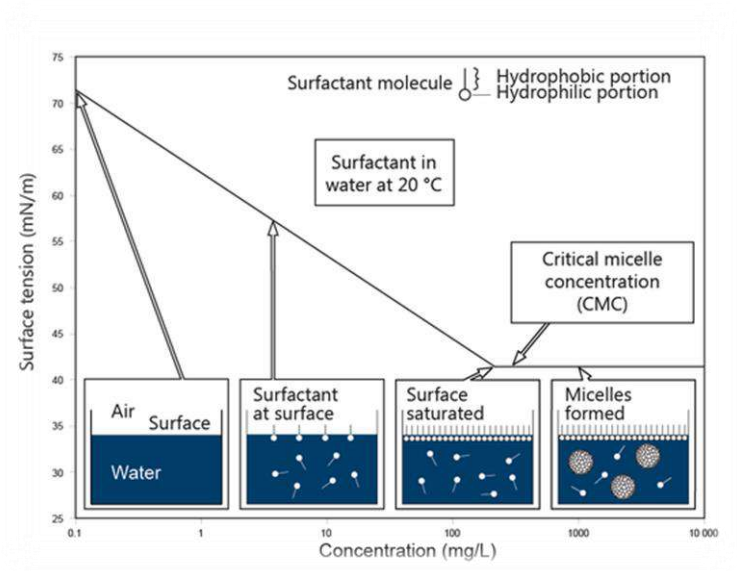


Figure II.4 : détermination de la CMC par la variation de la tension de surface en fonction de logarithme de concentration

II.3.2.3.2. Conductimétrie

La conductimétrie est une technique électrochimique permettant de mesurer la force ionique ou charge électrique du milieu à travers la quantité et la qualité des groupements et / ou des ions libres agissants dans le milieu. La mesure s'effectue au moyen d'un appareil muni d'une sonde ou électrode permettant de capter la force ionique due aux groupements ionisés et aux ions constituants la charge électrique du milieu. Dans une solution, les électrons ne se déplacent pas comme dans un solide (indépendamment des cations) mais les charges sont transportées en même temps que les ions qualifiés d'électrolytes. Ces ions peuvent provenir d'un sel, d'un acide ou d'une base ou encore de l'eau elle-même. La conductimétrie est très importante dans la détermination de la CMC et de l'effet d'un biosurfactant dans le milieu aqueux. Au travers d'un point d'inflexion de la courbe de la conductivité par rapport à la

concentration des solutions mesurées, il est ainsi possible de déterminer la CMC d'une solution d'un tensioactif ou d'un biosurfactant.

On prépare une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) 0.04 M ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) un jour à l'avance pour éviter la formation de mousse. On mesure la conductivité en faisant des ajouts de 1mL de cette solution dans 125 ml d'eau déminéralisée à température ambiante.

Tableau II.2 : préparation de la solution

	Masse (g)	MM (g/mol)	Volume (l)	Concentration (M)
Dodécylsulfate de sodium	1.153	288	0.1	0.040

Calcul :

Conductivité (k) = Conductance (G) * Constante de la cellule (C)

Concentration de la solution mesurée (c) = c_{SDS} * (V_{SDS}/Vtot)

Condutivité molaire (λ) = conductivité (κ) / concentration de la solution (c)

II.3.3. Pouvoir mouillant

La diminution de la tension de surface facilite de nombreux procédés technologiques, tels que la formation de mousses, d'émulsions ou le mouillage d'une surface . Le pouvoir mouillant est la capacité d'un liquide à s'étaler sur un solide ou la capacité d'un solide à absorber un liquide. Les agents mouillants présents dans les tensio-actifs diminuent la tension superficielle du liquide et permettent ainsi un étalement du liquide plus important (**Figure II.5)**. Dans les lessives, les agents mouillants permettent donc aux vêtements de s'imbiber d'eau et de lessive ce qui rendra le lavage plus efficace. Nous supposons donc que plus une lessive a un pouvoir mouillant important, plus son lavage est efficace .



Figure II.5 : Pouvoir mouillant en présence et en absence de tensioactif

II.3.4. Pouvoir émulsifiant

Un émulsifiant permet l'émulsion entre deux liquides non-miscibles, comme l'eau et l'huile. Une émulsion est une dispersion d'un liquide dans un autre liquide sous forme de petites gouttelettes (**Figure II.6)**. Les tensioactifs diminuent la tension superficielle entre les deux liquides ce qui facilite la miscibilité de ces deux liquides et donc la formation de petites gouttelettes .

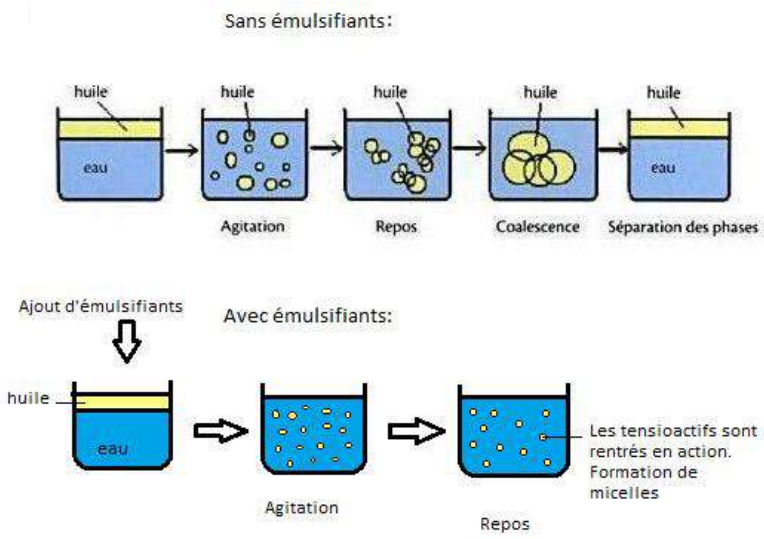


Figure II.6 : Pouvoir émulsifiant.

II.3.5. L'indice d'émulsification EI_{24}

L'indice d'émulsification EI_{24} estimé par la méthode de Cooper et Goldenger (1987). Des échantillons de 2 ml sont pris après centrifugation puis ajustés à 4 ml avec de *n-hexadécane* et soumis à une agitation à la main pendant 5 minutes. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h. L'indice d'émulsification à 24 h (EI_{24}) est donné en pourcentage par le rapport de la hauteur de la couche émulsionnée (mm) divisé par la hauteur totale de la colonne du liquide (mm).

II.3.6. Pouvoir moussant

Le pouvoir moussant est le degré d'aptitude à former de la mousse. Lorsqu'un important volume de gaz se disperse dans un faible volume de liquide, il y a formation de mousse. Les

bulles d'air formant la mousse piègent les salissures. Nous supposons donc que plus une lessive forme de mousse, plus son lavage est efficace.

Les propriétés moussantes sont mesurées à l'aide de la méthode décrite par Padmashree and *al.,* (1987), 3 g de tensioactifs sont mélangés à 300 mL d'eau dans une éprouvette graduée d'un litre . La suspension est agitée à 1600 tr/min pendant 5 min à l'aide du Turbotest Raynerie. Le volume est mesuré 30 s après l'agitation. La capacité moussante (CM) est exprimée en pourcentage de volume (liquide + mousse) en utilisant l'équation II.2 .

L'indice de formation de la mousse ou indice moussant est une caractéristique des tensioactifs donc des biosurfactants en solution aqueuse. Ainsi, pour la détermination de cet indice une solution des biosurfactants de 1 g / l est préparée, (Das et *al.,* 1998) avec quelques modifications. Un volume de 20 ml de solution à 1 g / l des biosurfactants est transféré dans un cylindre de mesure et de l'air est injecté au travers la solution à raison de 0,5 l / min pendant 2 min. L'indice de moussage est ainsi déterminé selon l'équation II.2:

$$\text{Indice moussant (\%)} = \left(\frac{Hauteur_{mousse}}{Hauteur_{mousse+liquide}}\right)*100 \qquad \text{(II.2)}$$

Le volume de la mousse est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après agitation. La stabilité moussante (SM) est calculée en utilisant l'équation II.3 .

$$\text{SM (\%)} = \left(\frac{volume\ de\ la\ mousse\ après\ un\ temps\ t}{volume\ de\ la\ mousse\ initiale}\right)*100 \qquad \text{(II.3)}$$

II.4. Potentiel d'application des biosurfactants

II.4.1. Pouvoir antimicrobien

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 .

Parmi ces biosurfactants, les lipopeptides forment la classe largement rapportée ayant une action antimicrobienne. Le genre *Bacillus* est responsable de la production de

biosurfactants lipopeptides les plus connus. *B. subtilis* produit le premier biosurfactant présentant cette propriété antimicrobienne, qui est, la surfactine, (Das et *al.*,2008), (Fernandes et *al.*, 2007) . (El-Sheshtawyet *al.*, 2014) ont montré une activité antimicrobienne des biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa* avec le glucose comme source de carbone contre différentes bactéries et souches de champignons. Le biosurfactant brut a montré une bonne action activité antimicrobienne contre différentes espèces bactériennes et fongiques .

Parmi ses biosurfactants on distingue :

- **Les Gramicidine S :** de nombreuses bactéries produisent un décapeptide cyclosymetrique antibiotique, la gramicidine S. La préparation de spores de *brevis Brevibacterium* contient de grandes quantités de la gramicidine S liés fortement à la surface extérieure des spores, (Marahiel, M et *al.*,1979) , (Piret, J et *al.*,1982) . Les spores mutants manquent de la gramicidine S et germent rapidement car ils n'ont pas une surface lipophile, (Rosenberg, M 1981) . L'activité antibactérienne de la gramicidine S est due à son activité de surface très élevée, (Danders, W et *al.*, 1982) , (Ivanov, V et *al.*, 1977) .
- **Les Polymyxines :** Il s'agit d'un groupe d'antibactériens produits par *Brevibacterium polymyxa* et bacilles connexe, (Paulus, H et *al.*, 1967) . La Polymixine B est un décapeptide dans laquelle les acides aminés 3 à 10 forment un octapeptide cyclique. Un acide gras à chaîne ramifiée est connecté à l'acide 2,4-diamino- terminal (DAB). Les Polymixines sont capables de solubiliser certaine enzymes de membrane, (Balakrishnan, R et *al.*, 1980) .
- **Les Surfactine (subtilysine) :** Un des plus actifs biosurfactants produits par *B. subtilis* est un lipopeptide surfactine cyclique, (Arima, K et *al.*,1968) , (Bernheimer, A et *al.*, 1970) . Le rendement en produit de surfactine par *B. subtilis* peut être amélioré à environ 0,8 g / l en éliminant en continu l'agent tensio-actif par le fractionnement de mousse et l'ajout de fer ou des sels de manganèse au milieu de croissance, (Cooper, D et *al.*, 1981) .

- **Les Antibiotique TA :** *Myxococcus xanthus* produit TA antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec la polymérisation du pentapeptide lipide disaccharide, (Zafriri, D et *al.*, 1981) des micros - organismes. Cet antibiotique TA a des applications chimio-thérapeutique très intéressantes, (Rosenberg, M et *al.*, 1986) .

II.4.2. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants peuvent être aussi efficaces et plus avantageux que les surfactants synthétiques. Ils sont hautement spécifiques, biodégradables ; Une étude réalisée par (Deschenes et *al.*,1996) reporte que *Pseudomonas aeruginosa* UG2, produit des biosurfactants qui n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations. Ces auteurs indiquent de plus que ce biosurfactant était biodégradable .

