

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche scientifique



جامعة امحمد بوقرة- بومرداس
Université M'HAMED BOUGARA *Boumerdes*
Faculté Des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de magister

Pour l'obtention du titre de Magister en Biologie
Option Biochimie et Microbiologie appliquées

Présenté et soutenu publiquement par : M^{elle} KHEMILI Souad

Le : 26/02/2008

Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites

Devant le jury:

Mr MOHAMDI A.	Maître de conférences (UMBB)	Président
Mme FAZOUANE F.	Maître de conférences (UMBB)	Promotrice
Mme KEBBOUCHE-GANA S.	Chargée de Cours (UMBB)	Co-promotrice
Melle HALOUANE F.	Maître de conférences (UMBB)	Examinatrice
Mme ALLOUANE R.	Maître assistante (UMBB)	Examinatrice
Mr MADANI K.	Maître de conférences (Univ. Béjaia)	Examinateur
Mme REFOUFI A.	Maître de conférences (UMBB)	Examinatrice
Mr GANA M.A.	Chercheur (CRD, Sonatrach)	Invité

Boumerdes 2008

REMERCIEMENTS

*Ce travail de recherche a été réalisé au sein du Laboratoire de Centre de Recherche et de Développement de Sonatrach(CRD). Je tiens à remercier Monsieur **GANNA M.A.**, chercheur au CRD, de m'avoir accueilli et pour l'intérêt qu'il a manifesté envers ce travail.*

*Je remercie Madame **FAZOUANE F.**, Maître de conférence de l'UMBB, de m'avoir fait confiance, et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant de diriger cette étude.*

*Je remercie ma co-promotrice de thèse, Madame **KEBBOUCHE-GANNA S.**, pour tout l'aide et le soutien de tous les instants qu'elle m'a apporté, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi que pour les conseils et astuces qui ont permis de me faciliter le travail. Merci pour votre gentillesse. Merci pour tout.*

*Je remercie l'ensemble du jury, Messieurs **MOHAMEDI A.**, Maître de conférence à l'UMBB, Mademoiselle **HALOUANE F.**, maître de conférence à l'UMBB, madame **REFOUFI A.**, maître de conférence à l'UMBB, madame **ALLOUANE-GOUNINA R.**, maître assistante à l'UMBB et monsieur **MADANI K.**, maître de conférence à l'université de Bejaia, qui ont bien voulu examiner ce travail.*

Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont Contribué à ma formation.

Mes vifs remerciements vont, également, à Mme Mimoune ainsi qu'à toutes les techniciennes du département de biologie sans exception pour leur aide et surtout pour leurs gentillesse.

Enfin, il me 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 mes sincères remerciements.

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu de m'avoir aidé à réaliser cet ouvrage.

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.

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

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

A mes adorables sœurs : Radia et Amina.

A mes chers frères : Mohamed, Hichem et mon beau frère Kamel.

A la mémoire de mes grands parents.

A tata Djawida qui a été toujours comme une grande sœur pour moi sans oublier son mari, leurs petits anges (Ramzi, Kamelia, Melina et Faten) et tata Fifi.

A ma chère tata Fadila qui ne m'a jamais oublié avec ses prières ainsi qu'à toute la famille Talbi.

A Sihem qui était toujours à mes côtés et qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais des simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements ma très chère amie.

A toute ma famille.

A tout mes amis.

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers.

الملخص:

البكتيريا المحبة للملح هي الأكثر انتشارا في مجموعة *Archeae* تعيش في الأوساط ذات التركيز العالي من الملح (أكثر من 1,5 مول / ل من NaCl) حاليا البكتيريا المحبة للملح *Halobactéries* لها أهمية كبيرة بفضل إنتاجها لمواد حيوية مثل biosurfactants. تستعمل في مجالات واسعة لامتيازها بالخاصية الخلطية. في عملنا هذا قمنا بتطبيقات ميكروبيولوجية و فيزيولوجية و بيوكيميائية لنوعين من البكتيريا المحبة للملح (A و D)، إثبات قدرتها على إنتاج المواد ذات الخاصية الخلطية، و كذلك محاولة تحديد طبيعة هذه المواد.

حسب النتائج التي حصلنا عليها، يمكننا القول أن الفصيلة البكتيرية A إلى نوع *Halovivax* و الفصيلة البكتيرية D تنتمي إلى نوع *Haloarcula* من عائلة *Halobacteriaceae*. بالنسبة للمواد المنتجة من طرف هاتين الفصيلتين يمكننا أن نعتبرها من نوع، بروتينات سكرية بالنسبة للفصيلة A و من نوع بروتينات دسمة، سكريات دسمة، أو بروتينات سكرية بالنسبة للفصيلة D.

الكلمات المفتاح: *Archeae*، البكتيريا المحبة للملح، Biosurfactants، الخاصية الخلطية.

Résumé

Les bactéries halophiles extrêmes sont prédominantes dans le domaine des *Archaea*. Elles survivent dans les milieux à très forte concentration en sel ($> 1.5M$ de NaCl).

Actuellement, les Halobactéries présentent un grand intérêt grâce à leurs produits bioactives tel que les biosurfactants. Ces derniers ont des applications importantes grâce à leur propriété émulsifiante et activité tension active.

Dans le présent travail, nous avons effectué des études microbiologiques, physiologiques et biochimiques des deux souches bactériennes halophiles A et D, leur pouvoir à produire des biopolymères à propriété émulsifiante, ainsi que l'essai de la caractérisation de ces biopolymères.

D'après les résultats obtenus, la souche bactérienne A a été rapprochée au genre *Halovivax* et la souche bactérienne D au genre *Haloarcula*, au sein de la famille des *Halobacteriaceae*.

Le biopolymère produit peut être un glycoprotéine pour la souche bactérienne A et d'un lipopeptide, glycolipide et /ou glycoprotéine pour la souche bactérienne D.

Mots clés : *Archeae*, Halobactéries, biosurfactants, propriétés émulsifiantes, tension active.

Abstract

The extreme halophilic bacteria are prevalent in the field of *Archaea*. They survive in the mediums very strong salt concentration ($> \text{NaCl } 1.5\text{M}$).

Currently, Halobactéries are of great interest thanks to their products bioactives such as the biosurfactants. The latter have important applications because of their emulsifying property and active tension activity. In this work, we carried out microbiological, physiological and biochemical studies of the two halophilic bacterial stocks A and D, their capacity to produce biopolymères with emulsifying property, as well as the test of the characterization of these biopolymères.

According to the obtained results, the bacterial strain A was approached to the genera *Halovivax* and the bacterial strain D to the genera *Haloarcula*, within the family of *Halobacteriaceae*.

The biopolymer product can be a glycoprotein for bacterial strain A and of a lipopeptid, glycolipid and /or glycoprotein for the bacterial stock D.

Key words: *Archeae*, Halobacteries, biosurfactants, emulsifying properties, active tension.

Sommaire

	Introduction générale	1
	Chapitre I : Les archaeobactéries	
I. 1	Biodiversité du monde vivant.....	3
I. 2	Diversité des <i>Archaea</i>	4
I. 2. 1	Principaux groupes d' <i>Archaea</i>	6
I. 2. 2. 1	Membranes des archaeobactéries.....	6
I. 2. 2. 2	Parois cellulaires.....	8
I. 2. 2. 3	Sensibilité des <i>Archaea</i> aux antibiotiques	10
I. 2. 2. 4	Réplication et ADN des <i>Archaea</i>	10
I. 3	Microorganismes halophiles.....	11
I. 3. 1	Archaeobactéries halophiles extremes.....	12
I. 3. 2	Classification des archaeobactéries halophiles.....	13
I. 3. 3	Caractéristiques générales des archaeobactéries halophiles extremes..	16
I. 3. 4	Mécanisme d'adaptation dans les milieux sales.....	18
I. 4	Exploitation des archaeobactéries halophiles extremes.....	18
I. 4. 1	Production d'enzymes.....	19
I. 4. 2	Production de substances antibactériennes.....	19
I. 4. 3	Production de la bactériorhodopsine.....	19
I. 4. 4	Domaine de la recherche en biotechnologie.....	20
I. 4. 5	Traitement des eaux salées.....	20
I. 4. 6	Production de polymers.....	20
	Chapitre II : Les biosurfactants	
II. 1	Définition des biosurfactants.....	21
II. 2	Production des surfactants biologiques.....	23
II. 2. 1	Microorganismes producteurs.....	23
II. 3	Principales classes des biosurfactants	25
II. 3. 1	Les glycolipides	25
II. 3. 2	Les lipopeptides	30
II. 3. 3	Les phospholipides	32
II. 3. 4	Les polymères (lipopolysaccharides).....	34
II. 3. 5	Les acides gras et les lipides neutres (mono et diglycérides).....	34
II. 4	Paramètres influençant la production des biosurfactants	36
II. 4. 1	Influence de la source de carbone.....	36
II. 4. 2	Influence de l'azote.....	37
II. 4. 3	Influence du pH.....	37

II. 4. 4	Influence de l'âge de la culture.....	38
II. 4. 5	Influence des sels minéraux.....	38
II. 4. 6	Influence de l'agitation	38
II. 5	Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	38
II. 6	Identification des biosurfactants.....	39
II. 7	Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs.....	39
II. 7. 1	Abaissement de la tension superficielle.....	39
II. 7. 2	Abaissement de la tension interfaciale.....	39
II. 7. 3	Concentration Micellaire Critique (CMC).....	40
II. 7. 4	Solubilisation des biosurfactants dans l'eau	41
II. 6. 4. 1	La balance lipophile-hydrophile ou HLB.....	41
II. 7. 5	Toxicité et biodégradabilité.....	42
II. 8	Utilisation des biosurfactants	43
	Chapitre III: Matériel et méthodes	
III. 1	Matériel.....	46
III. 1. 1	Matériel et équipements	46
III. 1. 2	Matériel biologique	46
III. 2	Méthodes	47
III. 2. 1	Etude microbiologique	47
III. 2. 1. 1	Revivification des souches bactérienne A et D	47
III. 2. 1. 2	Conservation des souches bactériennes A et D	47
III. 2. 1. 3	Identification des souches bactériennes étudiées	47
III. 2. 1. 3. 1	Etude des caractères cultureux	47
III. 2. 1. 3. 2	Etude microscopique	48
III. 2. 1. 3. 3	Etude biochimique et physiologique.....	48
III. 2. 2	Caractérisation des propriétés physico-chimiques des biomolécules produites.....	61
III. 2. 2. 1	Cultures.....	61
III. 2. 2. 2	Culture en présence de gasoil	61
III. 2. 2. 3	Test d'index d'émulsion E ₂₄	61
III. 2. 2. 4	Localisation des biosurfactants	62
III. 2. 2. 5	Etude de la tension superficielle	62
III. 2. 2. 6	Etude de la relation entre la variation de la densité optique, l'index d'émulsification et la tension superficielle.....	62
III. 2. 2. 7	Détermination de la stabilité de l'émulsion	63
III. 2. 2. 8	Extraction du biosurfactant.....	64

	Chapitre IV : Résultats et Discussions	
IV. 1	Résultats de l'étude microbiologique	66
IV. 1. 1	Revivification des souches bactériennes halophiles A et D.....	66
IV. 1. 2	Identification des souches bactériennes A et D	66
IV. 1. 2. 1	Etude des caractères culturaux	66
IV. 1. 2. 2	Etude biochimique et physiologique	70
IV. 1. 2. 3	Caractéristiques et identification des souches bactériennes A et D...	95
IV. 2	Production des biosurfactants.....	97
IV. 2. 1	Caractérisation des biosurfactants produits	97
IV. 2. 2	Index d'émulsification (E_{24})	99
IV. 2. 3	Localisation des biosurfactants	99
IV. 2. 3	Abaissement de la tension superficielle	99
IV. 2. 4	Etude de la relation entre la variation de la cinétique de croissance, l'évolution de l'index d'émulsification, le pH et l'abaissement de la tension superficielle.....	99
IV. 2. 5	Détermination de la stabilité d'émulsion produite.....	101
IV. 2. 5. 1	Effet de l'eau distillée	101
IV. 2. 5. 2	Effet du pH	101
IV. 2. 5. 3	Effet de l'éthanol	102
IV. 2. 5. 4	Effet de la température.....	103
IV. 2. 6	Extraction du biosurfactants.....	104
	Conclusion	107
	Bibliographie	109
	Annexes	125

Liste des figures

Figure n°01:	Structures secondaires de la molécule d'ARN 16S de la petite sous unité ribosomique de la bactérie <i>Escherichia coli</i> (Perry et al., 2004).....	3
Figure n°02:	Arbres phylogénétiques des êtres vivants (<i>Woese, 1994</i>).....	4
Figure n°03:	Principaux groupes d' <i>Archaea</i> (Perry et al., 2004).....	6
Figure n°04:	Schémas représentatifs d'un lipide archaebactérien et d'un lipide eubactérien (Rachel, 1991).....	7
Figure n°05:	Structures de la membrane cellulaire d'une archaebactérie (Ross et al., 1981 ; Perry et al., 2004).....	7
Figure n°06 :	Structures de la pseudomuréine chez les <i>Archaea</i> (Perry et al., 2004).....	9
Figure n°07 :	Quelques habitats des microorganismes halophiles extrêmes (Basso et al., 2005).....	12
Figure n°08:	Modifications de la voie d'Entner-Doudoroff chez les <i>Archaea</i> (Perry et al., 2004).....	17
Figure n°09 :	Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces (Larpent, 1995).....	22
Figure n°10:	Les structures des cinq types majeurs de diglycosyl diglycérides isolés chez les bactéries Gram-positif (Zajic et Mahomedy, 1984).....	26
Figure n°11:	Structures des rhamnolipides R1, R2 R3, R4, RA et RB produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Lang et Wullbrandt, 1999).....	27
Figure n°12:	Structure de glucose-lipide synthétisé par <i>Serratia rubideae</i> (Wagner et Lang, 1996).....	28
Figure n°13:	Structure des tréhaloses-lipides produits par <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215 et <i>Arthrobacter sp.</i> EK 1 (a) et par <i>R. erythropolis</i> SD -74 (b) (Wagner et Lang, 1996).....	28
Figure n°14:	Structure de sophorolipide produit par <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 (Wagner et Lang, 1996).....	29
Figure n°15:	Structure de mannosyl erythritol lipide produit par <i>Candida antarctica</i> T-34 (Wagner et Lang, 1996).....	30
Figure n°16:	Structures majoritaires des acides gras: Saturée, β -hydroxylée, iso, anteiso et cyclopropane (Zajic et Mahomedy, 1984).....	34
Figure n°17:	Représentations schématiques d'une micelle de surfactant (Pore, 1992).....	40
Figure n°18:	Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel.....	45
Figure n°19:	Réaction d'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et Bourdn, 1982).....	51
Figure n°20:	Protocole d'extraction des lipides membranaires (Kharoub et al., 2006).....	60
Figure n°21:	Test d'émulsification.....	61
Figure n°22:	Un anticlinal renfermant du gaz, du pétrole et de l'eau (Khemili, 2005).....	65
Figure n°23:	Aspect macroscopique des souches bactériennes A et D sur milieu SH solide	67

	après 14 jours d'incubation à 40°C.....	
Figure n°24:	Aspect microscopique des bactéries A et D observées à l'immersion après coloration de Gram modifiée.....	68
Figure n°25:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur différents sucres, sur milieu SH modifié liquide incubées à 40°C pendant 15 jours.....	72
Figure n°26:	Variation de pH sur milieu SH modifié liquide additionné de différents sucres inoculé par les souches bactériennes A et D à 40°C pendant 15 jours d'incubation.....	74
Figure n°27:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH modifié liquide additionné de différents alcools à 40°C pendant 15 jours d'incubation.....	75
Figure n°28:	Variation de pH sur milieu SH modifié liquide additionné de différents alcools inoculé par les souches bactériennes A et D à 40°C pendant 15 jours d'incubation.....	76
Figure n°29:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH modifié additionné de différents acides organiques à 40°C pendant 15 jours d'incubation.....	77
Figure n°30:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH standard à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.....	78
Figure n°31:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH standard à différentes valeurs de pH pendant 16 jours d'incubation.....	79
Figure n°32:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A sur milieu SH standard additionné de différentes concentrations de NaCl à 40° C pendant 17 jours d'incubation.....	81
Figure n°33:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH standard additionné de différentes concentrations du Mg ⁺⁺ à 40°C pendant 17 jours d'incubation.....	82
Figure n°34:	Résultats de révélation de l'amylase pour les souches bactériennes A et D cultivé à 40°C pendant 15 jours.....	83
Figure n°35:	Résultats d'antibiogramme des souches bactériennes A et D.....	84
Figure n°36:	Résultats de l'analyse quantitative de la lyse cellulaire des deux souches halophiles A et D.....	87
Figure n°37:	Représantion tridimensionnelle de la Lactate déshydrogénase de lactobacille et de la Malate déshydrogénase de <i>Haloarcula marismortui</i> (Panagiotis et <i>al.</i> , 2007).....	88
Figure n°38:	Profil chromatographique sur couche mince obtenue après migration et révélation des spots des souches bactériennes A et D.....	90
Figure n°39:	Chromatographie sur couche mince des lipides polaires d' <i>Haloferax mediterrani</i> DSM 141 ^T , <i>Haloarcula vallismortis</i> DSM 3756 ^T , <i>Halogeometricum borinquense</i> DSM 11551 ^T , <i>Halobiforma haloterrestis</i> 135T,	

	<i>Natrinema pellirubrum</i> NCIMB 786 ^T et <i>Halobacterium salinarum</i> NRC 34001 ^T	91
Figure n°40:	Chromatographie sur couche mince des lipides polaires extraits à partir d' <i>Haloarcula marismortui</i> ATCC43049 ^T , <i>Halobacterium saccharovorum</i> ATCC29259 ^T , <i>Halobacterium sodomense</i> ATCC33755 ^T , <i>Halobaculum gomorense</i> DS2807 ^T , <i>Haloferax volcanii</i> ATCC29605 ^T et <i>Haloferax denitrificans</i> ATCC35960 ^T traité par le système de solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (85 :22,5 :10 :4 v/v).....	91
Figure n°41:	Cinétique de croissance des souches bactériennes A(a) et D(b) sur milieu SH modifié additionné de différentes concentrations de gazoil à 40°C pendant 13 jours.....	95
Figure n°42:	Résultats d'index d'émulsification pour les deux souches bactériennes halophiles A et D.....	97
Figure n°43:	Variation de la tension superficielle en fonction de temps(croissance sur milieu SH standard liquide à 40°C pendant 11 jours de deux souches bactériennes halophiles A et D).....	98
Figure n°44:	Variation de la cinétique de la croissance, indexe d'émulsification, le pH et la tension superficielle en fonction de temps pour les souches A et D.....	99
Figure n°45:	a) Aspect de l'émulsion après variation du pH pour la souche bactérienne A.....	100
	b) Variation d'index d'émulsification (E ₂₄) en fonction du pH et au cours de 24h pour la souche bactérienne A.....	101
Figure n°46:	a) Aspect de l'émulsion après l'ajout de différentes concentrations de l'éthanol pour la souche bactérienne halophile A.....	102
	b) Variation de l'index d'émulsification (E ₂₄) en fonction de la concentration d'éthanol pour la souche bactérienne halophile A.....	102
Figure n°47:	Profil chromatographique obtenue après migration et révélation des spots des souches bactériennes A et D.....	104

Liste des tableaux

Tableau I:	Comparaison entre <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i> et <i>Eucarya</i> (Perry et al., 2004).....	5
Tableau II:	Les 28 genres de la famille des Halobacteriaceae.....	126
Tableau III:	Caractères distinctifs entre 14 genres de la famille des Halobacteriaceae (Berger's Manual, 1989).....	127
Tableau IV:	Classification des <i>Halobacteriaceae</i> selon leur composition en lipides polaires.....	15
Tableau V:	Les antibiotiques possédants des activités de surface (Zajic et Mohamedy, 1984).....	32
Tableau VI:	La distribution structurale des phospholipides majeurs (Zajic et Mohamedy, 1984).....	33
Tableau VII:	Principaux types de surfactants biologiques	35
Tableau VIII:	Composition chimique des exopolysaccharides produits par <i>Halomonas eurihalina</i> dans des milieux de cultures contenant plusieurs types d'hydrocarbures (Calvo et al., 2002).....	37
Tableau IX:	Relation entre les propriétés des agents tensio-actifs et leur balance lipophile-hydrophile (HLB) (Marcou, 1992).....	42
Tableau X :	Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (Christofi et Ivshina, 2002).....	43
Tableau XI:	Composition chimique des milieux de culture utilisés.....	129
Tableau XII :	Liste des sucres, alcools, acides organiques et hydrocarbures utilisés.....	55
Tableau XIII :	Résultats de l'analyse physico-chimique des deux eaux de gisement P1 et P2.....	66
Tableau XIV :	Résultats des caractères macroscopiques et microscopique des souches bactériennes A et D.....	67
Tableau XV:	Résultats des caractères biochimiques des souches bactériennes halophiles A et D.....	70
Tableau XVI :	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents sucres.....	135
Tableau XVII:	Les valeurs du pH des cultures des souches bactériennes A et D cultivées sur différents sucres	135
Tableau XVIII:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents alcools.....	136
Tableau XIX:	Les valeurs du pH des cultures des souches bactériennes A et D cultivées sur différents alcools	136
Tableau XX:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents acides organiques.....	136
Tableau XXI:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes températures.....	136
Tableau XXII:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents pH.....	137
Tableau XXIII:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentrations de NaCl.....	137
Tableau XXIV:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentration	

	de Mg ⁺⁺	138
Tableau XXV:	Résultats des antibiotiques des souches bactériennes A et D.....	85
Tableau XXVI:	Résultats de la lyse quantitative (souches A et D).....	138
Tableau XXVII	Spectre d'absorbance des pigments des souches bactériennes A et D dans l'Untraviolet et le Visible.....	89
Tableau XXVIII :	Caractéristiques des genres <i>Halovivax</i> (Castillo et <i>al.</i> , 2006) et <i>Haloarcula</i> (Oren et <i>al.</i> , 1999) et des souches bactériennes étudiées A et D	94
Tableau XXIX:	DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentration de gasoil.....	139
Tableau XXX :	Résultats de mesure de la tension superficielle au cours de temps des deux souches bactériennes A et D.....	140
Tableau XXXI :	Valeurs des résultats de la variation de la densité optique, l'index démulsiification, le pH et la tension superficielle au cours de temps (souches bactériennes A et D).....	140
Tableau XXXII :	Valeurs de test E24 en fonction de la variation du pH.....	141
Tableau XXXIII:	Valeurs de test E24 en fonction des concentrations d'éthanol.....	141
Tableau XXXIV :	Valeurs des Rf obtenues après révélation des plaques de CCM.....	104

Liste des abréviations

ADH: Arginine dihydrolase
ATP: Adenosine tri-phosphate
CCM: Chromatographie sur couche mince
CMC: Concentration micellaire critique
DO: Densité optique
CL: Cellobioses-lipides
DGD: Diglycosyldiether
EPS: Exopolysaccharides
E24: Index d'émulsification
HAP: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
LDC: Lysine décarboxylase
LPS: Lipopolysaccharides
MEL: Manosylerythritol-lipides
ODC: Ornithine décarboxylase
PG: Phosphatidylglycérol
PGP-Me: Phosphate-méthyl ester
RMN: Résonance magnétique et nucléaire
S-DGD: Diglycosyl-diether sulfate
SM: Spectrométries de masse
TGD: Triglycosyl-glycérodiether
TGD: Phospho-triglycosyl-glycérodiether
UV: Lumière ultra-violette
Vis: Lumière visible
VP: Réaction Voges Proskaur

Introduction

Introduction générale

L'étude de la biodiversité microbienne des écosystèmes algériens comme les chotts hypersalés (Sebkhas), les sources hyperthermales, les eaux de gisement de pétrole et les eaux prélevées au niveau des zones arides et semi-arides a révélé la présence de nouveaux groupes microbiens très particuliers (Tortora *et al.*, 2003).

Souvent, cette microflore fait partie du domaine des archaebactéries, l'un des trois règnes du monde vivant avec les Eucaryotes et les Eubactéries. La découverte des archaebactéries est assez récente car il a été difficile d'imaginer l'existence d'organismes vivants dans les conditions très hostiles (température, salinité et pression extrêmes) (Perry *et al.*, 2004).

Les halophiles extrêmes forment le troisième grand groupe des archaebactéries après les méthanogènes et les thermophiles. Ces microorganismes constituent un outil performant pour les sciences fondamentales du fait qu'ils représentent le modèle unique de la stabilité des biomolécules aux conditions extrêmes de l'environnement (Campbell et Reece, 2004).

Le développement des techniques de la biologie moléculaire et l'utilisation de la molécule d'ARN ribosomique comme marqueur évolutif a permis de s'affranchir des étapes de culture et a permis d'asseoir sur des bases phylogénétiques les relations taxonomiques s'établissant entre les différents organismes vivants (Corre, 2000).

Récemment, et grâce à l'étude de l'ARNr 16S, l'hybridation ADN/ADN, l'analyse des lipides membranaires et autres études, on a pu déterminer 28 genres au sein de la famille des *Halobacteriaceae* (Torreblanca *et al.*, 1986 ; Grant et Larsen, 1990 ; Tindall, 1992 ; McGenity et Grant, 1995 ; Oren *et al.*, 1995 ; Kamekura *et al.*, 1997 ; Montalvo-Rodriguez *et al.*, 1998 ; McGenity *et al.*, 1998 ; Ventosa *et al.*, 1999 ; Xu *et al.*, 1999 ; Waino *et al.*, 2000 ; Grant *et al.*, 2001 ; Hezayen *et al.*, 2002 ; Burns *et al.*, 2007 ; Elvi-Bar *et al.*, 2006 ; Castello *et al.*, 2007).

Les archaebactéries halophiles strictes occupent les milieux hypersalés. Ces bactéries sont faciles à repérer par leur couleur qui tourne au pourpre. Elles représentent un potentiel de biosynthèse intéressant de substances bioactives comme les biosurfactants. La propriété majeure de ces derniers est le pouvoir de modification des caractéristiques des interfaces des systèmes polyphasiques dans lesquels ils sont introduits, en réduisant les tensions superficielles et interfaciales.

Grâce à leur performance, les biosurfactants ont donné lieu à de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole afin d'extraire le pétrole adsorbé sur la roche du réservoir. Dans le domaine de la protection de l'environnement et la

bioremédiation, les biosurfactants (les rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures. En agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans les formulations d'herbicides et des pesticides. D'autres part, les biosurfactants de structure glycolipides peuvent avoir des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Banat, 2000).

Le sujet développé dans le cadre de ce travail concerne la caractérisation et l'identification des souches halophiles strictes, isolées à partir des eaux de gisement de champ pétrolier du sud algérien (Ghoubali et Kaci-Chaouch, 2004), et cela par l'étude des caractères microscopiques, macroscopiques, biochimiques et physiologiques, ainsi que de leur aptitude à produire des biopolymères à activité émulsifiantes (biosurfactants), évaluée par le test d'émulsification E₂₄, et essai de caractérisation de ces biosurfactants, et leur extraction par chromatographie sur couche mince.

Dans le premier et le deuxième chapitre on trouvera la synthèse bibliographique sur les archaebactéries halophiles strictes et sur les biosurfactants. Le troisième chapitre est consacré pour la partie matériel et méthodes, suivi dans le quatrième chapitre des résultats et discussion. A la fin, on trouvera une conclusion, liste des références bibliographiques et les annexes.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les archaeobactéries

I. 1 Biodiversité du monde vivant

En comparant les séquences de nucléotides de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) (figure 01) de différents types de cellules, on constate qu'il existe trois groupes distincts de cellules : les Eucaryotes, les Bactéries et les Archaeobactéries (Woese, 1994).

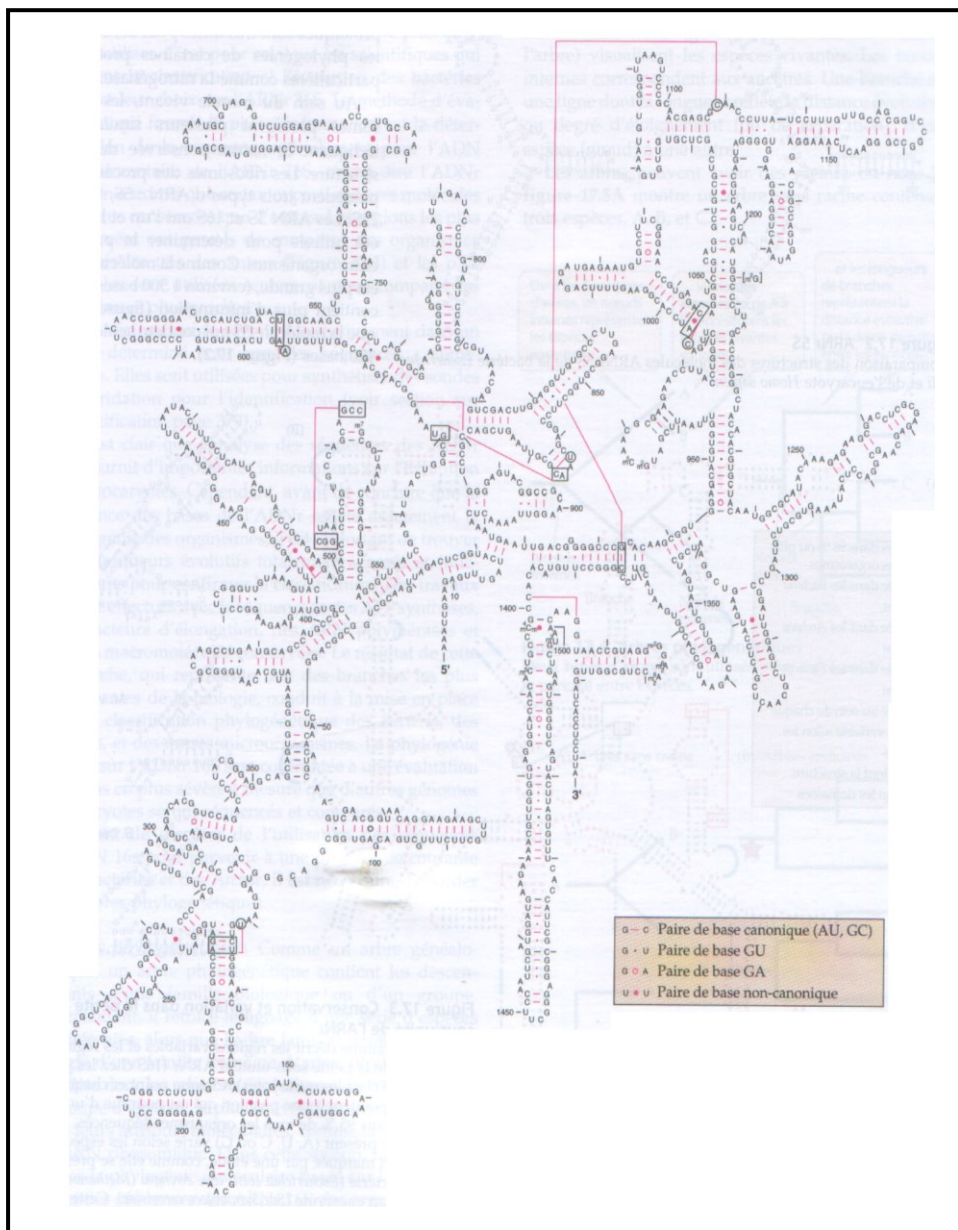


Figure n°01: Structures secondaires de la molécule d'ARN 16S de la petite sous-unité ribosomique de la bactérie *Escherichia coli* (Perry et al., 2004).

En 1978, Carl Woese suggère de faire des trois types de cellules des divisions taxonomiques supérieures aux règnes : les **domaines**. Il pense que les archaeobactéries

(*Archaea*) et les bactéries (*Bacteria*), bien qu'apparemment semblables, devraient former deux domaines séparés dans l'arbre phylogénétique (figure n°02). Dans ce modèle largement accepté, le troisième domaine, celui des eucaryotes (*Eucarya*), est constitué par le règne des animaux (*Animalia*), le règne des plantes (*Plantae*), le règne des mycètes et le règne des protistes. La taxonomie utilise des outils pour mieux comprendre l'évolution des organismes et les relations qui les unissent. On découvre chaque jour de nouveaux organismes, et les taxonomistes tentent toujours d'élaborer un système naturel de classification qui reflète les relations phylogénétiques (Tortora et al., 2003).

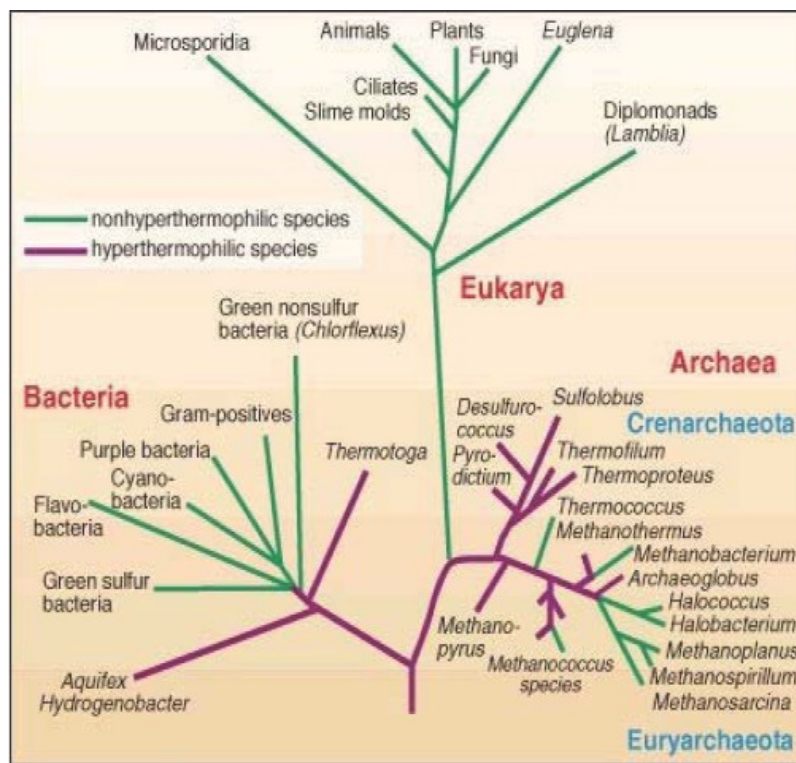


Figure n°02: Arbres phylogénétiques des êtres vivants (Woese, 1994).

I. 2 Diversité des *Archaea*

Non seulement les *Archaea* sont très différentes des autres organismes, mais elles le sont aussi notablement entre elles. La variabilité chez les *Archaea* est probablement du même ordre de grandeur que celle trouvée chez les *Bacteria* bien qu'un plus petit nombre d'*Archaea* ait été identifié (Perry et al., 2004).

Le tableau I représente les caractéristiques générales des organismes appartenant aux trois domaines des êtres vivants:

Tableau I: Comparaison entre *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Perry et al., 2004)

	<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Eucarya</i>
Organismes typiques	<i>Archaea</i> produisant du méthane, halobactéries, thermophiles extrêmes	Entérobactéries, cyanobactéries, <i>Bacillus</i> , etc.	Champignons, plantes, animaux, algues, protistes
Taille typique	1 à 4 µm	1 à 4 µm	Supérieure à 5 µm
Caractéristiques physiologiques	Aérobie et anaérobie	Aérobie et anaérobie	Très largement aérobie
Matériel génétique	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; génome associé avec des faux histones	Petit chromosome circulaire, plasmides et virus ; pas d'histones	Noyau complexe avec plus d'un chromosome linéaire, virus, génome associé avec des histones
Différenciation	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Généralement unicellulaire, différenciation cellulaire rare	Unicellulaire et pluricellulaire, différenciation cellulaire fréquente
Paroi cellulaire	Protéine, glycoprotéine, pseudomuréine, pas de paroi	Muréine et lipopolysaccharide, rarement formée de protéines, formes sans parois rares	Grande variété, absence de peptidoglycane
Membrane cytoplasmique	Ether du glycérol et d'isoprénoïdes	Ester du glycérol et des acides gras	Ester du glycérol et des acides gras, cholestérol fréquent
Synthèse protéique	Ribosome 70S, insensible au chloramphénicol et au cycloheximide	Ribosome 70S, insensible au chloramphénicol et au cycloheximide	Ribosome 80 et 70S, insensible au chloramphénicol, sensible au cycloheximide
ARN polymérase	Complexe	Simple	Complexe

Les ressemblances des *Archaea* avec d'autres organismes sont aussi intéressantes. Par exemple, même si la différence est plus importante entre les ARN 16S archaebactériens et bactériens, les ARN 16S archaebactériens et bactériens sont cependant semblables à 60% de leurs positions. Vraisemblablement, le code génétique est essentiellement le même chez tous les organismes, la plupart des voies de l'anabolisme sont identiques, et beaucoup de coenzymes et de vitamines sont ainsi retrouvés (Perry et al., 2004).

I. 2. 1 Principaux groupes d'Archaea

Les *Archaea* comportent trois groupes phénotypiques principaux : les *Archaea* produisant le méthane ou méthanobactéries, les halophiles extrêmes ou haloarchaeobactéries, et les thermophiles extrêmes. Les relations phylogénétiques entre les *Archaea* ne sont pas simples (figure n°03) (Perry et al., 2004).

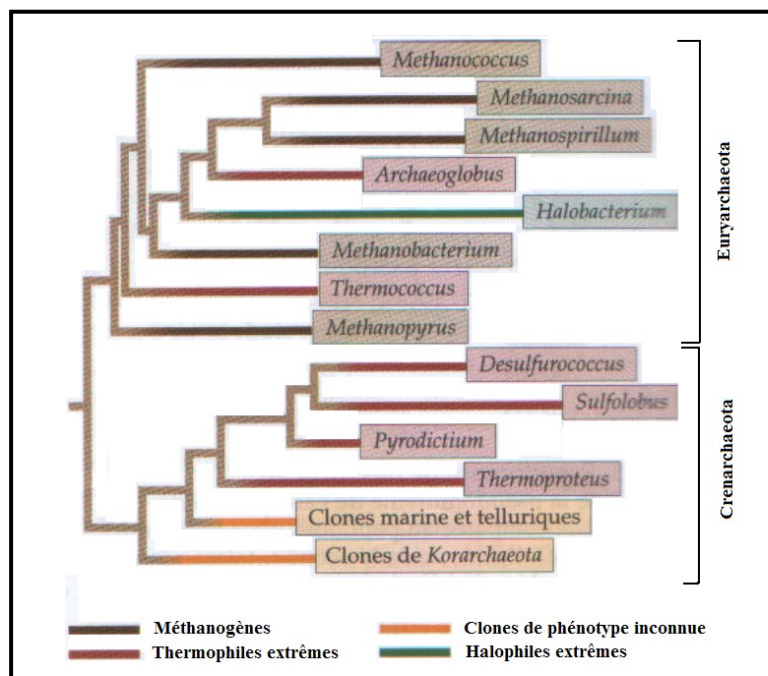


Figure n°03 : Principaux groupes d'Archaea (Perry et al., 2004).

