



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
قسم الميكروبيولوجيا

Département : Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

**Etude de la production de biosurfactants par des bactéries
hydrocarbonoclastes.**

Présenté et soutenu par : *Boudoune Meriem Rayen*

Le : 14/06/2018

Boualem Yasmine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. Benhizia Yacine Professeur à UFC

Rapporteur : Mme Guergouri Ibtissem Maitre-Assistante « A » à UFC

Examineurs : Mme Bouzeraib Latifa Maitre-Assistante « A » à UFC

*Année universitaire
2017 - 2018*

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Nous remercions très chaleureusement notre encadreur Mme GUERGOURI IBTISSEM Maitre-Assistante « A » à UFC qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voire le jour. Nous lui exprimons notre gratitude de nous avoir dirigé, encouragé et sur tout aidé afin de réaliser ce travail.

Nous remercions les membres du jury, Monsieur BENHIZIA YACINE Professeur à UFC pour l'honneur qu'il nous fait en président ce jury et Mme BOUZERAIB LATIFA pour avoir accepté l'évaluation de ce mémoire et d'en être examinatrice.

Nous remercions tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation.

Nous remercions tous les travailleurs de laboratoire de biologie moléculaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

Dédicace



J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui a toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur ma vie et mon bonheur maman que j'adore. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mes grands-parents MAA et SIDI qui ont toujours été à mes côtés dans les bons et les mauvais moments.

A la mémoire de mon très cher oncle SALAH qui aurait été si fier de moi aujourd'hui, qu'il repose en paix

A mes chers oncles HAFID et TAREK.

A mon cadeau pour le cœur, ma joie de vivre, ma moitié NIHEL.

A mon point de force dans la vie, mon plus doux amour, les prunelles de mes yeux, a mes frères HOUSSEM et LOKMEN, ainsi mon grand frère HALIM.

A la raison de bonheur dans ma vie

A ma meilleure cousine, ma copine et ma confidente MINA, ma cousine adorée DOUDOU et ma petite AYA.

A ma sœur que la vie m'a donnée, ma fidèle accompagnante dans les moments les plus délicats de ma vie, ma chère copine KHAOULA.

A mon binôme, ma chère copine YASMINE.

Aux personnes qui m'ont aidé et encouragé de près et de loin, qui m'ont accompagné durant mon chemin d'étude, mes aimables amis et collègues.

A toute la promotion de Microbiologie 2017 /2018

Boudoune Meriem Rayen

Dédicaces



Je dédie ce mémoire qui est le fruit de tout un long chemin d'étude :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance :

*A celle qui m'est la plus chère au monde, qui a su partager chaque moment de mon existence avec son intarissable tendresse, à celle à qui je dois le meilleur de moi même. C'est à toi **MAMAN**, que je dédie aujourd'hui le fruit de ton dévouement, en espérant être à la hauteur de tes sacrifices.*

*A mon cher **PAPA**, nulle dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement, mon profond amour, mon respect et ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as prodigué pour ma formation, ma réussite et mon bien être.*

*A mon frère **BORHANE**.*

*A ma sœur **MAROUA**.*

*Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de ma famille, que je remercie tout particulièrement un grand merci à mes chères cousines (**IKRAM, KARIMA, WISSEM, INES, MOUNIA**) ainsi que mes tantes chéries (tata **CHAFIKA, LEILA** et **NAWEL** sans oublier mes grands-parents **MIMI** et **DJEDI**)*

*A Mon fiancé **ANIS**, qui m'a soutenu tout au long de ce projet*

*Mon binôme de travail, ma copine, une sœur à moi que dieu la garde **RAYENE***

*A celles qui je passe avec elles les bonnes heures et je porte avec elles que les bons souvenirs à **MES AMIES***

*A toute la famille : **BOUALEM** et **BLILA***

A toute la promotion de Microbiologie 2017/2018

BOUALEM YASMIME

Résumé

Les surfactants sont des agents à activité de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactant). Ces molécules sont principalement produites par des micro-organismes qui se développent de manière aérobie dans un milieu contaminé contenant une ou plusieurs sources de carbone.

Les biosurfactants constituent une classe de molécules biologiques ayant divers intérêts dans plusieurs domaines, allant de l'industrie agro-alimentaire, chimique, cosmétique, pharmaceutique...etc, à l'application dans domaines plus critiques ; biomédicale et thérapeutique.

L'objectif de notre travail est la production et la caractérisation de biosurfactants en utilisant des bactéries pures issues de deux régions différentes : Nord et Sud Algérien.

Pour cela, une fermentation sur milieu MSM additionné de 4% d'huile végétal comme source de carbone a été réalisée et incubée durant une semaine à 30°C et 180 rpm.

Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'un suivi régulier à savoir : le pH, la densité optique (DO) et test de déplacement d'huile (ddh) ce qui nous permis de comparer les souches par rapport à leur capacité de production de biosurfactant.

Les biosurfactants sont extraites par deux méthodes d'extraction : extraction par précipitation et par solvants organiques. Le rendement pour les deux méthodes d'extraction n'était pas le même. Les extraits obtenus ont montré une activité antimicrobienne variable vis-à-vis deux souches testées : *Bacillus sp* et *Enterobacter sp*.

Mots clés : biosurfactant, fermentation, extraction, diamètre de déplacement d'huile, activité antimicrobienne.

Abstract

Surfactants are surface active agents chemically or biologically synthesized. These molecules are mainly produced by microorganisms that grow aerobically in a contaminated environment containing one or more carbon sources.

Biosurfacts constitute a class of biological molecules having various interests in several fields, ranging from the agro food industry, chemical, cosmetic, para pharmaceutical...etc., to the application in more critical areas such as biomedical and therapeutic.

The objective of our work is the production and characterization of biosurfactants using pure bacteria from two different regions : North and South Algeria.

For this, a fermentation on MSM environment supplemented with 4% of vegetable oil as carbon source was performed and incubated for one week at 30 • C and 180 rpm.

Several parameters were regularly monitored such as : pH, optical density (DO) and oil displacement test (ddh), which allowed us to compare the strains compared to their production capacity of biosurfactant.

The biosurfactants are extracted by two methods : Extraction by precipitation and organic solvents. The output of both extraction methods was not the same. The extracts obtained showed a variable antimicrobial activity for two strains tested : *Bacillus* sp and *Enterobacter* sp

Key Words : biosurfacts, fermentation, extraction, oil displacement diameter, antimicrobial activity

ملخص

السرفكتونات هي العوامل السطحية النشطة المنتجة كيميائيا او بيولوجيا (السرفكتونات الحيوية). يتم انتاج هذه الجزيئات بشكل رئيسي عن طريق الكائنات الدقيقة التي تنمو هوائيا في وسط ملوث يحتوي على مصدر كربون او اكثر.

تشكل السرفكتونات الحيوية فئة من الجزيئات البيولوجية ذات أهمية مختلفة في العديد من المجالات, و التي تتراوح من صناعة الاغذية الزراعية, المواد الكيميائية, مستحضرات التجميل, المستحضرات الصيدلانية الخ الى التطبيقات في المجالات الاكثر اهمية, الطبية, الحيوية العلاجية.

الهدف من عملنا هو انتاج و توصيف السرفكتونات الحيوية باستخدام البكتيريا النقية الناتجة من منطقتين مختلفتين شمال و جنوب الجزائر.

لهذا، تم تنفيذ التخمر في وسط مغذي معدني مزود ب4% من الزيت النباتي كمصدر للكربون و قد تم الحضان لمدة اسبوع عند30 درجة مئوية و180 دورة في الدقيقة.

تم رصد العديد من المعايير بانتظام: الاس الهيدروجيني، الكثافة البصرية واختبار ازاحة النفط مما سمح لنا بمقارنة السلالات من خلال المساهمة في قدرتها الإنتاجية للسرفكتونات الحيوية

يتم استخلاص السرفكتونات الحيوية بواسطة طريقتين الاستخلاص بالترسيب و المذيبات العضوية لكن لم يكن المرود لكل من اسلوبي الاستخلاص مماثلا. اظهرت المستخلصات التي تم الحصول عليها نشاطا مضادا متغيرا للميكروبات مقابل السلالتين التي تم اختبارهما *Bacillus sp.* و *Enterobacter sp.*

الكلمات المفتاحية: السرفكتونات الحيوية, التخمر, الاستخلاص, نشاط مضاد للميكروبات, اختبار ازاحة النفط

Table de matière

Liste des Tableaux

Listes des Figures

Introduction.....01

Rappel Bibliographique

CHAPITRE I : Hydrocarbures et dégradation microbologique.....	02
I. Généralité sur les hydrocarbures.....	02
I.1 Origine.....	02
I.2 Classification.....	03
II. Devenir des Hydrocarbures dans l'environnement.....	03
II.1 Evaporation.....	03
II.2 Solubilisation.....	04
II.3 Emulsification.....	04
II.4 Sédimentation.....	04
II.5 Photo-oxydation.....	05
II.6 L'hydrolyse.....	05
II.7 Biodégradation.....	05
III. Bactéries Hydrocarbonoclastes.....	05
III.1 Généralités.....	05
III.2 Classification.....	06
III.3 Les Caractéristiques des bactéries aptes a la biodégradation des Hydrocarbures.....	06
III.4 Les Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule Bactérienne.....	07
IV. Processus de biodégradation et facteurs l'influençant.....	08
IV.1. Biodégradation des hydrocarbures.....	08
IV.2. Types de Biodégradation.....	08
IV.2.1- Biodégradation aérobie.....	08
IV.2.2. Biodégradation anaérobie.....	09
IV.2.3. Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures..	10
A. Structure et nature du sol.....	10
B. Composition chimique des hydrocarbures.....	10
C. Humidité.....	10
D. Température.....	11
E. Salinité.....	11
F. Potentiel d'hydrogène (pH).....	11
G. Taux d'oxygène.....	11
CHAPITRE II : Biosurfactants, caractéristiques et synthèse.....	12
I. Définition.....	12
II. Classification.....	12
Les lipopeptides.....	13
Les phospholipides.....	13
Les lipopolysaccharides ou polymériques	13
Les acides gras et lipides neutres.....	13
III. Production des Biosurfatants.....	14
III.1 Organismes Producteurs.....	14

III.2 Paramètres influençant la production.....	15
Influence de la source de carbone.....	15
Influence de l'azote.....	15
Influence du pH.....	15
Influence des sels minéraux.....	15
Influence de l'oxygène.....	15
Influence de la vitesse d'agitation.....	16
IV. Extraction des Biosurfactants.....	16
V. Rôle des Biosurfactans.....	17
VI. Utilisation des Biosurfactants.....	17
VII. Application biomédicale et thérapeutique et activité antimicrobienne Des biosurfactants.....	18

Matériel et Méthodes

1. Microorganismes utilisé.....	20
2. Préparation du milieu de culture.....	20
3. Observation macroscopique et microscopique.....	21
4. Pré-culture et culture.....	22
4.1 Préparation de l'inoculum.....	22
4.2 Culture.....	23
4.3 Suivi de la Production de biosurfactant.....	23
Mesure de la Densité optique DO.....	23
Mesure de pH.....	24
Test du déplacement d'huile ddh.....	24
5. Extraction des biosurfactants.....	25
6. Test d'activité antimicrobienne du biosurfactant.....	27

Résultats et discussion

I. Caractères Morphologiques.....	28
1. Caractères macroscopiques.....	28
2. Caractères Microscopiques.....	30
II. Suivi de la production de biosurfactant.....	32
II.1.Mesure du pH.....	32
II.2.Mesure de la densité optique.....	33
II.3.Mesure du test DDH.....	35
III. Extraction des biosurfactants.....	36
IV. Test d'activité antimicrobienne du biosurfactant.....	38
V. Discussion.....	41
VI. Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	46
Annexes.....	50

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules modifié	3
Figure 2	Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol	4
Figure 3	Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes	8
Figure 4	Dégradation anaérobie de matière organique	9
Figure 5	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant	11
Figure 6	Structures chimiques de quelques biosurfactants communs	12
Figure 7	Les étapes de la préparation du milieu de culture	20
Figure 8	Préparation et incubation de l'inoculum	21
Figure 9	Inoculation du milieu de culture	22
Figure10	Mesure de la densité optique	22
Figure11	Mesure du pH	23
Figure12	Les étapes de la réalisation du test DDH	24
Figure13	Principe de l'extraction aux solvants organiques	25
Figure14	Réalisation du test d'activité anti microbienne	26
Figure15	Quelques aspects macroscopiques des souches étudiées	28
Figure16	Les différents aspects microscopiques obtenus après coloration de Gram	30
Figure17	Courbes de l'évolution du pH en fonction du temps des bactéries à Gram négatif et positif	32
Figure18	Courbes de l'évolution la densité optique en fonction du temps des bactéries à Gram négatif et positif	33
Figure19	Résultats du test de déplacement d'huile	34
Figure20	Courbes de l'évolution du test DDH en fonction du temps des bactéries à Gram négatif et positif	35
Figure21	Résultats d'extraction par précipitation acide	36
Figure22	Extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction	36
Figure23	Méthode de la mesure de la zone de lyse	37
Figure24	Effet du produit issu de la I1 sur Bacillus sp.	39

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Quelque genre bactérien dégradant les hydrocarbures	6
Tableau 2	Principaux types de surfactants biologiques	13
Tableau 3	Les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants	16
Tableau 4	Utilisations potentielles des biosurfactants	17
Tableau 5	Les sites de prélèvement	19
Tableau 6	Les Composants du milieu	19
Tableau 7	Caractères macroscopiques des souches isolées sur gélose nutritive	27
Tableau 8	Aspect microscopique des souches isolées	29
Tableau 9	Résultats des mesures du pH des dix souches isolées	31
Tableau 10	Résultats des mesures de la DO des dix souches isolées	32
Tableau 11	Résultats du test de déplacement d'huile des dix souches isolées	34
Tableau 12a	Résultats des boîtes témoins du test d'activité antibactérienne	37
Tableau 12b	Résultats des différentes valeurs du test d'activité antimicrobienne des extraits	38

Introduction

Introduction

La découverte des hydrocarbures « or noir » a résolument bouleversé notre mode de vie à tel point que la quasi-totalité de nos activités dépendent aujourd'hui de son utilisation

Les hydrocarbures pétroliers forment une classe de produits d'usage mondialement répandu et d'applications multiples. Les composés d'hydrocarbures sont nombreux et communément classés en fonction du nombre d'atomes de carbones contenus dans leur chaîne, cependant sont des polluants ubiquitaires. Ils sont hydrophobes dont la persistance dans les écosystèmes est principalement due à leur faible solubilité aqueuse. En raison de leurs potentialités toxiques, mutagènes et cancérigènes (Hassaine, 2015), leur présence chronique ou accidentelle constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes

Leur élimination est nécessaire, parmi les méthodes les plus utilisées est la biodégradation par des microorganismes et en particulier les bactéries

Les bactéries ont un pouvoir de synthétiser des biomolécules appelées biosurfactants, qui ont des propriétés fonctionnelles, leur permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ces biosurfactants servent à plusieurs applications comme la remédiation biologique, l'extraction du pétrole, les applications cosmétiques, détergentes ou émulsifiantes pour l'industrie alimentaire ainsi que dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales. Grâce à leur biodégradation et l'absence de toxicité, il est aussi indispensable de citer que les biosurfactants ont une activité antimicrobienne vis-à-vis des algues, des champignons et des bactéries, de nombreux genres bactériens ont été recensés à être sensible à certains type de biosurfactants.