Biocompatibles avec l'environnement, (Mulligan, 2009), moins sensibles aux biotopes de températures, pH et salinité extrêmes, (Suwansukho et *al.,* 2008) , moins toxiques . Des tests de toxicité réalisés par Haba et *al.,* (2003) ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques . et peuvent être synthétisés en grandes quantités sur des sources d'énergies coûteuses comme les produits pétroliers, (Sarubbo et *al.*,2006) , mais aussi sur des ressources renouvelables .

Un autre avantage des biosurfactants est la possibilité de leur modification par biotransformation à fin de générer de nouveaux produits pour des besoins spécifiques, (Samadi et *al.,* 2007). Avec l'introduction de certains groupements fonctionnels, les biosurfactants fournissent de nouvelles propriétés surpassant ainsi les surfactants chimiques dans beaucoup d'applications, (Huang et *al.,* 2010) .

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement, ils possèdent les avantages suivants:

- Biodégradabilité: Les tensioactifs biologiques sont facilement dégradés par les micro-organismes, (Mohan PK et *al.,* 2006) .
- Faible toxicité: les biosurfactants démontrent une absence de toxicité par rapport aux tensioactifs chimiques dérivés. Il a également été rapporté que les biosurfactants ont montrés des valeurs supérieur de CE 50 (concentration efficace pour diminuer de 50% de la population d'essai) que les dispersants synthétiques, (Desai JD et *al.,* 1997) .
- La disponibilité des matières premières: Les biosurfactants peut être produit à partir de matières premières très bon marché qui sont disponibles en grandes quantités. La source de carbone peut provenir des hydrocarbures, des glucides et / ou des lipides, qui peuvent

être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres, (Kosaric N et *al.*, 2001).

- Les facteurs physiques: Beaucoup de biosurfactants ne sont pas affectés par des facteurs environnementaux tels que la température, le pH et tolérances bien la force ionique des milieux. Le Lichenysin produit par la souche *Bacillus licheniformis* n'a pas été affectée par des températures allant jusqu'à 50°C, une plage de pH de 4 jusqu'à 9 avec une concentration de 50 g / l de NaCl et 25 g / l Calcium, (Krishnaswamy M et *al.*, 2008).
- L'activité de surface et d'interface: (Mulligan CN et *al.*, 2005) a indiqué qu'un bon agent tensio-actif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane de 40 à 1 mN / m. Le surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane à < 1 mN / m (Krishnaswamy M et *al.*, 2008).

II.4.3. Applications majeures des biosurfactants

La production des biosurfactants par divers micro-organismes a été largement étudiée par différents groupes de recherche ; ils sont applicables dans de nombreux secteurs à savoir. L'environnement, l'agriculture, la médecine, les détergents, les cosmétiques et les aliments Les applications majeurs des biosurfactants sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II.3 : les applications majeures des biosurfactants.

Applications	**Rôle de Biosurfactants**
L'assainissement des sols et de rinçage	**Ecologique :** Émulsification par l'adhésion aux hydrocarbures, un agent moussant, détergent, rinçage du sol, lavage des sols contaminés par le pétrole brut.
Biorestauration	Émulsification des hydrocarbures, l'abaissement de la tension interfaciale, la séquestration du métal, la biodisponibilité et la biodégradation des hydrocarbures polyaromatique et les biphényles polychlorés, le développement du biofilm structurelle.
Biocontrol Les engrais phosphatés	**Agriculture :** La facilitation des mécanismes de lutte biologique contre les microbes tels que le parasitisme, antibiose, la concurrence, la résistance systémique induite, et hypo-virulence.

L'application par pulvérisation	Prévenir l'agglomération au cours du stockage, de mouillage, de dispersion, de suspension de propulsion pesticides et émulsification des solutions de pesticides, favoriser le mouillage, propagation et la pénétration de substances toxiques, utiles comme fongicides.
Récupération améliorée du pétrole Desémulsification	**La production de pétrole / Produits :** L'amélioration du drainage de l'huile dans le trou et, stimulant la libération d'huile piégé par des capillaires, en mouillant des surfaces solides, l'abaissement de la tension interfaciale, la dissolution de l'huile. Désémulsification d'émulsions de pétrole, la réduction de la viscosité de l'huile de solubilisation, un agent mouillant.
microbiologique Biomédicale et de la thérapeutique	**technologie biologique :** comportement physiologique comme la mobilité cellulaire, la communication cellulaire, des nutriments adhésion, la concurrence de cellule à cellule, plante, et la pathogenèse des animaux. Antibactériens, antifongiques, des agents antiviraux, des agents anti-adhésives à des agents pathogènes, des agents probiotiques, des molécules immuno modulateurs, les vaccins, la thérapie génique, les érythrocytes lyse, inhiber la formation de caillots, des sphéroplastes bactériens et lyse des protoplastes.
Santé et produits de beauté	**Cosmétique** Émulsifiants, des agents de solubilisation, des agents mouillants, des nettoyants, des agents antimicrobiens, des médiateurs de l'action de l'enzyme moussant, crème hydratante.
produits d'entretien détartrage tissus	**Nettoyage industriel** Détergents et désinfectants. des agents inhibiteurs de corrosion et de mouillage dans le nettoyage à l'acide des tubes de chaudières et échangeurs de chaleur. Détergents pour la lessive et le nettoyage à sec.

II.5. Conclusion

les biosurfactant sont des molécules possède des propriété physico-chimique telle que , Abaissement de la tension superficielle ,pouvoir émulsifiantes, moussantes, mouillantes et même pouvoir antimicrobien .la recouvrement des biosurfactant est l'un des étapes de plus important au cours la production dépend principalement la nature et les caractéristiques de biosurfactant .

les biosurfactant sont plus avantageuse que homologue chimique car ils est biodégradable, non toxique, la disponibilité de matière premier et ces propriété peuvent être conservé lorsque des conditions extrêmes (PH acide et température élevé). L'application des biosurfactants a des plusieurs domaine industriel comme pharmaceutique ; agriculture ; cosmétique ; industrie pétrolière ….

CHAPITRE III

III.1. Objectif

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antimicrobienne du biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* sur plusieurs sources de carbone à savoir la boue morte d'hydrocarbure, le diesel et le kérosène en milieu liquide. L'évaluation de l'activité antimicrobienne s'effectue sur trois microorganismes, *Staphylococcus aureusATCC29213* Gram positif, *Bacillus subtilisATCC6631* Gram positif, *Escherichia coli ATCC11150* Gram négatif. Tous ces microorganismes sont pathogènes avec des potentialités différentes selon le type d'infections provoquées ce qui a motivé leur choix. Ainsi, les techniques d'évaluation sont la dilution successive en milieu liquide, le test de disque d'antibiogramme en milieu solide.

III.2. Matériel et Méthodes

III.2.1.1. Matériel

Cette étude est effectué au niveau de laboratoire de hall technologie de l'université de Médéa ; et pour réaliser cette expérience on a besoin des matérielles qui t'exprimé comme suit :

- ✓ Incubateur agitateur de type VWR utilisé pour la production des biosurfactants
- ✓ Spectrophotomètre UV/visible type mini 1240 SHIMADZU utilisé pour suivi la cinétique de production
- ✓ la mesure la potentiel hydrogène fait par pH mètre de type ultra basic
- ✓ Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des solutions et les milieux de culture
- ✓ Pour la récupération des biosurfactants nous avons utilisé la Centrifugeuse de type hettich EBA20
- ✓ Et pour déterminer l'indice d'émulsification et pour l'utilisation microbiologique on a utilisé Vortex de type VELP
- ✓ Autoclave pour la stérilisation des solutions et les milieux de cultures
- ✓ Toutes les pesées sont effectuée à l'aide d'un Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg
- ✓ Etuve de type memmert utilisé pour l'incubation des microorganismes

- ✓ La tension superficielle est mesuré a l'aide d'un tensiomètre de Nouy de type PHYWE avec un anneau en platine.
- ✓ Les données sont traitées à l'aide de l'Excel et logiciel Origine.

III.2.1.2. Liste des produits

Les produits utilisés au cours de toutes les expériences sont consignés dans le tableau III.1 ci-dessous :

PRODUIT	**TYPE**
$MgCl_2$	FLUKA
K_2SO_4	RIEDEL-DE HAËN
Agar-Agar	BIOKAR FRANCE
Glycerol	CATT KOLLER
KH_2PO_4	RIEDEL-DE HAËN
$FeCl_3$	SIGMA -ALDRICH
$CaCl_2$	RIEDEL-DE HAËN
KNO_3	SIGMA -ALDRICH
Ethanol absolu 99%	SIGMA-ALDRICH
Kerosene	FLUKA
Extrait de levure	CULTUMED
HCl	SIGMA-ALDRICH
Agar nutritive	CONDA
NaCl	CHEM-LABO NV
$MgSO_4$	SIGMA-ALDRICH

III.2.2. Méthodes

III.2.2.1. Phase d'activation

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est du genre *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* obtenue auprès de l'hôpital de Médéa – Algérie. La souche étant à l'état de congélation une activation est nécessaire de ce fait afin de réactiver les capacités métaboliques du microorganisme pour la production des biosurfactants. Ainsi, l'activation a été effectuée sur un milieu solide gélose au cétrimide dérivé de milieu King B de type « Biokar diagnostics France » afin de préserver la sélectivité et minimisé les contaminations biologiques.

Tous les éléments de milieu ont été ajoutés successivement puis chauffer sous agitation constante jusqu'à l'ébullition puis stérilisé à l'aide d'un autoclave à 121°C pendant 15 min. Après la stérilisation, le milieu a été refroidi jusqu'à température de

47°C, sous conditions aseptiques. Le milieu refroidit a ensuite été coulage dans des boîtes de pétri de 90 mm . Les boîtes de pétri ont été par la suite ensemencées par la technique de strie et incubées pendant 48 h dans l'étuve à 37°C selon les recommandations de la pharmacopée UE et US (2003).

III.2.2.2. Phase d'adaptation

L'adaptation de la souche à la source de carbone a pour but de facilité le métabolisme en milieu liquide fermentatif. Ainsi, cette étape a été réalisée cependant sur un milieu solide de Nutrient-agar non sélectif afin de permettre à la souche une croissance massive sur le diesel et le kérosène. Le milieu Nutrient-agar a été préparé sous les recommandations de UE et US pharmacopée (2003) puis coulé sur des boîtes de pétri. Le milieu Nutrient-agar a ensuite été couvert par une couche d'une solution stérile d'hydrocarbure de 0,1 ml d'une concentration de 1,055 g/l déposée à l'aide d'une micropipette puis étalé par la pipette pasteur (formation d'une couche mince de l'hydrocarbure). Il a été ainsi ensemencé par une suspension bactérienne par étalement de 0,1 ml de l'inoculum préparé au moyen d'une quantité suffisante d'une eau physiologique pour l'inoculation bactérienne. L'ensemencement ainsi effectué, les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 48 h à l'étuve, Figure III.1.



