



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة زيان عاشور - الجلفة

Université Ziane Achour – Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Microbiologie appliquée

Thème

Etude de la production des biosurfactants issus des bactéries halophiles et leur caractérisation

Présenté par: Belhaoudjeb Saadia et Arar Ismahan.

Soutenu le : 24/11/2018.

Devant le jury composé de :

Président : Mr Khaled Yazid	Maitre-Assistant (A)	UNIV-DJELFA
Promoteur : Mr Bakhti Mohamed	Maitre-Assistant (A)	UNIV-DJELFA
Co-promoteur: Mr Boutaiba Saad	Maitre de Conférences (A)	UNIV-DJELFA
Examineur : Mr Khiari Mohamed	Maitre-Assistant (A)	UNIV-DJELFA
Examinatrice : Mme Rachdi Fatima.Z	Maitre-Assistante (A)	UNIV-DJELFA

Année Universitaire 2017/2018.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant de nous avoir aidées à réaliser ce modeste travail.

Nous remercions très chaleureusement notre promoteur monsieur BAKHTI.M, qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour. Nous lui exprimons notre gratitude de nous avoir dirigées, encouragées et surtout de son aide afin de réaliser ce travail.

Nous adressons nos remerciements à notre Co-promoteur monsieur BOUTAIBA.S, et nous tenons à lui exprimer notre profonde gratitude pour l'attention et les conseils qu'il nous a prodigués.

Nous remercions les membres du jury d'avoir accepté de juger notre travail. Et nous remercions tous les enseignants de notre cursus universitaire qui ont contribué à notre formation.

Nos plus vifs remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Ziane Acheur de Djelfa, un grand merci à monsieur AISSA et à Mademoiselle ZINEB.

Nous remercions tous nos amis en particulier les étudiants de la spécialité de Microbiologie Appliquée.

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

إهداء

الحمد لله أولا و آخراً على نعمه المبررة

أتقدم بالشكر الجزيل والاحترام الكبير إلى نبع العنان الوالدين الكريمين

إلى أخواتي وأزواجه

إلى اخواني وأزواجه

إلى أبناء اخوتي و اخواتي

كما أشكر عملي هذا إلى معلمتي الفاضلة لوعيل ربيعة توتة و إلى حمزة

إلى كل صديقاتي وزميلاتي سليمه حنان زويبة شمسة احلام ندى ونانا أخص بالشكر لكل من كان له الفضل فيما أنا عليه اليوم.

عزراة إسمهان

Dédicace

Louange à Allah clément et miséricordieux

Je tiens à exprimer mes remerciements et un grand respect pour mes ressources de tendresse : mes parents à qui je demande à Dieu de les protéger.

À mes Sœurs

À Mes Frères

Aux fils de mes frères et soeurs

Je dédie également ce travail à mon enseignante distinguée : Loueile Rabia Touta et à Hamza

À tous mes amies et collègues, Salima Hanan Zwina, chahra Ahlam Nada Nana Joula et tous les promos de microbiologie appliquée

Je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué à ce que je suis aujourd'hui.

Arar Ismahan

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes chers parents, merci pour votre soutien moral et vos encouragements tout au long de mes études. Pour vos précieux conseils et l'éducation que vous m'avez apportée. Pour votre aide précieuse dans les moments difficiles. Merci infiniment.

J'ai une pensée toute particulière pour toi maman, tu es la personne qui me donne tous les jours la force et le courage de prendre la vie du bon côté, d'être le plus cool possible et de toujours voir la réalité de façon positive. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.

A mes chers frères : Mohamed, Ahmed, Brahim, Youssef et Naas

A mes adorables sœurs : Karima, Mariam et Fadhila

A mes chers amies : Ismahane, Fadila, Hanane, Iman, Amani, Razika

Tous mes camarades surtout la promotion 2017/2018 Option Master II microbiologie Appliquée.

A toute ma famille.

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.

Saadia Belhaouadjeb

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	
Sommaire	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Environnements hypersalins	03
1.1. Types d'environnements hypersalins	03
1.1.1. Les eaux hypersalins	03
1.1.1.1. Environnements thalassohalins	03
1.1.1.2. Environnements athalassohalins	04
1.1.2. Sols salins	05
2. Microorganismes halophiles	05
2.1. Définition	05
2.1.1. Bactéries non halophiles	05
2.1.2. Bactéries faiblement halophiles	05
2.1.3. Bactéries halophiles modérées	05
2.1.4. Bactéries halotolérants	05
2.2. Osmorégulation	05
2.2.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs	06
2.2.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl	06
3. Intérêt des halophiles dans biodégradation des composés organiques	07
4. Hydrocarbures pétroliers	08
4.1. Définition	08
4.2. Classification	08
4.3. Pollution	10
4.4. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures	10
4.4.1. Types de polluants	10

Sommaire

4.4.2. Evaluation des sites pollués	10
4.4.3. Impact des hydrocarbures sur l'environnement	11
4.5. Devenir et mobilité des hydrocarbures dans l'environnement	11
4.6. Techniques de traitement des eaux et des sols pollués par les HC	12
5. Les biosurfactants	14
5.1. Introduction	14
5.2. Définitions	14
5.3. Composition et structure chimique	14
5.4. Classification des biosurfactants	15
5.5. Organismes producteurs des biosurfactants	16
5.6. Propriétés physicochimique des biosurfactants	16
5.6.1. Abaissement de la tension superficielle	17
5.6.2. Abaissement de la tension interfaciale	17
5.6.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)	17
5.6.4. Solubilisation	17
5.7. Biosurfactants de faible et haut poids moléculaire	18
5.8. Rôle physiologique des biosurfactants	19
5.9. Paramètres influençant la production des biosurfactants	20
5.9.1. Influence de la source de carbone	20
5.9.2. Influence de l'azote	20
5.9.3. Influence des sels minéraux	20
5.9.4. Influence de l'oxygène	20
5.9.5. Influence de la vitesse d'agitation	20
5.10. Cinétique de fermentation	21
5.11. Techniques d'analyses des biosurfactants	22
5.12. Techniques d'identification	23
5.13. Extraction et purification des biosurfactants	24
5.14. Domaines d'applications des biosurfactants	24
5.15. Avantage de biosurfactants	26
5.16. Inconvénient des biosurfactants	27
Chapitre II : Matériel et méthodes	
1. Objectifs	28

Sommaire

2. Origines des souches	28
3. Présentation des sites de prélèvements	28
3.1. Zahrez el Gharbi	28
3.2. Rocher de Sel	28
4. Etude microbiologiques	29
4.1. Milieu de culture utilisé	29
4.2. Préparation du milieu de culture	29
4.3. Revivification des souches	30
4.4. Méthode d'ensemencement	30
4.5. Test de biodégradation des hydrocarbures	31
4.6. Mesure de la densité optique (DO)	31
4.7. Test d'émulsification (E ₂₄)	31
5. Analyses physicochimiques	32
5.1. Tests de production des biosurfactants	32
5.1.1. Déplacement de l'huile	32
5.1.2. Test de parafilm M	32
5.2. Caractérisation des propriétés physicochimiques des biosurfactants	33
5.2.1. Localisation des biosurfactants	33
5.2.2. Etude de la tension superficielle	33
5.2.3. Mode opératoire de la mesure de la tension superficielle	34
5.3. Extraction des biosurfactants	36
5.3.1. Pour les souches N3 ; N7 ; N15	37
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Résultats d'analyses microbiologiques	39
1.1. Test de biodégradation	39
1.2. Indices d'émulsification (E ₂₄)	43
2. Résultats d'analyses physico-chimiques	47
2.1. Tests de production des biosurfactants	47
2.1.1. Déplacement de l'huile	47
2.1.2. Test de parafilm M	48
2.2. Caractérisation des propriétés physico-chimiques des biosurfactants	49
2.2.1. Localisation des biosurfactants	49
2.2.2. Etude de la tension superficielle	51

Sommaire

3. Extraction des biosurfactants	52
Conclusion	53
Références bibliographiques	55
Annexes	
ملخص	
Résumé	
Abstract	

Liste des figures

Liste des figures

Numéro	Intitulé	Page
I-01	Environnements thalassohalins. , Marais salants à Formentera en Espagne (Site 1) et, Marais salants de l'île de Ré en France (Site2).	04
I-02	Environnement athalassohalins, la Mer Morte (Site3).le Lac Rose Salé au Sénégal (Site4).	04
I-03	Classification des hydrocarbures en fonction de la structure chimique.	09
I-04	Structures générales des tensioactives.	14
I-05	Classification des biosurfactants.	15
I-06	Structures chimiques de certains biosurfactants courants (a) lipide de mannosylérythritol (b) Surfactine (c) lipides à tréhalose (d) sophorolipides (e) rhamnolipide (f) Emulsane.	16
I-07	Illustration of regions in which micelle formation occurs (critical micelle concentration CMC).	17
I-08	Représentation graphique des différentes propriétés fonctionnelles des biosurfactants / bioémulsifiants: (A) Tension superficielle; (B) tension superficielle et interfaciale; (C) émulsification; (D) désémulsification; (E) mouillage; (F) moussant; et (G) l'adsorption.	18
I-09	Cinétique de différents types de fermentation pour la production de biosurfactants.	21
I-10	Différentes analyses qualitatives des biosurfactants.	23
II-11	Matériel utilisé.	29
II-12	Composants du milieu complet.	29
II-13	Milieu au cours d'agitation.	30
II-14	Milieu après l'agitation	30
II-15	Revivification et ensemencement des souches.	31
II-16	Mesure de la tension superficielle par la méthode stalagmométrique.	34
II-17	Mesure de la tension superficielle.	36

Liste des figures

II-18	Surnageant bactérien après la centrifugation des trois souches.	38
II-19	Diminution du pH de la solution à 2.	38
II-20	Evaporation de la phase chloroformique.	38
II-21	Mélange au repos.	38
II-22	Dépôt blanc obtenu après l'extraction.	38
III-23	Courbe de croissance de la souche Sb20 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	39
III-24	Courbe de croissance de la souche Sb41 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	39
III-25	Courbe de croissance de la souche N3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	40
III-26	Courbe de croissance de la souche N7 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	40
III-27	Courbe de croissance de la souche N15 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	41
III-28	Courbe de croissance de la souche 2/9 C3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	41
III-29	Courbe de croissance de la souche 1/13C3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	42
III-30	Courbe de croissance de la souche N20C2 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.	42
III-31	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (Sb20).	43
III-32	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (Sb41).	43
III-33	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de	44

Liste des figures

	l'hydrocarbure pour la souche (N3).	
III-34	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N7).	44
III-35	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche(N15).	45
III-36	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (2/9C3).	45
III-37	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (1/13C3).	46
III-38	Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N20 C2).	46
III-39	Déplacement de la couche superficielle de pétrole brut du à la présence de biosurfactants dans les surnageants des deux souches testées.	47
III-40	Test du parafilm M.	48
III-41	Résultat du test de localisation des biosurfactants.	50
III-42	Produits de l'extraction.	52

Liste des tableaux

Liste de Tableaux

Numéro	Intitulé	Page
I-01	Souches d'Archaea halophiles dégradant les hydrocarbures.	07
I-02	Synthèse des principaux traitements de dépollution.	13
I-03	Production des biosurfactants par des microorganismes.	19
I-04	Différentes méthodes de détection et d'analyse.	22
I-05	Différents procédés d'extraction et de purification des biosurfactants.	24
I-06	Différentes applications potentielles et les rôles des biosurfactants.	25
III-07	Résultats du test de déplacement de l'huile pour différentes souches.	48
III-08	Résultats du test de parafilm M.	49
III-09	Indice d'émulsification.	51
III-10	Résultats de la tension superficielle pour les deux souches.	51

Liste des abréviations

AW	Activité d'eau
CMC	Concentration Micellaire Critique.
DO	Densité optique.
E24	Activité d'émulsification après 24h.
EPS	Exopolysaccharides.
ESR	L'évaluation simplifiée des risques.
HC	Hydrocarbure.
HCP	Hydrocarbure pétrolier.
H_e	Hauteur de l'émulsion formée.
Hlb	Hydrophile Lipophile Balance.
H_t	Hauteur totale du mélange.
HTS	Criblage à haut débit.
IR	Infrarouge.
LPS	Lipopolysaccharides.
m	Masse d'une seule goutte de l'eau ou du liquide.
m_E	Masse d'une seule goutte de l'eau.
m_L	Masse d'une seule goutte du liquide.
MM	Milieu minimum
MS	Spectrométrie de Masse.
MSH	Milieu Spécifique des Halophiles.
M_T	Masse totale des gouttes.

Liste des abréviations

N	Nombre de gouttes de l'eau ou du liquide.
pH	Potentiel d'hydrogène.
ppb	Partie par billion
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
t	Temps.
tr	Tours.
UV-VIS	Lumière Ultra-violette et Visible.
V	Volume entre les deux repères du stalagmomètre.
γ_E	Tension superficielle de l'eau.
γ_L	Tension superficielle du liquide en N/m.



Introduction

Introduction

Certains organismes et en particuliers les microorganismes ont la capacité de survivre et de se développer dans des environnements physiques et chimiques extrêmes ; on les qualifie d'extrêmophiles. Parmi les écosystèmes dits extrêmes, se trouvent les environnements hypersalés ; caractérisés par une forte ou très forte teneur en sels ; les organismes qui vivent dans ces biotopes ont reçu le nom d'halophiles (du grec *halos* : sel, *phile* : aimer), et qui sont les premiers organismes isolés et étudiés dans la mer morte. (EBEL *et al.*, 2004).

Ces microorganismes exceptionnels, ont reçu ces dernières années un intérêt particulier de la part des scientifiques et des industriels suite à leurs potentialités de synthèse de molécules comme les antibiotiques, les halocines, les exopolysaccharides, enzymes, biosurfactants... qui peuvent être utilisées dans plusieurs domaines (thérapeutique, alimentaire, agronomique, environnemental, biotechnologique... etc.). (Sanjay *et al.*,2014 ; Castillo -Carvajal *et al.* ,2014).

Dans le domaine de la protection de l'environnement, les techniques issues de la biotechnologie sont de plus en plus sollicitées ; et ces microorganismes halophiles peuvent dégrader des composés organiques dans les effluents liquides et les sols pollués et surtout dans les industries caractérisées par une forte salinité comme les industries alimentaires et textiles par exemple (SANTOS *et al.*2016).

L'Algérie parmi les pays qui recèlent des écosystèmes salins et hypersalins, qui jouent un rôle primordial du point de vue de la biodiversité et ont des retombées touristiques et économiques potentiels non valorisés. Ces zones sont tantôt désignées par les noms communs Sebka ou Chott, tantôt par leurs noms propres Hodhna ou Zahrez. Les environnements hypersalins en Algérie sont représentés essentiellement par les sebkhas et les chotts, répondus notamment dans les zones arides et semi-arides (22 sebkhas et 43 chotts inscrits sur la liste RAMSAS des zones humides d'importances internationale) (INSID, 2008).

Introduction

Les microorganismes halotolérants dégradant les polluants organiques secrètent parallèlement des molécules de biosurfactants caractérisés par deux propriétés fondamentales : la première est l'adsorption aux interfaces qui provoque une diminution des tensions interfaciales. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification et la deuxième est l'autoagrégation en solution ou micellisation qui gouverne les propriétés de solubilisation et de microémulsification (**LARPENT, 1995**).

Ces molécules biosurfactantes en plus de leur biodégradabilité sont peu ou non nocifs vis à vis de l'environnement (eco-friendly) et en plus ils sont plus stables et plus fonctionnels que leurs homologues chimiques. Tous ces attributs ouvrent des champs d'application dans des secteurs variés comme la médecine, l'écologie, l'alimentaire, l'agriculture, exploitation minière, textile, nanotechnologie... (**SANTOS *et al.* 2016**).

Cette présente étude s'intègre dans un contexte de valorisation de la biodiversité locale des ressources des zones arides et semi-arides en l'occurrence la biomasse extrêmophile.

Le sujet de ce mémoire est axé sur la caractérisation préliminaire de souches halophiles, isolées à partir des sites du Rocher de sel et Zahrez el Gharbi, Région de Djelfa (**SAIHI et SENANI, 2016**), ainsi que l'étude de leur aptitude à produire des biosurfactants et des bioémulsifiants, estimée par le test d'émulsification E₂₄ et de la mesure de la tension superficielle, suivi par une extraction du produit obtenu.

Ce mémoire s'articule sur trois volets :

Le premier volet de ce mémoire est consacré à une synthèse bibliographique sur les halophiles, les hydrocarbures et les biosurfactants.

Le second volet du document est consacré aux matériels et des méthodes utilisés.

Enfin le dernier volet présent les résultats obtenus ainsi que leurs discussions, et le travail s'achève par une conclusion générale et des perspectives.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

1. Environnements hypersalins

Les environnements hypersalins sont définis habituellement comme des environnements dont la concentration en sel est supérieure à celle de l'eau de mer (3.5% (p/v) de sels dissouts), et présentent une grande variabilité au niveau de leur concentration totale en sels, de leur composition ionique et de leur pH (**OLLIVIER *et al.* 1994**). Cependant, pour une définition plus spécifique des environnements hyper salins, on doit tenir compte, mis à part la concentration en sel, de l'origine de l'eau et des types de sels (**DASSARMA et ARORA, 2001**).

Certains lacs salés sont très alcalins ; c'est le cas des lacs de sud en Afrique, en inde et en Chine ils ont un pH 11 et une salinité qui dépassent les 300 g/l (**HASSANI-BELKACEM, 2015**).

1.1. Types d'environnements hypersalins

Deux types d'environnements hypersalins biologiquement importants où le facteur de salinité détermine et spécifie la population bactérienne. Il s'agit de l'eau et le sol (**HASSANI-BELKACEM, 2015**).

1.1.1. Les eaux hypersalins

Les eaux sont considérées salées lorsque la salinité dépasse 0,3 % (p/v) et on définit les eaux hypersalées comme celles présentant des concentrations en sels minéraux supérieures à celle de l'eau de mer (3,3 % (p/v)) (**EDGERTON et BRIMBLECOME, 1981**).

Ces environnements sont classés en plusieurs types ou catégories :

1.1.1.1. Environnements thalassohalins

Beaucoup d'environnements hypersalins proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations, etc. De tels environnements aquatiques sont désignés sous le nom de thalassohalins (du grecque thalasso, la mer) (**MCGENITY *et al.* 2000; OREN, 2002; 2006**) (Figure 01).

La concentration finale des plans thalassohalins est dominée par le magnésium et les ions de chlorure mais durant l'évaporation, certains changements peuvent survenir dans la composition ionique des gypses ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou des autres minéraux (**OREN, 2002**).



