

**RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE OFFICE NATIONAL DES ŒUVRES UNIVERSITAIRES**  
**UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI-OUZOU**  
**FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES AGRONOMIQUES**  
**DÉPARTEMENT DE BMC**



**Mémoire de fin d'études**

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de master

**Spécialité : Biotechnologie Microbienne**

Thème

**Cinétique de production de biosurfactant(s) par une souche de  
*Pseudomonas* cultivée sur milieux empiriques et évaluation de  
deux effets : antimicrobien et stimulateur de croissance**

**Présenté par :**

**Melle MOUFFOK Samia**

**Melle KABOUCHE Fatma**

**Soutenu publiquement le : 25/09/2016.**

Devant le jury :

**Président : Mr OUELHADJ A.**

**Encadreur : Mr TAZDAIT D.**

**Co-Encadreur : Mme TAZDAIT R.**

**Examineur : Mme HELLAL Z.**

**Maitre de conférences A à l'UMMTO**

**Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Maitre assistante A à l'UMMTO**

**Année universitaire : 2015/2016**

## *Remerciements*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à Mr TAZDAIT D. : Maître de conférences B à l'UMMTO et Mme TAZDAIT R. : Maître de conférences B à l'UMMTO pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, leurs disponibilités, et leurs conseils qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre très grande considération et notre vive reconnaissance à Mr OUELHADJ A. : Maître de conférences A à l'UMMTO pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme HELLAÏ Z. : Maître assistante A à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et d'être parmi le jury. Un grand merci à nos familles respectives pour leur soutien et leur affection sans retenue au cours de nos longues années d'études.*

*Sans oublier l'ensemble de nos camarades et amis(es), ainsi qu'à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.*

## *Dédicace*

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.*

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.*

*A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ni sacrifices, ni privation ne l'ont empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants*

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

*A mon frère Hakim et ma sœur Feriel qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager*

*A mon grand père qui était toujours présent et compréhensif  
Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements*

*A ma grande famille, grands et petits.*

*A tout mes amis (es) et collègues de la promotion.*

*Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.*

*Samia*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail premièrement à mes chers parents qu'ils trouvent  
ici toute ma gratitude pour leur aide précieuse et leur soutien tout le  
long de mes études.*

*A :*

*Mon très cher frère et sœurs qui m'ont toujours  
Encouragé à aller de l'avant*

*Mon cher mari en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.  
Ma belle famille*

*Toute ma famille  
Grand et petit*

*Tous mes amis (es) et camarades de la promotion  
2015-2016.*

*Fatma*

# Sommaire

---

Liste des abréviations

Index des tableaux

Index des figures

Introduction générale..... 1

## **Etude bibliographique**

### **Chapitre I : Les Biosurfactants.**

I.1. Définition du surfactant microbien ou biosurfactant ..... 2

I.2. Classification des biosurfactants ..... 3

I.2.1 Classification selon le poids moléculaire ..... 3

I.2.2. Classification selon la structure chimique ..... 4

I.3. Propriétés physico-chimique des biosurfactants ..... 6

I.3.1 Caractéristiques physiques des biosurfactants..... 6

I.3.1.1. Diminution de la tension superficielle ..... 6

I.3.1.2. Concentration micellaire critique (CMC) ..... 6

I.3.2. Modification de la structure des systèmes diphasique ..... 7

I.3.2.1. Emulsification..... 7

I.3.2.2. Balance hydrophile- lipophile..... 7

I.4 Mode d'action ..... 8

I.4.1. Mobilisation ..... 8

I.4.2. Solubilisation ..... 8

I.5. Toxicité et biodégradabilité ..... 9

I.6. Potentiels des biosurfactants (avantages)..... 9

I.7. Application des biosurfactants ..... 10

# Sommaire

---

## **Chapitre II : Micro-organismes producteurs de biosurfactants**

II.1. Production des biosurfactants .....	13
II.2. Micro-organismes producteurs .....	13
II.3. Biosynthèse de biosurfactant .....	15
II.3.1. Les glycolipides .....	15
II.3.2. Les lipopeptides .....	22
II.3.3. Les phospholipides.....	24
II.4. paramètres influençant la production.....	25

## **Chapitres III : Généralités sur les méthodes d'extraction et identification des biosurfactants.**

III.1. Méthodes d'extraction des biosurfactant du milieu de croissance .....	27
III.2. Méthodes d'identification des biosurfactants .....	28

## **Etude expérimentale**

### **Chapitre IV : matériel et méthodes**

IV.1. Matériel biologique .....	29
IV.1.1. Souche bactérienne.....	29
IV.1.2. Revivification de la souche bactérienne.....	29
IV.1.3. Les tests de vérification de la pureté de souche .....	29
IV.1.3.1. Etude macroscopique.....	30
IV.1.3.2. Etude microscopique .....	30
IV.1.3.2.1. Coloration de Gram .....	30
IV.1.3.2.2. Dénombrement .....	32

# Sommaire

---

IV.2. Milieux testés .....	32
IV.2.1.Préparation .....	32
IV.2.1.1.Milieu à base de glucose .....	33
IV.2.1.2.Milieu à base d'épluchures figues de barbaries ( <i>Opuntia-ficus indica</i> ).....	33
IV.2.1.3.Milieu à base de pattes de poulet .....	33
IV.2.1.4.Milieu à base des têtes de sardine .....	34
IV.2.1.5.Milieu à base de margine de l'huile d'olive.....	34
IV.2.2. Caractéristiques physico-chimiques des milieux de culture préparés.....	34
IV.2.2.1.Mesure de la densité apparente .....	34
IV.2.2.2.Mesure de la matière sèche .....	35
IV.2.2.3.Mesure du taux de cendre .....	36
IV.2.2.4.Dosage des protéines.....	36
IV.2.2.5.Dosage des sucres .....	36
IV.3. Etude de la cinétique de la production de biosurfactants .....	37
IV.3.1.Pré- culture .....	37
IV.3.2. Culture.....	37
IV.4. Paramètres suivis au cours de la cinétique de production de biosurfactant .....	37
IV.4.1.Mesure de la densité optique (DO) .....	37
IV.4.2.Index d'émulsification .....	37
IV.5. L'extraction du biosurfactant .....	38
IV.6. Test de la capacité nettoyante de ou des biosurfactants.....	38
IV.7. Te test du pouvoir moussant ( <i>Foaming</i> ) .....	39
IV.8. Test la gélose Sang.....	39
IV.9. Etude de l'effet anti bactérien .....	40
IV.10. Etude de l'effet sur la croissance des lentilles ( <i>Lens culinaris</i> ) .....	41

# Sommaire

---

## Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Résultats des tests de vérification de la pureté de la souche .....	42
V.1.1. Etude macroscopique .....	42
V.1.2. Etude microscopique.....	42
V.2. Résultats de la caractérisation physico-chimique.....	44
V.2.1. Résultats de mesure de la densité apparente.....	44
V.2.2.Résultats du taux de matière sèche et de cendre .....	44
V.2.3.Résultats du dosage des protéines pour les milieux de culture .....	45
V.2.4. Dosage des sucres totaux pour les différents milieux de cultures préparés .....	45
V.3. Cinétique de croissance et production de biosurfactants sur les différents milieux.....	46
V.4. Extraction du biosurfactant .....	52
V.5. Test de capacité de nettoyage du ou des biosurfactant(s) produit(s).....	56
V.6. Le test du pouvoir moussant ( <i>foaming</i> ) .....	57
V.7. Test de gélose au sang .....	58
V.9. Etude de l'effet anti bactérien.....	59
V.10. Etude de l'effet sur la croissance des lentilles ( <i>Lens culinaris</i> ) .....	63
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>66</b>

### Références bibliographiques

### Annexes.

### Résumé.

# Liste des abréviations

---

**BN** : Bouillon Nutritif

**BHIB** : Bouillon cœur-cervelle

**BSA** : Sérum Albumine

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CMC** : Concentration Micellaire Critique

**DNS** : Acide 3,5- dinitrosalicylique

**DO** : Densité Optique

**E24** : Index d'émulsification

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**HLB** : Balance Hydrophile Lipophile

**IR** : Infra rouge

**MH** : Mueller-Hinton

**MS** : Spectrométrie de masse

**NAPL** : *Non Aqueous Phase Liquids*

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**SDS** : sodium dodecyl sulfate

**UFC** : Unités Formatrices de colonies

**UV** : Lumière ultra-violette

**UV-VIS** : Lumière ultra-violette et visible

## Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
<b>Tableau I</b>	Les sources microbiennes et les principaux types de biosurfactants produits.	5
<b>Tableau II</b>	Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne.	12
<b>Tableau III</b>	Les antibiotiques possédant des activités de surface.	24
<b>Tableau IV</b>	Les souches bactériennes utilisées	40
<b>Tableau V</b>	Résultats de la mesure de la densité apparente.	44
<b>Tableau VI</b>	Résultats du taux de matière sèche et des cendres.	44
<b>Tableau VII</b>	Résultats du dosage des protéines des différents milieux.	45
<b>Tableau VIII</b>	Résultats du dosage des sucres réducteurs des différents milieux.	46
<b>Tableau IX</b>	La concentration de biosurfactant produit.	52
<b>Tableau X</b>	Quotients C/N des différents milieux de culture.	54
<b>Tableau XI</b>	Résultats du test de capacité de nettoyage du biosurfactant produit	56
<b>Tableau XII</b>	Résultats du test du <i>foaming</i> .	57
<b>Tableau XIII</b>	Activité anti microbienne des biosurfactants produit sur certaines souches bactériennes.	59
<b>Tableau XIV</b>	Résultats des mesures de la hauteur des plantes pour le test de croissance.	63

## Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
<b>Figure 1</b>	Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces.	3
<b>Figure 2</b>	Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant.	7
<b>Figure 3</b>	Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel.	11
<b>Figure 4</b>	Les structures des cinq majeurs de diglycosyl diglycerides isolés chez les bactéries Gram positif.	17
<b>Figure 5</b>	Les structures des rhamnolipides R1 ; R2 ; R3 ; R4 ; RA et RB produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	18
<b>Figure 6</b>	Structure de glucose-lipide synthétisé par <i>Serratia rubideae</i> .	19
<b>Figure 7</b>	Structure des tréhalose-lipides produits par <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM43215 et <i>Arthrobacter</i> sp. EKI (a) et par <i>R.erythropolis</i> SD-74 (b).	20
<b>Figure 8</b>	Structure de sophorolipides produit par <i>Candida bombicola</i> ATCC22214.	21
<b>Figure 9</b>	Structure de mannosyl erythriol lipide produit par <i>candida Antarctica</i> T-34.	22
<b>Figure 10</b>	Préparation du frottis.	30
<b>Figure 11</b>	Une lame montrant la coloration de Gram.	31
<b>Figure 12</b>	Couppelles contenant la matière fraîche.	35
<b>Figure 13</b>	Gélose au sangensemencé avec une culture bactérienne.	40
<b>Figure 14</b>	Aspect macroscopique de la souche étudiée.	42
<b>Figure 15</b>	Aspect microscopique de la souche étudiée après coloration de Gram (GX1000).	43

<b>Figure 16</b>	Cinétique de la croissance bactérienne et de la production de biosurfactant dans les différents milieux de culture préparés.	46
<b>Figure 17</b>	Pré-culture huile (formation de deux phases huile + eau).	49
<b>Figure 18</b>	Observation de l'émulsion du E <sub>24</sub> pour le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie au microscope optique au grossissement x1000.	50
<b>Figure 19</b>	Observation de l'émulsion du E <sub>24</sub> pour le milieu à base du glucose au microscope optique au grossissement x1000.	50
<b>Figure 20</b>	Observation de l'émulsion du E <sub>24</sub> pour le milieu à base de pattes de poulet au microscope optique au grossissement x1000.	50
<b>Figure 21</b>	Observation de l'émulsion du E <sub>24</sub> pour le milieu à base des margines d'huile d'olive au microscope optique au grossissement x1000.	51
<b>Figure 22</b>	Observation de l'émulsion du E <sub>24</sub> pour le milieu à base de têtes de sardine au microscope optique au grossissement x1000.	51
<b>Figure 23</b>	Résultats de la gélose au sang.	58
<b>Figure 24</b>	Photographies représentatives des résultats de test de croissance pour les lentilles.	64

# *Introduction*

Les surfactants d'origine microbienne font l'objet de nombreuses études, l'attention portée aux problèmes d'environnement les faisant bénéficier d'un intérêt croissant. Les surfactants sont des molécules qui possèdent une partie hydrophile qui peut être non ionique (oxydes), cationique (sels d'ammonium), anionique (sulfates), amphotère et une partie hydrophobe. Le surfactant va se trouver à l'interface de phases ayant des degrés de polarité différents, comme dans le cas des mélanges eau-huile ou air-eau. La formation d'un film moléculaire ordonné abaisse l'énergie interfaciale et est responsable des propriétés particulières des surfactants. Beaucoup de molécules biologiques possèdent ce caractère amphiphile. Les composés microbiens qui possèdent de telles propriétés sont dénommés biosurfactants.

En termes d'abaissement de tension interfaciale, de la tension de surface, de la stabilité thermique et chimique (pH), beaucoup de biosurfactants sont comparables aux surfactants synthétiques. Les biosurfactants incluent un grand nombre de structures chimiques, comme les glycolipides, les lipopeptides, les complexes polysaccharides, les protéines, les phospholipides et les acides gras. La structure la plus commune est celle des glycolipides. Les bactéries les plus utilisées dans la production de biosurfactants sont *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Torulopsis*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Serratia* et *Corynebacterium*. La source de carbone peut être un alcane, du glucose, du glycérol, etc. Le choix de la source de carbone joue un rôle important sur le rendement et la structure du biosurfactant.

Comme dans toutes les fermentations, le but recherché est d'augmenter le rendement en biosurfactant à partir de la source de carbone. Les biosurfactants constituent un domaine de recherche en voie d'émergence. Il apparaît en effet que les biosurfactants ont des domaines d'application potentiels variés tels que les industries pétrolières, chimiques, agroalimentaires, la pharmacie, la cosmétologie, etc. Pour des raisons technico-économiques, les biosurfactants ne sont pas encore utilisés de manière intensive, cependant cela est en train de changer car la protection de l'environnement est devenue un critère de choix pour la sélection des produits. Contrairement aux surfactants de synthèse, ceux obtenus par voie microbienne sont facilement biodégradables et sont donc particulièrement adaptés pour la biodépollution.

L'objectif principal de cette étude est d'optimiser la production de biosurfactant(s) par la souche *Pseudomonas* sp. en utilisant des milieux de cultures empiriques préparé à base de déchets végétaux (épluchures de figues de barbarie et margines d'huile d'olive) ainsi que des déchets animaux (têtes de sardine et pattes de poulet) comme source de carbone.

*Etude  
bibliographique*

## **Chapitre I : Les Biosurfactants**

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains micro-organismes. Leur nature tout comme leur pouvoir tensioactif est fortement dépendants du type de micro-organisme utilisé (bactérie, levure, champignon), de la souche testée ainsi que du substrat nutritif disponible pour leur développement cellulaire.

Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve aujourd'hui des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lypopolysaccharides. Tous comme leur analogue de synthèse chimique, ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes. Certaines de ces propriétés peuvent, de plus, être conservées dans des conditions extrêmes telles que pH acides, température élevée, etc.

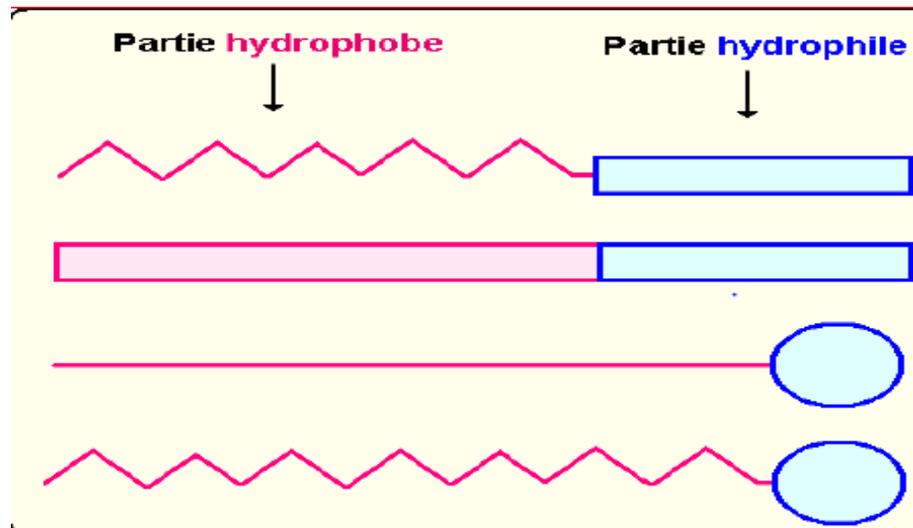
Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, ils sont toujours utilisés dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie ou encore la cosmétologie et devraient rapidement trouver leur place dans de nouveaux secteurs d'applications tels que les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques ou encore le domaine médicale (Herry et Bellon-Fontaine, 2001).

### **I.1. Définition du surfactant microbien ou biosurfactant**

Les surfactants (**SURF**ace **ACT**ive **AgeNTS**) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al-Arajil *et al.*, 2007).

Le surfactant microbien ou biosurfactant est un agent de surface ou tensioactif ayant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, susceptible d'être produit par une grande variété de micro-organismes. Cette synthèse est le résultat d'une bioconversion effectuée par une souche microbienne à partir d'un substrat hydrocarbonaté ou carbohydraté (Mimouni, 1995).

L'intérêt de l'utilisation des biosurfactants vient de leurs propriétés interfaciales qui sont une conséquence de leur structure moléculaire (pôle hydrophile et lipophile) (**Figure 1**) et qui leur confère un pouvoir émulsifiant (Banat *et al.*, 1991).



**Figure 1 : Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces (Larpent, 1995).**

## **I.2. Classification des biosurfactants**

Les biosurfactants sont classés selon leur poids moléculaire et leur structure chimique (Rosenberg et Ron, 1999).

### **I.2.1. Classification selon le poids moléculaire**

D'après Rosenberg et Ron (1999) on distingue deux types de biosurfactants :

- Les biosurfactants à poids moléculaire élevé
  - Les lipoprotéines
  - Les acides gras complexes

- Les biosurfactants à poids moléculaire bas
  - Les glycolipides
  - Les lipides neutres
  - Les lipoprotéines

### **I.2.2. Classification selon la structure chimique**

D'après la structure chimique, on distingue les biosurfactants suivants : les glycolipides, les lipopolysaccharides, les lipoamino-acide, les lipopeptides, les complexes protéine-polysaccharidiques, les phospholipides, les acides gras et les lipides neutres (Georgiou *et al.*, 1992 ; Wagner et Lang, 1996).

D'après Lang et Wullbrandt (1996) ces différentes structures sont arrangées en quatre classes principales de biosurfactants :

1. Les glycolipides
2. Les lipopeptides
3. Les polymères : les lipoprotéines et les lipopolysaccharides
4. Les phospholipides, les monoglycérides, les diglycérides et les acides gras.

- Selon plusieurs auteurs (Kosaric *et al.*, 1983 ; Rosenberg *et al.*, 1993 ; Desai *et al.*, 1997 ; Prommachan, 2002 ; Al-Arajil *et al.*, 2007 ; Mulligan, 2009) les classes majeures de biosurfactants sont différenciées essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne (**Tableau I**).

**Tableau I : Les sources microbiennes et les principaux types de biosurfactants produits  
(Desai *et al.*, 1997)**

<b>Biosurfactant</b>	<b>Organisme</b>	<b>Référence(s)</b>
<b>Glycolipides :</b> Rhamnolipides  Trehalolipides  Sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.  <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i> <i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>	Guerra-Santos L. <i>et al.</i> , 1984, Robert M. <i>et al.</i> , 1989 Hisatsuka K. <i>et al.</i> , 1972, Lang S. <i>et al.</i> 1987, Parra J. <i>et al.</i> 1989 Rapp P. <i>et al.</i> , 1979 Margaritis A. <i>et al.</i> , 1979,1980, Cooper D.G. <i>et al.</i> , 1989 Cooper D.G. <i>et al.</i> , 1989, Gobbert U. <i>et al.</i> ,1984 Hommel R. <i>et al.</i> , 1987, Tulloch P. <i>et al.</i> , 1967 Cooper D. G. <i>et al.</i> , 1983 Boothroyd, B. <i>et al.</i> , 1956,Syldack, C. 1985
<b>Lipopeptides et lipoprotéines :</b> Peptides-lipides Serrawettine Viscosine Surfactine Subtilisine Gramicidines Polymyxines	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>P. fluorescens</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. brevis</i> <i>B. polymyxa</i>	Javaheri, M. <i>et al.</i> , 1985, Yakimov, M. <i>et al.</i> , 1996 Matsuyama, T. <i>et al.</i> ,1991 Neu, T. <i>et al.</i> , 1990 Arima, K. <i>et al.</i> , 1968, Bernheimer, A. W. <i>et al.</i> , 1970 Bernheimer, A. W. <i>et al.</i> , 1970 Marahiel, M. <i>et al.</i> , 1977 Suzuki, T. <i>et al.</i> , 1965
<b>Acide gras, lipides neutres et phospholipides :</b> Acide gras  lipides neutre phospholipides	<i>Candida lepus</i>  <i>N. erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Cooper D.G. <i>et al.</i> , 1989, Cooper D.G. <i>et al.</i> , 1978 MacDonald, C. R. <i>et al.</i> , 1981 Beeba, J. L. <i>et al.</i> , 1971
<b>Surfactants polymériques :</b> Emulsane Biodispersane Mannane-lipide-proteine Liposane Hydrates de carbone-proteine-lipide Proteine PA	<i>Acinéto bacter calcoaceti</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>C. lipolytica</i> <i>P. fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorp</i> <i>P. aeruginosa</i>	Rosenberg, E. <i>et al.</i> , 1979, Zosim, Z., 1982 Rosenberg, E. <i>et al.</i> , 1988 Kappeli, O. <i>et al.</i> , 1984 Cirigliano, M. C. <i>et al.</i> , 1984, 1985 Desai, A. J. <i>et al.</i> , 1988, Persson, A. <i>et al.</i> , 1988 Singh, M. <i>et al.</i> , 1989 Hisatsuka, K. <i>et al.</i> , 1972, 1977
<b>Biosurfactants particuliers</b> Vesicles et fimbriae La cellule entière	<i>A. calcoaceticus</i> variété de bactéries	Gutnick, D. L. <i>et al.</i> , 1987, Kappeli, O. <i>et al.</i> , 1979 Fattom, A. <i>et al.</i> , 1985, Roggiani, M. <i>et al.</i> , 1993

### **I.3. Propriétés physico-chimique des biosurfactants**

D'après Larpent (1995), les biosurfactants sont des molécules amphiphiles ayant deux parties fonctionnelles :

- une partie lipophile, non polarisée (soluble dans les solutions apolaires).
- une partie hydrophile, polarisée (soluble dans les solutions aqueuses).