Figure III.1 : Incubation lors de la phase d'adaptation a 37°C pendant 48 h de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027.*

III.2.2.3. Production des biosurfactants

La synthèse des biosurfactants a été effectuée sur un milieu fermentatif basé sur la formulation de Zajic et *al.*, (1977). Le milieu de culture pour la production des glycolipides comporte les éléments suivant en proportion strictement dépendante de la capacité du bioréacteur batch (g/l): NaCl 2; $MgSO_4.x\ H_2O$ 0,8; $CaCl_2.2H_2O$ 0,15; $FeCl_3.0,7H_2O$ 0,08 ; extraits de levure 12 $g.l^{-1}$ d'eau distillée, du tampon phosphate KH_2P0_4 monobasique 8 comme stimulant à la croissance et stabilisant du pH. Il faut noter que ses produits ont été pesés avec un maximum de précision sous forme anhydre. Ainsi, les éléments traces sont ajoutés en raison de 2,5 $ml.l^{-1}$ de culture : $ZnSO_4$ 35 mg ; $MnSO_4$ 60 mg ; $FeSO_4.5H_2O$ 25 mg; $CuSO_4$ 25 mg; $CoCl_2.6H_2O$ 70 mg, H_3BO_3 32 mg; KI 10 mg; et de l'EDTA 180 mg par litre d'eau distillée avec de l'extrait de levure qui contient 10% en azote. Tous les éléments ont été dissous dans l'eau distillée puis agité pendant au moins 5 min pour bien homogénéiser. Le batch est constitué d'un Erlenmeyer de 250 ml placé dans l'incubateur agitateur pendant 72 h à 37°C et 250 tr/min.

Le milieu ainsi homogénéisé, le pH a été ajusté au moyen d'un pH mètre à 6,0 ± 0,01 avec de la soude 1N ou de l'acide chlorhydrique 1N. Le milieu a été stérilisé pendant 15 minutes à 121ºC à l'autoclave. Après la stérilisation, le milieu est refroidit à l'eau du robinet et le pH mesuré puis ajuster à 7,0 ± 0,01 avant tout ensemencement.



Figure III.2 : Incubateur agitateur type VWR.

III.2.2.3.1. Suivi cinétique de la croissance

Le suivi de la production des biosurfactant a été effectué par mesure de la densité optique de la biomasse d'un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 600 nm. Après chaque 3h et en conditions aseptiques un prélèvement de 10 ml de milieu fermentatif est effectué et dosé à 600 nm avant et après une série de trois étapes de centrifugation de 10 ,15 et 20 min successivement à 6000 tr/min. La densité optique DO de la biomasse est donnée par la formule suivante :

$$\boldsymbol{DO = DO_{avant\ centrifugation} - DO_{après\ centrifugation}} \quad \text{(III.1)}$$

III.2.2.3.2. Extraction des biosurfactants

Au bout de 72 h de fermentation le ferment a été centrifugé et le milieu acellulaire contenant les biosurfactants a été acidifié avec du HCl 4M jusqu'à pH = 2. Le milieu ainsi acidifier a été réfrigéré à 4°C pendant 24 h afin d'éliminé les fragments protéiques contenue. L'extraction des biosurfactants a été ensuite effectué par précipitation à l'éthanol absolu 99 % à froid sous agitation constant jusqu'à la précipitation totale de toute la quantité des biosurfactants contenue dans batch. Le précipité est placé au réfrigérateur pendant 24 h à 4°C. Les biosurfactants produits sont récupérés par centrifugation à 6000 tr/min pendant 20 min et séchés au dessiccateur sous vide en présence des billes du gel de Sephadex.



Figure III.3 : Précipitation des biosurfactants à l'éthanol absolu 99 % à froid.

III.2.2.4. Etude physicochimiques et biologique des biosurfactants

III.2.2.4.1. Indice d'émulsification EI_{24}

L'indice d'émulsification est une caractéristique décrivant la présence des biosurfactants dans un milieu acellulaire fermenté. L'évolution de la tension superficielle du milieu qui indique la production des biosurfactants est suivie au moyen de la méthode de Noüy à la fin de la culture et l'indice d'émulsification EI_{24}, estimé par la méthode de Cooper et Goldenger (1987). Des échantillons de 2 ml sont pris après centrifugation puis ajustés à 4 ml avec du kérosène et soumis à une agitation au vortex pendant 5 min. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h. L'indice d'émulsification à 24 h (EI_{24}) est donné en pourcentage constitué de la hauteur de la couche émulsionnée (mm) divisé par la hauteur totale de la colonne du liquide (mm) suivant la formule III.2.

$$EI_{24}\% = \frac{H_{emulsionnée}}{H_{colonne}} * 100 \qquad \text{(III.2)}$$



Figure III.4 : Formulation de l'émulsification du milieu acellulaire à l'aide d'un vortex.

IIII.2.2.4.2. Activité moussante

L'activité moussante est une propriété des biosurfactants en solution aqueuse sous l'action de la turbulence provoquée par une quantité d'air injecté ou due à une agitation de la solution par formation des micelles. Le biosurfactant obtenu après séchage est dissout dans une quantité d'eau pour une concentration de g/l au moyen un bain ultrason dans une éprouvette graduée jusqu'à la dissolution totale de biosurfactant. Les propriétés moussantes sont mesurées à l'aide de la méthode décrite par Padmashree and *al.,* (1987) 3 g de biosurfactants sont mélangés à 300 ml d'eau dans une éprouvette graduée d'un Litre. La suspension est agitée à 1600 tr/min pendant 5 min à l'aide du Turbotest Raynerie. Le volume est mesuré 30 s après l'agitation. La capacité moussante (CM) est exprimée en pourcentage de volume (liquide + mousse) en utilisant la formule (III.3) suivante :

$$CM = \frac{volume_{après\ agitation} - volume_{avant\ agitation}}{volume_{avant\ agitation}} \qquad \text{(III.3)}$$

Le volume de mousse est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après agitation. La stabilité moussante (SM) est calculée en utilisant la formule (III.4) suivante :

$$SM = \frac{volume\ de\ la\ mousse\ après\ un\ temps\ (t)}{volume\ initial\ de\ la\ mousse} \qquad \text{(III.4)}$$

III.2.2.4.3. Détermination de la concentration micellaire critique CMC

Deux méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la concentration micellaire critique (CMC) des biosurfactants bruts à savoir la méthode utilisant un tensiomètre de Noüy et la méthode par conductimétrie. Le but est alors de comparer les résultats suivants une gamme de concentration d'une série plus faible à une série plus grande. Toutes les mesures ont été effectuées à une température de 25°C.

La CMC a été déterminée à partir de la mesure de la conductivité des solutions aqueuses des biosurfactants. Ainsi les valeurs de la conductivité seront portées en fonction de la concentration G = f(C). Pour l'étalonnage de l'instrument, la conductivité de l'eau pure a été mesurée avant chaque série d'expériences.

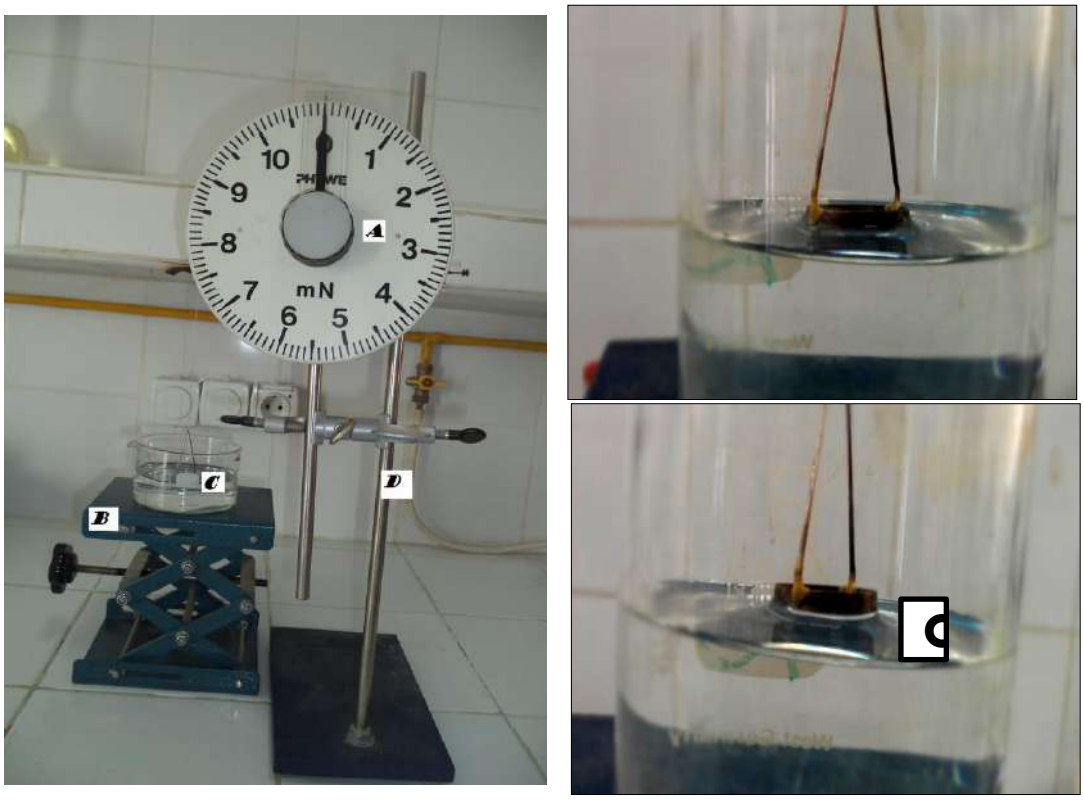


Figure III.5 : Etapes de mesure de la tension superficielle par arrachement de l'anneau de Nouy. **A :** disque tournant gradué**, B :** support élévateur**, C :** anneau en platine**, D :** support du tensiomètre.

III.2.2.5. Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants

III.2.2.5.1. Etude en milieu Solide (test d'antibiogramme)

Le test de sensibilité aux biosurfactants effectué sur un milieu solide suit les étapes de la réalisation d'un antibiogramme. Ainsi, les boîtes de pétri ont été ensemencées par une suspension bactérienne de 0,1 ml de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland pour *E. coli ATCC11150, B. subtilis ATCC6631, S. aureus ATCC29213* avant le dépôt des disques de diffusion massique. Les disques de diffusion ont été imprégnés d'une solution de biosurfactants de concentration10 g/l pendant 5 min. Le disque imbibé est déposé par la suite sur une lame de façon aseptique (à la proximité d'un bec bunsen) pour éliminer l'excès d'eau avant d'être posé sur la gélose. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pour *E. coli, B. subtilis, S. aureus* pendant 24 h. Le disque de diffusion permet à la substance de se propager sur le milieu suivant un transfert de matière

coaxiale en fonction du temps d'incubation. La diffusion de la matière freine la croissance du microorganisme au tour de la surface de diffusion coaxiale. Ce qui permet d'observer une variation de la densité bactérienne en fonction de la zone de diffusion de la matière. Elle permet de situer la zone d'inhibition et la zone de destruction sur la gélose au bout d'un temps d'observation.

III.2.2.5.2. Détermination de la CMI

Le paramètre le plus souvent utilisé pour évaluer l'effet d'un antibiotique est la CMI. Elle correspond à la concentration minimale d'une substance antimicrobienne qui inhibe la croissance visible du germe en 24 h. Cette valeur a été déterminée en milieu solide suivant le test d'antibiogramme et en milieu liquide suivant la technique des dilutions successives.

La méthode de diffusion par disque imprégné en milieu solide est la méthode de référence pour déterminer la sensibilité microbienne aux antibiotiques dans ce cas les biosurfactants. Par l'utilisation des disques de papier buvard, qui sont imprégnés de solution de biosurfactant de concentration différente et déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure du microorganisme à étudier. La lecture des résultats s'est effectuée après 24 h d'incubation à 37°C à l'étuve.