Ce travail a pour but d'étudier la capacité des souches hydrocarbonoclastes à produire des biosurfactants dans des conditions favorables à leur croissance

La réalisation de ce modeste mémoire est structurée en trois sections : la première présente un rappel bibliographique, la seconde décrit le matériel et les méthodes utilisés, et une troisième partie consacrée aux résultats et discussion qui sera suivie d'une conclusion et des perspectives.

Rappel Bibliographique

Chapitre I : Hydrocarbures et Dégradation Microbiologique

I. Généralités sur les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques formés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène, ayant pour formule brute C_nH_m (où « n » et « m » sont deux entiers naturels). De par leur abondance naturelle, ils font partie des produits chimiques les plus importants pour l'humanité et sont notamment utilisés comme source d'énergie primaire. Malgré la diversité des hydrocarbures et par conséquent de leur biodégradabilité, cette dernière est soumise à quelques règles ; plus la chaîne d'un hydrocarbure sera longue, plus sa biodégradabilité sera difficile et plus l'hydrocarbure comportera de cycles, plus sa biodégradabilité sera importante (Tarayre, 2012).

I.1. Origine

Les transformations chimiques et mécaniques rapides du pétrole déversé dans l'environnement terrestre, du fait des mécanismes d'altération (évaporation, dissolution, photo oxydation, biodégradation, . . .) sont souvent un obstacle à la détermination de son origine.

Par conséquent, si un pétrole ne peut être rapidement analysé après son introduction dans le milieu naturel, son identification devient très difficile (Bocard, 2006).

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir plusieurs origines :

- Les hydrocarbures fossiles, qui proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique coincée entre deux couches sédimentaires. Cela demande des caractéristiques géologiques passées spécifiques ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles.
- Les hydrocarbures actuels: qui sont produits par des bactéries décomposant la matière organique. Cette production a lieu essentiellement dans les zones humides (tourbières, marais) et en quantité limitée. Le changement climatique pourrait accroître cette production dans les zones actuellement gelées et relâcher de grandes quantités de méthane dans l'atmosphère terrestre ce qui accentuerait d'autant plus l'effet de serre (Djerbaoui, 2011).
- Les rejets industriels et urbains: qui sont les sources d'hydrocarbures pétroliers pyrolytiques (sont des carburants de synthèse pour lesquels des recherches sont en cours pour faire un substitut du pétrole) (Soltani, 2004).

Rappel Bibliographique

I.2. Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (Neef, 1979).

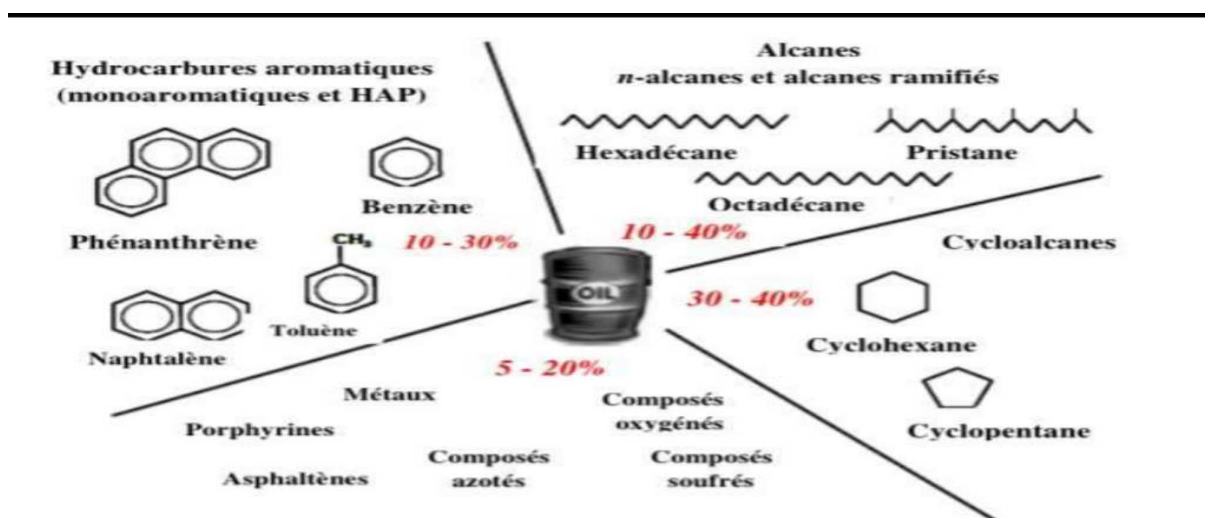


Figure 1 : représentation schématique des principales familles d'hydrocarbures et autres composés d'un pétrole avec quelques exemples de molécules modifié d'après (Syakti 2004)

II. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été répandu dans l'environnement. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs environnementaux qui sont :

-Evaporation

L'évaporation est un phénomène qui touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone (T° ébullition < 270 °C), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés

Rappel Bibliographique

- Solubilisation

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (Bouchez et al ,1995).

-Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse Chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions « huile dans l'eau » facilitent l'élimination des hydrocarbures (Soltani, 2004).

- Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond (figure 2). Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle (Morgan et Watkinson, 1989).

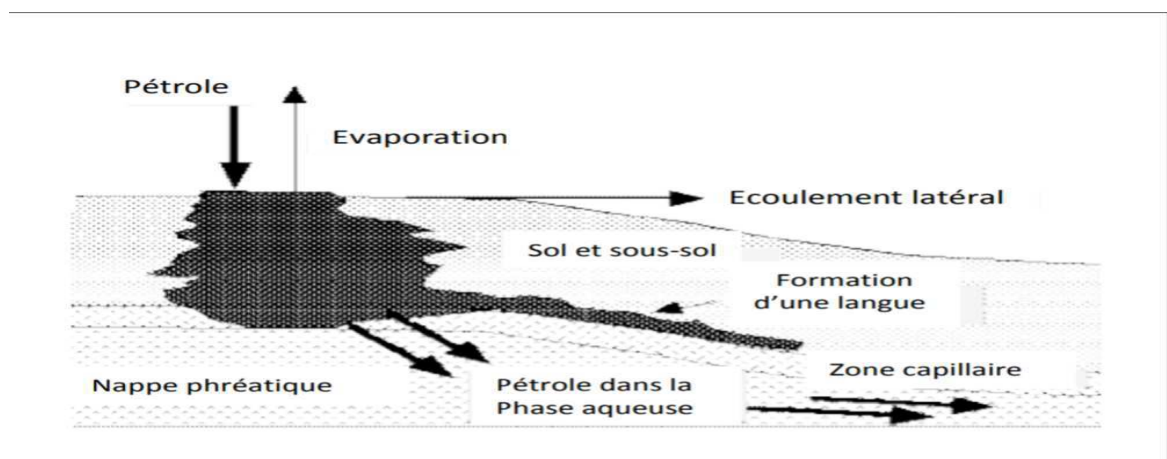


Figure 2 : Représentation schématique du devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol (Morgan et Watkinson, 1989)

Rappel Bibliographique

La photo- oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures. L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-alcanes (Wilcke et al, 2000).

-L'hydrolyse

Processus de dégradation des molécules organiques sous l'action de l'eau fortement influencé par le pH et la température du sol.

-Biodégradation

Ce phénomène fait appel à la capacité enzymatique des organismes vivants à dégrader les polluants en composés moins toxiques. Ce sont généralement des processus qui se déroulent au niveau de la rhizosphère des plantes ou bien grâce à un consortium microbien autochtone.

III. Bactéries Hydrocarbonoclastes

III.1.Généralités

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes terrestres. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes (Rifat et Nuzhat, 2014). On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autotrophes, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles. De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures (Tarayre, 2012) De nombreuses études ont montré qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination. Naturellement, leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole. Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes (Sauret, 2011).

Rappel Bibliographique

III.2. Classification

Les bactéries hydrocarbonoclastes utilisent les hydrocarbures pétroliers comme seule source de carbone. La plupart de ces bactéries appartiennent aux α -protéobactéries. (Prince, 2005).

Tableau 1 : Quelque genre bactérien dégradant les hydrocarbures (Tarayre, 2012).

<i>Aeromonas</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Alcanivorax</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Cycloclasticus</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Serratia</i>	<i>Xanthomonas</i>
	<i>Flavobacterium</i>	<i>Spherotilus</i>	<i>Lactobacillus</i>

III.3. Les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures selon (Pelmont, 1995) sont les suivantes :

- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage (c'est l'action d'entreposer dans un entrepôt des produits pétroliers recommandés afin de réduire les risques de contamination des sols, des eaux de surface et des eaux souterraines) de longue durée
- Génétiquement stable
- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimales
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques
- La majorité des souches bâtonnets à Gram négatif
- 32% des bactéries motiles ou mobiles
- 20% des bactéries à Gram positif, filamenteux.

Rappel Bibliographique

III.4. Les Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

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

- par l'utilisation de composés organiques préalablement solubilisés,
- par contact direct de la cellule avec le composé organique. Cela peut être facilité par des modifications cellulaires telles que la formation de fimbriae ou l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire qui favorise l'attachement de la cellule au composé organique
- par contact direct avec les microgouttelettes dispersées dans la phase aqueuse
- une assimilation améliorée via la synthèse **des biosurfactants**, qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau, ou peuvent encore faciliter l'attachement des cellules aux hydrocarbures (Maier et *al*, 2009).

Dans ce cas l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile .On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe .Ils participent au pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance (Bouderhem, 2011)

IV.Processus de biodégradation et facteurs l'influençant

IV.1.Biodégradation des hydrocarbures

La biodégradabilité est l'aptitude d'une matière organique à subir la biodégradation, c'est-à-dire la dégradation moléculaire en milieu généralement aqueux résultant des actions complexes des microorganismes. Sous l'activité enzymatique de ces microorganismes, une substance pourra subir la biodégradation en se transformant en métabolites et finalement, en dioxyde de carbone et en eau (Scow, 2003).

IV.2.Types de Biodégradation

IV.2.1-Biodégradation aérobie

(Das et *al*, 2011) ont proposé un schéma général (Figure 4) de la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes en condition aérobie, condition prépondérante en milieu pélagique. L'attaque initiale intracellulaire est un processus oxydatif et l'activation ainsi que l'incorporation d'oxygène est la clé de la réaction enzymatique catalysée par les

Rappel Bibliographique

oxygénases et les peroxydases. Les voies périphériques de dégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs). La biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule se fait à partir de métabolites précurseurs comme l'acétyl-CoA, le succinate ou le pyruvate.

Celle-ci peut être affectée par la modification de l'un des facteurs suivants :

- Vitesse de dégradation des composés organiques.
- Quantité de l'oxygène consommée.
- Produits résultant de la dégradation.
- Activité microbienne.

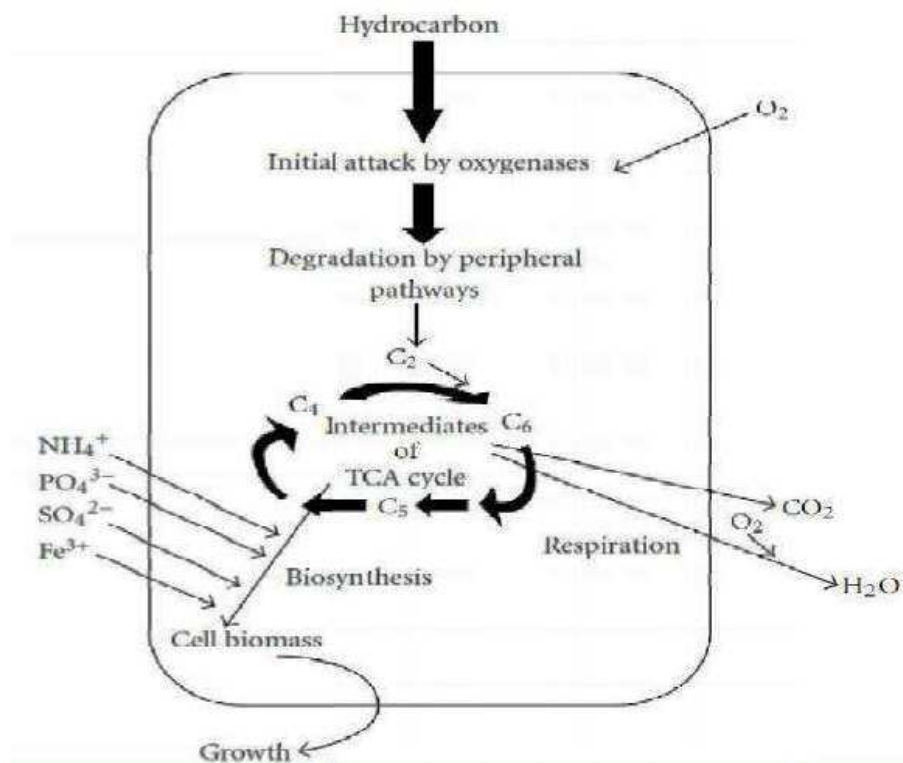


Figure 3 : Mécanisme général de dégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das et *al*, 2011).

IV2.2. Biodégradation anaérobie

En absence d'oxygène, les bactéries métabolisent les HAP par voie anaérobie, mais beaucoup plus lentement qu'en aérobie (Martin, 2012).

Rappel Bibliographique

L'activité métabolique des microorganismes produit des substances organiques simples non complètement oxydées telles que des acides organiques et d'autres composés comme le méthane et l'hydrogène gazeux (Aleksandra, 2010).