Cette structure confère aux molécules de biosurfactants un certain nombre de propriétés physico-chimiques particulières (Marcou, 1989 ; Larpent, 1995).

#### **I.3.1. Caractéristiques physiques des biosurfactants**

##### **I.3.1.1. Diminution des tensions de surface**

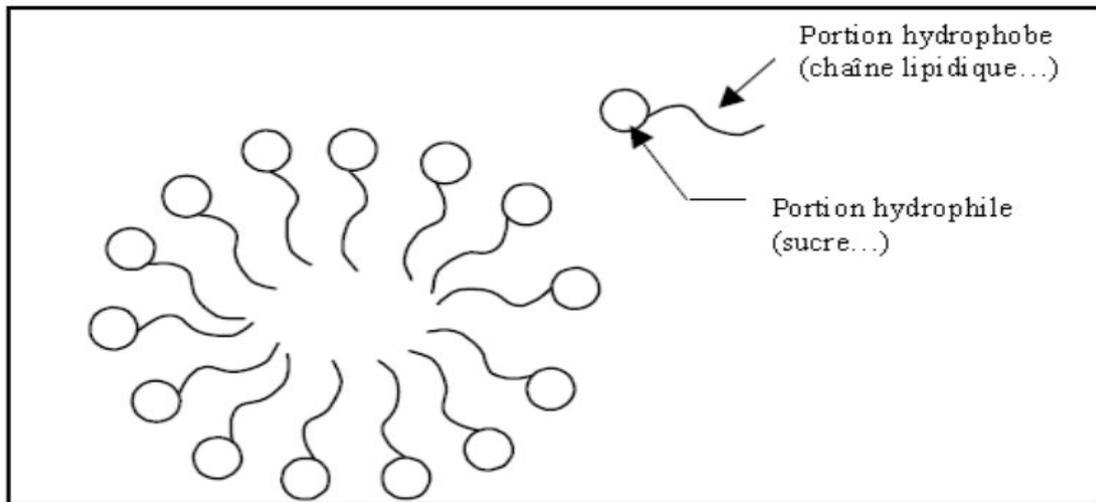
Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau même dans les solutions très diluées. Ceci apparait dans l'exemple suivant : la tension superficielle de l'eau pure est de 72,80 mN / m (Laurila, 1985).

##### **I.3.1.2. Concentration micellaire critique (CMC)**

La concentration critique micellaire (CCM) est par définition la concentration d'un agent de surface (biosurfactant) au dessus de laquelle, une partie des molécules dispersées au sein de la solution aqueuse se rassemblent sous forme de micelle (Pore, 1992).

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles (Haigh, 1996).

En effet, dans les micelles les parties hydrophobes se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure 2**).



**Figure 2 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactant (Gabet, 2004).**

### **I.3.2. Modification des structures des systèmes diphasiques**

Une émulsion consiste en la dispersion d'un liquide dans un autre sous forme de gouttelettes microscopique de 0,1 à 100 nm de diamètre. De façon générale, plus le diamètre est petit plus l'émulsion est stable, selon les types de phases dispersées, on distingue les émulsions eau dans l'huile (E/H) et huile dans l'eau (H/E), l'huile désigne ici la phase non aqueuse (Zajic et Seffens, 1984).

#### **I.3.2.1. Emulsification**

La dispersion d'un liquide dans un autre n'est jamais complètement stable. Pour préparer une émulsion stable, on peut ajouter un troisième composant qui aura des propriétés distinctes, tout d'abord la formation de gouttelettes, puis une fois formées leur stabilisation (Zajic et Seffens, 1984).

#### **I.3.2.2. Balance hydrophile-lipophile**

Le type d'émulsion (eau dans l'huile ou l'huile dans l'eau) que l'émulsifiant peut améliorer, est indiqué par son affinité pour l'huile et l'eau, quantifiée par une valeur appelée la balance hydrophile-lipophile ou HLB. Cette dernière est définie comme étant le rapport entre 20 fois la masse moléculaire de la partie hydrophile et la masse moléculaire de la molécule entière. Les biosurfactants les plus hydrophobes auront des valeurs inférieures à 7 (cas des tréhalose dimycolates), souvent comprise entre 3 et 6 (Zajic et Seffens, 1984), alors

que les plus hydrophiles comme les rhamnolipides auront un coefficient supérieur à 7 (Haferburg *et al.*, 1986) le plus souvent entre 8 et 10 (Zajic et Seffens, 1984).

#### **I.4. Modes d'action**

Les biosurfactants agissent de façons différentes : par mobilisation et par solubilisation.

##### **I.4.1. Mobilisation**

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants à diminuer les tensions interfaciales entre les NAPL (*Non Aqueous Phase Liquids*) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface du NAPL (Mc Cray *et al.*, 2001).

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions (Bai *et al.*, 1997).

##### **I.4.2. Solubilisation**

La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes (Gabet, 2004).

Généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effet sur la plupart des hydrocarbures (Pennell *et al.*, 1993).

Au-dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des hydrocarbures dans les micelles apparaît, permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente (Gabet, 2004).

Ainsi, pour que les micelles se forment il faut ajouter suffisamment de biosurfactant pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC réelle. La sorption dépend donc

de la concentration de biosurfactant en solution (Van Dyke *et al.*, 1993). Bai *et al.* (1998) indiquent qu'à de forte concentration, la solubilisation est le mécanisme principal.

### **I.5. Toxicité et biodégradabilité**

Des tests de toxicité réalisés par Haba *et al.* (2003) ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

Une étude réalisée par Deschenes *et al.* (1996) indique que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations. De plus, ces auteurs indiquent que ce biosurfactant était biodégradable.

D'après Tabka (2015) les biosurfactants sont biodégradables (100%), non toxiques, biocompatibles, d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques et agroalimentaires.

### **I.6. Potentiels des biosurfactants (avantages)**

Les biosurfactants peuvent être aussi efficaces et plus avantageux que les surfactants synthétiques. Ils sont hautement spécifiques, biodégradables, biocompatibles avec l'environnement (Mulligan, 2009), moins sensibles aux biotopes de températures, pH et salinité extrêmes (Suwansukho *et al.*, 2008), moins toxiques et peuvent être synthétisés en grandes quantités sur des sources d'énergie 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).

Ces biomolécules présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines (Prommachan, 2002). Cependant, il n'est

pas facile de rationaliser la différence entre leurs rôles naturels et nos applications (Cameotra *et al.*, 2009 ; Hamme *et al.*, 2006 ; Marqués *et al.*, 2009).

Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et leur auto-assemblage en micelles ou autres nanostructures est cruciale pour plusieurs processus industriels tels que la formation de couches, la diffusion, la formation de mousse, la détergence, la catalyse micellaire, etc. (Xiaoyang *et al.*, 2009).

Ces biomolécules peuvent aussi induire la séparation de phases, la solubilisation, la réduction de viscosité (Ochsner *et al.*, 1995), la floculation, l'agrégation, la désorption (Karanth *et al.*, 1999) ainsi que la stabilisation et la déstabilisation d'émulsions (Huang *et al.*, 2010). Des caractéristiques techniques excellentes tel que la formation d'émulsion (50-100%), l'abaissement de la tension interfaciale (~ 0,1 dyne/cm), abaissement de la tension superficielle (~27 dyne/cm), pouvoir moussant (mousse stable (15min)), pouvoir mouillant, CMC (20-2000 mg/l) et pouvoir antibiotique ou fongicide (Tabka, 2015)

### **I.7. Application 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 (**Figure 3**).

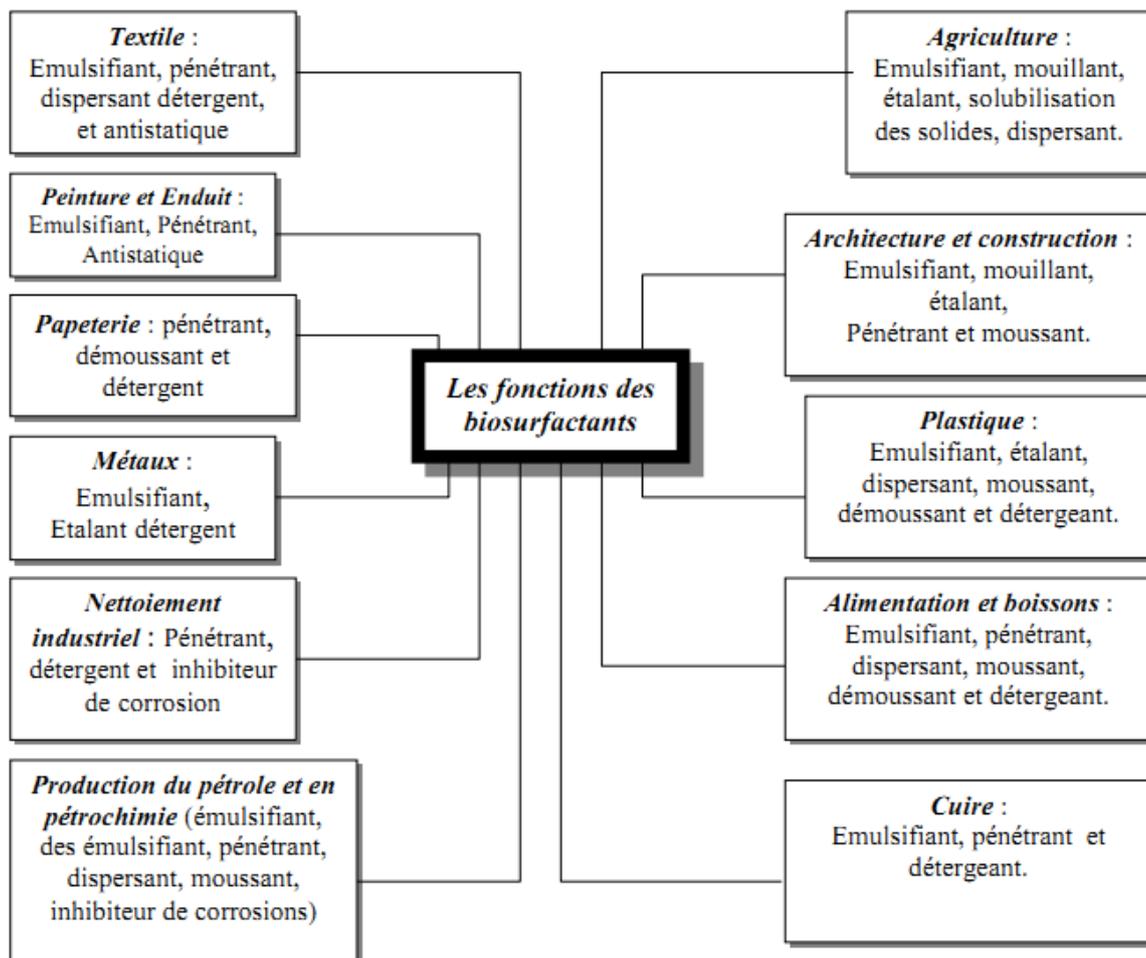


Figure 3 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel (Khemili, 2008).

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

- La bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds (**Tableau II**), (Raza *et al.*, 2007) et dans le traitement des eaux usées (Samadi *et al.*, 2007).

**Tableau II : Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne (Mulligan, 2009).**

<b>Composés éliminés par voie bactérienne</b>	<b>Références bibliographiques</b>
<b>Composés organiques</b>	
Phénanthrène	H. Yin <i>et al.</i> , 2008
Styrène	Y. Guo <i>et al.</i> , 2006
Polychlorobiphényle	Occulti <i>et al.</i> , 2008
Pétrole Brut (Heavy, Light)	Vasefy <i>et al.</i> , 2008, Mehdi <i>et al.</i> , 2008
Gaz-Oil	Li <i>et al.</i> , 2006
Diesel	L.-M. Whang <i>et al.</i> , 2008
4-Chlorophenol (4-CP)	A. Uysal <i>et al.</i> , 2007
Perchloroéthylène (PCE)	J.S. Clifford <i>et al.</i> , 2007
<b>Métaux lourds</b>	
Cadmium	Juwarkar <i>et al.</i> , 2007, Asci <i>et al.</i> , 2007
Plomb	Juwarkar <i>et al.</i> , 2007, J. Kim <i>et al.</i> , 2006
Zinc	B. Dahrazma <i>et al.</i> , 2007, Asci <i>et al.</i> , 2007
Copper, et Nickel	B. Dahrazma <i>et al.</i> , 2007, W.-J. Chen <i>et al.</i> , 2008
Chromium hexavalent	
Arsenic	H. Massara <i>et al.</i> , 2007
Phénanthrène mélangé au Cadmium	Wang and <i>et al.</i> , 2009 S. Song <i>et al.</i> , 2008

- L'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupération transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole (Banat, 1995 ; Meylheuc *et al.*, 2001 ; Cedou, 2013).
- L'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation des zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) (Hultberg *et al.*, 2008).
- L'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie (Prommachan, 2002).
- L'industrie du cosmétique (Suwansukho *et al.*, 2008 ; Tabka, 2015) et dans les procédés de teinture du textile (Savarino *et al.*, 2009 ; Kilic, 2013).
- L'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses (Rodrigues *et al.*, 2006).
- Le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique (Marqués *et al.*, 2009) ainsi que dans les nanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO, etc. (Mulligan, 2009).

## **Chapitre II : Micro-organismes producteurs de biosurfactants**

### **II. 1. Production des biosurfactants**

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, Makkar et Cameotra (2002) indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagés, etc.). Une étude réalisée par Mercade et Manresa (1994) rapporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g/L pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

### **II. 2. Microorganismes producteurs**

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

Le principal rôle physiologique du biosurfactant 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 (Fieshter, 1992 ; Mata-Sandoval *et al.*, 2000).

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

(2001) indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

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 les bactéries les plus étudiées (Banat *et al.*, 2000). La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel de glycosyl catalysée par des transférases rhamnosyl spécifiques : il y a intervention de donneurs rhamnosyl, les TPD transférases. Deux transférases différentes permettent la formation de quatre rhamnolipides différents (Koch *et al.*, 1991). Les molécules de biosurfactants sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (Thangamani et Shreve, 1994).

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciales, ainsi que des polymères de masse molaire élevée, qui se lient fortement aux surfaces (Ron et Rosenberg, 2002). Les biosurfactants de faible masse molaire sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masse molaire élevée sont constitués des polysaccharides, des protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoprotéines. Ces derniers sont moins efficaces pour réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence.

Une des techniques utilisées pour suivre la production des biosurfactants est l'ADSA-P («Axysymmetric Drop Shape Analysis by Profile») qui détermine simultanément l'angle de contact et la tension de surface de liquide grâce au profil d'une goutte restant sur une surface d'un solide. Les gouttes contenant les microorganismes producteurs sont placées sur une surface en fluoroéthylène-propylène et le profil de la goutte est déterminé.

D'autres méthodes ont été décrites comme l'hémolyse du sang, qui est une caractéristique connue de certains biosurfactants et un index d'émulsification (E-24) obtenu sur une kérosine (Banat, 1995). Le test du « drop-collapsing » est utilisé pour voir les colonies bactériennes produisant les biosurfactants : des gouttes contenant des cellules en suspension sont placées sur une surface recouverte d'huile ; si la goutte reste stable, cela démontre l'absence du tensioactif (Jain *et al.*, 1991).

### **II.3. Biosynthèse des biosurfactants :**

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insoluble dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indique une production efficiente (Pruthi *et al.*, 1995). La présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscible (Krepsky *et al.*, 2007).

Cameotra (2009) explique ce phénomène comme étant l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats hydrophobes, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau.

En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intercellulaires, extracellulaire ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu *et al.*, 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne afin de les dégrader (Al-Arajil *et al.*, 2007).

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

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et à la formation de biofilms (alasan d'*Acinobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides des *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

#### **II.3.1. Les glycolipides :**

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatique ou d'acides hydroxy aliphatique (Healy *et al.*, 1996 ; Ron et Rosenberg, 2002).

Beaucoup de bactéries tel que *Pseudomonas*, *Streptococcus* produisent des glycolipides, parmi ces derniers on distingue :

- Les rhamnose-lipides (ou rhamnolipides),
- Les glucose-lipides,
- Les tréhalose-lipides,
- Les pentasaccharide-lipides
- et mélange varié

D'après Laurila (1985), les glycolipides bactériens sont groupés selon deux catégories :

- les glycosyl-diglycerides
- et les dérivés de sucre acylés.

### **1. Les glycosyl-diglycerides**

Ce sont des composés de résidus de carbohydrates liés glycosidiquement, au niveau de la position C3 d'un 2-diglycéride, par le carbone 1 du sucre.

Dans cette catégorie, le glycosyl-diglycérides le plus commun rencontré chez les bactéries est celui du diglycosyl-diglycéride (Spencer *et al.*, 1979).

La figure 4 illustre la structure des cinq types majeurs de diglycosyl-diglycérides produits par des bactéries Gram positif (Zajic et Mahomedy, 1984).

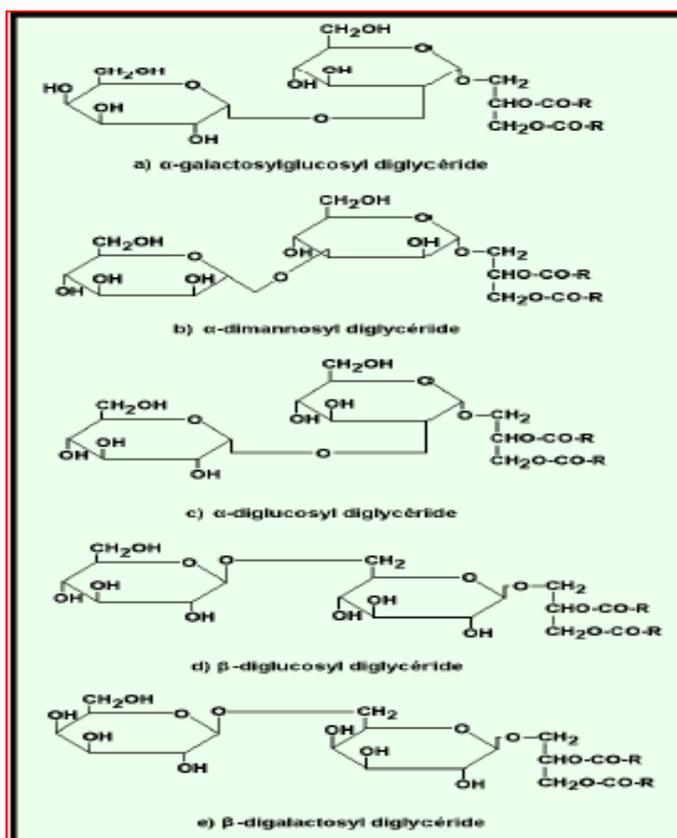


Figure 4: Les structures des cinq types majeurs de diglycosyl diglycérides isolés chez les bactéries Gram positif (Zajic et Mahomedy, 1984).

## 2. Les dérivés des sucres acylés

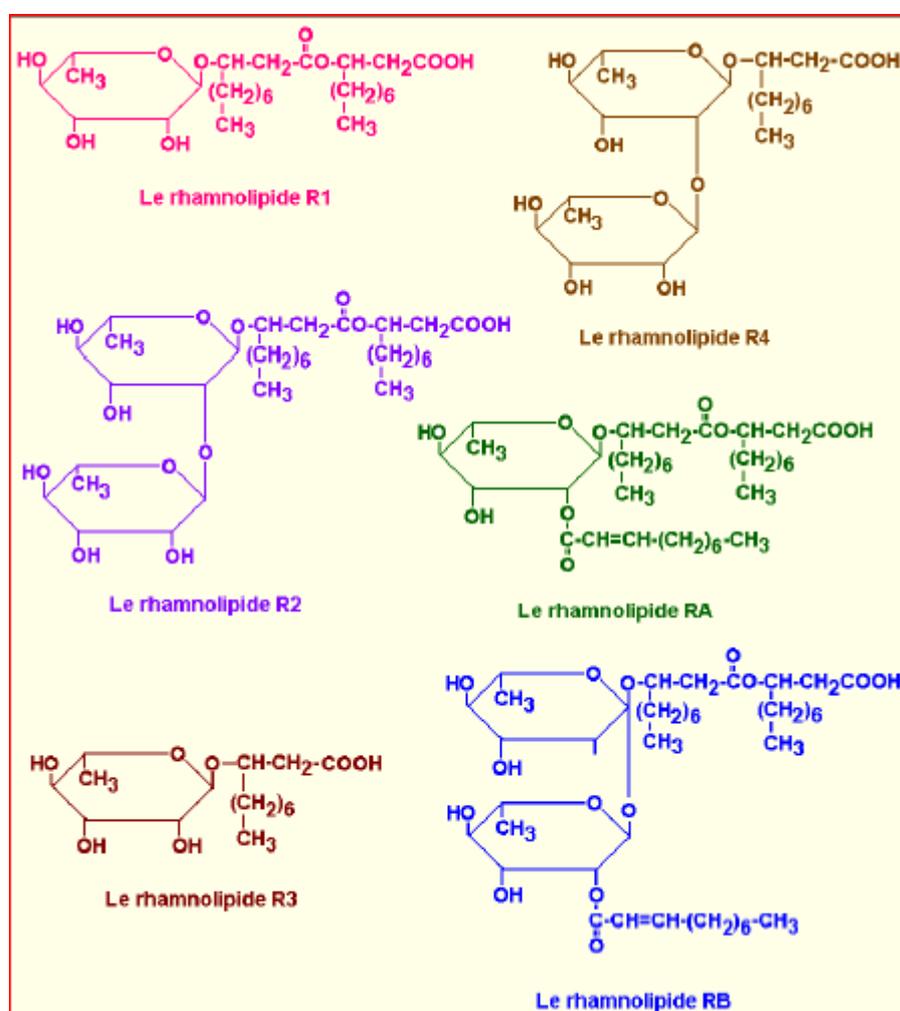
D'après Zajic et Mahomedy (1984) et Laurila (1985), les dérivés de sucre de source acylé ne contiennent pas du glycérol, mais possèdent des résidus d'acides gras attachés à un sucre. Par ailleurs, connaissant la nature du sucre glycolipide, on distinguera :

### a. Les rhamnolipides

Ce sont des glycolipides qui contiennent du rhamnose et de l'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque. Ils sont retrouvés, pour la première fois, par Bergstroim *et al.* (1946) chez *Pseudomonas pyococyanea* cultivée sur glucose. Ces auteurs étaient incapables de déterminer la structure moléculaire des deux composants. Elle a été déterminée par Jarvis et Johson (1949), qui ont mis en évidence une liaison glycosidique sur 3% du glycérol. Cependant, la liaison précise entre les deux unités du rhamnose n'était pas claire, c'est ainsi qu'Edwards et Hayashi (1965) ont démontrés une liaison 1-2 dans le premier rhamnolipide

identifié, appelé aussi R2, qui est constitué de deux molécules de rhamnose et de deux molécules d'acide B-hydroxydécanoïque. Le R2 est le produit unique de *Pseudomonas aeruginosa* S7B1 cultivée sur un substrat le n-hexadécane ou les n-paraffine (C14-C18) (Hisatsuka *et al.*, 1971).