Les *Archaea* cultivables sont divisées en deux phyla sur la base de la structure de leur ARNr. Les membres cultivables d'un phylum, les *Crenarchaeota*, sont exclusivement des thermophiles extrêmes. Le second phylum, les *Euryarchaeota*, contient toutes les méthanobactéries. Les halophiles extrêmes sont très apparentées entre elles et à une branche des méthanogènes au sein de ce groupe. Quelques unes des thermophiles extrêmes appartiennent à des branches très profondes de ce second groupe. Ainsi, les méthanogènes et les halophiles extrêmes sont reliés phylogénétiquement et phénotypiquement. Au contraire, les thermophiles extrêmes ne constituent pas un groupe phylogénétique homogène (Perry et al., 2004 ; Prescott et al., 2003).

I. 2. 2. 1 Membranes des archaeobactéries

L'observation de coupes fines des membranes des archaeobactéries donne une image identique à celles des bactéries alors que leur composition chimique est différente. Une des principales différences concerne le résidu lipidique qui n'est pas un complexe d'esters de glycérol mais d'éthers de glycérol. De plus, les acides gras sont substitués, chez la plupart des archaeobactéries, par des chaînes latérales

d'isoprénoïdes composées d'unités répétées dont le squelette contient 5 atomes de carbone (figures n°04 et 05) (Ross et *al.*, 1981 ; Perry et *al.*, 2004).

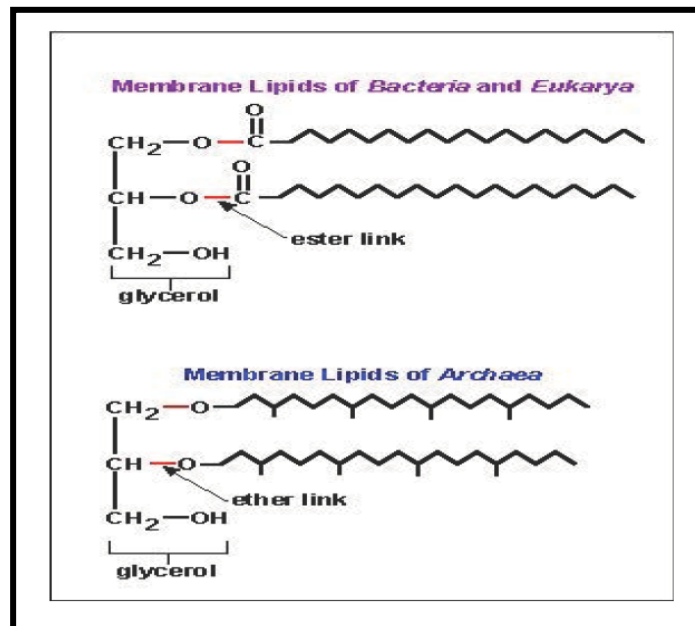


Figure n°04: Schémas représentatifs d'un lipide archaebactérien et d'un lipide eubactérien (Rachel, 1991).

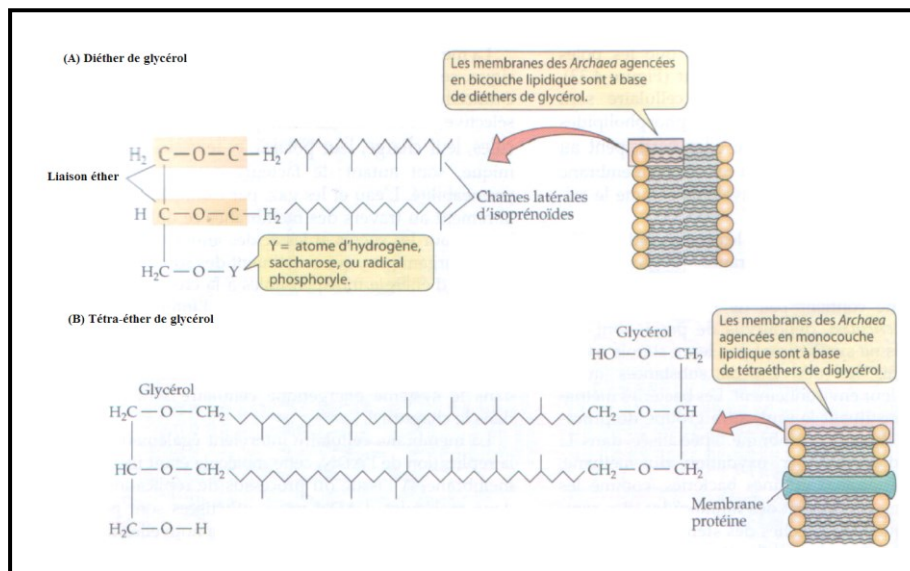


Figure n°05: Structures de la membrane cellulaire d'une archaebactérie (Ross et *al.*, 1981 ; Perry et *al.*, 2004).

Les membranes cellulaires des archaebactéries sont de deux types (figure n°05) (Perry et *al.*, 2004) :

- Une bicouche composée de deux feuillets d'éthers de glycérol greffés par des chaînes d'isoprénoïdes dont le caractère hydrophobe assure le maintien des feuillets (A);
- Une monocouche composée de tétra-éthers de di-glycérol (B).

Les lipides apolaires sont généralement des dérivés du squalène (Prescott, 2003).

I. 2. 2. 2 Parois cellulaires

Bien qu'elles puissent être Gram positives ou Gram négatives, les archaebactéries ont une paroi dont la structure et la chimie diffèrent de celle des eubactéries. La structure de la paroi est très variée : beaucoup d'archaebactéries ont une paroi avec une couche unique épaisse et homogène comme celle des eubactéries Gram positives. Les archaebactéries Gram négatives sont dépourvues de la membrane externe et du peptidoglycane complexe des eubactéries Gram négatives. Elles possèdent généralement à la place, une couche superficielle de sous-unités protéiques ou lipoprotéiques (Prescott et *al.*, 2003).

La chimie des parois archeobactériennes est aussi très différente de celle des eubactéries. Aucune n'a le peptidoglycane caractéristique contenant de l'acide muramique et des acides aminés D. Il n'est donc pas étonnant que toutes les archaebactéries résistent à l'attaque de lysozyme et des antibiotiques à noyau β -lactame comme la pénicilline (Tortora et *al.*, 2003).

- *Paroi à pseudomuréine*

On la rencontre chez les archaebactéries Gram positives tel que *Methanobacterium* et certains autres méthanogènes. La pseudomuréine est un polymère ressemblant au peptidoglycane, mais qui a des acides aminés L dans ses ponts, de l'acide N-acétyltalosaminuronique au lieu d'acide N-acétylmuramique, et des liens glycosidiques β (1-3) à la place des liens glycosidiques β (1-4) (figure n°06) (Prescott et *al.*, 2003 ; Perry et *al.*, 2004).

I. 2. 2. 3. Sensibilité des *Archaea* aux antibiotiques

Comme la biochimie des *Archaea* est très différente de celle des autres êtres vivants (tableau I), on peut s'attendre à ce que la sensibilité aux antibiotiques soit très différente. C'est bien ce qui a été constaté. Ainsi, en raison de l'absence de la muréine chez les *Archaea*, celles-ci ne sont pas sensibles à la plus part des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire. Elles ne sont pas affectées par des concentrations très élevées de pénicilline, de cyclosérine, de vancomycine et de céphalosporine, tous inhibiteurs de la synthèse de la muréine (Perry et *al.*, 2004).

La sélectivité de ces antibiotiques est très utile, en les utilisant comme additifs, pour éviter la croissance de bactéries contaminantes dans la culture *d'Archaea*. De la même façon, l'ARN polymérase ADN dépendante des *Archaea* est insensible à l'inhibition par la rifampicine qui inhibe l'enzyme bactérienne à de très faibles concentrations. La synthèse protéique des *Archaea*, elle non plus, n'est pas affectée par les antibiotiques usuels, chloramphénicol, cycloheximide et streptomycine sauf la néomycine qui est inhibitrice à concentration élevée. La tétracycline est aussi un inhibiteur peu efficace bien qu'elle inhibe la synthèse protéique des *Bacteria* et des eucaryotes. Ces résultats suggèrent que la structure des ribosomes des *Archaea* est très différente de celle des bactéries et des eucaryotes (Tortora et *al.*, 2003 ; Perry et *al.*, 2004).

I. 2. 2. 4 Réplication et ADN des *Archaea*

Les *Archaea* et les autres microorganismes présentent plusieurs caractères communs ; en particulier la direction du flux de l'information génétique (ADN → ARN → Protéines), mais différent dans certains mécanismes. L'ADN des *Archaea* présente approximativement la même taille (2 à 4,106 pb) et la même complexité de séquences que celui des bactéries ; il forme également un chromosome circulaire unique (Brown et Doolittle, 1997). Les eucaryotes ont plusieurs sites de réplication, par contre les bactéries n'ont qu'une seule origine, et vu la grande similitude entre chromosome bactérien et archéen ; certains auteurs suggèrent que ce dernier possède une origine de réplication (Brown et Doolittle, 1997).

L'analyse de génome bactérien, archéen et eucaryote a clairement mis en évidence la similarité des complexes de réplication chez les *Archaea* et les eucaryotes (Macneill, 2001).

Par exemple, la plupart des protéines de réplication de l'ADN archéen connues présentent une homologie significative avec les protéines eucaryotiques correspondantes. En revanche, il y a très peu voire aucune similarité avec les séquences bactériennes (Brown et Doolittle, 1997).

Les ARN de transfert des Eubactéries sont pourvus de thymine (par méthylation de l'uracile). Chez les *Archaea*, l'uracile est modifié pour donner naissance à la pseudo-uridine ou la 1-méthyl pseudo-uridine. Pour cela, la synthèse protéique est initiée par la méthionine plutôt que par la N-formyl méthionine (Prescott et *al.*, 2003).

L'organisation du génome archéen est du même type que celui des bactéries. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans un même mécanisme sont souvent localisés les uns à côté des autres sur le chromosome pour former un opéron. Ils sont alors transcrits en ARN messagers. Au contraire, les gènes eucaryotes sont toujours transcrits isolément et ne sont jamais regroupés en opérons (Bell et *al.*, 2001).

L'ADN archéen présente une grande variation dans le contenu en GC qui se situe entre 20 et 70%, ce qui est un signe de la diversité des *Archaea* (Prescott et *al.*, 2003).

I. 3 Microorganismes halophiles

Les halophiles sont distingués 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, halotolérants et halophiles extrêmes (Kushner, 1978) :

- **Non halophiles** : présentent la plupart des Eubactéries qui ne se développent pas en présence de sel ou, du moins, dès que la concentration atteint 0,2M (1,16%) de sel.
- **Faiblement halophiles** : présentent 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.
- **Halophiles modérés** : ce sont des microorganismes qui se développent dans un milieu contenant entre 3% et 15% de sel (Kushner, 1998). On peut citer comme exemple : *Vibrio costicola*, *Paracoccus*, *Halodenitrificans* et *Pseudomonas*.
- **Halotolérants** : 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*, *Fungi* et *algues*.

- ***Halophiles extrêmes*** : cette nomenclature a été utilisée pour décrire les souches hyper halophiles c'est-à-dire les souches qui exigent pour leur croissance des concentrations entre 2,5 à 5,2 M (14,5-30%) de sel. C'est le cas des archaebactéries halophiles extrême (*Halococcus*, *Halobacterium* ...).

I. 3. 1 Archaeobactéries halophiles extrêmes

Les archaebactéries halophiles extrêmes occupent les écosystèmes à haute salinité, qualifiés d'extrêmes. Ces derniers sont souvent d'intensité lumineuse très forte. Certaines espèces ne font que tolérer la salinité, tandis que d'autres ont besoin, pour croître, d'un environnement dix fois plus salé que l'eau de mer (Noll, 1992).

Ces microorganismes sont rencontrés dans les lacs hyper salés, la mer morte (Jordanie), les marais salants (Espagne) et dans les grands lacs alcalins extrêmement salés tels que Oued Natron en Egypte, le lac Mgadi au Kenya, les étangs de distillation solaire et le « Salt Lake City » aux U.S.A. Ils sont également fréquents au niveau des sols salés des déserts, des régions arides et semi-arides (sebkhas au sud de l'Algérie) et se développent aussi dans les produits alimentaires conservés par salaison tels que la viande et le poisson, ce qui confère aux produits contaminés une forte coloration rouge (Oren et *al.*, 1999 ; Tortora et *al.*, 2003) (figure n°07).

Ces microorganismes peuvent s'étendre d'un site à un autre sur des grains de sel cristallisés sec, par les vents ou par le biais des pattes et des plumes d'oiseaux (Perry et *al.*, 2004).

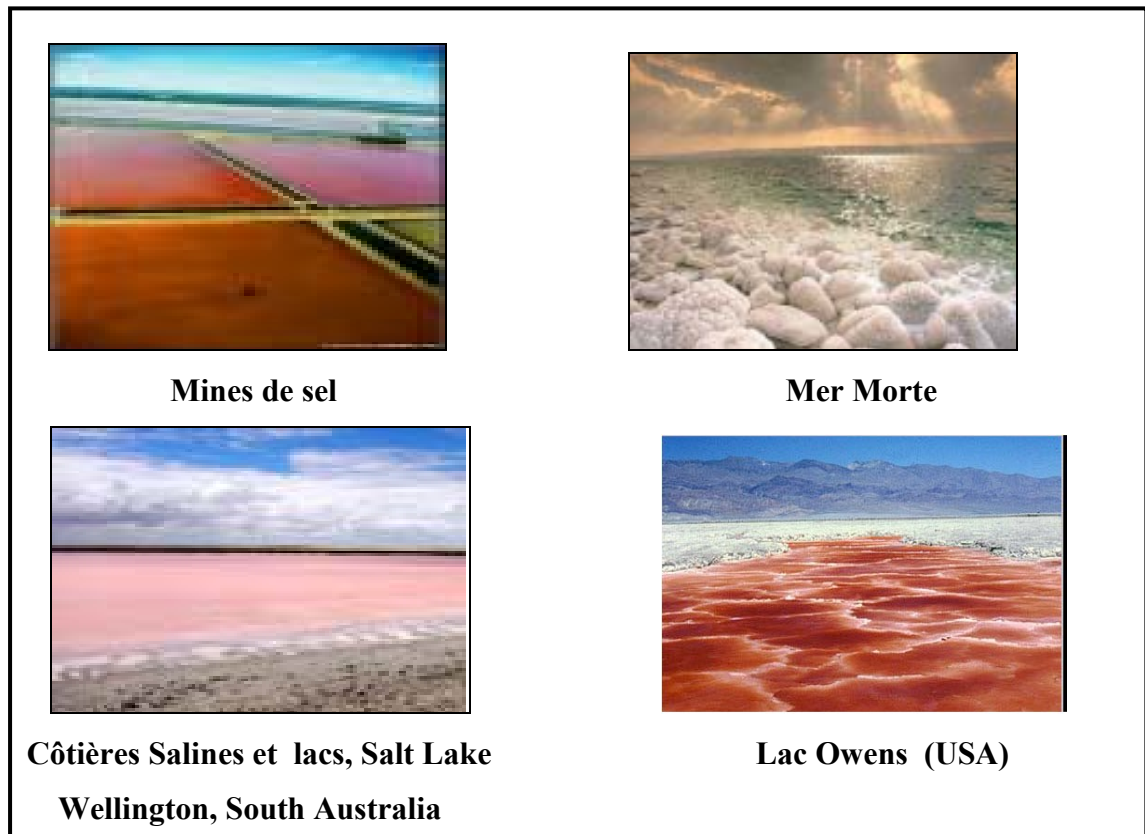


Figure n°07 : Quelques habitats des microorganismes halophiles extrêmes (Basso et al., 2005).

I. 3. 2 Classification des archaebactéries halophiles

La taxonomie des *Archaea* halophiles a été confuse suite à un système de classification non basé sur le séquençage de l'ARNr 16S ; en effet, de nombreuses souches affiliées à l'origine au genre *Halobacterium* ont été déclassées.

La diversité des glycolipides (structure des lipides membranaires) ainsi que les séquences d'ARN 16S représentent les marqueurs de diagnostic taxonomique les plus crédibles chez les *Archaea* halophiles.

Actuellement, plusieurs critères sont utilisés pour définir les *Archaea* halophiles. Celles-ci sont groupées dans un seul ordre *Halobactriales* et une seule famille *Halobacteriaceae*. A ce jour, 28 genres sont validés (Kharoub et al., 2006 ; Castillo et al., 2007) (tableau II et III ; Annexe I).

Les genres et les espèces sont définis selon les critères élaborés par Oren et al. en 1997 qui se résument en :

- La morphologie des colonies et cellules,
- La physiologie cellulaire,
- Les caractères biochimiques,
- La composition en lipides membranaires, protéines cellulaires, la structure de l'enveloppe et acides nucléiques,
- L'hybridation ADN/ADN qui est spécifiée uniquement pour la description de nouvelles espèces.

La diversité structurale des lipides membranaires et notamment des glycolipides chez les *Halobacteriaceae* est confirmée par plusieurs recherches. Ainsi, les lipides polaires sont différents selon le groupe d'halobactéries :

- ✓ Pour les bactéries alcalihalophiles extrêmes : ce sont des dérivés de sn-2-sesterterpanyl-3-phytanyl-glycérol (C20-C20) et sn-2,3-diesterterpanyl glycérol (C20-C25),
- ✓ Pour les espèces neutrophiles des genres halophiles extrêmes, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halobaculum* et *Halorubrum* ; elles contiennent uniquement sn-2,3-diphytanyl glycérol (C20-C20),
- ✓ Pour les espèces des genres *Halococcus*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Haloterrigena* et autres non encore classées ; elles contiennent, à la fois, les deux types de lipides (C20-C20) et (C20-C25). Aucune description des lipides du genre *Halogeometricum* n'a été donnée (Kamekura et Kates, 1999).

En ce qui concerne la composition en phospholipides, tous les genres validés comprennent le phosphatidylglycérol phosphate-méthyl ester (PGP-Me), phosphatidylglycérol (PG) et acide phosphatique (PA), exception faite pour *Haloarcula* et *Halobacterium*, qui contiennent les phosphosulfolipides en plus (Kamekura et Kates, 1999).

Les espèces de *Natronococcus* (*N. occultus*) comprennent PGP-1', 2'-cyclique phosphate (PL2) qui est, à la fois, PG et PGP-Me. Le PGP monoisoprennyl analogue de (C20-C20) et (C20-C25) est détecté chez *Halococcus saccharolyticus* (Kamekura et Kates, 1999).

Autres phospholipides mineurs non identifiés (PL1, PL3, PL4) sont détectés chez *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Halorubrum* et *Natronomonas*. Le PL2, détecté chez un genre haloalcalophile, est assigné au genre *Natrialba* (Kamekura et Kates, 1999).

La structure des glycolipides est très importante au sein de la famille *Halobacteriaceae* car elle permet la distinction entre les genres (Tableau IV).

Tableau IV: Classification des *Halobacteriaceae* selon leur composition en lipides polaires

Genres	Espèces	Lipides polaires	Références
<i>Halobaculum</i>	<i>Halobaculum salinarum</i> <i>Halobaculum gomorense</i>	S-TGD-1, S-TeGD S-DGD-1	Kamekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999
<i>Halorubrum</i>	<i>Halorubrum saccharovororum</i> <i>Halorubrum sodomense</i> <i>Halorubrum lacusprofundi</i> <i>Halorubrum coriense</i> <i>Halorubrum distributum</i> <i>Halorubrum vacuolatum</i> <i>Halorubrum trapanicum</i>	S-DGD-3 S-DGD-3 S-DGD-3 S-DGD-3 S-DGD-3 S-DGD-3 S-DGD-5	Kamekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999 Oren et al., 1997
<i>Haloarcula</i>	<i>Haloarcula vallismortis</i> <i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloarcula hispanica</i> <i>Haloarcula japonica</i> <i>Haloarcula argentiensis</i> <i>Haloarcula mukohatei</i> <i>Haloarcula quadrata</i>	TGD-2, DGD-2 TGD-2, DGD-2 TGD-2, DGD-2 TGD-2, DGD-2 TGD-2, DGD-2 S-TGD-2, DGD-2 TGD-2, DGD-2	Kamekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999 Oren et al., 1997
<i>Natronomonas</i>	<i>Natronomonas pharaoni</i>	Néant	Kamekura et Kates, 1999 Kalmekura et al., 1997
<i>Halococcus</i>	<i>Halococcus morrhuae</i> <i>Halococcus saccharolyticus</i> <i>Halococcus salifodinae</i> <i>Halococcus tibetense</i> <i>Halococcus dombrowskii</i>	S-DGD-1, P-DGD S-DGD-1, P-DGD S-DGD-1, P-DGD S-DGD-1, P-DGD S-DGD-1, P-DGD	Kalmekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999
<i>Natrialba</i>	<i>Natrialba asiatica</i> <i>Natrialba magadii</i>	DGD-4, S ₂ -DGD-1 S ₂ -DGD-1	Kalmekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999
<i>Natronobacterium</i>	<i>Natronobacterium gregoryi</i>	DGD-4	Kamekura et Kates, 1999
<i>Halogeometricum</i>	<i>Halogeometricum Borinquene</i>	Glycolipide non identifié	Kamekura et Kates, 1999
<i>Natronococcus</i>	<i>Natronococcus occultus</i> <i>Natronococcus amylolyticus</i>	Néants Néants	Kamekura et Kates, 1999
<i>Haloferax</i>	<i>Haloferax volcanii</i> <i>Haloferax gibsonienne</i> <i>Haloferax denitrificans</i> <i>Haloferax mediterranei</i>	S-DGD-1 S-DGD-1 S-DGD-1 S-DGD-1	Kamekura, 1998 Kamekura et Kates, 1999 Oren et al., 1997
<i>Natrinema</i>	<i>Natrinema pellirubrum</i> <i>Natrinema pallidum</i> <i>Natrinema versiforme</i>	Glycolipides non identifiés	Kamekura et Kates, 1999 Xin et al., 2000
<i>Haloterrigena</i>	<i>Haloterrigena turkmenica</i> <i>Haloterrigena thermotolerans</i>	S ₂ -DGD-1 S ₂ -DGD-1	Kamekura et Kates, 1999 Montalvo-Rodriguez et al., 1998
<i>Natronorubrum</i>	<i>Natronorubrum bangense</i> <i>Natronorubrum tibetense</i>	Dérivé de phosphatidylglycérol et de phosphatidyl-glycérolphosphate	Xu et al., 1999
<i>Halorhabdus</i>	<i>Halorhabdus utahensis</i>	Phosphatidylglycérol, dérivés méthylés du diphosphatidylglycérol, triglycosyldiéthères et triglycosyldiéthères sulfatés	Waino et al., 2000

DGD : diglycosyldiéter, TGD : triglycosyl-glycéroldiéter, P-TGD : phospho-triglycosyl-glycéroldiéter, S-DGD : diglycosyldiéter sulfate.

I. 3. 3 Caractéristiques générales des archaebactéries halophiles extrêmes

✓ **Caractères cultureux**

- Les colonies qu'elles forment sur milieu solide sont de couleur rouge, rose, rouge mauve et, très rarement, incolores. Cette coloration est due à la présence de la bactériorubrine (pigment caroténoïde qui joue le rôle de protecteur contre les rayons solaires) et de la bactériorhodopsine qui participe à la synthèse d'ATP et au transport actif (Pelmont, 1994).

✓ **Caractères morphologiques**

- Pléomorphisme : les cellules peuvent avoir diverses formes (cocci, bacille, disque, triangle, sphère, etc.) (Prescott et *al.*, 1995),
- Elles sont Gram négatif (Grant, 2001),
- Elles peuvent être immobiles ou mobiles grâce à des flagelles polaires lophotriches (Prescott et *al.*, 1995).

✓ **Caractères physiologiques et biochimiques**

- Aérobie ou anaérobie facultative (Grant, 2001),
- Elles présentent un optimum de température entre 35 et 50°C (Prescott et Harley, 1995),
- Forte exigence en sel : elles nécessitent au minimum 1,5M de NaCl, l'optimum de salinité varie entre 3,5 et 4,5 M, certaines peuvent croître à concentration plus élevée (5,2 M) représentant la saturation,
- L'osmorégulation : est effectuée par accumulation d'une forte concentration de KCl dans les cellules et de NaCl dans le milieu. La dilution de ce dernier entraîne le changement des formes bacilles (*Halobacterium*) en forme sphériques, tandis que les formes cocci (*Halococcus*) grâce à leurs parois épaisses peuvent garder leur morphologie en cocci en présence de faible concentration de NaCl (Grant, 2001). Cette lyse osmotique est d'autant plus marquée que les cultures sont jeunes (Deana et *al.*, 1999),
- Les vésicules à gaz apparaissent comme des inclusions claires à l'intérieure de la cellule et permettent à celles-ci de flotter à des profondeurs favorables (Oren et *al.*, 1997 ; Stuart et *al.*, 2001),
- Les halophiles extrêmes sont résistants à certains antibiotiques tels que la pénicilline, le chloramfinicol... (Montalvo-Rodriguez et *al.*, 1998),
- Le processus de la dénitrification a été trouvé chez les halophiles (Oren et *al.*, 1997).
- Présence d'une catalase et d'une oxydase (Prescott et *al.*, 2003 ; *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, 1989),

- Présence chez tous les isolats, de lipides contenant le diphytanyl C20-C20 ou le phytanyl sesterterpanyl C20-C25 (Kamekura et Kates, 1999 ; Oren et *al.*, 1997).
- Les lipides membranaires : chez les archéobactéries halophiles, le glycérol est lié à un alcool appartenant à la classe des phénols par une liaison éther, ce qui favorise leur résistance aux conditions extrêmes (salinité, température,...) (Van de Vossenberg et *al.*, 1999),
- Chimioorganotrophes : utilisent les acides aminés et les carbohydrates comme source de carbone (Grant et *al.*, 2001),
- L'isolement et la culture des bactéries hyper halophiles exigent l'utilisation des milieux riches en tryptone, peptone de caséine, autolysat de levure,
- Les sucres ne sont pas toujours utilisés comme source de carbones et d'énergie (Tanaka et *al.*, 2000). *Halobacterium* oxyde le glucose par une modification de la voie d'Entner-Doudoroff (figure 08). Dans cette modification, le 2-céto-3-désoxygluconate-6-phosphate est absent. On trouve chez les *Archaea* extrêmement thermophiles une autre modification dans laquelle aucun intermédiaire phosphorillé n'est pas présent (figure n°08). Les hydrates de carbones sont oxydés par la pyruvate-oxdoréductase et le cycle de Krebs. Une chaîne de transporteurs d'électrons très semblable à celles des *Bacteria* oxyde le NADH généré par le cycle de Krebs. En l'absence d'oxygène, *Haloferax denitrificans* est aussi capable de croître par la respiration anaérobie des nitrates. *Halobacterium salinarum* peut fermenter l'arginine en l'absence d'oxygène ou de nitrate (Perry et *al.*, 2004).

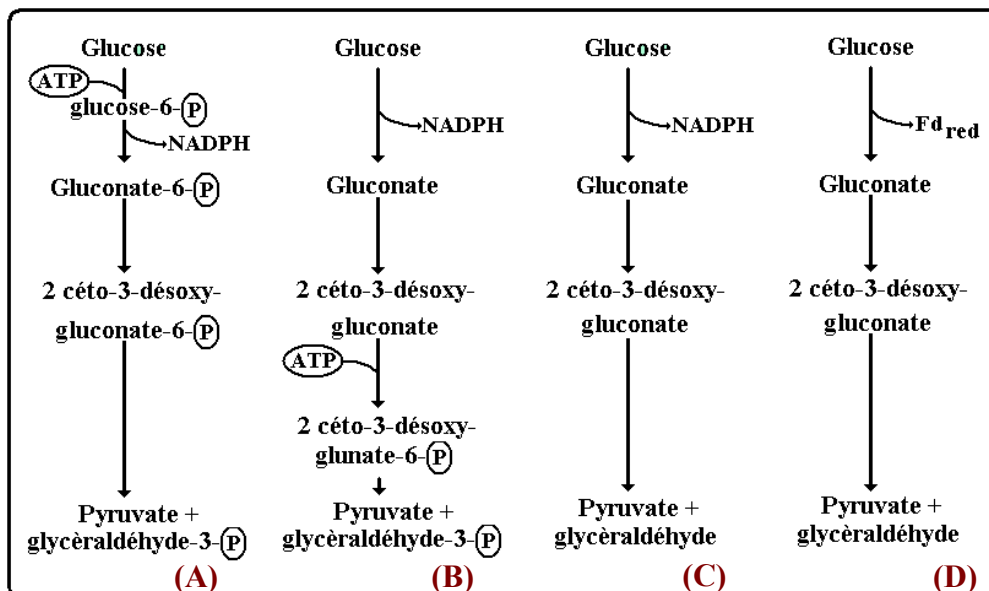


Figure n°08: Modifications de la voie d'Entner-Doudoroff chez les *Archaea*.

Les voies les plus courantes sont décrites : (A) *Pseudomonas* et autres bactéries ; (B) *Halobacterium* et *Clostridium aceticum* ; (C) *Sulfolobus*, une autre *Archaea* hyperthermophile. Fd_{red} est la ferredoxine réduite (Perry et *al.*, 2004).

- Le glycérol est un précurseur classique de la biosynthèse des lipides, il est également bien métabolisé par les hyper halophiles. Le NH_4Cl , à la concentration optimale de 0,2 - 0,5%, entraîne une réduction du temps de latence qui serait en relation avec l'utilisation des acides aminés.
- L'ADN contient de 61 à 71% de GC. Les plasmides sont des composants mineurs représentant 10 à 30% de l'ADN total (Oren et *al.*, 1997).

I. 3. 4 Mécanisme d'adaptation dans les milieux salés

Afin de se développer, les halobactéries requièrent une forte teneur en NaCl dans le milieu, celle-ci peut atteindre une concentration supérieure à 5M (Zaccai et Eisenberg, 1990). Pour survivre à ces conditions extrêmes de salinité, ces microorganismes adoptent deux mécanismes d'osmorégulation :

➤ Mécanisme d'adaptation type KCl ou halobactériel

C'est le principal mécanisme utilisé par les archaebactéries halophiles extrêmes. Dans ce dernier, le KCl intervient en tant qu'agent osmorégulateur : il s'accumule à l'intérieur de la cellule pour empêcher la sortie de l'eau vers le compartiment extracellulaire.

Les sous unités fonctionnelles et structurales des cellules sont adaptées à des hautes concentrations en sels. Les enzymes intracellulaires exigent pour leur fonctionnement des taux élevés en KCl . Les protéines halobactériales sont dénaturées lorsque les teneurs en sel diminuent dans le milieu (Zaccai et Eisenberg, 1990 ; Grant et *al.*, 2001).

➤ Mécanisme d'adaptation type soluté compatible

Le milieu étant fortement salé, les cellules produisent dans le cytosol des métabolites osmorégulateurs qui permettent de maintenir l'équilibre entre le milieu intra et extracellulaire. Parmi ces molécules, on cite : la bétaine, l'éctoïne, la proline, le glutamate, le glycérol... ; Dans ces conditions d'équilibre, l'eau ne passe plus des cellules vers le compartiment extracellulaire et les réactions biochimiques ne sont plus inhibées (Zaccai et Eisenberg, 1990 ; Margesin et Schiner, 2001). Ce type de mécanisme est répandu chez les microorganismes halophiles et halotolérants (Oren, 1999).

I. 4 Exploitation des archaebactéries halophiles extrêmes

Les halophiles extrêmes ont, ces dernières années, attirées l'attention des chercheurs car elles sont une source potentielle de nouvelles molécules actives et stables dans des conditions extrêmes : antibiotiques, bactériocines, enzyme, rhodopsine, osmorégulateurs...etc. (Oren et *al.*, 1997).

I. 4. 1 Production d'enzymes

Des études récentes ont clairement montré que les extrémophiles sont une source nouvelle de catalyseurs intéressants pour l'industrie. Ils constituent une source unique d'enzyme ayant des propriétés intéressantes. En effet, les microorganismes halophiles poussent très bien à de fortes concentrations de sels et à des températures élevées (40 à 50°C) (Kushner, 1998). Ainsi, la majorité de leurs enzymes sont très actives à 50°C ou plus et à des fortes concentrations de NaCl (Eisenberg et Wachtel, 1987), les plus importantes sont ;

- Les lipases : qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides présentant ainsi un intérêt potentiel pour l'industrie des détergents. Boutaiba et *al.* (2006) ont pu mettre en évidence l'activité lipolytique d'une archaebactérie halophile extrême, *Natronococcus sp*, qui hydrolyse l'huile d'olive, ayant un intérêt biotechnologique.
- Les alpha-amylases : qui dégradent l'amidon en glucose, utilisées dans la dégradation des polymères ayant un rôle dans l'industrie des détergents, du papier et alimentaire comme aromatisants (Margesin et Schiner, 2001).
- Les bêta-galactosidases : qui dégradent le lactose, utilisé comme excipient (Bonne et Gastenholz, 1989).
- La série protéase extracellulaire, produite par *Halobacterium halobium*, utilisée comme catalyseur pour générer des peptides à partir des protéines (Margesin et Schinner, 2001).

I. 4. 2 Production de substances antibactériennes

Les halophiles produisent des substances antibactériennes appelées « halocines » qui présentent un large mode d'action (inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, bactériolyse et déstabilisation de la membrane cellulaire) (Oren, 1999).

Par contre, leur spectre d'action est étroit : elles n'agissent que sur les microorganismes phylogénétiquement proches de la souche productrice.

Ces substances ont une large application, notamment dans la conservation des produits alimentaires par salaison (viande, poisson,...) (Oren, 1999).

I. 4. 3 Production de la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine est une protéine ayant une structure similaire à la rhodopsine de la rétine humaine d'où son utilisation dans la fabrication de rétines artificielles et de modulateurs de lumière spatiale (Oren et *al.*, 1997). Cette protéine joue le rôle d'une pompe qui permet la transformation de l'énergie solaire en énergie chimique (ATP). En effet, elle peut être incorporée dans des membranes synthétiques pour la génération de l'électricité à partir de la lumière solaire.

Cette méthode permet de produire de l'électricité à un prix raisonnable avec une technologie peu coûteuse.

I. 4. 4 Domaine de la recherche en biotechnologie

L'utilisation la plus intéressante est le clonage des gènes, codant les solutés osmorégulateurs, afin d'augmenter la tolérance de certaines plantes au sel dans les sols salés (Herbert, 1992).

I. 4. 5 Traitement des eaux salées

Les halobactéries peuvent être des agents dépolluants. En effet, certaines archaebactéries utilisent les hydrocarbures tels que le pétrole comme seule source de carbone. Cette biodégradation n'a aucune conséquence négative sur les écosystèmes salins, contrairement au traitement par des agents chimiques (Margesin et Schinner, 2001).

I. 4. 6 Production de polymères

Les halobactéries produisent des exopolysaccharides (EPS) qui ont d'excellentes propriétés rhéologiques et résistent à des températures, salinités et pH extrêmes. Ces métabolites sont utilisés en tant qu'agents émulsifiants et surfactants et ont une large application dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Herbert, 1992) :

- Production des liposomes, utilisés en médecine et cosmétique pour le transport des métabolites aux sites spécifiques des cellules (Margesin et Schinner, 2001),
- Production de plastiques biodégradables pouvant remplacer le dérivé d'huile thermoplastique, dérivant du pétrole, dans plusieurs domaines (Margesin et Schinner, 2001), par exemple : bêta-hydroxy acide butyrique, produit et accumulé par *Haloferax mediterranei* à partir de n-butyrique, sa récupération est facilitée par la lyse cellulaire causée par de faibles concentrations en sel (Ventosa et Nieto, 1995),
- Les biosurfactants : les microorganismes halophiles et halotolérants produisent les biosurfactants qui peuvent jouer un rôle significatif dans la remédiation accélérée des environnements salins, pollués par le pétrole (Margesin et Schinner, 2001).

Chapitre II : Les biosurfactants

Introduction

Depuis la révolution industrielle, au siècle dernier, l'homme n'a pas cessé de proposer de nouvelles sources d'énergie. La découverte du pétrole a donné un essor considérable à l'industrie. Depuis, les réserves naturelles de pétrole ont été utilisées sans limite et risquent d'être épuisées à court et à moyen terme.

Sachant que ces ressources ne sont pas renouvelables, il est indispensable de songer à une meilleure exploitation des gisements et à une récupération maximale du pétrole, aussi bien des puits que des containers. De là est née la nécessité d'utiliser des substances, « les surfactants chimiques », qui permettent une récupération totale du pétrole.

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 3 millions de tonnes par année (Banat *et al.*, 2000). La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (Para *et al.*, 1989 ; Healy *et al.*, 1996 ; Page *et al.*, 1999; Vipulanandan et Ren, 2000). C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou **biosurfactants**. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et qui sont également efficaces, dans le cas de micro-organismes extrémophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes (Banat *et al.*, 2000). Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation (Bognolo, 1999). Les substrats de croissance pour les micro-organismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques (Van Dyke *et al.*, 1991 ; Fiechter, 1992).

Grâce à leur performance, les biosurfactants ont donné lieu à de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole pour extraire le pétrole adsorbé sur la roche du réservoir. Cette application consiste en la récupération assistée des hydrocarbures par l'utilisation des microorganismes, ainsi que, l'exploitation de leurs métabolites afin d'augmenter la production du pétrole. Dans le domaine de la protection de l'environnement et la bioremédiation, les biosurfactants (les rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures. En agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans les formulations d'herbicides et des pesticides. D'autres part, les biosurfactants de structure

glycolipides peuvent avoir des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

II. 1 Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (figure n°09). 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).

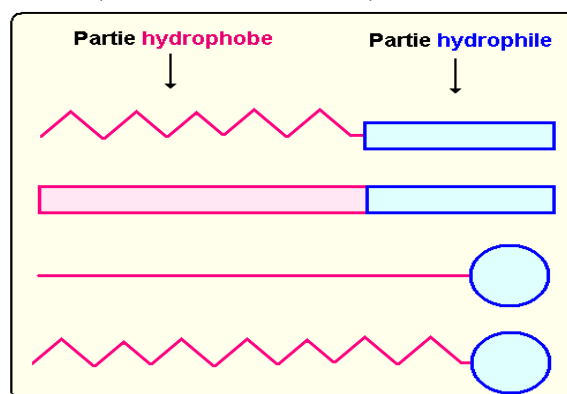


Figure n°09 : Représentations les plus utilisées pour illustrer les deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces (Larpent, 1995).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques (Parra *et al.*, 1989 ; West et Harwell, 1992 ;Pore, 1992):

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

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbone ou son degré de ramification (West et Harwell, 1992).

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. La revue bibliographique révèle que la majorité des

biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique (Cameotra et Makkar, 1998 ; Bognolo, 1999). Il existe peu de structures cationiques (Mulligan *et al.*, 2001); cependant, et dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule, ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation par exemple.

II. 2 Production des surfactants biologiques

Le principal frein à l'utilisation des biosurfactants est leur coût. En effet, Bognolo (1999) indique que les prix varient de 8 €.mg⁻¹ pour de la Surfactine purifiée à 98 % (utilisations bio-médicales) à 1 à 3 €.kg⁻¹ pour des formulations d'Emulsan utilisées dans les années quatre vingt (80) pour le nettoyage des cuves. De récentes estimations indiquent un coût de revient de 2 à 16 €.kg⁻¹.