1.1.1.2. Environnements athalassohalins

Les environnements athalassohalins ont une composition ionique saline largement différente de celle de l'eau de mer ; ils prennent leurs origines des roches géologiques entourant les eaux salines. La composition ionique de ces eaux est influencé par celle des roches, où l'ion magnésium prédomine (**LITCHFIELD et GILLEVET, 2002**).

Les eaux athalassohalins proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, cas de la Mer Morte, du Lac Rose Salé au Sénégal et de la plupart des sebkhas situées en zones semi- arides et arides. Ces environnements ont une composition ionique saline différente de celle de l'eau de mer (**LITCHFIELD et GILLEVET, 2002; OREN, 2002**) (Figure 02).



1.1.2. Sols salins

Les sols salés ou sols halomorphes sont caractérisés par une concentration en sels solubles. Ces sols ont une grande extension dans les trois pays du Maghreb. Elle est due aux conditions arides ou semi-arides d'une grande partie de cette région où les possibilités d'évaporation sont considérables et les précipitations pluviales limitées (AUBERT, 1975).

2. Microorganismes halophiles

2.1. Définition

Les bactéries halophiles sont distinguées par leur exigence des concentrations salines pour se développer (VENTOSA et al, 1999). Ainsi, ces microorganismes sont classés dans cinq catégories: non halophiles, faiblement halophiles, halophiles modérés, halotolérantes et halophiles extrêmes (KUSHNER, 1993).

2.1.1. Bactéries non halophiles

Les bactéries non halophiles représentent la plupart des Eubactéries qui ne se développent pas en présence de sel ou, du moins, à des concentrations < 0,2M (1,16%) de sel (KUSHNER, 1993).

2.1.2. Bactéries faiblement halophiles

Ces bactéries représentent une bonne croissance sur des milieux contenant 0,2M à 0,5M de sel (1,16% -2,9%). C'est le cas des microorganismes marins (KUSHNER, 1993).

2.1.3. Bactéries halophiles modérées

Ce sont des microorganismes qui se développent dans un milieu contenant entre 3% et 15% de sel. On peut citer comme exemple: *Vibriocosticola*, *Paracoccus*, *Halodenitrificans* et *Pseudomonas* (KUSHNER, 1993).

2.1.4. Bactéries halotolérants

Les bactéries ne nécessitent pas de sel pour leur croissance, mais peuvent pousser en sa présence et supportent jusqu'à 1,8M (10,4%) de sel, comme *Staphylococcus epidermidis*, *Halomonas elongata*, champignons et algues (KUSHNER, 1993).

2.2. Osmorégulation

Adaptation moléculaire à l'halophilisme

Dans à l'état naturel il est extrêmement rare de trouver un habitat composé d'une seule espèce ou lignée cellulaire. Différents microorganismes coexistent, interagissent entre eux et avec l'environnement qui les entoure et de ce fait même définissent la communauté. Cette dernière forme un système en constante évolution mais qui en même temps possède une

certaine homéostasie qui reflète les interactions entre tous les membres de cette communauté et l'habitat qu'ils occupent (**ALEXANDER, 1997**).

Aussi, la vie dans les lacs hypersalés n'est possible qu'aux prix d'une forte spécialisation qui n'est atteinte que par quelques microorganismes, capables de maintenir une pression osmotique égale à celle de l'environnement. Deux stratégies sont utilisées pour s'adapter au milieu hypersalé et donc à une faible activité d'eau (A_w). (**KHARROUB, 2007**).

2.2.1. Adaptation à la salinité par la production d'osmoprotecteurs

L'adaptation est basée sur l'expulsion des sels du cytoplasme et l'accumulation de solutés organiques afin de fournir et de soutenir la balance osmotique, les solutés peuvent être des sucres, des acides aminés, des ectoïnes et des polyalcools. Cette stratégie est largement utilisée dans les trois domaines Bacteria, Archaea et Eucarya. Le soluté le plus utilisé dans le domaine bacteria est l'éctoïne (synthétisée par une large variété de microorganismes) et à moindre degré la glycine betaine (accumulé par beaucoup de bactéries hétérotrophes à partir du milieu) (**CHUN *et al*, 2000**).

Le mode d'action des osmoprotecteurs est loin d'être clair. Ils pourraient n'être simplement que des solutés compatibles inoffensifs, ou au contraire, ils pourraient jouer un rôle protecteur actif interagissant avec les protéines et les protègent de cette façon de l'action destructrice due à l'osmolarité (**PAPAGEORGION et MURATA, 1995 ; WELSH, 2000**).

2.2.2. Adaptation à la salinité par accumulation de KCl

Cette stratégie est adoptée par des groupes de bactéries halophiles anaérobies de l'ordre des Halobacteriales et par la bactérie aérobie telle que *Salinibacter ruber*. Ils accumulent essentiellement du KCl (**OREN, 2001 ; OREN *et al*, 2002 ; GRANT, 2004**).

L'exclusion du Na^+ du cytoplasme se fait grâce à un antiport Na^+/H^+ , localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. Généralement, les ions K^+ entrent passivement via un système uni port sous l'impulsion du potentiel de la membrane. Ce système revient à remplacer une partie du sodium cellulaire par du potassium. Des systèmes multiples de transport actif des ions K^+ (**OREN, 2001 ; OREN *et al*, 2002 ; GRANT, 2004**).

3. Intérêt des halophiles dans biodégradation des composés organiques

Le tableau suivant résume quelques résultats de la dégradation de composés organiques par des souches d'Archaea halophiles.

Tableau 1: Souches d'Archaea halophiles dégradant les hydrocarbures
(KRZMARZICK *et al.* 2018).

Souches	Hydrocarbures dégradés	Concentration ou Pourcentage de sel	Site
<i>Haloarcula st. EH4</i>	Tétradécane (88%), hexadécane (66%), éicosane (64%), hénéicosane (51%), pristane (48%), acénaphène (18%), phénanthrène (20%), anthracène (21%) et 9-méthylanthracène (24%)	3.5 mol/l	Aigus morte (France)
Haloferaxst. MSNC 4and MSNC 16 Haloarcula sp. st.MSNC 2	Heptadécane	225 g/l	Cancargue (France)
Haloferax st. MSNC 14	Heptadécane, phénanthrène (43%) et pristane (99.3%)	225 g/l	France
Haloferaxsp. HA-1 Haloferaxsp. HA-2 Halobacterium sp. st. HA-3 Halococcus sp. st.HA-4	Pétrole brut, n-alcanes en C8-C34, benzène, toluène, phénanthrène, biphenyle et / ou naphthalène	4 M	Koweït
Halobacteriaceae st. L1	Acide benzoïque et p-hydroxybenzoïque 100%	256g/l	Mer morte Jordan
Natrialbasp. st. C21	Phénol, naphthalène et pyrène	250 g/l = 25%	Ain salleh (Algérie)
Haloferax sp. C-24 and C-27, Halobacterium piscisalsist. C-37, Halobacterium salinarumst. C-51, Halorubrum zemmoulensest. C-41 and C-46, Halorubrum sp. st.C-43, and Halobacteriaceae st.C-50 and C-52	Naphtalène, phénanthrène, pyrène et / ou p-hydroxybenzoate	20% NaCl	Turquie
Haloferaxlucentest. A01 Halobacterium salinarumst. A02 Halobacterium piscisalsist. A03 Haloferax mucosumst. A04 Halobacterium sulfurifontis st. A05	Pétrol brut (60-70%), Tween 80, n-octadécane et phénanthrène	3.4 M de NaCl 3.3 M de NaCl	Koweït
Haloferax longansst. M4 Halobacterium salinarumst. M5	Pétrole brut, n-hexadécane et phénanthrène dans le cadre d'un biofilm	0.5 M de KCl 4.5 et 2.25 M de Mg SO ₄	Koweït

4. Hydrocarbures pétroliers

4.1. Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones (C) et d'hydrogènes (H) (**FRNENNEC *et al*, 1998**).

Le terme « hydrocarbure pétrolier » (HCP) est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières (**STANDARDS et PANCANADIENS, 2008**).

4.2. Classification

Les hydrocarbures pétroliers peuvent être classés sous plusieurs critères, le classement chimique (structure chimique) est le plus adopté :

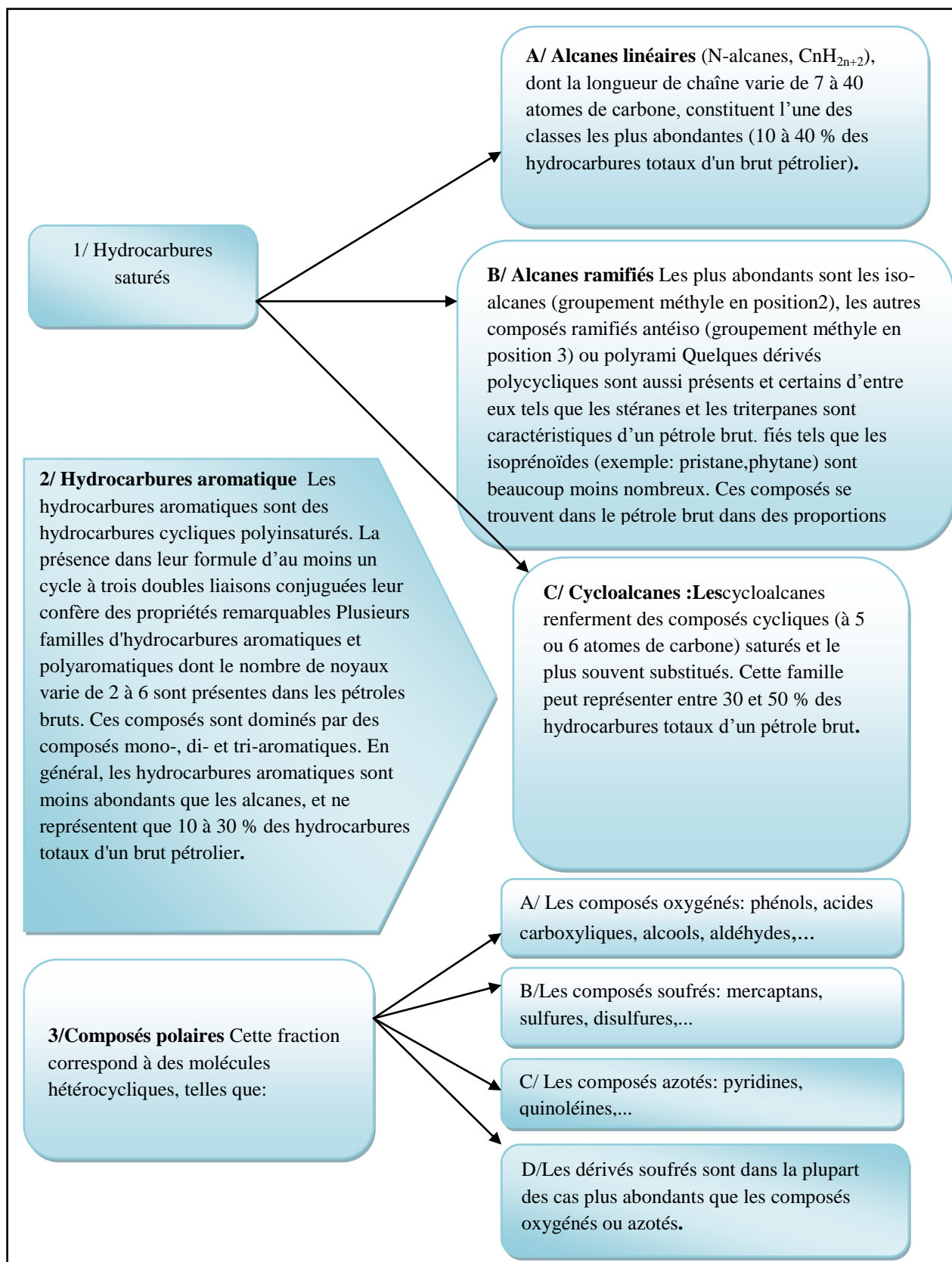


Figure 03 : Classification des hydrocarbures fonction la structure chimique (SOLTANI, 2004 et WAUQUIER, 1994).

4.3. Pollution

La pollution est définie comme étant toute modification directe ou indirecte de l'environnement provoquée par tout acte qui provoque ou qui risque de provoquer une situation préjudiciable pour la santé, la sécurité, le bien-être de l'homme, la flore, la faune, l'air, l'atmosphère, les eaux, les sols et les biens collectifs et individuels (**JORA ,2003**).

4.4. Pollution de l'environnement par les hydrocarbures

La notion de la pollution est toute relative. On peut considérer qu'il y a pollution par les hydrocarbures lorsque l'action de ceux-ci peut être considérée comme néfaste aux conditions de vie de l'homme directement, ou indirectement, si elle affecte les populations animales et végétales qui lui sont utiles (**BERTRAND et al. 1972**).

L'étude de la pollution des hydrocarbures nécessite des dosages très précis ; 200 ppb d'hydrocarbures dans l'eau sont suffisantes pour altérer son odeur. On constate que 10 ans peuvent s'écouler entre un déversement dans le sol et son arrivée dans une nappe aquifère (**BERTRAND et al. 1972**).

4.4.1. Types de polluants

Les groupes de composés pétroliers polluants pour lesquelles la biodépollution est possible sont :

- ✓ Les hydrocarbures pétroliers (gasoils, fuels, kérosène, huiles minérales).
 - ✓ Les déchets d'exploitation du pétrole (boues et résidus d'huiles de forages)
- (BERTRAND et al. 1972).**

4.4.2. Evaluation des sites pollués

L'évaluation de la contamination des sites suspects et l'estimation du danger qui l'associe est un grand problème. L'évaluation simplifiée des risques (ESR) concerne leur impact potentiel sur les cibles définies. Le risque est défini par la combinaison de trois facteurs :

- ✓ Le danger de la source polluante ; lié à la nature des substances polluantes présentes sur le site et à leur quantité.
 - ✓ Le transfert des substances de la source vers les milieux.
 - ✓ Une cible : l'homme seul, ou l'environnement (l'homme, faune, flore...)
- (BERTRAND et al. 1972).**

4.4.3. Impact des hydrocarbures sur l'environnement

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées (SOLTANI, 2004).

Les risques que font courir les pollutions du milieu souterrain par les hydrocarbures concernent en premier la qualité des eaux souterraines, les rendant impropres pour certaines utilisations (eau potable en particulier) (SCRIBAN, 1999).

Les sols contaminés par les hydrocarbures présentent un danger lors d'un contact direct avec l'homme ou l'animal ou lors de leur transfert dans la chaîne alimentaire. C'est le phénomène de bioaccumulation avec le piégeage par les végétaux et les animaux des polluants ou de leurs produits de dégradation jusqu'à des teneurs atteignant les seuils de toxicité (SOLTANI, 2004).

Au niveau de la phase gazeuse du sol, les risques sont réels avec la présence de substances volatiles : émanations toxiques, incendies et explosions avec des produits inflammables et explosifs en atmosphère confinée (SCRIBAN, 1999).

4.5. Devenir et mobilité des hydrocarbures dans l'environnement

C'est par des processus physiques, chimiques et biologiques qu'un hydrocarbure va pouvoir être déplacé, transformé ou éliminé, après avoir été réparti dans l'environnement. Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on citera les facteurs environnementaux qui sont (SOLTANI, 2004).

- ✚ **Evaporation ;**
- ✚ **Solubilisation ;**
- ✚ **Emulsification ;**
- ✚ **Sédimentation ;**
- ✚ **Photo-oxydation ;**
- ✚ **Biodégradation.**

4.6. Techniques de traitement des eaux et des sols pollués par les HC

Plusieurs techniques de traitement ont vu le jour afin de tenter de restaurer les sites pollués classés dangereux pour les écosystèmes et la santé humaine (**BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999**).

L'intérêt d'une méthode se mesure à son efficacité, à son coût, à la facilité de sa mise en œuvre, à la qualité du sol obtenu après traitement ainsi qu'à la facilité de retraitement des sous-produits générés (**BALLERINI et VANDECASTEELE, 1999**).

Pour réaliser une action curative sur un site reconnu contaminé par les hydrocarbures, plusieurs filières sont envisageables : traitements physiques, chimiques ou biologiques.

Le choix de la filière obéit à des impératifs technologiques (moyens disponibles, volume à traiter, nature du sol et objectifs à atteindre) et économiques (**RHODIA, 1998**).

Il existe trois grandes classes de techniques de décontamination de sol :

- ✓ Techniques in-situ : sans excavation des sols, la pollution est traitée sur place.
- ✓ Techniques sur-site : les terres polluées sont excavées mais sont tout de même traitées.
- ✓ Techniques hors-site : on procède à l'excavation du sol et les terres polluées, qui sont ensuite traitées hors du site.

En outre, la technique de dépollution ne doit pas être plus polluante que le résultat de la pollution (pas de transfert de polluant) (**LECOMTE, 1995**).

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : Synthèse des principaux traitements de dépollution (BALLERINI *et al* 1998 ; COLIN, 2000).

Technique	Principe du traitement	Estimation du coût (€ t ⁻¹)	Avantages et Inconvénients	Durée de traitement	Rendements
Pompage-écrémage	Pompage des produits flottants sur la nappe	20 à 80	Elimination rapide de la pollution	Durée brève	50%
Pompage et traitement	Entraînement des polluants avec l'eau	20 à 160	Risque de dissémination de la pollution	3 à 18 mois	Varie avec la solution lavante
Confinement	Excavation et mise en décharge	600 à 1000	Isole la pollution, Dégradation du sol		
Stabilisation	Injection de produits liants pour fixer la pollution	20 à 200	Technique désuète Dégradation du sol		
Incinération	Incinération en four tournant à haute température	270 à 1100	Technique efficace mais coûteuse et toxicité des fumées émises		Jusqu'à 99 %
Vitrification	Fusion du sol	180 à 400	Pas de réapparition de tapis végétal	Rapide : 3 à 5 t.h ⁻¹	
Traitement chimique	jout d'oxydants pour les transformer en espèces moins nocives	10 à 100	Procédé non spécifique		50 à 95 % suivant le HAP
Bioslurry	Biodégradation	85 à 230	Facile à mettre en oeuvre et à contrôler	2 à 3 semaines	Jusqu'à 95 % suivant le HAP
			Facile à mettre en oeuvre et à contrôler, mais peu rapide		

5. Les biosurfactants

5.1. Introduction

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par une grande variété de microorganismes (bactéries, levures et champignons), (DESAI et BANAT, 1997) soit sécrétés à l'extérieur de la cellule, soit liés à des parties de la cellule. Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides. Les biosurfactants ont été utilisés comme agents de dissolution. Leurs applications ont été étendues à d'autres domaines, comme une meilleure alternative aux produits chimiques tensioactifs, en particulier dans les produits alimentaires, pharmaceutiques et dans l'industrie pétrolière. Aussi, ils possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants synthétiques. Ils offrent des applications dans des domaines variées comme la médecine, l'environnement, l'alimentaire, le cosmétique... (GAKPE *et al* ,2007).