Le schéma suivant (Figure 5) illustre parfaitement les processus anaérobies que subi la matière organique (Hongway et *al* ; 2003 et Begbeg ,2008)

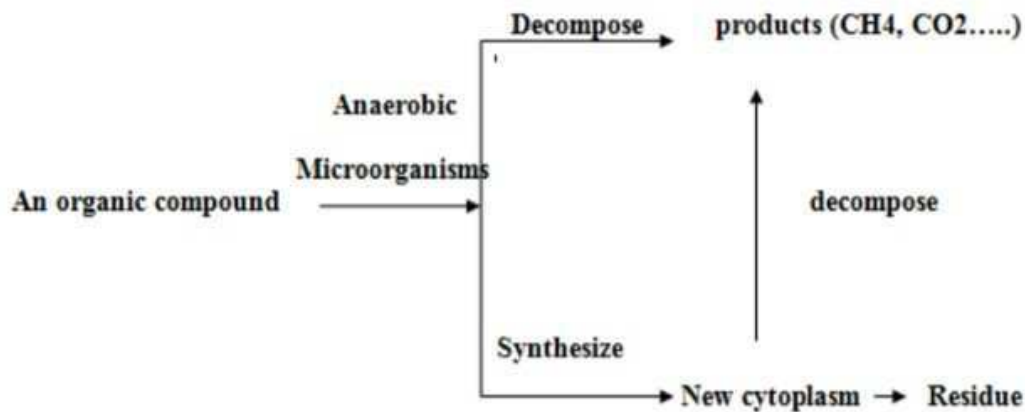


Figure 4 : Dégradation anaérobie de matière organique (Hongway et *al*; 2003 et Begbeg ,2008)

IV.2.Facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures

A. Structure et nature du sol

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est important de connaître la structure et la nature de sol (Lecomte, 1995).

B. Composition chimique des hydrocarbures

Les hydrocarbures pétroliers diffèrent par leur susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légères, les aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (Soltani, 2004).

C. Humidité

L'humidité est un paramètre important dans les processus de dégradation des composés organiques simples ou complexes. Des teneurs trop élevées vont influencer sur la perméabilité

Rappel Bibliographique

des sols aux gaz et générer des conditions de limitations de transfert d'oxygène et donc de limitation de métabolisme microbien aérobie (Ballerini, 1999).

D. Température

Tous les micro-organismes ont une température optimale de croissance caractéristique à laquelle ils ont leur plus fort taux de reproduction et de croissance. Ils ont aussi des températures minimales de croissance en-dessous desquelles ils sont métaboliquement inactifs et ne croissent pas, ainsi que des limites supérieures de température au-delà desquelles ils ne réussissent pas à croître. La température optimale de croissance et la gamme des températures qu'un micro-organisme peut tolérer déterminent la survie d'un micro-organisme et le rôle qu'il va jouer dans un écosystème donné (Atlas and Bartha, 1993).

E. Salinité

La salinité exerce un effet osmotique (qui dépend de la variation d'amplitude de la concentration en sel imposée à la salinité de l'habitat des microorganismes) sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCl, KCl et MgCl₂ (Abed et al, 2006) Les fortes concentrations ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique (Atlas and Bartha, 1993).

F. Potentiel d'hydrogène (pH)

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7. Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les bactéries (Gabet, 2004).

G. Taux d'oxygène

La respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures (Gareer et al, 2003)

Rappel Bibliographique

Chapitre II : Biosurfactants, caractéristiques et synthèse

I .Définition

Les surfactants (**SUR**Face **ACT**ive **Age**NTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures. Les biosurfactants sont des composés amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois une partie hydrophile (tête) et une partie hydrophobe (queue) (Neu, 1996). Ils ont pour propriété de diminuer la tension interfaciale en s'adsorbant à l'interface entre deux composés immiscibles, solide-liquide, liquide-liquide ou gaz-liquide immiscibles (Laha et *al.*, 2009 ;Luna et *al.*, 2013 ; Volkering et *al.*, 1997).

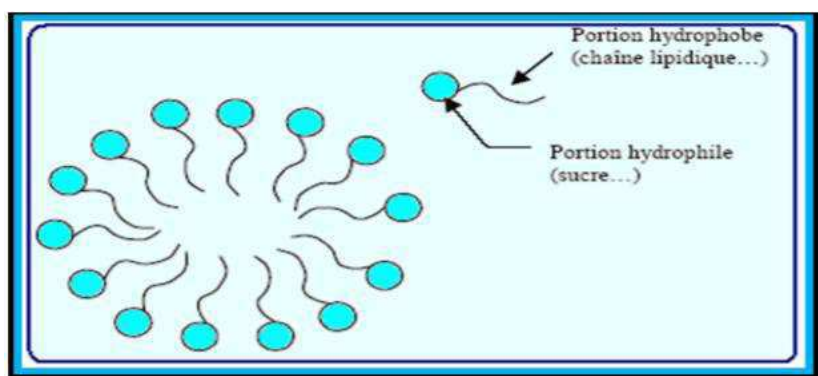


Figure 5 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant (Gabet, 2004)

II .Classification

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy et *al.*, 1996).

Les glycolipides : sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (Ron et Rosenberg, 2002)

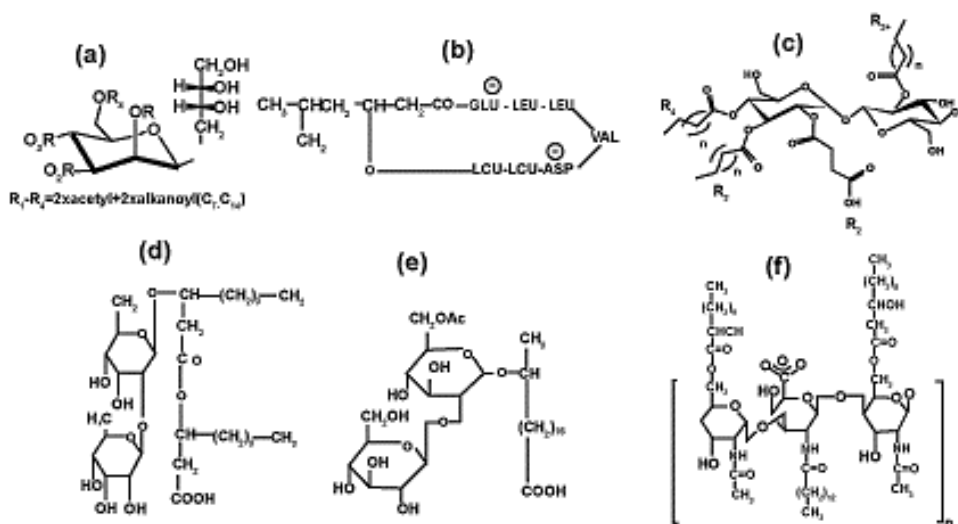
Les lipopeptides : sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornithine sont les plus connus (Healy et *al.*, 1996).

Rappel Bibliographique

Les phospholipides : sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaîne lipidique. (Bognolo, 1999) indique que bien que présents dans tous les micro-organismes, il y'a peu d'exemples de production extracellulaire.

Les lipopolysaccharides ou polymériques : sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras (Healy et al ,1996)

Les acides gras et lipides neutres : sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (Healy et al ,1996). Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (Desai et Banat ,1997)



- (a) lipideMannosylerythritol
- (b) Surfactine
- (c) lipide trehalose
- (d) Sophorolipide
- (e) Rhamnolipide
- (f) Emulsane

Figure 6 : Structures chimique de quelques biosurfactants communs (Fakruddin, 2012)

Rappel Bibliographique

III. Production des biosurfactants

III.1 Organismes producteurs :

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, les huiles ou les hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (tableau3).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules (Vandyke *etal*, 1993)

Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat *etal*, 2000). Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (Thangamani et Shreve, 1994).

Tableau 2 : Principaux types de surfactants biologiques (Banat *et al*, 2000)

Groupe	Biosurfactant	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipides Trehalolipides sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus sp</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida antartica</i>
Lipopetides et lipoprotéines	Surfactine Viscosine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
Acides gras	Acide gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou polymeérique	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Rappel Bibliographique

III. 2. Paramètres influençant la production

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

a. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles.

b. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices (Lang et Wullbrandt, 1999), cependant pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant (Gabet, 2004).

c. Influence du pH

Le pH qui est un facteur très important et qui est plus ou moins relatif à la production, c'est à dire une valeur supérieur ou inférieur à celle optimal influence la production.

d. Influence des sels minéraux

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

e. Influence de l'oxygène

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

Rappel Bibliographique

f. Influence de la vitesse d'agitation

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

IV.Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Pour extraire le biosurfactant extracellulaire du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple).

Il est bien connu que la majorité des produits de fermentation sont libérés dans la phase aqueuse diluée. Par conséquent et dans plusieurs cas, le processus précité comprend environ 60% du rendement total du produit. Du à des considérations économiques, la majorité des applications de biosurfactants fait appel soit à la culture microbienne en bouillon ou bien la préparation brute. De plus, l'interférence due à la présence d'autres substances dans l'activité des préparations de biosurfactant brut est négligée (Kosraic et *al.*, 1993).

Le choix de la méthode de récupération d'un biosurfactant particulier, dépend de sa charge ionique, de sa solubilité dans l'eau ainsi que du fait qu'il soit lié à la cellule ou extracellulaire. Les méthodes utilisées sont listées dans le tableau au-dessous. Ça comprend l'extraction aux solvants organiques, l'adsorption suivie d'extraction aux solvants, la précipitation, la cristallisation, la centrifugation, le fractionnement de mousse. La majorité des biosurfactants sont sécrétés dans le milieu, et isolés après filtration ou bien suite à une centrifugation qui élimine les cellules (Kosraic et *al.*, 1993).

Rappel Bibliographique

Tableau 3 : les méthodes communes employées dans la récupération de biosurfactants (Kosraic et al., 1993)

Méthodes
a. Extraction à partir d'une fermentation en batch
- Extraction aux solvants
- Cristallisation
- Précipitation au sulfate d'ammonium
- Précipitation acide
- Précipitation éthanol-acide acétique
- Précipitation acétone
b. Extraction à partir d'une fermentation continue
- Centrifugation
- Séparation de mousse et précipitation
- Diafiltration et précipitation
- Adsorption
- Filtration tangentielle

Les méthodes discutées au-dessous pour la récupération de biosurfactants sont bien étudiées et classiquement utilisées dans le recouvrement de plusieurs produits de la biotechnologie.

Il est possible d'extraire les glycolipides comme précipités ou cristaux à partir du surnageant d'une culture de *Pseudomonas aeruginosa* par addition d'acide suivie d'une incubation à basse température. Récemment, les glycolipides produits par une population microbienne mixte et les rhamnolipides formés par *P. aeruginosa* et *Candida lipolytica* ont été isolés par acidification du surnageant de la culture puis une extraction aux solvants organiques tels que le mélange chloroforme-méthanol ou bien l'éthyl acétate. (Kosraic et al, 1993)

La récupération de plusieurs substances à activité de surface par précipitation été documenté dans la littérature. C'est le cas pour la surfactine synthétisée par *Bacillus subtilis* et la pseudosurfactine synthétisée par *B. licheniformis*. (kosraic et al, 1993)

V. Rôle des biosurfactants pour la bactérie

Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (Fiechter, 1992 ; Mata-Sandoval et al, 2000).

Rappel Bibliographique

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms la régulation du niveau énergétique cellulaire l'activité bactéricide, la pathogénicité de certaines bactéries, ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

VI. Utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (Banat et al, 2000). C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines. Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique (Christofi et Ivshina, 2002).

Tableau 4 : Utilisations potentielles des biosurfactants (Banat et al, 2000)

Fonction	Champs d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures
Solubilisant et micro-émulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie
Agent moussant	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais
Dispersant	Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau
Aide à la croissance bactérienne	Fermentation

VII. Application biomédicale et thérapeutique et activité antimicrobienne des biosurfactants

Selon Sneha (2012), plusieurs biosurfactants ont montré une action antimicrobienne contre des bactéries, des algues, des champignons ainsi que des virus.

Le lipopeptide iturine de *Bacillus subtilis* avait montré une activité antifongique (Besson et al, 1976). L'inactivation de l'enveloppe virale de l'herpès et du rétrovirus était observée avec 80 mM of surfactine (Vollenbroich et al, 1997).

Rappel Bibliographique

Les Rhamnolipides répriment la croissance d'algues nocives à la floraison des arbres tels que *Heterosigma akashivo* and *Protoentrum dentatum* à des concentrations variant de 0.4 à 10.0 mg/l.

Un mélange de rhamnolipides obtenue de *Pseudomonas aeruginosa* a montré une activité inhibitrice contre les bacteries *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Alcaligenes faecalis* (32 mg/ml), *Serratia marcescens* et *Mycobacterium phlei* (16mg/ml) ainsi que *Staphylococcus epidermidis* (8 mg/ml) en plus d'excellentes propriétés antifongiques contre *Aspergillus niger* (16 mg/ml), *Chaetonium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans* (32 mg/ml) et les phyto-pathogènes *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani*(18mg/ml) (Kosaric et al, 1993).

Les rhamnolipides et sophorolipides ont montré leur efficacité en tant qu'agents antifongiques contre les phyto-pathogènes des graines. Un surfactant glycolipide de *Candida antartica*, a montré une activité antimicrobienne particulièrement contre les bactéries à Gram positif (Kitamoto et al, 1993).

Matériel et Méthodes

1. Microorganismes utilisés

Notre travail est focalisé sur la production des biosurfactants en utilisant des bactéries pures issues d'une recherche antérieure dans le cadre d'une thèse de doctorat de madame Guergouri. I sur la flore bactérienne des sols pollués aux hydrocarbures pétroliers. Ces bactéries isolées et purifiées, sont testées pour leur capacité à synthétiser des biosurfactants à travers une multitude de testes qualitatifs.