Lang et Wullbrandt (1999) indiquent que pour la production de rhamnolipides en grande quantité dans des fermenteurs de 20 à 100 m³, les coûts diminuent de 16 à 4 €.kg⁻¹. Par comparaison, les coûts de surfactants chimiques sont de l'ordre de 0,5 à 2 €.kg⁻¹. Ainsi, le succès de l'utilisation et la production des biotensioactifs passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, Makkar et Cameotra (2002) indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles, d'une part, pour diminuer les coûts mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...). Une étude réalisée par Mercadé et Manresa (1994) reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.L⁻¹ pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

II. 2. 1 Microorganismes producteurs

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).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont, en général, issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux, voire quatre rhamnolipides (Van Dyke *et al.*, 1993). Abalos *et al.* (2001) indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Bien que de nombreuses espèces produisent des biotensioactifs, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat *et al.*, 2000). La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifiques : il y a intervention de donneurs rhamnosyl, les TPD transférases. Deux transférases différentes permettent la formation de quatre rhamnolipides différents (Koch *et al.*, 1991). Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (Thangamani et Shreve, 1994).

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

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

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

II. 3 Principales classes des biosurfactants

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants: les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy *et al.*, 1996).

II. 3. 1 Les glycolipides

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

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

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

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

- Les glycosyl-diglycérides
- Et les dérivés de sucre acylés.

✓ Les glycosyl-diglycérides

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

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

La figure n°10 illustre les structures de cinq types majeurs de diglycosyl-diglycérades produits par des bactéries gram positif (Zajic et Mahomedy, 1984).

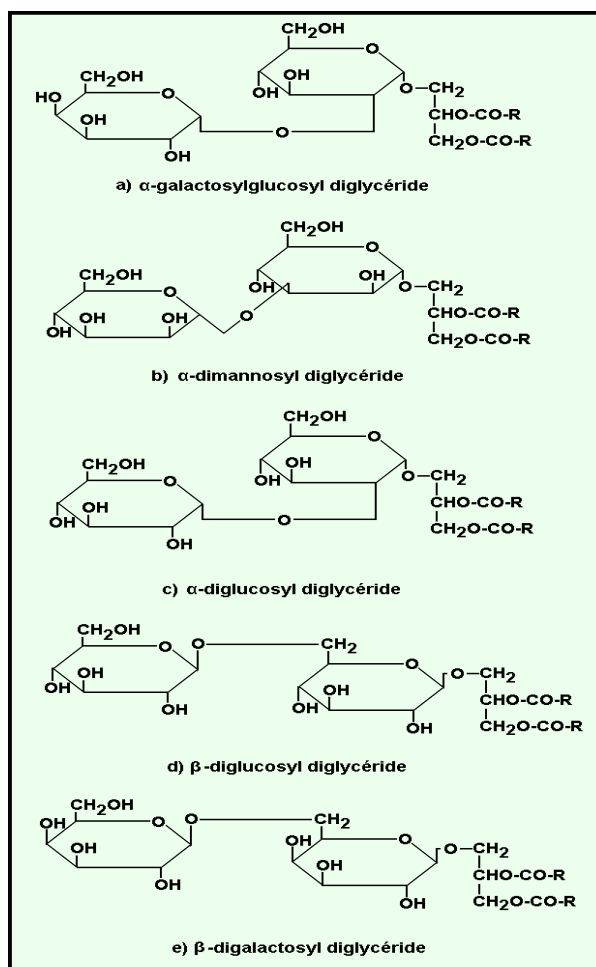


Figure n°10: Les structures des cinq types majeurs de diglycosyl diglycérides isolés chez les bactéries gram-positif (Zajic et Mahomedy, 1984).

✓ **Les dérivés de sucre acylés**

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

▪ **Les rhamnolipides**

Ce sont des glycolipides qui contiennent du rhamnose et de l'acide β -hydroxydécanoïque. Ils sont retrouvés, pour la première fois, par Bergström et *al.* (1946) chez *Pseudomonas pyocyanea* cultivée sur glucose. Ces auteurs étaient incapables de déterminer la structure moléculaire des deux composants. Elle a été déterminée par Jarvis et Johnson (1949), qui ont mis en évidence une liaison glycosidique sur 3% du glycérol. Cependant, la liaison précise entre les deux unités du rhamnose n'était pas claire, c'est ainsi qu'Edwards et Hayashi (1965) ont démontré une liaison 1-2 dans le premier rhamnolipide identifié, appelé aussi R2, qui est constitué de deux molécules de rhamnose et de deux molécules d'acide β -

hydroxydécanoïque. Le R2 est le produit unique de *Pseudomonas aeruginosa* S7B1 cultivée sur un substrat le n-hexadécane ou les n-paraffine (C14-C18) (Hisatsuka et al., 1971).

Par ailleurs, la culture de *Pseudomonas aeruginosa*, sur d'autres substrats tels que les n-alcane, aboutit à la production de rhamnolipides distincts: R1, R3, R4, RA et RB (Lang et Wullbrandt, 1999). Les structures des rhamnolipides analogues: R1, R2, R3, RA et RB sont illustrées dans la figure n°11.

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

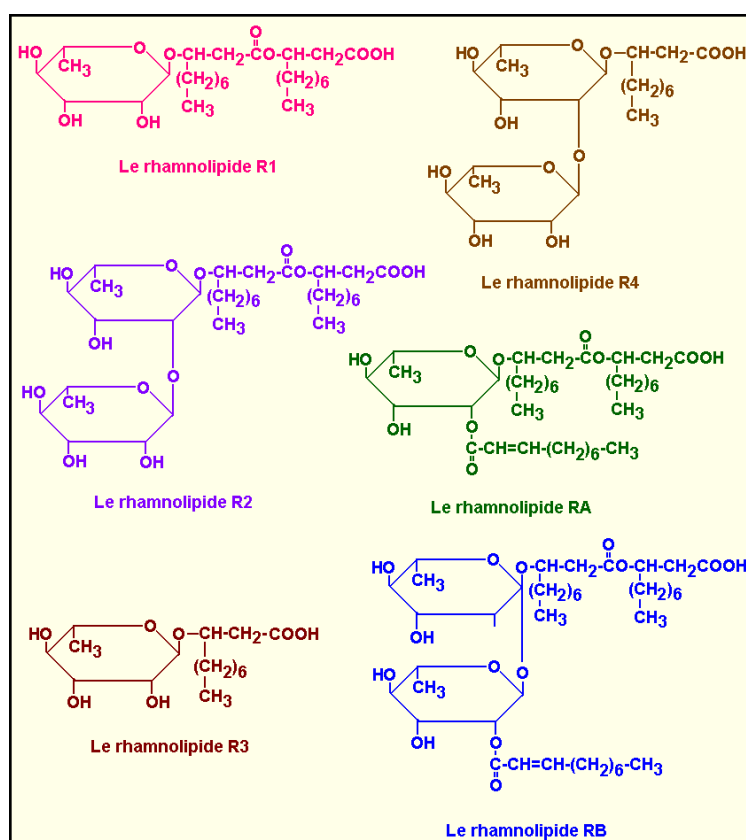


Figure n°11: Structures des rhamnolipides R1, R2 R3, R4, RA et RB produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Lang et Wullbrandt, 1999).

- **Les glucoses-lipides**

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

D'après Wagner et Lang (1996), ce glucose-lipide est constitué d'un acide D-3-hydroxydécanoïque (figure n° 12).

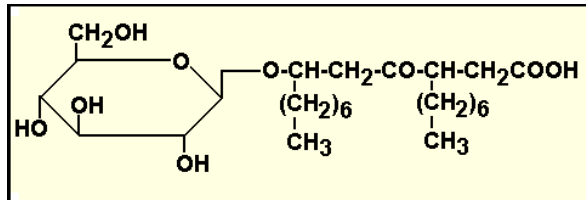


Figure n°12: Structure de glucose-lipide synthétisé par *Serratia rubideae* (Wagner et Lang, 1996).

- **Les tréhalose-lipides**

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

Selon Wagner et Lang (1996), l' α -tréhalose-2, 2', 3, 4-tétraester, ayant un seul résidu succinoyl et une chaîne d'acide gras au milieu de la chaîne, est connu depuis 1983. Trois souches de bactéries sont capables de le synthétiser: *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215, *Arthrobacter sp* EKI et *Rhodococcus erythropolis* SD-74 (figure n°13).

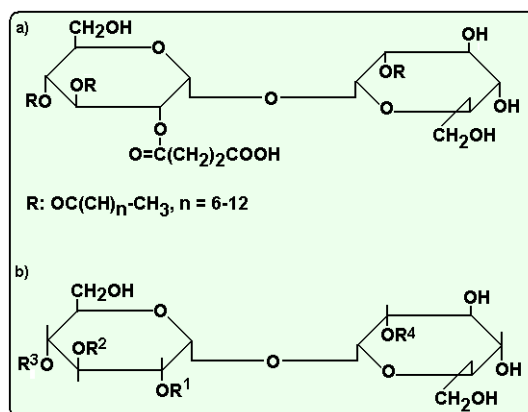


Figure n°13: Structure des tréhaloses-lipides produits par *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 et *Arthrobacter sp.* EK 1 (a) et par *R. erythropolis* SD -74 (b) (Wagner et Lang, 1996).

▪ **Les pentasaccharides-lipides**

D'après certains auteurs, le pentasaccharide-lipide le plus connu est celui produit par *Nocardia corynebacteroides* SM1 cultivée sur les n-alcanes (Wagner et Lang, 1996).

▪ **Les mélanges variés**

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

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

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

► **Les glycosyl d'acide gras hydroxylés (*les sophorose-lipides*)**

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

D'après ces mêmes auteurs, les sophorolipides sont produits sous forme d'un mélange de composés à base de dérivés de sophoroses acylés dont chacun est lié à un acide gras hydroxylé (figure n°14).

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

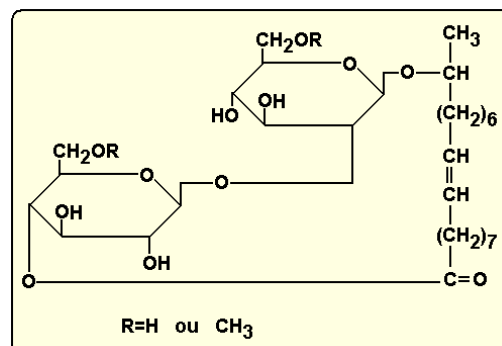


Figure n°14: Structure de sophorolipide produit par *Candida bombicola* ATCC 22214 (Wagner et Lang, 1996).

► Les esters de polyols d'acide gras

On distingue les *monosylerythritol-lipides*: décrits pour la première fois en 1983 par Kawashima et *al.*, en particulier en cultivant *Candida sp* B-7 et plus récemment *Candida antarctica* T-34 (Kitamoto et *al.*, 1990). Après purification et identification du produit de synthèse, on reconnaît la structure représentée dans la figure n°15 décrite par Wagner et Lang (1996).

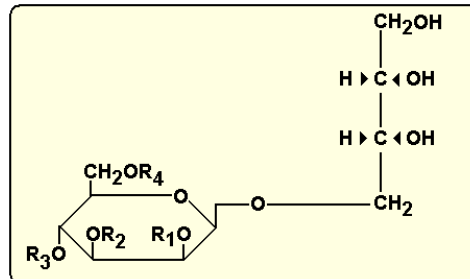


Figure n°15: Structure de mannosyl erythritol lipide produit par *Candida antarctica* T-34 (Wagner et Lang, 1996).

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

La structure moléculaire des deux composants est déterminée par les nouvelles techniques spectroscopiques (RMN) et spectrométries de masse (SM).

Ces glycolipides renferment deux types de sucres:

- les manosylerythritol-lipides (MEL),
- les cellobioses-lipides (CL).

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

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

II. 3. 2 Les lipopeptides

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

a) La surfactine

C'est une substance fortement active, protéolipide, produite par *Bacillus subtilis*. Elle a été nommée « surfactine » par Arima et *al.* (1968) et subtilysine par Bernheimer et Avigad (1970).

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

La surfactine est composée d'une séquence de sept acides aminés : **L-Glu1-Leu2-D-Leu 3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7** formant un cycle lactonique avec un acide gras β -hydroxyé en C (13)-C (15).

✓ Les variantes peptidiques de surfactine

Plusieurs variantes peptidiques de surfactine, appelées aussi lichenysine ou hallobacilline et pumilacidine, sont produites respectivement par les espèces *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus* (Yakimov et *al.*, 1995).

b) La lichenysine

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

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

Par ailleurs *Streptomyces canus* produit un lipopeptide tensio-actif (Kieslich, 1984).

c) Les lipoamino-acides (l'ornithine)

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

d) Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des produits naturels extracellulaires (métabolites secondaires) et sont produits par divers microorganismes : certains fonctionnent comme agents tensio-actifs en réduisant la tension superficielle (Zajic et Mohamedy, 1984). Le tableau V représente les différents peptides bioactifs qui agissent comme surfactants.

**Tableau V: Les antibiotiques possédants des activités de surface
(Zajic et Mohamedy, 1984)**

Antibiotiques	Microorganisme producteur	Activité
A-3302	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibactérien
N-Acétilmuramyl-talanyl	<i>Staphylococcus aureus</i>	Immunoadjuvant
D-isoglutamine	<i>Escherichia coli, B. cereus</i>	
Actinoboline	<i>S. griseoviridis</i>	Antibactérien
Bacilysine	<i>B. subtilis</i>	Antibactérien
Bacitracine	<i>B. licheniformis</i>	Antibactérien
Edeïnes	<i>B. brevis</i>	Antibactérien
Esperine	<i>B. mesentericus</i>	Antibactérien
Gramicidine A, B	<i>B. brevis</i>	Bactéricide
Gramicidine S	<i>B. brevis</i>	Antibactérien
Mycobacilline	<i>B. subtilis</i>	Antifongique
Mycobactines	<i>Mycobacterium sp.</i>	Iron (III) chélatant stimulation de la croissance de mycobactéries
Octapeptines	<i>B. circulans</i>	Antibactérien
Phosphoramidon	<i>S. tanashiensis</i>	Inhibiteur de protéinase
Polymyxines	<i>B. polymexa, B. colistinus, B. circulans</i>	Antibactérien
Polypeptines	<i>B. circulans</i>	Antibactérien
Subtiline	<i>B. subtilis</i>	Antibactérien
Surfactine	<i>B. subtilis</i>	Surfactant (inhibiteur de la formation des caillots dans la réaction thrombine-fibrinogène).

II. 3. 3 Les phospholipides

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

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

De sa part, *Corynebacterium alkanolyticum* est induite à produire des phospholipides extracellulaires en enrichissant le milieu de culture de pénicilline ou de céphalosporine (laurila, 1985).

Ainsi, les phospholipides sont classés selon deux groupes : **Les glycérophospholipides** et **les glycophospholipides** (Zajic et Mohamedy, 1984). Les glycérophospholipides contiennent deux acides gras (R1 et R2) estérifiés au glycérol, et un seul groupe phosphate, qui a généralement d'autres substitutions (Zajic et Mohamedy, 1984).

Selon les auteurs, la composition et le type de phospholipides produit par les différentes espèces de bactéries, levures et fungi, dépendent de la source de carbone utilisée et des conditions de culture de croissance, à savoir la valeur de pH du milieu de culture.

Le tableau VI donne la distribution des phospholipides majeurs chez les bactéries, par exemple : chez les bactéries gram négatives, le phosphatidylethanolamine prédomine; par contre chez les bactéries Gram positives, on retrouve différents types de phospholipides.

Tableau VI : La distribution structurale des phospholipides majeurs (Zajic et Mohamedy, 1984)

Phosphatidyl glycérol	Présent chez toutes les bactéries (exception des actinomycétales)
Biphosphatidylglycérol	Composant majeur des bactéries gram négatives et aussi présent chez les <i>Bacillaceae</i>
Phosphatidylinositol	Chez les <i>Propionibacterium</i> , les <i>Corynebacterium</i> , les <i>Arthrobacter</i> et les <i>Nocardia</i>
Phosphatidylinositol mannosides	Chez les <i>Corynebacterium</i> et les <i>Actinomycetales</i> , il peut être présent aussi chez les <i>Propionibacterium</i> .

II. 3. 4 Les polymères (lipopolysaccharides)

Les lipopolysaccharides ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée.

La molécule lipopolysaccharide (LPS) est constituée de trois régions attachées entre elles : région du composant hydrophobe, désignée par le terme lipide A, région du centre oligosaccharide et une région O-spécifique (Laurila, 1985 ; Zajic et Mohamedy, 1984).

Composition du lipopolysaccharide :

- **Le lipide A** : inséré dans la membrane des bactéries Gram négatif, contenant plusieurs unités de glucosamine phosphate porteuse d'acide gras (hydroxylés) et deux phosphate (désignée sous le nom d'endotoxine).
- **Partie centrale polysaccharide** : contenant 10 à 15 unités glucidiques, notamment des sucres en C7 et un octose appelé CDO, acide 2-céto-3-désoxy-actulosonique ou acide 3-désoxy-mannoctulosonique. Le sucre en C7 est le L- glycéromannoheptose et enfin du glucose et deux molécules de N-acétyl glucosamines.
- **La chaîne latérale O** : des unités répétées de 3 à 5 glucides chacune prolongent la partie centrale et forment une chaîne poly-saccharidique flottante appelée antigène O. cette partie est très variable en composition, elle contient une variété de sucre, connus et d'autres inconnus dans ce monde vivant (Pelmont, 1995).
La structure amphiphile du LPS, lui confère des caractéristiques d'un biosurfactant.

✓ **Les complexes polysaccharides-lipides**

Un complexe polysaccharide a été isolé à partir de la membrane cellulaire de la levure *Candida tropicalis* après culture sur hydrocarbure (Laurila, 1985).

II. 3. 5 Les acides gras et les lipides neutres (mono et diglycérides)

Les acides gras et les lipides neutres sont retrouvés chez tous les microorganismes et sont souvent des produits extracellulaires (Zajic et Mohamedy, 1984).

Les acides gras se divisent en quatre groupes suivants (figure n°16)

- Acides gras à chaîne droite,
- Acides gras à chaîne ramifiée,
- Acides gras insaturés,
- Acides gras formés d'un cyclopropane.

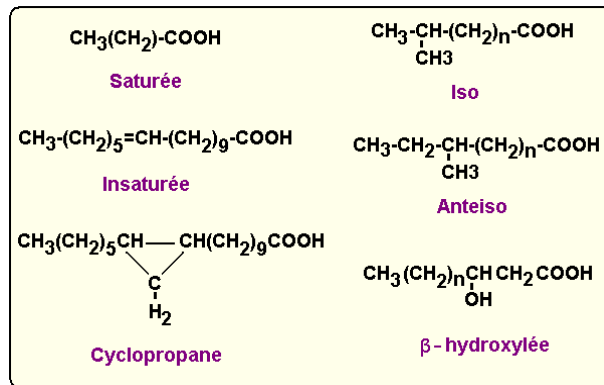


Figure n° 16: Structures majoritaires des acides gras: Saturée, β-hydroxylée, iso, anteiso et cyclopropane (Zajic et Mahomedy, 1984).

Généralement, la production extracellulaire des acides gras et des lipides neutres nécessite une croissance des microorganismes sur hydrocarbures.

La plupart de ces acides gras (exemple, les acides carboxyliques) et les lipides neutres (les alcools, les esters, les mono et les diglycérides) manifestent certains degrés d'activités superficielles (laurila, 1985).

A titre d'exemple, le biosurfactant produit par *Corynebacterium lepus* est formé par des acides gras corynomyeoliques (Banat, 2000).

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biotensioactifs les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides (Falatko et Novak, 1992 ; Desai et Banat, 1997) (Tableau VII).

Tableau VII: Principaux types de surfactants biologiques

Le biosurfactants	Microorganismes producteurs	Références
Les glycolipides : - rhamnolipides - trehalolipides - sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Nocardia, Corynebacterium</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. petrophilum</i> <i>Candida bogoriensis</i>	Guera-santos et al., 1986. Hisatsuka et al., 1971. Lang et Wagner, 1987. Parra et al., 1989. Lang et Wagner, 1984. Cooper et Paddock, 1984. Cooper et Goldenberg, 1987. Cultler et Light, 1979.
Lipopeptides et lipoprotéines	<i>Bacillus brevis</i> <i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Marahiel et al., 1977. Mutua et Akoh, 1993. Knoche et Shiveley, 1972.
Acides gras, phospholipides et lipides neutres	<i>Acinetobacter sp</i> <i>Aspergillus sp</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Kappeli et al., 1979. Beeba et Umbreit, 1971. Kretschmer et al, 1982.
Biosurfactants polymériques	<i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i>	Cirigliano et Carman, 1984. Cameron et al., 1988. Hisatsuka et al., 1977. Dessai. 1988.
Biosurfactants particuliers	<i>B. brevis</i> <i>S. aureus</i> <i>A. calcoaceticus</i>	Rosenberg, 1993. Dessai, 1987. Wilkinson et al. 1975.

II. 4 Paramètres influençant la production des biosurfactants

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

II. 4. 1 Influence de la source de carbone

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

Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a produit des tensioactifs sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène (Déziel *et al.*, 1996), la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène.

Mata-Sandoval *et al.* (2000) reportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le changement du substrat carboné altère la structure des molécules produites. En effet, Fiechter (1992) indique que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production.

Desai et Banat (1997) indiquent qu'un ajout d'hexadécane dans le milieu, constitué de D-glucose pendant la phase de croissance stationnaire, provoque une augmentation de rendement.

Calvo *et al.* (2004) ont étudié la relation entre présence des hydrocarbures et le type de exopolysaccharide produits par *Halomonas eurihalina*. La composition chimique des exopolysaccharides produits varie selon les conditions de culture. Les exopolysaccharides produits dans un milieu à base des hydrocarbures contiennent moins de carbohydrates et de protéines que dans un milieu à base de glucose. Néanmoins, le pourcentage des acides uroniques, acétyls et sulfates sont toujours plus élevé que dans un milieu contenant du glucose (tableau VIII).

Tableau VIII : Composition chimique des exopolysaccharides produits par *Halomonas eurihalina* dans des milieux de cultures contenant plusieurs types d'hydrocarbures (Calvo *et al.*, 2004)

	Glucose	Tetradécane	Corne (végétale)	Hexadécane	Mazout	Heavy oil (minéral)
Protéines	7±0,05	11±1	6±0,6	11±1	7±0,05	10±0,1
Hydrates de carbone	20±1,0	21±1,3	23±1,1	27±0,9	20±1,0	19±1,0
Acide uronique	7±0,1	6±0,1	6±0,1	7±0,3	7±0,1	5±0,03
Acétyles	0,5±0,03	0,5±0,01	1,6±0,2	0,4±0,01	0,3±0,02	0,5±0,03
Sulfate	17±1,1	30±1,3	35±1,0	29±1,0	35±1,4	29±0,5

II. 4. 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 limitante (Desai et Banat, 1997 ; Cameotra et Makkar, 1998 ; Lang et Wullbrandt, 1999).

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices: par exemple, la production de tensioactif par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates. Par contre, Robert *et al.* (1989) indiquent que la production de surfactant à partir de *Pseudomonas* 44T1 cultivées sur de l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium. Hommel *et al.* (1994) indiquent que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium. Des résultats semblables ont été obtenus par Manresa *et al.* (1991) à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biotensioactif. Par exemple, Guerra-Santos *et al.* (1986) ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé de production pour des rapports inférieurs à 11/1 où l'azote n'est pas limitant.

II. 4. 3 Influence du pH

Arino *et al.* (1996) et Desai et Banat (1997) indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de tensioactif chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Ishigami *et al.* (1987) et Champion *et al.* (1995) ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées.

II. 4. 4 Influence de l'âge de la culture

L'âge de la culture est une variable importante pour la production en batch de biosurfactant. L'âge de la culture augmente le phénomène d'autolyse avec la libération des lipides et des biosurfactants intracellulaire, ainsi que des fragments

de la paroi et de la capsule possédant une activité de biosurfactant (Desai et Banat, 1997).

II. 4. 5 Influence des sels minéraux

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

II. 4. 6 Influence de l'agitation

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance. Les milieux de culture sont agités lors de la production de tensioactifs. 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).

II. 5 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

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

La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules).

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

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

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

La capacité des biosurfactants à s'agréger aux surfaces a également été utilisée pour les retenir sur des membranes de filtration. Par exemple, une membrane XM-50, dont le seuil de coupure est de 5000 D, a été utilisée sur une surfactine pure à 97 % et un taux de récupération de 98 % est obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de

coupure plus élevé (10 000 D) fournit un rendement de récupération de 92 % (Desai et Banat, 1997).

II. 6 Identification des biosurfactants

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

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

II. 7 Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs

II. 7. 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 et *al.*, 2001).

La tension superficielle s'exprime en Dyne.Cm⁻¹ (= mN.m⁻¹).

Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées. Ceci apparaît dans l'exemple: la tension superficielle de l'eau pure est de 62.80 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle peut atteindre approximativement une valeur de 30 mN/m (Holmberg et *al.*, 2001).

L'adsorption des biosurfactants et la diminution de la tension superficielle sont responsables de la formation de mousses.

II. 7. 2 Abaissement de la tension interfaciale

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

La tension interfaciale de l'eau contre un alcane (n-octane) est de 50.81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m (Holmberg et *al.*, 2002).

II. 7. 3 Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (Figure n°17) (Pore, 1992).

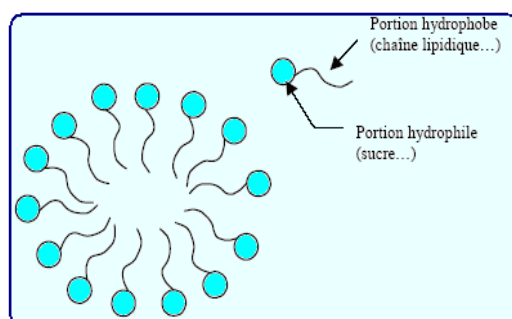


Figure n°17 : Représentations schématiques d'une micelle de surfactant (Pore, 1992).

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN.m⁻¹ en solution aqueuse). Pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure (Mata-Sandoval *et al.*, 2000). Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 mg.L⁻¹ (Zhang et Miller, 1992 ; Abalos *et al.*, 2001).

La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (Edwards *et al.*, 1991). Les effets des électrolytes sur la CMC sont plus prononcés pour les surfactants ioniques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (Haigh, 1996).

Haba *et al.* (2003) indiquent que le rapport et la composition des homologues de surfactant, la présence de liaisons insaturées, la ramification et la longueur de la chaîne alkyle ou la taille de la tête hydrophile affectent la valeur de la CMC. La CMC des composés insaturés est supérieure à leurs homologues saturés. Ceci peut être attribué à des facteurs stériques pendant la formation des micelles.

II. 7. 4 Solubilisation des biosurfactants dans l'eau

Les agents tensio-actifs, au-dessus de leur concentration micellaire critique augmentent, de façon significative, la solubilité des produits insolubles ou peu solubles dans l'eau. Ce phénomène est appelé "solubilisation" (Marcou, 1989).

La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures dépend du nombre de liaisons C-C présentes dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant (Mimouni, 1995), c'est-à-dire:

- Si la longueur de la chaîne (de la partie lipophile) est inférieure à 12 liaisons C-C, le surfactant est soluble dans l'eau,
- Si la partie non polaire (lipophile) a plus de 16 liaisons C-C, le surfactant est non soluble dans l'eau.

Cette propriété de solubilité devient aisée quand il y a formation de micelle, car la molécule individuelle du biosurfactant est relativement peu soluble dans l'eau, du fait qu'elle renferme une partie hydrocarbonée importante insoluble dans l'eau, par contre la micelle réalise des conditions meilleures de solubilité puisque les parties hydrocarbonées sont soustraites à l'eau et que sa surface est recouverte par l'ensemble hydrosoluble (Minouni, 1995).

Selon Larpent (2000) la solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures est fonction de l'importance relative de leur partie hydrophobe et hydrophile ou plus précisément de leur "balance lipophile-hydrophile (HLB)".

II. 6. 4. 1 La balance lipophile-hydrophile ou HLB

Ce système imaginé par Griffen en 1949, consiste à attribuer à chaque agent de surface ou tensio-actif, une valeur illustrant sa balance lipophile-hydrophile. Selon Marcou (1992), cette HLB varie de 0 à 20:

- ✓ La valeur 0 correspond à un produit totalement hydrophobe,
- ✓ La valeur 20 correspond à un produit totalement hydrophile.

La connaissance de HLB de chaque agent de surface ou tensio-actif est très importante, car les diverses propriétés (émulsion, mouillage...) correspondent à des valeurs données du HLB (tableau IX)

Tableau IX: Relation entre les propriétés des agents tensio-actifs et leur balance lipophile-hydrophile (HLB) (Marcou, 1992)

Solubilité dans l'eau	Valeur du HLB	Propriétés
Insoluble	2	
	3	
Se disperse progressivement	5	Emulsionnant
	6	Eau dans l'huile
Forme une dispersion laiteuse	7	
	8	Mouillant
	9	
Forme une dispersion translucide	10	
	11	
	12	
	13	
Soluble	14	Emulsionnant Huile dans l'eau
	15	
	16	
	17	
	18	
	19	
	20	
	20	

II. 7. 5 Toxicité et biodégradabilité

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. Edwards *et al.* (2003) ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menidia Beryllina*). Ces auteurs concluent que les biotensioactifs ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques.

Par exemple, l'Emulsan qui est le biosurfactant le moins toxique de l'étude, présente une CL50 (concentration létale) supérieure à 200 mg.L⁻¹. A titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, a une CL50 de 2,5 à 6 mg.L⁻¹. Le Tableau X regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques.

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

**Tableau X : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques
(Christofi et Ivshina, 2002)**

Surfactant	Origine	CE50 (mg.L ⁻¹)
<i>Rhodococcus ruber</i> AC 235 glycolipide complexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>		49
Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>		286
Rhamnolipide de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50
Stéarate de sucrose (DK 50)		67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP 22		0,004

CE50 : concentration effective à 0%, c'est-à-dire affectant 50% de la population testée.

De nombreux auteurs indiquent que les biotensioactifs sont biodégradables (Parra *et al.*, 1989 ; Herman *et al.*, 1995 ; Banat *et al.*, 2000 ; Vipulanandan et Ren, 2000). Une étude réalisée par Deschênes *et al.* (1996) reporte que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations (500 µg de tensioactif.g-1 de sol).

Ces auteurs indiquent de plus que le surfactant était biodégradable. De même, Vipulanandan et Ren (2000) ont prouvé que la biodégradation du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphtalène. Ces résultats sont en accord avec ceux de Page *et al.* (1999) qui expliquent le phénomène par le fait que les biotensioactifs sont des sous-produits ou des constituants membranaires des micro-organismes. Il faut cependant noter que la biodégradation des tensioactifs biologiques pose un problème économique : en effet, pour éviter toute perte d'efficacité de dépollution, il est nécessaire d'augmenter les taux de tensioactifs appliqués, ce qui induit un surcoût.

II. 8 Utilisation des biosurfactants

Grâce à leurs performances, les biosurfactants ont donné de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole pour extraire ce dernier adsorbé sur la roche du réservoir. Cette application consiste en la récupération assistée des hydrocarbures par l'utilisation des microorganismes, ainsi que, l'exploitation de leurs métabolites afin d'augmenter la production du pétrole (Banat, 2000).

Dans le domaine de la protection de l'environnement et la remédiation, les biosurfactants (rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures (Lang et Wallbrant, 1999).

En agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans la formulation d'herbicides et de pesticides (Lang et Wallbrant, 1999).

D'autres part, les biosurfactants de structure glycolipides peuvent avoir des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaire (Lang et Wallbrant, 1999; Banat, 2000).

Plusieurs biosurfactants ont des propriétés antimicrobienne telles que la surfactine qui a un pouvoir antibactérien (Peypoux et al., 1999), antitumoral, hypercholestérolémique, inhibiteur de la formation de caillot de fibrine (Laurila, 1985), et dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (Banat, 2000).

En moyen de méthode classique de récolte et culture microbienne, on produit une grande variété de biosurfactants. Cette diversité structurelle ainsi que les propriétés émulsifiantes ont augmenté leur intérêt dans l'amélioration de la récupération du pétrole et la dépollution des sites terrestres souillés par les hydrocarbures, mais leur usage dans l'industrie est encore limité du fait qu'ils constituent un domaine de recherche en voie d'émergence.

Pour que l'application des biosurfactants soit intensive dans le prochain avenir, il faudra que la protection de l'environnement devienne une priorité et un critère de choix pour la sélection des produits.

Il s'agit donc de mettre au point des procédés de traitement biologique efficaces à partir d'une culture microbienne sélectionnée in situ (telle que *Pseudomonas*) capable de dégrader les hydrocarbures et de produire des biosurfactants.

Ainsi l'usage d'une culture microbienne productrice de biosurfactant dans la bioremédiation et l'augmentation de la production pétrolière sont plus compatibles avec notre réalité économique, tandis que l'emploi direct de biosurfactant pure est plus qualifié aux autres domaines industriels (détergence, papeterie, pharmacie, textile).

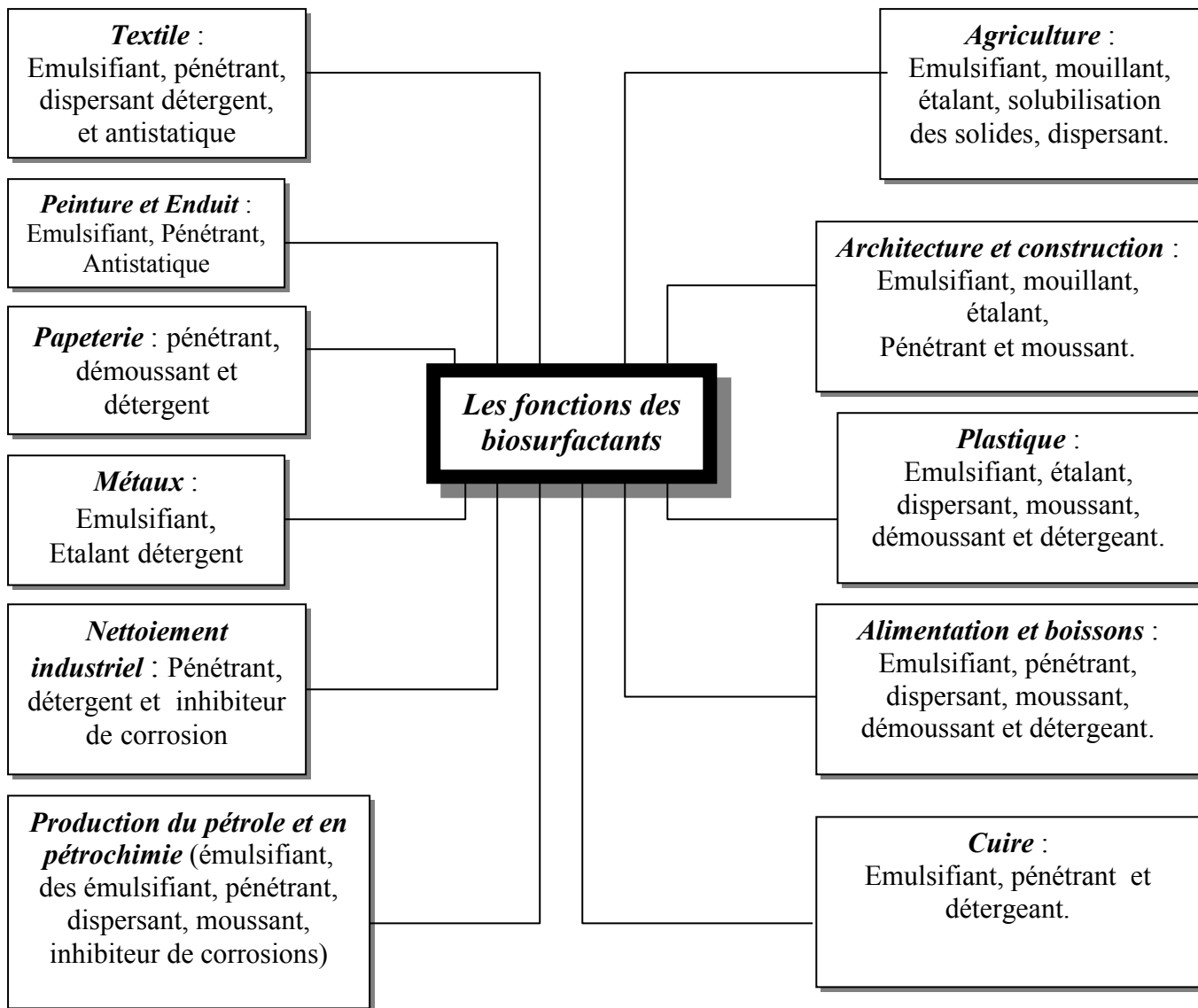


Figure n° 18: Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel.

Matériel et méthodes

Chapitre III : Matériel et méthodes

Notre travail de recherche est réalisé au sein du laboratoire de microbiologie situé au niveau de l'université M'HAMED BOUGARA de *Boumerdes* (UMBB) et du laboratoire de corrosion bactérienne situé au niveau du Centre de Recherche et de Développement de Sonatrach (CRD) de *Boumerdes*. Il a pour objectif d'une part l'identification des souches bactériennes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers Algériens, et d'autre part, la caractérisation des biosurfactants produites par ces bactéries.

III. 1 Matériel

III. 1. 1 Matériel et équipements

La liste de verrerie, équipement et autres est donnée dans l'annexe II.

III. 1. 2 Matériel biologique

a. Souches bactériennes

Les souches bactériennes (codée A et D), utilisées dans cette étude, considérées comme étant des halophiles strictes et extrêmes, ont été isolées par Ghouali et Kaci Chaouche (2004) à partir des eaux de gisement de certains champs pétroliers algériens (codés P1 et P2) au niveau de centre de Recherche et de Développement de *Boumerdes*. Elles étaient conservées dans des tubes contenant un milieu gélosé incliné, additionnés de 25% de NaCl.

Selon Ghouali et Kaci Chaouche (2004) ces souches bactériennes ont la capacité de produire des biomolécules de types biosurfactants.

b. Milieux de culture

Le choix d'un milieu de culture dépend des espèces à cultiver et l'objectif de l'étude à réaliser, pour cela nous avons utilisé des milieux de cultures spécifiques contenant 25% de NaCl pour chacun, leurs compositions est donnée dans le tableau IX en annexe III:

- ✓ **Milieu SH standard** : le milieu désigné par SH standard est utilisé pour l'isolement des *Halorubrum* anciennement dénommée *Halobacterium sodomense* à partir des eaux de la mer morte. Ce milieu a été utilisé pour le développement des souches A et D (Tindall, 1992).
- ✓ **Milieu SH standard modifié** : l'utilisation des sucres et d'autres sources de carbone avec la production d'acides sont déterminées par l'utilisation du milieu

SH standard modifié (Oren et *al.*, 1995). Ce milieu est caractérisé par la substitution de la source de carbone, présente dans le milieu SH standard, par un sucre, alcool ou acide organique selon le but ou le test à étudier, avec quelques variations dans les concentrations des constituants par rapport au milieu SH standard.

III. 2 Méthodes

III. 2. 1 Etude microbiologique

III. 2. 1. 1 Revivification des souches bactérienne A et D

Cette opération se fait dans des Erlenmeyer de 250 ml préalablement autoclavés à 120°C pendant 20 min, remplis de 25 ml de milieu de culture SH standard et ensemencés à partir des tubes de conservation. L'incubation se fait à une température de 40°C avec une agitation de 120 trs/min dans l'incubateur agitateur, pendant 7 à 14 jours.