5.2. Définitions

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di); le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (DESAI et BANAT, 1997).

Les surfactants (SURFace ACTIVE AgeNTS) sont des agents à activité de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al-ARAJI *et al*. 2007)

5.3. Composition et structure chimique

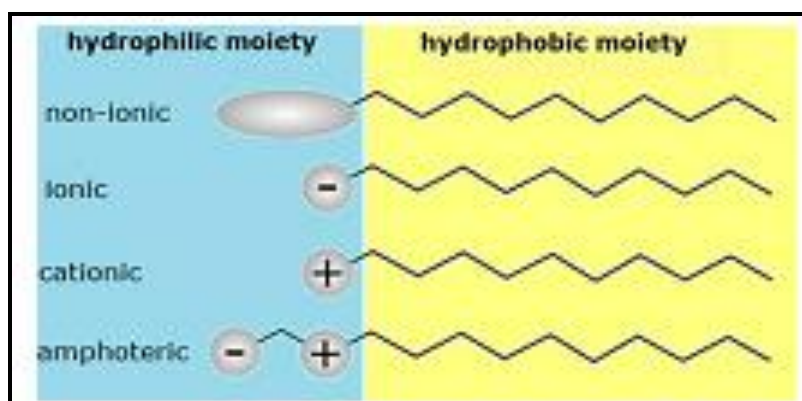


Figure 04: Structures tensioactives générales (CAMPOS *et al*. 2013).

5.4. Classification des biosurfactants :

La classification des biosurfactants est basée sur la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres (HEALY *et al.* 1996) ; et aussi classés suivant leurs poids moléculaires (RON et ROSENBERG, 2002)

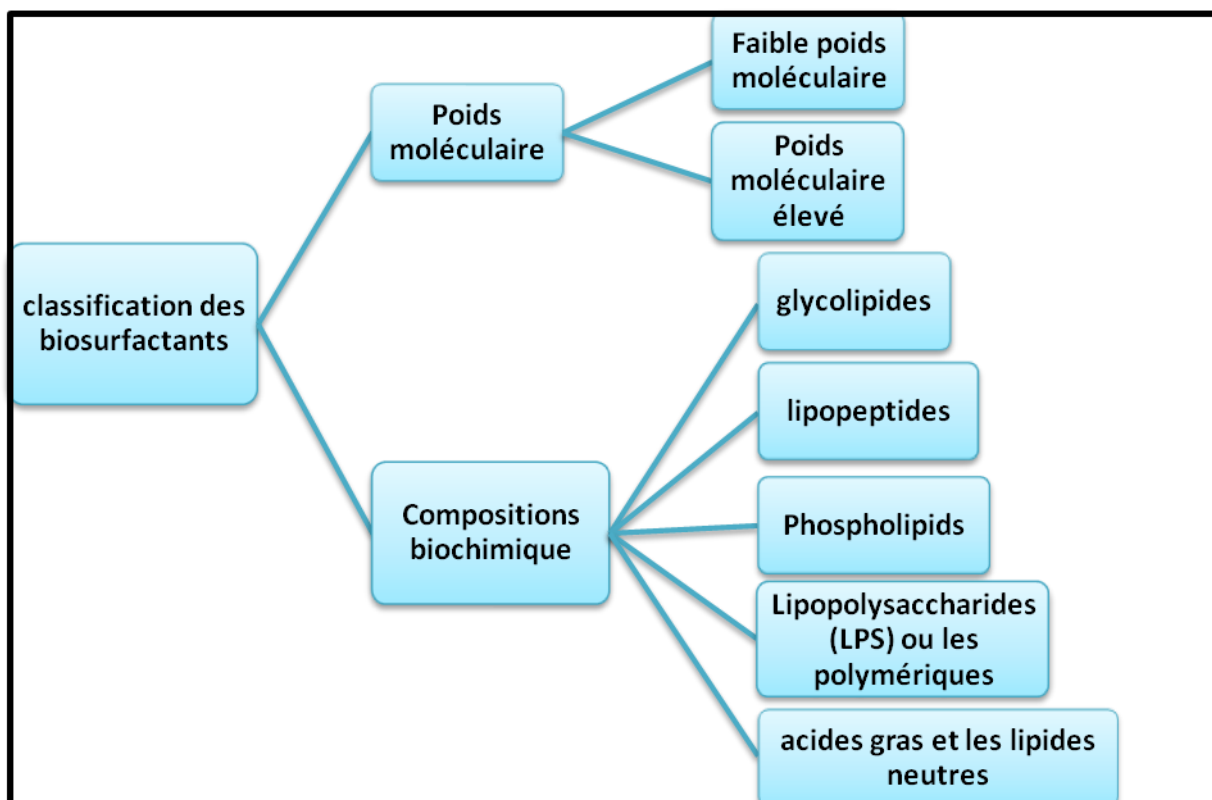


Figure 05: Classification des biosurfactants suivant le poids moléculaire et composition chimique.

La figure 06 suivante représente quelques structures moléculaires de biosurfactants les plus étudiés :

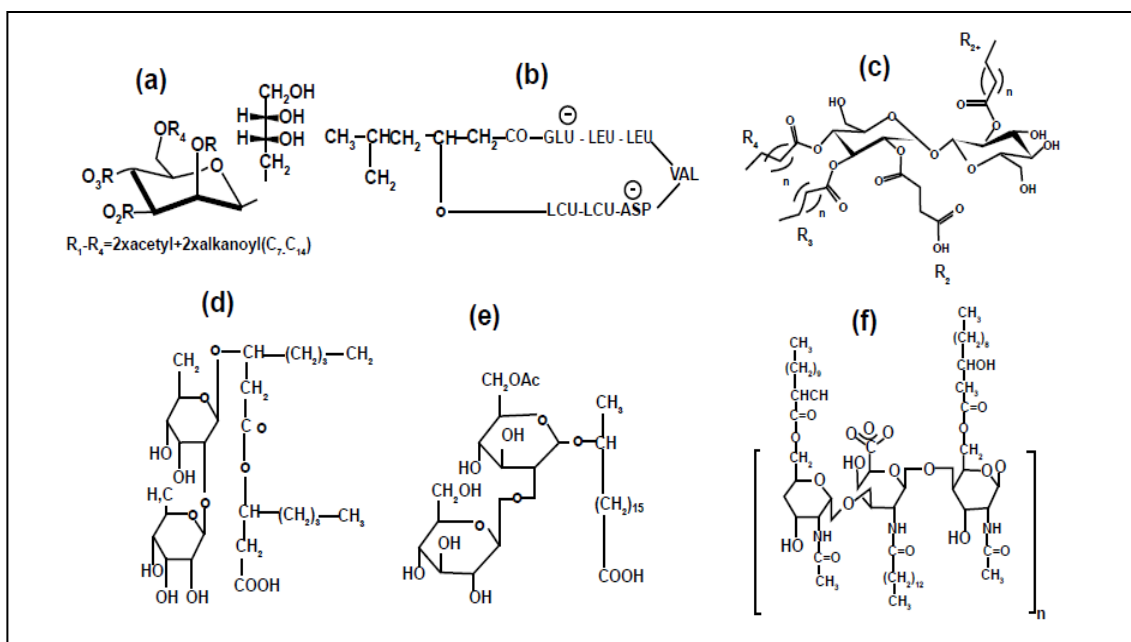


Figure 06: Structures chimiques de certains biosurfactants courants (a) lipide de mannosylérythritol (b) Surfactine (c) lipides à tréhalose (d) sophorolipides (e) rhamnolipide (f) Emulsane (FAKRUDDIN, 2012).

5.5. Organismes producteurs des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie (MULLIGAN *et al.* 2001) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (BOGNOLO, 1999 ; MULLIGAN *et al.* 2001). Ces organismes sont, en général, des levures, des champignons ou des bactéries. Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible. (FIECHTER, 1992 ; MATA-SANDOVAL *et al.* 2000).

5.6. Propriétés physicochimique des biosurfactants

Les biosurfactants sont caractérisés par des propriétés spécifiques ; qui sont en corrélation avec leur composition chimique.

5.6.1. Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface (**HOLMBERG, 2001**).

5.6.2. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (**NEINDRE, 1993**)

5.6.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'auto-associe sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée **concentration micellaire critique (CMC)**. La valeur de la concentration micellaire critique est une caractéristique du tensioactif : elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température (**LARPENT, 1995**).

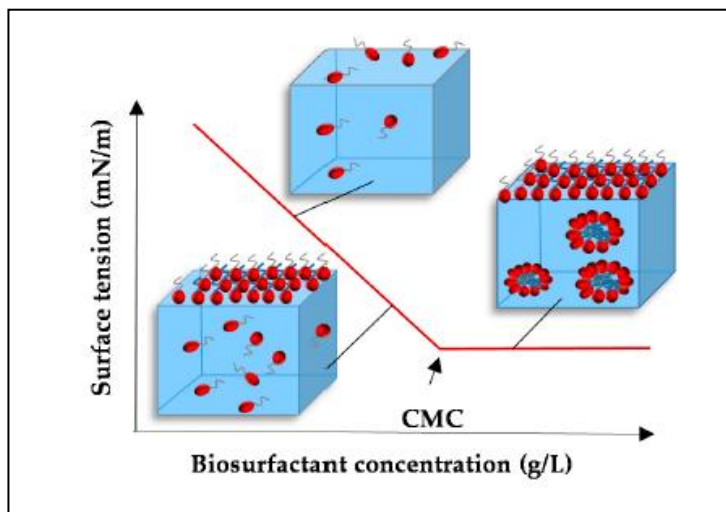


Figure 07: Illustration des domaines dans lesquels il y a formation de micelles (concentration micellaire critique CMC) (**DANYELLE et al.2016**).

5.6.4. Solubilisation

Selon **MARGARITIS et al (1979)**, La solubilité d'un agent tensioactif dans l'eau dépend du nombre de liaisons C-C dans la queue lipophile de la molécule de tensioactif.

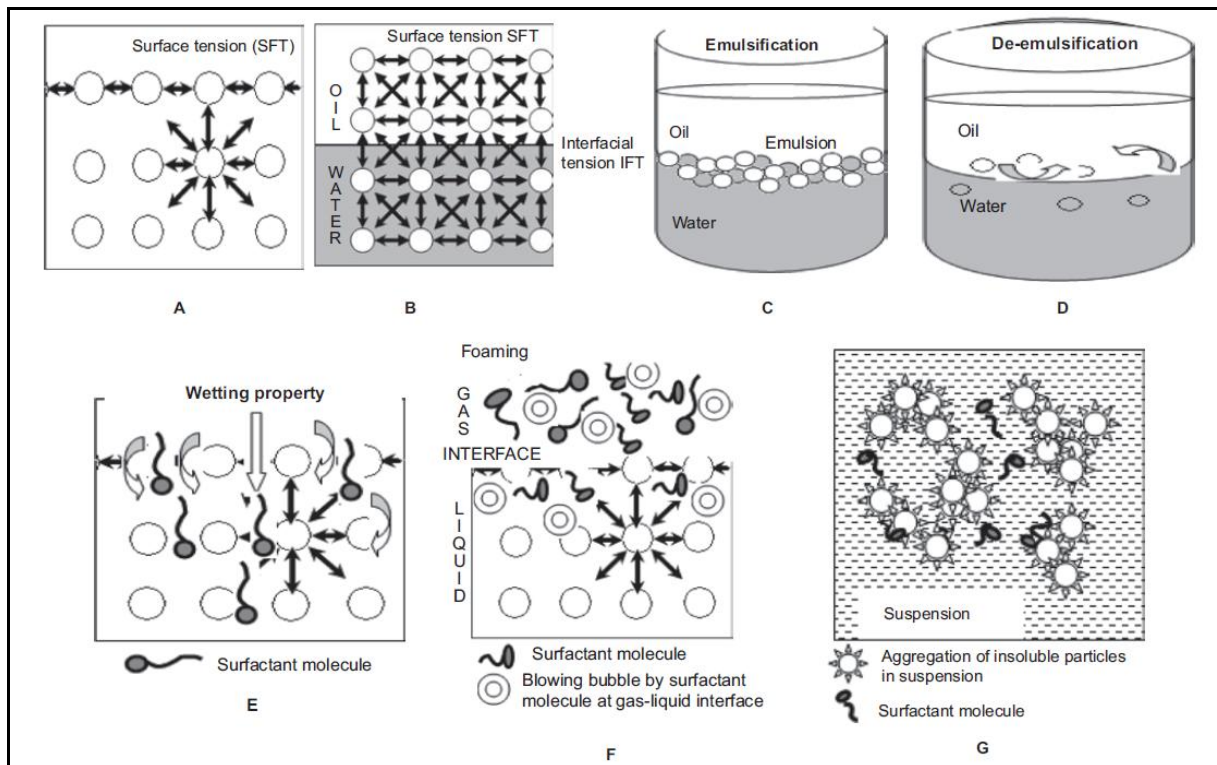


Figure 08 : Représentation graphique des différentes propriétés fonctionnelles des biosurfactants / bioémulsifiants: (A) Tension superficielle; (B) tension superficielle et interfaciale; (C) émulsification; (D) désémulsification; (E) mouillage; (F) moussant; et (G) l'adsorption. (SUREKHA K *et al.*2010).

5.7. Biosurfactants de faible et haut poids moléculaire

a. Les biosurfactants à faible poids moléculaire : qui sont efficace dans l'abaissement de la tension inter faciale, tels que : les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides.

b. Les biosurfactants à poids moléculaire élevé : qui sont très efficace comme agents émulsifiants et stabilisateurs, tels que : les polymériques (KAPPELI et FINNERTY, 1979).

Tableau 03: Production des biosurfactants par des microorganismes
(VAN HAMME *et al.*2006).

Classe	biosurfactants	Microorganismes
Faible poids moléculaire	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i>
	Sophorolipides	<i>Conidialipolytica</i> , <i>Torulopsis bombicola</i>
	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
	Polymyxines	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Acides Gras	<i>Nocardia asteroides</i> <i>Arthrobacter parvifera</i> <i>Pinicillium spiculisporum</i>
Haut poids moléculaire	Sulfolipides	<i>Capnocytophaga</i> , <i>Corynebacterium</i>
	Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Polysaccharides	<i>Halomonas eurihalina</i>
	Sulfatés	

5.8. Rôle physiologique des biosurfactants

La fonction physiologique des bio-tensioactifs est encore inconnue, bien qu'il y ait eu beaucoup de spéculations dans la littérature et qu'il existe plusieurs fonctions pour ces molécules uniques et fascinantes.

Un rôle physiologique suggéré des biosurfactants est de faciliter la croissance de microorganismes sur des substrats non miscibles à l'eau en réduisant la tension interfaciale et en améliorant ainsi la biodisponibilité du substrat. D'autres fonctions suggérées comprennent l'amélioration de l'adhésion des cellules aux substrats insolubles, l'activité antibiotique et un rôle possible dans la pathogenèse de la fibrose kystique et des brûlures.

On a également découvert que certains biosurfactants se lient à certains métaux pour former des complexes métalliques fortement liés, suggérant un rôle pour les bio-tensioactifs dans l'interaction des microorganismes avec les métaux dans leur environnement (MAIER, 2003). D'après APARNA *et al.* (2011), Le rôle physiologique des bio-tensioactifs comprend:

- ✚ L'augmentation de la surface des substrats de croissance hydrophobes ; en réduisant la tension superficielle et la tension interfaciale entre la paroi cellulaire et l'environnement proche.
- ✚ Désorber les composés hydrophobes des surfaces en augmentant leur solubilité apparente
- ✚ Induire des modifications de la membrane pour augmenter l'hydrophobicité en réduisant le contenu lipopolysaccharide de la paroi cellulaire ; l'amélioration de la dispersion des hydrocarbures par encapsulation en micelles.

5.9. Paramètres influençant la production des biosurfactants

La synthèse et le rendement de production des biosurfactants par les microorganismes sont fonction de plusieurs facteurs, on peut citer :

5.9.1. 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 (**DESAI et BANAT, 1997**).

5.9.2. 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**).

5.9.3. Influence des sels minéraux

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

5.9.4. Influence de l'oxygène

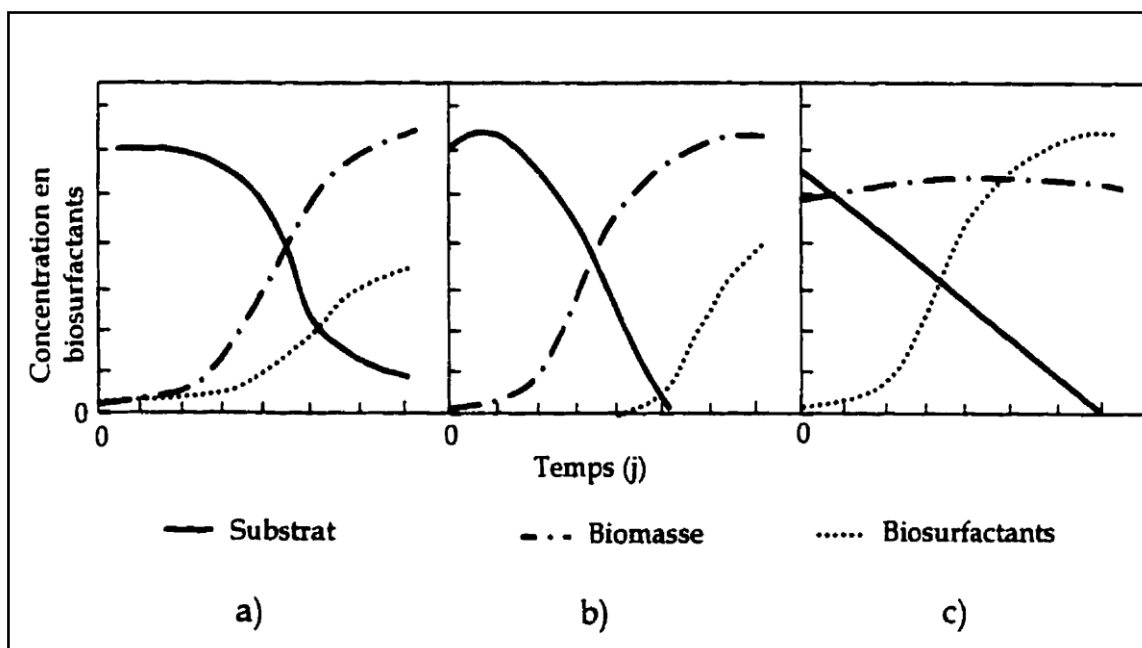
La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (**GABET, 2004**).

5.9.5. Influence de la vitesse d'agitation

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactants. 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**).