Par ailleurs, la culture de *Pseudomonas aeruginosa*, sur d'autres substrats tels que les n-alcanes, aboutit à la production des rhamnolipides distincts : R1, R3, R4, RA et RB (Lang et Wullbrandt, 1999). Les structures des rhamnolipides analogues : R1 ; R2 ; R3 ; RA et RB sont illustrées dans la **Figure 5**.



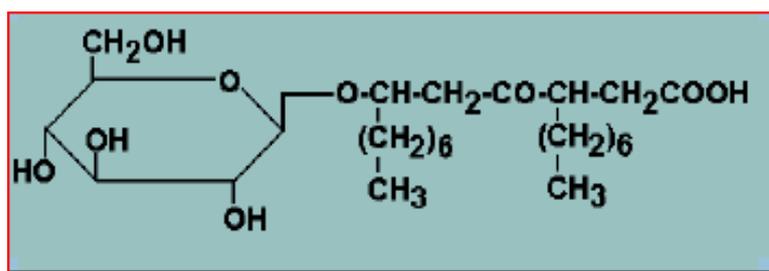
**Figure 5 : Structure des rhamnolipides R1 ; R2 ; R3 ; R4 ; RA et RB produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Lang et Wulbrandt, 1999).**

Thanamsub *et al.* (2006) ont déterminé deux types de rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir de pertes d'usine de lait (lactosérum). Ces deux biosurfactants ont été identifiés comme L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-B-hydroxydecanoyl-B-hydroxydecanoate ou Rha-Rha C10-C10 et L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-B-hydroxydecanoyl-B-hydroxydecanoate ou Rha-Rha C10-C12.

### b. Les glucoses-lipides

Un autre type de biosurfactant est synthétisé par *Serratia rubidaea* : il s'agit du glucose-lipide, obtenu après culture sur milieu à base de peptone et du glycérol.

D'après Wagner et Lang (1996), ce glucose-lipide est constitué d'un acide D-3-hydroxydécanoïque (**Figure 6**).

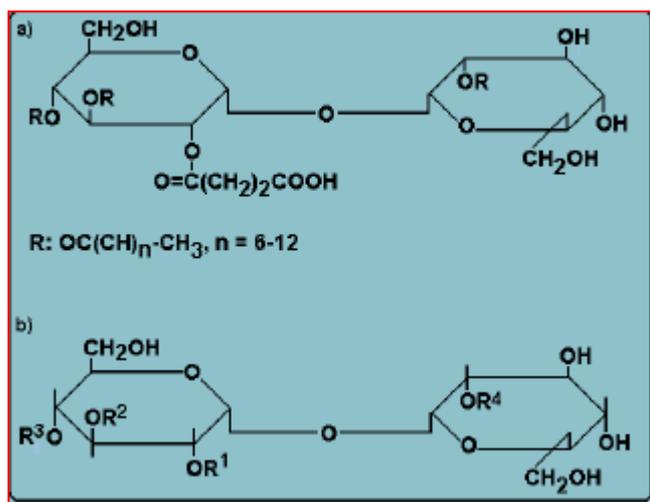


**Figure 6 : Structure de glucose-lipide synthétisé par *Serratia rubidaea* (Wagner et Lang, 1996).**

### c. Les tréhaloses-lipides

Ce sont des glycolipides composés d'un disaccharide : les tréhaloses sont communs dans les lipides extracellulaires de certaines espèces microbiennes telles que : *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Nocardia* après leur culture sur des hydrocarbures (Laurila, 1985).

Selon Wagner et Lang (1996), l' $\alpha$ -tréhalose-2-2', 3, 4-tétraester, ayant un seul résidu succinoyl et une chaîne d'acides gras au milieu de la chaîne, est connu depuis 1983. Trois souches de bactéries sont capables de le synthétiser : *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215, *Arthrobacter* sp. EKI et *Rhodococcus erythropolis* SD-74 (**Figure 7**)



**Figure 7 : Structure des tréhalose-lipides produits par *Rhodococcus erythropolis* DSM43215 et *Arthrobacter* sp. EKI (a) et par *R. erythropolis* SD-74 (b) (Wagner et Lang, 1996).**

#### d. Les pentasaccharide-lipides

D'après certains auteurs, le pentasaccharide-lipide le plus connu est celui produit par *Nocardia corynebacteroides* SMI cultivée sur les n-alcanes (Wagner et Lang, 1996).

#### e. Les mélanges variés

D'autres molécules de glycolipides sont produites par divers microorganismes. Parmi elles, on distingue : les mono/ disaccharides-corynomycolates produits par *Arthrobacter* sp. DSM 2567 (Wagner et Lang, 1996).

D'après Spencer *et al.* (1979), certaines levures produisent des glycolipides après leurs cultures. Ces derniers sont classés en deux catégories :

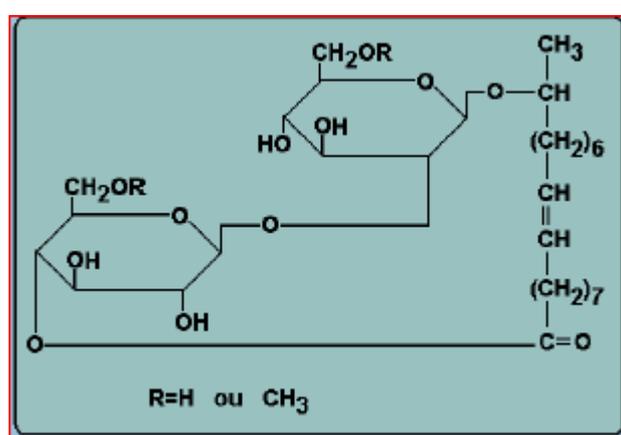
- les glycosyl d'acide gras hydroxylés,
- les esters de polyols d'acide gras.

#### 1. Les glycosyl d'acide gras hydroxylés (les sophoroses-lipides)

Les sophorolipides (ou SI) sont produits par *Candida bombicola* et *Torulopsis* après leur culture dans un milieu à base de glucose et de composés lipophiles (Wagner et Lang, 1996).

D'après ces mêmes auteurs, 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 8**).

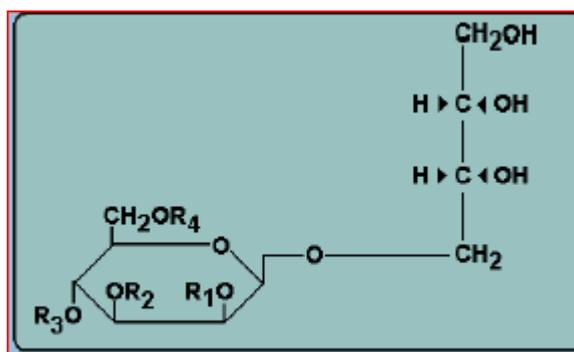
D'après Stuawer *et al.* (1987), la modification de la composition du milieu de culture par un apport d'un substrat (le n-hexadécane), conduit à la production de 0,46 g de sophorolipides constitué en majorité d'acide gras, en utilisant le levure *Candida apicola* Met 43747.



**Figure 8 : Structure de sophorolipide produit par *Candida bombicola* ATCC 22214 (Wagner et Lang, 1996).**

## 2. Les esters de polyols d'acide gras

On distingue les **monosylerythriol-lipides** : décrits pour la première fois en 1983 par Kawashima *et al.*, en particulier en cultivant *Candida* sp. B-7 et plus récemment *Candida antarctica* T-34 (Kitamoto *et al.*, 1990). Après purification et identification du produit de synthèse, on reconnaît la structure représentée dans la **Figure 9** décrite par Wagner et Lang (1996).



**Figure 9 : Structure de mannosyl erythritol lipide produit par *Candida antarctica* T-34 (Wagner et Lang, 1996)**

*Ustilago maydis* (DMS 4500 et ATCC 14826) est l'espèce de moisissure productrice de glycolipides à des taux élevés en utilisant des conditions limitées d'azote. Cependant à partir de 45 g/l d'un substrat d'acide gras de l'huile de tournesol, on obtient 30 g/l de glycolipide (Spoeckner *et al.*, 1999).

Ces glycolipides renferment deux types de sucres :

- Les mannosylerythritol-lipides (MEL),
- Les cellobiose-lipides (CL).

Haskins (1950) et Lemieux *et al.* (1951) ont décrit pour la première fois la production de cellobiose-lipide par la souche *Ustilago zaeae* PRL-119, par contre, *Ustilago maydis* PRL-627 est productrice de mannosyl erythritol lipide (Boothroyd, 1956).

Par ailleurs, le produit résultant après culture d'*Ustilago maydis* sur un substrat dérivé des huiles végétales est un mélange de deux types de glycolipides, où les mannosyl erythritol lipides sont les composés majeurs alors que les cellobioses-lipides sont produits en faibles quantités. Pour augmenter le rendement de cette dernière fraction, du glucose a été utilisé comme source de carbone (Khemili, 2008).

### II.3.2 Les lipopeptides

Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Parmi les biosurfactants bactériens de nature lipopeptidique, on distingue :

**a) La surfactine**

C'est une substance fortement active, protéolipide, produite par *Bacillus subtilis*. Elle a été nommée surfactine par Arima *et al.* (1986) et subtilysine par Bernheimer et Avigad (1970).

La surfactine est un surfactant très intéressant car elle est capable de réduire considérablement la tension superficielle de l'eau jusqu'à 27 mN/m et présente en plus une activité anti bactérienne (Ratledge, 1988; Laurila, 1985; Peypoux *et al.*, 1999).

La surfactine est composée d'une séquence de sept acides aminés : **L-GLU 1- Leu 2-D-Leu 3-L-Val 4-L-Asp 5-D-Leu 6-L-Leu 7** formant un cycle lactonique avec un acide gras  $\beta$ -hydroxylé en C (13)-C (15) .

**b) La lichenysine**

Grangermard *et al.* (1999) ont réussi à isoler une série de 9 lipopeptides (biosurfactant lactoniques) à partir de *Bacillus licheniformis* IM 1307, comme représentants du groupe lichenysine, ils l'ont nommé lichenysine G. Malgré une structure de base identique à celle des surfactines, les lichenysine diffèrent par le résidu glutaminyl en position 1.

Un lipopeptide, similaire à la surfactine a été isolé à partir de *Candida petrophilum*, cultivée sur alcanes et est considéré comme étant agent émulsifiant d'hydrocarbure (Laurila, 1985).

**c) Les lipoamino-acides (l'ornithine)**

Un lipide qui contient un seul amino-acide l'ornithine provoquant l'émulsion est produite par *Pseudomonas rebeszens* (Laurila, 1985).

**d) Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des produits naturels extracellulaires (métabolites secondaires) et sont produit par divers microorganismes : certains fonctionnent comme agents tensio-actifs en

réduisant la tension superficielle (Zadjic et Mohamedy, 1984). Le **Tableau III** représente les différents peptides bioactifs qui agissent comme surfactants.

**Tableau III : les antibiotiques possédants des activités de surface (Zadji et Mohamedy, 1984).**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Microorganisme producteur</b>	<b>Activité</b>
<b>A-3302</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibactérien
<b>N-Acetylmuramyl-talanyl</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Immunoadjuvant
<b>D-isoglutamine</b>	<i>Escherichia coli, B.cereus</i>	Antibactérien
<b>Actinoboline</b>	<i>S. griseoviridis</i>	Antibactérien
<b>Bacilysine</b>	<i>B. subtilis</i>	Antibactérien
<b>Bacitracine</b>	<i>B. licheniformis</i>	Antibactérien
<b>Edeines</b>	<i>B. brevis</i>	Antibactérien
<b>Esperine</b>	<i>B. mesentericus</i>	Antibactérien
<b>Gramicidine A, B</b>	<i>B. brevis</i>	Bactéricide
<b>Gamicidine S</b>	<i>B. brevis</i>	Antibactérien
<b>Mycobacilline</b>	<i>B. subtilis</i>	Antifongique
<b>Mycobactine</b>	<i>Mycobacterium sp</i>	Iron (III) chelatant stimulation de la croissance de mycobacteries
<b>Octapeptides</b>	<i>B. circulans</i>	Antibactérien
<b>Phosphoramidon</b>	<i>S. tanashiensis</i>	Inhibiteur des protéinases
<b>Polymexines</b>	<i>B. polymexa, B.colistinu , B. circulans</i>	Antibactérien
<b>Polypeptides</b>	<i>B. circulans</i>	Antibactérien
<b>Subtiline</b>	<i>B. subtilis</i>	Antibactérien
<b>Surfactine</b>	<i>B. subtilis</i>	Surfactant (inhibiteur de la formation des caillots dans la réaction thombine-fibrinogène).

### II.3.3. Les phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique (Healy *et al.*, 1996). Bognolo (1999) indique que bien que présents dans tous les microorganismes, il ya peu d'exemples de production extracellulaire.

Divers phospholipides sont isolés à partir de culture de cellules libres de *Thiobacillus thiooxidans*. Ces phospholipides se lient à l'élément soufre qui est nécessaire à la croissance cellulaire (Rosenberg et Ron, 1999).

Selon les auteurs, la composition et le type de phospholipides majeurs chez les bactéries, levures et fungi, dépendent de la source de carbone utilisées et les conditions de culture de croissance, à savoir la valeur du pH du milieu de culture.

## **II. 4. 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.).

Plusieurs facteurs contribuent à la production de biosurfactants comme la source de carbone et de nombreux paramètres de culture comme le pH, la température, l'agitation et l'oxygénation du milieu. De plus, la salinité, c'est-à-dire, les concentrations en ions multivalents (mg, ca, k, na et éléments traces), les concentrations de phosphate et d'azote ainsi que les sources de ces derniers peuvent influencer la production des biosurfactants. Ces paramètres peuvent jouer de façon positive ou négatives sur la production et varient de façon importante entre les espèces (Guerra-Santos *et al.*, 1986 ; Rahman *et al.*, 2002 ; Nitschke *et al.*, 2005).

### **a. Influence de la source de carbone**

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides. Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive (Desai et Banat, 1997). En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes (Cameotra et Makkar, 1998).

### **b. Influence de l'azote**

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

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant (Gabet, 2004).

**c. Influence du pH**

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa* le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardiacoryn bacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 (Arino *et al.*, 1996).

**d. Influence des sels minéraux**

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

**e. Influence de l'oxygène**

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

**f. Influence de la vitesse d'agitation**

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

## **Chapitre III : Généralités sur les méthodes d'extraction et d'identification des biosurfactants**

### **III.1. Méthodes d'extraction des biosurfactants du milieu de croissance**

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

La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilisation ainsi leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou liés aux cellules).

Les techniques les plus utilisées sont des extractions par les solvants : chloroformes/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. (Desai et Banat, 1997) ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

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

Il existe des techniques de récupération en continu. Reiling *et al.* (1986) ont réalisé une adsorption sur l'Amberlite XAD-2 suivie d'une purification et lyophilisation, donnant des rendements variant de 60 à 90% en pureté.

La capacité des biosurfactants à s'agréger aux surfaces a également été utilisée pour les retenir sur des membranes de filtration. Par exemple une membrane XM-50, dans le seuil de coupure est de 5000 D, a été utilisée sur une surfactine pure à 97% et un taux de récupération de 98 % est obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de coupure plus élevé (10 000 D) fournit un rendement de récupération de 92 % (Desai et Banat, 1997).

### **III.2. Méthodes d'identification des biosurfactants**

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

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-VIS) qui détecte la présence de chromophore (Spoeckner *et al.*, 1999) ,
- La spectrométrie infra rouge (IR) qui détermine le groupement fonctionnels (Peypoux *et al.*, 1999),
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, les indications sur la structure et qui a une haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule (Daniels *et al.*, 1999),
- La résonance magnétique nucléaire a haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser (Daniels *et al.*, 1999).

*Etude  
expérimentale*

*Matériel et  
méthodes*

## **Chapitre IV : Matériel et méthodes**

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou(UMMTO). Il a pour objectif l'étude de la cinétique de production de biosurfactant(s) à partir d'une souche bactérienne.

### **IV.1. Matériel biologique :**

#### **IV.1.1. Souche bactérienne :**

La souche utilisée dans cette étude appartient au genre *Pseudomonas* sp. Elle a été sélectionnée dans le cadre de travaux réalisés auparavant.

Les souches suivantes ont été utilisées pour l'étude de l'effet antibactérien : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

#### **IV.1.2. Revivification de la souche bactérienne :**

Cette opération a été effectuée dans deux tubes de deux bouillons de culture BHIB et BN stériles, et ensemencés à partir de tube de conservation, l'incubation se fait à une température de 37°C pendant 24H.

Après incubation, on procède à l'ensemencement de la souche revivifiée dans des boîtes de Pétris contenant la gélose nutritive solide. Une fois les boîtes ensemencées et étiquetées, elles sont incubées à 37°C pendant 24h.

#### **IV.1.3. Les tests de vérification de la pureté de la souche**

Afin de s'assurer la pureté de la souche utilisée au cours de nos travaux, une série de tests a été réalisée.

#### **IV.1.3.1. Etude macroscopique :**

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur la description des colonies obtenues sur le milieu gélosé en se basant sur l'aspect morphologique. L'observation à la loupe est basée sur les éléments d'identification donnée par Thoma *et al.* (1970).

#### **IV.1.3.2. Etude microscopique :**

Plusieurs étapes sont réalisées pour l'étude microscopique, chacune d'elle doit fournir un certain nombre d'informations pour l'élaboration du résultat final.

##### **IV.1.3.2.1. Coloration de Gram :**

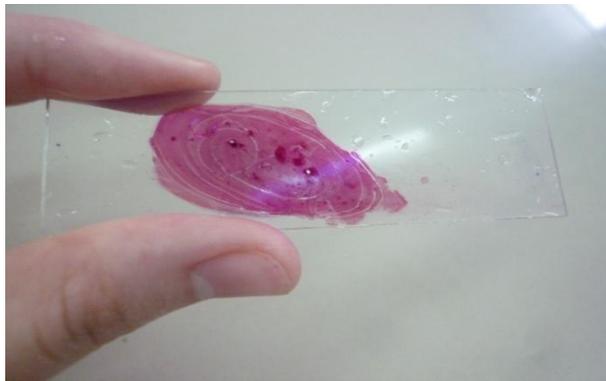
Cette technique nous permet de distinguer de types de bactéries : Gram positifs et les Gram négatifs, et les différencier d'après leur morphologie.

- Préparation du frottis :
  - nettoyage de la lame par l'alcool
  - Déposer une goutte d'H<sub>2</sub>O sur la lame
  - Prélever quelques colonies à l'aide d'une once
  - Frotter la pointe dans la goutte d'eau
  - Laisser sécher la lame sur la flamme du bec bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur (**Figure 10**).



**Figure10: Préparation du frottis**

- Coloration du frottis :
  - Couvrir le frottis avec du violet de gentiane.
  - Laisser agir 1 minute.
  - Rincer brièvement en faisant couler l'eau.
  - Déposer quelques gouttes de lugol.
  - Laisser agir 2 x 45 s.
  - Décolorer en faisant passer la solution décolorante pendant 30s.
  - Rincer.
  - Déposer la fuschine.
  - Laisser agir 1 min
  - Rincer avec de l'eau
  - Sécher à l'air libre (**Figure 11**).
  - Observation au microscope optique (G×400) ou avec l'huile d'immersion au (Gx1000) (Singleton, 2005).



**Figure 11 : Une lame montrant la coloration de Gram.**

Les souches Gram + se colorent en violet et les souches Gram- se colorent en rose.

#### **IV.1.3.2.2. Dénombrement de la souche bactérienne :**

La souche bactérienne a été dénombrée par la méthode classique de comptage sur boîte pétri. Afin d'estimer la concentration bactérienne qui sera ensemencé dans les différents milieux de culture.

- Préparation de la suspension bactérienne :

La préparation de la suspension bactérienne (solution mère) est réalisée en ensemencant des cellules bactériennes dans une solution saline (eau physiologique stérile) puis on mesure la densité optique avec un spectrophotomètre.