Tableau 5. Les sites de prélèvement

Site de prélèvement	Nord algérien			Sud algérien						
Souche	S8	S11	H3	I1	N9	2'	8'	10	13	17

2. Préparation du milieu de culture

Le principe de la dégradation est de fournir aux bactéries tous les éléments nécessaires pour qu'elles puissent se développer en présence d'une substance huileuse comme seule source de carbone et donner un grand rendement en biosurfactants. Pour obtenir une culture masseuse on a utilisé le milieu de culture minimal salt medium (MSM) décrit par (**Tahzibi, 2004**) dont la composition est :

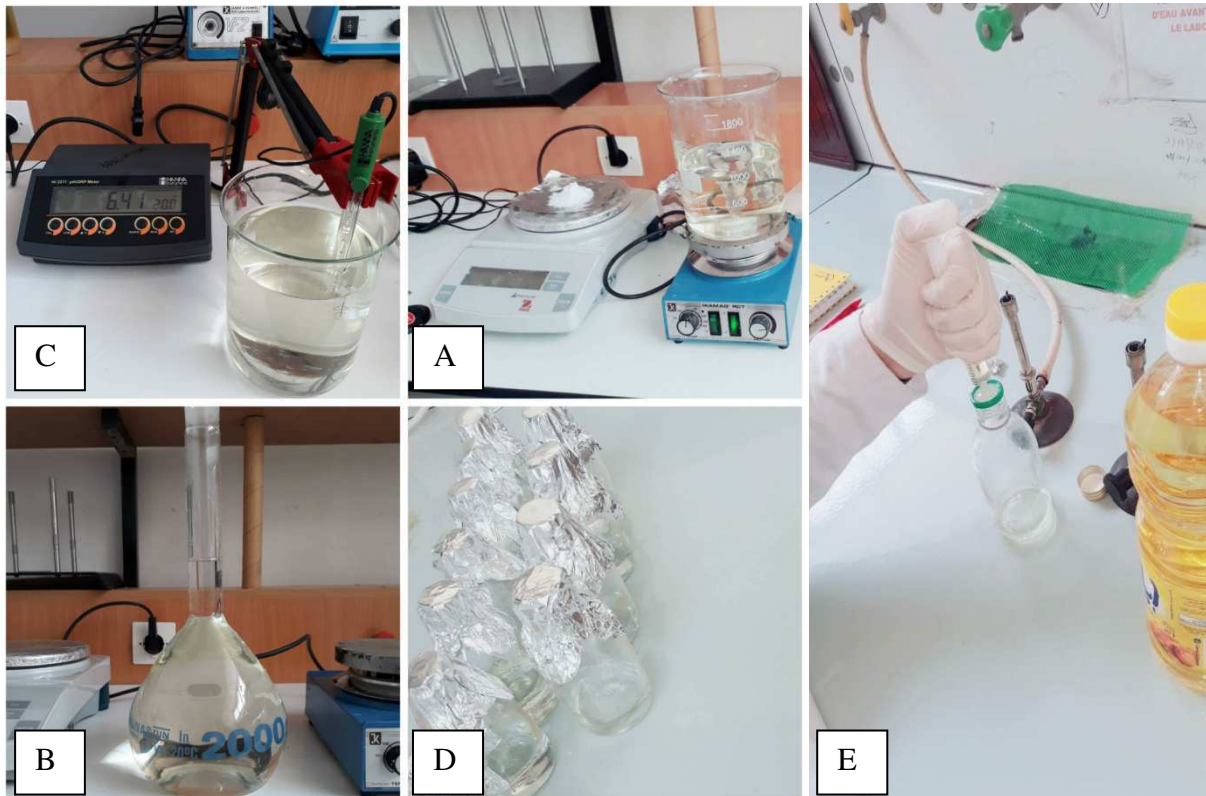
Tableau 6. Les Composants du milieu

Le composant	La quantité (g/L)
Na NO₃	30
Na Cl	2.2
KH₂ PO₄	6.4
K Cl	2.2
K₂ H PO₄ 3H₂O	11.52
Mg SO₄ 7H₂ O	1
Fe SO₄ 7H₂ O	0.00056
Extrait de levure	1
Glucose	1% (10g)
Huile végétale (après autoclavage)	4% (0,4mL)
pH= 7	

Matériel et Méthodes

Le milieu est réparti dans des flacons de 250 ml à raison de 50mL et 100 mL, bouchonnés en utilisant du coton de la gaze et le papier aluminium. Le tout est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes sous pression de 1,2 bar. Un flacon de pré-culture (50mL) et deux flacons de culture sont prévus pour chaque souche (100mL).

L'huile végétale utilisée est une huile du commerce, composée d'un mélange d'huile de tournesol et de colza. Pour être additionnée au milieu, elle est filtrée à travers des filtres stérilisant de 0,22 μ .



- A: Pesé des composants
- B : Volume complet du milieu
- C : Ajustement du pH
- D : Répartition dans des flacons
- E : Filtration d'huile

Figure 7 : les étapes de la préparation du milieu de

Matériel et Méthodes

3. Observation macroscopique et microscopique

Les bactéries pures repiquées sur gélose nutritive sont observées après 24h d'incubation à 30°C et leur aspect est décrit (forme des colonies, contours, opacité, élévation, pigmentation...etc.).

La coloration différentielle permettant la distinction entre deux grands groupes de bactéries est réalisée suivant un protocole standard du Gram. Elle permet de déduire la composition de la paroi cellulaire de nos bactéries via la réponse aux colorants c'est à dire Gram positif (violet) ou négatif (rose). L'observation est faite avec un objectif 100 à immersion.

4.1 Pré-culture et culture

4.1.1. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum consiste à la réalisation d'une culture de chacune des dix souches. Il est préparé en prélevant une colonie à partir d'une culture jeune (24h) et en l'ensemencant dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml du milieu MSM. L'incubation s'effectue à 37°C dans un incubateur agitateur du type « IKA KS 4000I » à 180 rpm pendant 18 à 20 h

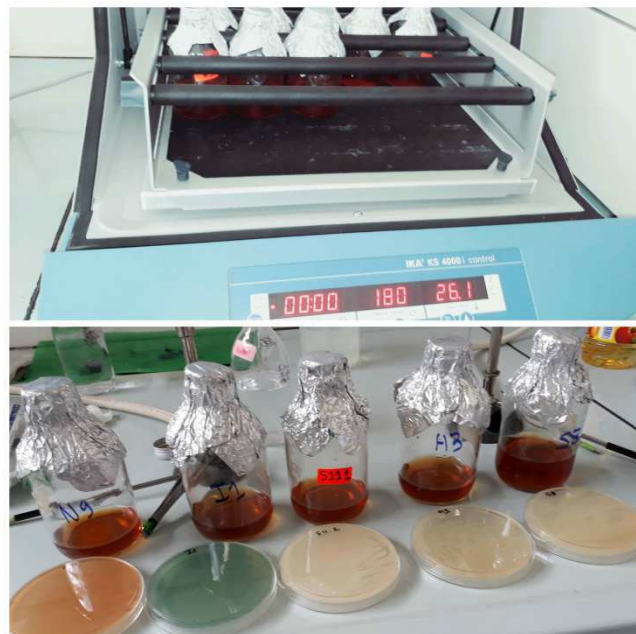


Figure 8 : Préparation et incubation de l'inoculum

Matériel et Méthodes

4.2. Culture

La fermentation s'effectue dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml du milieu MSM préalablement autoclavé additionné de 4 % (4mL dans 100mL) d'huile végétal stérile comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1 ml de l'inoculum précédant, la suspension mère est diluée pour avoir une densité optique de 0, 1nm.L'incubation s'effectue à une température ambiante sous agitation de 180 rpm sur un agitateur pendant 7jours à 30° C.



Figure 9 : Inoculation du milieu de culture

4.3. Suivi de la Production de biosurfactant

Des prélèvements sont effectués deux fois par jour (9h30 et 12h30) avec un suivi régulier des paramètres suivants :

a. Mesure de la Densité optique DO

L'absorbance est déterminée en prélevant 3ml de la suspension de chaque souche, par un spectrophotomètre du type « JEWAY 6300 »préalablement étalonné à 600 nm. La tare est effectuée avec le milieu stérile.



Figure 10 : Mesure de la densité optique

Matériel et Méthodes

b. Mesure de pH

Le pH est directement mesuré par un pH mètre de type « HANNA » En plongeant la sonde dans le flacon après avoir la désinfectée à l'éthanol et à l'eau distillée stérile bien sur le travail s'effectue entre deux Bec Bunsen pour afin d'éviter la contamination des flacons et pour travailler dans des conditions d'asepsie.



Figure 11 : Mesure du pH

c. Test du déplacement d'huile DDH

C'est un test quantitatif de détection du taux de production du biosurfactant. Pour cet essai ,10 μ l de pétrole brute est ajoutée à la surface de 30 ml d'eau distillée dans une boîte de Pétri pour former une mince couche d'huile.

Ensuite 10 μ l de la culture sont placés doucement au milieu de la couche d'huile .Si le biosurfactant est présent dans le surnageant, l'huile est déplacée, et un halo clair et visible (zone de compensation) est formé. (Morikawa et *al*, 1993) le diamètre de la zone est mesuré au pied à coulisse.

Matériel et Méthodes

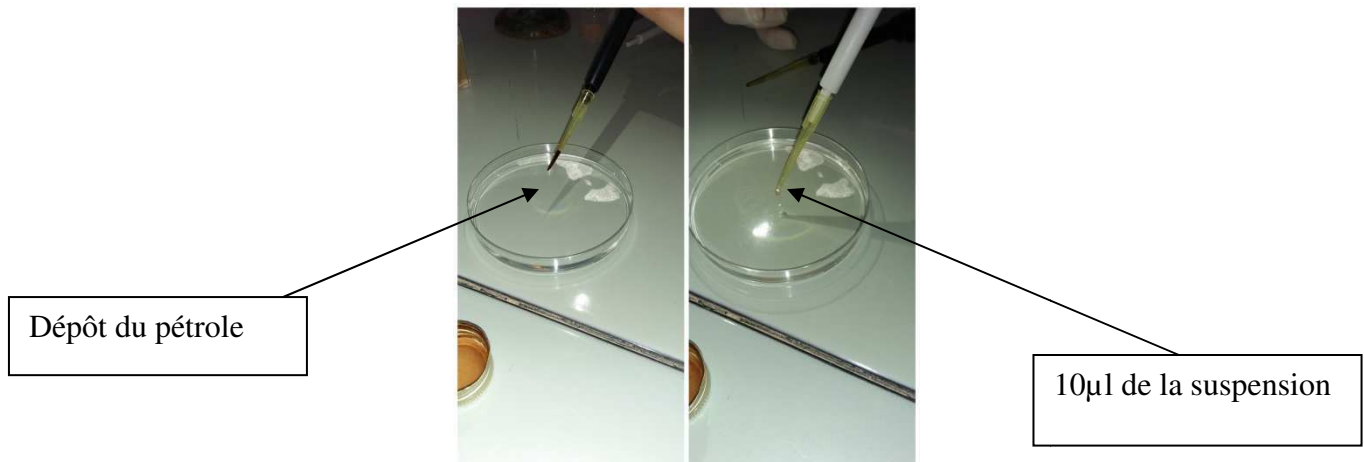


Figure 12 : Les étapes de la réalisation du test DDH

5. Extraction des biosurfactants

Les mouts de fermentation obtenus après 7 jours (168h) d'incubation sous agitation sont récupérés en raison de l'extraction. Dans un premier temps, le volume de 100 mL de chaque flacon est réparti dans deux tubes de centrifugation, pesés et équilibrés pour être centrifugés à 4800 rpm à une température de 4°C pendant 20 min. Une fois les 20 minutes sont achevées, le culot est jeté alors que le surnageant est récupéré et acidifié à pH 2 grâce à une solution d'HCl à 6N (voir annexe).

Deux techniques d'extraction sont employées, à savoir ;

- l'extraction par précipitation acide (Mortikawa et *al*, 1993)
- la précipitation acide suivie d'une extraction par solvants organiques

La première consiste à laisser précipiter la nuit à 4°C après acidification. Une centrifugation est effectuée le lendemain afin de concentrer le produit en culot.

Pour la deuxième technique, après acidification, un mélange de solvants organiques chloroforme / méthanol (V/V) (2 :1) ou bien l'éthyle acétate seul est ajouté à la préparation. Le mixte est soumis à une agitation vigoureuse dans une ampoule à décanter puis laissé au repos pour quelques minutes.

Matériel et Méthodes

Lorsque les phases se séparent la décantation de la première phase est effectuée. La phase organique (solvant contenant le biosurfactant) se trouve en bas et la phase aqueuse (milieu de culture) en haut.

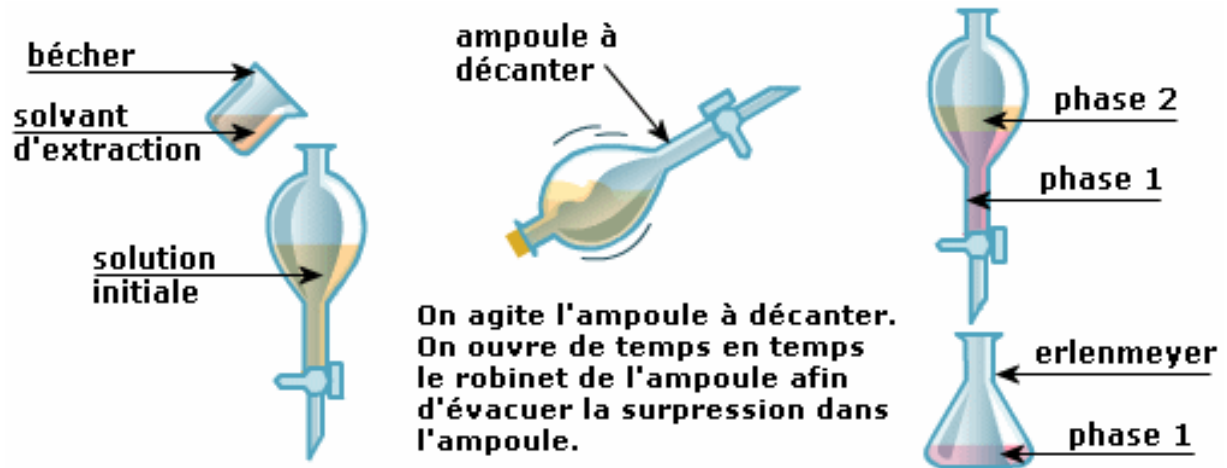


Figure 13: Principe de l'extraction aux solvants organiques (www.maxicours.com)

Dans le cas où une émulsion se forme dans la phase organique, un lavage répété 3 à 4 fois à une solution d'NaCl saturée (voir annexe) est effectué afin d'éliminer l'émulsion formée et de libérer d'éventuelles molécules de biosurfactants emprisonnées dedans.

Après lavages, la phase organique est desséchée en mettant le $MgSO_4$ qui va absorber l'eau restant dans cette phase et former des grumeaux éliminés par filtration sur papier wattman.

Le séchage des solvants est ensuite effectué sous vide par évaporation rotative dans un rotavap du type «BUCHI R-210 » à 40°C.

6. Test d'activité antimicrobienne du biosurfactant

Après une étape d'extraction de biosurfactant, un test d'activité antimicrobienne est réalisé en utilisant deux souches faisant partie des genres *Bacillus sp.* et *Enterobacter sp.* Ensemencées par étalement sur gélose nutritive à défaut de gélose Muller Hinton.

C'est une méthode proposée par **Cooper** et **Woodman** en **1946**, et reprise par la suite par **Schroder** et **Messing** en **1949** pour tester l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

Matériel et Méthodes

Elle assure une diffusion radiale de la substance à partir d'un puits créé dans la gélose en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser la solution à tester, de concentration connue. Cette dernière diffuse radialement créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Dorman et Deans, 2000).

Chaque boîte contient quatre puits (un pour le biosurfactant pur et un dilué à $\frac{1}{2}$, un troisième dilué à $\frac{1}{5}$ et le quatrième est le contrôle du solvant (eau distillée ou solvant organique)).