5.10. Cinétique de fermentation

La cinétique de production de biosurfactants présente des variations considérables entre les différents systèmes. Par commodité, les paramètres cinétiques sont regroupés comme suit: (a) production associée à la croissance; b) production dans des conditions limitant la croissance; (c) production par des cellules au repos ou immobilisées; et d) production avec supplément de précurseurs. Dans la production associée à la croissance, il existe des relations parallèles entre la croissance, l'utilisation du substrat et la production de biosurfactant. La production dans des conditions limitant la croissance est caractérisée par une augmentation accentuée de concentration de biosurfactant en raison de la limitation d'un ou plusieurs composants du milieu. La production par des cellules au repos ou immobilisées est un type de production de biosurfactant dans lequel il n'y a pas de multiplication cellulaire; les cellules continuent néanmoins d'utiliser la source de carbone pour la synthèse de biosurfactant. Des études ont indiqué que l'ajout de précurseurs de biosurfactants au milieu entraîne des changements qualitatifs et quantitatifs dans le produit final (SANTOS *et al* 2016).



a) Associée à la croissance (*Acinetobacter calcoaceticus*).

b) Limitation par le substrat (esp. *Pseudomonas* sp.).

c) En phase stationnaire (esp. *Torulopsis*).

Figure 09: Cinétique de différents types de fermentation pour la production de biosurfactants. (DESAI et BANAT, 1997).

5.11. Techniques d'analyses des biosurfactants

Il existe plusieurs méthodes d'analyses (screening méthodes) et de détection des biosurfactants, le tableau ci-dessous représente les différentes techniques utilisées dans la détection et l'analyse quantitative des biosurfactants .

Tableau 04 : Différentes méthodes de détection et d'analyse (RAMKRISHNA, 2010).

Technique Analytique	Analyse Qualitative	Analyse Quantitative	Vitesse d'Analyse	Application dans le HTS*
Mesure directe de la tension de surface/Tension interfaciale	++	+	min	-
Test de collision par Effondrement	++	-	min	+
Test de microplaques	++	-	min	+
Test de pénétration	++	-	min	+
Essai d'étalement d'huile	++	-	min	-
Test de capacité d'émulsification	+	-	j	-
Solubilisation de l'anthracène cristallin	+	-	j	+/-
Adhérence bactérienne à l'analyse des hydrocarbures	+	-	min	-
Chromatographie d'interaction hydrophobe	+	-	h	-
Test de plaque réplique	+	-	j	-
Test d'agrégation des sels	+	-	min	+/-
Test d'agar CTAB	+	-	j	-
Test d'hémolyse	+	-	j	-

Analyse qualitative : ++ = très efficace, + = efficace.

Analyse quantitative : (de l'activité de surface) : + = Oui, - = Non.

Vitesse d'analyse (temps nécessaire par analyse) : min = analyse en quelques minutes,
h = analyse en quelques heures,
j = analyse en quelques jours ;

Application dans HTS : + = Oui, - = Non, +/- = non rapporté mais principalement applicable.

*HTS: *high-throughput screening* (Criblage à haut débit).

5.12. Techniques d'identification

Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Cette structure est en générale révélée à l'aide de techniques spectroscopiques et chromatographiques.

Le diagramme ci-dessous donne un aperçu de ces méthodes.

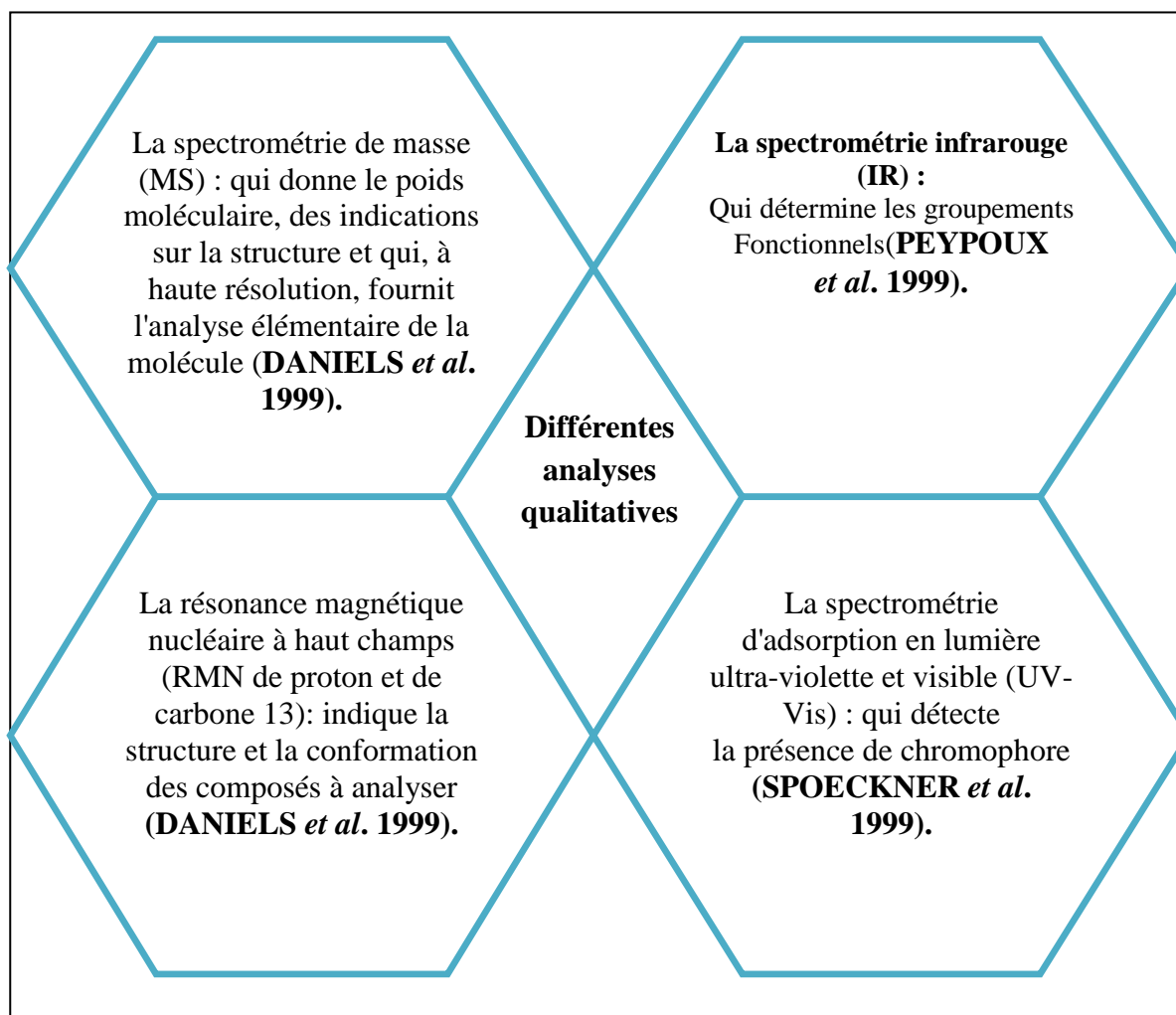


Figure 10 : Différentes analyses qualitatives des biosurfactants.

5.13. Extraction et purification des biosurfactant

L'objectif des étapes d'extraction et de purification est d'obtenir le produit le plus pur possible, sans perte d'activité biologique et en un minimum d'étapes, de manière à ce que le coût soit le plus faible possible (PASCAL, 2011).

Le tableau suivant résume les techniques d'extraction et de purification des biosurfactants les plus utilisés

Tableau 05: Différents procédés d'extraction et de purification des biosurfactants (DESAI et BANAT, 1997; SAHARAN *et al.* 2011).

Procédé	Exemples d'application
Précipitation acide	Surfactine
Extraction par solvant	Tréhalolipides,
Cristallisation	Glycolipides
Centrifugation	Glycolipides
Adsorption	Rhamnolipides,
Fractionnement de mousse et précipitation	Surfactine
Technique membranaire et précipitation	Mélange de biosurfactants Glycolipides
Ultrafiltration	Glycolipides
Chromatographie d'échange d'ions	Rhamnolipide

5.14. Domaines d'applications des biosurfactants

Les biosurfactants présentent en effet l'avantage d'être biodégradable et non toxique. De plus, certains d'entre eux, sécrétés par des organismes extrêmophiles, restent fonctionnels malgré des conditions drastiques de température, de salinité ou de pH (BANAT, 2000), c'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines.

Le tableau ci-dessous résume les applications et les rôles des biosurfactants dans différentes domaines :

Tableau 06 : Différentes applications potentielles et les rôles des biosurfactants.
(SANTOS *et al.*2016).

Industrie	Application	Rôle des biosurfactants
Environnement	Bioremédiation; Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures; Assainissement des sols et rinçage	Emulsification des huiles, abaissement de la tension interfaciale, dispersion des huiles, solubilisation des huiles, mouillage, étalement, détergence, moussage, inhibition de la corrosion dans les huiles combustibles et les équipements, rinçage du sol.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole; Désémulsification	Emulsification des huiles, abaissement de la tension interfaciale, désémulsification des émulsions d'huile, solubilisation des huiles, réduction de la viscosité, dispersion des huiles, mouillage des surfaces solides, étalement, détergence, moussage, inhibition de la corrosion dans les fuel-oils et les équipements.
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds; Assainissement des sols; Flottation	Mouillage et moussage, collecteurs et mousses, enlèvement de métal ions de solutions aqueuses, sols et sédiments, métaux lourds séquestrants, étalement, inhibition de la corrosion dans les huiles.
Aliments	Émulsification et désémulsification; Ingrédient fonctionnel	Solubilisation des huiles aromatisées, contrôle de la consistance, émulsification, agent mouillant, étalement, détergence, moussage, épaississant.
Médicament	Microbiologique; Pharmaceutique et thérapeutique	Agents anti-adhésifs, antifongiques, antibactériens, antiviraux, vaccins, thérapie génique, molécules immunomodulatrices.
Agriculture	Biocontrôle; Les engrais	Mouillage, dispersion, suspension de pesticides en poudre et engrais, émulsification de solutions de pesticides, facilitation de

Synthèse bibliographique

		mécanismes de biocontrôle des microbes, élimination des agents pathogènes des plantes et augmentation de la biodisponibilité des nutriments pour des microbes bénéfiques associés aux plantes.
Produits de beauté	Produits de santé et de beauté	Emulsification, agents moussants, solubilisation, agents mouillants, agents nettoyants, agents antimicrobiens, médiateurs de l'action enzymatique.
Nettoyage	Détergents à lessive	Détergents et désinfectants pour la lessive, le mouillage, la diffusion, inhibition de la corrosion.
Textiles	Préparation des fibres; Teinture et impression; Finition des textiles	Mouillage, pénétration, solubilisation, émulsification, détergence et dispersion, mouillage et émulsification en finition formulations, ramollissement.
Nanotechnologie	Synthèse de nanoparticules	Emulsification, stabilisation.

5.15. Avantages des biosurfactants :

Selon **GAKPE *et al* (2007)**, Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés que ceux de leurs homologues d'origine chimiques ; mais ils possèdent de nombreux avantages potentiels spécifiques :

- ✚ Biodégradabilité;
- ✚ Biocompatibilité et digestibilité;
- ✚ Disponibilité des matières premières;
- ✚ Économies de production acceptables;
- ✚ Utilisation dans le contrôle de l'environnement;
- ✚ Spécificité

5.16. Inconvénients des biosurfactants :

Selon **HEALY *et al* (1996)**, Le principal facteur limitant l'usage des biosurfactants demeure l'aspect économique d'une production à grande échelle, dont les principaux obstacles sont

- ✚ Faibles rendements de production par rapport au substrat(s);
- ✚ Importants investissements de capitaux;
- ✚ Faibles rendement volumiques;
- ✚ Problèmes de contrôle de procédé comme la formation de mousse;
- ✚ Problèmes de récupération et de purification de produit;
- ✚ Problèmes de caractérisation des produits finis en raison de leur complexité chimique.



Chapitre II
Matériel et méthodes

1. Objectifs

Notre travail est réalisé au niveau des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de la vie-Université Ziane Achour, Djelfa. Ce travail vise les objectifs suivants :

Mettre en évidence la capacité des souches halophiles sélectionnées à dégrader les hydrocarbures (pétrole brut, benzène et gasoil) et la production de molécules biosurfactants par ces mêmes souches.

2. Origines des souches

Les souches étudiées proviennent des sites : Rocher de sel et chott Zahrez el Gharbi. L'échantillonnage a été effectué par nos collègues au cours de l'année 2016 (**BELADEL *et al.*, 2016**) à partir de Rocher de sel (Etude de la biodiversité microbienne au niveau de Rocher de sel) et (**MELIANI et MORSLI ,2016**) à partir de Zaher el Gharbi.

3. Présentation des sites de prélèvements

3.1. Zahrez el Gharbi

Le chott Zahrez el Gharbi se situe dans la wilaya de Djelfa, au centre de l'Algérie à 50 Km de la ville de Djelfa à 10Km au sud-ouest de la commune de Hassi Behbeh, entre les coordonnées géographiques latitude **34°58'NORD** et longitude **2°44' EST** et s'élève sur une altitude de 840m (**MELIANI et MORSLI ,2016**).

Le chott et la sebkha sont une vaste dépression ou converge les eaux prévenant de l'ATLAS SAHARIEN et l'ATLAS TELLIEN, cette dernière est due d'une part a une topographie favorisant l'accumulation des eaux et d'autre part a son sol imperméable.

3.2. Rocher de sel

Le Rocher de sel est situé sur la route d'Alger à Djelfa, à 25 km au nord de Djelfa dans la commune d'Ain-Maabad, entre les coordonnées géographiques latitude : **34°77' 39.04 NORD** et longitude : **3° 17' 37.89 EST** et s'élève sur une altitude de 1083m. (**GAUTIER E.F, 1914**).

4. Etude microbiologique

4.1. Milieu de culture utilisé

Dans ce travail nous avons utilisé un milieu spécifique qui est nécessaire à la croissance des microorganismes halophiles qui est le milieu MSH.

Il y a deux différents milieux MSH complets :

- MSH complet solide qui contient les composants (g/l) suivants : NaCl 200, MgCl₂ 32, KCl 5, CaCl₂ 0.8, NaBr 0.6, NaHCO₃ 0.16, MgSO₄ 50, l'extrait de levure 5 et l'agar 20.
- MSH complet liquide qui contient les mêmes composants sans agar.
- Pour le milieu minimum nous avons réduit la quantité de l'extrait de levure à 0.25g/l dans l'étape d'ensemencement, après l'élimination total d'extrait de levure en présence des hydrocarbures.

4.2. Préparation du milieu de culture



Figure 11 : Matériel utilisé.



Figure 12: Composants du milieu complet.

Pour la préparation du milieu de culture, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Ajouter les composants cités précédemment dans un erlenmeyer de 1 L contenant 800 ml d'eau distillée placé sous agitation pour faciliter l'homogénéisation des différents composants.
- Additionner en dernier l'extrait de levure.
- Fermer l'ouverture de l'erlenmeyer à l'aide d'un papier aluminium pour éviter l'évaporation de la solution.
- Au moment de l'ébullition ajouter le volume manquant de l'eau jusqu'à 1 L.
- Les flacons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.



Figure 13: Milieu au cours d'agitation



Figure 14: Milieu après l'agitation.

4.3. Revivification des souches

Cette étape consiste à faire sortir les tubes du réfrigérateur pour s'adapter à la température ambiante pendant trois heures afin d'éviter le choc thermique.

Une fois cette mesure de sécurité prise, nous avons procédé à l'ensemencement des bactéries sur des Boîtes contenant le milieu MSH complet solide.

4.4. Méthode d'ensemencement

Selon la nature de notre échantillon les huit souches sont aérobies ; nous avons utilisé MSH complet solide. Dans ce cas, l'échantillon est prélevé avec une pipette Pasteur et mis dans des Boîtes de Pétri (chaque boîte pour une souche), Ces boîtes sont aussitôt étiquetées. Elles sont déposées dans l'incubateur à 40°C durant 8 jours.



Figure 15: Revivification et ensemencement des souches.

4.5. Test de biodégradation des hydrocarbures

L'objectif de ce premier test est de mettre en évidence le rôle des hydrocarbures (pétrole brut, gasoil, benzène) comme seule source de carbone pour leurs besoins énergétiques et de croissance. Nous avons utilisé le MSH minimum liquide comme un milieu de culture c'est-à-dire il n'y a pas d'extrait de levure dans le milieu.

Dans cette méthode 1/5 du volume de la culture bactérienne est prélevé et mis dans des flacons contenant 20 ml de MSH minimum et 0.2% de pétrole brut pour les quatre souches ; le même principe pour les 2 hydrocarbures (0.08% benzène, 0.2% gasoil). Nous obtenons Vingt-quatre flacons, pour chaque souches 3 flacons (flacons pour chaque hydrocarbure).

4.6. Mesure de la densité optique (DO)

Nous avons mesuré la densité optique (DO) chaque jour à l'aide d'un spectrophotomètre pour vérifier la croissance bactérienne (cinétique de croissance). La longueur d'onde utilisée est de 680 nm.

4.7. Test d'émulsification (E_{24})

Ce test a été mis au point par **FRANCY *et al.* (1991)** puis modifié par **BODOUR et MAIER(1998)**. Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe (pétrole brut, gasoil, benzène) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le Protocol du test consiste à mélanger 3 ml de milieu de culture contenant notre inoculum avec 3 ml d'hydrocarbure dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 minutes puis laissés se reposer pendant 24 heures, les comparer au témoin qui est constitué du 3 ml d'hydrocarbure incorporés dans 3ml de milieu de culture stérile.

Nous avons calculé l'index de l'émulsion (E_{24}) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante.

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

E_{24} : Activité d'émulsification après 24h.

H_e : Hauteur de l'émulsion formée.

H_t : Hauteur totale du mélange.

5. Analyses physicochimiques

5.1. Tests de production des biosurfactants

5.1.1. Déplacement de l'huile

Dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, 20 ml d'eau distillée sont déposés, puis une quantité de 10 μ l de pétrole est rajoutée à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau. 10 μ l de la suspension bactérienne sont déposés au centre délicatement. En dernier lieu, le diamètre des zones claires est mesuré.

La forme de la goutte sur la surface de l'huile est inspectée après 1min .Si la goutte d'huile sur le surnageant est devenue plate 1min après l'ajout de l'huile, le résultat est considéré comme positif. Si les gouttes restaient perlées, le résultat est noté comme négatif. **(THAVASI et al. 2010).**

5.1.2. Test de parafilm M

Le test de parafilm est utilisé comme un essai préliminaire pour la détection de la production des biosurfactants. Nous avons prélevé 25 μ l à partir du surnageant bactérien et déposer à l'aide d'une micropipette sur la surface hydrophobe du parafilm.

Nous avons mesuré les diamètres des gouttelettes obtenus (après effondrement sur papier parafilm par comparaison à une goutte de bouillon nutritif stérile et d'eau comme témoins stable). (SATPUTE et al. 2010).