- Préparation des dilutions :

Une série de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ ) (voir le détail en annexe III) a été effectuée pour chaque tube de la manière suivante: 1 ml de l'échantillon de la solution mère a été prélevé stérilement puis introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique à 0,9%, on obtient ainsi la dilution  $10^{-1}$ . Après homogénéisation on prélève 1 ml de la dilution précédente que l'on verse dans un autre tube contenant 9 ml de diluant stérile. Ceci donne la dilution  $10^{-2}$ . On procède de la même manière pour réaliser les autres dilutions (Bourdon et Marchal, 1973).

- Méthode d'ensemencement :

Nous avons déposé 0,1 ml d'échantillon d'eau de chaque dilution que nous avons étalé de façon uniforme avec une pipette râteau sur milieux gélosés. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C.

La lecture a été effectuée après 24h à 72 h, le dénombrement est réalisé à l'aide d'un décompteur électronique puis on multiplie le nombre de colonie trouvée par le facteur de dilution.

#### **IV.2. Les milieux testés :**

##### **IV.2.1. Préparation**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de divers déchets organiques. Nous avons entrepris dans cette étude, la préparation de milieux de culture à base de déchets

d'animaux (pattes de poulet et têtes de sardine), végétaux (épluchures de figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) et les margines d'huile d'olive) ainsi qu'un milieu à base de glucose utilisé comme milieu de référence. Le but étant de sélectionner parmi ces milieux testés, celui ou ceux qui sous-tend (ent) une meilleure production de biosurfactant(s).

La préparation de ces milieux a été réalisée comme suit :

#### **IV.2.1.1. Préparation du milieu glucose**

- Dans un Erlenmeyer de 2000 ml on a introduit les réactifs suivants : 1,6 g de  $K_2HPO_4$ , 0,4 g de  $KH_2PO_4$ , 0,09 g de  $MgSO_4$ , 15 g de NaCl, 0,1 g de  $NH_4NO_3$ , 0,02 g de  $CaCl_2$ , 0,01 g de  $ZnSO_4$ , 0,05 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,008 g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,004 g de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , 0,01 g de  $Co(NO_3) \cdot H_2O$ , 5g de glucose. Ajuster jusqu'à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Agiter pour homogénéiser
- Ajuster le pH à 7
- Mettre dans un autoclave 20 min à 120°C (Ould El Hadj et al., 2006).

#### **IV.2.1.2. Préparation du milieu d'épluchures de figes de barbarie (*Opuntia ficus-indica*)**

- Couper les épluchures de figes de barbaries en petits morceaux puis mixer à l'aide d'un mixeur.
- Mettre 259,5g d'épluchures de fige de barbaries dans 1,038 L d'eau distillée puis agiter pour homogénéiser
- Mettre au bain marie à 75-80°C pendant 45 min.
- Filtrer à l'aide d'une passoire
- Ajuster le pH à 7
- Autoclaver à 120°C pendant 20 min (Ould El Hadj et al., 2006).

#### **IV.2.1.3. Préparation du milieu de pattes de poulet**

- Couper les pattes de poulet en petits morceaux puis mixer à l'aide d'un mixeur

- Mettre 328,7g de pattes de poulet dans 1,3 Litres d'eau distillée puis agiter pour homogénéiser.
- Mettre dans un bain marie à 75-80°C pendant 45 min.
- Filtré à l'aide d'une bande à gaz
- Ajuster le pH à 7
- Autoclaver 20 min à 120°C (Ould El Hadj et al., 2006).

#### **IV.2.1.4. Préparation du milieu de têtes de sardines**

- Couper les têtes en petits morceaux puis écraser à l'aide d'un mortier
- Mettre 220,4g de têtes de sardine avec 881 ml d'eau distillée puis agiter pour homogénéiser
- Mettre dans un bain marie à 75-80°C pendant 45 min
- Filtré à l'aide d'une bande à gaz
- Ajuster le pH à 7
- Autoclaver 20 min à 120°C (Ould El Hadj et al., 2006).

#### **IV.2.1.5. Préparation du milieu des margines de l'huile d'olive :**

- Dans un Erlenmeyer mettez 1 volume d'huile + 2 volumes d'eau distillée
- Ajuster le pH à 7

Verser notre milieu dans des flacons et mettre dans un autoclave 20 min à 120°C (Ould El Hadj et al., 2006).

A la sortie de l'autoclave tous les flacons contenant les différents milieux seront conservés au réfrigérateur jusqu'à leur utilisation.

### **IV.2.2. Caractérisation physico-chimiques des milieux :**

#### IV.2.2.1. Mesure de la densité apparente :

Pour un volume donné on mesure la densité apparente : masse/volume

- Nous avons versé un volume de 20 ml de chaque milieu préparé (sauf le glucose) dans des béchers
- Puis nous avons pesé sur une balance sachant que nous avons préalablement pesé les béchers vides
- A la fin nous avons calculé le rapport (masse/volume) annexe (IV).

Cet essai a été réalisé en triplicata.

#### IV.2.2.2.Mesure de la matière sèche :

- Prendre 20 ml de la matière fraîche de chaque milieu (pattes de poulet, têtes de sardine, épluchures de figes de barbarie et les margines d'huile d'olive).
- Mettre les échantillons dans des coupelles en porcelaine préalablement pesé (**Figure12**) annexe (V).
- Mettre à l'étuve à 105°C pendant 24h.



**Figure 12: Coupelles contenant la matière fraîche**

Après 24 heures on pèse la matière sèche (annexe V). On calcule le taux de matière sèche en utilisant l'équation suivante (Équation 1) :

$$\text{Taux de matière sèche (\%)} = \frac{\text{masse de la matière sèche}}{\text{masse de la matière fraîche}} \times 100 \quad (\text{Équation 1})$$

IV.2.2.3. Mesure du taux de cendres :

- Prendre les coupelles contenant la matière sèche de chaque milieu (pattes de poulet, têtes de sardine, épluchures de figues de barbarie et les margine d'huile d'olive).
- Mettre dans un four à moufle pendant 1 heure à 600°C.
- Après 1 heure de temps, on pèse les cendres obtenues (Annexe V).

Le calcul du taux de cendre est effectué en utilisant l'équation suivante (Équation 2) :

$$\text{Taux de cendre (\%)} = \frac{\text{masse des cendres}}{\text{masse de la matière fraîche}} \times 100 \quad (\text{Équation 2})$$

IV.2.2.4. Dosage des protéines pour les milieux de culture :

Le dosage des protéines pour les différents milieux de culture à base de déchets a été effectué par la méthode de Bradford donné par Mint El Moukhtar en 2010 (voir le détail en annexe VI).

IV.2.2.5. Dosage des sucres totaux pour les différents milieux de cultures préparés :

Le dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS (dinitrosalicylique) qui est de principe un dosage colorimétrique du glucose. Cette technique se base sur l'utilisation des propriétés réductrice du glucose à chaud et au milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNS (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur. La réaction est citée dans l'annexe(VII). (Boulal *et al.*, 2013)

### **IV.3. Etude de la cinétique de production de biosurfactant(s)**

#### **IV.3.1. Pré-culture :**

Dans des Erlenmeyers de 50 ml remplis des milieux de culture préparés, on ensemence 1 ml de la suspension bactérienne  $1,5 \cdot 10^7$  CFU/ml.

Les Erlenmeyer sont incubés sous une agitation à 50 tr/min pendant 48 heures à température ambiante ( $21,7^\circ\text{C} \pm 3,07$ ).

#### **IV.3.2. Culture :**

Après la pré-culture, on réalise une culture dans une bouteille en verre de 500 ml stérile remplie de 250 ml de milieu de culture, on laisse incuber pendant 5 jours sous agitation à 150 tr/min à température ambiante ( $21,7^\circ\text{C} \pm 3,07$ ).

Au cours de la culture bactérienne, on a réalisé 3 prélèvements par jour, à raison de 5 ml par prélèvement.

### **IV.4. Les paramètres suivis au cours de la cinétique**

#### **IV.4.1. Mesure de la densité optique (DO) :**

Avec un spectrophotomètre UV visible on mesure la densité optique des différents prélèvements réalisés au cours de la culture bactérienne.

#### **IV.4.2. Index d'émulsification :**

Il a été mis au point par Brodrick et Cooney, puis il est modifié par Francy *et al.*, (1991) et Bodour *et al.*, (2004). Ce test permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger dans un tube à essai: 2 ml de gasoil avec 2 ml du milieu de culture centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes afin d'éliminer les cellules bactériennes. Les tubes sont agités au vortex pendant 2 minutes.

Les tubes sont laissés reposer pendant 24h à température ambiante, puis le  $E_{24}$  a été calculé comme suit:

C'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange le tout multiplié par 100 (Équation 3)

$$E_{24} = \frac{\text{hauteur d'émulsion}}{\text{hauteur totale du mélange}} \times 100 \quad (\text{Équation 3})$$

Par ailleurs, des essais témoins sont réalisés avec les milieux de culture frais et de gasoil, soumis aux mêmes conditions.

#### **VI.5. L'extraction du biosurfactant**

Le(s) biosurfactant(s) est (sont) extrait(s) de la culture après centrifugation à 5000 tours/min pendant 30min.

Le surnageant est récupéré et ajuster à un pH de 2 en utilisant du HCl à 6M. Un volume égale de chloroforme/méthanol ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ ) (2 :1) est ajouter, le mélange est agité vigoureusement pendant 15 min ; on peut observer la séparation de deux phase organique et inorganique, l'opération est répétée trois fois.

Le produit obtenu de la phase organique est mis dans un évaporateur rotatif jusqu'à évaporation du solvant. A la fin, un produit visqueux jaunâtre est obtenu auquel du méthanol est ajouté. Le mélange est remis dans l'évaporateur rotatif à 45°C jusqu'à évaporation complète du solvant (Silva *et al.*, 2010).

#### **IV.6. Test de la capacité nettoyante du ou des biosurfactant(s) produit(s) :**

Pour déterminer l'effet nettoyant du ou des biosurfactant(s) produit(s), les parois intérieures des béchers de 50 ml sont recouvertes d'huile de moteur neuf (Rebex LUBRIFIANTS, CHABA HD 40, NAFTALO). 50 ml du surnageant de la culture bactérienne sont ensuite additionnés. Un biosurfactant de référence, surfactant chimique (SDS sodium dodecyl-sulfate) a été utilisé comme témoin positif. Les béchers sont agités pendant 10

minutes et laissés pendant 6 heures de temps (Pruthi and Cameotra, 2000). On est sensés observer un détachement de l'huile de la paroi intérieures des bécchers si le ou les biosurfactant(s) produit(s) a (ont) un effet nettoyant.

On a aussi effectué un essai avec du milieu neuf (témoin négatif).

#### **IV.7. Le test du pouvoir moussant (*foaming*) :**

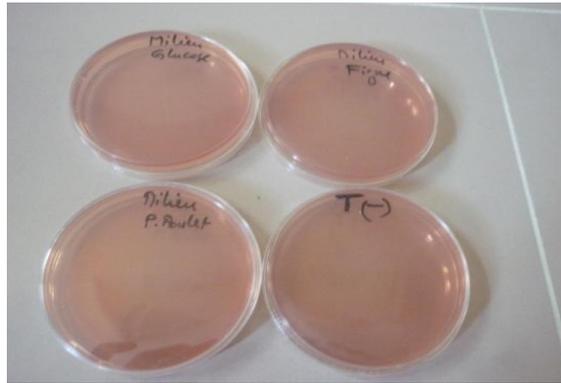
La mousse d'un biosurfactant dans un milieu de culture est déterminée par agitation de surnageant (5ml) pendant 2 minutes, et est calculée selon l'équation suivante (Mohammed, 1997):

$$Foaming = \frac{\text{hauteur de la mousse (cm)}}{\text{hauteur totale (cm)}} \times 100 \quad (\text{Équation 4})$$

On a réalisé 3 essais pour chaque milieu. La mousse obtenue est observée au microscope optique (hund WETZLAR).

#### **IV.8. Test de la gélose au sang :**

- Préparation de la gélose au sang :
  - Mettre un flacon de gélose nutritive (200 ml) à liquéfié dans un bain marie
  - Une fois liquéfié on laisse refroidir un peu à température ambiante
  - Ajouter 5 ml de sang de mouton dans le flacon en mélangeant doucement pour éviter l'éclatement des cellules
  - Couler sur des boites de Pétri et laisser solidifier à température ambiante.
  
- Ensemencement :
  - A l'aide d'une micropipette déposer 100 µl de notre culture (résultat de la cinétique) pour chaque milieu sur les boites préalablement préparées.
  - Préparer un essai qui contient 100 µl de la suspension de la souche elle-même comme témoin négatif
  - Etaler de façon uniforme avec une pipette râteau
  - Les boites sont incubées à température ambiante (**Figure 13**).



**Figure 13: Gélose au sang ensemencé avec la culture bactérienne**

Après 24 à 72h on fait la lecture afin de constater si nous avons une activité hémolytique ou pas.

#### IV.9. Etude de l'effet anti bactérien :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus (dans notre cas c'est le biosurfactant).

**Tableau IV : Les souches bactériennes utilisées**

<b>Souches bactériennes</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Gram négatif	<b>Provenance</b>
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 43300)	Gram positif	Laboratoire de microbiologie de la FSBSA de Tizi Ouzou
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	

### **Test de diffusion sur gélose**

L'évaluation de l'activité antibactérienne du biosurfactant a été déterminée par la technique de diffusion sur gélose décrite par Djenane *et al.* (2011). Cette méthode a été réalisée sur milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH). Des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé, puis laissées solidifiées à une température ambiante pour 30 minutes.

Un volume de 0,1ml de la suspension standardisée d'inoculum à  $1,5 \cdot 10^7$  UFC/ml est ensemencé uniformément dans chaque boîte de Pétri. Des disques stériles en papier wattman de 5 mm de diamètre imprégnés de 100  $\mu$ l d'une solution de biosurfactants ont été déposés au centre de chaque boîte de Pétri. Par ailleurs, d'autres disques sont imbibés de 100  $\mu$ l de différentes dilutions de la même solution de biosurfactant (1/2, 1/5, 1/10). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition qui se forment autour des disques à l'aide d'une règle en (cm).

Un témoin négatif a été réalisé par des disques stérile imbibé avec 100 $\mu$ l d'eau distillée déposés sur un milieu préalablement ensemencé de la bactérie teste. Chaque essai a été répété trois fois.

### **IV.10. Etude de l'effet sur la croissance des lentilles (*Lens culinaris*):**

Le test de croissance consiste en la semence de 30 graines de lentilles dans 50g de terre prélevée et autoclavée pendant 20 min à 120°C. Ces derniers ont été arrosés pendant 8 jours avec une solution préparée comme suit : 50 ml d'eau distillée + 0,02 g de biosurfactant.

A l'issu de ce test nous avons mesuré la hauteur des plantes (des tiges) pour chaque milieu. Par ailleurs, un témoin négatif, soumis aux mêmes conditions, a été réalisé mais arrosé avec de l'eau distillée.

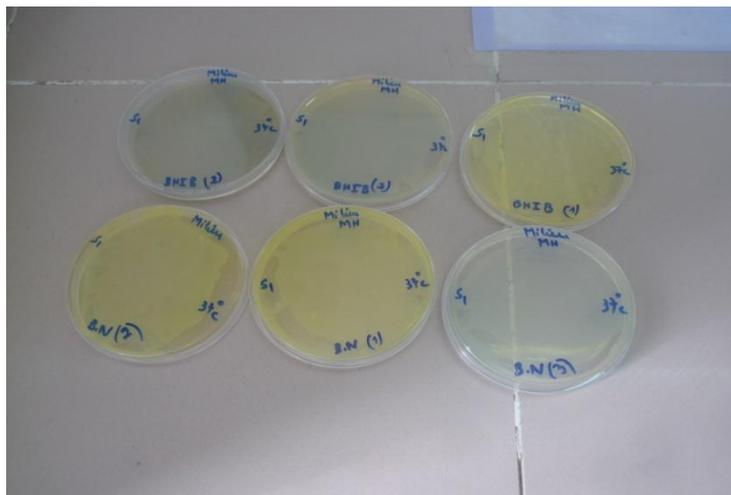
# *Résultats et discussions*

## Chapitre V : Résultats et discussions

### V.1. Résultats des tests de vérification de la pureté de la souche :

#### V.1.1. Etude macroscopique

Après étalement à partir des bouillons sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive et incubation de cette dernière dans une étuve à 37°C pendant 24 h, nous avons remarqué l'apparition de colonies bactériennes avec un aspect visqueux, de forme irrégulière, au centre bombées et lisse qui s'étale sur toute la gélose avec la production d'un pigment verdâtre ou jaunâtre comme le montre la **Figure 14**.

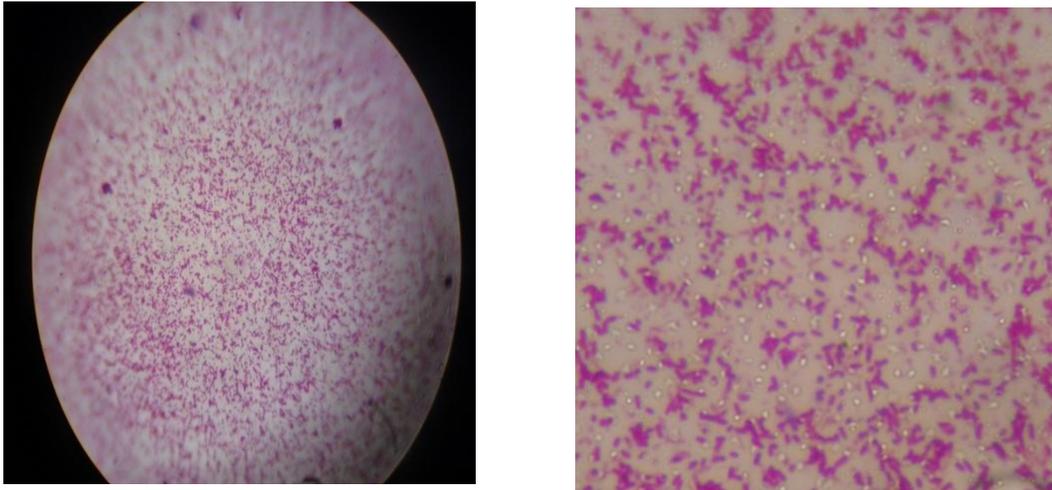


**Figure 14: Aspect macroscopique de la souche étudiée.**

#### V.1.2. Etude microscopique

##### V.1.2.1. Coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram, l'observation au microscope photonique à immersion nous a permis de distinguer le type, la forme et l'arrangement des cellules (**Figure 15**).



**Figure 15 : Aspect microscopique de la souche étudiée après coloration de Gram (G×1000).**

D'après les résultats microscopiques obtenus, nous pouvons dire que notre souche est Gram négatif (colorées en rose après coloration de Gram), de forme bâtonné.

D'après ces résultats, la souche peut être rattachée au genre *Pseudomonas* pour sa morphologie macroscopique et microscopique : colonies blanc jaunâtre, plates (**Figure 14**), bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fins et longs (**Figure 15**).

*Pseudomonas* est un microbe pathogène opportuniste important, fortement résistant à un grand nombre de désinfectants et d'antibiotiques. Cette bactérie vit à l'état saprophytique dans l'eau, le sol et sur les végétaux (Sotirova *et al.*, 2009). Elle est par ailleurs connue par sa capacité à biodégrader les composés hydrocarbonés. En effet, plusieurs chercheurs l'ont isolé à partir des sols contaminés par les hydrocarbures (Sifour *et al.*, 2007; Chabouni, 2008 ; Yin *et al.*, 2009; Lotfabad *et al.*, 2009).

#### **V.1.2.2. Dénombrement de la souche étudiée**

Le résultat du dénombrement de la souche étudiée fait ressortir une concentration bactérienne de  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml  $\pm$  0,52.

## V.2. Résultats de la caractérisation physico-chimique des milieux de culture préparés

### V.2.1. Résultats de mesure de la densité apparente

Les résultats de la mesure de densité apparente sont indiqués dans le Tableau IV.

**Tableau V: Résultats de la mesure de la densité apparente.**

Milieu de culture	Pattes de poulet	Têtes de sardine	Epluchures de figue de barbarie	Margines d'huile d'olive
Densité	0,951 ± 0,00	0,927 ± 0,00	0,977 ± 0,00	0,98 ± 0,00

D'après les résultats du tableau précédent, on remarque que la densité apparente est différente d'un milieu à l'autre. Le milieu à base de margines d'huile d'olive représente une densité élevée par rapport aux autres milieux avec une valeur de 0,98.

### V.2.2. Résultats du taux de matière sèche et de cendres

Les résultats sont donnés dans le Tableau suivant :

**Tableau VI : Résultats du taux de matière sèche et des cendres.**

Milieus de culture	Taux de matière sèche (matière sèche/matière fraîche (%))	Taux de cendre (cendre/matière fraîche(%))
Milieu à base d'épluchures de figues de barbarie	2,102 ± 0.001	0 ,1872 ± 0.0001
Milieu à base de têtes de sardine	2,8375 ± 0.0145	0,2665 ± 0.271
Milieu à base de pattes de poulet	2,7755 ± 0.0025	0,1474 ± 0.0002
Milieu à base des margines d'huile d'olive	96,333 ± 0.00	0,236 ± 0.00

On constate que le milieu à base de têtes de sardine représente une quantité importante des sels minéraux par rapport aux autres milieux suivie de celui à base des margines d'huile d'olive, épiluchures de figues de barbarie et pattes de poulet en dernier (**Tableau VI**).

V.2.3. Résultats du dosage des protéines pour les milieux de culture

Les résultats du dosage des protéines sont cités dans le **Tableau VII**.

**Tableau VII:** Résultats du dosage des protéines des différents milieux.

Milieux	Milieu têtes de sardine	Pattes de poulet	Epiluchures des figues de barbaries	Margines d'huile d'olive
<b>Concentration des protéines (g/l)</b>	0,097 ± 0,021	0,228 ± 0,011	0,017±0,009	0,528±0,089

A partir du **Tableau VII** nous avons constaté que les deux milieux à base des margines d'huile d'olive et pattes de poulet ont une concentration élevée en protéines, suivie des deux milieux à base de têtes de sardine et les épiluchures des figues de barbarie respectivement avec une teneur en protéine plus faible.