Après l'incubation, on procède à l'ensemencement des bactéries revivifiées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu SH standard solide à raison de 15 ml. Une fois les boîtes sont ensemencées et étiquetées, elles seront mises dans des sacs en plastique afin de réduire la dessiccation précoce de milieu. Par la suite, elles seront déposées à l'étuve à 40°C durant 7 à 14 jours.

III. 2. 1. 2 Conservation des souches bactériennes A et D

Après l'apparition des colonies sur les milieux solides, nous procédons à leur repiquage sur des milieux neufs ayant la même composition que le milieu d'isolement.

Une colonie est prélevée à l'aide d'une anse stérile, ensemencée par des stries, ensuite incubée à 40°C. L'opération s'effectue sur milieu SH standard incliné.

III. 2. 1. 3 Identification des souches bactériennes étudiées

L'identification des souches bactériennes A et D est réalisée selon les recommandations de *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* et selon Oren et *al.*, (1995).

III. 2. 1. 3. 1 Etude des caractères cultureux

A) Etude macroscopique

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur la description des colonies obtenues sur le milieu solide en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'oeil nu est basée sur les éléments d'identifications données par Thomas et *al.*, (1970) :

- *La forme des colonies* : circulaire, ondulée, filamenteuse.
- *La taille des colonies* : punctiforme (moins de 1mm de diamètre), non punctiforme (supérieure à 1mm).
- *La chromogénèse* : couleur de pigment.
- *L'opacité* : transparente, translucide ou opaque.
- *Élévation* : colonie plate, convexe ou concave.
- *L'aspect de la surface* : lisse, sèche, rugueuse, brillante ou émoussée.
- *L'aspect du contour* : régulier ou non (denté, étoilé...).
- *La consistance* : visqueuse ou non visqueuse.
- *L'odeur* : présence ou absence, et sa nature.

III. 2. 1. 3. 2 Etude microscopique

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

✓ Observation microscopique à l'état frais

Cette observation est réalisée afin d'estimer la forme (cocci, bâtonnet...) et la mobilité de la bactérie à identifier.

A partir d'une culture liquide âgée de 72h, on prélève une goutte, à l'aide d'une pipette Pasteur. Cette goutte est mise entre lame et lamelle et observée sous le microscope optique avec un grossissement x40.

✓ Coloration de Gram modifiée

Cette technique nous permet de distinguer deux types de bactéries : Gram positif et Gram négatif, et de les différencier d'après leur morphologie. La coloration de Gram modifiée est décrite par Dussault en 1955, elle est réalisée comme suit :

- Préparation du frottis

On dépose au centre d'une lame 2 à 3 gouttes d'une suspension bactérienne préparée préalablement dans une solution saline à 20% (pour éviter la lyse cellulaire). Puis, on les étale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, de façon à réaliser un étalement mince et homogène. On fait passer la lame sur la flamme bleue du bec Bunsen pour la sécher, puis on procède à la fixation par la chaleur.

- Coloration du frottis

Les cellules sont traitées avec de l'acide acétique à 2% pendant 5 min, suivi d'un traitement au cristal violet de Gentiane pendant une minute, puis rincées à l'eau, recolorées une deuxième fois par la fuchsine pendant 1 minute et 30 secondes. La lame est rincée par l'eau distillée et séchée, puis observée au microscope photonique à immersion.

III. 2. 1. 3. 3 Etude biochimique et physiologique des bactéries

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora et *al.*, 2003).

A) Recherche des enzymes respiratoires et métaboliques

La recherche des enzymes respiratoires et métaboliques a été réalisée selon Gerhardt et *al.* (1981) et Oren (1983).

➤ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction suivante :



Cette enzyme empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H₂O₂) à l'intérieur de la cellule dont la présence serait létale.

La recherche de cette enzyme est mise en évidence en mettant sur une lame propre une à deux gouttes d'eau oxygénée, puis à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie de 72h qui sera déposée et étalée sur la lame. Après quelques secondes, on observe: soit l'apparition de bulles gazeuses indiquant une réaction positive ; soit on n'observe aucun changement, ce qui signifie que la catalase est absente.

➤ Recherche de l'oxydase

Ce test permet de mettre en évidence la présence de cytochrome « c » dans la chaîne respiratoire.

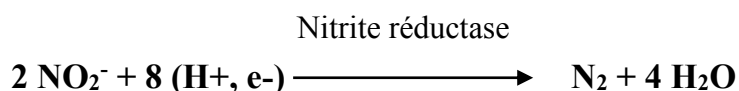
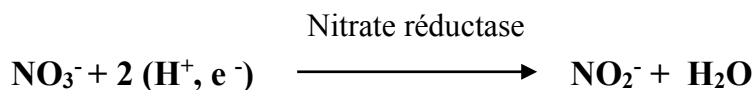
Dans des tubes stériles, on met 1 ml d'une solution aseptique à 20% de NaCl, puis on place à l'aide d'une pince stérile un disque d'oxydase dans chaque tube. Prélever la colonie à tester avec une anse stérile et l'émulsifier dans le tube contenant le disque et la solution saline (on laisse un tube sans inoculum comme un témoin) ; Incuber à 40°C et examiner après 24h. Le test est dit positif lorsque le milieu vire vers le bleu violet.

➤ Recherche du nitrate réductase

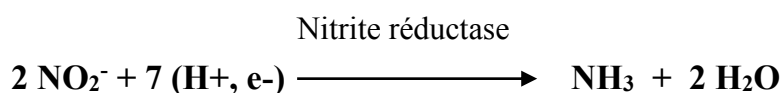
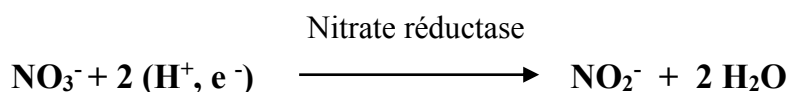
L'enzyme nitrate réductase B catalyse la réaction des nitrates en nitrites (réduction assimilatrice). Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote

(N₂) dans le cas de la nitrate réductase A (respiration nitraté) en fonction des réactions suivantes :

▪ **Systeme type A :**



▪ **Systeme type B :**



La recherche de cette enzyme se fait comme suit:

Dans des tubes de bouillon nitrate, on ajoute 20% de NaCl préalablement autoclavés à 120°C pendant 20 min et on les ensemence ensuite avec des colonies âgées de 72 h puis on les incube à 40°C pendant 7 jours. La lecture se fait en utilisant quelques gouttes des réactifs de Griess (NRI et NRII).

Les résultats sont dits positifs, lorsqu'il y a le virage de la couleur du jaune au rouge ; cela indique la présence des nitrites provenant de la réduction des nitrates par les bactéries, donc nitrate réductase positive (NR+).

Si le milieu reste inchangé, on ajoute de la poudre de zinc ; si ce dernier devient rouge cela indique que les nitrates sont présents dans le milieu et n'ont pas été réduits, donc nitrate réductase négative (NR-). Cependant si le milieu reste jaunâtre, cela indique que les nitrates, sont absents car la bactérie les a réduits en azote gazeux.

➤ **Etude du type respiratoire**

Le milieu utilisé est le milieu SH semi-solide réparti dans des tubes à raison de 10 ml. Ce milieu est régénéré au bain Marie bouillant avant chaque utilisation afin d'enrichir l'oxygène dissous. Après refroidissement, les tubes sont ensemencés par

piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur chargée de colonies pures âgées de 72 h. L'incubation se fait à 40° C pendant 7 jours.

La lecture des résultats se fait comme suit :

- Croissance en surface uniquement ; souche aérobie stricte.
- Croissance en profondeur uniquement ; souche anaérobie stricte.
- Croissance tout au long du tube ; souche aéro-anaérobie facultative.
- Croissance légère en dessous de la surface ; souche micro-aérophile.

➤ Test de l'ONPG

Pour dégrader activement le lactose, les microorganismes doivent posséder deux enzymes ; la perméase et la β -galactosidase.

L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β -galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl- β -D- galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose. Le lactose est formé de deux molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG (composé incolore) libère l'orthonitrophényl qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu, la réaction est illustrée dans la figure n°19.

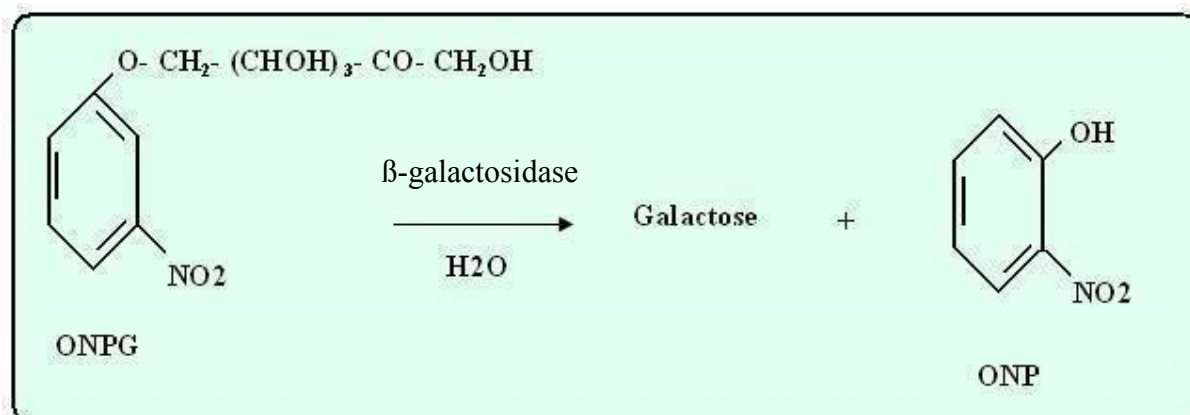


Figure n° 19: Réaction d'hydrolyse de l'ONPG (Marchal et Bourdon, 1982).

La méthode consiste à placer dans un tube stérile un disque d'ONPG contenant 1 ml d'une solution aseptique saline à 20% de NaCl,ensemencée d'une colonie de la souche test et incubée à 40°C. La lecture se fait après 3 à 7 jours d'incubation. Le test est dit positif si le milieu vire au jaune.

➤ **La recherche de la Lysine décarboxylase, l'Arginine dihydrolase et de l'Ornithine décarboxylase**

Ce test est effectué pour rechercher quelques enzymes protéolytiques des souches vis-à-vis de quelques acides aminés. Cette activité est due à des enzymes spécifiques de chaque acide aminé que comporte le milieu de Moeller. On recherche :

- L'Ornithine décarboxylase (ODC),
- L'arginine dihydrolase (ADH),
- La lysine décarboxylase (LDC).

Le test est réalisé comme suit :

- Répartir les milieux contenus dans les ampoules dans des tubes stériles.
- Ajouter du NaCl aseptique à raison 20% de salinité.
- Ensemencer les tubes par des colonies de 72h avec une anse de platine stérile.
- Recouvrir les milieux ensemencés par l'huile de Vaseline stérile.
- Incuber à 40°C pendant 7 jours.

Un milieu Moeller témoin sans acides aminés est éventuellement ensemencé.

 **La lecture**

L'utilisation du glucose dans le tube témoin est distinguée par le virage de la couleur de violet vers le jaune avec une acidification du milieu dû à sa fermentation dans les conditions d'anaérobiose qui conduit à la libération des acides.

L'utilisation des acides aminés est indiquée par le retour de la coloration vers le violet, ce qui signifie que les bactéries ont utilisé les acides aminés du milieu et elles l'ont alcalinisé (coloration violette), donc : LDC+, ODC+, ADH+.

➤ **Etude des différentes voies fermentatives intermédiaires**

Principe

Cette étude permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixtes (réaction rouge de méthyle : RM) et butylène glycolique (réaction Voges Proskauer, VP). Ces deux réactions ont un intérêt différent, mais elles peuvent être effectuées sur le même milieu et le plus souvent, se vérifiant mutuellement, une souche à RM⁺ est habituellement VP⁻ et vice versa.

a- Réaction au rouge de méthyle : elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu glucosé par la fermentation du glucose, cette acidification provoque le virage du rouge de méthyle (rouge à un pH ≤ 5; jaune pH ≥ 5.8).

b- Réaction de l'acétoïne (réaction de Voges- Proskauer) : certaines bactéries sont capables de produire de l'acétyl-méthyl carbinol, soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit, le plus souvent au cours de la fermentation de 2-3 butyléneglycolique. En présence d'une base forte. L'acétoïne donne une coloration rouge au milieu oxygéné (oxydation en diacétyle). Le diacétyle formé réagit avec le groupement guanidine de α - naphthol pour donner un composé rouge.

Technique

Prélever une colonie de la souche test (A ou D) âgée de 72 h. Ensemencer le milieu Clark et Lubs qui est préalablement additionné de 20% de NaCl stérile. Incuber à 40°C pendant 7 à 14 jours.

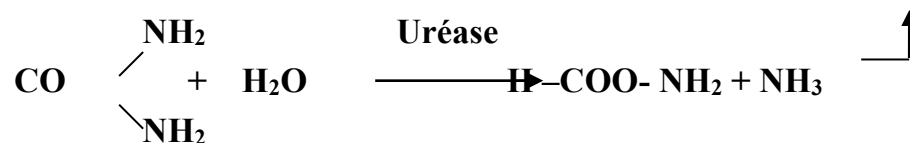
Après l'incubation, diviser le milieu dans deux tubes stériles, verser quelques gouttes de VP I et quelques gouttes de VP II dans l'un des tubes, et dans l'autre, ajouter quelques gouttes de réactif RM (rouge de méthyle).

Lecture: Test VP : Coloration rouge : VP⁺.
 Coloration jaunâtre : VP⁻.
 Test RM: Coloration rouge : RM⁺.
 Coloration jaunâtre : RM⁻.

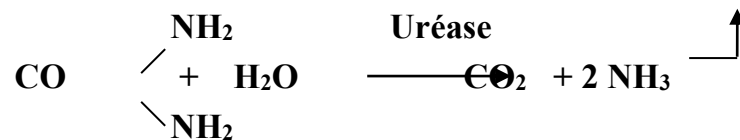
➤ Recherche de l'uréase et de l'indole

✓ Uréase

L'uréase est l'enzyme qui hydrolyse l'urée selon la réaction suivante :



L'uréase très active :



$\text{CO}_2 + 2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2$ Carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu.

La recherche de l'uréase se fait comme suit :

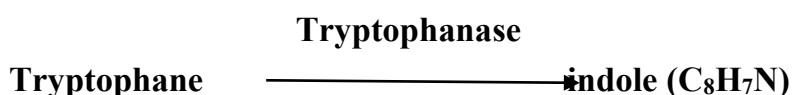
Dans les tubes d'urée –Indole, on ajoute 20% de NaCl aseptiquement, puis à l'aide d'une anse stérile, on ensemence par des colonies de la souche test âgée de 72h. On incube à 40° C pendant 7 jours.

La lecture s'effectue comme suit :

- L'uréase est positive s'il y a virage de couleur vers le rouge violacé ou vers le rose rouge.
- L'uréase est dite négative, s'il n'y a pas du virage de couleur ou le milieu devient jaune citron.

✓ **Production d'indole**

Certaines bactéries possèdent une tryptophanase, capable de scinder la molécule de tryptophane en produisant de l'indole suivant la réaction :



Pour la recherche de l'indole, on ajoute quelques gouttes du réactif de Kovacs au milieu urée-indole, s'il y a apparition de l'anneau rouge ; l'indole est positif, s'il n'y a pas l'apparition de l'anneau ; l'indole est négatif.

➤ **Recherche de la citrate perméase**

Le milieu utilisé est le citrate de Simmons. On liquéfie le milieu dans le bain Marie et on lui ajoute du NaCl à raison de 20%, puis on l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Après solidification du milieu sous forme inclinée, on procède à l'ensemencement en stries d'épuisement par des colonies âgées de 72 h. L'incubation se fait à 40°C pendant 7 jours.

La croissance de la bactérie sur le milieu indique que cette dernière possède du citrate perméase. Cependant s'il n'y a pas de développement, la bactérie ne possède pas cette enzyme.

B) Test de production d'H₂S et de gaz

Dans ce test le milieu utilisé est le milieu TSI. On fait fondre ce milieu dans le bain Marie, et on ajoute 20% de NaCl préalablement autoclavé. Bien mélanger, répartir ensuite dans des tubes et laisser solidifier sous forme inclinée. Après solidification on procède à leur ensemencement par une piqûre centrale et en stries. L'incubation se fait à 40°C pendant 7 jours.

La lecture

- Dans le cas où il y a apparition d'un fond noir, cela indique qu'il y a production d'H₂S, l'absence du noircissement signifie que l' H₂S n'est pas produit.
- La production de gaz est traduite par l'apparition des poches gazeuses dans le milieu et / ou soulèvement de la gélose.

C) Mise en évidence de la mobilité

Cette étude est réalisée comme suite :

On prélève une colonie de 72h à partir du milieu SH standard à l'aide d'une pipette Pasteur, puis on l'ensemence par piqûre centrale dans le milieu mannitol mobilité additionnée de 20% de NaCl préalablement autoclavé. L'incubation se fait à 40°C pendant 7 jours.

La mobilité des souches est traduite par l'apparition d'un trouble dans le tube (les bactéries diffusent de la ligne centrale de la piqûre dans tout le tube), alors que les souches immobiles se développent uniquement le long de la piqûre d'ensemencement.

D) Utilisation des différents sucres, alcools et acides organiques

Cette étude est réalisée par l'utilisation de milieu SH standard modifié liquide, où la source de carbone est un sucre, un alcool ou un acide organique à raison de 5g/l (Oren *et al.*, 1995).

La procédure se base sur des cultures liquides dans des Erlenmeyer de 100 ml, rempli de 40 ml de milieu et ajusté à un pH 7. Après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min, le milieu est inoculé par des cultures de 72h à partir des cultures solides.

Après l'inoculation, on mesure les densités optiques (DO) afin d'estimer la quantité des cellules inoculées à $t_0 = 0$ jours d'incubation (X_0). L'incubation se fait à 40°C sous agitation à 120 trs/min dans l'incubateur agitateur.

La lecture spectroscopique des DO à 600 nm avec la mesure de pH se font chaque trois jours d'incubation jusqu'à atteindre la phase de déclin de la croissance bactérienne (Oren *et al.*, 1995 ; Hezayen *et al.*, 2001).

La liste des sucres, alcools et les acides organiques utilisée pour la croissance des deux souches A et D est donnée dans tableau n° XI.

Tableau n° X : Liste des sucres, alcools, acides organiques et hydrocarbures utilisés

Sucres	Alcools	Acides organiques
Glucose, galactose, saccharose, lactose, maltose, fructose, mannose, cellobiose, arabinose, rhamnose, raffinose, xylose, amidon.	Adonitol, sorbitol, mannitol, glycérol.	Acétate, citrate, Oxalate.

E) Détermination de la température optimale des souches bactériennes A et D

Les souches bactériennes sont inoculées dans des Erlenmeyer de 100 ml, remplis de 40 ml de milieu SH standard stérile ajusté à pH = 7.

L'incubation est faite sous agitation rotative de 120 trs/min à différentes températures (4°C, 22°C, 37°C, 40°C, et 50°C).

Afin d'estimer l'optimum de température, on mesure la DO à 600 nm des cultures après chaque trois jours d'incubation jusqu'à atteindre la phase de déclin de la croissance bactérienne.

F) Détermination du pH optimum des souches bactériennes A et D

Cette étude est réalisée par l'utilisation du milieu SH standard liquide ajusté aux différentes valeurs de pH (5,0- 6,0- 6,5- 7,0- 7,5- 8,0- 8,5 et 9,0).

Dans des Erlenmeyer de 100 ml remplis de 40 ml de milieu stérile, on inocule avec des cultures de 72 h, puis on les incube à 40°C avec une agitation de 120 trs/min.

La croissance optimale est estimée par la mesure des DO à 600 nm des cultures à $t_0 = 0$ jours et après chaque trois jours d'incubation jusqu'à atteindre la phase de déclin de la croissance bactérienne.

G) Détermination de la concentration optimale en NaCl

Le milieu utilisé est le milieu SH standard liquide à différentes concentrations de NaCl (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%) inoculés par des cultures bactériennes de 72h.

L'étude est réalisée dans des Erlenmeyer de 100 ml remplis de 40 ml de milieu SH stérile ajusté à un pH 7. L'incubation se fait à 40°C sous une agitation de 120 trs/min.

Une lecture spectroscopique des DO à 600 nm des cultures se fait à $t_0 = 0$ jours d'incubation et après chaque trois jours d'incubation jusqu'à la phase de déclin (Kharoub et *al.*, 2006).

H) Détermination de la concentration optimale en ions Mg⁺⁺

Les souches sont inoculées sur le milieu SH standard liquide à différentes concentrations de MgCl₂, 6 H₂O (0M, 0.01M, 0.02M, 0.05M, 0.08M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.5M, 0.8M, 1M, 1.2M). Ces derniers sont réalisés dans des Erlenmeyer de 100 ml remplis de 40 ml de milieu stérile et ajusté à pH = 7. On incube à 40°C dans l'incubateur agitateur à 120 trs/min.

La mesure des DO à 600 nm des cultures se fait à t₀ = 0 jours d'incubation et après chaque trois jours d'incubation jusqu'à atteindre la phase de déclin de la croissance bactérienne (Kharoub et *al.*, 2006).

I) Criblage de souches productrices d'enzymes

Ce test a été effectué pour compléter les tests d'identification des souches en même temps pour sélectionner celles qui sont productrices d'enzymes. La mise en évidence, des enzymes suivantes : l'amylase, gélatinase et estérase est effectuée sur des cellules cultivées sur milieu SH additionné respectivement par 0,1% d'indicateurs ; amidon, gélatine et tween 80. Ces milieux sontensemencés par des spots de culture microbienne de 72 heures. Après incubation à la température optimale de croissance (40°C), la lecture se fait par addition d'un révélateur spécifique à chaque enzyme :

- Iodine à 10% : colore l'amidon en bleu violacée. L'action de l'amylase se traduit par l'apparition d'un halo clair (González et *al.*, 1978).
- Réactif de Frazier colore la gélatine et tween 80 en noir (15g HgCl₂, 20 ml HCl concentré et 100 ml d'eau distillée). La protéolyse se traduit par une zone de clarification autour des spots (Gutiérrez et González, 1972).

J) Recherche de la coagulase du lait

L'activité coagulante est évaluée selon la méthode de Berridge (1945).

➤ *Extraction du coagulase*

Le mout de fermentation, de la souche test, est agité pendant 45 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. Centrifuger à 10.000 trs /min pendant 20 minutes à 4°C, et à la fin récupérer le surnagent.

➤ **Préparation du substrat de Berridge**

Peser 12 g du lait écrémé en poudre et les dissoudre dans 100 ml de la solution de CaCl_2 à 0.01M, ensuite agiter lentement le mélange pendant 20 minutes.

✓ **Mesure du temps de coagulation**

Cette méthode consiste à déterminer visuellement, à partir du moment de l'addition de la solution enzymatique (1 ml d'extrait enzymatique dans 10 ml du lait) le temps d'apparition des premières micelles (tailles $2 \cdot 10^{-4}$) qui est le temps de prise et le temps de coagulation. Ce dernier correspond au temps écoulé entre le temps d'emprésurage (moment de dépôt de présure) et le temps où le caillé est complet (séparation entre le coagulum et le lactosérum).

K) Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Ce test consiste à déterminer la résistance ou la sensibilité des souches bactériennes A et D aux certains antibiotiques: Acide nalidixique (NA), Ofloxacine (OFX), Pénicilline G (P), Ampicilline et dérivés (AM), Amoxicilline + Acide clavulamique (AMC), Erythromycine (E), Spiromycine/ Jovamycine/ Midécamycine (SP), Lincomycine (L), Pristinamycine (PT), Triméthoprime (SXT), Furanes (FT), Gentamicine (GM), Chloramphénicol/ Thiamphénicol (C), Tétracycline (TE) , Doxycycline (DO), Oxacilline (Ox1), Cefotaxime (CTX), Cefalexine (CN), Céfixime (CFM), Rifampicine (RA), Nitroxoline (NI), Fosfomycine (FOS) (Bonelo et *al.*, 1984).

Pour réaliser ce test, on procède comme suit :

- on prépare le milieu SH standard solide,
- on réalise un autoclavage pendant 20 min à 120°C,
- on additionne le milieu en surfusion avec une culture jeune (soit la souche bactérienne A ou D),
- on conditionne le mélange dans des boîtes de Petri à raison de 15 ml,
- on dépose les disques des antibiotiques et on incube à 40°C pendant une semaine.

La lecture se fait en se basant sur la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

L) Etude de la lyse osmotique

La lyse cellulaire suite à un choc osmotique a été étudiée par la méthode de l'indice de clarification (méthode de Huguette, 1968). Cette méthode fait partie de la caractérisation des archaebactéries halophiles extrême. Deux tests sont réalisés :

➤ **Analyse qualitative**

Cette observation consiste à préparer deux lames pour chacun des isolats ; pour la première lame ; On prépare une suspension bactérienne à partir d'une culture solide âgée de 72 h dans une solution saline à 20%, puis on prélève une goutte et on la met entre lame et lamelle. Par contre, la deuxième lame consiste à préparer une suspension bactérienne à partir de la même culture que la première, mais dans ce cas dans de l'eau physiologique, on prélève une goutte et on la dispose entre lame et lamelle (Asker et Ohta, 2002).

L'observation des deux lames s'effectue parallèlement à l'aide de deux microscopes optiques au grossissement x40. Ainsi, on compare l'aspect des cellules, leur taille et leur agrégation par la réalisation d'une coloration de Gram modifié.

➤ **Analyse quantitative**

On ajoute 5 ml d'une eau salée à 20% à une boîte contenant des souches âgées d'une semaine (ensemencée sur milieu SH). La suspension cellulaire est récupérée dans un flacon. Celui-ci est agité pendant dix minutes puis centrifugé à 2000 g pendant dix minutes dans deux tubes différents. Les culots sont égouttés, l'excès est éliminé en utilisant un papier filtre. A l'un des tubes, nous avons additionné 6 ml d'eau physiologique et dans l'autre 6 ml d'eau salée (20% de NaCl). Ce dernier est utilisé en tant que témoin. La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 600 nm après une heure, trois heures, six heures et vingt-quatre heures (Asker et Ohta, 2002).

Le taux de lyse se traduit par le pourcentage de clarification dont la formule est la suivante :

$$\% \text{ de clarification} = \frac{T - A}{T} \times 100$$

T = Absorbance de témoin (eau salée) + cellules.

A = Absorbance de l'essai (eau physiologique) + cellules.

M) Etude du pigment produit par les souches bactérienne A et D

Les cultures des deux souches halophiles strictes sont réalisées sur milieu SH liquide, et incubées sur une table d'agitation à 120 trs/min à 40°C pendant 7 jours. Les cellules sont ensuite récupérées après centrifugation à 4000 g pendant 20 minutes, puis lavées avec une solution de NaCl à 20% et enfin centrifugées une deuxième fois à 4000 g. Le culot obtenu est mélangé à un système de solvant d'extraction (méthanol/acétone 1/1 V/V). L'extrait est récupéré puis analysé par spectrophotométrie UV / visible (Lillo et Rodriguez-Valkera, 1990 ; Oren et *al.*, 1995).

N) Analyse des lipides membranaires

Les archaebactéries halophiles se distinguent des Eubactéries par la composition en lipides qui servent de marqueurs chimiques pour leur identification et leur distinction des autres groupes taxonomiques (Ross *et al.*, 1981). D'après Kharoub *et al.* (2006), cette analyse doit suivre plusieurs étapes:

✓ Séparation des cellules

Les cultures des souches bactériennes sont réalisées sur des milieux SH standard liquides incubés à 40°C avec une agitation de 120 trs/min. 20 ml de chaque cultures sont centrifugés à 12.000 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les cellules du milieu. Le culot est récupéré, puis suspendu dans 1 ml d'eau distillée, ensuite il est extrait par 3,75 ml d'un mélange du méthanol et chloroforme (2 :1, v/v).

✓ Extraction des lipides polaires

Pour l'extraction des lipides membranaires, on procède à une agitation de mélange (cellules, méthanol, chloroforme) pendant 4 heures. Ensuite on réalise des centrifugations successives avec changement du système d'extraction pour chaque centrifugation selon le protocole de la figure n° 20.

✓ Chromatographie sur couche mince (CCM)

Après évaporation et concentration, le produit est repris dans un petit volume de chloroforme. Les lipides polaires sont séparés par chromatographie en une et deux dimensions sur plaques recouvertes d'une mince couche du gel de silice (20 x 20) cm, avec utilisation de système de solvant chloroforme-méthanol-acétate-eau (85 :22,5 :10 :4, v/v) pour la chromatographie monodimensionnelle.

✓ Révélation des spots

Pour la révélation des glycolipides, on pulvérise les plaques par un mélange d' α -naphthol à 0,5% (p/v) dissous dans 50% (v/v) de méthanol, puis avec 5% (v/v) d' H_2SO_4 dans de l'éthanol. Les plaques ensuite sont chauffées à 150°C pendant 2 min. Par contre, pour les phospholipides, on pulvérise les plaques par le molybdate d'ammonium et l'acide sulfurique (Kates, 1972), ensuite on procède au calcul du R_f des taches.

Calcul de R_f (Retarding factor ou Rapport frontal)

$$R_f = \frac{d_i}{d_s}$$

d_i : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache).

d_s : distance parcourue par le front du solvant.

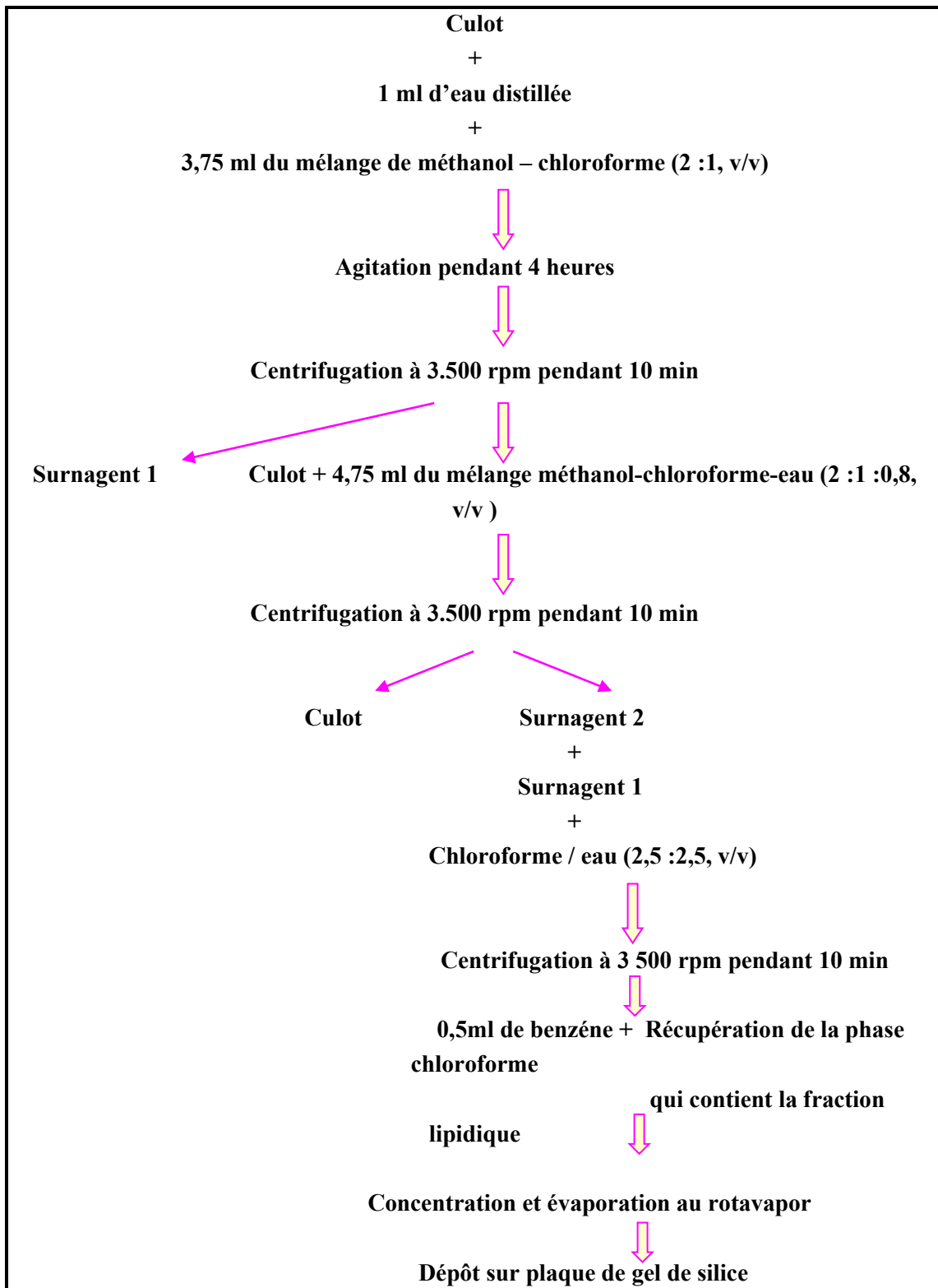


Figure n°20: Protocole d'extraction des lipides membranaires (Kharoub et al.,2006)

III. 2. 2 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des biomolécules produites

III. 2. 2. 1 Cultures

Les cultures sont lancées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml du milieu SH standard liquide, l'inoculation se fait en prélevant une colonie isolée de la souche à étudier à partir de milieu solide. Puis les cultures sont incubées à 40°C pendant 7 à 14 jours sous agitation de 120 trs/min.

III. 2. 2. 2 Culture en présence de gasoil

Des séries d'Erlenmeyer de 500 ml contenant le milieu SH standard modifié à raison de 1/10 du volume de culture et additionnés de différentes concentrations de gasoil (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%), sont inoculés par des colonies jeunes de 8h à 72h et incubés à 40°C. On procède au suivi de la cinétique de croissance par mesure de la DO à 600nm.

III. 2. 2. 3 Test d'émulsification (E₂₄)

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

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture avec 3 ml de gasoil dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min et après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion, et on les compare au témoin, qui est constitué du milieu de culture aseptique et de gasoil, soumis aux mêmes conditions (figure n° 21).

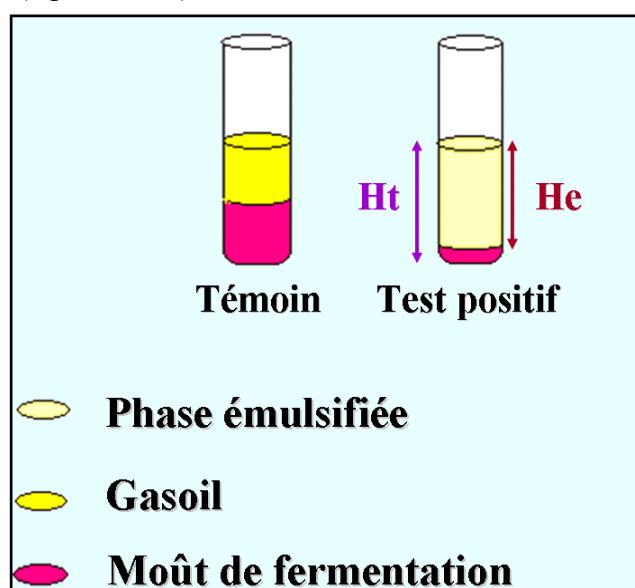


Figure n °21: Test d'émulsification.

Les tubes sont laissés reposer pendant 24h à température ambiante, puis on calcule une deuxième fois le E₂₄ pour vérifier la stabilité de l'émulsion.

Calcul de l'index de l'émulsion E₂₄

C'est le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale de mélange multiplié par 100.

$$E_{24} = \frac{He}{Ht} \times 100$$

He : hauteur de l'émulsion.

Ht : hauteur totale du mélange.

III. 2. 2. 4 Localisation des biosurfactants

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

A partir d'un moût de fermentation de 6 à 7 jours, prélever 10 ml de chaque souche bactérienne (A et D), effectuer une centrifugation à 2000 g pendant 10 min et récupérer 3 ml de surnageant pour chacun. Ces derniers (3ml) sont additionnés par 3 ml d'un hydrocarbure (gasoil par exemple), le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 2 à 3 min, puis on calcule l'index d'émulsification (E₂₄).

S'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.

III. 2. 2. 5 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.

La méthode consiste à prélever un échantillon de culture, dans laquelle on a ajouté 5% de gasoil, chaque jour et pendant 11 jours pour le suivi de la tension superficielle, et cela pour chaque souche bactérienne étudiée. La mesure est effectuée à l'aide d'un tensiomètre (ABU-Ruwaida et *al.*, 1991).

III. 2. 2. 6 Etude de la relation entre la variation de la densité optique, l'index d'émulsification et la tension superficielle

Dans cette étude nous avons réalisé des mesures des différentes variables avec le même moût de fermentation:

- 1/ Mesure de la tension superficielle durant la fermentation.
- 2/ Suivi de l'évolution du test d'émulsification (E_{24}) au cours de la fermentation.
- 3/ Mesure de la densité optique (DO) à 600 nm ainsi que de pH du moût de fermentation et de son évolution.

D'après ces mesures, nous avons tracé des courbes afin d'interpréter les résultats et de constater la relation entre ces paramètres.

III. 2. 2. 7 Détermination de la stabilité de l'émulsion

La stabilisation des émulsions formées sera évaluée sous certaines conditions physico-chimiques.

A) Effet de l'eau distillée

Ce test a été décrit par Akit *et al.* (1981). Il consiste à mélanger dans un tube à essai la suspension bactérienne, 4ml d'eau distillée avec 6ml de kérosène (ou autre liquide immiscible à l'eau ; le gasoil par exemple). Le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 4 à 5 min. Après une heure, la proportion de la phase gasoil émulsifiée est observée.

Un témoin est préparé avec la même quantité de milieu de culture non inoculé. L'index d'émulsification est ensuite calculé.

B) Effet du pH

Ce test a été décrit par Cameron *et al.* (1988). Il consiste à étudier la stabilité des émulsions formées après le test E_{24} , et cela à différents pH allant de 2 à 11.

❖ Protocole

- Le pH des émulsions formées est réajusté chacune à différentes valeurs de pH allant de 2 à 11 à l'aide de HCl concentré ou du NaOH 2N.
- Le mélange de l'émulsion est agité à l'aide d'un vortex pendant 4 à 5mn.
- L'index d'émulsion est recalculé pour chaque échantillon.

C) Effet de l'éthanol

Ce test a été décrit par Cameron *et al.* (1988). L'émulsion est testée à différentes concentrations d'éthanol (0%, 5%, 10%, 25%, 50%), puis agitée au vortex pendant 3mn. L'index d'émulsion est recalculé pour chaque concentration, après 24 h de repos.

D) Effet de la température

Afin d'observer la stabilité des émulsions formées, celles-ci sont soumises à 4 cycles de température (40°C, 25°C, 4°C, -4°C). La stabilité des émulsions est alors observée à l'œil nue après 16 heures d'exposition (Cameron *et al.*, 1988).

III. 2. 2. 8 Extraction du biosurfactant

Les biosurfactants sont extraits en utilisant la technique de Horowitz et Griffen, (1991), selon le protocole suivant :

1. On sépare les cellules du moût de fermentation par une centrifugation à 6300 rpm, à 10°C pendant 15 min.
2. 2 ml du surnageant sont acidifiés à un pH 2 par ajout du HCl concentré.
3. On effectue une deuxième centrifugation à 6300 rpm, pendant 15 à 20 mn.
4. On récupère le précipité formé avec ajout de 1ml d'HCl (pH 2).
5. On récupère les biosurfactants avec un mélange de chloroforme – méthanol (2 :3, v/v).