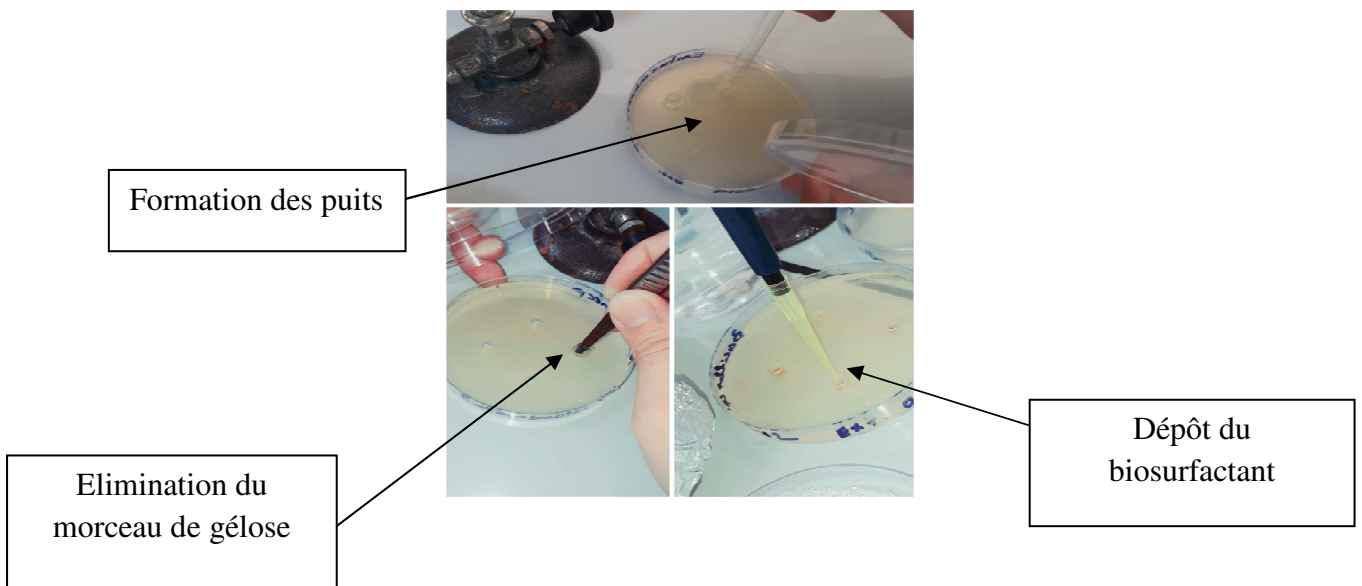


Figure 14 : réalisation du test d'activité anti microbienne

« Les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, les boîtes sont observées pour la détection d'éventuelles zones d'inhibition et le diamètre de la zone est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

Résultats et Discussion

I. Caractères Morphologiques

A partir de cultures pures sur milieux gélosés, on a pu apprécier les caractères morphologiques des dix souches. On a remarqué que sur le même milieu les bactéries poussent de façon différente et le tableau suivant résume les caractères morphologiques des différentes bactéries productrices de biosurfactants.

1. Caractères macroscopiques

Les caractères macroscopiques des souches sont regroupés dans le tableau

Tableau 7 : Caractères macroscopiques des souches sur gélose nutritive

Caractère Souche	Forme	Elévation	Bord	Couleur	Aspect	Opacité	Consistance
S8	dentelée	Plate	Irrégulier	Crème	Rugueux	Opaque	Crémeuse
S11.2	dentelée	Plate	Irrégulier	Crème	Rugueux	Transparente	Sèche
H3	Ronde	Bombée	Régulier	blanche	Lisse	Opaque	Crémeuse
N9	Ronde	Plate	Régulier	Pigment marron diffusible	Lisse	Transparent	Sèche
I1	Ronde	plate	Régulier	Pigment vert diffusible	Lisse	Transparent	Crémeuse
2'	dentelée	Plate	Irrégulier	Crème	Rugueux	Opaque	Crémeuse
8'	Ronde	Bombée	Régulier	Pigment jaune non diffusible	Lisse	Opaque	Crémeuse
10	Ronde	bombée	Régulier	Pigment rose non diffusible	Lisse	Transparent	Crémeuse
13	dentelée	Plate	Irrégulier	Crème	Rugueux	Translucide	Sèche
17	Ronde	Bombée	Régulier	jaune	Lisse	Transparent	Crémeuse

Résultats et Discussion

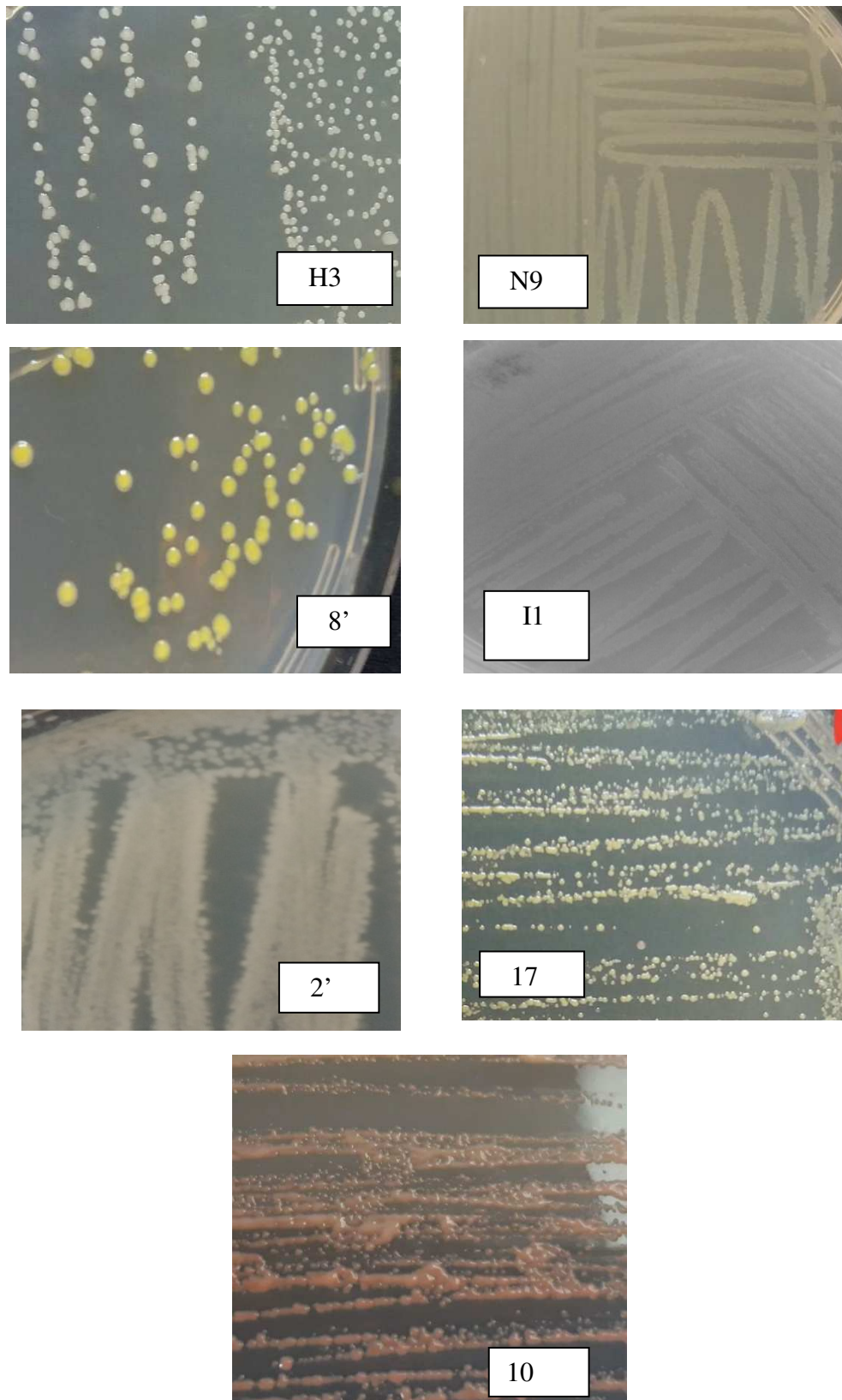


Figure 15 : Quelques aspects macroscopiques des souches étudiées

Résultats et Discussion

2. Caractères Microscopiques

L'observation microscopique a été réalisée suivant une étape de coloration de Gram. Les résultats obtenus se résument dans le tableau 8

D'après nos observations, il ressort qu'il y a deux groupes de bactéries avec des formes différentes

Tableau 8 : Aspect microscopique des souches isolées

Caractère Souche	Le Gram	La Forme	Le Mode de regroupement des cellules	Présence/absence de spores
S8	+	Bacille	streptobacille	+
S112	+	Bacille	Isolé	+
H3	-	Bacille	streptobacille	-
N9	-	Coccobacille	Isolé	-
I1	-	Bacille	Isolé	-
10	+	Gros coque	Nid d'abeille	-
17	+	Coque	Nid d'abeille	-
8'	-	Bacille	Isolé	-
2'	+	Long bacille	En chaînette	+
13	+	Gros bacille	streptobacille	+

+ : Gram + - : Gram - + : Présence de spores - : Absence de spores

Résultats et Discussion

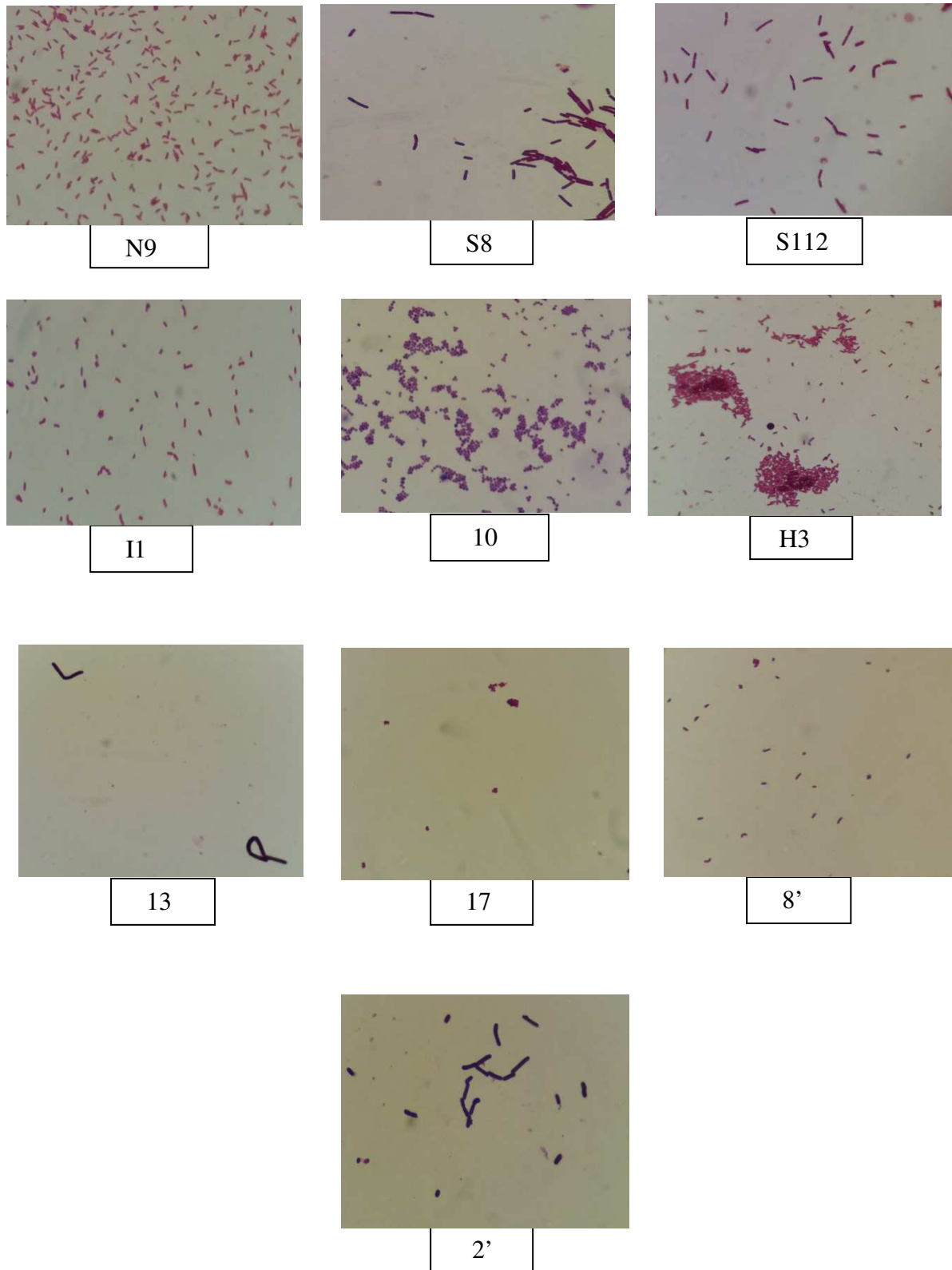


Figure 16 : les différents aspects microscopiques obtenus après coloration de Gram

Résultats et Discussion

L'observation microscopique a été réalisée après une coloration de Gram. Les résultats consignés dans le tableau 8 montrent une variété de types bactériens.

Les bactéries isolées présentent différentes formes : bacille, coccobacille ou cocci. Elles sont soit isolées ou bien assemblées en paire, en chaînette, en amas irrégulier ou sous forme d'un nid d'abeille.

Elles présentent aussi une paroi à Gram positif ou négatif. Les bacilles à Gram positif possèdent une spore de résistance.

II. Suivi de la production de biosurfactant

Cette partie du travail consiste à réaliser une culture bactérienne et suivre des paramètres tels que le pH la DO et le DDH en fonction du temps. Les mesures ont été prises durant 7 jours, les tableaux suivants résument le travail qui a été fait.

1. Mesure du pH

D'après les résultats obtenus (voir le tableau 9) le pH des 10 souches reste à chaque mesure proche de la neutralité.