La technique de dilution successive en milieu liquide employant des bouillons nutritifs, consiste à effectuer des dilutions décimales de la solution aqueuse des biosurfactants dans un intervalle de $[10^{-8}$; 10] g/l en présence d'une quantité identique dans tous les tubes de 15 ml de la suspension microbienne à tester avec DO_0 = 0,337 ± 0,02 pour *E.coli*, DO_0 = 0,450 ± 0,02 pour *S. aureus*, DO_0 = 0,258 ± 0,02 pour *B. subtilis* sur du biosurfactant produit avec le kérosène, DO_0 = 0,206 ± 0,02 pour *E. coli*, DO_0 = 0,151 ± 0,02 pour *S. aureus*, DO_0 = 0,146 ± 0,02 pour *B. subtilis* sur du biosurfactant produit avec le diesel et enfin DO_0 = 0,191 ± 0,02 pour *E. coli*, DO_0 = 0,160 ± 0,02 pour *S. aureus*, DO_0 = 0,202 ± 0,02 pour *B. subtilis* sur du biosurfactant produit avec la boue morte d'hydrocarbures. La croissance microbienne est appréciée par l'apparition du trouble dans le milieu caractéristique de la croissance ou l'absence du trouble par l'apparition d'un milieu transparent ou peu transparent. Ainsi la CMI a été aussi suivi par mesure de la densité optique microbienne du milieu avant et après le

temps d'exposition de 24 h à 37°C pour tous les microorganismes testés afin de mieux confirmé le résultat de l'observation.



Figure III.6 : La détermination de la CMI sur le milieu liquide.

CHAPITRE IV

IV .1. Phase de L'activation

L'activation de la souche *P. aeruginosa ATCC 9027* a pour but de rajeunir les caractéristiques métaboliques de la souche. Les critères recherchés par cette étape portent essentiellement sur les caractéristiques morphologiques et phénotypiques. Ainsi les résultats ont démontré que des amas visible à l'œil nu, des colonies formées au bout de 48 à 72 h d'activation sur un milieu solide gélosé au cétrimide, constitué d'une pigmentation caractéristique jaune – vert, suivant une morphologie ronde et plate et d'un contour régulier. Les colonies avaient un diamètre moyen de 1 à 2 mm comme le montre la figure IV.1 ci – dessous.

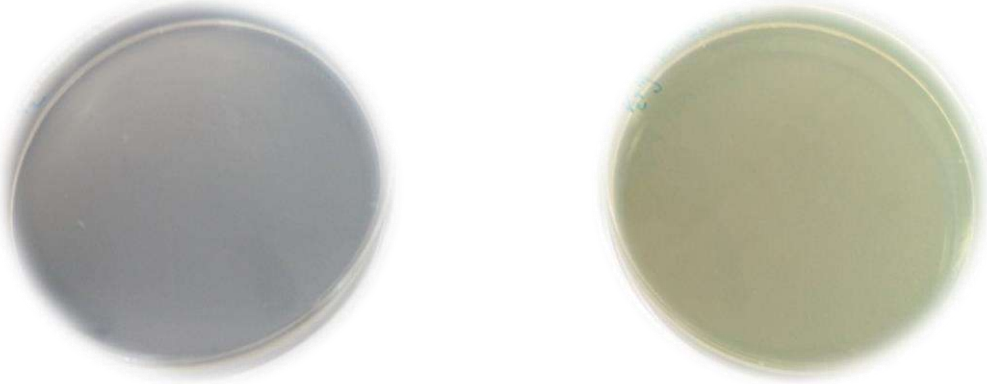


Figure IV .1: Activation de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* sur gélose au cétrimide.

IV.2. Phase d'adaptation

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 peut utiliser plusieurs sources de carbone pour sa croissance en milieu solide ou en milieu liquide car elle est peut exigeante du point de vue nutritionnel. L'objectif de ce travail consiste en la production et l'application des biosurfactants issus des diverses sources de carbone, l'adaptation de la souche a la source de carbone permet ainsi de limiter la phase de latence en milieu fermentatif. Le résultat obtenu lors de cette adaptation comme envisagé dans la procédure expérimentale a montré qu'au bout de 24 h les colonies de coloration verte caractéristique de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* sur les

hydrocarbures en milieu solide commencent à pousser sur la gélose comme le démontre la figure IV.2.



a) **b)**

Figure IV. 2 : a) le milieu avant l'incubation de la souche ; **b)** le milieu après adaptation.

IV.3. Production des biosurfactants

IV.3.1. Cinétique de production des biosurfactants

La cinétique de production de biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*sur le diésel et sur le kérosène a été suivi par mesure de la densité optique de la biomasse caractérisant la croissance de la souche dans le milieu fermentatif et l'indice d'émulsification caractéristique de la production des biosurfactants en fonction du temps **(tableau 1 et 2 annexe II)**. Les résultats obtenus montrent la cinétique de croissance (Figure IV.3) est caractéristique de la croissance d'une bactérie. La courbe de croissance sur le diesel caractérise une croissance en deux temps ce qui démontre la présence de deux substrats dans le milieu. Cela s'explique par le fait que le diesel étant insoluble dans un milieu aqueux comme l'eau, il a été ainsi solubilisé dans une solution éthanol – eau (25 / 75 %) avant d'ajouter les nutriments pour la fermentation. De plus, les résultats expérimentaux montrent que le diesel par nature est un mélange de plusieurs sources de carbone sur lesquelles *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* peut croitre en continue dans le milieu fermentatif durant une période de 72 h sans l'apparition d'un facteur limitant.

La première phase de croissance sur le substrat le plus facilement dégradable se situe entre 3 h et 22 h comme le montre la figure IV.3 suivie d'une légère phase de latence intervenant entre 22 h et 28 h. La deuxième phase de croissance qui représente la croissance sur le diesel étant le substrat le plus difficilement dégradable intervient entre 28 jusqu'à 72 h. Ces deux phases de croissance représentent un phénomène de diauxie car *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* possède des enzymes inductives lui permettant d'effectuer une diauxie par induction. Ainsi la deuxième phase de la croissance est une phase induite par les enzymes en réponse au stimulus qui est le diesel.

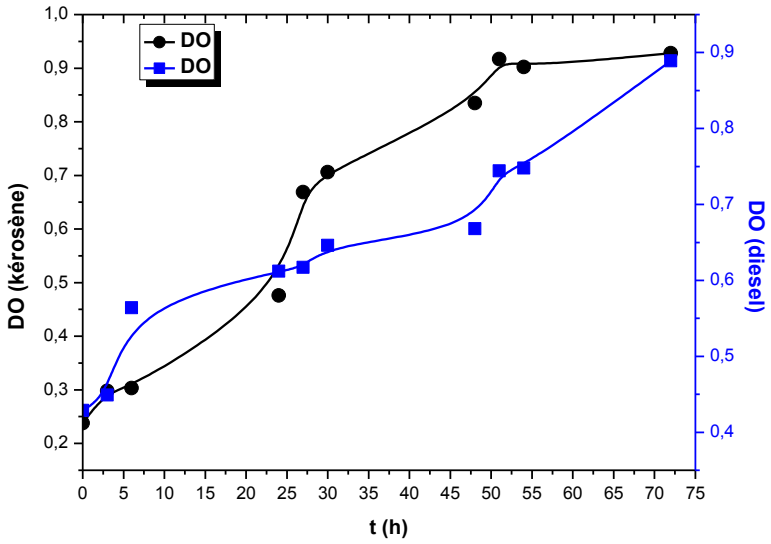


Figure IV.3 : Suivi de la croissance en fonction de temps par DO.

La figure IV.3 montre que la croissance de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* sur du kérosène est caractérisée par une croissance en un seul temps au contraire du milieu contenant la solution du diesel. Cette croissance démontre une phase d'accélération entre 0 h et 6 h de culture à 37°C. La phase d'accélération est suivie par une phase de croissance exponentielle s'effectuant entre 6 h et 48 h avec un taux horaire maximum entre 30 h et 32 h, $\tau = 0{,}0157\ h^{-1}$. La phase exponentielle est suivie d'une phase de ralentissement caractéristique de l'apparition du facteur limitant dans le milieu d'où l'appauvrissement du milieu de culture, provoquant ainsi un stress nutritif à la souche entre 48 h et 52 h. Enfin la phase de ralentissement est suivie de la phase stationnaire entre 52 h et 72 h. La phase stationnaire s'est distinguée par une absence de renouvellement de la biomasse car la densité optique était stable. Ce qui signifie que la

croissance est freinée par le facteur limitant fixé dans ce travail comme étant la source d'azote.

IV.3.2. Cinétique d'émulsification

La croissance sur le milieu contenant le diesel caractérisée par une croissance en deux temps ou diauxie. Cette croissance en deux temps décrit la présence de plusieurs sources de carbone dans le milieu est aussi relatée par le suivi de la cinétique d'émulsification (Figure IV.5). La première phase de croissance sur le diesel démontre un indice d'émulsification de EI_{24} = 54,50 % correspondant à 24 h de culture et caractéristique de la croissance sur un premier substrat avec une DO = 0,476. La deuxième phase de croissance sur le diesel démontre une phase exponentielle relativement à l'indice d'émulsification et la densité optique DO = 0,835 et un indice d'émulsification EI_{24} = 57,00 % à 48 h de culture. La croissance sur le kérosène montre un indice d'émulsification EI_{24} = 52,00 % à 48 h correspondant à une DO = 0,668 à la phase de croissance exponentielle. Un autre indice d'émulsification EI_{24} = 52,00 % à 72 h de culture correspondant à la phase stationnaire donc lié au stress nutritif dans le milieu. Ainsi ces résultats montrent que la production des biosurfactants à partir du *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* est une productivité liée à la croissance et au stress. Les études menées par ; Patel et Desai (1997) ; Benincasa et *al.*, (2004) ; Wei et *al.*, (2005) ; Marchant et Banat (2012) et Bassirou M.H (2014) ont démontré des comportement similaires par *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* en présence d'une source de carbone biodégradable.



a) **b)** **c)**

Figure IV.4 : Les étapes de détermination de l'index d'émulsification. **a)** avant agitation, **b)** après agitation directe et **c)** après 24h de repos.

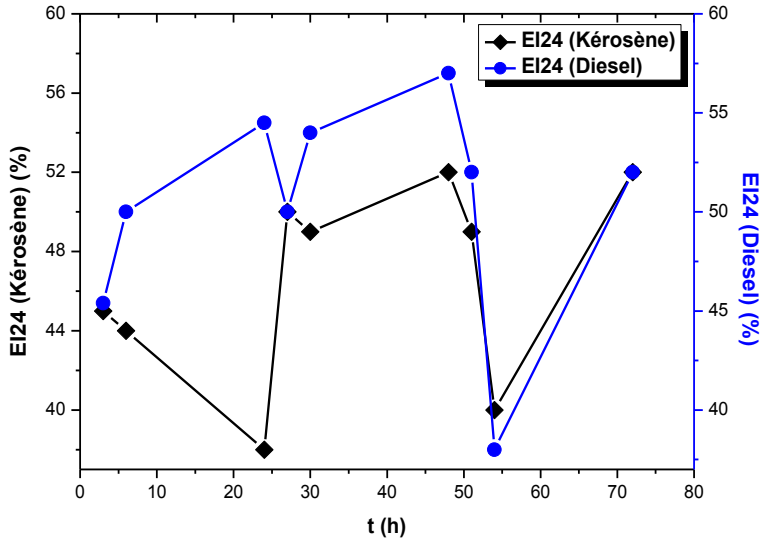


Figure IV.5 : Suivi de l'indice d'émulsification du milieu acellulaire.