➤ Chromatographie sur couche mince unidimensionnelle

- La phase organique est concentrée puis analysée par chromatographie sur couche mince en utilisant deux systèmes de solvant, S₁ : chloroforme, méthanol, acide acétique (80 :18 :2v/v) et S₂ : chloroforme, méthanol, acide acétique (97 :2 :1 v/v).
- La chromatographie unidimensionnelle est utilisée sur du gel de silice (Si 60 F₂₅₄, 2mm, Merck).
- Le concentré est dissout dans du chloroforme, ensuite spoté sur une plaque de gel de silice de format (20 x 20cm) et cela par de petites fractions à l'aide d'une seringue, puis séché sous un courant d'air froid.
- On peut observer les spots après une pulvérisation des réactifs de révélation des lipides (vapeurs d'iode), des peptides (Ultraviolet), des glucides (réactif de Moolish).
- On procède ensuite au calcul du R_f.

Résultats et discussions

Chapitre IV : Résultats et Discussions

IV. 1 Résultats de l'étude microbiologique

L'échantillonnage des deux souches A et D, par Ghouali et Kaci-Chaouche, a été effectué à partir des eaux de gisement de quelques champs pétrolier du sud algérien codés P1 et P2.

L'eau de gisement est par définition, l'eau qui accompagne le pétrole brut dans la production pétrolière (Khemili, 2005) (figure n° 22).

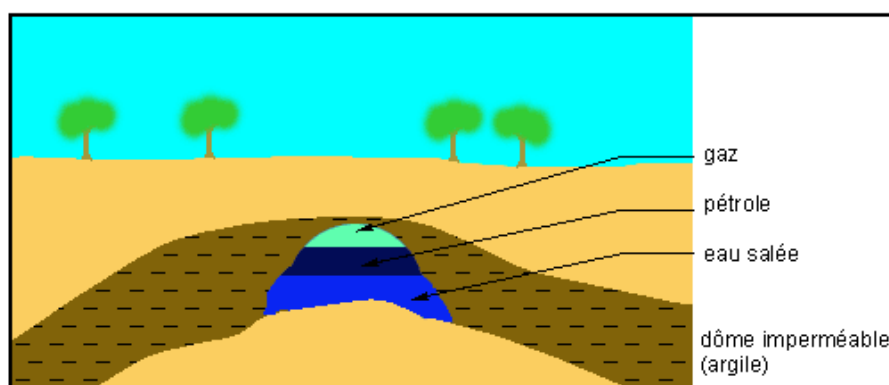


Figure n° 22: Un anticlinal renfermant du gaz, du pétrole et de l'eau (Khemili, 2005).

Cette eau est, généralement, chargée en sel jusqu'à saturation. Le sel prédominant est le chlorure de sodium (NaCl) mais il est toujours accompagné de quantités variables de calcium, potassium, carbonates, et chlorures de baryum (Khemili, 2005). Les résultats de l'analyse physicochimique de ces eaux de gisement P1 et P2 sont résumées dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Résultats de l'analyse physico-chimique des deux eaux de gisement P1 et P2 (Ghoubali et Kaci-Chaouche, 2004)

Eléments (mg/l)	P1	P2
Na+	-	12550
K+	-	320
Ca²⁺	-	1635,3
Mg²⁺	-	554,5
Ba⁺⁺	-	140,9
Sr⁺⁺	-	81,5
Fe⁺⁺	-	0,2
HCO₃⁻	-	0
CO₃⁻	-	0
SO₄⁻⁻	-	0
Cl⁻	91025,6	24524,9
pH	7,2	2,2
Température	40°C	34°C
Salinité g/l	150	40,41

IV. 1. 1 Revivification des souches bactériennes halophiles A et D

Après une incubation pendant 14 jours dans des conditions de croissance (à 40°C sous agitation), nous avons remarqué que la couleur des milieux de culture liquides a changé du jaune claire au rose orangée pour la souche bactérienne « A » et au rose rouge pour la souche bactérienne « D ». Nous pouvons dire, qu'il y a une croissance favorable sur ce milieu par l'apparition du trouble et de la pigmentation rose rouge et rose orange des deux souches bactériennes.

IV. 1. 2 Identification des souches bactériennes A et D

IV. 1. 2. 1 Etude des caractères cultureux

A) Etude macroscopique

Après trois (03) jours d'incubation à 40°C, nous avons constaté la croissance de nos souches bactériennes A et D par l'apparition des colonies roses oranges et roses rouges sur les milieux SH standards solides (figure n°23).



Souche A

Souche D

Figure n°23: Aspect macroscopique des souches bactériennes A et D sur milieu SH solide après 14 jours d'incubation à 40°C.

L'observation des colonies nous a permis de déduire les caractères macroscopiques résumés dans le tableau n°XIV.

Tableau XIV: Résultats des caractères macroscopiques des souches bactériennes A et D

Tests réalisés		Souche A	Souche D
Caractères macroscopiques	Forme de colonies	Circulaire	Circulaire
	Taille des colonies	Punctiforme (<1mm)	Punctiforme (<1mm)
	Opacité	Opaque	Opaque
	Chromogénèse	Rose orange	Rose rouge
	Elevation	Colonies plates	Colonies plates
	Aspect de la surface	Lisse	Lisse
	Aspect de contour	Irrégulier	Irrégulier
	Consistance	Visqueuse	Visqueuse
	Odeur	Absente	Absente
Caractères microscopiques	Mobilité à l'état frais	Mobile	Mobile
	Forme des cellules	Cocci régulier	Cocci régulier
	Gram	Négatif	Négatif
	Arrangement	isolées	isolées
	Lyse cellulaire dans l'eau physiologique	Positive	Positive

La coloration rose des colonies est une coloration caractéristique des bactéries halophiles, elle est due au pigment bactériorhodopsine qui est un composé caroténoïde, caractérisant les membres de la famille des *Halobacteriaceae* (Leclerc, 1995 ; Larpent, 2000). Arhal et *al.* (1996) ont pu isolé 22 souches bactériennes à partir de la mer morte présentant cette pigmentation rose au rouge. Leur caractérisation moléculaire par l'ARN 16S les a affiliées aux genres *Haloferax*, *Halobacterium* et *Haloarcula* au sein de la famille des *Halobacteriaceae*. Cela nous conduit à penser que ces deux souches bactériennes (A et D) pourraient appartenir à cette famille.

B) Etude microscopique

✓ Observation à l'état frais

L'observation à l'état frais des souches bactériennes A et D, effectuée dans des conditions de salinité (15% de NaCl), au microscope photonique au grossissement 10x40 (tableau XIII), nous a montré que les souches bactériennes A et D sont mobiles.

✓ Coloration de Gram modifiée

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

La forme des cellules pour les souches bactériennes A et D est de type cocci régulier avec un arrangement isolé (figure n° 24).

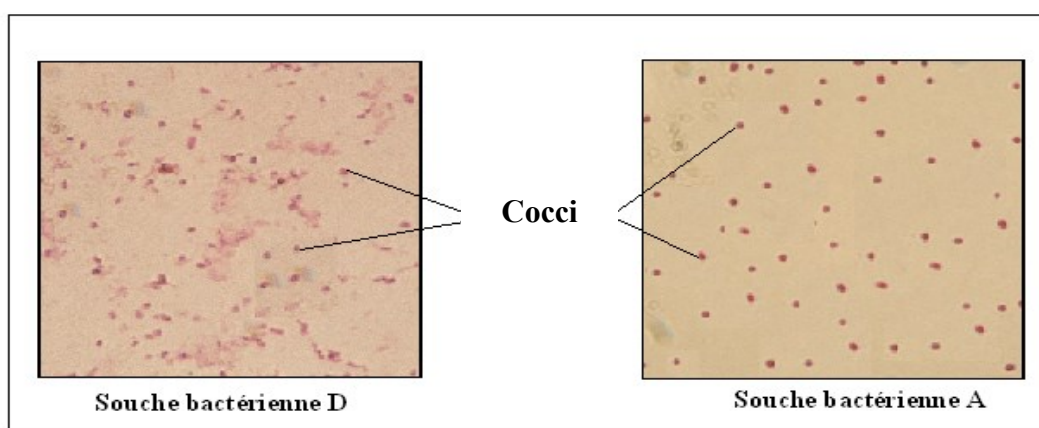


Figure n° 24 : Aspect microscopique des bactéries A et D observées à l'immersion après coloration de Gram modifiée.

D'après les résultats microscopiques obtenus, nous pouvons dire que les souches bactériennes A et D sont Gram négatives (colorées en rose après coloration de Gram modifiée), mobiles, de forme cocci et de regroupement isolé.

Par ailleurs, tous les membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont des bactéries Gram négative mais leurs formes, regroupements et mobilité changent suivant les espèces. *Halococcus salifodinae* a été identifiée à partir des roches salées en Australie par Stan-Lotter et al. (1999). C'est une archaebactérie halophile extrême pigmentée en rose sur milieu de culture solide, de forme cocci, Gram négatif et immobile. Une autre *Archae* halophile extrême, *Halorubrum ezzemoulense*, a été isolée à partir d'une sabkha en nord-est d'Algérie par Kharoub et al. (2006) et présente une pigmentation rose rouge des colonies, une forme pléomorphique (bacilles irréguliers, cocci et triangles), mobile et un Gram négatif.

D'autre part, *Haloarcula quadrata* isolée à partir des sols salés en Egypte par Oren et al. (1999) est une *Archae* halophile Gram négatif, de forme carrée ou pléomorphes, colonies pigmentées en rouge rose, mobile grâce à un ou plusieurs flagelles. Ces mêmes auteurs ont, également, pu isolé une autre *Archae* halophile extrême, *Haloferax alexandrinus*, à partir des étangs de distillation solaire en Egypte. Cette souche halophile présente des colonies rougeâtres, un Gram négatif, immobile et pléomorphique.

Par ailleurs, *Halomicrobium mukohataei* isolée à partir des sols salés en Argentine (Oren et al., 2002) présente une pigmentation rouge orange des colonies, Gram négatif, mobile grâce à des flagelles, et pléomorphique. *Halobaculum gomorense* est une *Archae* halophile extrême isolée à partir de la mer morte par Oren et al. (1995), pigmentée en rouge-orange, Gram négatif, de forme bacillaire et mobile.

En outre, Heysayen et al. (2002) ont pu isolé une *Archae* halophile extrême *Halobiforma haloterrestis* à partir des sols hyper salins en Egypte. Cette souche halophile est mobile, Gram négatif, présentant des colonies rouge et une forme pléomorphe: forme coccoïdale dans un milieu solide et une forme bacillaire dans un milieu liquide.

IV. 1. 2. 2 Etude biochimique et physiologique

Les résultats des tests biochimiques effectués pour les deux souches bactériennes A et D sont représentés dans le tableau n°XV.

Tableau XV: Résultats des caractères biochimiques des souches bactériennes halophiles A et D

Tests effectués		Souche A	Souche D
Type respiratoire		+	+
Catalase		+	+
Oxydase		+	+
ONPG		+	+
Nitrate réductase		+	+
Citrate synthase		+	+
Uréase		-	-
Production d'H ₂ S		-	-
Production de gaz		+++	+
Indol		+	+
RM		+	+
VP		-	-
TDA		-	-
Catabolisme des acides amines	Témoin	+	+
	LDC	-	+
	ODC	-	-
	ADH	+	-

(+) : positif

(+++): production importante

(-) : négatif

A) Résultats de la recherche des enzymes respiratoires et métaboliques

➤ Type respiratoire

D'après le résultat obtenu, les souches bactériennes tests A et D sont aérobie-anaérobie facultatif, puisque nous avons remarqué une croissance tout au long de la piqure centrale qui s'est propagée tout le long du tube.

Par ailleurs, nous avons constaté que les deux souches bactériennes A et D possèdent l'enzyme respiratoire catalase, oxydase et la nitrate réductase responsable de la réduction des nitrates en nitrites et les nitrites en azote gazeux ; donc, elles peuvent croître en anaérobiose sur un milieu contenant les nitrates comme source d'énergie.

➤ **Test de l'ONPG**

Le résultat obtenu nous a permis de dire que les bactéries A et D ont l'enzyme β -galactosidase, responsables de la dégradation du lactose. Donc, les deux souches bactériennes peuvent croître sur un milieu contenant du lactose.

➤ **Dégradation des acides aminés**

D'après les résultats, la souche A possède seulement une arginine dihydrolase positive par contre la souche D possède une lysine décarboxylase uniquement. Donc, les deux souches bactériennes A et D peuvent croître sur des milieux contenant des acides aminés comme sources de carbone et d'azote.

➤ **Etude des différentes voies fermentatives intermédiaires**

Le résultat des expériences montre que les deux souches A et D ont un RM^+ et VP^- : cela indique, que les deux bactéries réalisent une fermentation d'acides mixtes qui provoque l'acidification du milieu et l'abaissement du pH à des valeurs inférieures à 5 et non pas la fermentation butylène glycolique.

➤ **Recherche de l'uréase et production d'indole**

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que les bactéries A et D ne sont pas capable de dégrader l'urée, car elles ne présentent pas cette enzyme « uréase ». Par contre, l'indole est positif, ce qui signifie qu'il y a une production d'indole à partir de tryptophane par l'enzyme tryptophanase.

➤ **Citrate perméase**

La croissance des bactéries A et D sur le milieu citrate de Simmons indique que ces bactéries utilisent l'acide citrique comme source de carbone, grâce à l'enzyme citrate perméase.

B) Production d' H_2S et de gaz

Les résultats obtenus montrent que les souches A et D ne produisent pas d' H_2S , mais elles sont productrices de gaz.

C) La mobilité

Après l'incubation du milieu mannitol mobilité inoculé avec nos souches bactériennes A et D, nous avons remarqué une croissance tout au long des tubes, cela indique que nos souches bactériennes sont mobiles. Selon Leclerc et *al.* (1984), les halophiles possèdent un système de mobilité constitué d'un ou plusieurs flagelles. Donc, la mobilité des souches bactériennes halophiles A et D est assurée par un ou plusieurs flagelles.

Par ailleurs, les mêmes résultats sont souvent trouvés chez la majorité des membres de la famille des *Halobacteriaceae*. *Halococcus salifodinae* (Stan-Lotter et al., 1999), *Halobaculum gomorrense* (Oren et al., 1995), *Halobiforma haloterrestriis* (Heyzayen et al., 2002) et *Halorubrum ezzemoulense* (Kharoub et al., 2006) sont des bactéries aérobies qui possèdent une nitrate réductase, catalase et oxydase positive, β -galactosidase négative et ne produisent pas d'indole à partir du tryptophane. *Haloarcula quadrata* (Oren et al., 1999) et *Halomicrobium mukohataei* (Oren et al., 2002) présentent une nitrate réductase positive jusqu'au stade gazeux, catalase et oxydase positive, et produisent l'indole à partir du tryptophane. D'autre part, *Haloferax alexandrinus* (Asker et Ohta, 2002) présente une β -galactosidase, catalase et oxydase positive mais uréase, lysine décarboxylase et ornithine décarboxylase négative.

D) Utilisation des différents sucres, alcools et acides organiques

▪ Mise en évidence de la dégradation des sucres

Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme des courbes de croissance pour chacune des souches bactériennes A et D (figure 25).

Les valeurs de densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans le tableau XVI (annexe n° V).

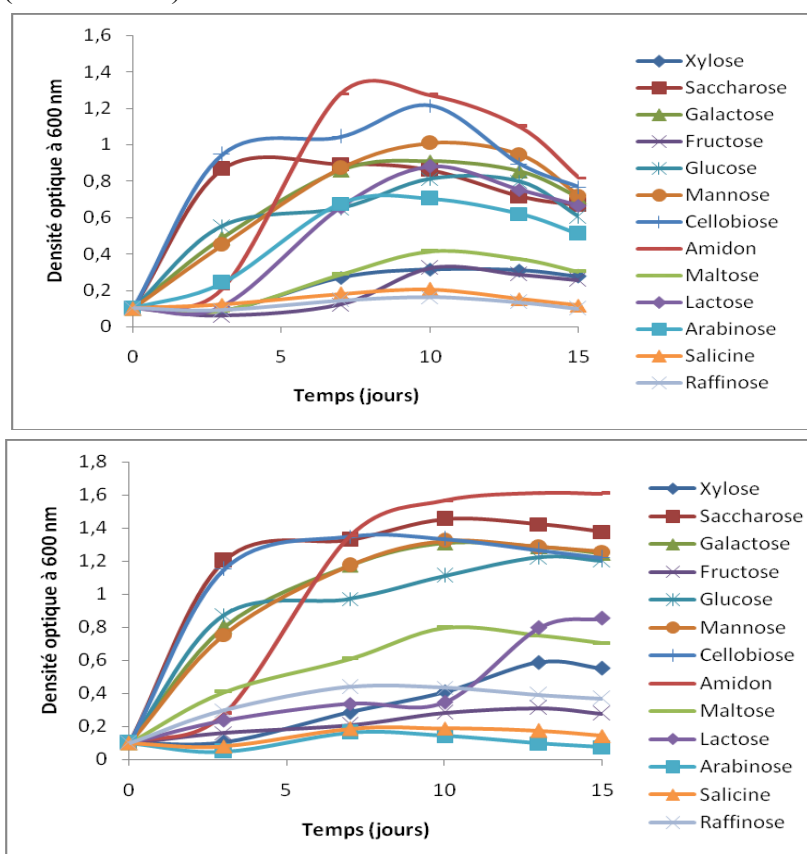


Figure n° 25: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur différents sucres, sur milieu SH modifié liquide, incubées à 40°C pendant 15 jours.

La cinétique de croissance des souches bactériennes A et D a été suivie durant 15 jours.

Selon les courbes obtenues, nous remarquons que les bactéries A et D dégradent un nombre important de sucres que ce soit monosaccharide (glucose, mannose, arabinose, galactose, xylose, fructose), disaccharides (saccharose, lactose, cellobiose, maltose) ou polysaccharide (raffinose, salicine, amidon).

La comparaison des différentes cinétiques de croissance nous a permis de dire que l'amidon est le sucre le plus consommable par les deux souches bactériennes A et D. La présence d'une phase de latence est expliquée par sa nature puisqu'il s'agit d'un polysaccharide.

Après l'amidon, les sucres les mieux consommés, dans l'ordre décroissant, présentant une courbe de croissance sans une phase de latence pour la souche A sont le cellobiose, le mannose, le xylose, le galactose, l'arabinose puis le lactose, alors que pour la souche D on trouve le saccharose en premier lieu, le cellobiose, le mannose, le galactose, puis le glucose. Le maltose et le lactose sont moyennement consommés par la souche D.

Le reste des sucres (maltose, fructose, salicine et raffinose pour la souche A et xylose, raffinose, fructose, salicine et arabinose pour la souche D) sont légèrement dégradés présentant une faible croissance bactérienne.

La mesure du pH au cours des fermentations en présence des différents sucres nous a permis de tracer les courbes représentées dans la figure n° 26. Les valeurs du pH sont données dans le tableau XVII (annexe V).

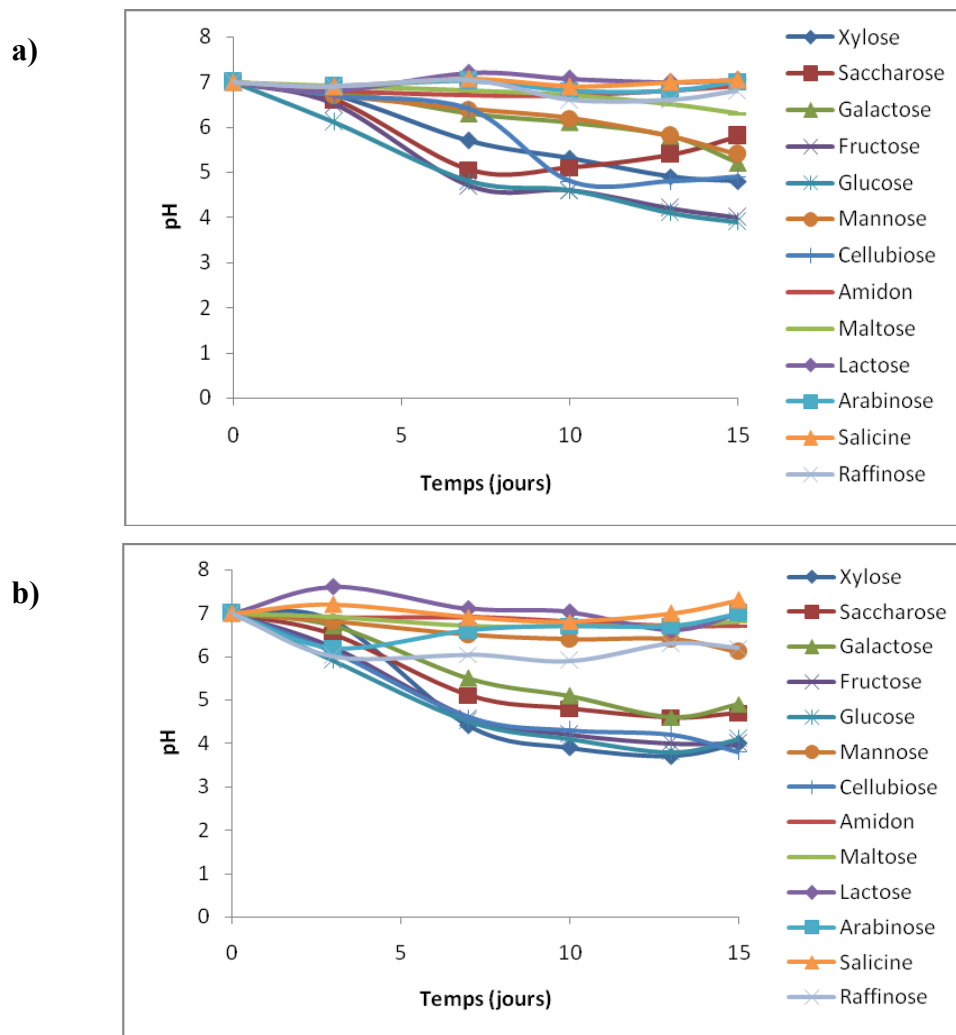


Figure n° 26: Evolution de pH du milieu SH modifié liquide additionné des différents sucres inoculé par les souches bactériennes A (a) et D (b) à 40°C pendant 15 jours d’incubation.

Le suivi de la production des acides organiques traduite par l’abaissement du pH au cours de la croissance des souches bactériennes A et D sur différents sucres nous a permis de constater qu’il y a une production d’acides en présence du glucose, fructose, saccharose, xylose, galactose et mannose (dans l’ordre décroissant) pour la souche bactérienne A et en présence du glucose, fructose, cellobiose, xylose, saccharose, galactose et en fin le raffinose pour la souche bactérienne D. Cette production se manifeste au cours de la phase stationnaire, ce qui signifie que ces bactéries sont productrices des produits secondaires (dans ce cas, ce sont des acides organiques).

En présence de l'amidon, cellobiose, maltose, lactose, arabinose, salicine et raffinose pour la souche bactérienne A et de l'amidon, mannose, maltose, lactose, arabinose, et salicine pour la souche bactérienne D, on n'assiste pas à un abaissement de pH. Cela se traduit par le fait que ces deux souches bactériennes utilisent ces sucres pour la croissance de la biomasse (augmentation de la concentration cellulaire) et non pas pour la production des acides organiques.

La dégradation des différents sucres a été étudiée afin d'identifier et de caractériser les souches *Archae* halophiles au sein de la famille des *Halobacteriaceae*. Par exemple, *Halomicrobium mukohaei* (Oren et al., 2002) produit des acides organique en utilisant le glucose, le galactose, le mannose, le ribose, le sucrose et le maltose. *Haloferax alexandrinus* (Asker et Ohta, 2002) produit des acides organiques à partir du fructose, glucose, rhamnose, maltose, L-arabinse, D-xylose, ribose, sucrose. Par contre le lactose, galactose, mannose, et l'amidon ne sont pas dégradés par cette souche halophile. En outre, La croissance d'*Haloarcula quadrata* (Oren et al., 1999) est stimulé par le galactose et en présence du glucose, galactose, sucrose, xylose ou ribose, cette souche *Archae* halophile produit des acides organiques.

▪ **Mise en évidence de la dégradation des alcools**

Les résultats sont représentés en courbes de croissance bactérienne pour chaque souche bactérienne A et D (figure n° 27). Les valeurs de la densité optique mesurée à 600 nm (DO) sont données dans le tableau XVIII (annexe V).

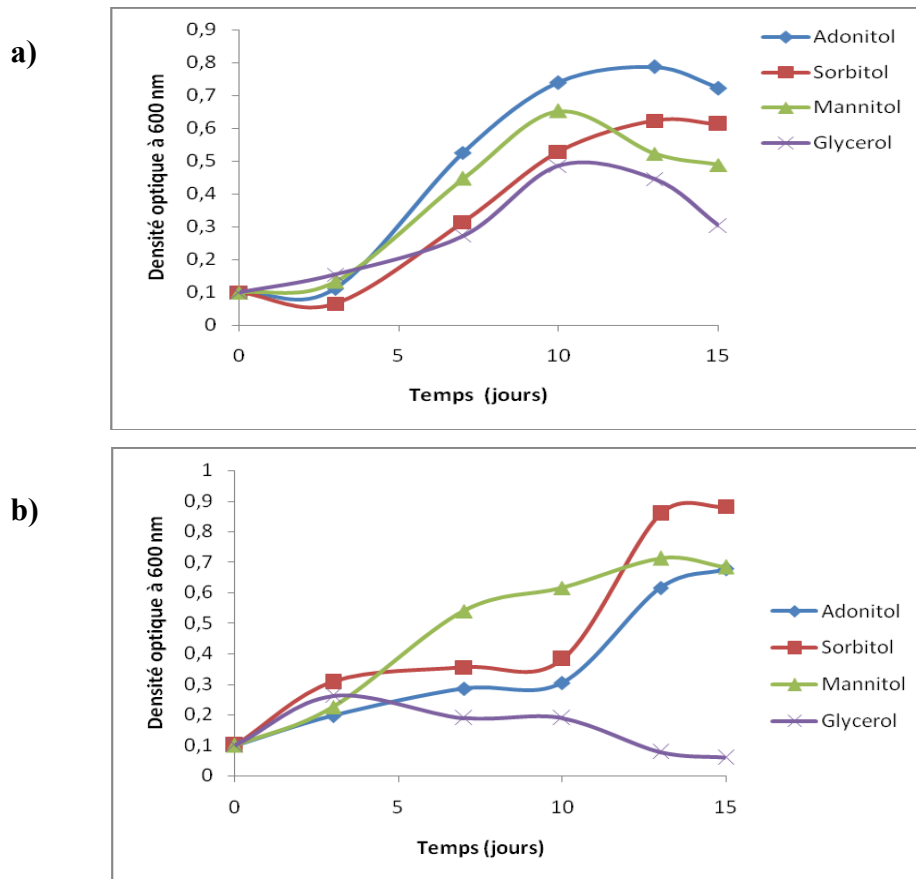


Figure n° 27: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH modifié liquide additionné de différents alcools à 40°C pendant 15 jours d'incubation.

D'après ces courbes, nous avons remarqué que l'alcool le mieux consommé par la souche bactérienne A est l'adonitol, alors que pour la souche bactérienne D c'est le mannitol. Le glycérol est l'alcool le moins dégradé par ces deux souches bactériennes. Cependant, la phase de latence est plus longue dans le cas des alcools par rapport à celle des sucres parce que l'utilisation des alcools exige des enzymes particulières.

Le suivi de la variation du pH au cours de la consommation des alcools nous a donné les résultats illustrés dans la figure n° 28. Les valeurs du pH sont données dans le tableau XIX (annexe V).

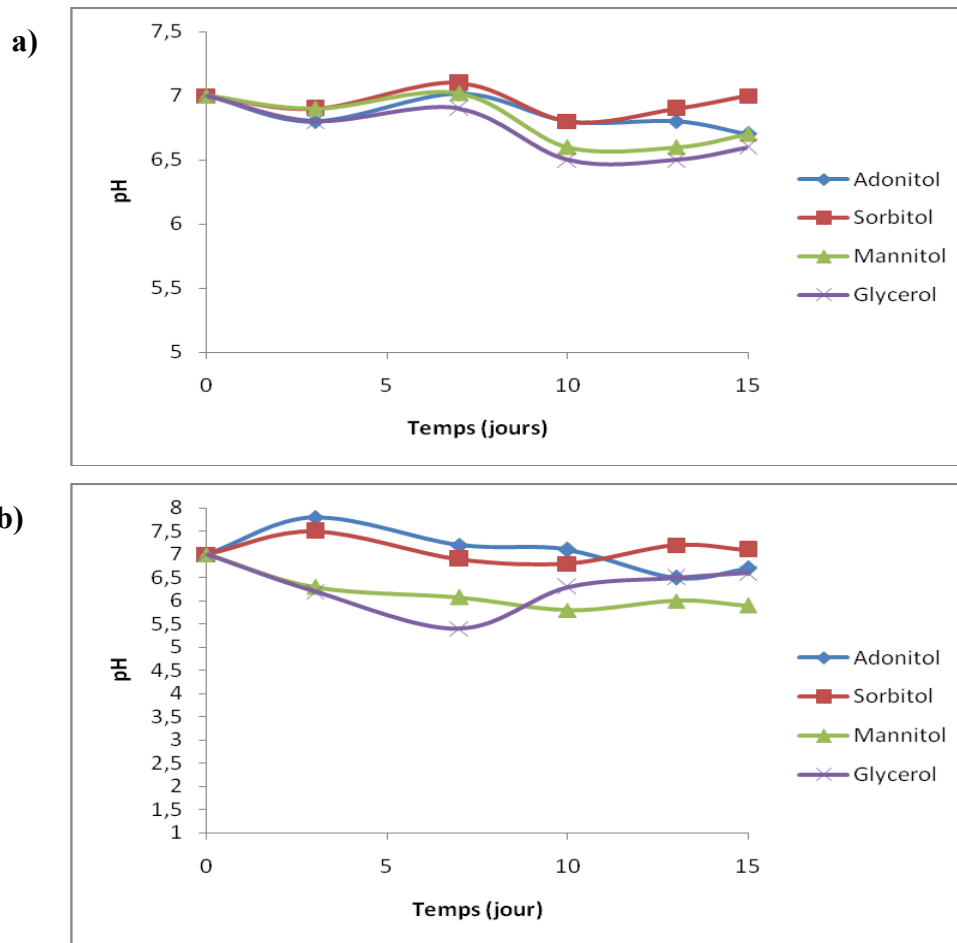


Figure n° 28: Evolution de pH du milieu SH modifié liquide additionné des différents alcools inoculé par les souches bactériennes A (a) et D (b) à 40°C pendant 15 jours d'incubation.

D'après les courbes, et suite à un abaissement très faible du pH dans le cas de la souche bactérienne A, on peut dire que cette dernière ne produit pas des quantités importantes d'acides organiques en présence d'adonitol, sorbitol, glycérol et mannitol. Cependant, dans le cas de la souche bactérienne D, soit on assiste à une légère alcalinisation du milieu (pH \approx 8) en présence de l'adonitol et le sorbitol, ou bien à une légère acidification du milieu (pH \approx 5) en présence du glycérol et du mannitol.

Plusieurs archaeobactéries halophiles dégradent un certain nombre d'alcool avec ou sans production d'acides organiques. *Halobiforma haloterrestris* dégrade le glycérol sans production d'acides organiques (Heyzayen et al., 2002) alors que *Halobaculum gomorense* produit des acides organiques à partir de ce dernier (Oren et al., 1995). En outre, la croissance de *Haloarcula quadrata* est stimulé par le glycérol,

le sorbitol et le mannitol mais sans production d'acides organiques (Oren et *al.*, 1999).

▪ **Mise en évidence de la dégradation des acides organiques**

Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme de courbes de croissance bactérienne dans la figure n° 29. Les valeurs de densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans le tableau XX (annexe V).

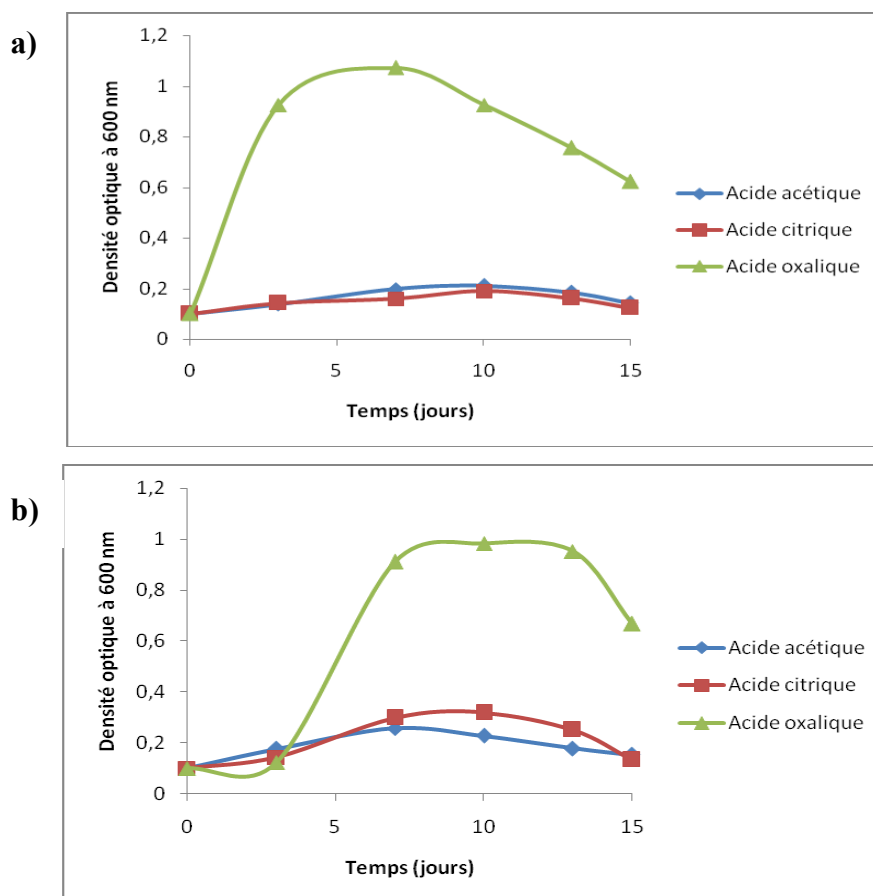


Figure n° 29: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH modifié additionné de différents acides organiques à 40°C pendant 15 jours d'incubation.

Nous avons constaté d'après l'allure des courbes de croissance que les bactéries halophiles étudiées (A et D) consomment faiblement l'acide citrique et l'acide acétique mais dans le cas de l'acide oxalique elles ont montré un maximum de croissance.

En plus du citrate, acétate et oxalate, les halophiles strictes peuvent utiliser d'autres acides organiques comme source de carbone pour leur croissance.

Halobiforma haloterrestis peut dégrader le pyruvate et le l'acide n-butyrique (Heyzayen et al., 2002) et la croissance de *Halorubrum ezzemoulense* peut être stimulée par la présence du malonate, fumarate, et du formate (Kharoub et al., 2006).

E) L'optimum de la température et du pH

L'influence de la température sur la croissance des bactéries testées A et D est étudiée afin de déterminer l'optimum de la température à savoir 4°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C et 50°C. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes illustrés dans la figure n° 30. Les valeurs de la densité optique mesurées à 600 nm sont données dans le tableau XXI (annexe V).

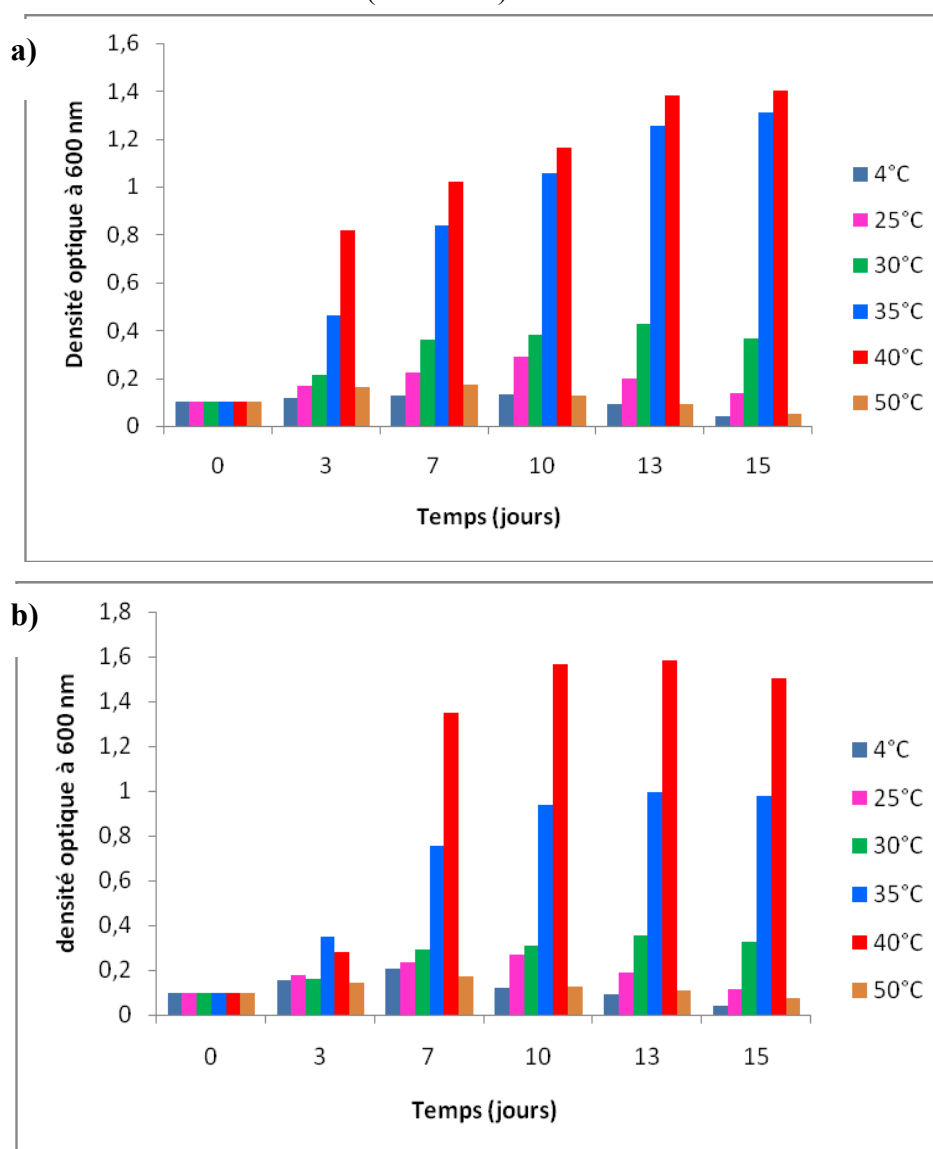


Figure n° 30: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH standard à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.

D'après les histogrammes ci-dessus, on peut constater que la souche bactérienne A possède une faible croissance à 4°C, 25°C, 30°C et 50°C. Par contre, à 35°C et 40°C nous remarquons une croissance cellulaire importante, présentant un optimum à 40°C.

La souche bactérienne D présente une bonne croissance 30°C et 50°C mais un optimum de croissance à 40°C.