D'après les études de Vilimovsky (2015), les pattes de poulet et têtes de sardine sont une source de protéines renferment 50% (p/v) et 45% (p/v) de ces constituant respectivement.

V.2.4. Dosage des sucres totaux pour les différents milieux de cultures préparés

Les résultats du dosage des sucres sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VIII : Résultats du dosage des sucres réducteurs des différents milieux.

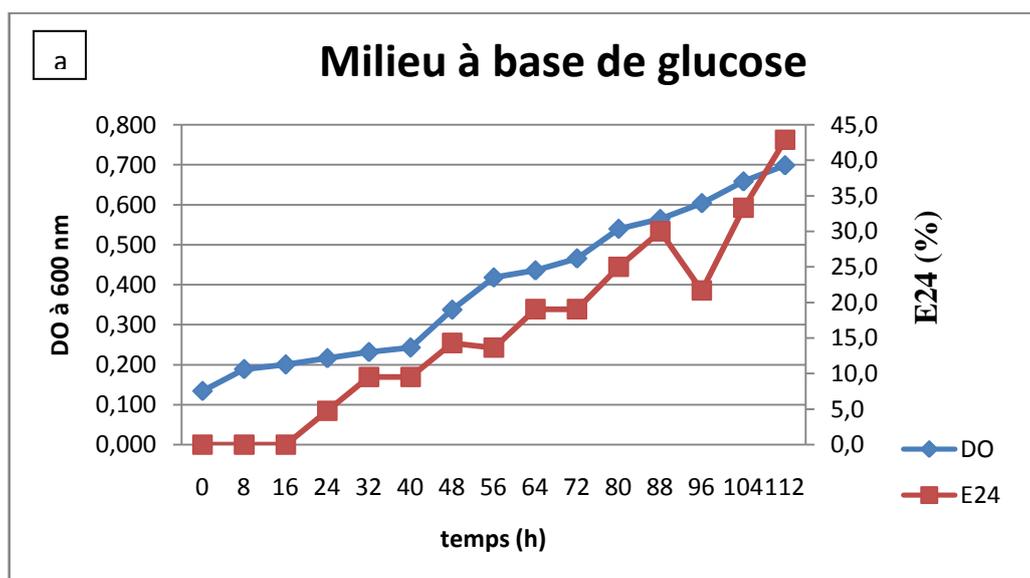
Milieux	Têtes des sardines	Pattes de poulets	Epluchures de figes de barbarie	Margines d'huile d'olive
<b>Concentration des sucres réducteurs (g/l)</b>	0,072 ± 0,083	0,139 ± 0,164	0,226 ± 0,000	0,227 ± 0,012

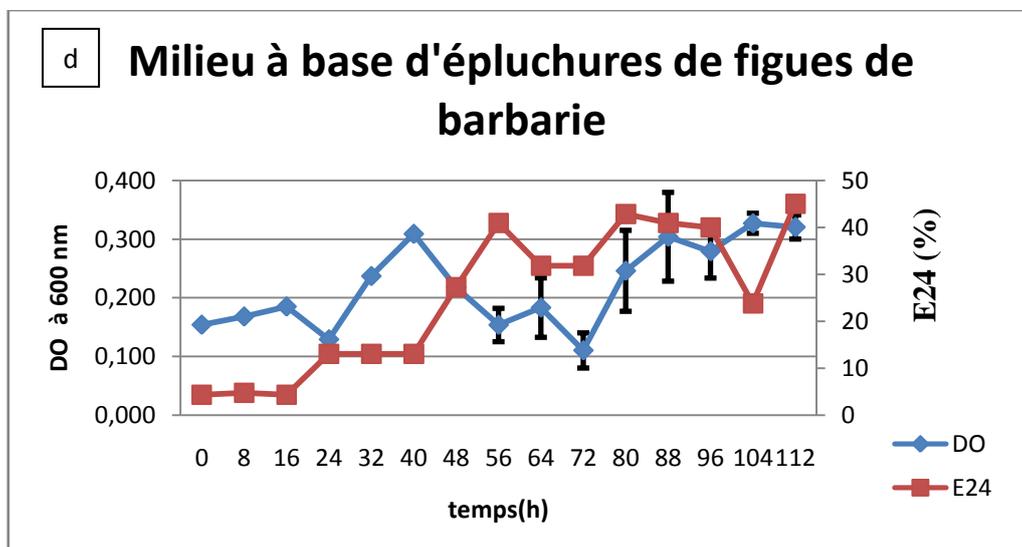
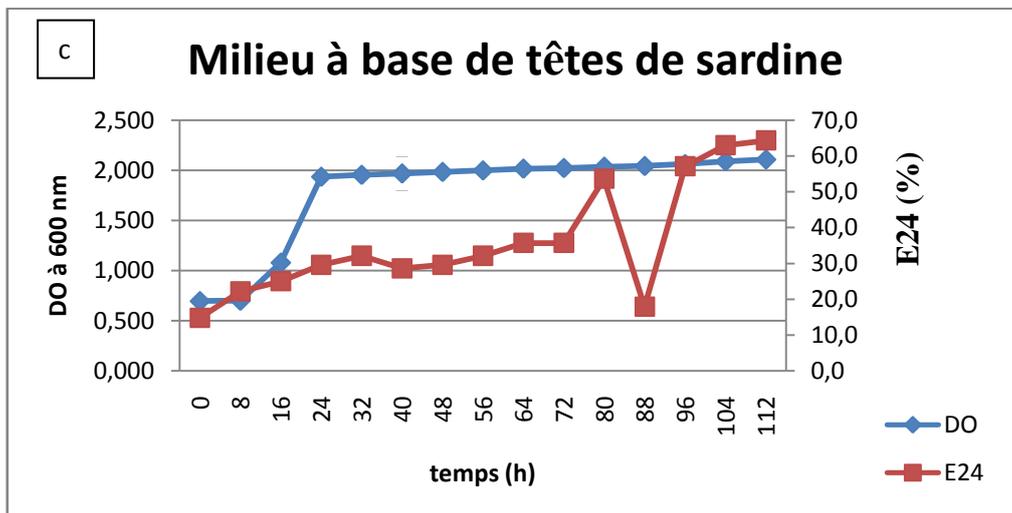
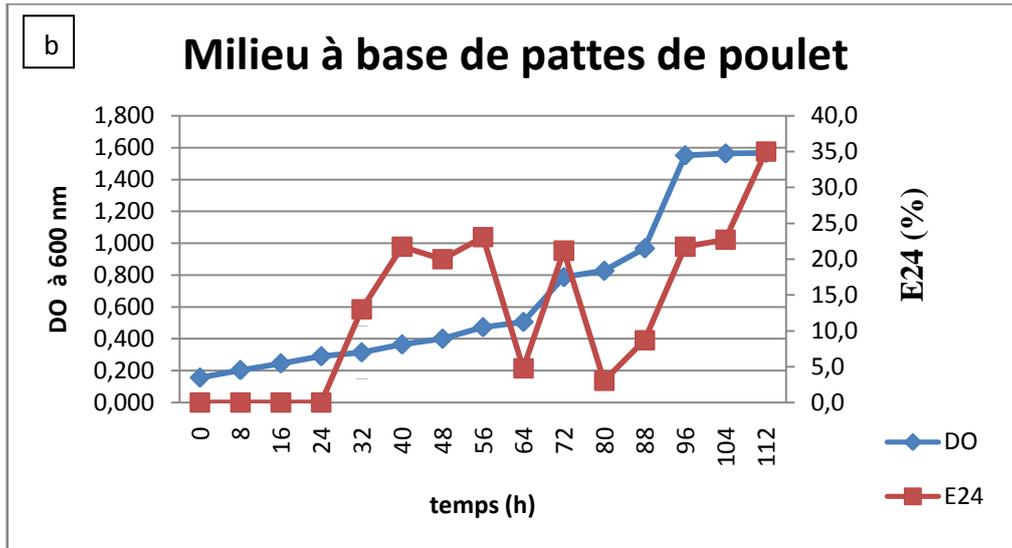
D'après le **Tableau VIII**, on constate que le milieu à base des margines d'huile d'olive et épluchures de figes de barbarie présentent une concentration plus élevée en sucres réducteurs par rapport aux milieux à base de pattes de poulet et têtes de sardine.

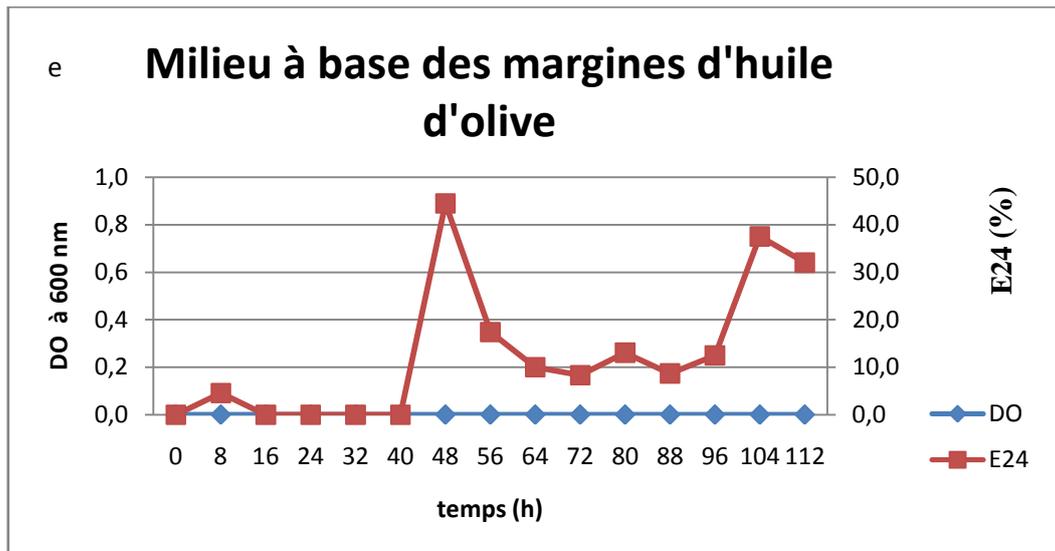
### V.3. Cinétiques de croissance et de production de biosurfactant sur les différents milieux

Notre souche a été cultivée dans les différents milieux à température ambiante pendant 5 jours à 150tr/min.

La cinétique de la croissance microbienne ainsi que le paramètre indicateur de production de biosurfactant à savoir, l'index d'émulsion E<sub>24</sub> sont représentés dans la **Figure16**.







**Figure 16: Cinétique de la croissance bactérienne et de la production de biosurfactant dans les différents milieux de culture préparés.**

D'après la **Figure 16 a**, la variation de la concentration microbienne est une courbe typique d'une croissance microbienne, caractérisée par l'absence de phase de latence et par une longue phase exponentielle. Plusieurs auteurs ont observés le même comportement avec différents microorganismes (Rocha *et al.*, 2007 ; Akmouci-Toumi, 2009).

La valeur maximale obtenue du  $E_{24}$  est de 42,85% au bout de la 112<sup>ème</sup> heure de fermentation.

**Figure 16 b**, la variation de la concentration microbienne est une courbe typique d'une croissance microbienne, caractérisée par l'absence de phase de latence et par une longue phase exponentielle et se termine par une phase stationnaire.

La valeur maximale obtenue du  $E_{24}$  est de 35 % au bout de la 112<sup>ème</sup> heure de fermentation.

**Figure 16 c** : la variation de la concentration microbienne est une courbe typique d'une croissance microbienne, caractérisée par la présence de phase de latence entre 0 et 8 h, phase exponentielle entre 8 et 32 h, phase de déclin entre 32 et 40 h et se termine par une longue phase stationnaire.

La valeur maximale obtenue du  $E_{24}$  par le milieu à base de tête de sardine est de 64,28% au bout de la 112<sup>ème</sup> heure de fermentation.

**Figure 16 d :** la variation de la concentration microbienne est une courbe caractérisée par la présence d'une phase de latence entre 0 et 24 h, phase exponentielle de croissance entre 24 et 40 h phase de déclin car il y a épuisement des sucres simples tel que le glucose, entre 40 et 72 h (il y a mort cellulaire). Reprise de la croissance due sans doute à l'utilisation des sucres simples issus de la dégradation des sucres complexes.

La valeur maximale obtenue du  $E_{24}$  par le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie est de 45 % au bout de la 112<sup>ème</sup> heure de fermentation.

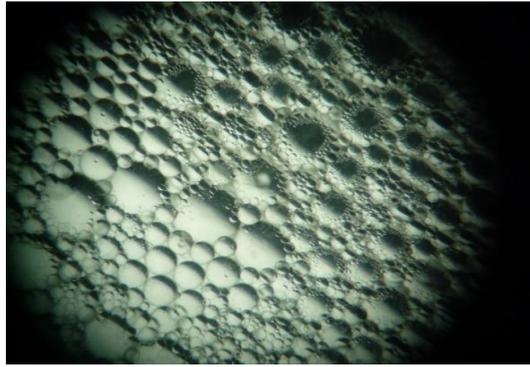
**Figure 16 e :** Puisqu'il y a eu production de biosurfactants (le  $E_{24}$  en témoigne), cela veut dire qu'il y a eu croissance bactérienne, sauf que nous avons deux phases dans notre milieu de culture (huile et eau), la mesure de la croissance (exprimée en DO) n'est pas possible car les bactéries présentes dans ce milieu se seraient sans doute accumulées dans la phase huileuse comme le montre la **Figure 17**.



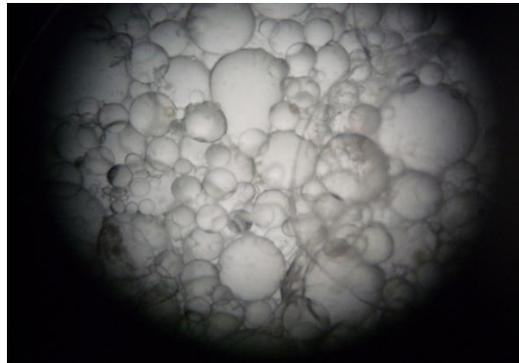
**Figure 17: Pré-culture huile (formation de deux phases huile + eau).**

La valeur maximale obtenue du  $E_{24}$  par le milieu à base des margines d'huile d'olive est de 44,44 % au bout de la 48<sup>ème</sup> heure de fermentation.

Afin de mieux voir l'émulsion nous l'avons observé au microscope optique au grossissement x 1000, les résultats sont cités dans les figures suivantes :



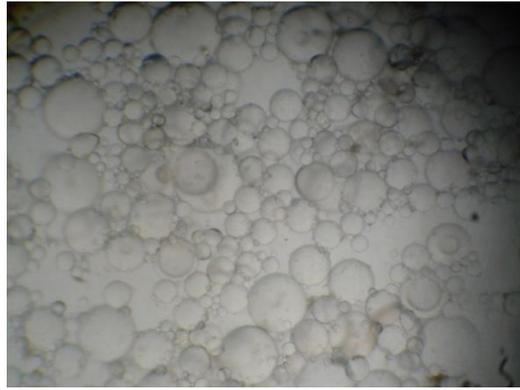
**Figure 18 : Observation de l'émulsion du E<sub>24</sub> pour le milieu à base d'épluchures de figures de barbarie au microscope optique au grossissement x 1000.**



**Figure 19 : Observation de l'émulsion du E<sub>24</sub> pour le milieu à base de glucose au microscope optique au grossissement x 1000.**



**Figure20 : Observation de l'émulsion du E<sub>24</sub> pour le milieu à base de patte de poulet au microscope optique au grossissement x 1000.**



**Figure 21 : Observation de l'émulsion du E<sub>24</sub> pour le milieu à base des margines d'huile d'olive au microscope optique au grossissement x 1000.**



**Figure 22: Observation de l'émulsion du E<sub>24</sub> pour le milieu à base de têtes de sardine au microscope optique au grossissement x 1000.**

D'après l'observation au microscope optique de l'émulsion obtenue pour les différents milieux, le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie présente une émulsification importante, apparition de bulles plus petites ce qui indique une bonne émulsification suivie du milieu à base des margines d'huile d'olive, têtes de sardine, pattes de poulet et glucose en dernier avec des bulles de plus grandes taille.

A partir des résultats de l'observation microscopique des émulsions et ceux des cinétiques de production, l'augmentation de l'index d'émulsification est proportionnelle à la concentration microbienne. Se traduisant par des bulles observé au microscope optique qui sont plus petites là où l'émulsification est élevée et inversement.

Des résultats similaires ont été trouvés chez *Pseudomonas aeruginosa* qui peut atteindre un index d'émulsification de 50% (Benincasa et Accorsini, 2009) et de 58% (Lovaglio *et al.*, 2011) en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone.

Plusieurs travaux ont indiqués que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent émulsionner et stabilisent les émulsions de différents types d'hydrocarbures et des huiles comme le pétrole brut, kérosène, n-alkanes, les composés aromatiques, l'huile d'olive et les huiles minérales et le diesel (Patel et Desai, 1997 ; Benincasa *et al.*, 2004 ; Wei *et al.*, 2005).

L'utilisation de l'huile de tournesol comme seul source de carbone par *Pseudomonas aeruginosa* a permis de produire un biosurfactant dont l'index d'émulsion est de 51% (Sifour *et al.*, 2007). Robert *et al.* (1989), ont également pu produire un biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 en utilisant l'huile d'olive, avec un index d'émulsion de 49%.

Il est à noter qu'il existe une relation entre l'augmentation de la biomasse et la production du biosurfactant par *Pseudomonas* sp. ceci peut être expliqué par la phase prolongée de la croissance microbienne (Das *et al.*, 2009). Ce qui confirme que la production de biosurfactant s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, et qui suggère qu'il est produit comme métabolite primaire (Amiriyani *et al.*, 2004).

#### V.4. Extractions du biosurfactant

Après avoir effectué l'extraction de notre biosurfactant nous avons eu les résultats cités dans le tableau suivant :

**Tableau IX : La concentration de biosurfactant produit.**

Milieu	Glucose	Figue de barbarie	Pattes de poulet	Têtes de sardine	Margines d'huile d'olive
<b>Concentration de biosurfactant (g/l)</b>	<b>10,96 ± 0,00</b>	<b>13,3 ± 0,00</b>	<b>6,1 ± 0,00</b>	<b>9,06 ± 0,00</b>	<b>12,43 ± 0,00</b>

D'après le **Tableau IX** la concentration de biosurfactant produit est différente d'un milieu à l'autre. La production la plus importante (13,3 g/l) correspond au milieu à base d'épluchures de figues de barbarie, suivie du milieu à base des margines d'huile d'olive, glucose, têtes de sardine et pattes de poulet.

On peut déduire que le milieu à base d'épluchures de figues de barbarie utilisé ici comme seule source de carbone est un substrat approprié pour la croissance et la production de biosurfactant, car ce dernier a été produit en quantité importante (13,3g/l) avec un index d'émulsion de 45%.

L'utilisation des margines d'huile d'olive comme seule source de carbone par la souche testée dans cette étude a permis de produire une quantité importante de biosurfactant (12,43 g/l) avec un index d'émulsion de 44,44%. Ces résultats sont confortés par ceux de Santos *et al.* (2010) qui ont indiqué que l'utilisation des huiles végétales en tant que seule source de carbone, ont un grand potentiel comme substrat dans la production de biosurfactant par les souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans leurs travaux, Wu *et al.* (2008) ont pu produire par *Pseudomonas aeruginosa* 3,70g/l et 2,63g/l de biosurfactant en utilisant l'huile d'olive et l'huile de soja comme seule source de carbone respectivement. Par ailleurs, Costa *et al.* (2006), Rahman *et al.* (2002) et Haba *et al.* (2000), signalent la production de 2,9g/l de biosurfactant en présence de l'huile de buriti, de l'huile de carthame et de l'huile de friture, respectivement par la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

L'éthanol a déjà été testé comme source de carbone (Hori, Marsudi et Unno, 2002 ; Chen *et al.*, 2007), mais ce n'est que dans les conditions de fermentation dans un bioréacteur que Matsufuji, Nakata et Yoshimoto (1997) ont pu produire une grande quantité de rhamnolipides (jusqu'à 32 g/l). Bien que Robert *et al.* (1989) aient déjà observé que le glucose générât une meilleure production que le mannitol en milieu minimal. Nos résultats ont démontré que le milieu à base de figue de barbarie et margines d'huile d'olive ont permis une production plus importante de biosurfactant, et ce par rapport au milieu glucose.

La production des biosurfactants polymérique est retrouvée chez certaines espèces appartenant aux *Bacteria*, *Eucarya* et *Archaea* constitué des genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Halomonas*, *Methanobacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces* et *Sulfolobus* (Bodour *et al.*, 2004).

Le ou les biosurfactant(s) produit(s) par la souche testée dans le cadre de la présente étude peut être considéré de nature rhamnolipidique puisque les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour produire des biosurfactants glycolipidiques contenant le rhamnose et les acides gras qui sont nommés les rhamnolipides (Gunther *et al.*, 2005). Leurs

compositions chimique et activités émulsifiante dépendent non seulement de la souche productrice, mais aussi des conditions de culture et des paramètres physiques (températures, aération, agitation et pH), ainsi que la nature des sources de carbone et d'azote qui influencent la quantité et la qualité du biosurfactant produit (Calvo *et al.*, 2009).

De nombreuses études ont déjà mis en évidence que plus l'apport en azote est limité, plus la production de rhamnolipides augmente et inversement (Guerra-Santos, Käppeli O. et Fiechter, 1984 ; Mulligan et Gibbs 1989 ; Santa Anna *et al.*, 2002 ; Abalos *et al.*, 2002 ; Haba *et al.*, 2000). De plus, cet excès d'azote crée un débalancement du quotient C/N dans le milieu.

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).