5.2. Caractérisation des propriétés physicochimiques des biosurfactants

5.2.1. Localisation des biosurfactants

L'objectif de cette technique est de détecter la localisation cellulaire (extra ou intracellulaire) des biosurfactants produits par les souches bactériennes.

À partir d'un moût de fermentation de huit jours, prélever 10 ml de chaque souche bactérienne, effectuer une centrifugation à 2000 tours pendant 10 min et récupérer 3 ml de surnageant pour chacun. Ces derniers (3ml) sont additionnés par 3 ml d'un hydrocarbure (pétrole brut ; benzène ou gasoil), le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 2 à 3 min, puis on calcule l'index d'émulsification (E_{24}).

Si il y a une émulsion cela indique que les biosurfactants produits sont extracellulaires. Si l'émulsification est absente, cela indique que les biosurfactants produits sont intracellulaires.

5.2.2. Etude de la tension superficielle

La tension de surface est définie comme étant un état résultant des interactions qui s'exercent entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface.

Dans notre étude nous avons utilisé la méthode stalagmométrique, qui est basée sur la loi de Tate.

La méthode consiste à mesure la tension superficielle du surnageant en fonction du nombre de gouttes de l'eau, prise comme référence, et celles du surnageant qui tombent du tube capillaire (stalagmomètre), et des masses volumiques des deux liquides ; la relation établie est la suivante :

$$\gamma_L = \gamma_E * \frac{m_L}{m_E}$$

Avec :

m_E : Masse d'une seule goutte de l'eau.

m_L : Masse d'une seule goutte du liquide.

γ_E : Tension superficielle de l'eau en N/m (72.10^{-3} N/m à 25°C).

γ_L : Tension superficielle du liquide en N/m.



Figure 16: Mesure de la tension superficielle par la méthode stalagmométrique.

5.2.3. Mode opératoire de la mesure de la tension superficielle

Après centrifugation (9000 tr/min pendant 30 minutes à 4°C) de notre milieu bactérien pour les deux souches (N3, N15), nous avons récupéré le surnageant et mesurer la tension superficielle suivant le Protocol suivant (BAKHTI, 2015) :

Matériel et méthodes

Un stalagmomètre gradué est étalonné avec de l'eau distillée. Pour cela, on détermine la masse d'un grand nombre de gouttes d'eau de façon à pouvoir calculer la masse m_E d'une goutte pure délivrée par le stalagmomètre.

La même manipulation (avec le même stalagmomètre) est faite avec le surnageant.

- Au lieu de mesurer le nombre des gouttes, on peut mesurer la masse d'une goutte.
- Pour déterminer, la masse d'une goutte, on utilise une balance analytique. On fait écouler un certain volume de liquide se trouvant dans le stalagmomètre dans un bécher taré posé sur la balance et on note le nombre de gouttes. Plus le nombre de gouttes est élevé, plus la précision sur la masse d'une goutte est grande.
- Réaliser la manipulation avec l'eau distillée.
- Laver le stalagmomètre, et le sécher et rincer le avec le liquide à étudier.
- Aspirer le liquide jusqu'à 1 cm au-dessus du repère supérieur du tube.
- Laisser le liquide s'écouler lentement et verticalement en comptant le nombre de gouttes formées lors de l'écoulement du volume V repéré par les deux traits a et b du stalagmomètre.
- Répéter l'expérience trois fois et prendre la moyenne pour chaque liquide.
- Refaire l'expérience avec le surnageant.
- Appliquer la relation ci-dessus.

-On prendra :

$$M_T = N * m \text{ (pour l'eau ou pour liquide)}$$

M_T : Masse de l'eau ou du liquide qui correspond au nombre de gouttes.

m : Masse d'une seule goutte de l'eau ou du liquide.

N : Nombre de gouttes de l'eau ou du liquide.

$V = 6,3 \text{ cm}^3 =$ Volume entre les deux repères du stalagmomètre.

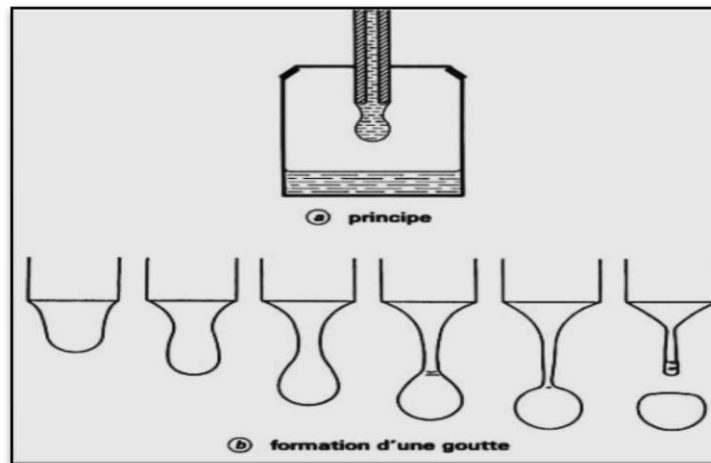
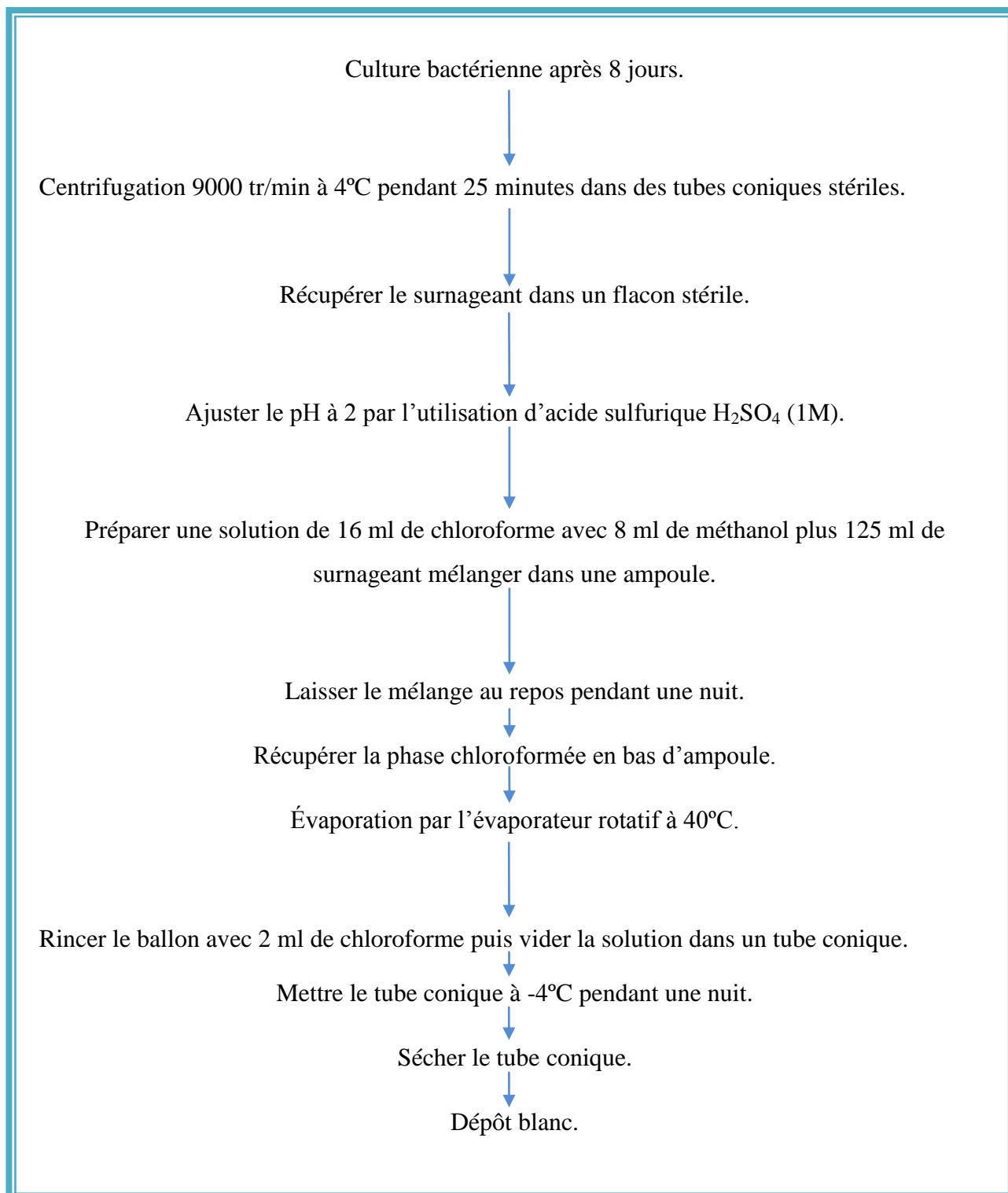


Figure 17: Mesure de la tension superficielle (NEINDRE, 1993).

5.3. Extraction des biosurfactants

Pour l'extraction des biosurfactants nous avons adopté le Protocol suivant pour les deux souches.

5.3.1. Pour les souches N3 ; N15 (ANANDARAJ et THIVAKARAN, 2010).



Matériel et méthodes

Ce Protocol présente les étapes d'extraction des biosurfactants



Figure 18: Surnageant bactérien après la centrifugation des trois souches.

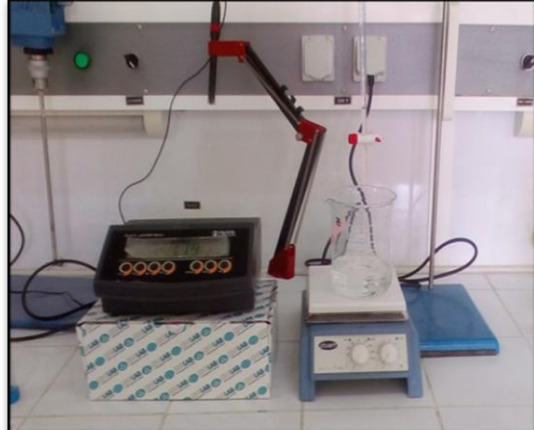


Figure 19: Diminution du pH de la solution à 2.



Figure 21: Evaporation de la phase chloroformique



Figure 20: Mélange au repos.



Figure 22: Dépôt blanc obtenu après l'extraction.



Chapitre III
Résultats et discussion

1. Résultats d'analyses microbiologiques

1.1. Test de biodégradation

Nous avons utilisé un milieu liquide minimum (MSH) comme un milieu de culture, dépourvu d'extrait de levure et additionné des hydrocarbures (pétrole brut à 0.2%, gazoil à 0.2% et benzène à 0.08%) comme seule sources de carbone, la température d'incubation est de 40 °C pendant 08 jours.

Les figures 23à30 montrent la croissance bactérienne dans un milieu MSH minimum liquide strictement minéral en présence des hydrocarbures pour les huit souches utilisées.

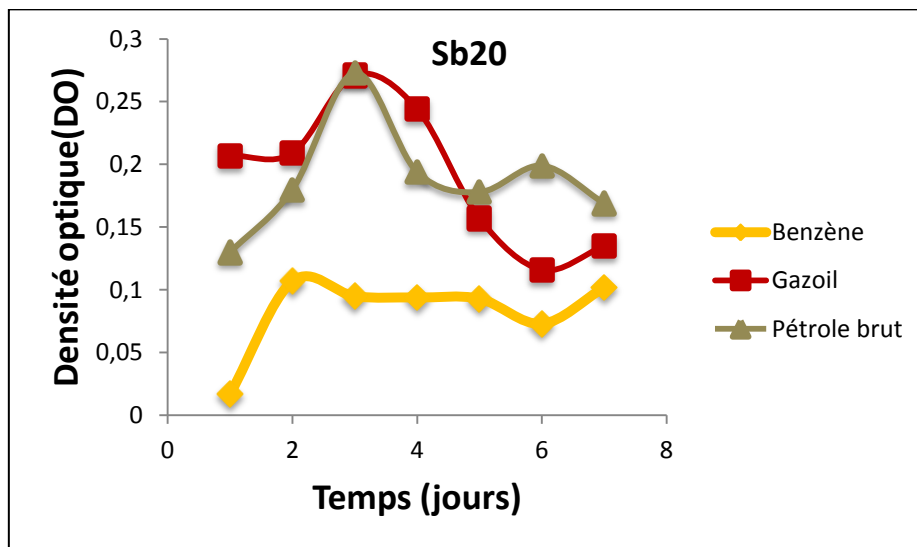


Figure 23 : Courbe de croissance de la souche Sb20 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

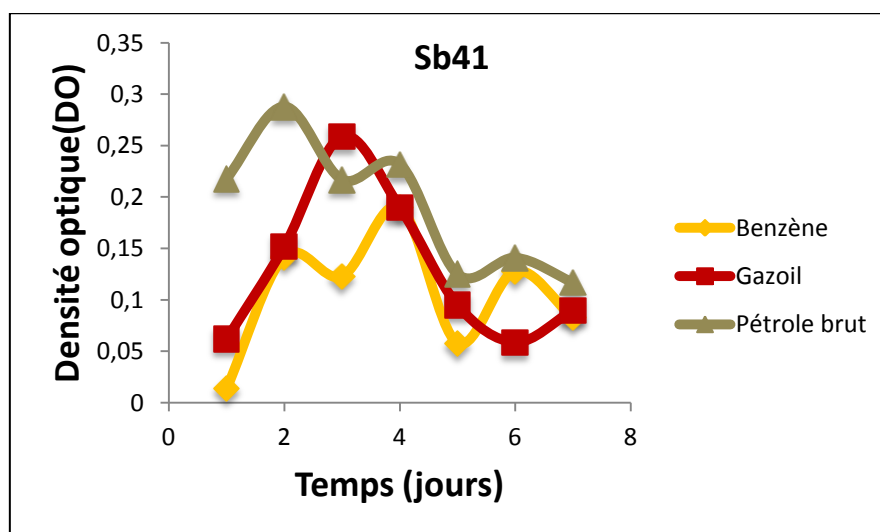


Figure 24 : Courbe de croissance de la souche Sb41 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

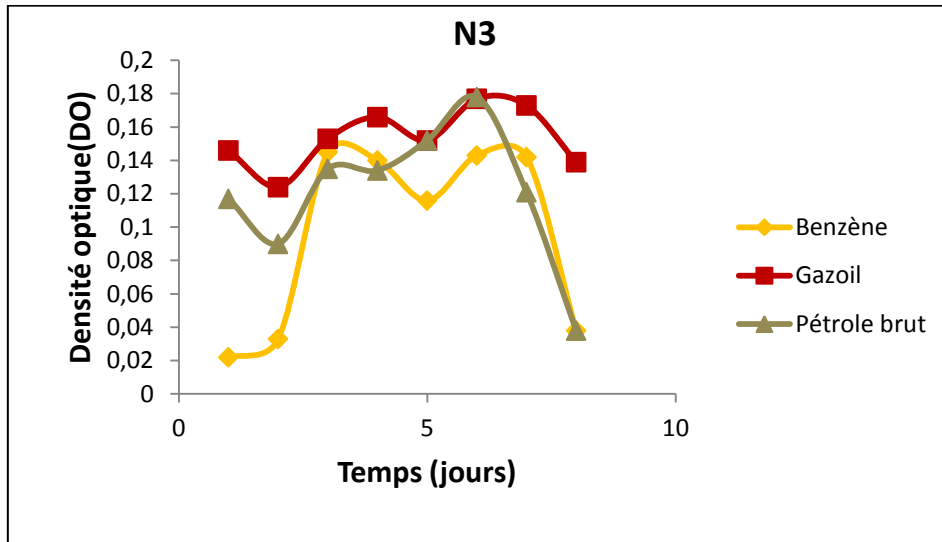


Figure 25 : Courbe de croissance de la souche N3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

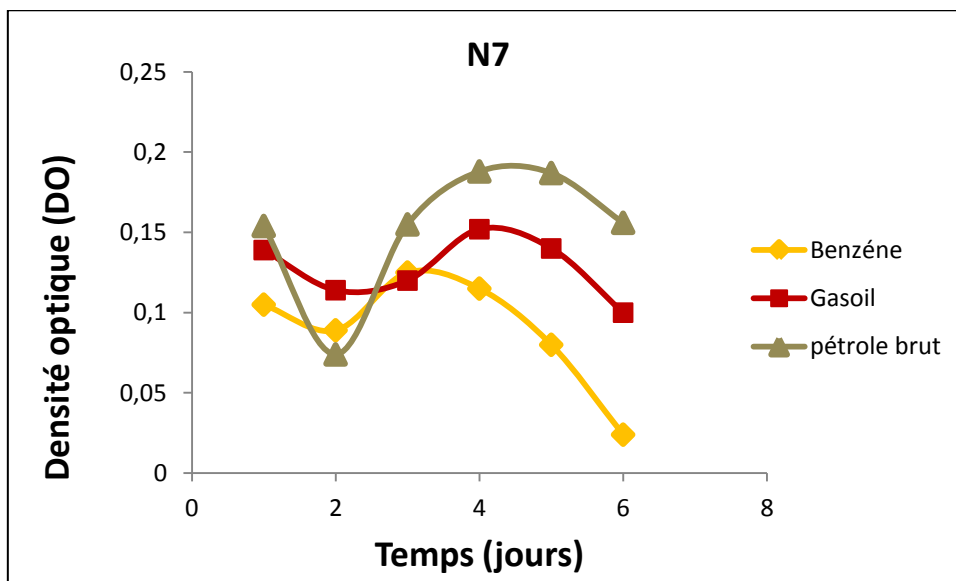


Figure26: Courbe de croissance de la souche N7 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

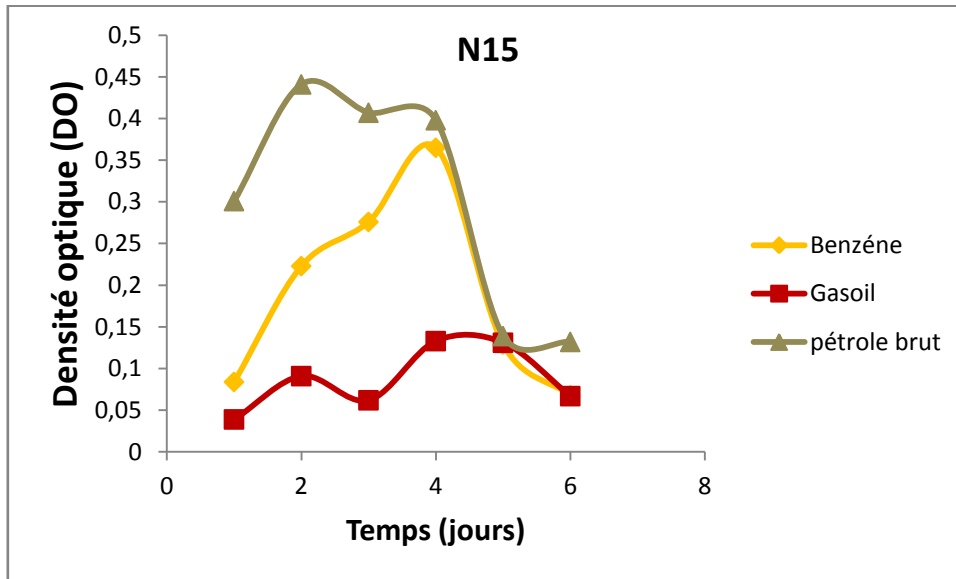


Figure27: Courbe de croissance de la souche N15 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