Tableau 9 : Résultats des mesures du pH des dix souches

Temps Souche	T0	T1=19h	T2=23h	T3=42h	T4=46h	T5=66h	T6=70h	T7=120h
S8	6.2	6.48	6.66	7.02	7.01	7.07	6.99	7.17
S112	7.92	6.87	6.65	6.98	7.32	7.04	7.24	6.77
H3	8.72	6.32	6.60	6.33	6.57	6.23	6.66	6.49
N9	8.70	6.62	6.64	6.55	6.72	6.36	6.61	8.16
I1	8.5	7.22	7.35	8.35	8.42	8.53	8.60	8.79
10	6.64	6.65	6.64	6.67	6.69	6.61	6.66	6.74
17	6.5	6.09	06	5.76	5.72	5.42	5.46	5.69
8'	6.65	6.67	6.7	6.31	6.30	6.96	7.07	7.15
2'	6.42	6.71	6.61	7.61	6.66	6.80	6.76	6.76
13	6.44	6.20	6.26	7.04	6.99	7.29	7.31	7.76

Résultats et Discussion

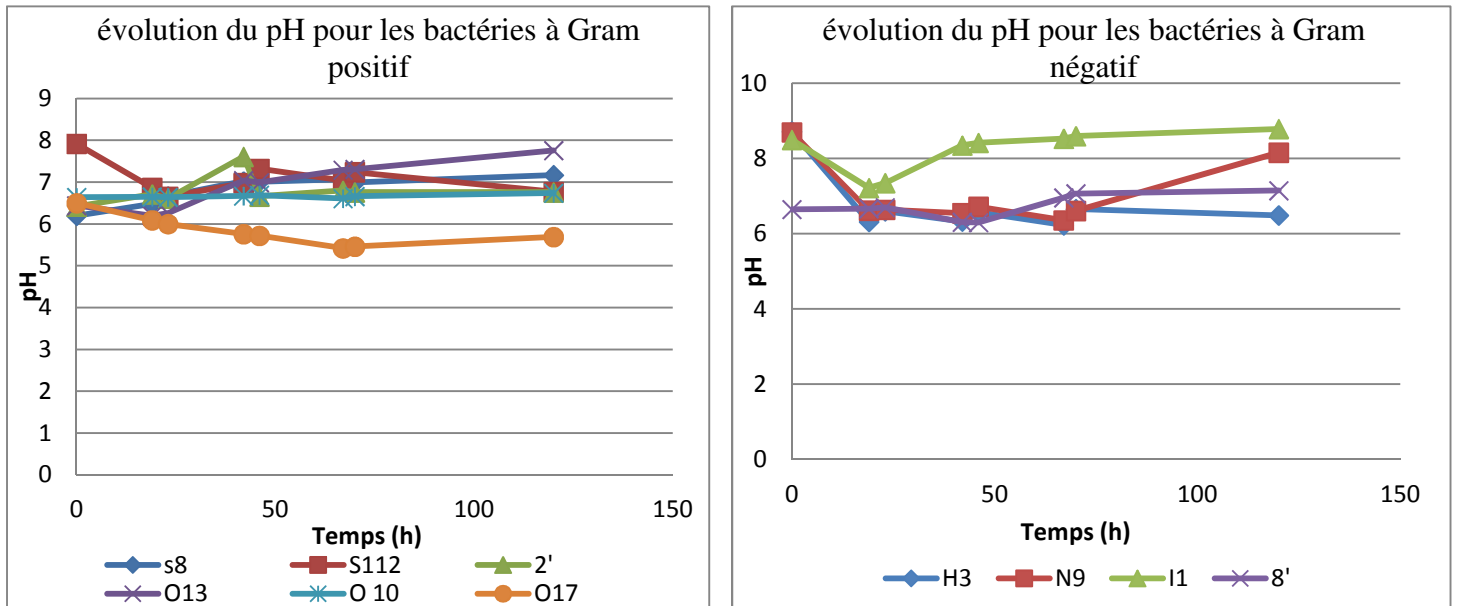


Figure 17 : courbes de l'évolution du pH en fonction du temps des Bactéries à Gram négatif et à Gram positif

2. Mesure de la DO

Tableau 10 : Résultats des mesures de la DO des dix souches

Temps Souche	T0	T1=19h	T2=23h	T3=42h	T4=46h	T5=66h	T6=70h	T7=120h
S8	0.250	7.26	11.28	81.8	83.4	85.3	111.4	7.06
S112	0.09	0.037	0.843	3.58	9.23	19.62	3.8	63
H3	0.02	8.40	4.28	1.908	1.94	1.518	1.34	0.71
N9	0.03	0.095	0.755	0.095	1.97	2.34	6.13	3.1
I1	0.01	11.07	3.61	0.58	6.49	8.24	8.53	6.46
10	0.335	1.377	1.210	1.767	1.772	1.889	4.04	2.20
17	0.231	1.902	1.944	5.57	4.88	3.73	5.88	1.977
8'	0.291	1.710	1.914	8.95	7.69	6.40	8.47	5.67
2'	0.151	1.164	1.128	1.694	1.700	1.880	4.08	3.35
13	0.198	8.15	7.43	9.88	9.65	6.18	8.25	4.57

Résultats et Discussion

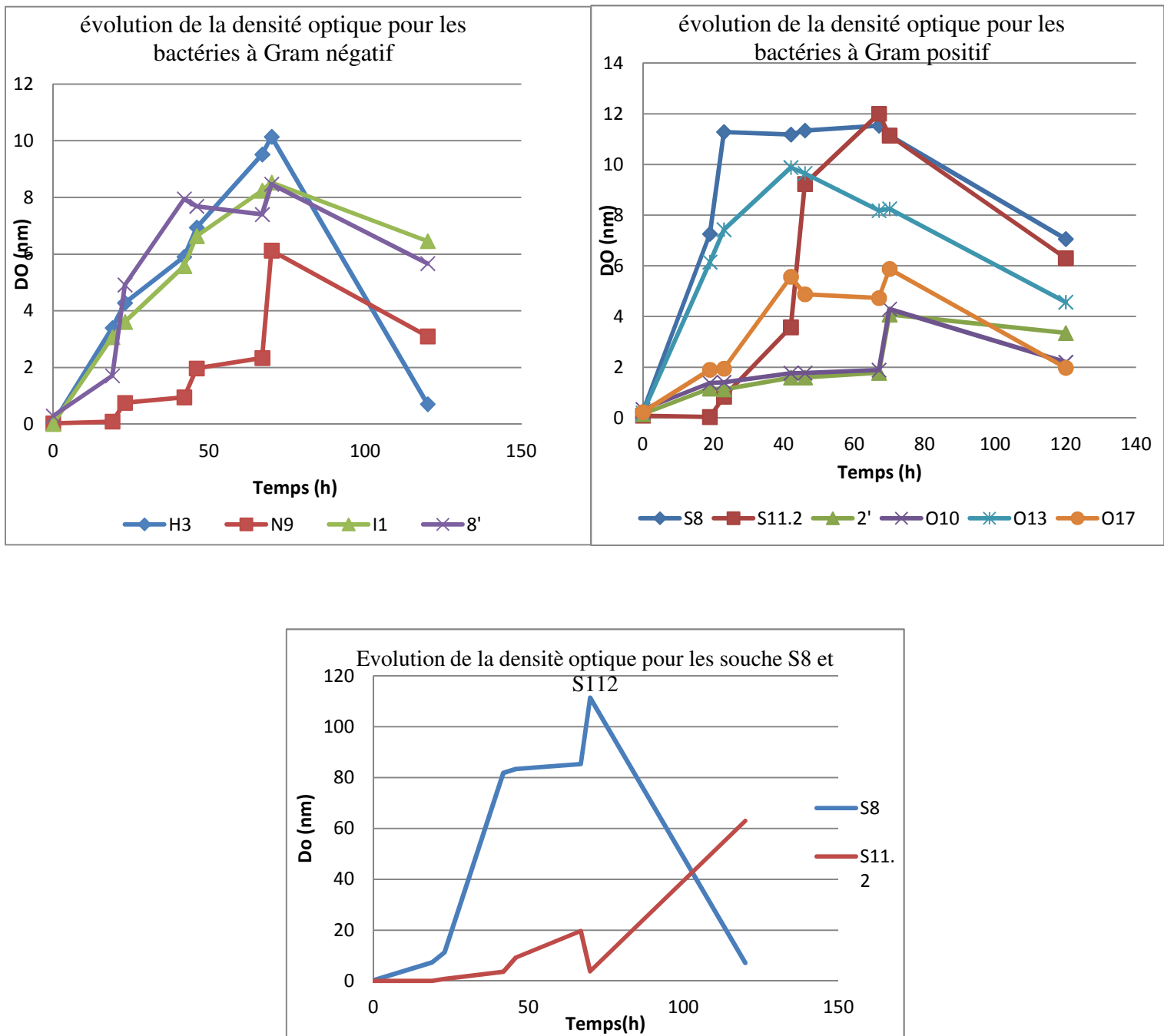


Figure 18 : courbes de l'évolution la densité optique en fonction du temps des Bactéries à Gram négatif et positif

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus montrent que la zone de déplacement d'huile indique la production de biosurfactant, le test est réalisé suivant les étapes indiquées sur la photo

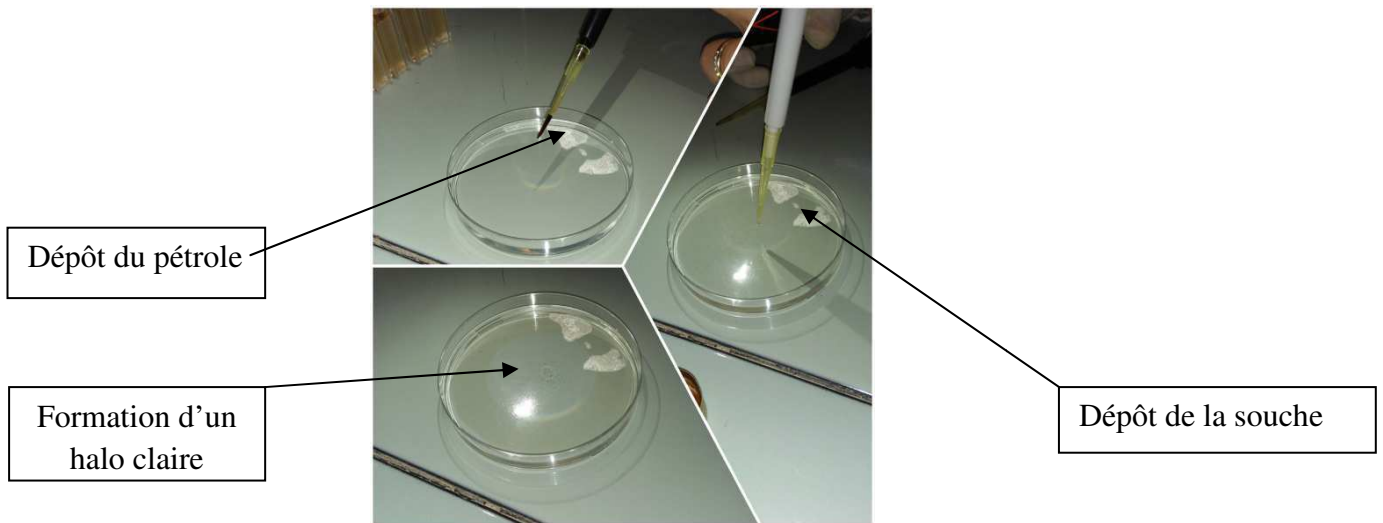


Figure 19 : Résultats du test ddh

Les résultats obtenus dans le tableau 11 montrent que la S8 et la I1 présentent un diamètre de 9 et 8.3 cm respectivement. Ceci nous a permis de conclure que sont les meilleures souches productrices de biosurfactant.

Tableau 11 : Résultats du test de déplacement d'huile des dix souches

Temps Souche	T0	T1=19h	T2=23h	T3=42h	T4=46h	T5=66h	T6=70h	T7=120h
S8	4	2.8	7.2	8.3	8.6	8.1	9	9
S112	6	4.5	2.8	8	6.8	7.2	6.3	7
H3	5	3.5	2.4	0.8	2.5	0.2	1	4.2
N9	1.5	6	1.7	2.5	4.7	5	4	2
I1	0	7	7	8.8	8	8.2	8	8.3
10	3.5	2	2	2.3	1.8	2.7	4.6	7.3
17	0.5	1.2	2.5	1.3	0.5	0.9	01	0.2
8'	1.8	5.3	1.5	3.7	1.7	0.8	1.1	1.3
2'	0.5	0.5	1.5	4.6	2.8	4.5	3.1	6.9
13	2.5	1.8	5.3	1.6	2.2	1.2	1.1	4.2

Résultats et Discussion

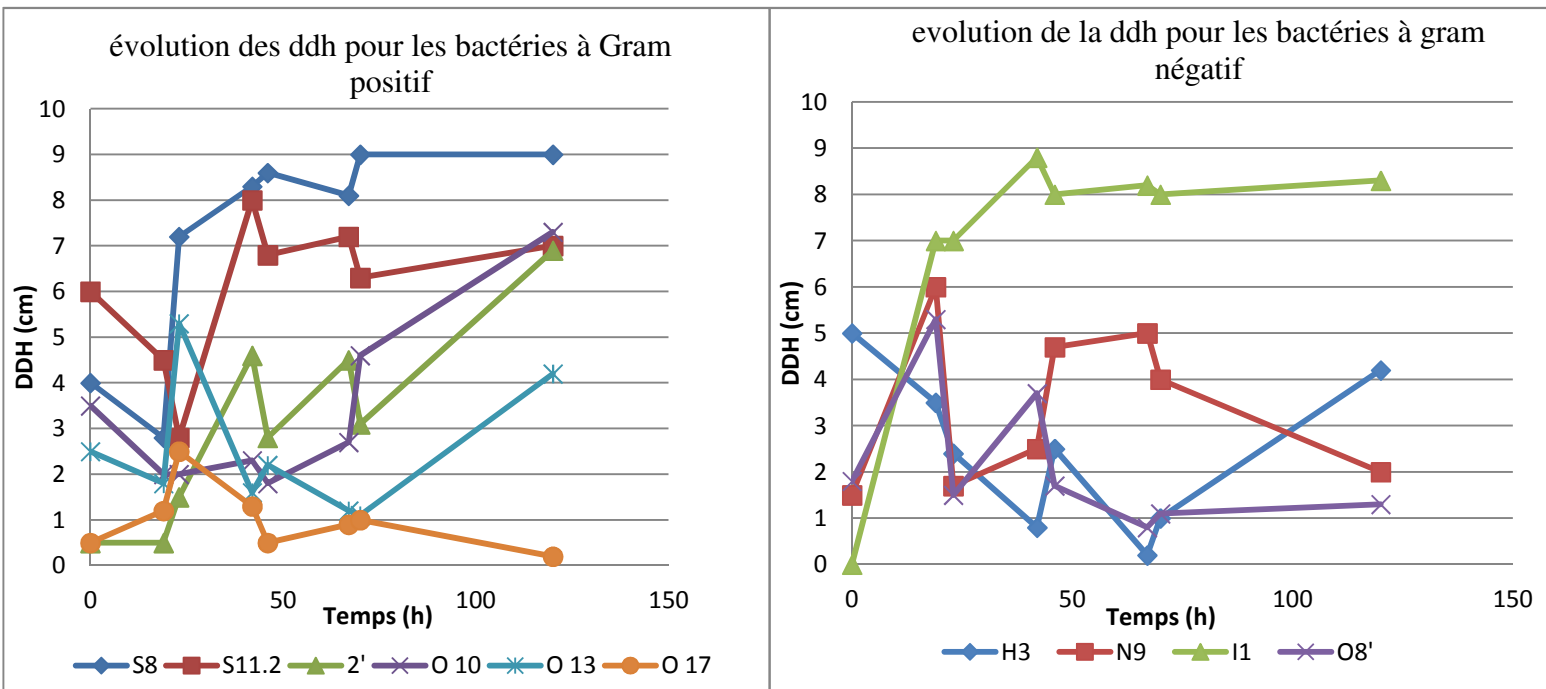


Figure 20 : courbes de l'évolution du test ddh en fonction du temps des Bactéries à Gram négatif et positif

La production de biosurfactants en présence d'huile végétale a été largement étudiée. Après avoir tracé les courbes, l'évolution de la croissance des souches est déterminée en fonction du temps en présence de deux sources de carbone ; le glucose et l'huile végétale de commerce.