IV.3.4. Détermination de la concentration micellaire critique CMC

La détermination de la concentration micellaire critique CMC a été effectuée par mesure de la conductimétrie des solutions aqueuses des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* sur trois sources de carbone à savoir la boue morte d'hydrocarbure, le diesel et le kérosène afin d'effectuer une étude comparative de l'efficacité de la source de carbone de production et la spécificité des biosurfactants vis-à-vis la source de carbone. Ainsi des solutions aqueuses de ces trois biosurfactants ont été dosées dans un intervalle de concentration de [0 – 1,8] g/l. Les résultats de la conductivité sont portés en fonction des concentrations des biosurfactants comme le montre la figure IV.6, $G = f(C)$. Les valeurs des CMC obtenues sont pour le biosurfactants issu de la boue morte est de C_B = 1,2 g/l, celui du diesel C_D = 1,3 g/l et celui du kérosène C_K = 1 g/l, (figure IV.6**)** ci - dessous.

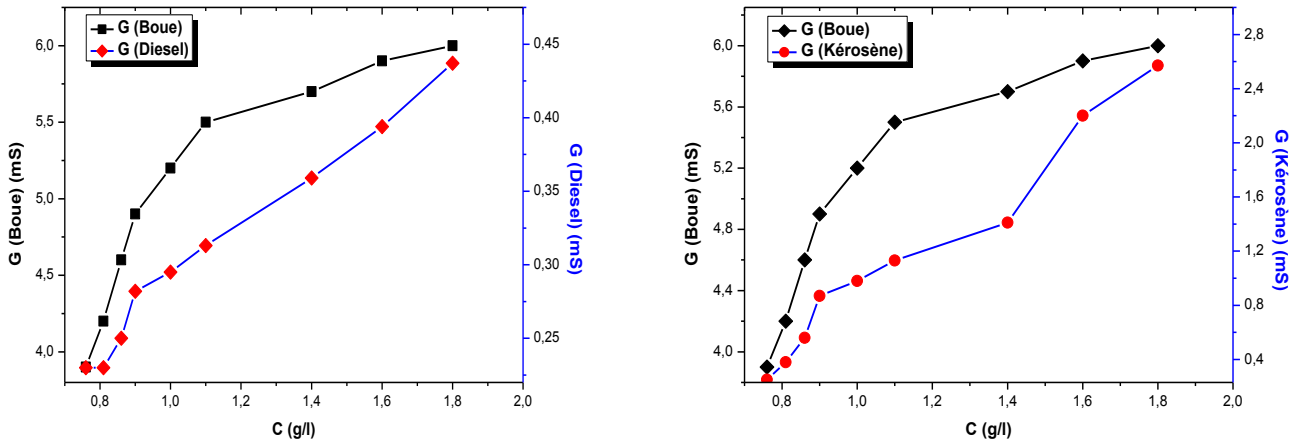


Figure IV. 6 : Détermination de la CMC par conductimétrie .

IV.3. 5. Activité moussante

L'activité moussante et sa stabilité (Figure IV.7) tout comme l'indice d'émulsification, la CMC et l'abaissement de la tension superficielle par les biosurfactants sont des propriétés caractéristiques relatives à la nature et à la spécificité moléculaire. L'activité moussante détermine aussi la spécificité d'un biosurfactant à la source de carbone de production et au type de microorganisme producteur. Ainsi, les trois biosurfactants employés dans cette étude ont montré une capacité moussante spécifique au vu des résultats obtenus, (tableau IV.1). La capacité moussante du biosurfactant obtenue sur le kérosène après 30 s est la plus élevée suivi de celle du Diesel et enfin celle de la boue morte. Cependant, la stabilité de la mousse en fonction du temps est plus élevée pour le biosurfactant obtenu avec une boue morte d'hydrocarbure comme source de carbone. Cela peut être expliqué par le fait que la boue morte contient une source de carbone plus difficilement dégradable par rapport à celle de deux autres sources. Ce qui est à l'origine d'un biosurfactant d'un poids moléculaire plus élevé et d'une structure chimique plus complexe que dans les deux autres cas. De plus, suivant les résultats du tableau IV.1, il existe une similarité en termes d'indice moussant et de stabilité moussante entre le diesel et la boue morte d'hydrocarbure. Ce qui signifie qu'à l'origine la boue morte d'hydrocarbure recèle un contenu en carbone des propriétés chimiques identiques avec le diesel.

Tableau IV.1 : Suivi de l'activité moussante et la stabilité de la mousse en fonction du temps.

	CM	**SM**				
temps	**30 s**	**5 min**	**30 min**	**60 min**	**120 min**	**300 min**
Kérosène	0,09	1	0,66	0,66	0,33	/
Diesel	0,08	1	1	1	0,66	0,33
Boue morte	0,06	1	1	1	1	0,66



Figure IV.7 : Capacité moussante des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa ATCC9027*.

IV.4. Etude de l'effet antimicrobien des biosurfactants

IV.4.1. Effet antimicrobien en milieu Solide

Le test de diffusion sur gélose a été entrepris dans le but d'étudier l'effet inhibiteur ou bactéricide des biosurfactants sur les microorganismes en tant que facteur de virulence produit par *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* lors de sa croissance en milieu fermentatif. Les résultats obtenus concernent trois microorganismes dont *S.aureus, B.subtilis et E.coli* deux à Gram positif et un à Gram négatif. Des concentrations de biosurfactants de 10 g/l de solutions d'immersion ont permis

d'obtenir les résultats consignés dans le tableau IV.2 pendant une période d'incubation de 24 h à 37°C.

Tableau IV.2 : Activité antimicrobienne de biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027* à une concentration de 10 g/l.

	Zone d'inhibition		
	Gram -	Gram +	
	E. coli	*B. subtilis*	*S. aureus*
Kérosène	22	25	-/+
Diesel	26	28	-/+
Boue morte	19	28	-/+

Les résultats montrent que le biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* possède des propriétés antimicrobiennes très significatives au vue des expériences réalisées dans ce travail. Suivant les caractéristiques génétiques de ces trois bactéries testées et la spécificité des biosurfactants, les résultats montrent que les Gram positifs sont beaucoup plus inhibés que les Gram négatifs. Cependant les expériences ont montré un effet plus ou moins significatif sur le *S. aureus* qui est un Gram positif et extrêmement pathogène. Ce résultat est relativement lié aux conditions de manipulation et / ou à l'utilisation d'une grande densité bactérienne pour l'ensemencement de la gélose (voir Figure IV.8B). De plus, une concentration de 10 g/l ne constitue pas une valeur optimale permettant une bonne réactivité des biosurfactants dont le pouvoir d'action dépend des faibles concentrations en fonction des conditions physicochimiques du milieu de dissolution.

En outre les résultats obtenus avec le *Bacillus subtilis* et le *Staphylococcus aureus* (Figure IV.8B et 8C) montrent que le facteur génétique des bactéries participent dans l'activité antimicrobienne des biosurfactants. De plus ces résultats montrent que l'attaque du biosurfactant sur les bactéries se situent au niveau de la paroi membranaire ou à la membrane cytoplasmique et / ou le peptidoglycane. En effet l'activité antimicrobienne des biosurfactants est beaucoup plus importante chez les bactéries ayant un peptidoglycane de faible poids moléculaire donc les Gram négatifs que chez les bactéries ayant un peptidoglycane épais, les Gram positif (Figure IV.8 et tableau

IV.2). Cette indication est très importante en thérapeutique car elle permettra d'orienter la thérapie lorsque l'agent pathogène est identifié Gram négatif ou positif.

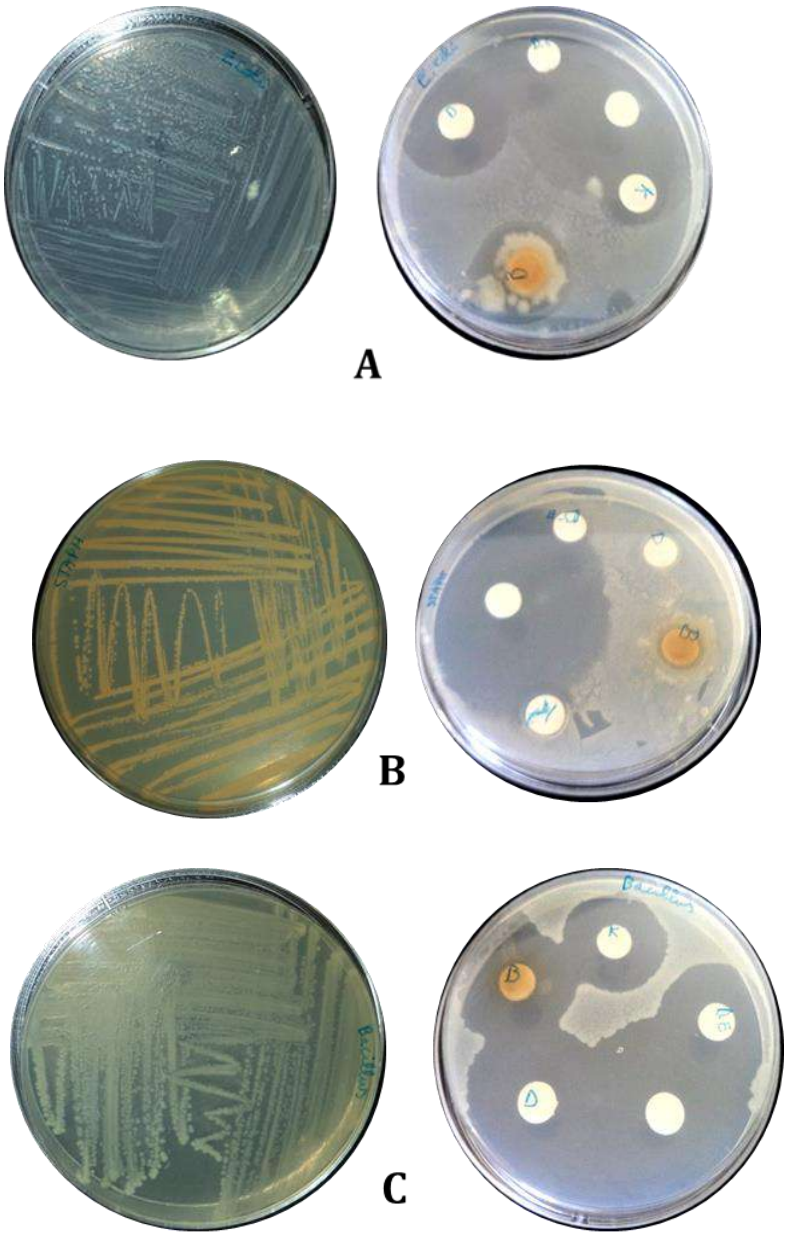


Figure IV.8 : Test de diffusion sur gélose portant sur les trois bactéries avec les trois biosurfactants à 10 g/l pendant 24 h à 37°C.