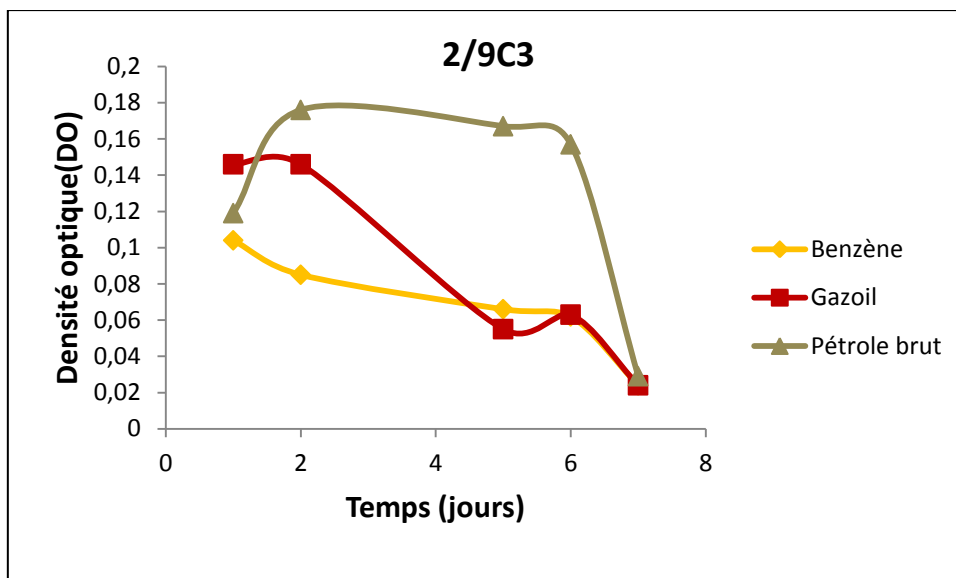


Figure28: Courbe de croissance de la souche 2/9C3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

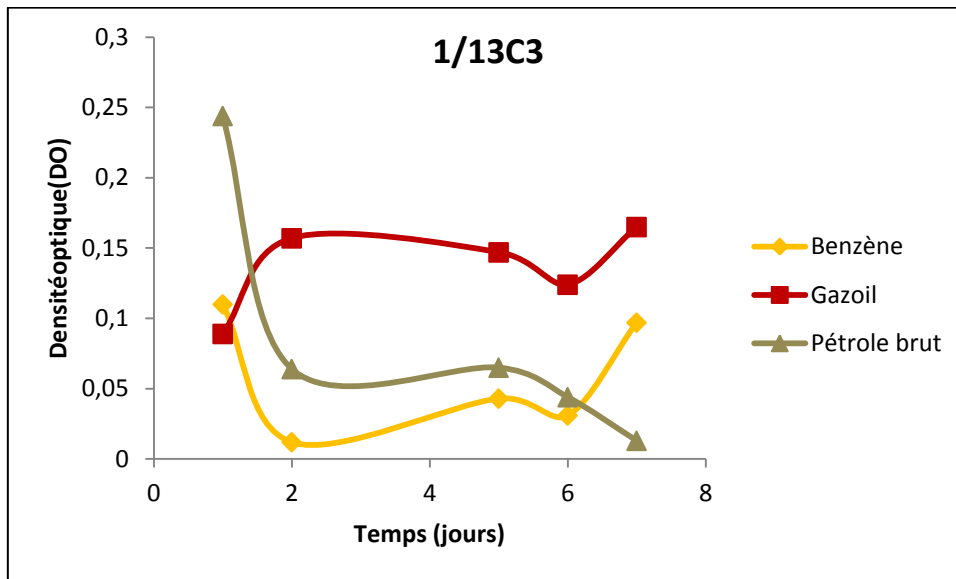


Figure 29 : Courbe de croissance de la souche 1/13C3 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

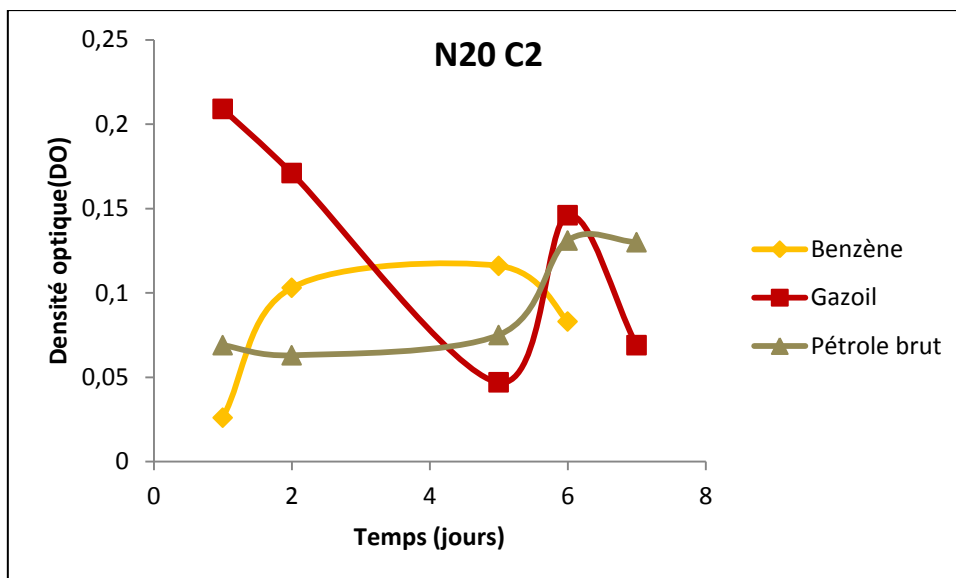


Figure 30: Courbe de croissance de la souche N20C2 dans un milieu minimum liquide avec 250mg/L de l'extrait de levure en présence d'hydrocarbures.

Nous avons constaté qu'il y a une croissance bactérienne suite à l'évolution de la densité optique de la solution.

1.2. Indices d'émulsification (E24)

Les figures 31 à 38 représentent les indices d'émulsion (E24) obtenus par les huit souches sélectionnées en présence du gasoil, du pétrole brut et du benzène.

Au vu des résultats obtenus ; nous pouvons en déduire que les souches Sb20, N3, N7 et N15 sont plus efficaces à dégrader les hydrocarbures que les reste des autres souches étudiées.

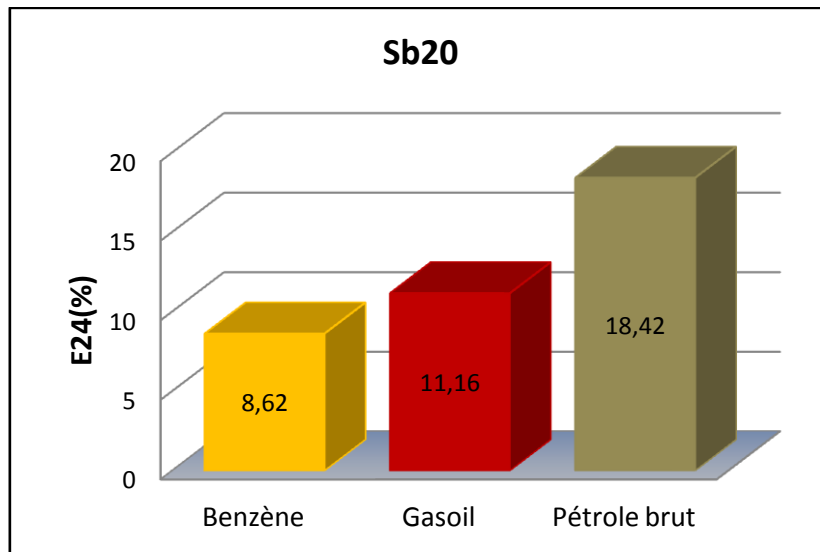


Figure 31: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (Sb20).

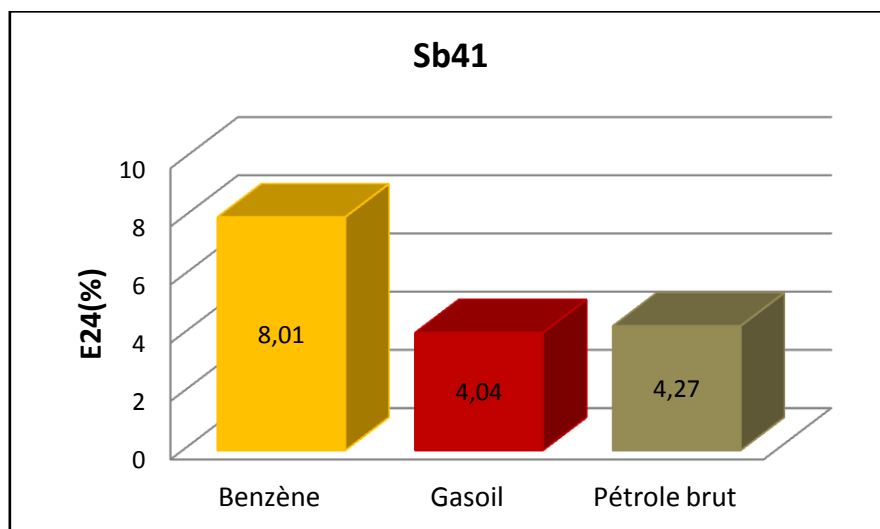


Figure 32: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (Sb41).

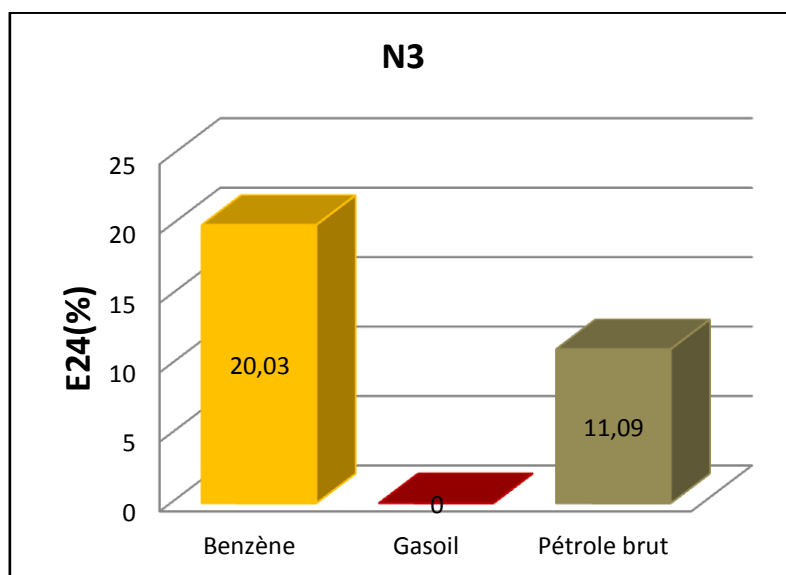


Figure 33 : Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N3).

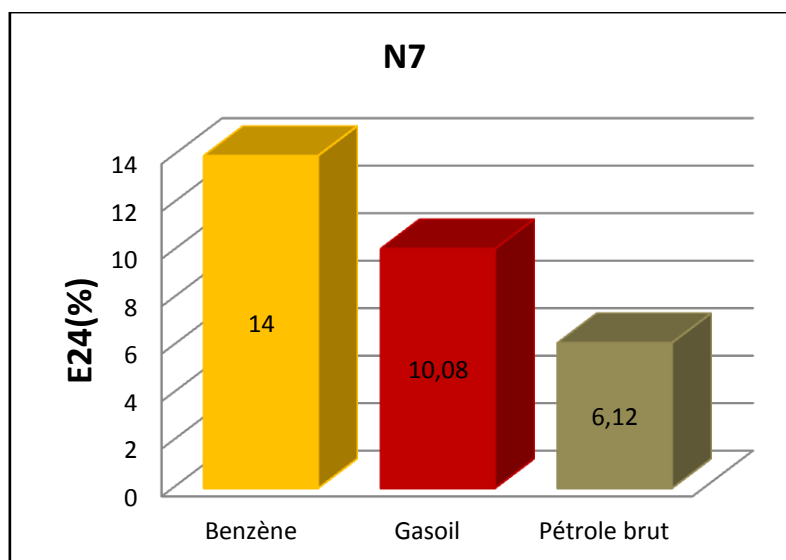


Figure 34: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N7).

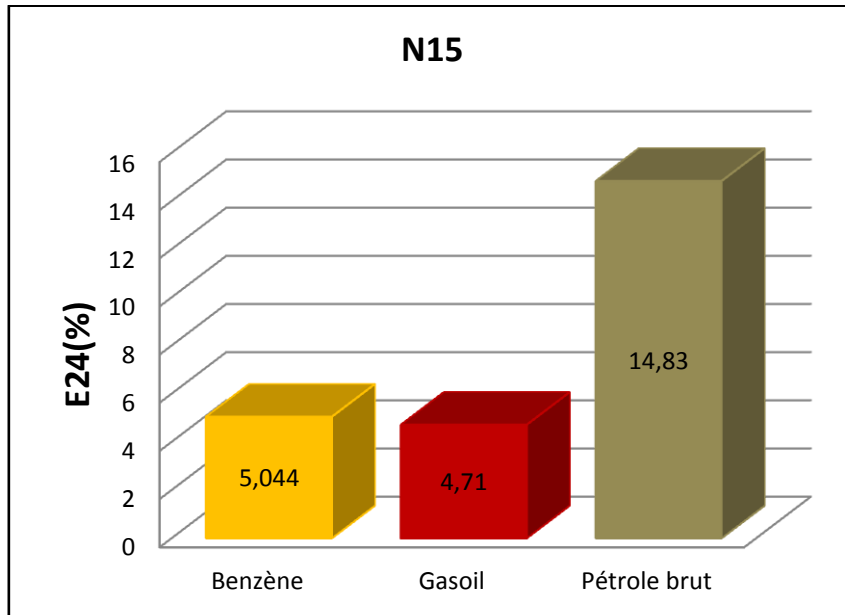


Figure 35: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N15).

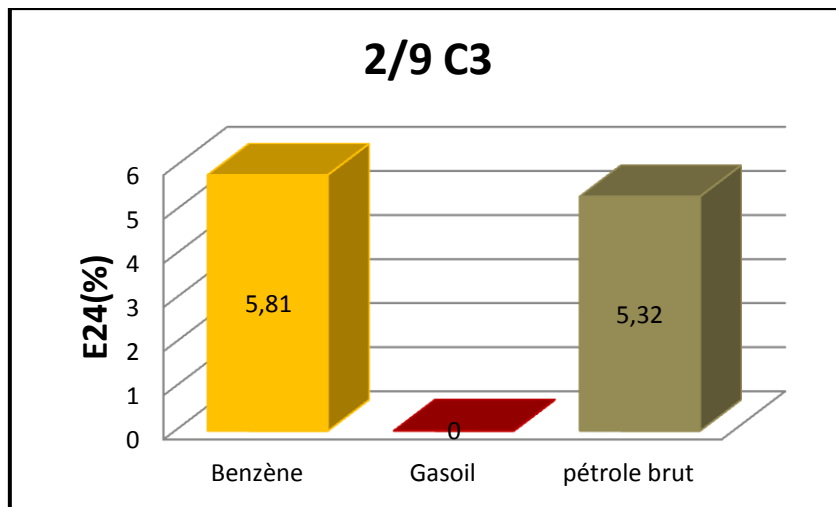


Figure 36: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (2/9C3).

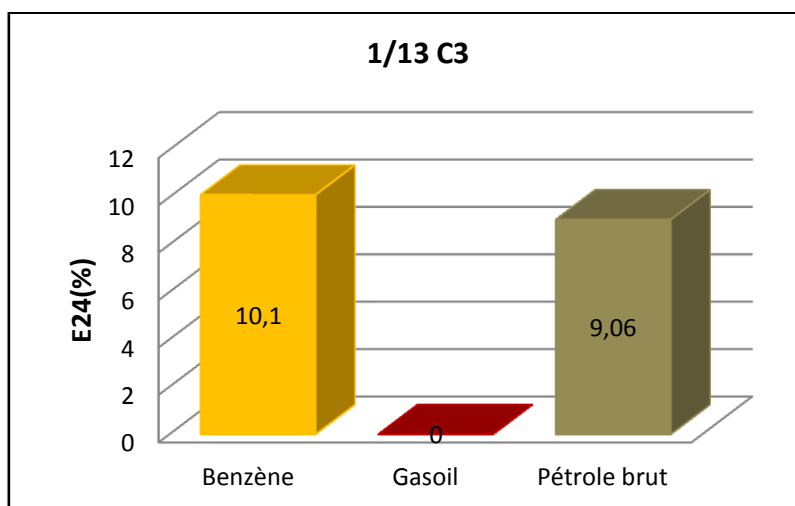


Figure 37: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (1/13C3).

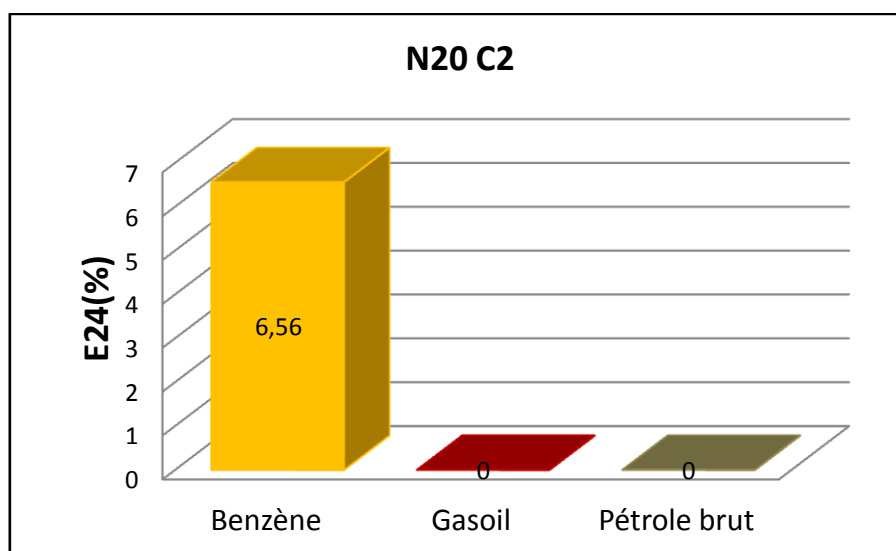


Figure 38: Comparaison de l'indice d'émulsion (E24) en fonction de l'hydrocarbure pour la souche (N20C2).