L'influence de la variation du pH sur la cinétique de croissance des souches bactériennes A et D est représentée dans la figure n° 31. Les valeurs de la densité optique mesurée sont données dans le tableau XXII (annexe V).

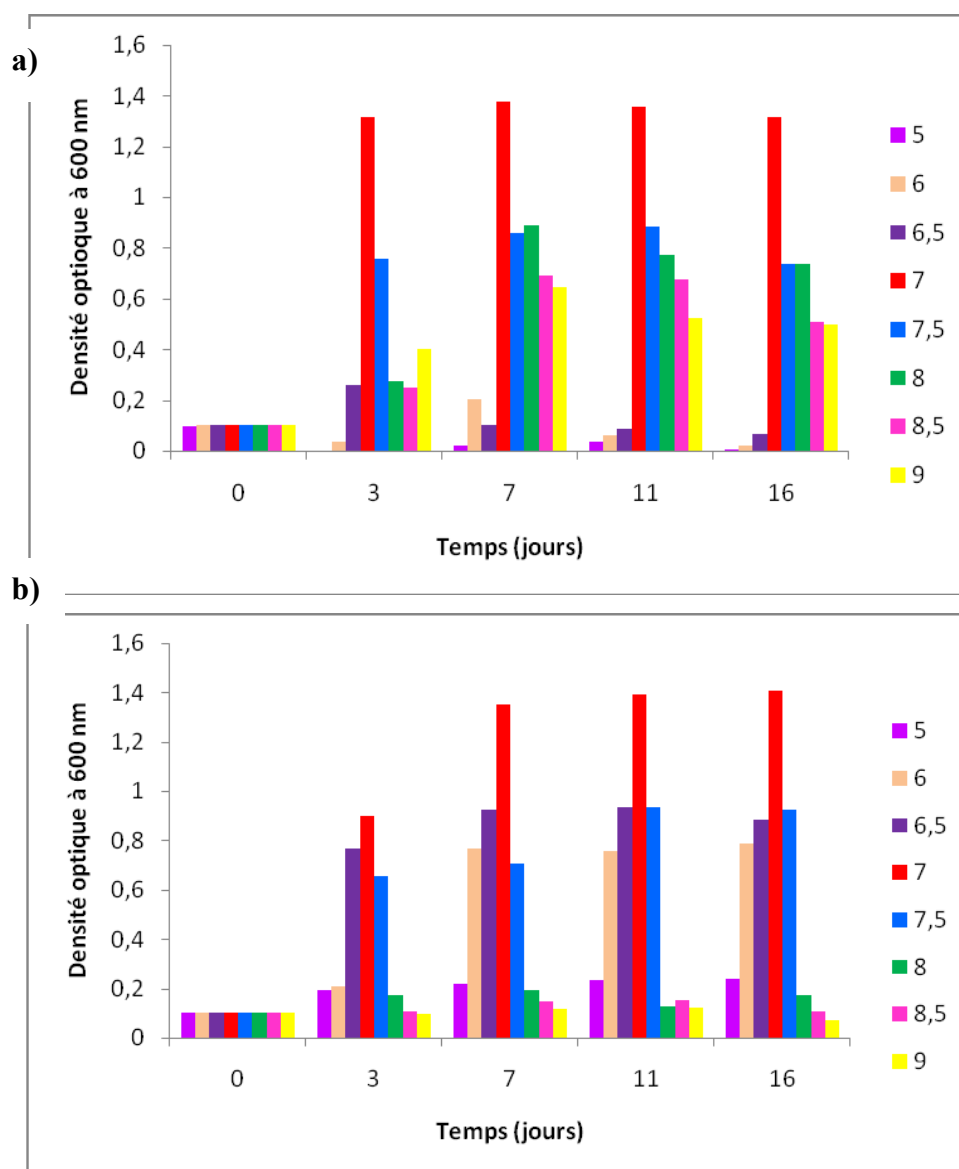


Figure n° 31: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH standard à différentes valeurs de pH pendant 16 jours d'incubation.

La cinétique de croissance des deux souches bactériennes A et D a été suivie durant 16 jours et, d'après les résultats obtenus, nous avons remarqué une différence entre les deux souches bactériennes.

L'optimum de croissance est observé dans l'intervalle du pH variant entre 7 et 9 pour la souche bactérienne A avec un optimum de croissance à pH 7. Cependant, la souche bactérienne D présente un intervalle de pH compris entre 6 et 7.5, avec un optimum de croissance à pH 7.

Selon Kiss Pappo et Oren (2000), les membres de la famille des *Halobacteriaceae* présente une température optimale de croissance entre 40 et 45°C, et ils sont subdivisés en deux classes :

- Les Haloneutrophiles : ont un pH de croissance allant de 5 à 8, regroupant les genres: *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Halogeometricum*, *Natronorubrum*.
- Les Haloalcalophiles : ont un pH de croissance basique entre 8.5 et 11.5, regroupant, les genres : *Natronococcus*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Halobacterium*, *Natromonas*.

A partir de cette classification, on peut dire que les deux souches A et D appartiennent respectivement aux classes *Haloalcalophiles* et *Haloneutrophiles*.

F) Optimum de NaCl (la salinité)

Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme d'histogrammes de la croissance bactérienne dans la figure n° 32. Les valeurs de densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans le tableau XXIII (annexe n° V).

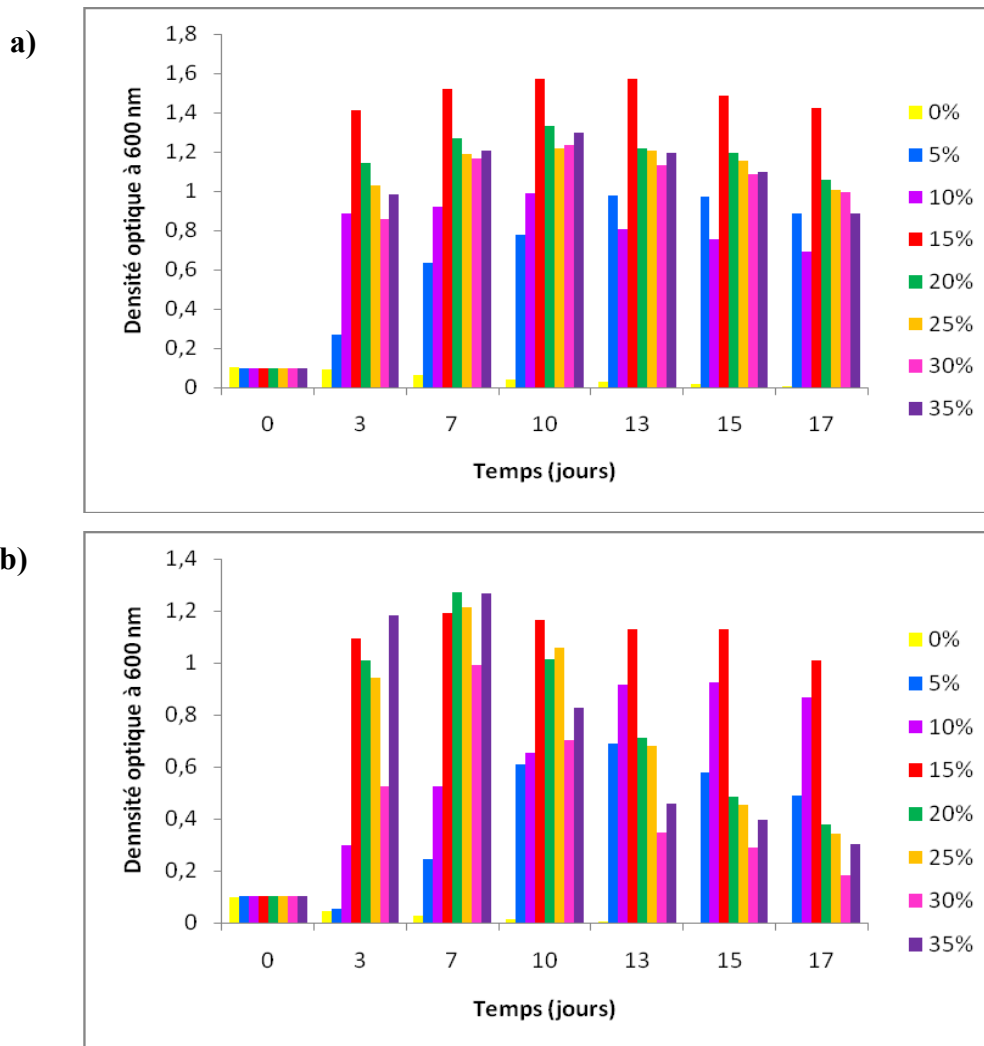


Figure n° 32 : Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH standard additionné de différentes concentrations de NaCl à 40°C pendant 17 jours d'incubation.

D'après les résultats obtenus dans cette étude, nous avons remarqué que les souches bactériennes A et D ne montrent aucune croissance à 0% de NaCl mais une légère croissance à 5% de NaCl.

Selon Leclerc (1989), les halophiles extrêmes ont besoin de concentrations élevées de sel pour survivre: cela signifie que les souches bactériennes A et D sont des halophiles strictes qui exigent des concentrations supérieures à 5% pour leur croissance.

Nous avons remarqué également que les deux souches bactériennes marquent un optimum de croissance à une concentration de 15% du NaCl. A des concentrations de 30% et 35% du NaCl dans le milieu, nous avons observé une bonne croissance, ce qui nous amène à dire que les souches bactériennes A et D peuvent tolérer une

concentration de salinité atteignant la saturation. Ce résultat montre que ces souches bactériennes sont des halophiles extrêmes qui peuvent bien appartenir à la famille des *Halobacteriaceae* (Grant et al., 2001). Par exemple *Halococcus salifodinae* (Stan-Lotter et al., 1999) et *Halomicrobium mukohataei* (Oren et al., 2002), *Haloarcula quadrata* (Oren et al. (1999), *Halorubrum ezzemoulense* (Kharoub et al., 2006) *Halovivax asiaticus* (Castillo et al., 2006) et *Halovivax ruber* (Castillo et al., 2007) exigent une concentration de 15% à 25% de NaCl pour leur croissance.

I) Optimum de Mg⁺⁺

Les résultats obtenus dans cette étude sont représentés sous forme d'histogrammes de la croissance bactérienne dans la figure n° 33. Les valeurs de densité optique (DO) mesurées à 600 nm sont données dans le tableau XXIV (annexe n° V).

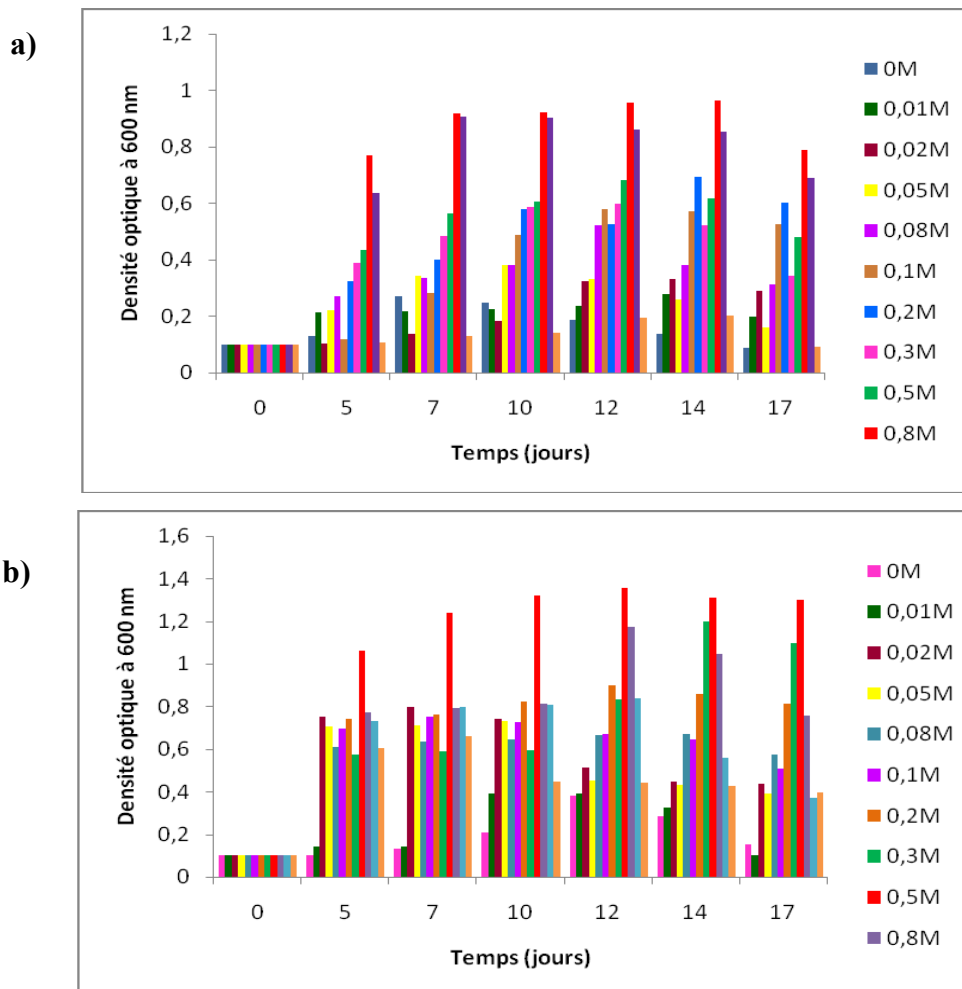


Figure n° 33: Cinétique de croissance des souches bactériennes A (a) et D (b) sur milieu SH standard additionné de différentes concentrations du Mg⁺⁺ à 40°C pendant 17 jours d'incubation.

D'après les résultats obtenus par le suivi de la cinétique de croissance avec des différentes concentrations des ions Mg^{++} , nous avons constaté que les deux souches bactériennes A et D marquent une très faible croissance à 0M des ions Mg^{++} , ce qui signifie qu'elles exigent la présence de ces ions pour leur croissance.

A des faibles concentrations (0,01 jusqu'à 0.08), la souche bactérienne A marque une faible croissance, donc elle exige des concentrations plus élevées puisque son optimum de croissance est marqué à 0.8M de Mg^{++} . Par contre, la souche bactérienne D, présente une croissance importante à des concentrations des ions Mg^{++} avec un optimum à 0.5M.

Cette exigence a été montrée par Oren et *al.*, (1995) qui ont déterminé que la croissance de *Halobacterium sodomense* exige des concentrations élevées en ions Mg^{++} . Kawakami et *al.* (2007) ont démontré que des concentrations inférieures à 0,02M en Mg^{++} permettent l'agrégation des cellules d'*Halobacterium salinarum*. D'après Panagiotis et *al.* (2007), les membranes d'*Halobacterium salinarum* sont dépourvues de paroi mais enveloppées par une pellicule extramembranaire formée uniquement de glycoprotéines reliées par des ions Mg^{2+} qui permet le maintien de la forme bacillaire des cellules.

D'autres part, l'*Archae* halophile *Halobaculum gomorense* exige une concentration entre 0,6 à 1,0M de $MgCl_2$ en présence de 2,1M de NaCl (Oren et *al.*, 1995) alors que *Haloarcula quadrata* perd sa forme carrée ou pléomorphe à des concentrations inférieures à 0,04M en ions Mg^{++} , en présence de 0,1M de $MgCl_2$, sa forme native est maintenue (Oren et *al.*, 1999).

J) Criblage de souches productrices d'enzymes

Après la révélation de l'amylase par la solution d'iode à 10% (figure n° 34), gélatinase et estérase par réactif de Frazier, on a constaté que les deux souches bactériennes A et D possèdent ces enzymes. Ces résultats confirment que nos bactéries arrivent à utiliser l'amidon, la gélatine et le tween 80.

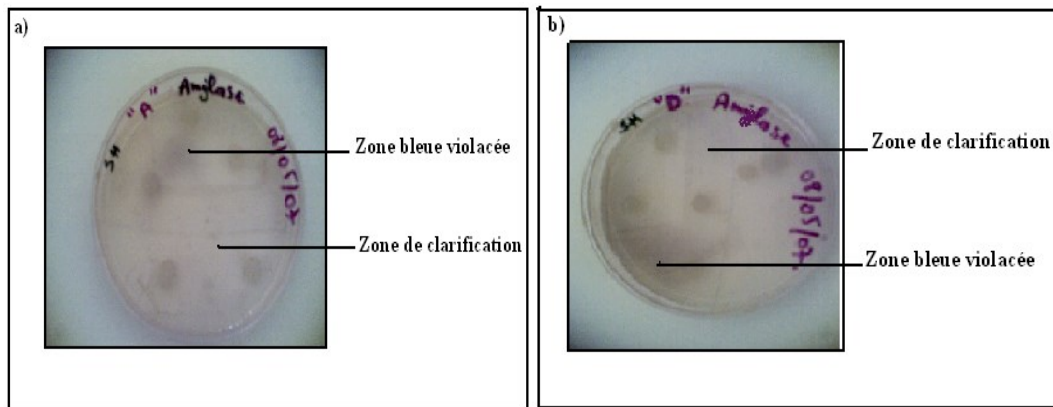


Figure n° 34 (a et b) : Résultats de la révélation de l'amylase pour les souches bactériennes A et D cultivé à 40°C pendant 15 jours.

D'après le *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology* (1989) et Grant et *al.*(2001) la dégradation de l'amidon et de la gélatine sont des caractéristiques majeures de la famille des *Halobacteriaceae*. Par exemple *Halomicrobium mukohataei* peut hydrolyser l'amidon mais la gélatine, la caséine et le tween 80 ne sont pas hydrolysés (Oren et *al.*, 2002), *Halobiforma haloterrestriis* hydrolyse la caséine, la gélatine, tween 20, 40 et 80 mais elle n'hydrolyse pas l'amidon (Heyzayen et *al.*, 2002). En outre, *Halorubrum ezzemoulense* n'hydrolyse pas l'amidon, l'aesculine, la gélatine et le tween 80 (kharoub et *al.*, 2006).

K) Coagulation du lait

Après la réalisation du test de coagulase, nous avons constaté que nos souches bactériennes ne peuvent pas coaguler le lait, cela signifie que les bactéries test ne possèdent pas la coagulase, responsable de la coagulation du lait.

L) Sensibilité aux antibiotiques

Les résultats d'antibiogramme sont représentés dans le tableau n° XXV.

D'après ces résultats, les souches bactériennes A et D sont résistantes presque à la majorité des antibiotiques testés, sauf au furane (figure n° 35).

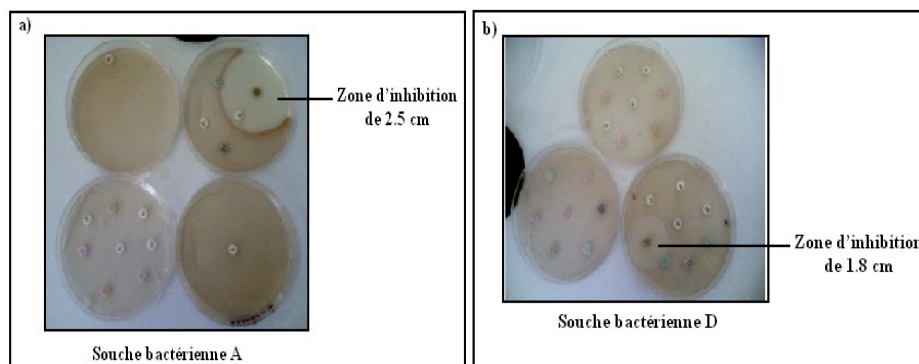


Figure n° 35 (a et b) : Résultats d'antibiogramme des souches bactériennes A et D.

Tableau XXV: Résultats des antibiogrammes des souches bactériennes A et D

Classe	Nom de spécialités	Charge du disque	Sensibilité De la souche A	Sensibilité de la souche D
Les quinolones	Acide nalidixique (NA) Ofloxacine (OFX)	30µg 5µg	R R	R R
β- lactamine	Pénicilline G (P)	6µg	R	R
	Ampicilline Et dérivés (AM)	10µg	R	R
	Amoxicilline + Acide clavulamique (AMC)	20µg + 10µg	R	R
Les macrolides	Erythromycine E	15µg	R	R
	Spiromycine (SP), Jovamycine, Midécamycine	100µg	R	R
	Lincomycine (L)	15µg	R	R
	Pristinamycine (PT)	15µg	R	R
Sulfamides et associations	Triméthoprime	1.25µg + 23.75µg	R	R
Nitrofuranes	Furanes (FT)	300µg	S	S
Aminosides et Aminocyclitol	Gentamicine (GM)	10µg (15µg)	R	R
Phénicoles	Chloramphénicol (C), Thiamphénicol	30µg	R	R
Tétracyclines	Tétracycline (TE)	30UI	R	R
	Doxycycline (DO)	30UI	R	R
Beta-lactamine	Oxacilline (Ox1)	1µg	R	R
Cephalosporines	Cefotaxime (CTX)	30µg	R	R
	Cefalexine (CN)	30µg	R	R
	Céfixime (CFM)	10µg	R	R
Divers	Rifampicine (RA)	30µg	R	R
	Nitroxoline (NI)	20µg	R	R
	Fosfomycine (FOS)	50µg	R	R

La sensibilité des *Archaea* aux antibiotiques est différente de celle des autres bactéries, en raison de l'absence de la muréine chez celle-ci (Perry et al. 2004). D'après le tableau n° XXIV, les souches bactériennes A et D ne sont pas sensibles à la pénicilline G, ampicilline et divers, amoxicilline, acide alavulamique, oxacilline, cefotaxime, cefalexine, céfixime et fosfomycine qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire.

De même, l'ARN polymérase ADN dépendante des *Archaea* est insensible à la rifampicine qui inhibe l'enzyme bactérienne à de très faibles concentrations (Tortora et al., 2003). La même résistance est observée chez les souches bactériennes A et D à cet antibiotique à une concentration de 30 µg.

D'autre part, les souches bactériennes A et D sont résistantes aux antibiotiques qui inhibent la synthèse des protéines, mais on observe une sensibilité importante au furane qui agit en perturbant la réplication de l'ADN (figure n° 36) (Perry et al., 2004).

La majorité des eubactéries sont sensibles à la pénicilline, le chloramphénicol et aux autres antibiotiques qui attaquent la paroi cellulaire. *Salinibacter ruber*, isolée à partir des sols hyper salés par Anton et al. (2002), est une eubactérie halophile extrême qui exige des concentrations trop élevées en sel (20 à 30%) pour sa croissance. Cette dernière appartient au domaine des *Bacteria* en raison de sa sensibilité à la pénicilline, ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, novobiocine, rifampicine et ciprofloxacine qui inhibent la synthèse des peptidoglycanes.

La résistance de nos souches bactériennes A et D à la majorité de ces antibiotiques nous conduit à dire que ces dernières sont des *Archae* halophiles extrême du fait que la majorité des membres de la famille de *Halobacteriaceae* sont résistants à ces antibiotiques et qu'elles présentent des parois cellulaires similaires à celles des archaebactéries. *Halococcus salifodinae* est sensible à l'anisomycine, aphidicoline, bacitracine, chloramphénicol et novobiocine mais elle est résistante à l'ampicilline, acide nalidixique, tétracycline et streptomycine (Stan-Lotter et al., 1999). D'autre part, *Haloarcula quadrata* est sensible aux bacitracine, novobiocine et anisomycine (25µg/ml) mais résistante à la pénicilline, ampicilline, rifampicine, chloramphénicol, neomycine et erythromycine (50µg/ml) (Oren et al., 1999).

M) Etude de la lyse cellulaire

➤ Résultat de l'analyse qualitative

L'observation microscopique des deux préparations de la même souche bactérienne (A ou D) avant et après la lyse, entre lame et lamelle, nous a permis de comparer entre elles du point de vue forme, mobilité et éclatement des cellules.

Nous avons constaté que la forme des cellules des souches bactériennes A et D change dans de l'eau physiologique: de la forme cocci à la forme bâtonnée, étoilée, et coccobacille. Les cellules deviennent immobiles et la plus part d'entre elles éclatent. Par contre, dans de l'eau salée à 20% de NaCl, les cellules gardent leurs caractères morphologiques initiaux et leur mobilité.

➤ Résultat de l'analyse quantitative

Cette analyse nous a permis de calculer l'indice de clarification de la lyse cellulaire suite à un choc osmotique de nos deux souches bactérienne A et D.

Les résultats obtenus dans ce test sont représentés dans la figure n° 36 et les valeurs de la densité optique mesurée sont données dans le tableau n° XXVI (annexe V).

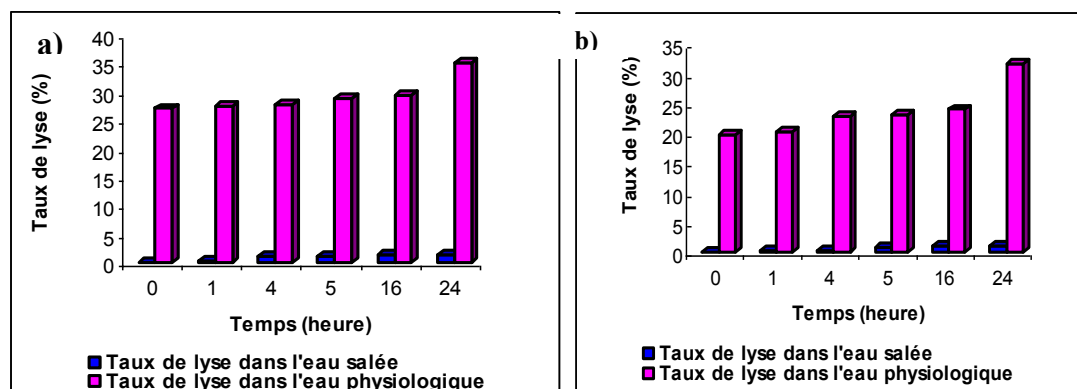


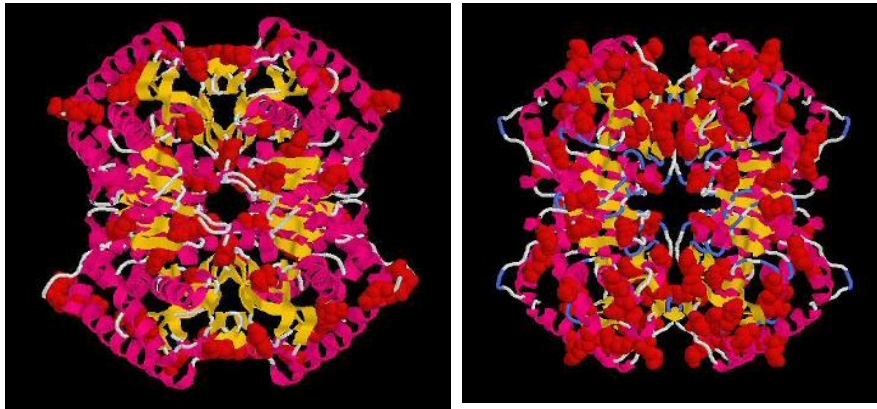
Figure 36: Résultats de la lyse quantitative des deux souches halophiles A (a) et D (b).

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que la densité optique à 600 nm des souches bactériennes A et D dans l'eau physiologique diminue au cours du temps. Ce qui correspond à la lyse des cellules bactériennes dans l'eau physiologique traduit par un taux de lyse croissant jusqu'à 16 heures. Après 24 heures, le taux de la lyse atteint son maximum et cette variation est expliquée par la diminution importante des cellules mises dans de l'eau physiologique par rapport à celles qui sont en contact avec de l'eau salée.

La mortalité des cellules est expliquée par le fait que ces souches bactériennes exigent du NaCl pour leur maintien et leur croissance. Oren *al.* (2002) ont pu démontrer qu'en diminuant la concentration du NaCl dans le milieu de culture, *Halomicrobium mukohataei* changeant leur forme bacillaire native et deviennent sphériques comme une forme de résistance dans les conditions défavorables de croissance. D'autres parts, ces mêmes auteurs ont prouvé qu'au dessous d'une concentration de 15% de NaCl, on a pas de croissance d'*Haloarcula quadrata*. Le même résultat a été trouvé avec les *Archae* halophiles *Halococcus salifodinae* (Stan-Lotter *et al.*, 1999), *Haloarcula argentinensis* (Ihara *et al.*, 1997) et *Haloferax alexandrinus* (Asker et Ohta, 2002).

D'après Panagiotis *et al.* (2007), *Halobacterium salinarum* a un besoin absolu d'une concentration élevée en sel, en particulier pour maintenir la structure de sa membrane et de ses protéines et ne peut se multiplier si la concentration en sel est inférieure à 2,5 mol.l⁻¹.

Les bactéries halophiles synthétisent des protéines qui concentrent près de 10 % de leur poids en sel près de la surface de la molécule, ce qui permet d'y piéger les molécules d'eau nécessaires au maintien de leur configuration spatiale et à leur solubilité dans l'eau. La surface de ces protéines est en quelque sorte recouverte d'une pellicule formée de sels et d'eau qui les stabilise et, si la concentration en sel devient insuffisante, elles se dénaturent. Chez les bactéries halophiles extrêmes, ce sont donc les protéines elles-mêmes qui sont halophiles et elles ne peuvent pas fonctionner en l'absence d'une concentration élevée en sel. La détermination de la séquence de plusieurs de ces protéines et la prévision de leur structure tridimensionnelle par le calcul a montré qu'elles diffèrent de leurs homologues non halophiles par une grande abondance d'acides aminés acides (acides glutamique et aspartique) situés en surface, donnée confirmée par les résultats du séquençage du génome de *Halobacterium* et par l'établissement de la structure tertiaire de quelques protéines halophiles par cristallographie (figure 37) (Panagiotis *et al.*, 2007).



Lactate déshydrogénase de lactobacille

Malate déshydrogénase de *Haloarcula marismortui*

Noter que les acides aminés acides (boules rouges) sont beaucoup plus abondants à la surface de la protéine halophile

Figure n° 37 : Représentations tridimensionnelle de la Lactate déshydrogénase de lactobacille et de la Malate déshydrogénase de *Haloarcula marismortui* (Panagiotis et al., 2007).

N) Analyse du pigment cellulaire

La pigmentation rose orange et rose rouge des deux souches bactériennes A et D nous a amené à penser qu'elles peuvent être des espèces halophiles appartenant à la famille des *Halobacteraceae*. Cette pigmentation est due à la présence de la bactériorubrine qui est un composé caroténoïde qu'elles utilisent probablement comme protection contre la lumière forte de soleil (Larpent, 2000).

Les résultats de l'analyse du pigment cellulaire sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau n° XXVII: Spectre d'absorbance des pigments des souches bactériennes A et D dans l'Ultraviolet et le Visible

Souche halophile	Pics d'absorption (nm)	Absorbance
A	699.0	1.330
	673.0	1.401
	528.0	1.845
	496.0	1.974
D	526.5	2.065

Dans cette étude, nous avons trouvé que chaque souche bactérienne a un spectre d'absorption différent.

La souche bactérienne « A » absorbe à des longueurs d'ondes proche du visible (673.0 nm, 699.0 nm, 528.0 nm, 496.0 nm), alors que la souche bactérienne « D » absorbe à une seule longueur d'onde qui est de 526.5 nm.

D'après Hazayen et al. (2002) *Halobiforma haloterrestis* présente des maxima d'absorption à 370, 390, 494 et à 528 qui correspondent au maxima d'absorption de la bactériorubrine, une des caractéristiques majeurs des archaeobactéries halophiles extrêmes (Gochnauer et al., 1972 ; Grant et al., 2001). D'autre part, le spectre d'absorption de la bactériorubrine d'*Halobacterium gomoense* présente des pics à 494 et à 528nm (Oren et al., 1995).

Par ailleurs, l'analyse de la composition de caroténoïde d'*Haloferax alexandrinus* a montré la présence de β -carotène (à 481nm), γ -carotène (à 496nm), lycopène (à 505nm), 3-hydroxyechinenone (à 477nm), canthaxantine (à 481nm), cis-astaxanthine (à 480nm), Trisanhydro-bactériorubrine (à 522nm), monoanhydro-bactériorubrine (à 491nm), bactériorubrine isomère (à 525,5 nm) et bactériorubrine (à 526,5nm) (Asker et al., 2002).

A partir de ces résultats on peut dire que la pigmentation rose orangée de la souche halophile A peut être due à la présence de la bactériorubrine et du γ -carotène, par le fait qu'elle présente respectivement des maxima d'absorption à 528 et 496 nm. Alors que la pigmentation rose rouge de la souche halophile D peut être due à la présence de la bactériorubrine présentant un maximum d'absorption à 526,5 nm. Ces résultats confirment l'appartenance de ces souches bactériennes à la famille des *Halobacteriaceae*.

O) Lipides membranaires

Pour l'application de la chromatographie unidimensionnelle sur couche mince, nous avons utilisé un système du solvant de migration contenant du chloroforme-méthanol- acétate- eau distillée (85 : 22.5 : 10 : 4, V/V). Les chromatogrammes obtenus sont illustrés dans la figure n°38.

Les résultats des valeurs des Rf obtenus après révélation des phospholipides a donné des taches marrons visibles : de 0.14 pour la souche bactérienne A et de 0.32 pour la souche bactérienne D. Alors qu'aucune tache n'a été observée après révélation des glycolipides. Cela peut être expliqué par le taux faible des glycolipides membranaires chez les deux souches bactériennes.

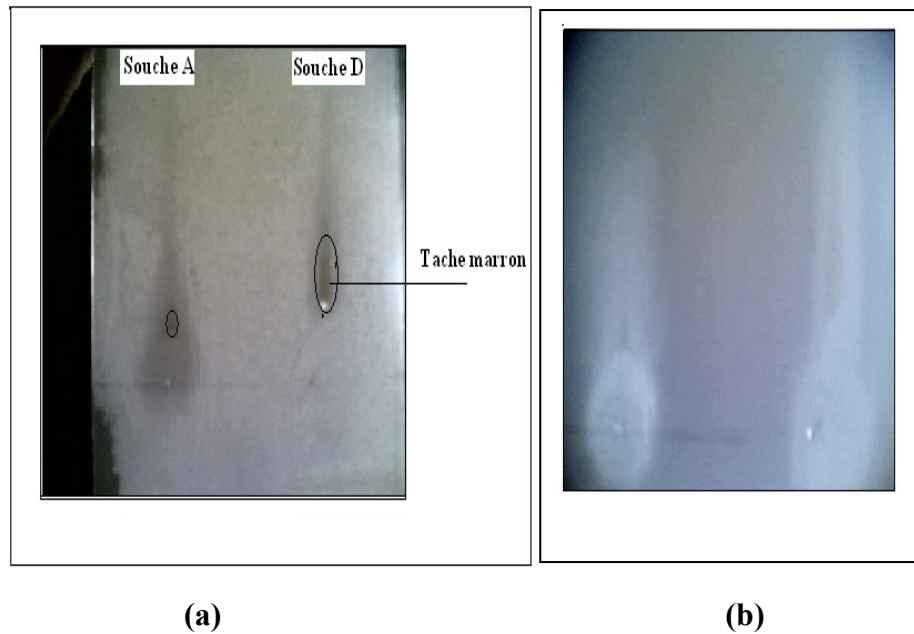


Figure n° 38 : Profil chromatographique sur couche mince obtenue après migration et révélation des spots des souches bactériennes A et D sur système de solvant chloroforme- méthanol- acétate- eau distillée (85 :22.5 :10 :4, V/V). (a) révélation des phospholipides, (b) révélation des glycolipides.

L'analyse des lipides membranaires est un critère très important pour l'identification des *Archae* halophiles extrêmes. La diversité structurale des lipides membranaires chez les *Halobacteriaceae* est confirmée par plusieurs recherches.

Heyzayen et *al.* (2002) ont montré que l'analyse des lipides polaires d'*Halobiforma haloterrestis* a révélé la présence de triglycérides diéther sulfatés et le diéther triglycosyl dans leur membrane cellulaire (figure n°39).

D'autre part, l'analyse des lipides polaires par chromatographie sur couche mince d'*Halobaculum gomorense* a révélé la présence de glycérol diéther analogue de phosphatidylglycérol, de phosphatidylglycérophosphate et d'un seul glycolipide (figure n° 40) (Oren et *al.*, 1995).

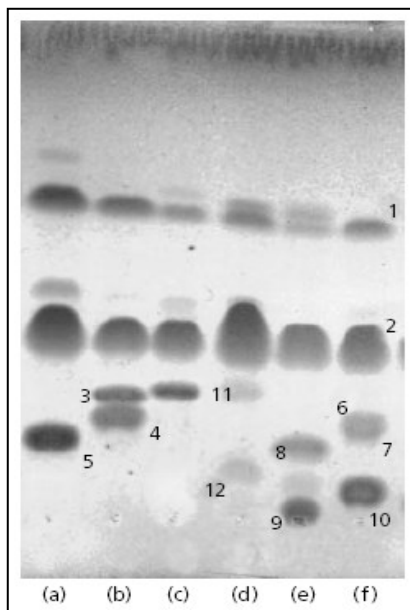


Figure n° 39 : Chromatographie sur couche mince des lipides polaires d'*Haloferax mediterrani* DSM 141^T (a), *Haloarcula vallismortis* DSM 3756^T (b), *Halogeometricum borinquense* DSM 11551^T (c), *Halobiforma haloterrestis* 135T (d), *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786^T (e) et *Halobacterium salinarum* NRC 34001^T (f). La plaque a été traitée avec le système de solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (80 :12 :15 :4, v/v). Les lipides totaux ont été visualisés par l'acide dodécamolybdophorique et un réactif spécifique qui détecte les groupements fonctionnels. Tous les lipides identifiés sont des dérivés de diéther : 1-phosphatidyl glycérol, 2-glycérophosphate méthyl phosphatidyl, 3- triglycosyl diéther, 4 et 7- phosphatidyl glycérophosphate, 5 et 8- diglycosyl diéther sulfate, 9- glycolipide sulfate, 10-triglycosyl diéther sulfate, 11- triglycosyl diéther, 12- glycolipide sulfate (Hezeyen et al., 2002).

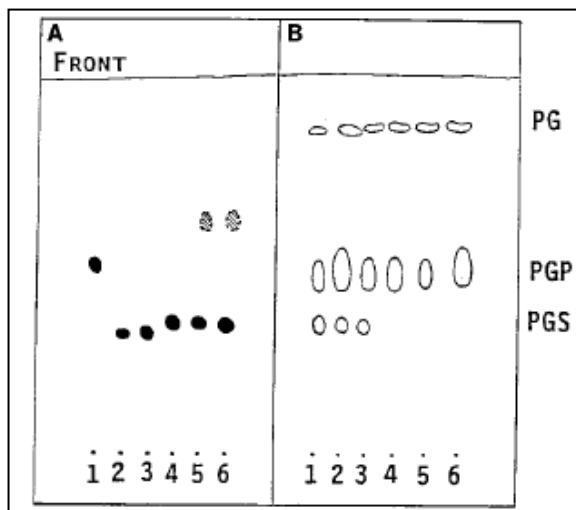


Figure n° 40: Chromatographie sur couche mince des lipides polaires extraits à partir d'*Haloarcula marismortui* ATCC43049^T (ligne 1), *Halobacterium saccharovorum* ATCC29259^T (ligne 2), *Halobacterium sodomense* ATCC33755^T (ligne 3), *Halobaculum gomorense* DS2807^T (ligne 4), *Haloferax volcanii* ATCC29605^T (ligne 5) et *Haloferax denitrificans* ATCC35960^T (ligne 6) traité par le système de solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (85 :22,5 :10 :4 v/v) (Oren et al., 1995).