Les rapports C/N pour les différents milieux testés sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau X: Quotients C/N des différents milieux de culture.**

Milieu à base de	Têtes de sardine	Pattes de poulet	Epluchures de figes de barbarie	Margines d'huile d'olive
Quotient C/N	4,639	3,818	83,088	2,687

D'après le **Tableau X** le C/N le plus élevé est celui du milieu à base d'épluchures de figes de barbarie correspondant à la production la plus élevée de biosurfactant (13,3 g/l) suivie de celui à base de têtes de sardine, pattes de poulet et margines d'huile d'olive.

Ainsi, nos résultats vont dans le sens des travaux de Guerra-Santos, Käppeli et Fiechter (1984 ; 1986), qui observent une production optimale de rhamnolipides lorsque les quotients C/N sont entre 16/1 et 18/1, et aucune production à partir du moment où le milieu n'est plus considéré comme étant limité en azote. En effet d'autres études ont déjà établi des quotients C/N optimaux pour la production de rhamnolipides à des valeurs beaucoup plus ou moins élevées (Haba *et al.*, 2000 ; Santa Anna *et al.*, 2002 ; Cha *et al.*, 2007).

Plus le N est faible plus l'apport d'azote est limité plus C/N est élevée donc la production de biosurfactant est optimal. Le quotient C/N du milieu à base de figue de barbarie est plus important (83,088) suivie de celui à base de têtes de sardine, pattes de poulet et margines d'huile d'olive.

La nature du milieu de culture et les facteurs environnementaux sont des paramètres importants dans la production des rhamnolipides (Nitschke, Costa et Contiero, 2005 ; Desai et Banat, 1997). D'une manière générale la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote sont les facteurs les plus limitant. En effet les sources de carbone hydrosolubles, telles que le glucose, le glycérol, le mannitol, ou l'éthanol sont souvent utilisées pour produire des rhamnolipides chez *P. aeruginosa*. Cependant elles sont moins efficaces que les sources de carbones liposolubles telles que les n-alcanes ou les huiles. D'après Robert *et al.* (1989) le mannitol et l'huile d'olive seraient les sources de carbone les plus efficaces pour chacune des deux catégories, hydrosolubles et liposoluble.

Pour ce qui est des sources d'azote, le nitrate, le glutamate et l'aspartate ont été répertoriés comme étant d'excellents promoteurs de la production des rhamnolipides, alors que la glutamine et l'ammonium inhibent la production (Mulligan et Gibbs 1989 ; Venkata Ramana et Karanth, 1989 ; Köhler *et al.*, 2000). De plus le quotient C/N a une influence sur la production (Guerra-Santos, Käppeli et fiechter, 1984 ; Desai et Banat 1997). Selon certaines études, le quotient C/N optimal peut varier en fonction des sources de carbone et d'azote utilisées mais aussi en fonction des souches et selon qu'elles sont cultivées dans des bioréacteurs ou non (Haba *et al.*, 2000 ; Santa Anna *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2007).

On suppose que lorsque le milieu est limité en azote, la synthèse des protéines est ralentie pour favoriser les voies de biosynthèses des hydrates de carbone du métabolisme cellulaire primaire et secondaire dont les rhamnolipides (Mulligan et Gibbs 1989 ; Arino, Marchal R. et Vandecasteele, 1996 ; Abalos *et al.*, 2002). Inversement, un excès d'azote entraîne une baisse de la synthèse de ces métabolites pour favoriser la croissance bactérienne. Il existe donc une corrélation entre l'apport limité en azote, le quotient C/N et la production de biosurfactants.

**V.5. Test de capacité de nettoyage du ou des biosurfactant(s) produit(s) :**

Les résultats de ce test sont indiqués dans le **Tableau XI**.

**Tableau XI : Résultats du test de capacité de nettoyage du biosurfactant produit.**

<b>Milieux</b>	<b>Traitements</b>	<b>Rapport Hn/Ht x 100 (%)</b>
<b>Glucose</b>	SDS+ huile de moteur neuf	100
	Milieu neuf +huile de moteur neuf	0
	Surnageant + huile de moteur neuf	40
	Surnageant + huile de moteur usée	50
<b>Epluchures de figes de barbarie</b>	SDS+ huile de moteur neuf	100
	Milieu neuf +huile de moteur neuf	0
	Surnageant + huile de moteur neuf	80
	Surnageant + huile de moteur usée	90
<b>Pattes de poulet</b>	SDS+ huile de moteur neuf	100
	Milieu neuf +huile de moteur neuf	0
	Surnageant + huile de moteur neuf	60
	Surnageant + huile de moteur usée	80
<b>Têtes de sardine</b>	SDS+ huile de moteur neuf	100
	Milieu neuf +huile de moteur neuf	0
	Surnageant + huile de moteur neuf	35
	Surnageant + huile de moteur usée	30
<b>Margines d'huile d'olive</b>	SDS+ huile de moteur neuf	100
	Milieu neuf +huile de moteur neuf	0
	Surnageant + huile de moteur neuf	30
	Surnageant + huile de moteur usée	20

Hn : hauteur nettoyée, Ht : hauteur totale.

D'après le **Tableau XI** on constate que le rapport **Hn/Ht** le plus élevé est celui du milieu à base d'épluchures de figes de barbarie suivie du milieu à base de pattes de poulet, glucose , têtes de sardines et margines d'huile d'olive. L'effet nettoyant le plus important étant celui du témoin positif, obtenu avec le SDS.

On suppose que la différence de nettoyage des béciers peut être expliquée par la nature des biosurfactants produits.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Raza *et al.* (2007) qui ont révélé que les biosurfactants jouent un rôle important dans la capacité de nettoyage des sites contaminé par les hydrocarbures et les polluants organique et les métaux lourds.

#### **V.6. Le test du pouvoir moussant (*foaming*)**

Les résultats de ce test sont représenté dans le tableau suivant :

**Tableau XII: Résultats du test du *foaming*.**

Milieu	Le <i>foaming</i> (%)	L'écart-type
Glucose	4,81	± 1,80
Pattes de poulet	58,97	± 2,22
Têtes de sardine	37,77	± 1,92
Epluchures de figues de barbarie	29,50	± 4,78
Margines d'huile d'olive	13,97	± 2,55

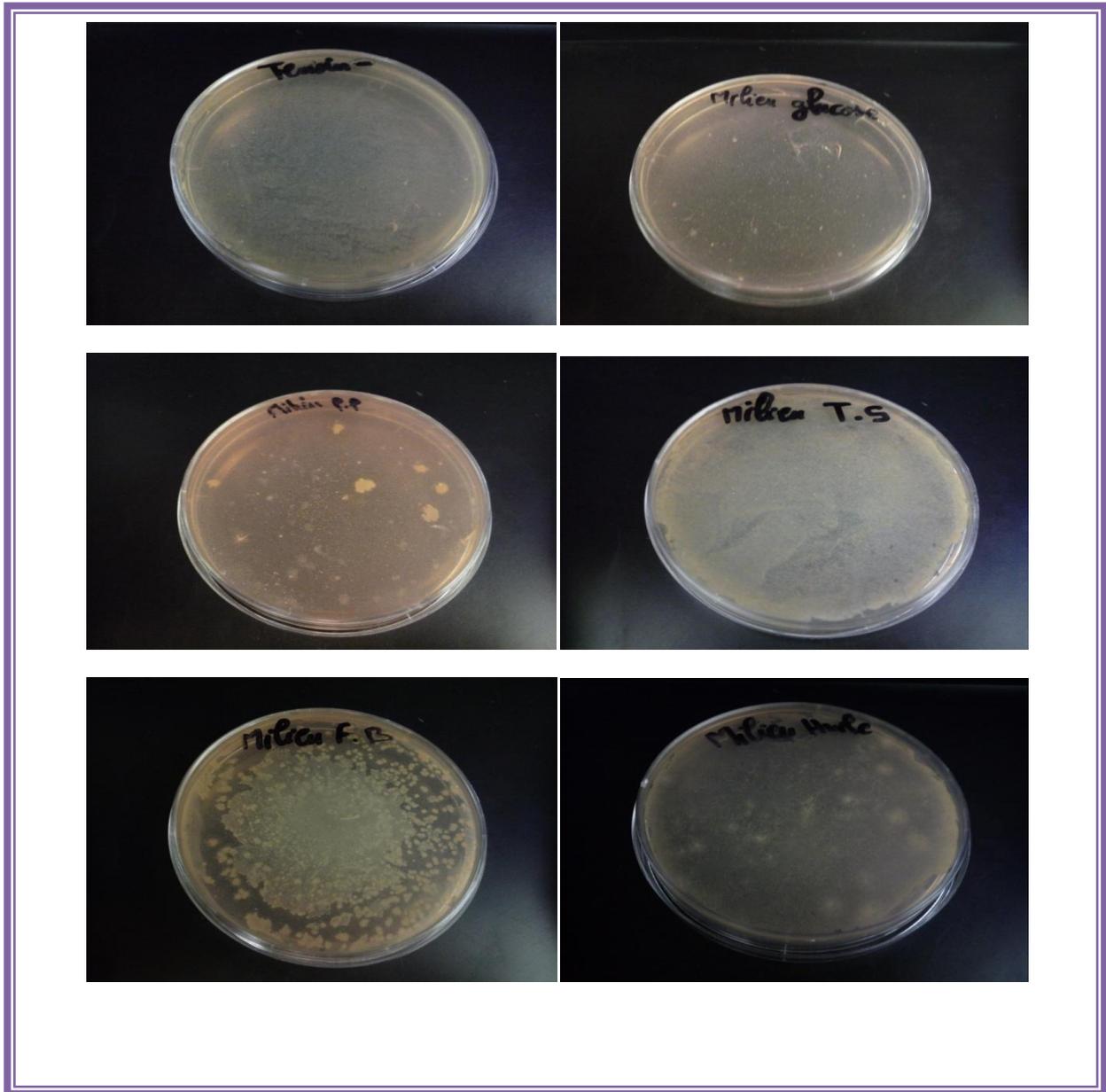
Nous remarquons d'après le **Tableau XII** que les cinq milieux représentent un effet moussant avec des valeurs variables dont on a constaté que le meilleur milieu est celui à base de pattes de poulet.

Cela peut nous amener à dire qu'il contient le biosurfactant, le E<sub>24</sub> en témoigne dans la **Figure 20** et vient appuyer notre remarque.

Les biosurfactants présentent plusieurs avantages par rapport aux surfactants chimiques, ils présentent un pouvoir moussant très important (Razafindralambo *et al.*, 1996) et une stabilité à des températures, pH et salinité extrêmes (Kretschmer *et al.*, 1982 ; Velikonja et Kosaric, 1993).

**V.7. Test de gélose au sang**

Après avoir réalisé ce test nous avons eu les résultats représentés dans la Figure suivante :



**Figure 23 : Résultats de la gélose au sang.**

La réalisation de ce test apporte les résultats cités dans les photographies de la **Figure 23**. Ces résultats montrent qu'il y a eu une croissance bactérienne en raison de la présence de colonies sur les boîtes de Pétri. Cependant, il n'y a pas formation d'halos ce qui indique l'absence d'une activité hémolytique.

Les travaux de Rodrigues *et al.* (2005) ont montré la présence d'une activité hémolytique en travaillant avec la souche *Lactobacillus* strains sur la production des biosurfactant.

Par ailleurs, nos résultats ont montré le contraire, ce qui nous conduit à dire que soit le sang utilisé dans la préparation de la gélose au sang est de mauvaise qualité, ou bien le biosurfactant produit n'a pas d'activité hémolytique.

### V.8. Etude de l'effet anti bactérien

Après l'incubation des différentes souches bactériennes avec des disques imbibés avec les biosurfactants issus des cinq milieux de culture, les résultats obtenus sont consignés dont on remarque l'activité sur certaines souches comme nous le montre le **Tableau XIII**.

**Tableau XIII: Activité antimicrobienne des biosurfactants produit sur certaines souches bactériennes.**

Biosurfactant produit dans le milieu à base de glucose		
Concentrations	Souches testées	Diamètre d'inhibition (cm)
5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,85 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,75± 0,05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0,7± 0,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
2,5g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,8± 0,00
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,7± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
1 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,65± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
0,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0

Biosurfactant produit dans le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie		
Concentrations	Souches testées	Diamètre d'inhibition (cm)
5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	1,65 ± 0,15
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,85 ± 0,05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0,7 ± 0,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
2,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	1,45 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,65 ± 0,05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0,7 ± 0,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
1 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,95 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,65 ± 0,05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
0,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,85 ± 0,15
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
Biosurfactant produit dans le milieu à base des margines d'huile d'olive		
Concentrations	Souches testées	Diamètre d'inhibition (cm)
5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,95 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
2,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,9 ± 0,1
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
1 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,85 ± 0,5
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
0,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,7 ± 0,1
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8 ± 0,1
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0

Biosurfactant produit dans le milieu à base de têtes de sardine		
Concentrations	Souches testées	Diamètre d'inhibition (cm)
5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,8 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,7 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,85 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i>	1,05 ± 0,05
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 ± 0,00
2,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,85 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,8 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	1,05 ± 0,05
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,9 ± 0,00
1 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0,8 ± 0,1
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,7 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0,95 ± 0,05
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,8 ± 0,00
0,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	1,1 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,65 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i>	0,75 ± 0,05
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0
Biosurfactant produit dans le milieu à base de pattes de poulet		
Concentrations	Souches testées	Diamètre d'inhibition (cm)
5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,65 ± 0,05
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,3 ± 0,00
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,6 ± 0,00
2,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,75 ± 0,05
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,6 ± 0,00
1 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,6 ± 0,00
0,5 g/l	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC	0,6 ± 0,00
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,6 ± 0,00

D'après les résultats du **Tableau XIII**, on constate que les biosurfactants produits dans les différents milieux ont une activité anti microbienne. Le milieu glucose présente une activité anti microbienne à des concentrations différentes (5g/l, 2,5g/l, 1 g/l) sur la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, et une activité exercée par la solution mère contre les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Absence d'activité sur la souche *Klebsiella pneumoniae*.

Le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie présente une activité anti microbienne à des concentrations différentes (5 g/l, 2,5 g/l, 1 g/l et 0,5 g/l) sur les souches suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, et une activité à des concentrations initiale (5 g/l) et 2,5 g/l sur les souches suivante : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Absence d'activité sur la souche *Klebsiella pneumoniae*.

Le milieu à base des margines d'huile d'olive présente une activité anti microbienne à des concentrations différentes (5 g/l, 2,5 g/l, 1 g/l et 0,5 g/l) sur les souches suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus*. Alors qu'il ne présente aucune sur les souches suivantes : *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae*.

Le milieu à base de têtes de sardine présente une activité anti microbienne à des concentrations différentes (5 g/l, 2,5 g/l, 1 g/l et 0,5 g/l) sur les souches suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300; *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Il exerce, par ailleurs, une activité sur la souche *Klebsiella pneumoniae* mais uniquement aux concentrations suivantes : (5 g/l, 2,5 g/l et 1 g/l).

Le milieu à base de pattes de poulet présente une activité anti microbienne à des concentrations différentes (5 g/l, 2,5 g/l, 1 g/l et 0,5 g/l) sur les souches suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922 ; *Klebsiella pneumoniae* et une activité à des concentrations de 5 g/l et 2,5 g/l sur la souche *Staphylococcus aureus*. Par contre, il y a absence d'activité sur les souches suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Escherichia coli*.

Quelques biosurfactants comme les lipopeptides produit par *Bacillus licheniformis* BAS50 (Yakmov *et al.*, 1995), les glycolipides élaborés par *Streptococcus thermophilus* A (Rodriguez *et al.*, 2006), et les glycolipides synthétisés par *Tsukamurella* sp. (Lang *et al.*, 2006) ont été rapportés comme présentant une activité antibactérienne, certains présentent une activité antivirale (Benincasa *et al.*, 2004 ; Haba *et al.*, 2002) comme les rhamnolipides

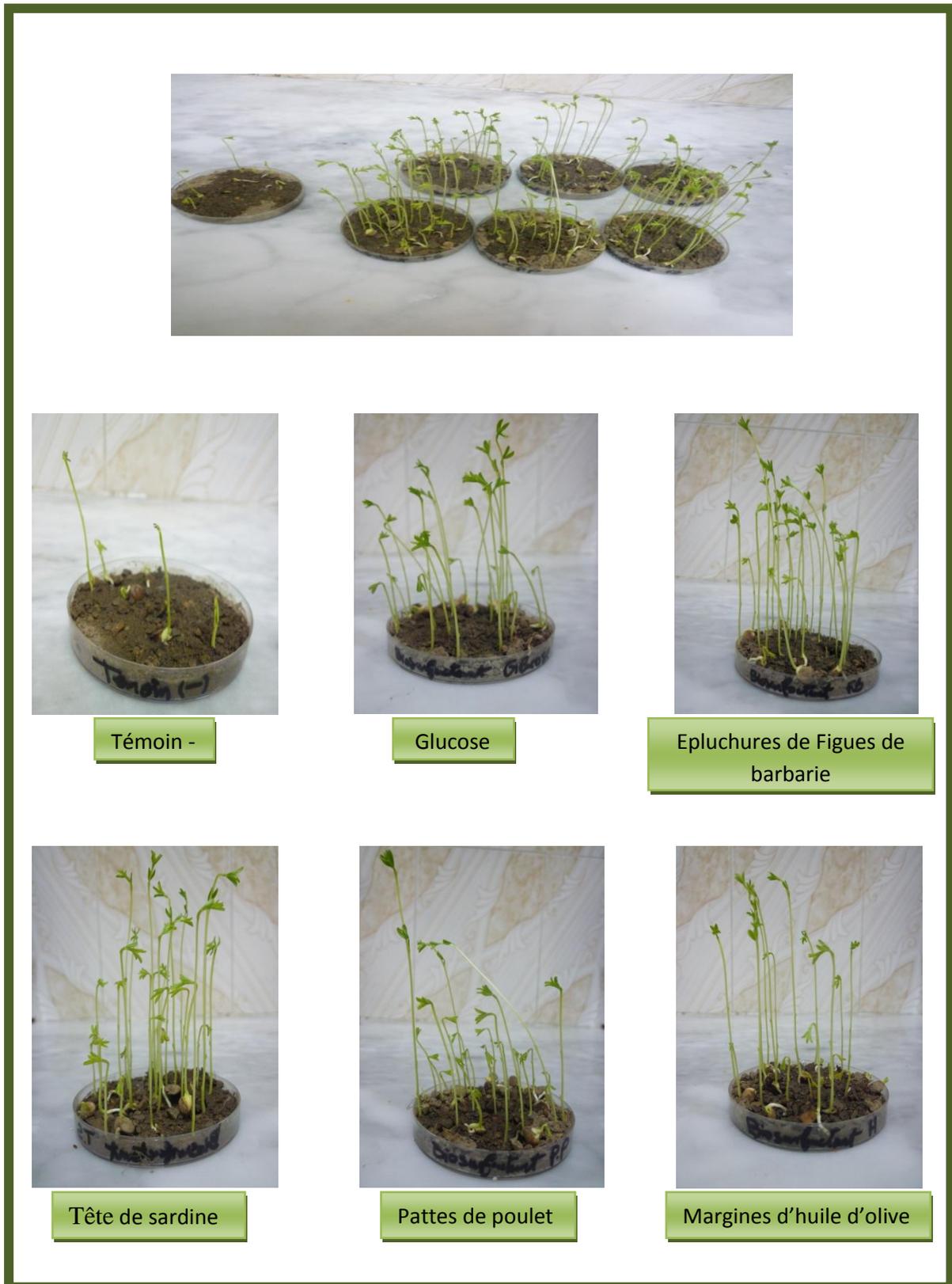
produit par *Pseudomonas aeruginosa* B189 (Thanamsub *et al.*, 2006), alors que d'autres peuvent changer la différenciation des cellules mammaires (Kitamoto *et al.*, 2002).

#### V.9. Etude de l'effet sur la croissance des lentilles (*Lens culinaris*)

Après avoir réalisé notre test semis des graines et arrosage pendant 8 jours avec la solution du biosurfactant de chaque milieu préalablement préparée, soumis aux mêmes conditions de croissance, nous avons mesuré la hauteur des tiges obtenues (**Tableau XIV**).

**Tableau XIV: Résultats des mesures de la hauteur des plantes pour le test de croissance.**

Biosurfactant extrait à partir du milieu	Témoin négatif (eau distillée)	Glucose	Epluchures de figues de barbarie	Pattes de poulet	Têtes de sardine	Margines d'huile d'olive
Hauteurs moyennes des plantes (cm)	2,3 ±2,03	5,51 ±2,79	7,33 ±3,01	5,57 ±2,84	7,09 ±2,84	5,24 ±4,05



**Figure 24 : Photographies représentatives des résultats de test de croissance pour les lentilles**

A partir des résultats de la **Figure 24** on a remarqué que les graines semés et arrosés pendant 8 jours avec les biosurfactants issues des différents milieux ont poussé de manière très importantes, et ce, par rapport au témoin négatif.

Cette poussée importante est surtout observé pour les boîtes arrosées par le biosurfactant issue du milieu à base d'épluchures de figues de barbarie qui atteint une hauteur moyenne de 7,33 cm, suivie de celui à base de têtes de sardines, pattes de poulet, glucose et margines d'huile d'olive en dernier.

D'après cette étude nous avons constaté que le biosurfactant a un effet actif sur la croissance des graines de lentilles.

Certaines bactéries sont par exemple capables de solubiliser le phosphore présent dans les sols ce qui est un grand avantage pour améliorer la croissance des plantes. Ces bactéries appartenant à différentes espèces, telles que *Pseudomonas* sp. ou *Bacillus* sp. synthétisent des enzymes spécialisées dans la solubilisation du phosphate organique ou inorganique (Faessel *et al.*, 2014).

D'autres bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont spécialisées dans la solubilisation du potassium à partir de minéraux. Les ions Fer libres peuvent aussi être séquestrés par des chélateurs particuliers nommés sidérophores produits par certaines bactéries comme les *Pseudomonas* sp. les rendant ainsi plus disponibles pour les plantes (Faessel *et al.*, 2014).