Le mécanisme d'action des biosurfactants semble s'identifié au mécanisme d'action des antibiotiques de types tensioactifs car les biosurfactants sont des tensioactifs par nature. Ainsi, les biosurfactants peuvent bloquer la synthèse de la paroi par inhibition de

la transpeptidase ce qui inhibe la synthèse du peptidoglycane. Ce qui provoque une déstabilisation de la paroi externe. Ce processus empêche la formation de nouvelles bactéries en bloquant la division cellulaire et peut entraîner la destruction du microorganisme. Les biosurfactants étant de structure identique avec les bicouches lipidiques de la membrane plasmique peuvent ainsi facilement s'intercaler dans les sites vides membranaires lors d'une contraction de la bicouche. Outre ce mécanisme l'abaissement de la tension superficielle en milieu liquide ou celle d'un solide par le principe d'adhésion des biosurfactants provoquent une augmentation de la charge électrique du milieu qui induirait une turgescence cellulaire.

IV.4.2. Détermination de la CMI

L'activité antimicrobienne des trois biosurfactants étudiés dans ce travail a porté sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice et le diamètre d'inhibition pour les trois souches considérées. Cette activité a été étudiée en comparant deux techniques de détermination de la CMI à savoir la diffusion sur gélose et la dilution successive.

IV.4.2.1. Diffusion sur gélose

Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice obtenues par la technique de diffusion sur gélose sont consignées dans le tableau IV.5 ci – dessous.

Tableau IV. 3 : Les valeurs de CMI en milieu solide

	Type de Biosurfactants par source de carbone					
	Diésel		Kérosène		Boue morte	
Souches	CMI (g/l)	D (mm)	CMI (g/l)	D (mm)	CMI (g/l)	D (mm)
E. coli	1	12	2	17	10^{-3}	19
B. subtilis	10^{-3}	13	2	11	10^{-3}	15
S. aureus	10^{-2}	12	2	17	10^{-3}	15

Les résultats du tableau IV.3 montrent que le biosurfactant produit sur une boue morte d'hydrocarbure agit plus efficacement en termes d'inhibiteurs sur les Gram positif tout comme sur les Gram négatif par rapport aux deux autres sources de carbone. La concentration minimale inhibitrice est la même pour les trois souches testées. Le

diamètre d'inhibition pour les Gram positif se proportionnel à la concentration minimale inhibitrice reflétant un caractère génétique de l'activité des biosurfactants sur ses bactéries, figure IV.9. En effet, les Gram négatif en l'occurrence *Escherichia coli* étudiée dans ce travail se comporte différemment d'un biosurfactant à une autre suivant la source de carbone de production.

Ainsi, les biosurfactants obtenus avec le kérosène et la boue morte d'hydrocarbure affectent plus significativement la bactérie que le biosurfactant obtenu avec le diesel. Cela s'explique par le fait que la diauxie observée avec le diesel et suivant la proportionnalité de la productivité en biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa*, Le biosurfactant obtenu avec cette source de carbone n'a pas atteint le niveau d'efficacité de celui obtenu avec les deux autres sources. Ce qui a réduit son spectre d'action sur cette souche en termes de diamètre d'inhibition. Cependant le biosurfactant obtenu sur du kérosène démontre une efficacité d'action a de très fortes concentrations soit sur les Gram positif soit les Gram négatif, figure IV.9. Ce qui démontre que la meilleure source de carbone pour une efficacité antimicrobienne est la boue morte d'hydrocarbure. En dépit de cette comparaison, les biosurfactants testés dans cette étape montrent un grand potentiel d'application en pharmaceutique, en agroalimentaire, en cosmétique et en conservation en plus de leur biodégradabilité.

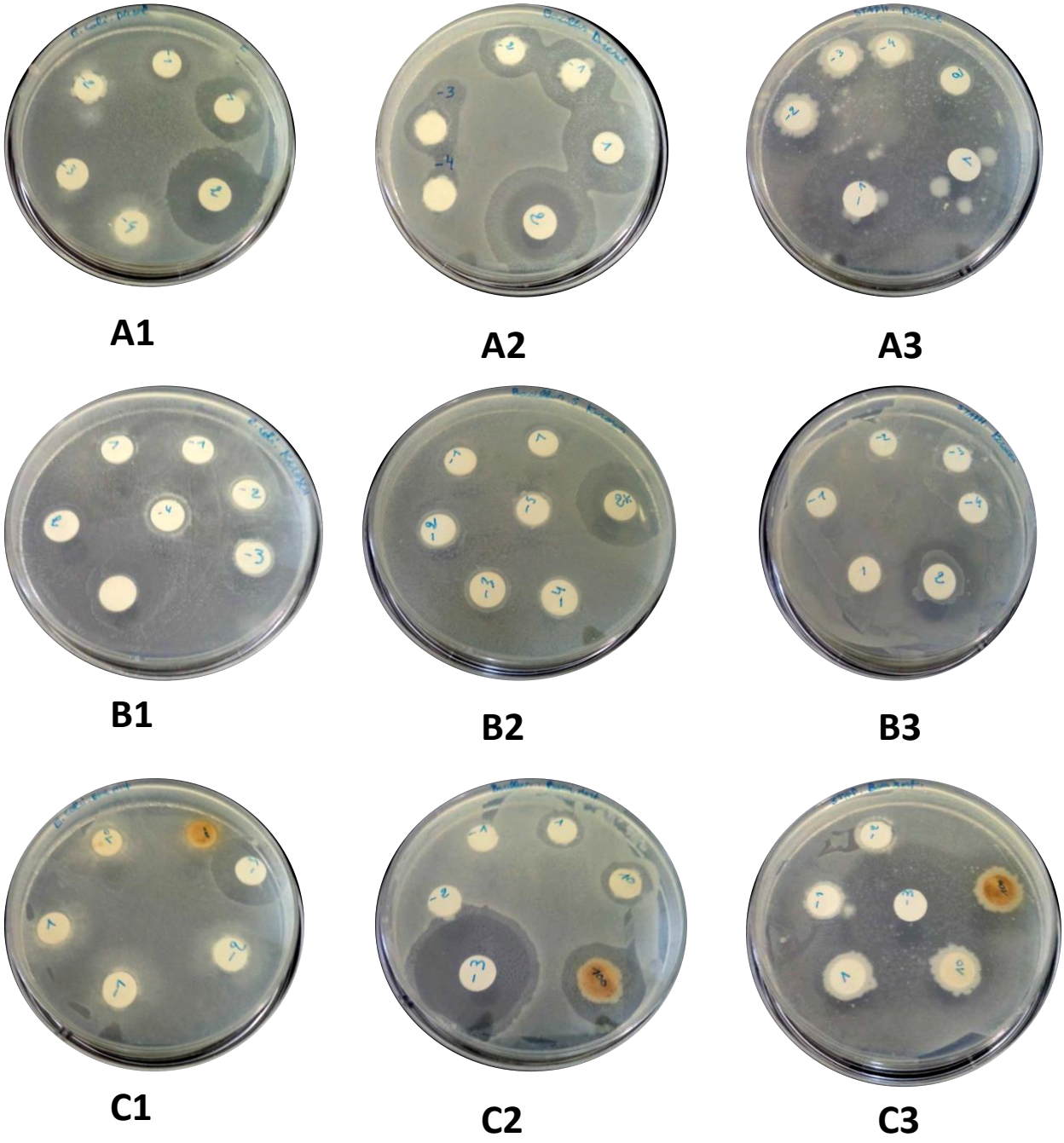


Figure IV.9 : Détermination de la CMI par diffusion sur gélose. A1) *E. coli*, A2) *B. subtillis* et A3) *S. aureus* sur le diesel ; B1) *E. coli*, B2) *B. subtilis* et B3) *S. aureus* sur le Kérosène et C1) *E. coli*, C2) *B. subtillis* et C3) *S. aureus* sur la boue morte d'hydrocarbure.

IV.4.2.2. Dilution successive

La technique de dilution successive a été employée en vue d'élucider le comportement des différentes souches testées dans le milieu liquide où la mobilité moléculaire et cellulaire affecte l'action antimicrobienne des biosurfactants. Ainsi l'effet antimicrobien a été suivi par mesure de la densité optique du milieu après 24 h d'incubation à 37°C avec un intervalle de concentration en biosurfactant de [0 – 2] g/l, figure IV.10. La technique de dilution successive recommandée par la norme AFNOR, ISO, la pharmacopée UE et US tout comme la technique de diffusion sur gélose précédemment expérimentée dans ce travail consiste en l'identification de la zone claire suivant les concentrations employées caractérisant l'inhibition du microorganisme dans le milieu constitué d'un bouillon nutritif. Ainsi, les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C (figure IV.10) montrent que le biosurfactant obtenu en employant le diesel à une concentration minimale inhibitrice (CMI) comprise entre $4{,}9.10^{-2}$ g/l pour *B. subtilis*, $5{,}6.10^{-2}$ g/l pour *E .coli* et *S. aureus*, figure IV.10.

Tandis que le biosurfactant produit sur la boue morte d'hydrocarbure présente une CMI de 5.10^{-2} g/l pour *E .coli* et 4.10^{-2} g/l *B. subtilis* et *S. aureus*. Les concentrations minimales inhibitrices du biosurfactant obtenus en employant le kérosène sont de $2{,}1.10^{-2}$ g/l pour *E. coli* et 2.10^{-1} g/l *B .subtilis* et *S. aureus*, figure IV.10.

Contrairement à la diffusion sur gélose où la déshydratation du milieu affecte l'effet antimicrobien, sur le milieu liquide l'hydratation avait permis au biosurfactant d'agir sur les microorganismes par augmentation de la solubilisation des biosurfactants dans le milieu qui favorise l'activité des groupements fonctionnels agissants sur la paroi cellulaire ou sur la structure protéique des cellules au même titre qu'un antibiotique avec un large spectre d'action (Gram positif et Gram négatif).