L'allure des courbes tracées correspond (pour la majorité) à celle d'une fermentation en batch en présence de deux source de carbone (croissance diauxie).

La première source fermentescible sera le glucose vu sa simplicité de sa structure et sa miscibilité dans l'eau. La deuxième source est de nature huileuse, non miscible dans l'eau et constitue une phase en surface du bouillon, difficilement accessible, nécessitant l'un des modes d'accès précité dans la revue pour être dégradé, entre autre la synthèse de biosurfactants..

III. Extraction des biosurfactants

L'extraction a été réalisée par deux méthodes suite à une succession des étapes (citées dans le chapitre précédent)

La technique d'extraction par solvant organique après évaporation à l'aide d'un rotavapor a donné des extraits de couleur jaune à orange avec une texture liquide. Or la technique par précipitation a donné des culots denses laiteux et une couleur blanchâtre avec

Résultats et Discussion

présence d'une couche à la surface des tubes de centrifugation (voile) chez toutes les souches sans exception (voir figure 21).



Figure 21 : Résultats d'extraction par précipitation acide



Figure 22 : Extrait obtenus par les deux méthodes d'extraction

Le voile était de couleur jaunâtre avec un aspect muqueux, ce dernier est récupéré dans des tubes propres à l'aide d'une pipette pasteur pour être testés. Les extraits sont transférés dans des tubes stériles.

Le protocole d'extraction par précipitation était facile à réaliser et rapide comparativement à l'extraction par solvants organiques qui est lente.

L'extrait obtenu par précipitation acide été de grande quantité pour certaines bactéries. Ce dernier est récupéré par une simple centrifugation alors que celui obtenu par extraction organique est difficilement récupéré. La présence d'une émulsion stable formée après agitation vigoureuse du mélange solvants + mout de fermentation est une bonne preuve de la production de biosurfactants. Cependant, ça constitue une barrière à l'extraction de ce dernier parce qu'il reste emprisonné dans l'émulsion donc pour être libéré il faut réaliser un ou plusieurs lavages par le NaCl saturé (15 ml NaCl + 80 ml mélange solvant+ mout) avec agitation et décantation.

Résultats et Discussion

Lors du passage au rotavapor, le solvant est séché presque totalement, (2 à 3 millilitres sont laissés pour récupérer l'extrait du ballon).

La souche 8'a subit 7 lavages mais l'émulsion n'a pas été éliminée donc l'extrait n'a pas était concentré.

IV. Test d'activité antimicrobienne du biosurfactant

Le test de sensibilité antimicrobienne a permis de montrer la présence d'une activité antimicrobienne contre deux bactéries une à Gram négatif (*Enterobacter sp.*) et une à Gram positif (*Bacillus sp.*). La mesure des diamètres de zones de lyse obtenues sont représentés dans le tableau ci-dessous.

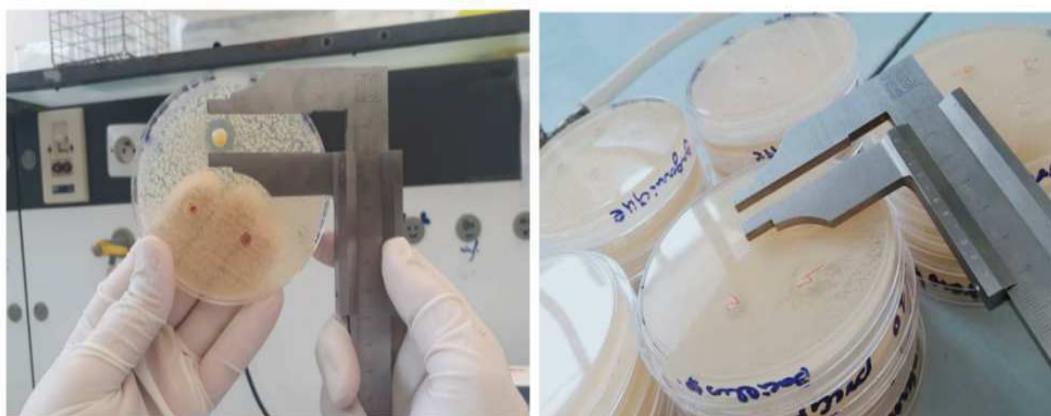


Figure 23: Méthode de la mesure de la zone de lyse

Tableau 12 a: Résultats des boites témoins du test d'activité antibactérienne

Témoin	Genres testés							
	<i>Enterobacter sp</i>				<i>Bacillus sp</i>			
	Puit 1	2	3	4	Puit 1	2	3	4
	Diamètre de la zone de lyse (cm)							
	00	00	00	00	00	00	00	00

Puit 1 : eau, 2 : chloroforme, 3 : méthanol, 4 : 2/3 chloroforme+ 1/3 méthanol

Résultats et Discussion

Tableau 12b: Résultats des différentes valeurs du test d'activité antimicrobienne des extraits

Souche	Type d'extraction	Genres testés							
		<i>Enterobacter sp</i>				<i>Bacillus sp</i>			
		Puit 1	2	3	4	Puit 1	2	3	4
		Diamètre de la zone de lyse (cm)							
S8	organique	Aucun effet				1.5	01	0.9	00
	précipitation	Aucun effet				00	00	00	0.9
S112	organique	Aucun effet				1.35	1.07	01	00
	précipitation	Aucun effet				0.95	0.9	0.7	1.1
H3	organique	Aucun effet				1.4	1.1	01	00
	précipitation	1.4	1.1	0.9	1.2	Aucun effet			
N9	organique	Aucun effet				03	02	01	00
	précipitation	Aucun effet				Aucun effet			
I1	organique	Aucun effet				3.8	3.4	2.4	00
	précipitation	Aucun effet				3.5	2.7	2.4	2.6
10	organique	Aucun effet				1.6	1.2	01	00
	précipitation	Aucun effet				1.1	0.9	0.7	0.7
17	organique	Aucun effet				1.3	1.1	0.9	00
	précipitation	Aucun effet				1.1	0.75	00	00
8'	organique	01	0.8	0.7	00	0.9	00	00	00
	précipitation	Aucun effet				1.1	0.9	0.7	00
2'	organique	Aucun effet				3.05	2.6	02	00
	précipitation	Aucun effet				1.6	1.25	0.9	1.3
13	organique	Aucun effet				1.2	01	0.9	00
	précipitation	Aucun effet				1.1	0.95	0.8	1.2

1 : puit contient l'extrait pur

2 : puit contient l'extrait dilué à 1/2

3 : puit contient l'extrait à 1/5

4 : puit contient l'eau distillé stérile (ext. organique) ou bien voile formé à la surface (ext. par précipitation acide).

Résultats et Discussion

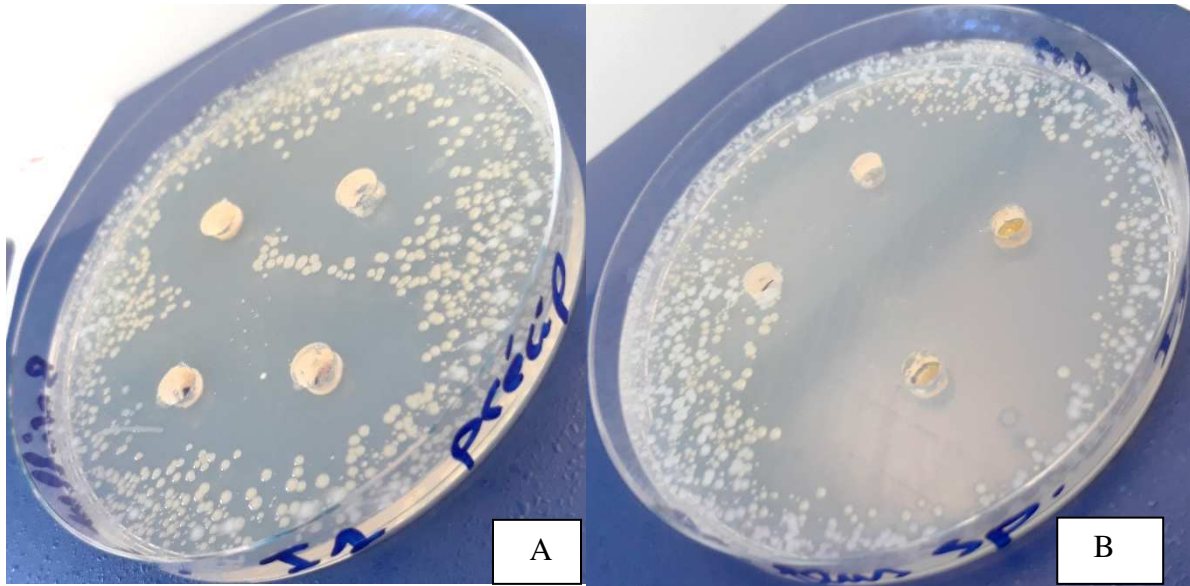


Figure 24 : effet du produit issu de la I1 sur *Bacillus sp.*

A : produit extrait par précipitation B : produit issu par extraction organique

Les extraits produits testés sur *Bacillus sp.* Ont tous eu une activité par rapport à ceux testés sur *Enterobacter sp.* Ainsi, seul l'extrait produit par 8' et H3 ont montré une activité sur *Enterobacter sp.*

Les extraits des souches I1, N9 et 2' avaient montré les plus grandes zone de lyse contre la bactérie *Bacillus sp.* (Voir figure 24).

La détermination de la sensibilité des souches aux différents extraits dépend de la bactérie testée, le type d'extraction et la concentration d'extrait.

V. Discussion

Le choix de la source de carbone additionnée dans le milieu de fermentation n'est pas aléatoire, il se base sur plusieurs lectures faites de recherches effectuées par d'autres chercheurs.

Des rendements importants en biosurfactants et forte stabilité des émulsions étaient obtenus dans les travaux de Sifour et ses collaborateurs (2007) sur *Pseudomonas aeruginosa* lorsque la source de carbone utilisée était l'huile végétale et pas l'hydrocarbure.

Varadharajan et subramaniyan (en 2013) ont comparé l'utilisation de plusieurs déchets agroalimentaires et huiles comme source de carbone pour la production. L'huile végétale est considérée selon eux, parmi les sources qui donnent les meilleurs rendements en biosurfactants.

La variation du pH est autour de la neutralité pour la majorité des bactéries. Seule la souche 17 a atteint un pH légèrement acide (=5,4). L'abaissement du pH traduit l'existence de nouvelles molécules acides en solution qui neutralisent le pH.

En regardant les courbes d'évolution de la biomasse à travers la densité optique mesurée, nous pouvons dire que la majorité des bactéries démarrent bien leur croissance en présence de glucose, puis une diminution de celle-ci est observée à cause de l'épuisement de cette première source. Le temps nécessaire à l'adaptation à l'huile comme deuxième source de carbone était différent d'une souche à l'autre (entre 42 h et 70 h) voir nul pour certaines (H3).

Cela avait un effet sur la production révélée par les courbes de déplacement d'huile. La meilleure productivité est observée chez les souches S8 (ddh=9cm) en suite la souche I1 (ddh= 8,3cm). Ces deux bactéries ont eu deux courbes de croissance presque parfaites avec deux phases exponentielles correspondant à l'utilisation des deux sources de carbone successivement.

Pour les souches 10 et 2', l'utilisation de glucose n'a pas donné un rendement très élevé en biomasse, par contre l'huile à augmenter ce dernier significativement. Elles ont aussi montré une bonne production de biosurfactants (ddh= 7,3 et ddh= 6,9 respectivement).

Pour le reste des bactéries, l'évolution du ddh au fils du temps n'était pas très importante, en plus nous constatons une diminution de ce dernier avec la diminution de la biomasse bactérienne (déclin), et rendement était faible. C'est le cas notamment de N9, 8' et

17. Ceci peut être expliqué par le faible taux du produit secrété ou bien le type de biosurfactant lié directement à la cellule.

L'analyse comparative des différentes techniques de détection du produit synthétisé (biosurfactant) par *Youssef N.H.* et ces collaborateurs en 2004, indique que la mesure de déplacement d'huile est une méthode sensible et fiable.

La propriété antimicrobienne des biosurfactants (Rodrigues et *al*, 2006) est largement reportée dans la bibliographie, en particulier celle des micro-organismes d'origine terrestre.

Les boîtes témoins utilisées pour tester l'effet des solvants (chloroforme, méthanol ou le mélange) ainsi que l'eau distillée ont montré des résultats négatifs. Donc toute zone de lyse observée pour le reste des extraits sera due à son effet inhibiteur contre la bactérie en question.

Tous les extraits obtenus par extraction organique ont un effet sur la croissance de *Bacillus sp.* mais n'ont aucun effet sur la bactérie *Enterobacter sp.* à l'exception de celui de la souche 8' (ou l'émulsion avait persisté). Pour cette même souche, l'effet sur *Bacillus sp.* est presque nul (0,9 cm pour l'extrait pure)

La majorité des voiles formés à la surface des surnageants après extraction ont montré une activité contre *Bacillus sp.* Seul le voile de l'extrait H3 avait une activité contre *Enterobacter sp.* Cela peut être expliqué par le fait que le biosurfactant ne s'est pas précipité en entier par force centrifuge.

Dans les travaux de Sneha, le meilleur effet inhibiteur était observé pour l'extrait d'un bacille à Gram positif contre des entérobactéries avec des valeurs de 3,6 et 2,5 cm pour *Klebsiella sp.* et *Escherichia coli* respectivement. Puis un bacille à Gram négatif avec des valeurs de zone d'inhibition de 2,4 cm contre les deux bactéries.