D'après les résultats du test d'émulsification nous avons choisi les souches N7, N3 et N15 pour la suite de notre travail.

2. Résultats d'analyses physico-chimiques

2.1. Tests de production des biosurfactants

2.1.1. Déplacement de l'huile

Les résultats du test de déplacement de l'huile montrent que le surnageant des trois souches a provoqué une zone de déplacement d'huile visible ; ce qui suggère une activité de surface et de mouillage, ce qui est un indicateur de présence de biosurfactants.

Les résultats du test de déplacement d'huile sont positifs pour les trois souches : le surnageant des trois souches a provoqué une zone de déplacement d'huile visible ; ce qui indique que les trois souches ont une activité de surface et de mouillage, ce déplacement moyen est de l'ordre de 9.71 mm, 5.83 mm et de 5 mm respectivement pour les souches N3, N7 et N15.

Ce résultat c'est un indicateur de présence de biosurfactants ; donc les trois souches étudiées sont productrices de molécules douées d'activité de surface et ou d'émulsification.

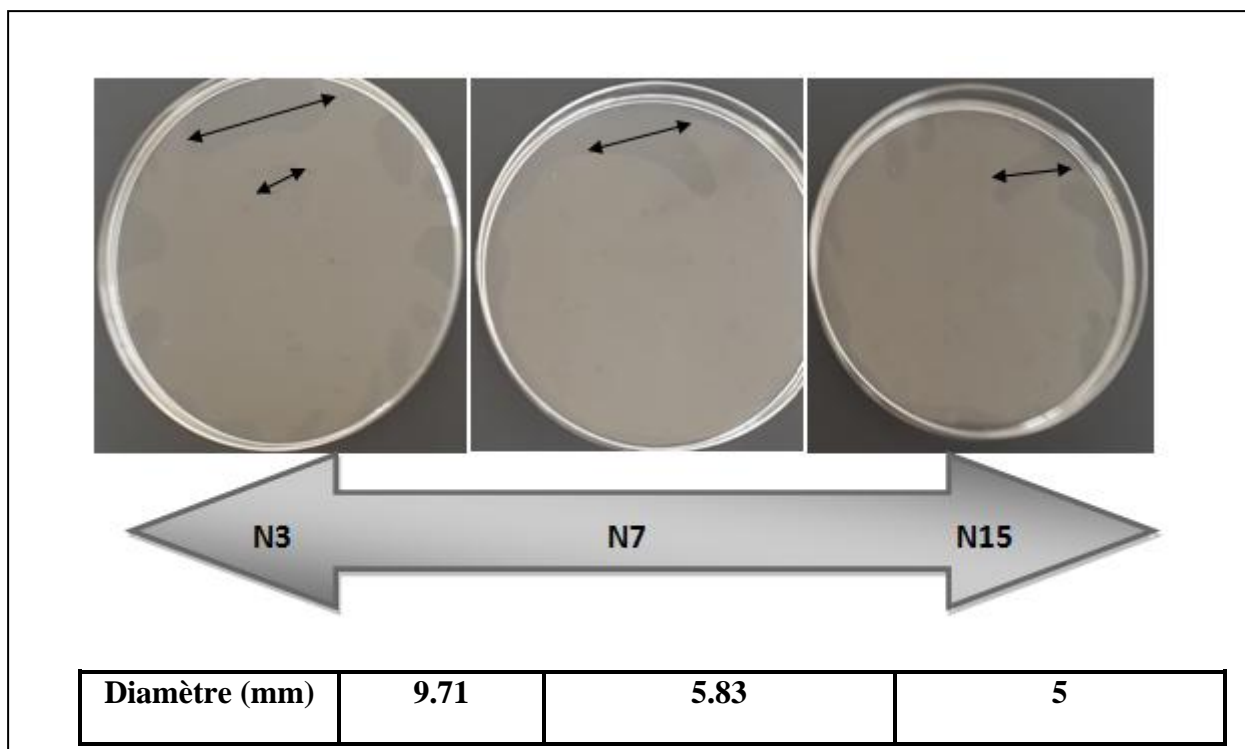


Figure 39 : Déplacement de la couche superficielle de pétrole brut du à la présence de biosurfactants dans les surnageants des trois souches testées.

Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant qui induit une variation de l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression superficielle du bio-tensioactif fait

Résultats et discussion

déplacer la phase huileuse (MORIKAWA *et al.* 1993). Le tableau suivant compare nos valeurs avec ceux trouvés par d'autres études.

Tableau 07: Résultats du test de déplacement de l'huile pour différentes souches.

Souche	Origine	Diamètre (cm)	Référence
<i>Brevibacterium lutescens</i> (JS05)	Usine de stockage de la pêche contenant une teneur élevée en sel (Inde)	4.2	JAYSREE <i>et al.</i> 2013
<i>Bacillus sp.</i> (JS06)	Usine de stockage de la pêche contenant une teneur élevée en sel (Inde)	3.0	JAYSREE <i>et al.</i> 2013
<i>Halobacillus Dabanensis</i>	Ecosystème de Mangrove contaminée par du pétrole, Egypte	4.00 ± 0.25	KHEIRALLA <i>et al.</i> 2013
<i>Pontibacillus Chungwhensi</i>	Ecosystème de Mangrove contaminée par du pétrole, Egypte	3.60 ± 0.10	KHEIRALLA <i>et al.</i> 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (C450R)	Eaux de production des champs de pétrole, Tunisie	8 ± 1	MNIF <i>et al.</i> 2011
N3	Rocher de sel	0.971	Cette étude
N7	Rocher de sel	0.583	Cette étude
N15	Rocher de sel	0.5	Cette étude

2.1.2. Test de parafilm M :

Les résultats du test de parafilm sont indiqués sur la figure 40 et le tableau.

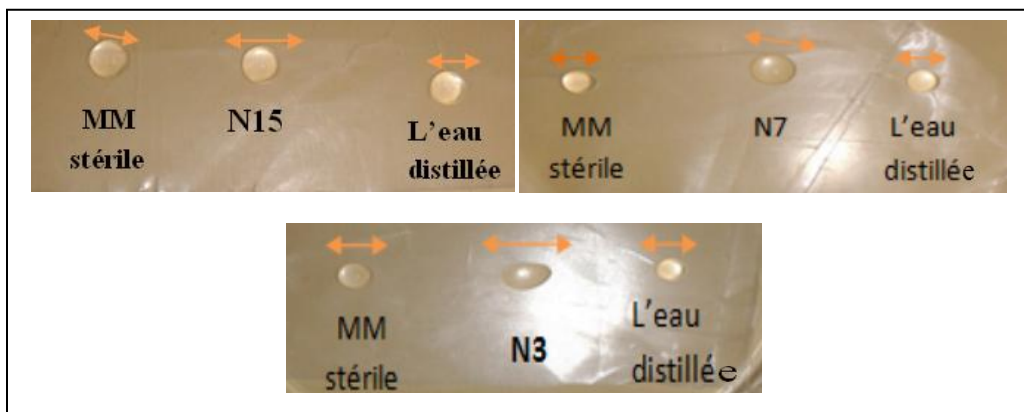


Figure 40: Test de parafilm M.

Tableau 08 : Résultats du test de parafilm M.

Milieu	Témoin		Surnageant bactérien		
	MSH	Eau distillée	N15	N7	N3
Diamètre (mm)	2.63	2.52	3.38	3.18	3.87

Les résultats du test de parafilm montrent d'une part que les trois souches sont productrices de biosurfactants et d'autre part qu'il y a une différence non significative vu que les diamètres des gouttelettes obtenus après effondrement sur papier parafilm par comparaison à une goutte du MSH minimum liquide stérile et d'eau distillée comme témoins stables sont de 2.63 mm et 2.52mm. Les valeurs trouvées sont de 3.87, 3.18, 3.38 respectivement pour les souches N3, N7 et N15.

Si le surnageant ne contient pas de biosurfactants, les molécules d'eau polaire sont repoussées par la surface hydrophobe du parafilm et les gouttes restent stables. Si le surnageant contient des biosurfactants, les gouttes s'étalent sur la surface car la tension interfaciale entre la goutte du surnageant et la surface hydrophobe du parafilm est réduite par la présence du biosurfactant.

2.2. Caractérisation des propriétés physicochimique des biosurfactants

2.2.1. Localisation des biosurfactants

Les résultats obtenus pour le test de localisation des biosurfactants sont schématisés par le diagramme suivant :

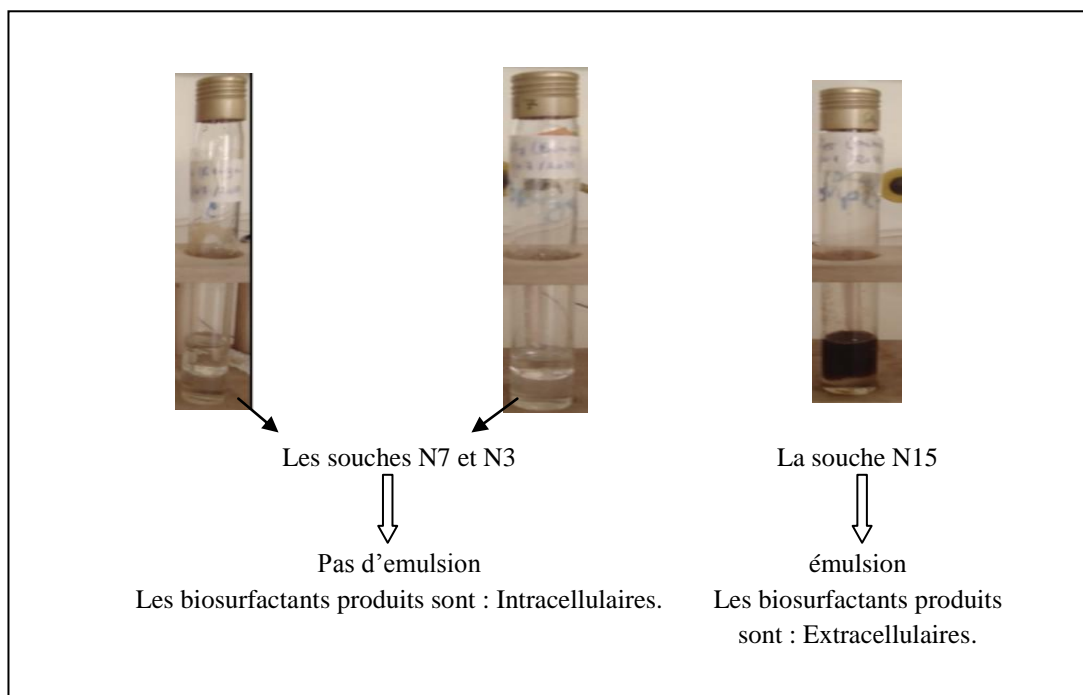


Figure 41:Résultat du test de localisation des biosurfactants.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure le biosurfactant issu de la souche N15 est de nature extracellulaire, par contre le biosurfactant des souches N7et N3 est de nature intracellulaire.

KEBBOUCHE-GANA (2008) a obtenu des indices d'émulsification (en %) après 48 h pour cinq souches *Archeobactéries halophiles* strictes isolées de sebkha d'In Salah qui sont productrices de biosurfactants extracellulaires.

Tableau 09 : Indice d'émulsification d'après (KEBBOUCHE-GANA, 2008).

Souches isolées à partir de sebkhas	Index d'émulsification (%) après 48 h du Surnageant de culture
A21	72.3 + 0.6
B21	65.8 + 0.7
C21	66.9+ 0.5
D21	75.2 + 0.4
E21	66.3 + 0.6

2.2.2. Etude de la tension superficielle

Les résultats de la tension superficielle des deux surnageants sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Résultats de la tension superficielle pour les deux souches.

Souche	Tension superficiele N/m	Tension superficiele de l'eau N/m
N15	59.89×10^{-3}	72.00×10^{-3}
N3	68.4×10^{-3}	

Nous avons constaté que la tension de surface passe de 72.00×10^{-3} N/m à 59.89×10^{-3} N/m et à 68.4×10^{-3} N/m respectivement pour la souche N15 et N3 ; cette diminution n'est pas significative en comparaison avec celle trouvée dans la littérature :

Le rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* et la surfactine produite par *Bacillus subtilis* ont la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m à 30 mN/m (BANAT *et al.* 1991).

Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures peut réduire la tension superficielle du milieu de culture jusqu'à 36 mN/m (SOMAYEH *et al.* 2008).

3. Extraction des biosurfactants

Nous avons constaté que les quantités des extraits réalisées par la technique employée sont de l'ordre de 41 mg et de 390 mg respectivement pour les souches N15 et N3.

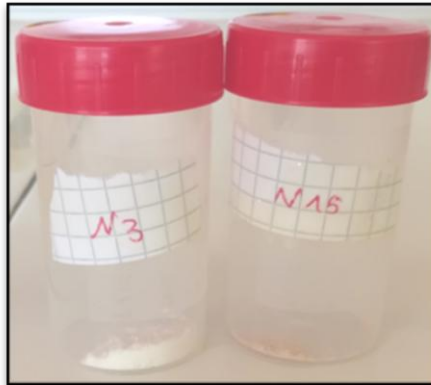


Figure 42 : Produits de l'extraction



Conclusion

Conclusion

Ce travail avait un double objectif, d'une part la valorisation de la biodiversité locale par la sélection de souches bactériennes halophiles capables à dégrader les hydrocarbures (pétrole, gasoil et benzène), et d'autre part de mettre en évidence leur capacité de sécrétion de molécules douées d'activité de surface et d'emulsification et essai partielle et de caractérisation des ces biomolécules.

Cette étude est une suite des recherches effectuées l'étude passée Nous avons étudié huit souches (Sb41, Sb20, N3, N7, N15, 1/13C3, N20, 2/9C3), les sites de prélèvements de ces souches se situent au niveau de la dépression de Zahrez el Gharbi et de Rocher de sel, dans la région de Djelfa.

Dans ce travail, nous avons fait des tests microbiologiques pour sélectionner les meilleures souches dégradant les hydrocarbures (pétrole brut, gasoil et benzène) selon le critère de l'indice d'émulsion ce qui a abouti à la sélection de deux souches (N3 et N15) qui sont révélées plus efficaces pour dégrader les hydrocarbures ; le pétrole et le benzène étant les mieux dégradé.

Nous avons mené des tests d'analyse qualitative pour déceler la présence de biosurfactant et de bioémulsifiants comme le test du parafilm M, le test de déplacement d'huile, ainsi que la mesure de la tension superficielle du mout de fermentation, dont la valeur est de l'orde de 59.89 mN/m et de 68.41 mN/m respectivement pour les souches N15 et N3, des valeurs inférieure à celle de l'eau (73 mN/m).

Le résultat de test de Localisation des biosurfactants a montré que N15 produit des biosurfactants extracellulaire avec ($E_{24}= 14.83\%$) par contre N3 produit des biosurfactants intracellulaire avec ($E_{24}= 20.03\%$) ; les produits d'extraction obtenus affichent des masses de 41 mg et 390 mg respectivement pour N15 et N3.

Au terme de cette étude nous tenons à signaler que les résultats de la caractérisation restent préliminaires. Il est essentiel d'approfondir cette prospection afin de confirmer nos résultats et d'approfondir d'avantage les essais.

Le présent travail a été réalisé dans une durée limitée et avec un manque de moyens de matériel et de produit et est loin de venir à bout des objectifs assignés; et à la lumière des

Conclusion

résultats obtenus, il est préférable de prolonger et de compléter cette étude par des approches plus approfondies portant sur les points suivants :

- + L'analyse par infrarouge, RX...;
- + Etude taxonomique des souches halophiles productrices de biosurfactants ;
- + Identification des souches par les outils de la biologie moléculaire ;
- + Utilisation d'autres analyses et techniques pour identifier les biosurfactants produits par les souches ;
- + Optimisation des milieux de production ;
- + Optimisation des techniques d'extraction et de purification ;
- + Réalisation de tests de toxicité ;
- + Mettre en œuvre des applications de ces biosurfactants dans le domaine biotechnologique, agroalimentaire, environnemental ...

Références bibliographiques

Chapitre I

- ✚ AL-ARAJI L., ABD RAHMAN R.N.Z.R., MAHIRAN B. et ABU BAKER.S., 2007 – MINIREVIEW: Microbial Surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15(3): 99-105.
- ✚ ALEXANDER, M. (1997). Microbial communities and interactions: aprelude. In *Manual of Environmental Microbiology*. Ed. C. I. Hurst. pp. 5-13. ASM Press, Washington.
- ✚ APARNA A., SRINIKETHAN G et SMITHA H., 2011 – Effect of Addition of Biosurfactant Produced by Pseudomonas sp. on biodegradation of crude oil. *Second international conference on environmental science and technology, IPCBEE Singapore, IACSIT Press*, 6: 71-75.
- ✚ AUBERT G., 1975–Les sols sodiques en Afrique du Nord. *Annales de l'Institut National. Agronomique. Alger, Algérie VI*: 185-195.
- ✚ BALLERINI D. et VANDECASTEELE J. P., (1999). La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In : Biotechnologie, coordonnateur R. Scriban, 5ème édition, *Edition Tech et Doc*, pp. 835- 865.
- ✚ BALLERINI D., GATELLIER C. et VOGEL T., *Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués*, ADEME Editions, (1998), 198 p.
- Balu A Chopade, 2010. Methods for investigating biosurfactants and
- ✚ BANAT I.M., 2000 – Les biosurfactants, plus que jamais sollicités, ENVIRONNEMENT. BIOFUTUR, 198 : 44-47.
- ✚ BERTRAND A. R., BRIANT J., CASTELA A., DEGOBERT P., GATELLIER C., MASSON M., OUDIN J.-L. et J. POTTIER., (1972).Prevention et lutte contre la pollution au cours des operations de forage et de production en mer.Oil and GasEnergyBooksellersince.
- ✚ BERTRAND J.C.et MILLE G., (1989).Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In : BIANCHI M., MARTY D., BERTRAND J.C., et GAUTHIER M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), chapitre 13 :343-385.
- bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010: 1-18.
- ✚ BOGNOLO G. (1999), Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152: 41-52.