A partir de ces résultats, on peut dire que nos deux souches bactériennes A et D peuvent être des *Archae* halophiles extrêmes par le fait qu'elle présentent des lipides polaires contenant le diphytanyl C20-C20 ou le phytanyl sesterterpanyl C20-C25 révélés par le molybdate d'ammonium et de l'acide sulfurique (Kamekura et Kates, 1999 ; Oren et *al.*, 1997).

Le Rf calculé pour la souche D est le même trouvé chez *Haloarcula vallismortis* identifié comme un triglycosyl diéther et chez *Haloarcula marismortui* identifié comme un phosphoglycérol sulfate. Dans notre cas on peut dire que le phospholipide trouvé pour cette souche bactérienne est un phosphoglycérol sulfate. Alors que celui de la souche A peut correspondre à un phosphatidyl glycérol par le fait qu'il d'agit du lipide le moins polaire (Hezayen et *al.*, 2002).

IV. 1. 2. 3 Caractéristiques et identification des souches bactériennes A et D

Les souches bactériennes A et D sont de forme cocci, Gram négatif, mobile et présente une pigmentation rose orange. Elle est aéro-anaérobie facultative et possède une oxydase, catalase, nitrate réductase (qui réduit le nitrate jusqu'au stage gazeux), perméase, β -galactosidase, tryptophanase, amylase, gélatinase et une estérase. Leur optimum de salinité est de 15% et elles tolèrent des concentrations en sel jusqu'à la saturation. La lyse cellulaire est remarquée à des concentrations inférieures à 5% de NaCl. Elles sont résistantes à la pénicilline G, ampicilline et divers, amoxicilline, acide alavulamique, oxacilline, cefotaxime, cefalexine, céfixime, fosfomycine et rifampicine mais sensibles au furane (300 μ g).

Pour une croissance optimale, la souche bactérienne A exige une concentration comprise entre 0,8M et 1M de Mg^{++} . Sa température optimale de croissance est entre 35°C et 40°C. Elle est haloalcalophile présentant une croissance dans un intervalle de pH entre 7 et 9 avec un optimum à pH 7. L'amidon, le cellobiose, le xylose, l'arabinose, le lactose, l'adonitol, le sorbitol, le glycérol, le mannitol et l'acide oxalique sont utilisés comme source de carbone pour sa croissance. Le glucose, fructose, saccharose, xylose, galactose et mannose sont dégradés avec production d'acides organiques. Les colonies présentent une pigmentation rose orangé qui correspond à la bactériorubrine et au γ -carotène et ses lipides membranaires présentent des diéther de glycérol qui peuvent être des phosphatidyl glycérol.

Alors que la souche bactérienne D exige, pour sa croissance optimale, une concentration comprise entre 0,3M et 0,8M de Mg^{++} . Sa température optimale est

entre 35°C et 40°C. Elle est haloalnutrophile présentant une croissance dans un intervalle de pH entre 6 et 7,5 avec un optimum à pH 7. L'amidon, le saccharose, le mannose. Le maltose et le lactose et l'acide oxalique sont utilisés comme source de carbone pour sa croissance. Le glucose, fructose, cellobiose, xylose, saccharose, raffinose, galactose, glycérol et mannitol sont dégradés avec production d'acides organiques. Son pigment rose rouge des colonies correspond à la bactériorubrine et ses lipides membranaires présentent des diéther de glycérol qui peuvent être des phosphoglycérols sulfates.

En raison de leur pigmentation, leurs lipides membranaires, leurs exigences aux concentrations extrêmes en sels et leurs lyses cellulaires à des concentrations inférieures à 5% de NaCl, leur résistance à l'ensemble des antibiotiques testés, et en comparant ces résultats à ceux de la littérature, Oren *et al.* (1995, 1997, 1999, 2002); Arahall *et al.* (1996), Ihara *et al.* (1997); Stan-Lotter *et al.* (1999); *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1989); Hezayen *et al.* (2002); Asker *et al.* (2001, 2002), Hacène *et al.* (2003), Kawakami *et al.* (2005 :2007) et Kharroub *et al.*, (2006), on peut classer les deux souches bactériennes A et D dans le Domaine d'*Archaea*, Classe des *Halobacteria*, Ordre d'*Halobacteriale* et dans la Famille des *Halobacteriaceae*.

En se basant sur leurs caractères microscopiques, macroscopiques, biochimiques et physiologiques (tableau XXVIII), on peut rapprocher la souche bactérienne A au genre *Halovivax* (Casillo *et al.*, 2006), et la souche bactérienne D au genre *Haloarcula* (Oren *et al.*, 1999) au sein de la famille des *Halobacteriaceae*.

Tableau XXVIII: Caractéristiques des genres *Halovivax* (Castillo et al., 2006) et *Haloarcula* (Oren et al., 1999) et des souches bactériennes étudiées A et D

Caractéristiques	Souche A	<i>Halovivax</i>	Souche D	<i>Haloarcula</i>
Morphologie	Cocci	Pléomorphes	Cocci	Pléomorphes
Gram	-	-	-	-
Pigmentation	Rose-orange	Rose	Rose-rouge	Rouge
Catalase et Oxydase	+	+	+	+
NaCl optimum (M)	2.7M	3.4M	2.7M	2.5-4.3M
NaCl (M)	2.7-4.5M	2.5-4.3M	2.7-4.5M	1.7-5.2
Mg⁺⁺ optimum (M)	0.8M	50-100 mM	0.5M	50-100 mM
pH optimum	7-9, opt. 7	7-9, opt. 7-7.5	6-7.5, opt. 7	6.5-7.5
Temperature optimum (°C)	35-40°C	25-45°C, opt. 37°C	35-50°C	35-53°C
Nitrite à partir du nitrate	-	-	-	+
Production de carbohydrates	+	V	+	+
Croissance sur seule source de carbone	+	-	+	+
Indole à partir du tryptophan	+	-	+	V
Hydrolyse de:				
Amidon	+	-	+	V
Gélatine	+	+	+	V
Caséine	+	+	+	-
Tween 80	+	+	+	V
Lysise dans l'eau distillée	Lyse cellulaire	Lyse cellulaire	Lyse cellulaire	Lyse cellulaire
Sensibilité à la pénicilline	+	+	+	+
Lipides membraires	Phophatidyl glycerol methyl ester	Phophatidyl glycerol methyl ester	Phosphatidyl glycerol-sulfate	Phosphatidyl glycerol-sulfate

V : variable selon les espèces.

IV. 2 Production des biosurfactants

IV. 2. 1 Caractérisation des biosurfactants produits

Les biomolécules étudiées sont des biosurfactants grâce à leur pouvoir tensioactif. Ces biosurfactants produits à partir des souches A et D ont été mis en évidence avec le test E24 par Ghouali et Kaci-Chaouche (2004): c'est ce qui nous a poussé à confirmer ce résultat et essayer de caractériser ces biomolécules produits par deux souches halophiles extrêmes pour donner un résultat qui n'a jamais été prouvé auparavant.

▪ Croissance des souches halophiles A et D en présence de gasoil

D'après Georgiou et Sharma (1990), la présence des hydrocarbures stimule la production des biosurfactants. C'est pour cette raison qu'on a utilisé le gasoil dans les milieux de cultures des deux souches halophiles A et D.

Les résultats de cette étape sont représentés sous forme des courbes de croissance des souches bactériennes tests sur différentes concentrations de gasoil (figure n°41). Les valeurs de la densité optique (DO) mesurés à 600 nm sont données dans le tableau XXIX (annexe n°V).

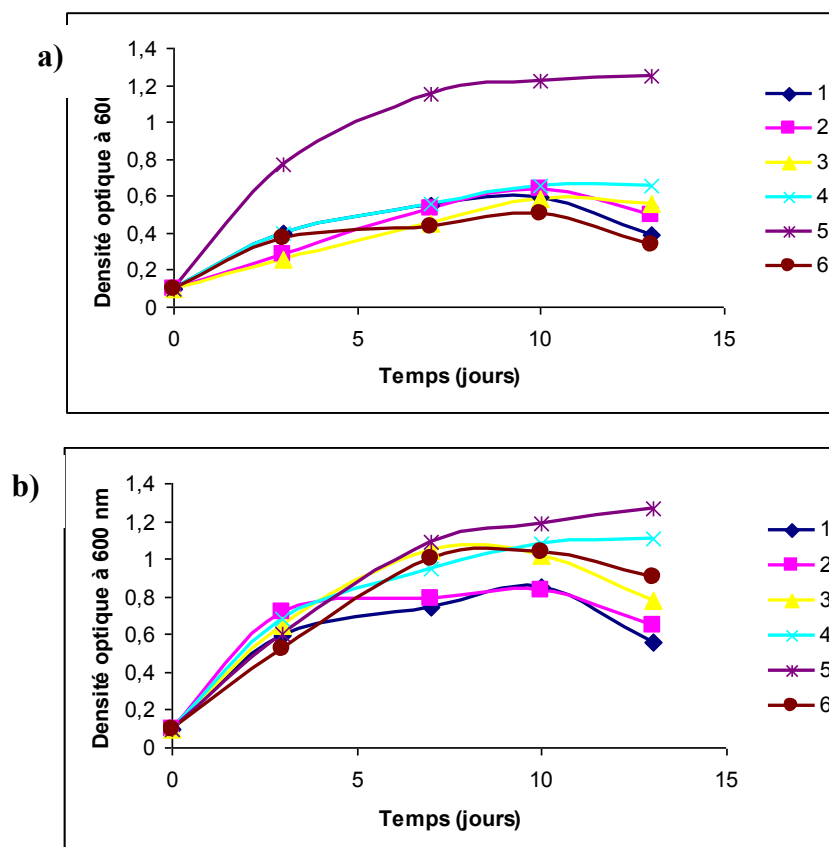


Figure n° 41 (a et b) : Cinétique de croissance des souches bactériennes A et D sur milieu SH modifié additionné de différentes concentrations de gasoil à 40°C pendant 13 jours d'incubation.

L'allure des courbes démontre que la croissance bactérienne augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration du gasoil. La souche A présente un maximum de croissance à une concentration de 5% de gasoil, mais la croissance cellulaire est faible pour les autres concentrations. Par contre la souche D marque une meilleure croissance avec les différentes concentrations de gasoil avec un optimum de 5%.

Un nombre limité des haloarchaebactéries est capable de dégrader les hydrocarbures. *Haloferax volcanii* D1227, une *Archae* halophile isolée à partir des sols contaminés par les hydrocarbures, est capable de dégrader des composés mono-aromatiques comme le benzoate, cinnamate et 3-phenylpropionate (Emerson et *al.*, 1994). Récemment *Fairley et al.* (2002) ont démontré que *Haloarcula sp.* D1 peut métaboliser l'acide p-hydroxy-benzoïque (pHBA) mais le mécanisme cellulaire de la biodégradation des hydrocarbures par les *Archae* halophiles est toujours mal compris (Guadros-Orellana et *al.*, 2006).

D'après Calvo et *al.* (2004), cette croissance peut être expliquée par la présence de substances comme les biosurfactants qui facilitent l'assimilation des hydrocarbures (gasoil). Pepi et *al.* (2004) ont pu identifier un nouveau biosurfactant de nature glycolipidique, produit par la bactérie halophile extrême (appartenant au domaine des *Bacteria*) *Halomonas sp.* ANT-3b développée sur un milieu contenant le n-hexadécane comme seule source de carbone.

IV. 2 .2 Index d'émulsification (E₂₄)

A fin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les souches bactériennes halophiles A et D, nous avons réalisé le test d'émulsification (E₂₄) par l'homogénéisation de 3ml de mout de fermentation du 7^{ème} jour avec 3ml de gasoil.

Le résultat obtenu démontre une production de biosurfactants par les deux souches bactériennes A et D avec un index d'émulsification de 62,96 % et de 54,57 %, respectivement (figure n° 42): ce qui indique que ces dernières ont un intérêt industriel important grâce à ces composés à activité émulsifiante.

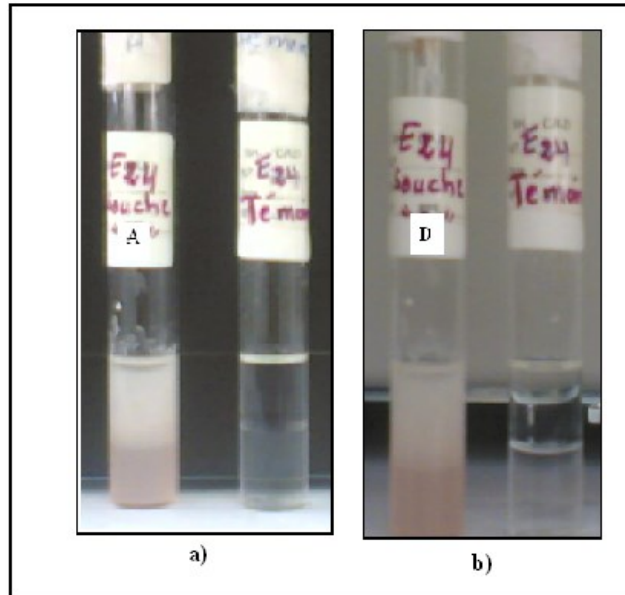


Figure n° 42 (a et b) : Résultats de l'index d'émulsification pour les deux souches bactériennes halophiles A et D.

IV.2. 3 Localisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules extracellulaires ou attachées à la surface cellulaire (Cameron et *al.*, 1988 ; Tabatabaee et *al.*, 2005). C'est pour cette raison qu'on a cherché à localiser nos biosurfactants produits par les deux souches halophiles A et D.

Le test d'émulsification (E_{24}) calculé pour le surnageant a donné un bon résultat par rapport à celui de moût de fermentation. Il est, respectivement, de 75% et 62,96 % pour la souche bactérienne A et de 57,57 % et 54,57% pour la souche bactérienne D. Cela nous amène à dire que les biosurfactants produit par les souches bactériennes halophiles A et D sont des produits extracellulaires: ce qui facilite leurs extraction.

IV. 2. 3 Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (Neindre, 1993).

Les résultats de la mesure de la tension superficielle sont donnés dans le tableau XXX (annexe n° V). Les résultats sont représentés sous forme de courbes illustrées dans la figure n°43.

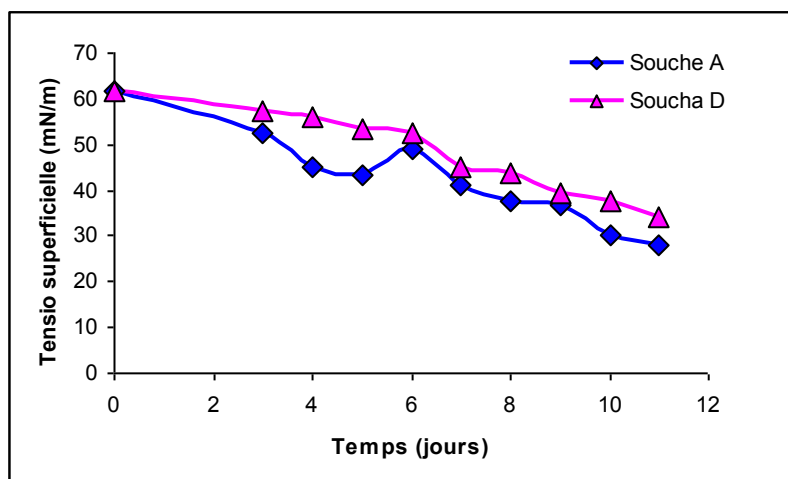


Figure n°43 : Variation de la tension superficielle en fonction de temps (croissance sur milieu SH standard liquide à 40°C pendant 11 jours d'incubation des deux souches bactériennes halophiles A et D).

Selon les courbes de la variation de la tension superficielle au cours de temps des souches bactériennes halophiles A et D, nous remarquons que la tension superficielle aux premiers jours de fermentation est assez élevée mais au bout du 3^{ème} jour, nous observons une diminution de ses valeurs jusqu'à ce qu'elles atteignent 28mN/m et 34 mN/m pour les deux souches bactériennes A et D respectivement. Ce résultat nous permet de dire qu'il y a une production des biomolécules ayant des propriétés tension-actives comme les biosurfactants qui provoquent l'abaissement de la tension superficielle (Tabatabaee et *al.*, 2005).

Les mêmes résultats ont été obtenus par Banat et *al.* (1991) qui ont pu isoler plusieurs bactéries ayant la capacité de réduire la tension superficielle du milieu de culture à des valeurs inférieurs à 40 mN/m.

D'autre part, la lichenysine A (lipopeptide) produite par *Bacillus licheniformis* BAS50 réduit la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m jusqu'à 28 mN/m et atteint la concentration micellaire critique à une concentration inférieure à 12 mg/litre. En outre, le rhamnolipide (glycoprotéine) produit par *Pseudomonas aeruginosa* et la surfactine (lipoprotéine) produite par *Bacillus subtilis* ont la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m jusqu'au 30 mN/m avec une concentration micellaire critique de 45 et 50 mg/l pour la surfactine et le rhamnolipide respectivement.

IV.2.4 Etude de la relation entre la variation de la cinétique de croissance, l'évolution de l'index d'émulsification, le pH et l'abaissement de la tension superficielle

Les résultats de cette étude sont représentés dans les figures 44, et les valeurs sont données dans le tableau XXXI (annexe n° V).

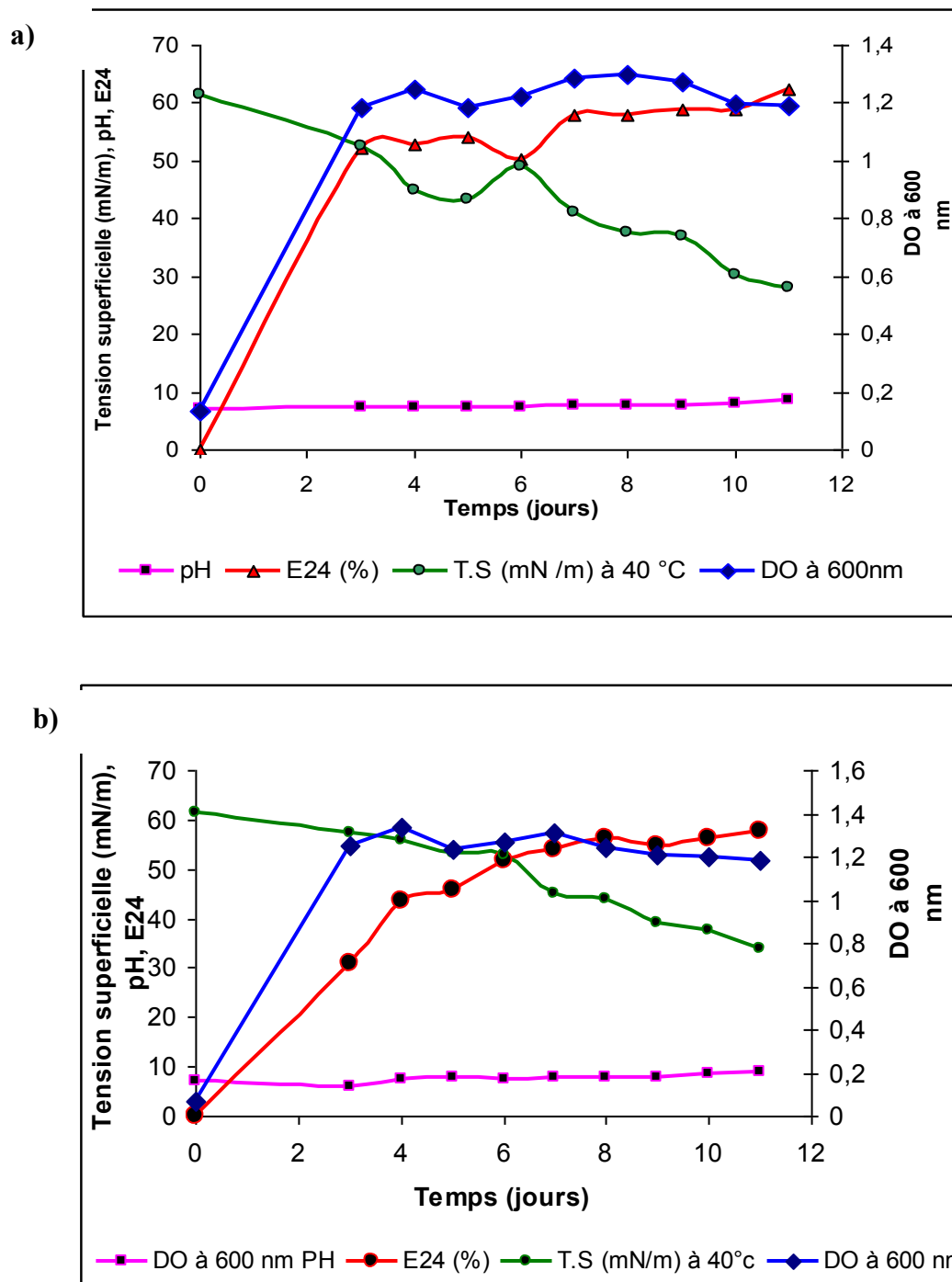


Figure n° 44 : Variation de la cinétique de la croissance, l'index d'émulsification, le pH et la tension superficielle en fonction de temps pour les souches A (a) et D (b).

D'après ces figures, on remarque que l'augmentation de la densité cellulaire est accompagnée par une augmentation de l'index d'émulsification. Elle atteint sa valeur maximale au bout du 8^{ème} jour.

L'allure des courbes est expliquée par une production maximale des biosurfactants au cours de la phase stationnaire de la croissance des souches bactériennes halophiles A et D; c'est la phase où les bactéries se dirigent vers la production des métabolites secondaires.

Par ailleurs, on observe une courbe décroissante de la tension superficielle du milieu, ce qui démontre une activité tension-active des biosurfactants dans les moûts de fermentation pour les deux souches bactériennes halophiles A et D.

La courbe de variation du pH montre que ce dernier reste plus au moins constant au cours du temps de fermentation. Ces biomolécules ne semblent pas influencer le pH du milieu.

IV. 2. 5 Détermination de la stabilité d'émulsion produite

1 – Effet de l'eau distillée

La dilution de moût de fermentation par l'eau distillée démontre que ce dernier n'a pas un effet sur l'émulsion produite. L'index d'émulsification pour les deux souches bactériennes A et D est maintenu constant avec une valeur de 58,82 %.

2 – Effet du pH

La variation du pH du 2 à 11 des tests d'émulsification (E_{24}) des souches bactériennes halophiles A et D a donné les résultats présentés dans figure n° 45. Les valeurs de test d'émulsification (E_{24}) sont données dans le tableau XXXII (annexe n° V).

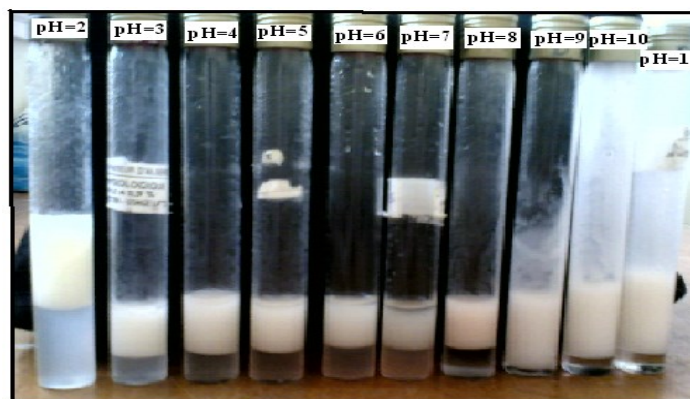


Figure n°45 (a) : Aspect de l'émulsion après variation du pH pour la souche bactérienne A.

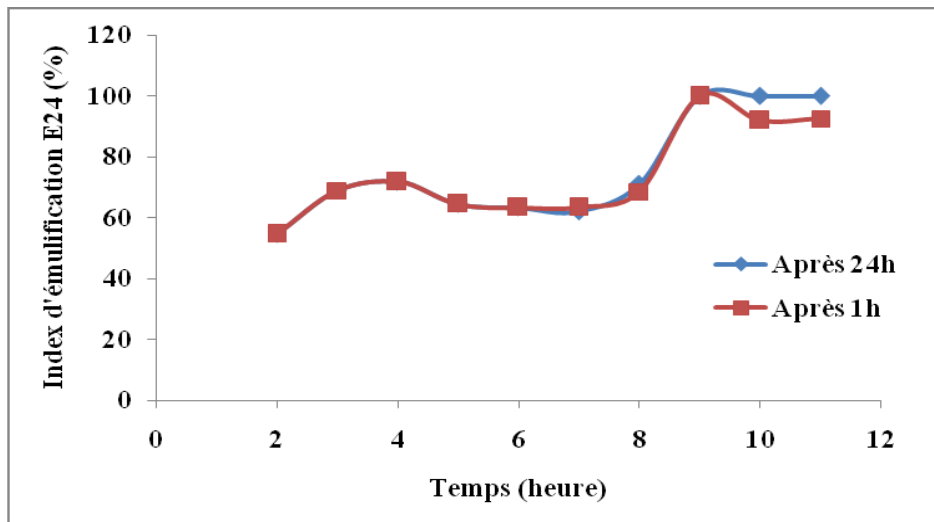


Figure n° 45 (b) : Variation d'index d'émulsification (E24) en fonction du pH et au cours de 24h pour la souche bactérienne A.

Les mêmes résultats de la variation du pH ont été remarqués pour la souche bactérienne D.

D'après la figure n°46 (b) on peut remarquer que :

- Entre pH 2 à pH 5 : les tests E₂₄ dans ces milieux acides, gardent leur valeur initiale même après 24h de repos, mais nous avons remarqué que les émulsions formées tendent à se solidifier,
- Entre pH 6 et pH 7 : les émulsions formées dans ces valeurs neutres restent stables même après 24h,
- Entre pH 8 à pH 11 : les tests E₂₄ dans ces milieux basiques sont plus importants que ceux qui sont dans les milieux acides et neutres mais ils marquent une légère diminution après 24 h de repos sauf à pH 9 où le E₂₄ atteint 100% .

L'effet de la variation du pH ne semble pas affecter les émulsions formées. Ces résultats démontrent encore une fois qu'il est possible d'utiliser ces moûts de fermentation dans des sites pollués, par exemple, par les hydrocarbures et ce quels que soient les valeurs de pH du site à dépolluer.

3 – Effet de l'éthanol

Les résultats de l'effet de la stabilité des émulsions formées pour la souche halophile A sont représentés dans la figure n°46 et les valeurs de l'index d'émulsification sont données dans le tableau XXXIII (annexe n° V). Les mêmes résultats ont été trouvés pour la souche bactérienne halophile D.

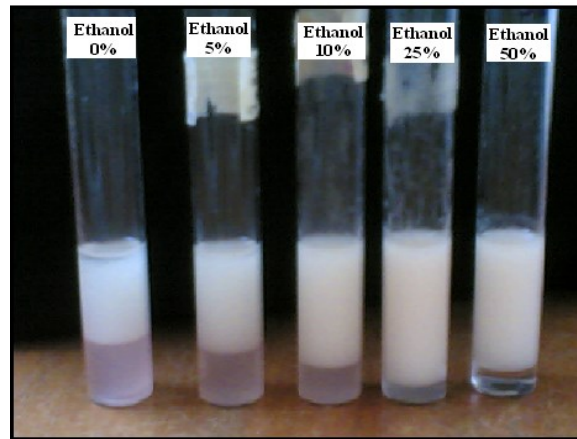


Figure n° 46 (a) : Aspect de l'émulsion après l'ajout de différentes concentrations de l'éthanol pour la souche bactérienne halophile A.

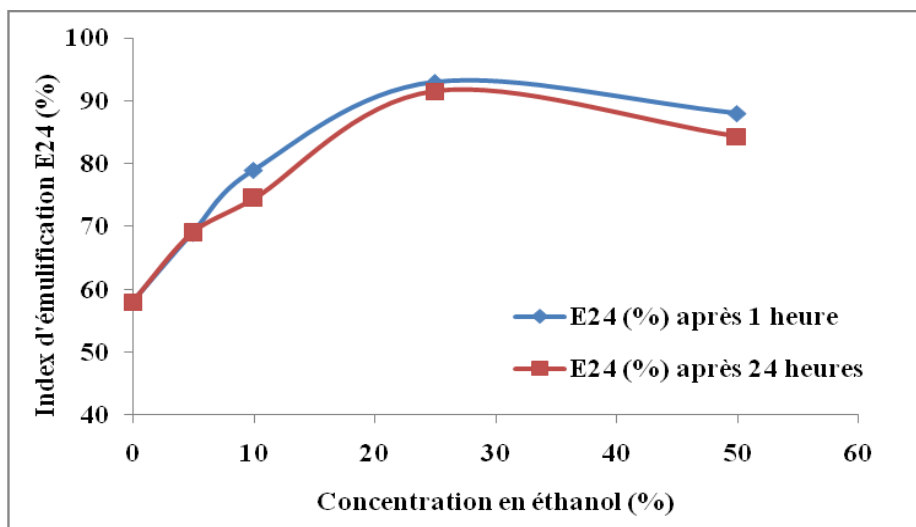


Figure n° 46 (b) : Variation de l'index d'émulsification (E₂₄) en fonction de la concentration d'éthanol pour la souche bactérienne halophile A.

D'après la figure n° 47 (a et b), on observe que la stabilité des émulsions formées augmente avec l'augmentation des concentrations d'éthanol jusqu'à ce qu'elle atteigne le maximum à une concentration de 25% ($E_{24} = 93\%$). Par contre, une concentration plus élevée en éthanol (50%) a provoqué une légère diminution de l'index d'émulsification ($E_{24} = 88\%$). Ceci démontre que la présence des concentrations élevées de solvant, tel que l'éthanol (jusqu'à 25%), a un effet positif sur la stabilité d'émulsion et l'index d'émulsification (E_{24}).

4 – Effet de la température

Le cycle de température de (40°C, 25°C, 4°C à – 4°C) n'a aucun effet sur la stabilité des émulsions formées. Par ailleurs, le cycle de température inverse de (-4°C, 4°C, 25°C à 40°C) provoque la dispersion de l'émulsion.

Selon Banat (2000), les biosurfactants produits par la plupart des microorganismes deviennent instables dans les conditions physico-chimiques extrêmes à savoir les variations de la température, pH ou la présence de forte concentration de solvant tel que l'éthanol, qui peuvent avoir un effet déstabilisant sur les émulsions formées. Nos émulsions produites (à 40°C, pH 7, 0% d'éthanol et 15% de NaCl), évaluées par le test E24, sont stables dans les différentes valeurs de pH, de températures (avec un cycle de 40°C, 25°C, 4°C et -4°C) et en dilution dans de l'eau distillée, mais ces émulsions augmentent avec l'augmentation de la concentration de l'éthanol jusqu'à 25%. Tous ces tests ont été réalisés dans un milieu contenant 15% de NaCl, ce qui implique que les émulsions formées sont stables à des concentrations élevées en sel.

Cameron *et al.* (1988) ont étudié la stabilité des biosurfactants, identifiés comme des mannoprotéines, produits par *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étude a montré que les émulsions produites, évaluées par le test d'émulsification en utilisant le kérosène, sont stables à différentes températures et à différentes valeurs de pH avec un E24 de 95%. Par contre, la stabilité de ces émulsifiants augmente avec l'élévation de la concentration de NaCl jusqu'à 5% et avec l'augmentation de la concentration en éthanol jusqu'à 50%.

A partir de ces résultats, on peut dire que les biosurfactants sont des biomolécules qui sont stables dans les conditions de leur production; nos émulsions formées par les deux souches halophiles extrêmes A et D supportent des concentrations élevées en sel (15%) alors que les émulsions formées par *Saccharomyces cerevisiae* sont stables pour différentes concentrations en éthanol jusqu'à 50%.

IV. 2. 6 Extraction des biosurfactants

Après la révélation des glucides (réactif de Moolish), des protéines (UV) et des lipides (la vapeur d'iode), nous avons observé des tâches marron et noir (figure n° 47). Les valeurs de Rf sont données dans le tableau n° XXXIV.

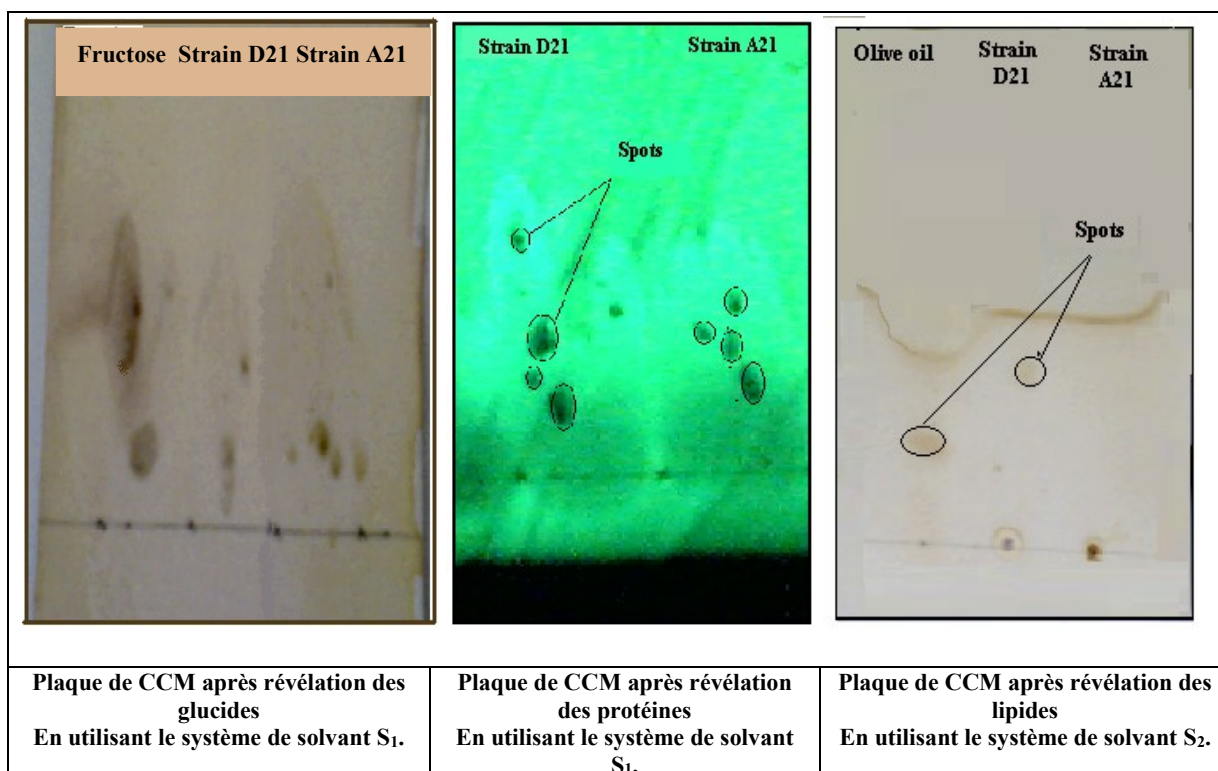


Figure n° 47 : Profil chromatographique obtenue après migration et révélation des spots des souches bactériennes A et D. Solvants de migration utilisés sont : [S₁ : chloroforme, méthanol, acide acétique (80 :18 :2 v/v) et [S₂ : chloroforme, méthanol, acide acétique (97 :2 :1 v/v)].

Tableau n° XXXIV : Valeurs des Rf obtenues après révélation des plaques de CCM

		Souche A		Souche D	
		Nombre de tâches	Les valeurs de Rf	Nombre de tâches	Les valeurs de Rf
Témoin	Fructose A 2%	2	0.13 – 0.33	2	0.13 – 0.33
	L'huile d'olive	2	0.19 0.69	2	0.19 0.69
Révélation	Glucides	5	0.13 – 0.13 0.13 – 0.17 0.47	2	0.19 0.69
	Protéines	4	0.21 – 0.27 0.31 – 0.36	4	0.16 – 0.22 0.31 – 0.52
	Lipides	0	-	1	0.34

Les résultats obtenus confirment qu'il y a une production des substances extracellulaires par les souches bactériennes A et D.

D'après le tableau n° XXXIV les biosurfactants produits par la souche halophile A pourraient être des glycoprotéines alors que pour la souche halophile D, le biosurfactant pourrait être un mélange entre les glucides, les protéines et les lipides donc, soit des glycoprotéines, des glycolipides ou des lipopeptides. Par ailleurs, l'analyse préliminaire du biosurfactant caractérisé par Tabatabaee et *al.* (2005), analysé par chromatographie sur couche mince avec le système de solvant chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (25 : 15 : 4 : 2, v/v), a indiqué la présence des glycolipides ou des lipides neutres en se basant sur la valeur 0,6 du Rf calculé.

Pour confirmer ces résultats et identifier les structures des biosurfactants produits par les souches halophiles A et D, après leur purification, on a recours à plusieurs méthodes qualitatives et quantitative tel que la spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore (spoeckner et *al.*, 1999), la spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupement fonctionnels (Peypoux et *al.*, 1999), la spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule (Daniels et *al.*, 1999), et / ou la résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) qui indique la structure et la conformation des composés à analyser (Daniels et *al.*, 1999).

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

Hezayen et *al.* (2001) ont pu isoler un polymère extracellulaire produit par l'archabactéries halophile *Natrialba asiatica*. Ce biopolymère est constitué essentiellement de l'acide glutamique (85%) carbohydrates (12,5%) et d'autres composés (2,5%). La production des polysaccharides extracellulaires a été décrite également par quelques membres de la famille des *Halobacteriaceae*, chez les genres *Haloferax* et *Haloarcula*, mais non en aucun cas, l'activité tensio-active n'a été prouvée.

Les biosurfactants présentent plusieurs avantages par rapport aux surfactants chimiques, ils présentent un pouvoir moussant très important (Razafindralambo et *al.*,

1996) et une activité spécifique à des températures, pH et salinité extrêmes (Kretschmer et al., 1982 ; Velikonja et Kosaric, 1993).

Quelques biosurfactants comme les lipopetides produits par *Bacillus licheniformis* BAS50 (Yakimov et al., 1995), les glycolipides élaborés par *Streptococcus thermophilus* A (Rodrigues et al., 2006), et les glycolipides synthétisés par *Tsukamurella* sp. (Langer et al., 2006) présentent une activité antibactérienne, certains présentent une activité antivirale (Benincasa et al., 2004 ; Haba et al., 2002) comme les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* B189 (Thanomsub et al., 2006), alors que d'autres peuvent changer la différenciation des cellules mammaires (Kitamoto et al., 2002).

D'autres part, *Flavobacterium* sp. produit des flavolipides, une nouvelle classe des biosurfactants, qui présentent un rôle dans la bioremédiation et la formation des biofilms (Bodour et al., 2003). De même, des glycolipides élaborés par la bactérie psychrophile *Halomonas* sp. présentent un intérêt biotechnologique environnemental par la remédiation des sols pollués par hydrocarbures à des basses températures (15°C) (Pepi et al., 2005). *Halomonas ventosa* et *Halomonas anticariensis* peuvent former, également, des biofilms par la production des exopolysaccharides à activité émulsifiante (Mata et al., 2006).

Conclusion

Conclusion

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser des souches bactériennes halophiles extrêmes codées A et D isolées à partir des eaux de gisement de champs pétroliers Algériens, de mettre en évidence leur pouvoir de production des biopolymères à activité émulsifiante et essai de la caractérisation de ces derniers.