Les biosurfactants isolés ont montré une activité non sélective et majoritaire contre la bactérie à Gram-positif *Bacillus sp.* Il a été reporté que les lipopeptides sont souvent actifs contre les bactéries à Gram positif (Kitamoto et *al*, 1993; Singh and Cameotra, 2004). L'étude d'Abousseoud et ces collaborateurs (2007) sur les rhamnolipides synthétisés par une *Pseudomonas fluorescens* a montré une activité d'inhibition de 2,5 cm vis-à-vis de *Bacillus subtilis*.

Ces résultats corroborent avec les nôtres. Le meilleur effet d'inhibition observé (plus grande zone de lyse, 3,5 – 3,8 cm) correspond aux extraits de la souche I1 (bacille à Gram négatif, libérant un pigment bleu verdâtre diffusible dans le milieu suspectée être

Pseudomonas aeruginosa) contre le *Bacillus sp.* La souche N9 (qui est un bacille à gram négatif libérant un pigment marron diffusible) avait aussi montré un effet notoire contre *Bacillus sp.* (3cm)

L'extrait de la bactérie 2' avait un effet de 3,05 cm contre *Bacillus sp.* Il s'agit ici d'une bactérie à Gram positif sporulante.

Conclusion

Le sol pollué par les hydrocarbures pétroliers possède une microflore importante qui suggère la possibilité de cette dernière à assurer la biodégradation des hydrocarbures lorsque les bonnes conditions du milieu sont réunies.

L'objectif de notre travail était de suivre la production et la caractérisation des biosurfactants en utilisant des souches pures aptes à les produire qui ont été isolées auparavant à partir de sols contaminés au pétrole brute de deux endroits différents Nord et Sud Algérien.

Le principe de la dégradation est de fournir aux bactéries tous les éléments nécessaires pour qu'elles puissent se développer en présence d'une substance huileuse comme seule source de carbone et donner un grand rendement en biosurfactants.

Dans un premier temps, il est important de faire une étude microscopique basée sur la coloration de Gram. Ceci nous permet de grouper les souches bactériennes en cinq groupes à savoir ; deux coques à Gram positif (souche 10 et souche 17), un coccobacille à Gram négatif (souche N9), des bacilles à Gram négatif (souche I1, H3 et 8') et des bacilles à Gram positif sporulants (souche S11.2, 2' et 13).

Une fermentation a été réalisée pendant une semaine sur milieu MSM additionné de 4% d'huile végétal avec un suivi de plusieurs paramètres dont : le potentiel d'hydrogène, la densité optique et le test de déplacement d'huile ce qui nous permis de savoir l'évolution de la production du biosurfactants. Certaines souches ont montré une bonne adaptation aux sources de carbone et une forte production de biomasse, c'était le cas pour I1 et S8.

Le suivi de l'évolution du pH a montré une variation différente au cours de la fermentation mais qui reste autour de la neutralité pour la majorité des souches

Enfin, l'extraction du biosurfactant par les deux méthodes a donné un meilleur rendement pour l'extraction par précipitation acide à l'abaissement du pH par rapport à celle par solvants organiques.

Le test d'activité antimicrobienne des extraits obtenus a été réalisé sur *Enterobacter sp* et *Bacillus sp*. Les meilleures zones d'inhibition étaient observées pour les extraits des bactéries I1, N9 et 2' contre la bactérie *Bacillus sp*. Tandis que contre la bactérie *Enterobacter sp.*, seul l'extrait de la souche H3 a montré un effet.

Ces bactéries et le produit qu'elles synthétisent (Particulièrement la souche II suspectée être un *Pseudomonas aeruginosa*) constituent d'excellents outils dans la lutte antibactérienne

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

- L'identification des souches étudiées et leur classification taxonomique
- L'étude des propriétés physico-chimiques du biosurfactant produit pour mieux connaître sa nature, sa structure ...etc.
- La production du biosurfactant par l'essai d'autres substrats (l'huile de vidange, l'huile de friture ...)
- La réalisation du test d'activité antimicrobienne sur des souches pathogènes.

Références

A

Aleksandra W, (2010). Recherche de signaux moléculaires végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeyadadantii*). Docteur. Microbiologie environnementale. Université Lyon, p.85.

Atlas R.M, Bartha R, (1993). The Benjamins Cummings Publishing Company Inc, "Microbial Ecology : fundamentals and applications", 3rd edition.p.819.

Abouseoud .M, Maachi .R, Amrane. A (2007). Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. The International Foundation for Science-I.F.S.- Stockholm Sweden ,10 :340-347.

B

Banat M, Makkar R.S, Cameotra S.S, (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 : 495-508.

Ballerini D, (1999). Traitements biologiques des sols. Technique de l'ingénieur, traité Environnement, G2 620 : 1 – 6.

Begbeg A, (2008). «Importance des considérations environnementales dans l'étude des performances des additifs utilisés dans les fluides de forage », mémoire de magister en traitement des effluents industriels.

Bocard C, (2006). Mares noires et sols pollués par les hydrocarbures et traitement des pollutions. Technip, p.12.

Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele J. P, (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 156-164.

Bouderhem A, (2011). Utilisation de souches bactériennes telluriques autochtones dans la biodétection et la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures. Thèse de magister de l'université KasdiMerbah Ouargla. Spécialité Microbiologie Appliquée, p.91.

Bognolo G, (1999). Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2) : 41-52.

C

Christofi N, Ivshina I.B, (2002). A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of Applied Microbiology*, 93 : 915-929.

D

Das N, Chandran P, (2011). "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview." *Biotechnology Research International* 2011.

Références

Desai J.D, Banat I.M, (1997).Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1) : 47-64.

Djerbaoui A.N, (2011). Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de biosurfactant et la bioremediation des sols de Hassi Messaoud contaminé par les hydrocarbures. Mémoire magister : biologie. Ouargla : université kasdi merbah-Ouargla, p.133.

F

Fiechter A, (1992). Biosurfactants: moving to wards industrial application, *Tibtech*, 10 : 3-12.

Florence M, (2011). Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures : analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Docteur de l'université de Grenoble chimie biologie, p.40.

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 de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p.177.

Greer C.W, Fortin N, Roy R, Whyte L.G, Lee K, (2003). Odnigenous Sediment miminal activity in response to nutriemenrichment and plant Growth Following a control le doils pill on a Fresh water wetland". *Bioremediation Journal.*, 7(1): 69-80.

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

H

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

HONGWEI Y et al. (2003). Anaerobic biodegradability of aliphatic compound and their quantitative structure biodegradability relationship, Tsinghua University, Beijing, PR China.

Hassaine, A (2015). Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda. Thèse de Doctorat : Biologie Végétale. ANNABA : Université badji mokhtar – ANNABA, p.189.

K

Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T., Nakane T., Kamisawa, Kretschmer A, Bock, H, Wagner, F, (1993). Chemical and physical characterization of interfacial active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Appl. Environ. Microbiol*, 44 : 864–870.

Références

L

Laha, Shonali, Berrin, Tansel, Achara, Ussawarujji, kulchai, (2009). “Surfactant–soil Interactions During Surfactant-amended Remediation of Contaminated oils by Hydrophobic Organic Compounds: A Review.” *Journal of Environmental Management* 90 (1) : 95–100.

Lang S, Wullbrandt D, (1999). Rhamnoselipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 : 22-32.

Lecomte P, (1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier, TEC & DOC. p.198.

Luna Juliana M, Raquel D, Rufino, Leonie A, Sarubbo, Galba Maria Campos Takaki, (2013). “Characterisation, Surface Properties and Biological Activity of a Biosurfactant Produced from Industrial Waste by *Candida Sphaerica* UCP0995 for Application in the Petroleum Industry.” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102: 202–209.

M

Maier R, Pepper M. I. L, Gerba C. P (2009). *Environmental Microbiology*, 2nd Edition, p.598.

Morgan P, Waykinson R.J, (1989). Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol* 8:305- 3

Morikawa M, Daido H, Takao T, Satoru M, Shimonishi Y, Imanaka T, (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, vol, 175, p : 6459-6466.

N

Neef J.M, (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, source, fate and biological effect, applied science, Essex, England, 262.

Neu T.R, (1996). “Significance of Bacterial Surface-active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces.” *Microbiological Reviews* 60 (1): 151–166.

P

Pelmont J, (1995). Bactéries et environnement-adaptation biologique, Tome 1. OPU. p. 875.

Prince R.C, (2005). The microbiology of marine oils spill bioremediation. *Petroleum microbiology*: 317-336.

R

Rifat Z.A, Nuzhat A, (2014). Effect of yeast extract on fluoranthene degradation and aromatic ring dioxygenase expressing bacterial community structure of a fluoranthene degrading bacterial consortium.

Références

Ron E.Z, Rosenberg E, (2002). Biosurfactants and oilremediation. Current Opinion in Biotechnology, 3 : 249-252.

Rodrigues L. R, Teixeira J.A, Henny C, van, (2006). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 49 :78-85.

S

Sauret C, (2011). Ecologies des communautés bactériennes marines soumises a une pollution pétrolière Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de doctorat de l'université pierre et marie curie, Spécialité Microbiologie environnementale Ecole Doctorale Sciences de l'Environnement d'Ile de France. p.129.

Scow K.M, (2003).Rate of biodegradation, Hand book of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, New York.

Soltani M, (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique, p.284.

Sifour M, Majid H, Al-Jilawi, Ghazi M, Aziz, (2007). Emulsification Properties of Biosurfactant Produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10: 1331-1335.

Singh P, Cameotra S. S, (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. Trends Biotechnol. 22 : 142.

T

Tahzibi A, Kamal F, Assadi, M. M, (2004).Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. Iranain biomedical Journal 8(1), 25-31.

Tarayre C, (2012). Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes, p.116.

Thangamani S, Shreve G. S, (1994). Effect of anionic biosurfactant on hexadecanepartitioning in multiphasesystems, Environ. Sci. Technol., 28 (12) : 1993- 2000.

V

Vandecastee J. P, (2008).PetroleumMicrobiology, Editions TECHNIP, Paris, p.816

Vandyke M.I, Coutur P, Brauer M, Lee H, Trevors J.T, (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removinghydrophobic compounds fromsoil, Can. J. Microbiol., 39 : 1071-1078.

Volkering, F. A, Breure M, Rulkens W. H, (1997). “Microbiological Aspects of Surfactant Use for BiologicalSoilRemediation.” Biodegradation 8 (6): 401–417.

Références

W

Wilcke W, (2000). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163: 229-248.

Y

Youssef N. H, Duncan K. E, Nagle D. P, Kristen N. Savage, Roy. M, Knapp, Michael. J, McInerney, (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56 :339– 347.

Annexe

Annexe1

➤ Coloration de Gram

Différentes étapes de cette coloration :

- ✓ préparer et fixer un frottis bactérien à la chaleur du bec bunsen.
- ✓ coloration par le violet de gentiane. Laisser agir 1 minute. Rincer à l'eau
- ✓ Ajouter du lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20secondes. Rincer à l'eau.
- ✓ On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
- ✓ Décoloration de l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame, et surveiller la décoloration (5à10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous filet d'eau.
- ✓ Recoloration à la fuchsine. Laisse agir de 30secondes à 1 minute. Rinçage à l'eau puis séchage.
- ✓ Observer avec une goutte d'huile à immersion, objectif 100(grossissement x100). Les bactéries à Gram positif se colorent en violet alors que les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

➤ Préparation de la solution d'HCl à 1N et à 6N

Les solutions servent pour l'ajustement du pH du milieu de culture et l'acidification pour les méthodes d'extraction par précipitation acide respectivement.

Pour mesurer le volume exact d'HCl, il faut faire un petit calcul suivant une simple règle de 3 : $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$$V_2 = \frac{0.1 \times 6}{12} \quad (\text{Même chose pour la 1N})$$

6 est remplacé par 1

$$0.1 = 100 \text{ mL}$$

$$6 = 6N$$

$$12 = \text{concentration d'HCl}$$

Dans un 1 er temps, et dans une fiole de 100 mL

- Verser environ 20 mL d'eau distillée

- Mesurer avec précision le volume exact d'HCl qui est égale à 50 mL pour la solution à 6N et à 8.3mL pour la solution à 1N
- Rajouter attentivement et petite à petite le volume d'HCL tout en agitant

Ensuite, le volume d'eau est complété jusqu'au trait de jauge l'opération s'effectue de préférence sous hôte pour éviter toute sorte d'accidents et les vapeurs d'HCl néfastes.

➤ **Préparation d'une solution NaCl saturée**

Dans un bécher, et sous agitation grâce à un agitateur + plaque chauffante

- Verser un volume d'eau distillée
- Rajouter des petites quantités du Na Cl tout en agitant, la poudre se solubilise dans l'eau et une fois le Na Cl se précipite et ne se solubilise pas c'est-à-dire la solution est saturée.

**Titre : Etude de la production de biosurfactants par des bactéries
hydrocarbonoclastes.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des
Microorganismes

Les surfactants sont des agents à activité de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactant). Ces molécules sont principalement produites par des micro-organismes qui se développent de manière aérobie dans un milieu contaminé contenant une ou plusieurs sources de carbone.

Les biosurfactants constituent une classe de molécules biologiques ayant divers intérêts dans plusieurs domaines, allant de l'industrie agro-alimentaire, chimique, cosmétique, pharmaceutique...etc, à l'application dans des domaines plus critiques ; biomédicale et thérapeutique.

L'objectif de notre travail est la production et la caractérisation de biosurfactants en utilisant des bactéries pures issues de deux régions différentes : Nord et Sud Algérien.

Pour cela, une fermentation sur milieu MSM additionné de 4% d'huile végétal comme source de carbone a été réalisée et incubée durant une semaine à 30°C et 180 rpm.

Plusieurs paramètres ont fait l'objet d'un suivi régulier à savoir : le pH, la densité optique (DO) et test de déplacement d'huile (DDH) ce qui nous permis de comparer les souches par rapport à leur capacité de production de biosurfactant.

Les biosurfactants sont extraites par deux méthodes d'extraction : extraction par précipitation et par solvants organiques. Le rendement pour les deux méthodes d'extraction n'était pas le même. Les extraits obtenus ont montré une activité antimicrobienne variable vis-à-vis deux souches testées : *Bacillus sp* et *Enterobacter sp*.

Mots clés : biosurfactant, fermentation, extraction, diamètre de déplacement d'huile, activité antimicrobienne

Laboratoire de recherche : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. BENHIZIA Yacine	Professeur. U.F.M. Constantine
Rapporteur : M ^{me} . GUERGOURI Ibtissem	M.A.A. U.F.M. Constantine
Examineur : M ^{me} BOUZERAIB Latifa	M.A.A.. U.F.M. Constantine

Date de soutenance : 14/06/2018