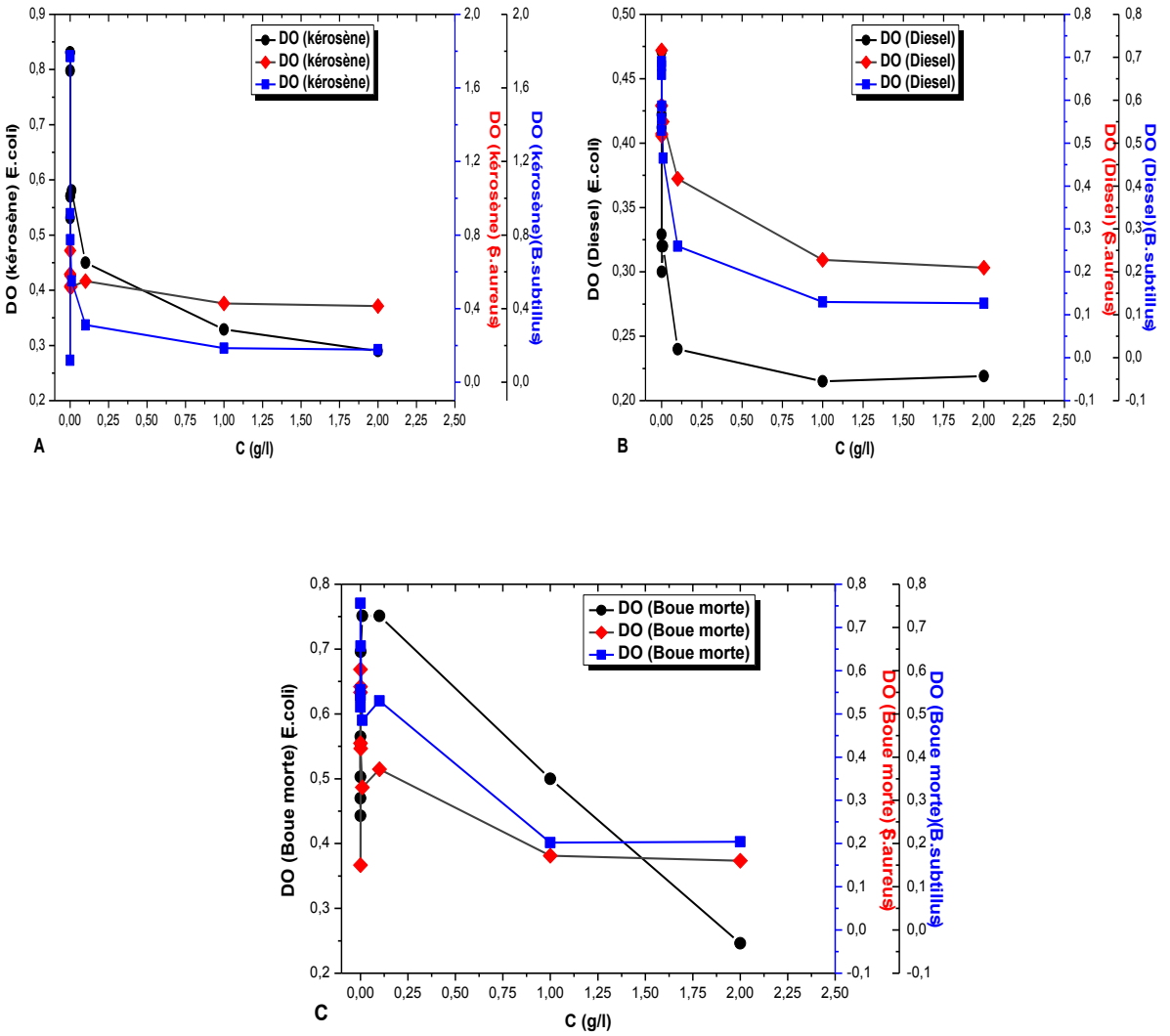


Figure IV. 10 : Effet antimicrobien du biosurfactant issu du kérosène (A) du Diesel(B) et la boue morte (C). $DO_{24h} = f(C)$.

L'activité antibactérienne des biosurfactants ainsi que leur mode d'action sont directement influencés par la nature et la proportion de leurs constituants qui entrent dans leur composition. La propriété amphiphile des biosurfactants donne un avantage pour dissoudre et réagir avec les parois des souches bactériennes et la surface de contact entre les biosurfactants et les souches bactériennes est augmentée en milieu liquide ce qui a permis l'entrainement du milieu liquide à l'intérieur des cellules bactériennes par turgescence provoquant ainsi l'éclatement des cellules.

IV.5. Conclusion

Cette étude a permis d'élucider la production des biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 sur trois sources de carbone à savoir la boue morte d'hydrocarbure, le diesel et le kérosène. Ainsi les biosurfactants produits ont été caractérisés suivant leurs propriétés d'abaissement de la tension superficielle par une concentration micellaire critique très faible, l'activité moussante du milieu acellulaire lors de la croissance de la souche productrice par indice d'émulsification et par les biosurfactants bruts décrivant une propriété tensioactive et la propriété antimicrobienne sur des microorganismes à Gram positif et à Gram négatif en tant que facteur de virulence pour la souche productrice afin de coloniser son milieu de croissance.

L'activité antimicrobienne a montré que les biosurfactants agissent en très faibles quantités soit en milieu solide soit en milieu liquide. Les résultats obtenus suite à cette étude démontrent que les biosurfactants constituent une nouvelle alternative pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique malgré la faible productivité de ces molécules pour lutter efficacement contre les bactéries par diverses formulations émulsionnantes ou stabilisantes des principes actifs avec effet antimicrobien.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale et perspective

L'objectif assigné à cette étude consiste en la détermination de l'effet antimicrobien des biosurfactants par utilisation des différentes sources de carbone et en l'étude de quelques propriétés physico-chimiques de ces biosurfactants.

La synthèse de biosurfactant étant effectuée par l'emploie de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 fournie à partir d'hôpital de Médéa sur deux sources de carbone, le diesel et le Kérosène. Ainsi les résultats obtenus ont démontré que ses deux sources de carbone sont toutes deux efficace dans la production des biosurfactants au travers des paramètres étudiés, l'indice d'émulsification, la capacité moussante, l'abaissement de la tension superficielle ou activité de surface et l'activité antimicrobienne sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Cette étude a ainsi permis d'élucider la production des biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* sur trois sources de carbone à savoir la boue morte d'hydrocarbure, le diesel et le kérosène. Ainsi les biosurfactants produits ont été caractérisés suivant leurs propriétés d'abaissement de la tension superficielle par une concentration micellaire critique très faible, l'activité moussante du milieu acellulaire lors de la croissance de la souche productrice par indice d'émulsification et par les biosurfactants bruts décrivant une propriété tensioactive et la propriété antimicrobienne sur des microorganismes à Gram positif et à Gram négatif en tant que facteur de virulence pour la souche productrice afin de coloniser son milieu de croissance.

L'activité antimicrobienne a montré que les biosurfactants agissent en très faibles quantités soit en milieu solide soit en milieu liquide. Les résultats obtenus suite à cette étude démontrent que les biosurfactants constitues une nouvel alternative pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique malgré la faible productivité de ses molécules pour lutter efficacement contre les bactéries par divers formulations émulsionnantes ou stabilisants des principes actifs avec effet antimicrobien.

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

- L'utilisation des sources de carbone disponible avec différente structure et origine. Pour réduire le coût de production.

- Perfectionnement de milieu fermentatif de production pour améliorer la quantité des biosurfactants produit.

- Etudes de l'effet antimicrobien des biosurfactants sur plusieurs microorganismes et des champignons.

- Etude l'effet antimicrobien à l'échelle microscopique pour déterminer les différents mécanismes d'action de biosurfactant sur les microorganismes.

REFERENCES BIBILIOGRAPHIQUES

A

ABEL, S. (2007). Micelles inverses d'AOT et de C12E4: Structure et évaluation de leurs compressibilités par simulation de dynamique moléculaire, thèse de doctorat de l'université de paris vi « pierre et marie curie ».

ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S., & NABI, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 223(1): 143-151.

AL-ARAJI, L., ABD RAHMAN R. N., BASRI, Z. R, SALLEH M. A. (2007). Minireview : Microbial Surfactant. (AsPac) , J. Mol. Biol. Biotechnol., 15 (3): 99-105.

ARIMA, K., KAKINUMA, A., & TAMURA, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochemical and biophysical research communications, 31(3), 488-494.

ASSELINEAU, C., & ASSELINEAU, J. (1978). Trehalose-containing glycolipids. Progress in the chemistry of fats and other lipids, 16, 59-99.

B

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., & CAMEOTRA, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 53(5), 495-508.

BALAKRISHNAN, R., KAUR, S., GOEL, A. K., PADMAVATHI, S., & JAYARAMAN, K. (1980). Biosynthesis of polymyxin by *Bacillus polymyxa*: II. On the nature and interaction of the multienzyme complex with the end product polymyxin. Archives of biochemistry and biophysics, 200(1), 45-54.

BERNHEIMER, A. W., & AVIGAD, L. S. (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis.* Microbiology, 61(3), 361-369.

BENINCASA, M., ABALOS, A.,OLIVEIRA, I., & MANRESA, A. (2004). Chemical structure , surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa LBI from soapstock. Antonie Van Leeuwenhoek, 85(1), 1-8.

BOFFI, E., & EL AMARI, M. (2004). (TI),traitement et pronostic des bacteriemies a *Pseudomonas aeruginosa* ; Thèse de doctorat ,l'Université de Genève ;Thèse n° 10406 Genève

BOGNOLO, G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152(1), 41-52.

C

CAMEOTRA, S. S., & MAKKAR, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, 50(5), 520-529.

COOPER, D. G., & GOLDENBERG, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. Applied and environmental microbiology, 53(2), 224-229.

COOPER, D. G., & PADDOCK, D. A. (1984). Production of a biosurfactant from Torulopsis bombicola. Applied and environmental microbiology, 47(1), 173-176.

COOPER, D. G., ZAJIC, J. E., & DENIS, C. (1981). Surface active properties of a biosurfactant from *Corynebacterium lepus.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 58(1), 77-80.

D

DANDERS, W., MARAHIEL, M. A., KRAUSE, M., KOSUI, N., KATO, T., IZUMIYA, N., & KLEINKAUF, H. (1982). Antibacterial action of gramicidin S and tyrocidines in relation to active transport, in vitro transcription, and spore outgrowth. Antimicrobial agents and chemotherapy, 22(5), 785-790.

DAS, P., MUKHERJEE, S., & SEN, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. Journal of applied microbiology, 104(6), 1675-1684.

DESAI, J. D., & BANAT, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and molecular Biology reviews, 61(1), 47-64.

DESAI, J.D., & DESAI, A.J.(1993). Production of Biosurfactants. Biosurfactants-Production-Properties-Applications. N. Koçaric, University of Western Ontario. 48: 65-92

DESCHENES, L., LAFRANCE, P., VILLENEUVE, J. P., & SAMSON, R. (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa UG2* biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. Applied Microbiology and Biotechnology, 46(5-6), 638-646.

DEZIEL, E. (2001) .Mécanismes physiologiques permettant à *Pseudomonas aeruginosa* d'accéder aux composés organiques hydrophobes : rôle de l'adhérence et des biosurfactants, et implication dans la formation de biofilms. Thèse de Doctorat en génie civil ; université Montréal .

E

EL-SHESHTAWY, H. S., & DOHEIM, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. Egyptian Journal of Petroleum, 23(1), 1-6.

F

FIECHTER, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Food Science & Technology, 3, 286-293.

G

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 université de limoges.

GHERBAL, A. (2014). Effets de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence de pétrole brut. Mémoire de master université kasdimerbah-ouargla .

GUERRA-SANTOS, L. H., KÄPPELI, O., & FIECHTER, A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied Microbiology and Biotechnology, 24(6), 443-448.

H

HABA, E., PINAZO, A., JAUREGUI, O., ESPUNY, M. J., INFANTE, M. R., & MANRESA, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa 47T2* NCBIM 40044. Biotechnology and bioengineering, 81(3), 316-322.

HAMAMOUCHE, M. (2014). Elaboration de système micellaire de poly (α méthyl styrène -g- éthylène glycol). MÉMOIRE de Master en Chimie Industrielle. Université d'Oran MOHAMED BOUDHIAF.

HEALY, M. G., DEVINE, C. M., & MURPHY, R. (1996). Microbial production of biosurfactants. Resources, conservation and recycling, 18(1), 41-57.

HOLMBERG, K. (2001). Natural surfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 6: 148-159.

HUANG, X. F., GUAN, W., LIU, J., LU, L. J., XU, J. C., & ZHOU, Q. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. Bioresource technology, 101(1), 317-323.

I

IVANOV, V.T. (1977). In "Peptides, Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium" (M. Goodman and J. Meienhofer, eds.), pp. 307-321. Wiley, New York.

ISHIGAMI, Y., GAMA,Y., NAGAHORA, H., YAMAGUCHI, M., NAKAHARA, H., & KAMATA, T. (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chemistry Letters, 16(5): 763-766.