Références bibliographiques

- ✚ CAMPOS JM1, STAMFORD TL, SARUBBO LA, DE LUNA JM, RUFINO RD, BANAT IM (2013) Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol Prog.* 2013 Sep-Oct; 29(5):1097-1108.
- ✚ CHUNG YR, KIM CH, HWANG I & CHUN J (2000) *Paenibacillus koreensis* sp. nov. A new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50:1495–1500
- ✚ CHUNG YR, KIM CH, HWANG I, CHUN J (2000) *Paenibacillus koreensis* sp. nov. A new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1495–1500
- ✚ COLIN F., (2000). *Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés*, Académie des sciences, rapport n° 44, Editions Tec&Doc, 417 p
- ✚ DANIEL, H. J., OTTO, R. T., BINDER, M., REUSS, M., AND SYLDATK, C. 1999. Production of sophorolipids of whey: Development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51:40–45.
- ✚ DANIELS, C. J., J. D. HOFMAN, J. G. MACWILLIAM, W. F. DOOLITTLE, C. R. WOESE, K.R. LUEHRSEN, & G.E., FOX (1985). Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archae bacterium *Halobacterium volcanii*. *Mol Gen Genet* 198: 270–274.
- ✚ DASSARMA S. et ARORA P., 2001 – Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*: 19.
- ✚ DESAI J.D et BANAT I.M., 1997 – Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 61 (1): 47-64.
- ✚ EBEL C., MADERN D., et ZACCAI G. 2004. Molecular adaptation of halophilic proteins. *Extremophiles*,2:1-7.
- ✚ EDGERTON M.E et BRIMBLECOME P., 1981 – Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol*, 27: 899-909.
- ✚ FIECHTER A. (1992), Biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, 10: 3-12.
- ✚ FRANAENNEC J.P. ; LEPRINCE P. ; TREMBOUZE P. ; FAVENNEC J.P. ; EDERN Y, (1998). Le raffinage de pétrole. Pétrole brut –produit pétrolier–schéma de

Références bibliographiques

- fabrication tom5 .technip . *Fuel. Applied and Environmental Microbiology* ; 66(10) :4205 – 421.
- ✚ GABET S., 2004 – *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.*Thèse de doctorat, l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, 177 p.
- ✚ GAKPE E., PATTANATHU K. S. M. R. et HATHA M. A.A., 2007 – Microbial Biosurfactants –Review. *J.Mar. Atmos. Res*, 3(2): 1-17.
- ✚ GRANT W. D. (2004). Life at low water activity. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 1249-1267
- ✚ GUERRA-SANTOS H.L., OTHMAR K.O et ARMIN F., 1986 – Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 24 : 443-448.
- ✚ HASSANI-BELKACEM I.I., 2015 – *Etudes des archaea halophiles et hydrocarbonoclastes isolées des zones arides du Sahara algérien.* Thèse doctorat, Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, 163p.
- ✚ HEALY M.G., DEVINE C.M et MURPHY R., 1996 – Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
- ✚ HEALY M.G., DEVINE C.M et MURPHY R., 1996 – Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18 : 41-57.
- ✚ HOLMBERG, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159 l'ingénieur. *Traité constantes physico-chimiques*. 475 : 2-12.
- ✚ KAPPELI O et FINNERTY W.R., 1979 – Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 140 (2): 707–712.
- ✚ KHARROUB K., 2007 – *Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila).* Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie., Université Mentouri – Constantine, 194p.

Références bibliographiques

- ✚ KRZMARZICK M-J., 2018 –Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation. Hindawi, 17.
- ✚ KUSHNER, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilicbacteria. In *The biology of halophilicbacteria*. Eds. R. H. Vreeland& L. I. Hochstein. pp. 87-103. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- ✚ LANG S et WULLBRANDT D., 1999 – Rhamnose lipidsbiosynthesis–Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 51 : 22-32.
- ✚ LARPENT C., 1995 – Tensioactifs. *TECHNIQUE DE L'INGENIEUR*, K342, 14 p.
- ✚ LAURA C., CASTILLO-CARVAJAL., JOSÉ LUIS SANZ-MARTÍN AND BLANCA E., BARRAGÁN-HUERTA., 2014. Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(21) :9578–9588.
- ✚ LECOMTE P., (1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. *Édition Lavoisier*, TEC & DOC, p. 198.
- ✚ LITCHFIELD C.D et GILLEVET P.M., 2002 – Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J IndMicrobiol Biotechnol*, 28: 48-55.
- ✚ MAIER R.M., 2003 – Biosurfactants : evolution and diversity. *Advances Applied Microbiology*. 52: 101-121.
- ✚ MARGARITIS A., ZAJIC J.E et GERSON D.F., 1979 – Production and Surface-Active Properties of Microbial Surfactants ,*Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXI,p : 1151- 1162.
- ✚ MCGENITY T.J., GEMMELL T.N., GRANT W.D et STAN-LOTTER H., 2000 Microorganisms from single cells to global climate. *FEMS MicrobiolRev*24, 263-290.
- ✚ MULLIGAN C.N., YOUNG R.N. ET B.F. GIBBS (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60:371-380
- ✚ NEINDRE B.L. (1993). Tensions superficielles et interfaces. *Techniques d'Opinion in Biotechnology*, 3: 249-252.
- ✚ OLLIVIER B., CAUMETTE P., GARCIA J.L et MAH R., 1994 – Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev*, 58 : 27-38.
- ✚ OREN A., 2002 – Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind MicrobiolBitechnol* , 28 : 56-63.
- ✚ OREN A., 2006 – Life at High Salt Concentrations. *Prokaryotes*, 2: 263–282

Références bibliographiques

- ✚ OREN, A et al. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extreme lyhalophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles* 6, 491-498.
- ✚ OREN, A. (2001). The bioenergetics basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia* 466, 61-72.
- ✚ Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol*, 2 : 243-250.
- ✚ PAPAGEORGION G. C. & MURATAN. (1995). Unusual strong stabilization effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res* 44, 243-252.
- ✚ PASCAL C., 2011– LA FERMENTATION – OPÉRATIONS UNITAIRES EN GÉNIE BIOLOGIQUE. 1^{er} ED. CNDP-CRDP, Bordeaux, France, 111 p.
- ✚ PEYPOUX F., BONMATIN J.M et WALLACH J., 1999– Recent trends in the biochemistry of surfactin, MINI-REVIEW. *App Microbiol Biotechnol*, 51: 553-563.
- ✚ RAMKRISHNA S., 2010 – *Biosurfactants – Advances in experimental medicine and biology*. Springer Science, USA, 331 p.
- ✚ RHODIA G., (1998). Guide à la décision pour le choix d'une technique de dépollution des sols. *Edition entreprise Rhodia Ecoservice*, Paris P. 413-421.
- ✚ RON E.Z. ET E. ROSENBERG (2002). Biosurfactants and oil remediation, *Current*
- ✚ SAHARAN B.S., SAHU R.K et SHARMA D., 2011 – A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, GEBJ-29.
- ✚ SANJAY ARORA¹., MEGHNA J., VANZA, RIDDHI MEHTA ., CHIRAG BHUVA and PURVI N., 2014. Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. *Patel African Journal of Microbiology Research*, 8(33) :3070-3078.
- ✚ SANTOS, D.K.F., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SANTOS, V.A. AND SARUBBO, L.A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), p.401.
- ✚ SATPUTE SK, BANPURKAR AG, DHAKEPHALKAR PK, BANAT IM, CHOPADE BA, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010: 1-18.

Références bibliographiques

- ✚ SCRIBAN R., (1999). Biotechnologie : restauration par voie biologique des sols contaminés par la polluante organique 5ème édition. *Ed Lavoisi*.
- ✚ SOLTANI M., 2004 – *Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone*. Thèse de doctorat de l'université Paris 6, 284p.
- ✚ SPOECKNER S., WRAY V., NIMTZ M et LANG S., 1999 – Glycolipids of the smut fungus *Ustilagomaydis* from cultivation on renewable resources. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 33-39.
- ✚ SUREKHA K SATPUTE, ARUN G Banpurkar, Prashant K. Dhakephalkar, Ibrahim M Banat,
- ✚ VAN HAMME JD, Singh A, WARD OP (2006) Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Advances* 24:604–620
- ✚ VANDECASTEELE J .P, (2005). Microbiologie pétrolière, Ed technip .Volume 2.
- ✚ VENTOSA, A et al. (1999). Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 131-136.
- ✚ WAUQUIER J-P., 1994 – Le raffinage de pétrole : Pétrole brut-produits pétrolier-schéma de fabrication. Ed. *Technip, Paris*, Tome 1, 478p.
- ✚ WELSH D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms from single cells to global climate. *FEMS Microbiol Rev* 24, 263-290.

Chapitre II

- ✚ ANANDARAJ B. et THIVAKARAN P., 2010 – ISOLATION AND PRODUCTION OF BIOSURFACTANT PRODUCING ORGANISM FROM OIL SPILLED SOIL. *jbiosci tech*, 1(3):120-126.
- ✚ BAKHTI M., 2015 – TP 01 Détermination de la tension superficielle par stalagmométrie. *Travaux pratique de physicochimie des surfaces et des colloïdes*, département de biologie ., Djelfa, 4 p.
- ✚ BELADEL A., CHEMMA A., 2016 - Etude de la biodiversité microbienne au niveau de Hajr –el melh.
- ✚ BODOUR A.A et MILLER-MAIER M.R., 1998– Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 273–280.
- ✚ FRANCY D.S., THOMAS J.M., RAYMOND R.L et WARD C.H., 1991 – Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:237-246.
- ✚ GAUTIER E F., 1914 – Le Rocher de sel de Djelfa. *Annales de géographie*. 129 : 245-260.
- ✚ MELIANI H., MORSLI A., 2016 – Etude de la biodiversité microbienne de la zone halomorphe de la chotte Zahrez El Gharbi.
- ✚ NEINDRE B.L., 1993 – Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques. 475 :2-12.
- ✚ THAVASI R., JAYALAKSHMI S et BANAT I.M., 2011 – Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacteriumkutscheri*and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 102: 772–778.

Chapitre III

- ✚ BANAT I., SAMARAH N., MURAD M., HORNE R. et BENERJEE S., 1991– Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *Word J.Microbiol. Biotechnol*, 7:80-84.
- ✚ JAYSREE R.C., RAJAM C. et RAJENDRAN N., 2013 –BIOSURFACTANT PRODUCTION BY HALOPHILIC BACTERIA. *EnvironmentalBiotechnology*, 4(4): (B) 904 – 912.
- ✚ KEBBOUCHE-GANA S., GANA M.L., KHEMILI S., FEZOUANE-NAIMI F., BOUANANE N.A., PENNINGCKX M et HACENE H., 2008 – Isolation and characterization of halophilicArchaea able to produce biosurfactants. *J IndMicrobiolBiotechnol*, 36: 727–738.
- ✚ KHEIRALLA Z.H., ASHOUR S.M., RUSHDY A.A et AHMED H.A., 2013 – Characterization of Biosurfactants Produced by *HalobacillusDabanensis*and *PontibacillusChungwhensi*Isolated from Oil_Contaminated Mangrove Ecosystem in Egypt. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(3): 263–269.
- ✚ MNIF S., CHAMKHA M., LABAT M et SAYADI S., 2011 – Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 525–536.
- ✚ MORIKAWA M., DAIDO H., TAKAO T., MURATA S., SHIMONISHI Y et IMANAKA T., 1993 – A New LipopeptideBiosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 175 (20): 6459-6466.
- ✚ SOMAYEH V., ABBAS A.S et NOUHI A.S., 2008 – Study the role of isolated bacteria from oil contaminated soil in bioremediation. *J Bacteriol*, 1365 : 678-707.

Références bibliographiques

Les sites web

1/https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+%C3%A0+Formentera+en+Espagne&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiY0Ze97vvdAhUDXRoKHY1DDO0Q_AUIDigB&biw=1708&bih=921

2/https://www.google.dz/search?q=Marais+salants+de+1%E2%80%99ile+de+R%C3%A9+en+France&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj4ysbt7_vdAhUIxoUKHXepCnkQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921

3/https://www.google.dz/search?q=la+Mer+Morte&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj5JaL8PvdAhVJQBoKHauwBtEQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921

4/https://www.google.dz/search?q=Lac+Rose+Sal%C3%A9&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiI5cuw8PvdAhVNyxokHWNEAEUQ_AUIDigB&biw=1708&bih=921

5/https://www.ccme.ca/files/Resources/fr_contam_sites/fr_phc/phc_standard_1.0_f.pdf



Annexes

Annexes

ANNEXE 1

Tableau 01 : Liste des appareils

Nom	Modèle	Marque	Utilisation
Agitateur-plaque chauffante	MRHei-Tec	HEIDOLPH	Mélange
Autoclave ou Etuve ou fourne pasteur	WON-50	WISD	Stérilisation
Bain marie	SW2W	JULABO	Chauffage
Balance analytique	SBA33	SCALTEC	Pesée
Balance de paillasse	/	DENVER INSTRUMENT	Pesée
Bec bunsen	/	/	Stérilisation
Centrifugeuse	SURVALL RC6+	Thermo SCIENTIFIC	Séparation solide-liquide
Chauffe ballon	KM-M1000ml	LABHEAT	Chauffage
Évaporateur rotatif	BUCHI	HEATING BATH B-491	Evaporation
Hotte chimique	Erlab	CAPTAIR	Protection
Hotte microbiologie	MSC9	JOUAN	Stérilisation
Incubateur	410/XAL	LMS	
Incubateur orbital	S1500	STUART	Agitation
Spectrophotomètre UV-Visible.	Ultrospec1000	PHARMACIA BIOTECH	Mesure de l'absorbance
Spectrophotomètre UV-Visible.	DU520	BECKMAN	Mesure de l'absorbance
pH mètre	HI9321	HANNA	pH
Réfrigérateur	/	/	Conservation
Vortex	SAB	STUART	Agitation

ANNEXE 2

Tableau 02:Liste des réactifs et produits.

Nom	Formule	%	Source
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	98	Sigma Aldrich
Agar			Biochem Chemopharma
Benzène		99.9	VWR (PROLAB)
Bicarbonate de sodium	Na HCO ₃	≥ 99.0	Fluka
Bromure de sodium	NaBr	99.5	Biochem Chemopharma
Chloroforme	CHCl ₃	99.0- 99.4	Sigma Aldrich
Chlorure de calcium	CaCl ₂	95.0	Biochem Chemopharma
Chlorure de magnésium	MgCl ₂	98.0	Biochem Chemopharma
Chlorure de potassium	KCl	≥ 99.0	Sigma Aldrich
Chlorure de sodium	NaCl	99.5	Biochem Chemopharma
Eau distillée	H ₂ O	/	/
Extrait de levure			Biochem Chemopharma
Hydrocarbure (pétrole brut, gasoil)	/	/	/
Méthanol	CH ₄ O	≥ 99.7	Sigma Aldrich
Sulfate de magnésium	Mg SO ₄	/	Biochem Chemopharma

ANNEXE 3

Tableau 03: Liste des petits matériels et verrerie.

Petits matériels et verrerie
Ampoule à décanter
Anse de platine
Ballon
Béchers
Boîtes de pétri
Burette graduée
Cuvette
Eprouvettes de 50ml, 500ml, 1000ml
Erlenmeyers de 500ml, 1000ml
Fiole de 10 ml, 100 ml
Flacons de 100ml, 200ml, 250ml
Micropipettes de 20μl, 200μl, 1ml
Papier absorbant
Papier aluminium
Parafilm M
Pipette pasteur
Sac en plastique
Support cornue
Tube conique.
Tubes à vice

ملخص:

الهدف من عملنا هو دراسة إنتاج وخصائص جزيئات السطح الحيوي من طرف البكتيريا المحبة للملوحة (N20C2, 1/3C3, 2/9C3, N15, N7, N3, Sb41, Sb20) هيدروكربونات مختلفة (زيت الغاز 0.2 %، النفط الخام 0.2 %، البنزين 0.08 %) كمصادر للكربون. ومنشطات السطح الحيوي هي مركبات محبة للجهتين التي تنتجها البكتيريا والخمائر والفطريات، التي تمنح القدرة على تجميع بين المرحتين السوائل الغير الممتزجة، كما أن لديهم خاصية مميزة للحد من التوتر السطحي وبين السطوح باستخدام نفس آليات باسم السطحية الكيميائية؛ ولكن أقل سمية وأكثر وظيفية.

تم اختيار سلالتين بكتيريتين N15 و N3 كأفضل سلالات منتجة لجزيئات السطح الحيوي، مع انخفاض في التوتر السطحي من 72 إلى 59.89 mN/m و 68.41 mN/m على التوالي للسلالات N15 و N3 بينما مؤشر الإستحلاب يساوي 20.03 للسلالة N3 و 14.83 للسلالة N15

الكميات المتحصل عليها بعد الاستخراج والتوتر على السلالة N15: 41mg و N3: 390mg

الكلمات المفتاحية: البكتيريا المحبة للملوحة ، الهيدروكربونات ، منشطات السطح الحيوي.

Résumé :

L'objectif de ce présent travail est l'étude de la production des biosurfactants et leur caractérisation préliminaire à partir de cultures libres de bactéries halophiles en batch (Sb20, Sb41, N3, N7 ; N15, 2/9C3, 1/13C3, N20C2) isolés au niveau des sites de Zahres el Gharbi et Rocher de sel de Djelfa ; par l'utilisation des différents substrats d'hydrocarbures (gasoil 0.2%, pétrole brut 0.2%, benzène 0.08%) comme sources de carbone.

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits par les bactéries, levures, et champignons, qui leurs confèrent la capacité de s'accumuler entre les phases fluides immiscibles, Ils possèdent la propriété caractéristique de réduire la tension superficielle et interfaciale en utilisant les mêmes mécanismes que les surfactants chimiques ; mais moins toxiques et plus fonctionnels.

Les deux souches bactériennes N15 et N3 ont été sélectionnées comme meilleurs souches productrices de biosurfactants avec une diminution de la tension superficielle de 72 mN/m à 59.89 mN/m et 68.41 mN/m respectivement pour la souche N15 et N3. L'indice d'émulsification est de 20.03 pour N3 et de 14.83 pour N15. Les quantités obtenues après extraction affichent des valeurs pour la souche N15 est 41mg et 390mg pour la souche N3.

Mots clés : Halophiles, hydrocarbures, biosurfactants.

Abstract:

The objective of this work is the study of the production of biosurfactants and their preliminary characterization from free cultures of halophile bacteria in batch (sb20, sb41, N3, N7, N15, 2/9C3, 1/13C3, N20C2) isolated at the sites of Zahres el Gharbi and Rocher the sel of Djelfa by the use of different hydrocarbon substrates (gas oil 0.2%, crude oil 0.2%, benzene 0.08%) as carbon sources.

The biosurfactants are amphiphilic compounds produced by bacteria, yeasts, and fungi, which give them the ability to accumulate between the immiscible fluid phases. They possess the characteristic property of reducing the surface and interfacial tension using the same mechanisms as the chemical surfactants; but less toxic and more functional. The two bacterial strains N15 and N3 were selected as the best producing strains of biosurfactants with a decrease in surface tension of 72 mN/m at 59.89 mN/m for N15 and 68.41 mN/m for strain N3. The emulsification index is 20.03 for N3 and 14.83 for N15. The quantities obtained after extraction display values of and respectively N15 is 41mg and 390mg for the strain N3.

Key words: Halophiles, hydrocarbons, biosurfactants.