Dans l'étude portant sur la lutte biologique de moisissures les antagonistes les mieux connue appartiennent au *Pseudomonas* sp. ou *Bacillus* sp. le fonctionnement diffère selon l'antagoniste et repose sur un ou plusieurs mécanismes, dont la production d'antibiotique et de biosurfactant, la compétition de nutriment ou leur place, la résistance induite et le mycoparasitisme (Bertrand, 2010).

Les résultats obtenus dans la présente étude permettent de suggérer que le biosurfactant produit par la souche *Pseudomonas* sp. testée agirait comme agent solubilisant de la matière minérale facilitant ainsi sa captation par les racines de la plante testée.

Cependant, une mort programmée (apoptose) des cellules chez les plantes est observé avec forte doses de rhamnolipides (Samaï *et al.*, 2016).

*Conclusion*

## Conclusion et perspectives

---

L'objectif de notre travail de recherche est l'étude de la cinétique de la production des biosurfactants par une souche *Pseudomonas* sp. incubée dans des différents milieux de culture à faible valeurs marchandes, préparés à partir de déchets végétaux (épluchures de figes de barbarie, margines de l'huile d'olive) et animaux (têtes de sardine et pattes de poulet).

La culture de *Pseudomonas* sp. dans le milieu à base d'épluchures de figes de barbarie comme substrat a permis la production d'une quantité importante de biosurfactant (13,3g/l) ayant un bon index d'émulsion (45%).

Le test de capacité de nettoyage du biosurfactant a permis d'avoir un effet nettoyant plus élevé pour le biosurfactant produit à partir du milieu à base d'épluchures de figes de barbarie avec un rapport Hn/Ht= 90% pour l'huile usée et 80% pour l'huile neuf, ce qui reflète que le biosurfactant jouent un rôle important dans la capacité de nettoyage.

Pour le test du pouvoir moussant les cinq milieux représentent un effet moussant avec des valeurs variables dont on a constaté que le meilleur milieu est celui à base de pattes de poulet ( $58,97\% \pm 2,22$ ).

L'effet de l'activité antibactérienne des biosurfactant contres les 5 souches bactériennes a était étudié, les résultats obtenus indique la présence d'un effet anti-bactériens des rhamnolipides produits par le genre *Pseudomonas* sp. pour tout les milieux surtout sur les deux souches : *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Staphylococcus aureus*.

L'étude de l'effet du biosurfactant sur la croissance des lentilles (*Lens culinaris*) s'est révélée positif vis-à-vis du témoin négatif surtout pour les lentilles arrosé avec le biosurfactant issus du milieu à base d'épluchure de figes de barbarie qui atteint une hauteur de  $7,33 \text{ cm} \pm 3,01$ . Ces résultats confirment l'importance des biosurfactant dans l'amélioration de la croissance des plantes.

Le biosurfactant produit à partir de la souche étudiée dans ce travail pourrait servir comme agent de lutte biologique dans les sites pollués par les hydrocarbures, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, comme agent stimulant de la croissance végétale à faible concentration, comme agent moussant (exemple industrie cosmétique).

## Conclusion et perspectives

---

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

- L'optimisation des paramètres de culture en faisant appel aux plans d'expériences telle que la méthode des surfaces de réponses.
- Une approche moléculaire par le séquençage de l'ARN 16S de la souche isolée aiderait à déterminer de façon précise leur affiliation phylogénique.
- La réalisation d'analyses qualitatives des hydrocarbures après leur biodégradation par la souche étudiée.
- Evaluation de la toxicité des biosurfactants.
- En fin, il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs à grande échelle, et ce, dans la perspective d'améliorer les rendements de production.

*Références  
bibliographique*

## Références bibliographiques

---

1. **Abalos A., Maximo F., Manresa M.A. et Bastida J. (2002).** Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT 10. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 777-784.
2. **Abalos A., A. Pinazo, M. R. Infate, M. Casals, F. Garcia et Manresa A. (2001).** Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir*, 17(5): 1367-1371.
3. **Akmouci-Toumi S. (2009).** Contribution à l'étude des boues de forage: Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Mémoire de Magister Biochimie et microbiologie appliquée. Université M'hamad Bougara Boumerdès. 109p.
4. **Al-Arajil., Abd Rahman R.N.Z.R., Basri, Salleh M.A.B. (2007).** *Minireview: Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Bio. Biotechnol.*, Vol. 15 No.3, p. 99-105.
5. **Amiriyan A., Assadi M.M. et Saggadian V.A. (2004).** Bioemulsan production by Iranian oil reservoirs microorganisms. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* 2 : 28-35.
6. **Arima K., A. kakinuma and Tamura G. (1968).** Surfactine, a crystalline peptid lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 488-494.
7. **Arino S. (1996).** Production de biosurfactants glycolipidiques par les bactéries de l'environnement : « Diversité et rôle physiologique» thèse de doctorat de l'institut national agronomique de Paris Grignon, 200 p.
8. **Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P. (1996).** Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by *Pseudomonas sp.* *Appl. Microbial. Biotechnol.* 45: 162-168.

## Références bibliographiques

---

9. **Bai G., Brusseau M. L. et Miller R.M. (1997).** Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, *J. Contam. Hydrol.*, 25. 157-170.
10. **Bai G., Brusseau M.L. et Miller R.M. (1998).** Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by biosurfactant, *J. Contam. Hydrol.*, 30: 265-279.
11. **Banat I.M. (1995).** Biosurfactants Production And Possible *Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oil Pollution Remediation: A Review*. *Bioresource Technol.* Vol. 51, p. 1-12.
12. **Banat I.M. (2000).** Les biosurfactants plus que jamais sollicités. *Biofutur ; mensuel Européen de biotechnologie*, 198 : 40-46.
13. **Banat I.M., Samarah N., Murad M., Horne R & Benerjee S. (1991).** Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World journal of microbiology and biotechnology*. 7; pp 80-84.
14. **Benincassa M., Abalos A., Oliveira I. et Manresa A. (2004).** Chemical structure, surface properties, and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonio Van Leeuwenhoek*, 85: 1-8.
15. **Benincasa M. et Accorsini F.R. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate, *Bioresource Technology*, 99: 3843–3849.
16. **Bergstroïm S., H. Theorell et David H. (1946).** On a metabolic product of *Ps. Pyocyanæ*, pyolopic acid active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ark. Ken. Mineral. Geol.*23: 1-12.
17. **Bernheimer et Avigad (1970).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud

## Références bibliographiques

---

- Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P. 47.
- 18. Bertrand C. (2010).** Etudes des pesticides Organiques d'origines Naturelles. Laboratoire de chimie des biomolécules et de l'environnement.
- 19. Bodour A.A., Gerrero-Barajas C. et Maier M. (2004).** Structure and Characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by *Flavolipid* sp. strain MTN11. *App. And Env. Microbiol.*, 10(6): 1114-20.
- 20. Bognolo G. (1999),** Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152: 41-52.
- 21. Boothroyd (1956).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P.46.
- 22. Boulal A., Benbrahim Z., Benali B et Ladjel S. (2013).** Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud-Ouest de l'Algérie. *Revue des Energies Renouvelables* Vol.16 N°3 :539-550.
- 23. Bourdon J.L. et Marchal N. (1973).** Techniques bactériologiques. Doin éditeurs, Paris.
- 24. Brodrick et Cooney.** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P.80.

## Références bibliographiques

---

25. Calvo C., Manzanera M., Silva-Castro G.A., Uad I. et Gonzalez-Lopez J. (2009). Application of Bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of totale environment, 407: 3634-3640.
26. Cameotra S.S. et Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50 : 520-529.
27. Cameotra S.S., Singh P., 2009. Synthesis Of Rhamnolipid Biosurfactant And Mode Of Hexadecane Uptake By *Pseudomonas* species, Microb Cell Fact. Vol. 8, N°. 16.
28. Cedou C. (2013). Mobilisation des lentilles de flottant (HC) par biolavage. GTS-intersol. P.20.
29. Cha M., Lee N., Kim M., Kim M. et Lee S. (2007). Heterologous production of *Pseudomonas putida*. Bioresour. Technol. 99: 2192-2199.
30. Chabouni S. (2008). Essai d'utilisation des souches bactériennes dans la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures « pétrole ». mémoire de DES Microbiologie. Université Kasdi Merbah Ourgla. P.78.
31. Chen S.Y., Lu W.B., Wei Y.H., Chen W.M. et Chang J.S. (2007). Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. Biotechnol. Prog. 23: 661-666.
32. Costa S.G.V.A.O., Nitschke M., Haddad R., Eberlin M.N. et Contiero J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. Process Biochemistry, 41: 483-488.
33. Daniels C.J., J. D. Hofman, J.G. Mac William, W. F. Doolittle, C. R. Woese, K.R. Luehrsen, & G.E., Fox. (1999). Sequence of 5S ribosomal RNA genre regions and their products in the *Harchaebacterium volcanii*. Mol Gen Genet 198: 270-274.

## Références bibliographiques

---

- 34. Das P., Mukherjee S. et Sem R. (2009).** Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour. Technol.* 100: 1015-1019.
- 35. Dashti N., Al-awadhi H., Khanafer M., Abdelghany S., Radwan S. (2008).** Potential Of Hexadecane-Utilizing Soil-Microorganisms For Growth On Hexadecanol, Hexadecanal And Hexadecanoic Acid As sole Sources Of Carbon And Energy, *Chemosphere*, 70: 475-479.
- 36. Desai J. D., Banat I.M. (1997).** *Microbial Production Of surfactants And Their Commercial Potential*, *microbial. And mol. Biol. Reviews*, 61: 47-64.
- 37. Deschenes L., Lafrance P., Villeneuve J. P. et Samson R. (1996).** Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 : 638-646.
- 38. Djenane D., Lefsih K., Yanguela J., Roncales P. (2011).** Composition chimique et activité anti-*Salmonella enteritidis* CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* ; de *Lavandula angustifolia* et *Satureja hortensis*. Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ . *Phytothérapie*, 9 : 343-353.
- 39. Edwards K.R. et Hayachi. (1965).** Structure of rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111: 415-421.
- 40. Faessel L., Gomy C., Nassr N., Tostivint C., Dechanteloup A. (2014).** Produits de stimulation en agriculture visant à améliorer les fonctionnalités biologiques des sols et des plantes- études des connaissances disponibles et recommandation stratégiques. 156 : 53-67.
- 41. Fiechter A. (1992),** biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, 10: 3-12.

## Références bibliographiques

---

42. **Francy D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond, C.H. Ward. (1991).** Emulsification hydrocarbon by surface bacteria. *J. Industrial Microbiol*, 8: 237-46.
43. **Gabet S. (2004).** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse se doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de L'eau, p. 177.
44. **Georgiou G., Lin S et Sharma M. (1992).** Surface-active compounds from micro-organismes. *Biotechnol.* 10; pp 60-65.
45. **Grangermard I., J.M. Bonmatin, J. Bernillon, B.C. Das et Peypoux F. (1999).** Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307: Production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *J. antibiot*, 4: 363-373.
46. **Guerra-Santos L., Cappelli O. et Fiechter A. (1986).** Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol. Biotechnol*, 24 : 443-448.
47. **Guerra-Santos L.H., Käppeli O. et Fiechter A. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol*, 48 : 301-305.
48. **Gunther N.W., Nunez A., Fett W. et Solaiman D.K. (2005).** Production of rhamnolipids by *pseudomonas chlororaphis*, a non-pathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2288-2293.
49. **Haba E., Espuny M.J., Busquets M., et Manresa A. (2000).** Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 379-387.

## Références bibliographiques

---

- 50. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M. J., Infante M. R. et Manresa A. (2003).** Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (3): 316-322.
- 51. Haferburg D., Hommel R., Claus R et Kleber H.P. (1986).** Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 33; pp 53-93.
- 52. Haigh S.D. (1996).** A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment*, 185: 161-170.
- 53. Hamme et al. (2006).** Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Mémoire de magister Ecologie Microbienne. Université Mentouri de Constantine. P. 14.
- 54. Haskins (1950).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P. 46.
- 55. Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R. (1996),** Microbial production of biosurfactants, *Ressources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
- 56. Herry et Bellon-Fontaine (2001).** Biosurfactants, surface-active biomolecules with wide potential application. *International Journal of food science and Technology* Vol. 21; N°. 6.
- 57. Hisatsuka K., T. Nakahara, N. Sano and Yamada K. (1971).** Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem.*, 35 : 686-692.

## Références bibliographiques

---

- 58. Hori K., Marsudi S. et Unno H. (2002).** Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 699-707.
- 59. 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*, Vol. 101, p. 317-323.
- 60. Hultberg M., Bergstrand K.J., Khalil S., Alsanusi B. (2008).** Characterisation Of Biosurfactant-Producing Strains Of Fluorescent *Pseudomonas* In A Soilless Cultivation System, *J. Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol. 94, p. 329-334.
- 61. Jarvis S.G. et Johnson M.J. (1949).** Glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem.* 73: 4124-4126.
- 62. Jain et al. (1991).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P. 40.
- 63. Karanth N.G.K., Deo P.G., Veenanadig N.K. (1999).** Microbial Production Of Biosurfactants And Their Importance, *Current science*, Vol. 77, N°. 1, p. 166-126.
- 64. Kawashima et al. (1983).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P. 46.

## Références bibliographiques

---

- 65. Khemili S. (2008).** Identification de deux archaebactéries halophiles isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Biochimie et Microbiologie appliquées. Université M'Hamed Bougara Boumerdes. 168p.
- 66. Kilic E. (2013).** Evaluation of degreasing process with plant derived biosurfactant for leather making: An ecological approach. *Tekstil Ve Konfeksiyon* 23: 181-187.
- 67. Kitamoto D., Akiba S., Hioki C. et Tabuchi T. (1990).** Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida Antarctica*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1-36.
- 68. Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T. (2002).** Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 187-201.
- 69. Koch A.K., Käppemi O., Fiechter A. et Reiser J. (1991).** Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants, *Journal of bacteriology*, 173 (13): 4212-4219.
- 70. Kosaric N., Gray N.C.C., Cairns W.L. (1983).** Microbial Emulsifiers And De-emulsifiers, p. 575-592. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, **Vol. 3**. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla.
- 71. Krepsky N., Da Silva F. S., Fontana L.F., Crapez M.A.C. (2007).** Alternative Methodology For Isolation Of Biosurfactant-Producing Bacteria, *Braz. J. Biol.*, Vol. 67, N°. 1, p. 117-124.
- 72. Kretschmer A., Bock H. and Wagner F. (1982).** Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Appl. Environ. Microbiol*, 44 : 864-870.

## Références bibliographiques

---

- 73. Lang S. et Wullbrandt D. (1996).** Rhamnose-lipids-biosynthesis, Microbiol production and application potentiel. App. Microbiol. Biothechnology. Vol. 51; N°. 1; pp 22-32.
- 74. Lang et Wullbrandt (1999),** Rhamnose lipids biosynthesis-Microbial production and application potential, Appl. Microbiol. Biotechnol, 51 : 22-32.
- 75. Langer O., O. Palme, V. Wray, H. Tokuda et Lang S. (2006).** Production and modification of bioactive biosurfactants. Process biochemistry, 41: 2138-2145.
- 76. Larpent C. (1995).** Tensio-actifs. Techniques de l'ingénieur traité constantes physico-chimiques K 342; pp 1-13.
- 77. Laurila M.A. (1985).** Biosurfactants production by mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Department of biotechnology, Swiss Federal Institut of technology Zurich, Switzerland. Pp 1-10 (117 p).
- 78. Lemieux et al. (1951).** Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P. 46.
- 79. Lotfabad. B., Shourianm., Roostaazadr., Najafabadia. R., Laurent P., Buchon L., Guespin-Michel J.F. et Orange N. (2009).** Production of pectatylases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 66:1538-1543.

## Références bibliographiques

---

- 80. Lovaglio R.B., Dos-Santos F.J., Junior M.J., Contiero J. (2011).** Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 85: 301-305.
- 81. Makkar R.S. et Cameotra S.S. (2002),** An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.
- 82. Marcou L. (1989).** Les applications des agents de surfaces. Dans les phénomènes d'interfaces : Agents de surface, principe et mode d'action. (350 p).
- 83. Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda A. J., Teruel J. A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M. J. (2009).**The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By *Rhodococcus erythropolis* 51T7, *Chem. Phy. Lip.* Vol. 158, p. 110-117.
- 84. Mata-Sandoval J.C., J. Kams et Torrents A. (2000).** Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (23): 4923-4930.
- 85. Matsufuji M., Nakata K. et Yoshimoto A. (1997).** High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* 19: 1213-1215.
- 86. Mc cray J.E., Bai G., Maier R.M. et Brusseau M.L. (2001).** Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures, *J. Contam. Hydrol.*, 48: 45-68.
- 87. Mercade M. E. et Manresa M.A. (1994).** The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, *J. A. O. C. S.*, 71(1): 61-64.
- 88. Meylheuc T., Herry J.M., Bellon-Fontaine M.N. (2001).** Les biosurfactants, des Biomolécules A forte Potentialité D'application, *J. Sciences des aliments* Vol. 21, N°.6, p. 591-649.

## Références bibliographiques

---

- 89. Mimouni (1995).** Sélection des souches bactériennes productrices de biosurfactant à partir de sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport d'avancement N° 1 ; pp 1-25.
- 90. Mint El Moukhtar S. (2010).** Etude des réponses physiologique et métabolique de dix variétés de riz (*Oryza sativa* L.) aux premiers stades de développement vis-à-vis du stress salin. Faculté des sciences et techniques département de chimie, p39.
- 91. Mohammed A.A. (1997).** Study on biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganism(s) (Ph.D. thesis), Botany Dept. Faculty of Girls, for arts, science and education, Ain shams University.
- 92. Mulligan C. N. (2009).** Recent Advances In The Environmental Application Of Biosurfactants, Current Opinion in Colloid & Interface Science, **Vol. 14**, N° 5, p.372-378.
- 93. Mulligan C.N. et Gibbs B.F. (1989).** Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3016-3019.
- 94. Nerurkar A.S., K.S. Hingurao, et al. (2009).** "Bioemulsifiers from marine microorganisms". J Sci Ind Res 68:273-277.
- 95. Nitschke M., Costa S.G. et Contiero J. (2005).** Rhamnolipid surfactant : an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. Biotechnol. Prog. 21: 1593-1600.
- 96. Ochsner A., Reiser J., Fiechter A., Witholt B. (1995).** Production Of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants In Heterologous Hosts, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 61, N° 9, p. 3503-3506.

## Références bibliographiques

---

- 97. Ould El Hadj M.D., Bitour Z. et Siboukeur O. (2006).** Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivée surmount de dates. Courrier du savoir. N°07, pp. 13-18.
- 98. Parra J.L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M.E. Mercadé, F. Comelles and M.P. Bosch. (1989).** Chemical characterisation and physicochemical behaviour of biosurfactants. J. Am. Oil Chem. Soc. 66: 141-145.
- 99. Patel R.M. et Desai A.J. (1997).** Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. J. Basic Microbiol. 37: 281-286.
- 100. Pennell K.D., Abriola L.M. et Weber W.J. (1993).** Surfactant-enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1- Experimental Investigation. Environ. Sci. Technol., 27 (12): 2332-2340.
- 101. Peypoux F., Bonmatin J.M et Wallach J. (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review App. Microbiol. Biotechnol. 51. Pp: 553-563.
- 102. Pore J. (1992).** Les agents de surface. Chapitre. 1. Dans Micro-émulsions, Emulsions multiples, Agents de surface. (270 p).
- 103. Prabhu Y., Phale P. (2003).** SB PP2 Novel Metabolic Pathway, Role Of Biosurfactant And Cell Surface Hydrophobicity In Hydrocarbon Assimilation. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 61, p. 342-351.
- 104. Prommachan O. (2002).** Production And application Of Biosurfactant From Bacillus MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thaïland, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants.
- 105. Pruthi V., Cameotra S.S. (1995).** Rapid Method For Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained By Acetone Precipitation, Biotechnol. Techniq. Vol. 9, p. 271-276.

## Références bibliographiques

---

106. Pruthi, V., Cameotra, S.S. (2000). Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. *Journal of Surfactants and Detergents* 3, 533-537.
107. Rahman K.S.M., Rahman T.J., MCCLEAN S., Marchant R. et Banat I.M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol Prog*, 18: 1277-81.
108. Ratledge, C., Wilkinson, S.G. Wilkinson. (1988). Fatty acids, related and derived lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds), *Microbial lipids*, Vol. 1. Academic Press, London, pp: 23-53.
109. Raza Z. A., Rehman A., Khan M.S. et Khalid Z.M. (2007). Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation*, 18:115-121.
110. Razafindralambo H., M. Paquot, A. Baniel, Y. Popineau, C. Hbid, P. jacques et Thonart P. (1996). Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J.Am. Oil Chem. Soc.* 73 : 149-151.
111. Reiling et al. (1986). Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites. Mémoire de magister Biochimie et microbiologie appliquées. Université M'hamed Bougara Boumerdes. P.55.
112. Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. et Guinea J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett*, 11(12): 871-874.

## Références bibliographiques

---

113. **Rocha M.V.P., Souza M.C.M., Benedicto S.C.L., Bezerra M. S., Macedo G.R., Saavedra Pinto G.A., et Gonçalves L.R.B. (2007).** Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice. Applied Biochemistry and biotechnology, 136-140.
114. **Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006).** Biosurfactants: Potential Application In Medicine, J. Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 57, N°4, pp. 609-618.
115. **Rodrigues L., Moldes A., Teixeira J., Oliveira R. (2005).** Biosurfactants production by *Lactobacillus* strains. Biochemical Engineering Journal. 28: 109-116.
116. **Rodriguez L., J.A. Teixeira, H.C. Van Der Mei et Oliveira R. (2006).** Isolation and partial characterisation of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 53: 105-112.
117. **Ron E.Z. et Rosenberg E. (2002).** Biosurfactants and oil remediation, Current Opinion in Biotechnology, 3: 249-252.
118. **Rosenberg E. (1993).** Exploiting Microbial Growth On Hydrocarbon: New Markets. Trends Biotechnol. Vol.11, p. 419-424.
119. **Rosenberg E. et Ron E.Z. (1999).** Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new Markets. Trends Biotechnol, 11: 419-424.
120. **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. Vol. 7, N°. 7, p. 1266-1269.
121. **Samai H.C., Rioult D., Haudrechy A., Garcia P.M., Geba E., Sommé A., Ongena M., Bouquillon S., Dorey S. et Betoulle S. (2016).** Contribution à l'évaluation a priori des risques immuno-toxiques associés aux composés biosourcés d'origines microbiennes- cas des rhamnolipides. GFP. 20 :4-5.