ISRAELACHVILI, J. N., MITCHELL, D. J., & NINHAM, B. W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics, 72, 1525-1568.

J

JARVIS, F. G., & JOHNSON, M. J. (1949). A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Chemical Society, 71(12), 4124-4126.

K

KIHLI, H. (2012). Isolement, identification et caractérisation de certains microorganismes producteurs de biosurfactants. Mémoire de master en génie des procédés, université de Médéa.

KOSARIC, N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technology and Biotechnology, 39(4): 295-304.

KOSARIC, N., & SUKAN, F. V. (EDS.). (2014). Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics (Vol. 159). CRC Press.

KRISHNASWAMY, M., SUBBUCHETTIAR, G., RAVI, TK., & PANCHAKSHARAM, S. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application.Current Science (00113891), 94(6).

L

LAURILA, M.A. (1985). Biosurfactants production by mutants of *Pseudomonas aeruginosa.* Thèse de doctorat. Departement of biotechnology, Swiss Federal Institut of technology Zurich, Switzerland. Pp 1-10 (117p).

LANG, S., & WULLBRANDT, D. (1999). Rhamnose lipids–biosynthesis, microbial production and application potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(1), 22-32.

LEE, K. H., & KIM, J. H. (1993). Distribution of substrates carbon in sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*. Biotechnology letters, 15(3): 263-266.

M

MAHAMADOU .H.,B. (2014). Étude expérimentale et théorique pour la prédiction de l'énergie de surface sur le processus de colmatage en ultrafiltration tangentielle. application à la production des biosurfactants en bioréacteur à membrane. Mémoire de master en génie des procédés, université de Médéa.

MAKKAR, R., & CAMEOTRA, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 58(4) : 428-434.

MAMERI, Y. (2010). Phototransformation de tensioactif anionique induite par un oxyhydroxyde de fer(iii) (goethite) en solution aqueuse ; mémoire de magister en chimie analytique et physique, université mentouri-constantine.

MARCHANT, R., & BANAT, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in biotechnology, 30(11), 558-565.

MATHIS A. (1992) . Surface-active products. Bulletin de l'Union des Physiciens. 86(749):1487.

MARGARITIS, A., ZAJIC, J. E., & GERSON, D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. Biotechnology and Bioengineering, 21(7), 1151-1162.

MARAHIEL, M., DANDERS, A., KRAUSE, W., & KLEINKAUF, H. (1979). Biological role of gramicidin s in spore functions. European Journal of Biochemistry, 99 (1): 49-55.

MOHAN, P. K., NAKHLA, G., & YANFUL, E. K. (2006). Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. Water Research, 40(3), 533-540.

MULLIGAN, C. N., YONG, R. N., & GIBBS, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, 60(1), 371-380.

MULLIGAN, C., N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution, 133(2) : 183-198.

MULLIGAN, C., N. (2009). Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants, Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14 (5): 372-378.

MURIEL, G.T. (1998). Production sous conditions non stérile de biosurfactants synthétise à partir de rejets industrieux pour le lavage de sol contaminé . Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de maitrise ès sciences appliquées (génie chimique) université Montréal.

N

NEINDRE, B. L. (1993). Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques, 475, 2-12.

NITSCHKE, M., & COSTA, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry.Trends in Food Science & Technology, 18(5), 252-259.

NOIRET N., BENVEGNU T. & PLUSQUELLEC D. (2002) . Surfactants from renewable resources. Actualite Chimique. 70 (11-12) : 70-75.

P

PADMASHREE, T. S., VIJAYALAKSHMI, L., & PUTTARAJ, S. (1987). Effect of traditional processing on the functional properties of cowpea (Vigna catjang) flour. Journal of Food Science and Technology, 24(5), 221-225.

PAGE, C.A, BONNER, J.S, KANGA, S.A, MILLS, M.A & AUTEURIETH, R.L. (1999). Biosurfactant solubilization of PAHS . Environmental Engineering Science, 16, (6): 465-474.

PARRA, J.L., GUINEA, J., MANRESA, M.A., ROBERT, M., MERCADE, M.E., COMELLES, F. & BOSCH, M.P. (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. Journal of the American Oil Chemists Society 66, (1): 141-145.

PATEL, R. M., & DESAI, A. J. (1997). Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosaGS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology, 25(2), 91-94.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., & WALLACH, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(5), 553-563.

PRABHU .Y , & PHALE, P.S. (2003) . Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp*. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Applied Microbiology and Biotechnology, 61(4), 342-351.

PIRET, J. M., & DEMAIN, A. L. (1982). Germination initiation and outgrowth of spores of *Bacillus brevis* strain Nagano and its gramicidin S-negative mutant. Archives of microbiology, 133(1): 38-43.

PRUTHI .V. & CAMEOTRA, S.S. (1995). Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation, Biotechnol. Lett., 9(4), 271–276.

R

RANASALVA, N., SUNIL,.R., & POOVARASAN, G. (2014). Importance of Biosurfactant in Food Industry; IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 7 (5), 06-09

ROBERT, M., MERCADÉ, M.E., BOSCH, M.P., PARRA, P.L., ESPUNY, M.P., MANRESA, M.A., & GUINEA, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa 44TI*. Biotechnology Letters, 11 (12): 871-874 .

RON, E. Z., & ROSENBERG, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. Current opinion in biotechnology, 13(3), 249-252.

ROSENBERG, E., & RON, E.Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 154-162.

ROSENBERG, M., & KJELLEBERG, S. (1986). Hydrophobic interactions: role in bacterial adhesion. In Advances in microbial ecology (pp. 353-393). Springer US.

RONDEL. C. (2009). Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives .Thèse de doctorat en génie des procédés, université de Toulouse, France .

S

SAMADI N., ABADIAN N., AKHAVAN A., FAZELI M. R., TAHZIBI A., & JAMALIFAR H. (2007) . Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil, J. Biol. Sci. 7 (7), 1266-1269

SARUBBO L. A., DE LUNA J. M., & DE CAMPOS-TAKAKI G. M. (2006) . Production And Stability Studies Of The Bioemulsifier Obtained From A New Strain Of *Candida glabrata UCP 1002*, Elect. J.Biotech. July..9 (4), 0717-3458.

SATPUTE, S. K., BANPURKAR, A. G., DHAKEPHALKAR, P. K., BANAT, I. M., & CHOPADE, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. Critical reviews in biotechnology, 30(2), 127-144.

SEFRAOUI, I. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest Algérien. Thèse de doctorat , université de Abou bekr BELKAID Tlemcen Algérie .

SIFOUR, M., AL-JILAWI, M. H., & AZIZ, G. M. (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa RB 28*. Pakistan journal of biological sciences: PJBS, 10(8) : 1331-1335

SPOECKNER S., V. WRAY,. NIMTZ , M .,& S. LANG.(1999). Glycolipids of the smut fungus Ustilago maydis from cultivation on renewable resources. App. Microbiol. Biotechnol, 51: 33-39.

STÜWER, O., HOMMEL, R., HAFERBURG, D., & KLEBER, H. P. (1987). Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of Torulopsis apicola. Journal of biotechnology, 6(4), 259-269.

SUWANSUKHO P., RUKACHISIRIKUL V., KAWAI F., & KITTIKUN A. H. (2008). Production And Applications Of Biosurfactant From *Bacillus subtilis MUV4*, Songklanakarin J. Sci. Technol. 30 (1), 87-93.

SYLDATK, C., & WAGNER, F. (1987). Production of biosurfactants. Biosurfactants and biotechnology, 25, 89-120.

T

TANFORD, C. (1972). Micelle shape and size. The Journal of Physical Chemistry, 76 (21): 3020-3024

V

VIKAS, P., & SWARANJIT, S.C. (1995). Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. Biotechnology Techniques 9 (4) 271-276

VIPULANANDAN, C., & REN, X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. Journal of Environmental Engineering, 126, (7), 629-634.

VOLLENBROICH, D., PAULI, G., ZEL, M., & VATERI, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Appl. Env. Microbiol. 63, 44-49.

W

WAGNER, F., & LANG, S. (1996). Microbial and enzymatic synthesis of interfacial active glycolipids. In Proceedings of 4th World Surfactants Congress (Vol. 1, pp. 124-137).

WEST, C.C. & HARWELL, J.H. (1992). Surfactants and subsurface remediation. Environ. Sci. Technol. 26, (12), 2324-2330.

WEI, Y. H., & CHU, I. M. (1998). Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis ATCC 21332*. Enzyme and Microbial Technology, 22(8), 724-728.

WEI, Y. H., CHOU, C. L., & CHANG, J. S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous Pseudomonas aeruginosa J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal, 27(2), 146-154.

Y

YAKIMOV, M. M., GOLYSHIN, P. N., LANG, S., MOORE, E. R., ABRAHAM, W. R., LÜNSDORF, H., & TIMMIS, K. N. (1998). Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 48(2), 339-348.

Z

ZAFRIRI, D., ROSENBERG, E., & MIRELMAN, D. (1981). Mode of action of Myxococcus xanthus antibiotic TA. Antimicrobial agents and chemotherapy, 19(2): 349-351.

ZELMAT, C.(2008). Micellisation d'un système modèle tensioactif mixte cationique/ non ionique. Mémoire de magistère en chimie physique , université d'ORAN,ES-SENIA .

Sites web

http://www.thesilveredge.com/pseudomonas.shtml#.VrDMQbKLRdg

http://www.chimix.com/an14/bac14/lib4.html

http://www.chimix.com/an14/bac14/poly4.html

http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/cmc/

http://pourquoilesavonlave.e-monsite.com/pages/les-tensioactifs-font-la-ronde-les-formations-de-micelles.html

http://tpedentifrice.e-monsite.com/pages/etudes-scientifiques-dentifrices industriels.html

http://tpedentifrice.e-monsite.com/pages/etudes-scientifiques-dentifrices industriels.html

http://uqac.ca/chimie_ens/Chimie_physique/Chapitres/chap_4.htm

http://www-lemm.univ-lille1.fr/physique/mecaflu_dyn/Mecaflu_Nancy/Poly-mecaflu.htm

LES ANNEXES

Annexe I

La gélose au cétrimide

La quantité en g/l	
Peptone de bactériologique	20
$MgCl_2$	1,4
K_2SO_4	10
Cétrimide	0,3
Agar- Agar	15
Glycérol	10ml
KH_2PO_4	12

Nutrient agar (agar nutritive)

La quantité en g/l	
peptone de gelatine	5.0
extrait de bœuf	3.0
Agar bactériologique	15

pH finale (à 25°C) 7.4±0.2

Le bouillon nutritif

La quantité en g/l	
peptone	10
Extrait de levure	10
NaCl	5

Tous les milieux de culture sont stérilisés à 121°C pendant 15 min .

Annexe II

Tableau 1 : Densité optique de la biomasse en fonction du temps.

t (h)	la DO kérosène	la DO de diesel
0	0,238	0,429
3	0,298	0,449
6	0,303	0,564
24	0,476	0,612
27	0,669	0,617
30	0,706	0,646
48	0,835	0,668
51	0,917	0,744
54	0,902	0,748
72	0,928	0,889

Tableau 2 : les valeurs de l'indice d'émulsification en fonction de temps

	indice d'émulsification %								
Temps de prélèvement (h)	3	6	24	27	30	48	51	54	72
diesel	45,4	50	54,5	50	54	57	52	38	52
kérosène	45	44	38	50	49	52	49	40	52