## Références bibliographiques

---

122. **Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Santos A.S., Pereira N.Jr. et Freire D.M.G. (2002).** Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. Braz. J. Chem. Eng. 19: 159-166.
123. **Santos S.C.D., Fernandez L.G., Rossi-Alva J.C., et Roque M.R.A. (2010).** Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. African Journal of Biotechnology. 9 (35): 5704-5711.
124. **Sarubbo L.A., De Luna J.M., De Campos-Takaki G.M.,** Production And Stability Studies Of The Bioemulsifier Obtained From A New Strain Of *Candida glabrata* UCP 1002, Elect. J. Biotech. July 2006. Vol. 9 N°. 4 ISSN: 0717-3458.
125. **Satpute S.K., I.M. Banat, et al. (2010).** « Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms ». biotechnology Advance 28 (4) : 436-450.
126. **Savarino P., Montoneri E., Bottigliengo S., Boffa V., Guizzetti T., Perrone D., Mendichi R. (2009).** Biosurfactants From Urban Wastes As Auxiliaries For Textile Dyeing, Ind. & engin. Chem. Research Vol. 48, N°. 8, p. 3738-3748.
127. **Sifour M., Al-Jilawi M.H. et Aziz J.M. (2007).** Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB. Pak. J. Biol. Sci., 10 (8): 1331-1335.
128. **Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. (2010).** Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 79, 174-183.
129. **Singleton P. (2005).** Bactériologie: pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. 6<sup>ème</sup> édition. Dunod-Paris, p.480-490.

## Références bibliographiques

---

130. **Spencer J.F.T., D.M. Spencer and Tulloch A.P. (1979).** Extracellular glycolipids of yeasts. In *Economic Microbiology Biology, Secondary production of metabolisms*. *Economic Microbiology*, 3: 525-540.
131. **Spoeckner S., V. Wray, M. Nimtz et Lang S. (1999).** Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *App. Microbiol. Biotechnol*, 51: 33-39.
132. **Stuawer O., Hommel R., Haserburg D. et Leber K. (1987).** Production of a crystalline surface. Active glycolipids by a strain *Corynebacterium apycola*. *Biotechnol*, 6 : 259-269.
133. **Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F., Kittikun A. H. (2008).** Pruduction And Applications Of Biosurfactant From *Bacillus subtilis* MUV4, Songklanakarin J. Sci. Technol. Vol. 30, N°. 1, p. 87-93.
134. **Thanamsub B., Pumeechockchai W., Limtrakul A., Arunrattiyakorn P., Petchleelaha W., Nitoda T. et kanzaki H. (2006).** Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk waste.
135. **Thangamani S. et Shreve G.S. (1994).** Effect of anionic viosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (12): 1993-2000.
136. **Thoma S., Larpent J.F. et Larpent J.M. (1970).** *Microbiologie pratique*. Ed. Hermat, Paris, pp: 2-5.
137. **Van Dyke M.I., Couture P., Brauer M., Lee H. et Trevors J.T. (1993).** *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbial.*, 39: 1071-1078.

## Références bibliographiques

---

138. Vandecasteele J.P. (2008). Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, 816 p.
139. Velikonja J. et Kosaric N. (1993). Biosurfactant in food applications, p 19-446. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. Appl. Biochem. 23 : 13-18.
140. Venkata Ramana K. et Karanth N.G. (1989). Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. J.Chem. Tech. Biotechnol. 45: 249-257.
141. Vilimovsky M. (2015). Fiche technique des valeurs nutritive de pattes de poulet et sardines crue. <https://www.lepoulet.qc.ca/fr/information-nutritionnelle/valeurs-nutritives>.<https://www.lessardine.qc.ca/fr/information-nutritionnelle/valeurs-nutritives>.
142. Wagner F. et Lang S. (1996). Microbial and enzymatic synthesis of interfacial active glycolipids. 1: 124-137.
143. Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal, 27: 146-154.
144. Wu J.Y., Yeh K.L., Lu W.B., Lin C.L. et Chang J.S. (2008). Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. Bioresource Technology, 99: 1157-1164.
145. Xiaoyang L., Abbott N. L. (2009). Spatial And Temporal Control Of Surfactant Systems, J. Colloid and Interface Science, Vol. 339, p. 1-18.
146. Yakmov M.M., Timmis K.N., Wray V. and Fredrickson H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 1706-1713.

## Références bibliographiques

---

- 147.** Yin H., Qiang J., Jia Y., YE J., Peng H., Qin H., Zhang N. et He B. (2009). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*. 44: 302-308.
- 148.** Zajic J.E. et Mahomedy A.Y. (1984). Biosurfactants intermediate in the biosynthesis of Amphipathic molecule in microbes. Chapter six in *Petroleum microbiology*. Ed. Ronald N. Atlas. Pp: 221-281.
- 149.** Zajic J.E. et Seffens W. (1984). Biosurfactants. *CRC. Crit. Rev Biothechnol.* 1 ; pp 87-107.

# *Annexes*

## **Annexe I : Matériel utilisés**

### **1. Equipements**

- Etuve de 37°C (BINDER)
- Etuve de 105°C (memmert)
- Autoclave (Webeco)
- pH mètre (inoLab)
- Agitateur- plaque chauffante (VWR)
- Centrifugeuse à froid (SIGMA)
- Microscope photonique (hund WETZLAR)
- Four à moufle (Nabertherm )
- Balance (KERN EMB 1200-1)
- Bain marie (nüve bath)
- Spectrophotomètre UV-visible (BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO. LTD. (UK) VIS-7220G)
- Balance de précision (KERN 770)
- Réfrigérateur (ENIEM)
- Vortex
- Compteur de colonies
- Bec bunsen

### **2. Verrerie et matériel en plastique**

- Erlenmeyers de 50ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml, 2000 ml
- Bechers de 10ml, 20 ml, 50ml, 100ml, 250ml
- Boîtes de Pétri en plastique
- Pipettes graduées
- Pipettes pasteur
- Anse de platine
- Anse à boucle
- Tubes à essai
- Lame
- Pinces métallique

- Micropipette
- Cuvettes de spectrophotomètre
- Seringues stérile
- Coupelle en porcelaine pour le four à moufle
- Dessiccateur
- Barreaux magnétique
- Ecouvillons stériles

## **Annexe II : Milieux de culture et réactifs**

### A. Composition des milieux de culture

#### 1. Gélose nutritive :

<b>Ingrédients</b>	<b>Quantité</b>
<b>Extrait de viande</b>	1,0 g
<b>Extrait de levure</b>	2,5 g
<b>Peptone</b>	5,0 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5.0 g
<b>Agar</b>	15,0 g
<b>Eau distillé</b>	1000 ml
<b>pH</b>	7,0

#### **Préparation :**

28 g par litre (stérilisation à l'autoclave).

## 2. Bouillon nutritif

Ingrédients	Quantité
<b>Peptone</b>	5,00 g
<b>Extrait de viande de bœuf</b>	3,00 g
<b>Eau distillée</b>	1000 ml
<b>pH</b>	7,20

### Préparation :

20 g dans 1L d'eau distillée.

## 3. BHIB (Bouillon cœur-cervelle)

Ingrédients	Quantité
<b>Protéose-peptone</b>	10,0 g
<b>Infusion de cervelle de veau</b>	12.5 g
<b>Infusion de cœur de bœuf</b>	5,0 g
<b>Glucose</b>	2,0 g
<b>Chlorure de sodium</b>	5,0 g
<b>Hydrogénophosphate de Sodium</b>	2,5 g
<b>Eau distillée</b>	1000 ml
<b>pH</b>	7,4

### Préparation :

37 g par litre stérilisation classique.

#### 4. Milieu MH (Mueller-Hinton)

Ingrédients	Quantité
<b>Infusion de viande de bœuf</b>	300,0 ml
<b>Peptone de caséine</b>	17,5 g
<b>Amidon de maïs</b>	1,5 g
<b>Agar</b>	17,0 g
<b>Eau distillée</b>	1000 ml
<b>pH</b>	7,4

#### **Préparation :**

38 g par litre. Stérilisation à l'autoclave. Pour préparer ce milieu il faut peser 38 g de poudre et la mélanger dans 1L d'eau distillée. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 minutes à 120°C.

#### B. Réactifs et solutions

- Alcool
- Fuschines
- Violet de gentiane
- Solution lugol
- Huile à immersion
- Eau distillé
- Tartrate de sodium potassium
- DNS (acide 3,5- dinitrosalicylique)
- SDS (sodium dodecyl- sulfate)
- Solution NaOH à 2N
- Gasoil
- Solution HCL 6M
- BSA

- Phénol
- Méthanol
- Acide chlorhydrique
- Acide acétique
- Acide sulfurique
- Chloroforme
- bleu de coomassie
- Acide phosphorique 85%.

### C. Sels minéraux

Sels minéraux	Quantité
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1,6g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,4g
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,09g
<b>NaCl</b>	15g
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	3g
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,02g
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	0,01g
<b>FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0,05g
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	0,008g
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	0,003g
<b>CO (NO<sub>3</sub>)</b>	0,0026g

### **Annexe III : Méthode de dénombrement des suspensions bactériennes**

Dénombrement par élément d'une suspension bactérienne sur une surface d'un milieu gélosé

1. Préparer une suspension mère à partir d'une culture jeune de 18 h
2. Préparer plusieurs dilutions au 1/10, c'est-à-dire transvaser 1ml de la suspension mère dans 9ml d'un liquide physiologique stérile en tube à essai pour préparer la dilution  $10^{-1}$  et continuer ainsi pour les autres dilutions.

Bien agiter les suspensions avant de prélever les 1ml

Utilisation d'une pipette stérile de 1 ml pour la préparation de chaque dilution

3. Déposer 0,1ml de la suspension mère sur la surface d'une gélose nutritive stérile et sèche.
4. Utiliser un étaloire stérile pour étaler la suspension sur toute la surface de la gélose après avoir coulé les boîtes de Pétri.

Utilisation de la même pipette et le même étaloire si on commence par la dilution  $10^{-2}$  ensuite  $10^{-1}$  et à la fin la suspension mère.

Changement de la pipette et stérilisation de l'étaloire si on commence par la suspension mère.

5. Incubation de toutes les boîtes 24 heures à 37°C.

**Les résultats du dénombrement par étalement d'une suspension bactérienne sur une surface d'un milieu gélosé :**

Apparition de colonies sur les différentes boîtes avec un nombre qui diffère d'une boîte à une autre.

**Pour la détermination du nombre de colonies par millilitre de la suspension bactérienne :**

- ❖ Multiplier le nombre de colonies comptées sur la dilution retenue pour le dénombrement par 10 pour déterminer le nombre de colonies par ml si le volumeensemencé est de 0,1ml.
- ❖ Multiplier ensuite le nombre trouvé par le taux de dilution retenue pour calculer le nombre de colonies par ml de la suspension mère.
- ❖ L'équation à appliquer = nombre de colonies compte sur la boite retenue x volume total de la dilution qui a servi au dénombrement x taux de dilution (dans ce cas c'est 8).
  
- ❖ Expression des résultats :  
Comme une colonie peut provenir d'une seule cellule bactérienne ou de plusieurs cellules bactériennes, on exprime le résultat final par le nombre d'unités formant colonies par ml et non par cellules par ml.

**Annexe IV : Calcul de la densité apparente**

Dans un bécher de 20 ml de milieu de culture préparé est mis sur une balance numérique et on a mesuré son poids puis on calcul le rapport suivant :

$$\text{Densité apparente} = \frac{\text{masse volumique}}{\text{volume}}$$

## **Annexe V : Mesure de la masse de la matière fraîche, matière sèche et des cendres**

<b>Milieux de culture</b>	<b>Masse de la matière fraîche(g)</b>		<b>Masse de la matière sèche(g)</b>		<b>Masse de la cendre (g)</b>	
<b>Milieu à base de figue</b>	15,499	17,082	0,326	0,359	0.029	0.032
<b>Milieu à base de têtes de sardine</b>	15,23	16,93	0,430	0,483	0.040	0.046
<b>Milieu à base de pattes de poulet</b>	16,300	14,900	0,452	0,414	0.024	0.022
<b>Milieu à base des margines d'huile d'olive</b>	18,574		17,893		0,044	

## **Annexe VI : Protocole utilisé pour le dosage des protéines (méthode de Bradford)**

### **Préparation du réactif de Bradford**

12,5mg de bleu de Coomassie

12,5ml de méthanol

25ml d'acide phosphorique

212,5ml d'eau distillée

Mélanger l'acide phosphorique avec l'eau distillée, ajouter le méthanol puis les mélanger avec le bleu de Coomassie.

## Préparation de la solution de BSA

Solution mère de Sérum Albumine (BSA) à 2 g/l (2mg/ml), obtenue par la solubilisation de la BSA dans de l'eau distillée.

Dissoudre 40mg de BSA dans 20 ml d'eau distillée.

## Protocole expérimentale

### Préparation des dilutions de la BSA

Volume totale = 2 ml par dilution

N° tube	T1= 0	T2 = 0,25	T3 = 0,5	T4 = 1	T5 = 1,4	T6 = 2
[BSA] (ml)	0	0,25	0,5	1	1,4	2
Eau distillée (ml)	2	1,75	0,5	1	0,6	0

### Préparation de la gamme étalon

Nous utiliserons 6 points pour tracer la droite pour un volume total de 3,1 ml par échantillon

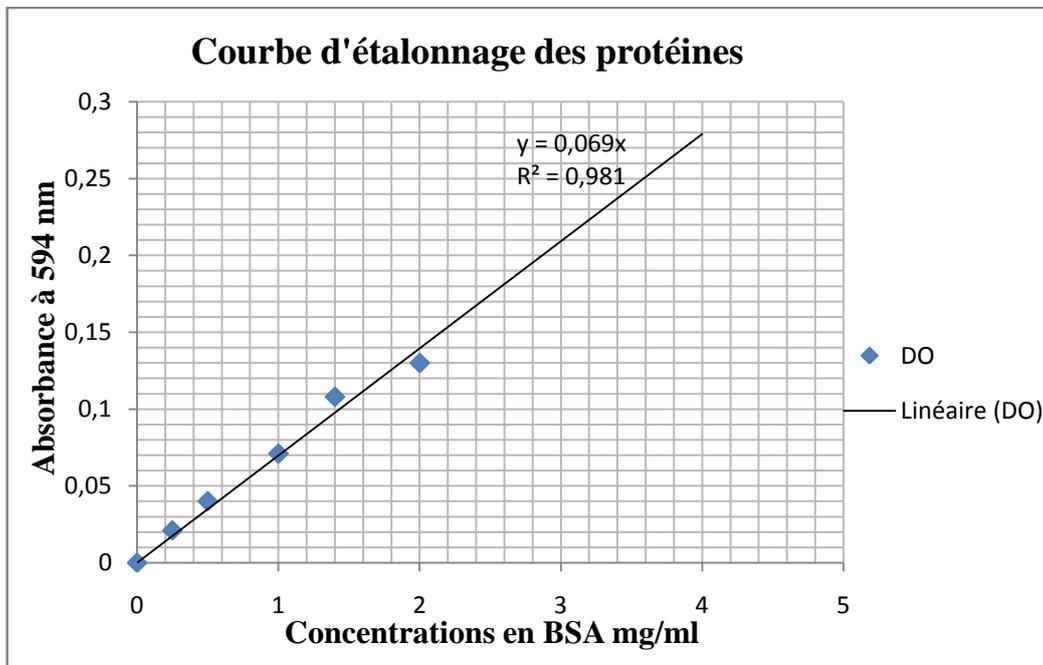
N° tube	Volume BSA en ml	[BSA] (mg/ml)	dilution	Réactif de Bradford
1(bleu)	0,1	0		3
2	0,1	0,25		3
3	0,1	0,5		3
4	0,1	1		3
5	0,1	1,4		3
6	0,1	2		3

## Tracer la gamme étalon

Régler le spectrophotomètre sur 594nm

La lecture de l'absorbance de chaque tube se fera contre le blanc (tube ne contenant pas la protéine), il faut donc d'abord positionner le zéro avec le tube n°1 pour chaque tube de la gamme, reporté dans un tableau l'absorbance indiquée par le photomètre.

[BSA] mg/ml	0	0,25	0,5	1	1.4	2
DO	0	0,021	0,040	0,071	0,108	0,130



## Mesure de la concentration d'un échantillon inconnu

Pour évaluer la concentration d'un échantillon il suffit alors d'utiliser le même volume que celui utilisé pour les points de la gamme (volume total et volume du réactif), d'en lire l'absorption à 594 nm au spectrophotomètre puis d'en reporter la mesure sur la courbe étalon qui nous donnera la concentration correspondante.

Pour déterminer la concentration d'un échantillon inconnu : préparer une cuve avec 3ml de réactif de Bradford ajouter 0,1 ml de l'échantillon puis lire son absorbance et la reporter sur la courbe d'approximation qui permet de retrouver sa concentration sur l'axe des abscisses.

## **Annexe VII : Méthode de dosage des sucres réducteurs (méthode à l'acide dinitrosalicylique) :**

Le réactif au DNS est un mélange de deux solutions :

Solution 1 : dissoudre 300 g de tartrate de sodium et de potassium dans 500ml d'eau distillée.

Solution 2 : dissoudre 10 g de DNS dans 200 ml de soude à 2 N.

Mélanger extemporanément les solutions 1et2 et compléter à 1L avec de l'eau distillée.

### **Gamme d'étalonnage :**

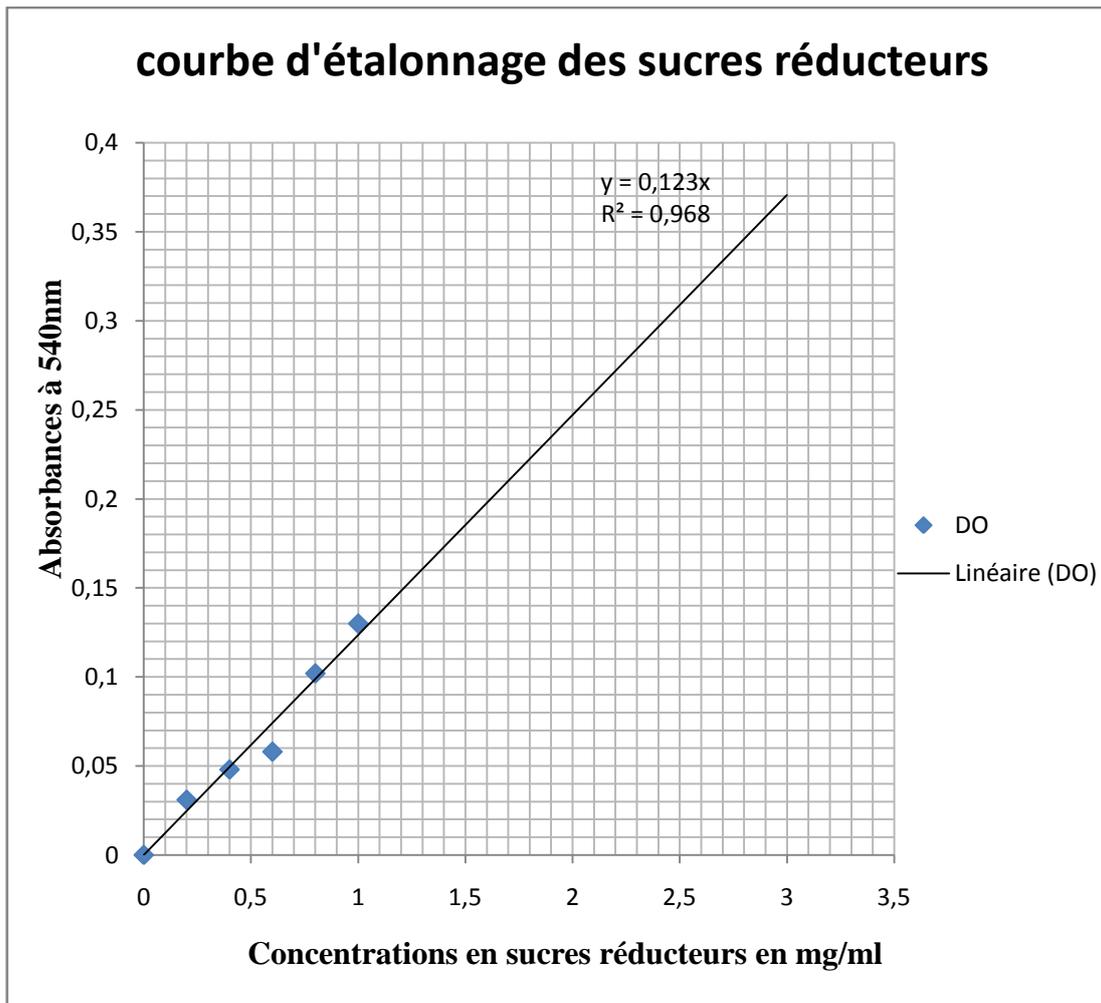
Dans une série de six tubes à essai :

- On introduit 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1ml de solution étalon à 0,45 g/l de glucose.
- On complète à 1mL avec de l'eau distillée.
- On ajoute 2mL de réactif au 3,5-dinitrosalicylique.

Tous les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant (100°C) en même temps exactement cinq minutes, puis ils sont refroidis dans un bain d'eau glacée. On complète chaque tube à 10ml avec de l'eau distillée. On homogénéise et on laisse reposer 15 minutes à température ambiante.

Les lectures des densités optiques sont réalisées à 540 nm contre le blanc réactif.

Pour l'essai, on prend 1mL qu'on dilue au dixième avec de l'eau distillée auquel on rajoute 2 ml de réactif, et on suit les mêmes étapes que précédemment.



Courbe représentative de la DO en fonction de concentration en sucre réducteurs (DO=f [sucres réducteurs]).