Les résultats obtenus après les études microbiologiques, physiologiques et biochimiques effectuées tels que la résistance aux antibiotiques, étude de l'optimum de NaCl, optimum de Mg^{++} , analyse des lipides membranaires et pigment cellulaire nous laissent penser que nos souches bactériennes A et D peuvent appartenir au domaine d'*Archaea* au sein de la famille des *Halobacteriaceae*.

La souche bactérienne halophile A a été rapprochée au genre *Halovivax* alors que la souche bactérienne halophile D a été affilié au genre *Haloarcula*.

L'étude biochimique et les tests effectués pour la détermination de la capacité de ces souches bactériennes à produire des biopolymères à propriétés émulsifiants, a été réalisé en effectuant différents tests.

La production de biosurfactants s'est révélée positive pour les deux souches bactériennes étudiées avec un index d'émulsification maximal de 62.96% pour la souche halophile A et 54.57% pour la souche bactérienne D, sur le milieu SH standard, pH 7 et à 40°C.

La caractérisation préliminaire des biosurfactants produits en utilisant la chromatographie sur couche mince monodimensionnelle (CCM) a révélé la présence de glucides et protéines pour la souche bactérienne A, lipide apolaire, glucide et protéine pour la souche bactérienne D.

Ces résultats montrent que les biosurfactants produits par la souche bactérienne A peuvent être des composés glycoprotéiques, par contre, il peut s'agir de lipopeptides, glycolipides et/ou glycoprotéines dans le cas de la souche bactérienne D.

Au terme de notre étude, nous tenons à signaler que les résultats de la caractérisation restent préliminaires. Il est nécessaire d'approfondir l'étude afin de confirmer ces résultats obtenus, et cela par le séquençage de l'ARN 16S et l'analyse des lipides membranaires.

Quand à la caractérisation des biopolymères produits, la méthode chromatographique reste une méthode qualitative de choix. Cependant la détection

d'une tache est insuffisante pour la détermination de la molécule correspondante. Pour cela, une purification et une concentration des produits élaborés par nos souches sont préconisées. En effet, les perspectives de cette étude monteraient qu'ils pourraient s'agir de biomolécules différentes de celles déjà connues.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. Abalos A., A. Pinazo, M.R. Infate, M. Casals, F. Garcia et A. Manresa (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir*, 17, (5): 1367-1371.
2. ABU-Ruwaida A.S., M. Banat, A. Haditirto, S. Salem et A Kadri (1991). Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotech*, 11(4): 315-24.
3. Akit J., D.J. Cooper, K.I. Manninen et J.E. Zajic (1981). Investigation of potential biosurfactant production among phytopathogenic corynebacteria and related soil microbes. *Curr. Microbiol*, 6:145-150.
4. Anton J., A. Oren, S. Benlloch, F. Rodriguez-Valera, R. Amann et R. Rossello-Mora (2002). *Salinibacter rubber* gen. nov., sp. Nov., a novel, extremely halophilic member of the bacteria from saltern crystallizer ponds. *Inter. J. Syst. Evolut. Microbio*. 52:485-491.
5. Arahal D.R., F.E Dewhirst, B.J. Paster, B.E. Volcani and A. Ventosa (1996). Phylogenetic Analyses of Some Extremely Halophilic archaea isolated from Dead Water, determined on the Basis of Their 16S rRNA sequences. *App. Envir. Microbiol*. 62: 3779-3786.
6. Arima K., A. Kakinuma and G. Tamura (1968). Surfactine, a crystalline peptidlipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 31: 488–494.
7. Arino S. (1996). Production de biosurfactants glycolipidiques par les bactéries de l'environnement: Diversité et rôle physiologique » thèse de doctorat de l'institut national agronomique de Paris Grignon, 200p.
8. Asker D., T. Awad et Y. Ohta (2001). Lipids of *Haloferax alexandrinus* Strain TM^T: an Extremely Halophilic Canthaxanthin-Producing Archaeon. *J. Biosci. And Bioingein*. 93 : 37-43.
9. Asker D. et Y. Ohta (2002). *Haloferax alexandrinus* sp. Nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *Inter. J. Syst. Evolut. Microbio*. 52 : 729-738.

10. Banat I., N. Samarah, M. Murad, R. Horne, and S. Benerjee (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 80–84.
11. Banat I. (2000). Les biosurfactants plus que jamais sollicités. *Biofutur ; mensuel Européen de biotechnologie*, **198** :40-46.
12. Basso D'Hondl S.L., B.B. Jordensen, D.J. Miller (2005). *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Initial Reports.* **201**.
13. Beeba J. L et W.W. Umbreit (1971). Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**: 612–615.
14. Bell S.D., C. P. Magill et S. P. Jackson (2001). Basal and regulated transcription in *Archaea*. *Biochemical Society Transaction.* **29**: 392-393.
15. Benincasa, M., A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**: 1–8.
16. Bergström S., H. Theorell et H. David (1946). On a metabolic product of *Ps. Pyocyanae*, pyolopic acid active against *Myobacterium tuberculosis*. *Ark. Ken. Mineral. Geol.* **23**: 1-12.
17. Berridge R.N. J (1945). *Biochimie*. Ed. Masson, Paris, 314 p.
18. Bodour, A.A., K. P. Drees, and R. M. Maier. 2003. Distribution of biosurfactant-producing microorganisms in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3280–3287.
19. Bodour A.A, C. Gerrero-Barajas, M. Maier (2004). Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App. and Env. Microbiol.*, **10**(6): 1114-20.
20. Bognolo G. (1999), Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, **152**: 41-52.
21. Bonelo, G., A. Ventosa, M. Megias, and F. Ruiz-Berraquero (1984). The sensitivity of halobacteria to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**:341- 345.
22. Boone DR. and Castenfholz (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. New York: Springer, 600p.
23. Brown J.R., et W.F. Doullittle (1997). *Archaea* and prokaryote to eukaryote transition. *Microbiology and molecular Biology Reviews.* **61** : 456-502.
24. Boutaiba S., T. Bhatnagar, H. Hacene, D.A. Mitchell et J.C. Baratti (2006). Preliminary characterisation of lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *J.of Moleculare catalysis B:Enzymatic*, **41**: 21-26.

25. Burns D.G., P.H. Janssen, T. Iton, M. Kamekura, Z. Li, G. Jensen, F. Rogriguez-Valera, H. Bolhuis and M.L Dyal-Smith (2007). *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57** : 387-392.
26. Calvo C., F.L. Toledo, C. Pozo, M.V. Martinez-Toledo et J. Gonzalez-Lopez (2004). Biotechnology of bioemulifiers produced by microorganisms. *J. of Food, Agriculture et Environment*. **2** :238-243.
27. Campbell N.A. et J.B. Reece (2004). Biologie. Ed. de renouveau Pédagogique inc. pp : 571-591.
28. Cameron R.D., Cooper D.G et R.J Neuffeld (1988). The manoprotein of *Saccharomyces cereviciae* is an effective bioemulsifier. *App. Environ. Microbiology*, **54**:1420 -1425.
29. Cameotra S.S. et R.S. Makkar (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**: 520-529.
30. Castillo A.M., M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cown, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2005). *Natrinema ejinorensis* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**: 2683-2687.
31. Castillo A.M., M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cown, B.E. Jones, W.D. Grant and A. Ventosa (2006). *Halovivax asiaticus* gen. nov., sp. nov., a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56** : 765-770.
32. Castillo A. M., M.C. Gutiérrez, M. Kamekura, Y. Xue, Y. Ma, D.A. Cowan, B. E. Jones, W.D. Grant et A. Ventosa (2007). *Halovivax ruber* sp. Nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Lake Xilinhot, Inner Mongolia, China. *Ins J syst evol Microbiol*, **57** : 1024-1027.
33. Champion J.T., Gilkey J.C., Lamparski H., Retterer J. et Miller R.M., (1995), Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmiun and octadecane, *J. Environ. Qual.*, **24**: 19-28.
34. Christofi N. et I.B. Ivshina (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of Applied Microbiology*, **93**: 915-929.
35. Cirigliano M. C et G.M., Carman (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*». *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 747-750.

36. Cooper D. G. and D. A. Paddock (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:173–176.
37. Cooper, D. G., and B. G. Goldenberg (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 224–229.
38. Corre E. (2000). Approche moléculaire de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hyperthermales profondes et les réservoirs pétroliers. Thèse de doctorat. p : 237.
39. Cuadros-Orellana S., M. Pohlschröder et L. Durrant (2006). Isolation and characterisation of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* **57** : 151-154.
40. Cutler A. J. and R. J. Light (1979). Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. *J. Biol. Chem.* **254**:1944–1950.
41. 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 archaebacterium *Halobacterium volcanii*. *Mol Gen Genet* **198**: 270–274.
42. Dessai J.D. (1987). Microbial surfactants: evaluation, types and future applications. *J. Sci. Ind. Res.* **46**:440–449.
43. Dessai A.J., K.M. PATEL and J.D. Dessai (1988). Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons . *Curr. Sci.* **57**: 500–501.
44. Dessai J.D. et Banat (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61** : 47- 64.
45. Deana D.M., A.C. Rose et M.F. Roberts (1999). Osmoadaptation in *Archae*. *App. Environ. Microbiol.* **65** : 1815-1825.
46. Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F. et Bisailon J.G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas strain* growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *App. Environ. Microbiol.* **62** : 1908-1912.
47. Dussault H.P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, **70**: 484–485.
48. Edwards K.R. et Hayachi (1965). Structure of Rhamolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**:415-421.

49. Edwards D. A., Luthy R.G. et Liu Z. (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, *Environ. Sci. Technol.* **25**(1): 127-133.
50. Edwards K.R., Lepo J.E. et Lewis M.A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants, and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species, *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 1309-1316.
51. Eisenberg H. et J. Wachtel (1987). Structural studie of halophilic proteins, ribosomes and organelles of bacteria adapted to extremes salt concentration. *Annual reviews Biophysiological chemistry*, **16**: 67-92.
52. Elazari-Volcani S. (1940). *genus*. Type genus of the order *Halobacteriales*. [Approved Lists].
53. Elvi-Bar D., Gonzalez C., Gutierrez C. and Ramirez C. (unpublished_2006). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylyolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, **24**: 710-715.
54. Emerson D., S. Chauhan, P. Oriel, J.A. Breznak (1994). *Haloferax* sp. D1227, a halophilic Archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, **161**: 445–452.
55. Fairley D.J., D.R. Boyd, N.D. Sharma, C.C.R. Allen, P. Morgan, M.J. Larkin (2002). Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in *Archaea* via an unusual pathway involving an intramolecular migration shift (NIH shift). *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 6246–6255.
56. Falatko D.M. et Novak J.T. (1992). Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon, *Water Environmental Research*, **64** (2): 163-169.
57. Fiechter A. (1992), Biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, **10**: 3-12.
58. Francy D.S., J.M. Thomas, R.L. Raymond, C.H. Ward (1991). Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. *J. Industrial Microbiol*, **8**: 237-46.
59. Georgiou G., S. C. Lin and M. M. Sharma (1990). Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, **10**: 60–65.
60. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg, & G. B. Philips (1981). *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington, DC: *American Society for Microbiology*.

61. Ghouali W. et N. Kaci-Chaouche (2004). Essai de caractérisation des archaebactéries corrosives halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement des champs pétroliers. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie Biologique.
62. Gochnauer, M. B., S. C. Kushwaha, M. Kates, & D. Kushner (1972). Nutritional control of pigment and isoprenoid compound formation in extremely halophilic bacteria. *Arch Microbiol*, **84**: 339–349.
63. Gonzalez C., C. Gutierrez et C. Ramirez (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. Nov. An amyolytic and carbohydrate-metabolizing extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol*, **24**: 710-715.
64. Grangermard I., J.M. Bonmatin, J. Bernillon, B.C. Das et F. peypoux (1999). Lichenysins G, a novel family of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus licheniformis* IM 1307:Production, isolation and structural evaluation by NMR and mass spectrometry. *J. antibiot*, **4**: 363-373.
65. Grant W.D. et H. Larsen (1990). Extremely halophilic archaeobacteria. Order *Halobacteriales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **3**: 2216-2233. Edited by J.T. Staley, M.P. Brayan, N. Pfenning & J.G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
66. Grant W. D., M. Kamekura, T. J. McGenity, & A. VENTOSA (2001). Order I. *Halobacteriales* Grant and Larsen, A989b, 495^{VP} (effective publication: Grant and Larsen, 1989a,2216). In *Bergy's Manual of Systematic bacteriology*, 2nd edn, vol. **1**, pp: 294-299. Edited by D. R. Boone et R. D. Castenholz. New York: Springer.
67. Guerra-Santos L., O. Cappeili et A. Fiechter (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors » *Appl Microbiol. Biotechnol*, **24** : 443-448.
68. Gutierrez, C. & C. Gonzalez, (1972). Method for simultaneous detection of proteinase and esterase in extremely halophilic bacteria. *Appl Microbiol* **24**: 516–517.
69. Gutnick D. L., and Y. Shabtai (1987). Exopolysaccharide bioemulsifiers ». *Marcel Dekker, Inc., New York*, pp: 211–246
70. Haba E., A. Pinazo, O. Jauregui, M.J. Espuny, M.R. Infante, A. Manresa (2002). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids

produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**: 316–322.

71. Haba E., A. Pinazo, O. Jauregui, M.J. Espuny, M.R. Infante, A. Manresa (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial proprieties of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044» *Biotechnology and Bioengineering*, **81**: 316-322.
72. Hacène H., F. Rafa, N. Chebhouni, S. Boutaiba, T. Bhatnagar, J.C. Baratti et B. Ollivier (2004). Biodiversity of prokaryotic microflora in el Golea Salt lake, Algerian Sahara. *J. Arid Envir*, **58**: 273-284.
73. Haigh S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, *The Science of the Total Environment*, **185**:161-170.
74. Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R. (1996), Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*, **18** : 41-57.
75. Herbert R.A. (1992). A perspectives on the biotechnological potential of extremophiles. *Letters in applied microbiology*, **9**: 33-39.
76. Herman D.C., J.F. Artiola et R.M. Miller (1995). Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.*, **29**(9): 2280-2285.
77. Hezayen, F. F., B. H. A. Rehm, Tindall, & A. Steinbuchel (2001). Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**: 1133–1142.
78. Hezayen F.F., B.J. Tindall, A. Streinbüchel and B.H.A Rehm (2002). Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. Nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int. J. Syst. Evolut. Microbial*. **52**: 2271-2280.
79. Hisatsuka K., T. Nakahara, N. Sano and K. Yamada (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem*, **35**: 686–692.
80. Hisatsuka K., T. Nakahara, Y. MINODA and K. Yamada (1977). Formation of protein-like activator for n-alkane oxidation and its properties. *Agric. Biol. Chem*. **41**: 445–450.

81. Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **6**: 148-159.
82. Hommel R.K., S. Stegner, L. Weber et H.P. Kleber (1994). Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**: 192-197.
83. Horowitz, S., and W. M. Griffin (1991). Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. *J. Ind. Microbiol.* **7**: 45–52.
84. Ihara K., S. Watanab et T. Tamura (1997). *Haloarcula Argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohtaei* sp. nov., Two New Extremely Halophilic Archaea Collected in Argentina ». *International Journal of systematic Bacteriology*, p 73-77.
85. Ishigami Y., Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara et T. Kamata (1987), The pH-sensitive conversion of molecular aggregates ofhamnolipid biosurfactant, *Chemistry Letters*, 763-766.
86. Itoh T., M. Kamekura, G. Teodosiu and L. Dumitru (2005). *Haloferax prahovense* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a Romanian salt lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 393-397.
87. Jarvis S.G. et M.J. Johnson (1949). Glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem.* **73**: 4124-4126.
88. Javor F.G., and M.J. Johnson (1982). A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*». *J. Am. Chem. Soc.* **71**: 4124–4126.
89. Kamekura M. and M.L. Dyll-Smith (1997). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **45**: 174-179.
90. Kamekura M. (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*. **2**: 289-295.
91. Kamekura M. et M. Kates (1999). Structural diversity of members of *Halobacteriaceae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**: 969-972.
92. Kappeli O., M. Muller and A. Fiechter (1979). Chemical and structural alterations at the cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacteriol.* **133**: 952–958.
93. Kawakami Y., T. Ito, M. Kamekura et M. Nakayama (2005). Ca²⁺- Dependent Cell Aggregation of Halophilic Archaeon, *Halobacterium salinarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**(6): 681-684.

94. Kawakami Y., N. Hayashi, M. Ema et M. Nakayama (2007). Effects of Divalent Cations on *Halobacterium salinarum* Cell Aggregation. *J. Biosci. Bioengi.* **104**: 42-46.
95. Kharoub K., T. Quesada, R. Ferrer, S. Fuentes, M. Agilera, A. Boulahrouf, A. Ramos-Cormenzana et M. Monteoliva-Sanchez (2006). *Halorubrum ezzemoulense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from Ezzemoul sabkha, Algeria, 1-6.
96. Khemili A. (2005). Procedure de valorisation du pétrole brute. Séminaire. Institut Algérien du Pétrole IAP-CU. 109p.
97. Kieslich K. (1984). Biotransformation, pp: 468-473. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *biotechnology*, **6a**. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
98. Kiss Pappo T. et A. OREN (2000). Halocins can they involved in the competition between halobacteria » in Saltern Ponds *Extremophiles*, **4**: 35- 41.
99. Kitamoto D., S. Akiba C. Hioki et T. Tabuchi (1990). Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *Candida Antarctica*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1-36.
100. Kitamoto, D., H. Isoda, T. Nakahara (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**: 187–201.
101. Knoche H. W., and J.M. Shiverley (1972). The structure of an ornithine containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem*, **247**:170–178
102. Koch A.K., O. Käppemi, A. Fiechter et J. Reiser (1991), Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants, *Journal of Bacteriology*, **173**(13): 4212-4219.
103. Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wagner (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:864–870.
104. Kushner D.J. (1998). Life in high salt solute concentrations: Halophilic *Bacteria*. In microbial life in extreme environments, pp: 317- 368.
105. Lang S., and F. Wagner (1984). Bioconversion of oils and sugars to glycolipids. In N. Kosaric (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 205–227.
106. Lang S., and F. Wagner (1987). Structure and properties of biosurfactants, Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 21–47.

107. Lang S. et D., Wullbrandt (1999), Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 22-32.
108. Langer O., O. Palme, V. Wray, H. Tokuda et S. Lang (2006). Production and modification of bioactive biosurfactants. *Process Biochemistry*, **41**: 2138-2145.
109. Larpent J.P. (2000). «Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens». Edition Techniques et Documentation. pp 28.
110. Laurila M.A. (1985). Biosurfactants production by mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Departement of biotechnology, Swiss Federal Institut of technology Zurich, Switzerland. Pp 1-10 (117p).
111. Leclerc H., J.L. Gaillard et M. Simonet (1984). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doin Ed., Paris, pp : 392- 399.
112. Leclerc J.P. et D.A.A. Mossel (1989). Microbiologie de tube digestif, l'eau et les aliments. Paris, Ed. Doin, pp : 117-120, 350-354.
113. Leclerc H. (1995). Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris. pp: 27-76 ; 59-103 et 264-275.
114. Lillo, J. G. and F. Rodriguez-Valera (1990). Effects of culture conditions on poly- β -hydroxybutyric acid production of *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2517-2521.
115. Lizama R., Dyall-Smith M.L., Franzmann Y. (unpublished_2000a). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **41**: 333-350.
116. Makkar R.S. et S.S. Cameotra (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**: 428-434.
117. Mancneill S.A. (2001). Understanding the enzymology of archaeal DNA replication : Progress in form and function. *Mol. Microbiol*, **40** : 520-529.
118. Manresa M.A., J. Bbastida, M.E. Mercadé, M. Robert, C. Deanrés, M.J Espuny et J. Guinea (1991). Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, *J. of Industrial Microbiology*, **8**: 133- 136.
119. Marahiel M., W. Dendres, M. Krause, and H. Kleinkauf (1977). Biological role of gramicidin-S in spore functions. Studies on gramicidin-S negative mutants of *Bacillus brevis* 9999. *Eur. J. Biochem*, **99**: 49–52.
120. Marchal N. et Bourdon J.L (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris.

121. Marcou L. (1989). Les applications des agents de surfaces. Phénomènes d'interfaces. Agents de surfaces: principe et mode d'action. pp: 325-336.
122. Margesin R. et F.F. Shiner (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for Biotechnology in extremophiles. *J. Biotech*, **5**: 73-83.
123. Mata J.A., V. Béjar, I. Iltamas, S. Arias, P. Bressolier, R. Tallon, M.C. Urdaci, et E. Quesada (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Research in Microbiology*, **157**: 827-835.
124. Mata-Sandoval J.C., J. Karns et A. Torrents (2002). Influence of rhamnolipides and Triton X-100 on the desorption of pesticides from soils, *Environ. Sci. Technol.*, **36**(21): 4669-4675.
125. McGenity T.J. & W.D. Grant (1995). Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halobacterium trapanicum* comb. nov., and *Halobacterium lacusprofundi* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 237-243.
126. McGenity T.J., R.T. Gemmell & W.D. Grant (1998). Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom. nov.». *Int J Syst Bacteriol*, **48**: 1187-1196.
127. Mercadé M.E. et M.A. Manresa (1994). The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, *J.A.O.C.S.*, **71**(1): 61-64.
128. Mimouni N. (1995). Selection des souches microbiennes productrices de biosurfactants à partir de sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport d'avancement, n° 1. pp: 1-20.
129. Montalvo-Rodriguer R., R.H. Vreeland, A. Oren, M. Kessel, Betancourt C. and J. Lopez-Garriga (1998). *Halogeometricum borinquense* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic archaeon from Puerto Rico. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**: 1305-1312.
130. Mulligan C.N., Young R.N. et B.F. Gibbs (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, **60**: 371-380
131. Mutua L. N., and C. C. Akoh (1993). Lipase catalyzed modification of phospholipids: incorporation of n-3-fatty acids into biosurfactants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **70**:125-128.

132. Neindre B.L. (1993). Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques. **475** : 2-12.
133. Noll K.M. (1992). Archaeobacteria (*Archaea*). *Encyclopedia of microbiology*, **1**:149-160.
134. Oren A. (1983). *Halobacterium sodomense* sp. nov., a Dead Sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **33**: 381–386.
135. Oren A., P. Gurevich, T.R. Gemmell et A. Teske (1995). *Halobaculum gomorrense* gen. nov., sp. Nov., a novel extremely Halophilic Archaeon from the dead sea. *International journal of systematic bacteriology*, **4**: 747- 754.
136. Oren A., A. Ventosa et W.D. Grant (1997). Proposed Minimal Standards for Description of New Taxa in the Order *Halobacteriales*. *International Journal of systematic Bacteriology*, **47**: 233 – 238.
137. Oren A., Ventosa A., Carmen Gutierrez M. et M. Kamekura (1999). *Haloarcula quadrata* sp. Nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *International Journal of systematic Bacteriology*, **49**: 1149-1155.
138. Oren A. et A. Ventosa (2000). International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of *Halobacteriaceae*». *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1405-1407.
139. Oren A., R. Elevi, S. Watanabe, K. Ihara, et A. Corcelli (2002). *Halomicrobium mukohataei* gen. Nov., comb. Nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei* ». *International Journal of systematic and evolutionary Microbiology*, **52**: 1831-1835.
140. Page C.A, Bonner J.S, S.A. Kanga, M.A. Mills et R.L. Auteurieth (1999). Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons, *Environmental Engineering Science*, **16**(6): 465-474.
141. Panagiotis L.K., N.C. Papandreou et S.J. Hamodrakas (2007). Haloadaptation: Insights from comparative modelling studies of halophilic archaeal DHFRs. *International Journal of Biological Macromolecules*, **41**: 447-453.
142. Parra J.L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M.E. Mercadé, F. Comelles and M.P. Bosch (1989). Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**: 141–145.
143. Pelmont J. (1995). Bactéries de l'environnement, adaptation physiologique». Ed. press. Universitaire de Grenoble, pp: 633-668.

144. Pepi M., A. Cesàro, G. Liut et F. Baldi (2005). An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomona sp.* ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbio. Ecol.* **53** : 157-166.
145. Perry J.J, T.J. Staley, S. Lory (2004). Microbiologie « Cours et questions de révision» Ed. Dunod, pp 397- 403.
146. Peypoux F., Bonmatin J.M et Wallach J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review *App. Microbiol. Biotechnol.* 51. pp: 553-563.
147. Pore J. (1992). Les agents de surface. Micro-émulsion, Emulsions multiples, agent de surface. *Techniques des industries des corps gras.* pp: 1-6.
148. Prescott M., J.P. Hasley et D.A. Klein (2003). Biologie. 2^{ème} Ed. Boeck Université, Paris. pp : 493-1015.
149. Rachel R. (1991). Heterotrophic marine Archaea hyperthermophile. *Microbiology* **14** : 53- 245.
150. Ratledge C. et S.G. Wilkinson (1988). Fatty acids, related and derived lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds), *Microbial lipids*, Vol. 1. Academic Press, London, pp: 23-53.
151. Razafindralambo H., M. Paquot, A. Baniel, Y. Popineau, C. Hbid, P. Jacques, et P. Thonart (1996). Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**:149–151.
152. Robert M., M.E. Mercadé, M.P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M.A. MANRESA and J. Guinea (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett*, **11**:871–874.
153. Rodriguez L., J.A. Teixeira, H.C. Van Der Mei et R. Oliveira (2006). Isolation and partial characterisation of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **53**: 105-112.
154. Ron E.Z. et E. Rosenberg (2002). Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, **3**: 249-252.
155. Rosenberg E. (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbon new markets. *Biotechnol*, **11**: 419–424.
156. Rosenberg E. et E.Z. Ron (1999). Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new Markets. *Trends Biotechnol*, **11**:419–424.

157. Ross H. N., M.D. Collins, B.J. Tindall et W.D. Grant (1981). A rapid procedure for the detection of Archaeobacterial lipids in halophilic bacteria. *Journal of general Microbiolog.* **123**: 75 – 80.
158. Savage K.N., L.R. Krumholz, A. Oren and M.S. Elshahed (unpublished_2006a). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**: 19-24.
159. Savage K.N., L.R. Krumholz, A. Oren and M.S. Elshahed (unpublished_2006b). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring ». *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**: 10- 14.
160. Skerman V.B.D., V. McGowan and P.H.A. Sneath (1980). Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **30**: 225-420.
161. Spoeckner S., V. Wray, M. Nimtz et S. Lang (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *App. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 33-39.
162. Spencer J.F.T., D.M. Spencer and A.P. Tulloch (1979). Extracellular glycolipids of yeasts. In Economic Microbiology Biology, Secondary production of metabolisms. *Economic Microbiology*, **3**: 523–540.
163. Stan-Lotter H., T.J. McGenity, A. Legat, E.B.M. Denner, K. Glaser, Stetter K. and Wanner G. (1999). Very similar strains of *Halococcus salifodinae* are found in geographically separated permo-Triassic salt deposits. *Microbiology*, **145**: 3565-3574.
164. Stuart E.S., F. Morched, M. Sremac et S. DasSarma (2001). Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic *Archaea*. *J. of Biotech.*, **88**: 119-128.
165. Stuawer O., R. Hommel, D. Haserburg et K. Leber (1987). Production of a crystalline surface. Active glycolipids by a strain *Corynebacterium apycola*. *Biotechnol.*, **6**: 259-269.
166. Tabatabaee A., M.M. Assadi, A.A. Noohi et V.A. Sajadian (2005). Isolation of biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.* **2**: 6-12.
167. Tanaka M., Y. Mukohata et S. Yuasa (2000). Differential transport properties of D-leucine and L-leucine in the archaeon, *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **46**: 376-382.

168. Thangamani S. et G.S. Shreve (1994). Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environ. Sci. Technol.*, **28**(12): 1993-2000.
169. Thanamsub B., W. pumeechockchai, A. Limtrakul, P. Arunrattiyakorn, W. Petchleelaha, T. Nitoda et H. Kanzaki (2006). Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk waste.
170. Thoma S., J.F. Larpent et J.M. Larpent (1970). Microbiologie pratique. Ed. Hermat, Paris, pp : 2-5.
171. Tindall B. J., H.N.M. Ross and W.D. Grant (1984). « *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria ». *Syst. Appl. Microbiol.* **5**: 41–57.
172. Tindall B. J. (1992). The family *Halobacteriaceae*. pp: 768–808.
173. Tindall B.J., H.N.M. Ross and W.D. Grant (2003). *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaeobacteria ». *Syst. Appl. Microbiol.*, **5**: 41-57.
174. Torreblanca M.F., G. Rodriguez-Valera, A. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura and M. Kates (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* , **8**: 89–99.
175. Tortora G.J., B.R. Funke et C.L. Case (2003). Introduction à la microbiologie. Ed. de Renouveau pédagogique Inc. pp :157- 355.
176. Van De Vossenberg J.L et W.D. Grant et W.N. Konings (1999). Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic *Archaea* have low H⁺ and Na⁺ permeability at high salt concentration. *Extremophiles*, **3**: 253-257.
177. Van Dyke M.I., H. Lee et J.T. Trevors (1991). Applications of microbial surfactants, *Biotechnol. Adv.*, **9**: 241-252.
178. Van Dyke M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee et J.T. Trevors (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil, *Can. J. Microbiol.*, **39**: 1071-1078.
179. Ventosa A. et J.J. Neito (1995). Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms. *Word. J. Microbial. Technol*, **11** : 85-94.

180. Ventosa A., M.C. Gutierrez, M. Kamekura & M.L. Dall-Smith (1999). Proposal to transfer *Halococcus turkmenicus*, *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., com. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, **49**: 131-136.
181. Velikonja J. et N. Kosaric (1993). Biosurfactant in food applications, p19–446. In N. Kosaric (ed.), Biosurfactants: production, properties, applications. *Appl. Biochem.* **23**:13–18
182. Vipulanandan C. et X. Ren (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, *Journal of Environmental Engineering*, **126**(7): 629-634.
183. Vreeland R.H., S. Straight, J. Krammes, K. Dougherty, W.D Rosenzweig and M. Kamekura (2002). *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S RNAr genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles*, **6**: 445-452.
184. Wagner F. et S. Lang (1996). Microbial and enzymatic synthesis of interfacial active glycolipids. **1**: 124-137.
185. Waino M., B.J. Tindall and K. INGVORSEN (2000). *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the *Archaea* from Great Salt Lake, Utah ». *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50** : 183-190.
186. West C.C. et J.H. Harwell (1992). Surfactants and subsurface remediation, *Environ.Sci. Technol.*, **36**(12): 2324-2330.
187. Wilkinson S. G., and L. Galbraith (1975). Studies on lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* **52**: 331–343.
188. Woese R. (1994). The must be prokaryote somewhere: Microbiology's search for it self. *Microbiological reviews*, *American of microbiology*. pp: 1-9.
189. Xin H., T. Itoh, P. Zhou, K.I. Suzuki, M. Kamekura et T. Nakase (2000). *Netrinema versiforme* sp. Nov., an extremely halophilic archeaon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *Int. J. Synst. Evol. Evol. Microbiol.* **50**: 1297-1303.
190. Xu Y., Z. Wang, Y. Xue, P. Zhou, Y. Ma, A. Ventosa and W.D. Grant (1999). *Natrialba hulunbeirensis* sp. nov. and *Natrialba chahannaoensis* sp. nov., novel haloalkaliphilic archaea from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**: 1693-1698.

191. Xue Y., H. Fan, A. Ventosa, W.D. Grant, B.E. Jones, D.A. Cowan and Y. Ma (2005). *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of haloalkaliphilic *Archaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**: 2501-2505.
192. Yakmov M.M., K.N. Timmis, V. Wray and H.L. Fredrickson (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1706–1713.
193. Zaccai G. et H. Eisenberg (1990). Halophilic proteins and the influence of solvent on protein stabilization. *Trends in Biochemical Sciences*, **15**: 333-337.
194. Zhang Y. et R.M. Miller (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(10): 3276-3282.
195. Zajic J.E. et A.Y. Mahomedy (1984). Biosurfactants intermediate in the biosynthesis of Amphipathic molecule in microbes. Chapter six in *Petroleum microbiology*. Ed. Ronald N. Atlas. pp: 221-281.

Annexes

Annexe I

Identification et taxonomie des *Archaea* halophiles extrême

D'après Oran et *al.*, l'identification et la taxonomie des halophiles aérobies de l'ordre Halobacteriales, famille *Halobacteriaceae* se fait par la réalisation des tests et des méthodes suivants :

➤ **Tests et méthodes nécessaires :**

- Morphologie des colonies ;
- Morphologie des cellules ;
- Mobilité ;
- Pigment ;
- Gram ;
- Les concentrations du sel qui permet la lyse des cellules ;
- La concentration du sel inhibitrice de la croissance ;
- Le champ de la température et du pH pour la croissance ;
- La croissance anaérobique à la présence de nitrate ;
- La croissance anaérobique à la présence d'arginine ;
- La réduction de nitrate en nitrite ;
- La production d'acides sur différentes sources de carbone ;
- La capacité de croissance sur une seule source de carbone ;
- Activité de l'oxydase et catalase ;
- Formation de l'indole ;
- Hydrolyse de l'amidon ;
- Hydrolyse de gélatine ;
- Hydrolyse de caséine ;
- Hydrolyse de Tween 80 ;
- Sensibilité aux différents antibiotiques (Novobiocine, Bacitracine, Anisomycine, Aphidicoline, Erythromycine, Pénicilline, Ampicilline, Rifampicine, Chloramphénicol, Néomycine) ;

Caractérisation des lipides polaires ;

- Type de glycolipides présents.

- Présence ou absence de phosphatidglycerosulfate.

- Le taux de G + C de ADN ;
- Séquences de nucléotides de ARNr 16S ;
- L'hybridation ADN-ADN relié à l'espèce (pour la description de l'espèce) ;

➤ **Les méthodes et les tests conseillés :**

L'observation sous microscope électronique ;

La croissance anaérobie à la présence de DMSO (diméthyl solfoxide) ou TMAO (triméthylamine N- oxyde);

L'activité de phosphatase ;

L'activité de l'uréase ;

L'activité de β - galactosidase ;

L'activité de la lysine décarboxylase ;

Présence de glycolipide dans l'enveloppe cellulaire ;

Présence de PHA (polyhydroxyalkanoate) ;

Présence de plasmides ;

Electrophorèse des protéines cellulaires.

Tableau II: Les 28 genres de la famille des *Halobacteriaceae*

Les genres d' <i>Halobacteriaceae</i>	Nombre d'espèces	Références
1. <i>Haladaptus</i>	01	Savage et al. (unpublished_2006a)
2. <i>Halalkalicoccus</i>	03	Xue et al. (2005)
3. <i>Haloacalophilium</i>	01	Lizama et al. (unpublished_2000a)
4. <i>Haloarcula</i>	43	Javor et al. (1982), Torreblanca et al. (1986)
5. <i>Halobacterium</i>	47	Elazari-Volcani (1940 ; 1957)
6. <i>Halobaculum</i>	01	Oren et al. (1995)
7. <i>Halobiforma</i>	03	Hezayen et al. (2002)
8. <i>Halococcus</i>	10	Skerman et al. (1980)
9. <i>Haloferax</i>	50	Torreblanca et al. (1986)
10. <i>Halogeometricum</i>	02	Montalvo-Rodriguez et al. (1998)
11. <i>Halomicrobium</i>	03	Oren et al. (2002)
12. <i>Halopiger</i>	01	Castillo et al. (unpublished_2006c)
13. <i>Haloplanus</i>	01	Elvir-Bar et al. (unpublished_2006), Burns et al. (2007)
14. <i>Haloquadratum</i>	01	Buruns et al. (2004 ;2007)
15. <i>Halorhabdus</i>	01	Waino et al. (2002)
16. <i>Halorubru</i>	93	Oren et ventosa (1996)
17. <i>Halosarcina</i>	01	Savage et al. (unpublished_2006b)
18. <i>Halosimplex</i>	01	Vreeland et al. (2002)
19. <i>Halostagnicola</i>	01	Castillo et al. (2006)
20. <i>Haloterrigena</i>	14	Oren et Ventosa (2000), Tindall (2003a)
21. <i>Halovivax</i>	02	Castillo et al. (2006 ;2007)
22. <i>Natrialba</i>	14	Kamekura et Dyall-Smith (1995)
23. <i>Natrinema</i>	21	McGenity et al. (1998), Tindall (2003a)
24. <i>Natronobacterium</i>	08	Tindall et al. (1984)
25. <i>Natronococcus</i>	14	Tindall et al. (1984)
26. <i>Natronolimnobius</i>	02	Itoh et al. (2005)
27. <i>Natronomonas</i>	01	Kamikura et al. (1997)
28. <i>Natronorubrum</i>	07	Xu et al. (1999)

Annexe II

Matériel utilisés

➤ Equipements

- 1 – Etuve (Incucell)
- 2 – Spectrophotomètre UV / visible (SHIMADZU)
- 3 - Autoclave (SANA CLAV)
- 4 – pH mètre (HANNA instruments)
- 5 – Agitateur –plaque chauffante (VELP scientifica)
- 6 – Vortex (VELP scientifica)
- 7 - Centrifugeuse à froid (SIGMA)
- 8 – Incubateur- agitateur (Nonotron HT)
- 9 – Tensiomètre (KRÜSS)
- 10 – Microscope photonique (NOVEX Holand)
- 11 – Loupe (NOVEX Holland)
- 12 –Balance (SCALTEC)
- 13 – Bec Bunsen (Fisher)
- 14 – Four Pasteur (SELECTA)
- 15 – Bain Marie (MEMMERT)
- 16 - Réfrigérateur

➤ Verreries et matériel en plastique

Erlenmeyer de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml,
Bêcher de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml,
Boite de Pétri en plastique,
Pipettes Pasteur,
Anse de platine,
Tubes à essai,
Lames et lamelles,
Seringues,
Sacs en plastique,
Parafilm,
Cuves de CCM,
Micropipettes,
Pincés (à bois et métallique),
Cuvettes de spectrophotomètre.

Annexe III

Composition des milieux de culture

Tableau XI : Composition chimique des milieux de culture utilisés

Composition chimique g/l	SH standard	SH standard modifié
NaCl	125	125
MgCl ₂ .6H ₂ O	160	160
K ₂ SO ₄	5	5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1	0,1
Extrait de levure	1	0,25
Casamino acide	1	0,25
Amidon	2	-
NH ₄ Cl ₂	-	0,1
KH ₂ PO ₄	-	0,01
Source de carbone (test)	-	5
Eau distillée	1000	1000
pH	7,00	7,00

Remarque :

Pour éviter la précipitation du sel, le chlorure de sodium est stérilisé séparément dans des flacons puis ajouté progressivement aux autres composants.

L'autoclavage de milieu se fait à 121°C pendant 15 min.

Pour la préparation des milieux solides, on ajoute 20g d'Agar-Agar au milieu liquide utilisé.

➤ Recherche de l'activité catalasique :

Réactif :

Eau oxygénée30
volumes

Tween 80, à 10% dans l'eau.

Mélanger à parties égales au moment de l'emploi.

Composition du réactif de Griess :

-Réactif 1 :

Acide parasulfanilique..... 0,8 g
Acide acétique100ml

-Réactif 2 :

g	α – naphtylamine	0,5
	(ou mieux diméthyl- α naphtylamine.....)	0,6g
	Acide acétique 5 N	
	100ml

➤ **La composition du milieu de culture Citrate de simmons**

Sulfate de magnésium.....	0,2g/l
Phosphate mono-ammonique.....	1g/l
Phosphate bipotassique.....	1/l
Citrate de sodium.....	2g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Bleu de bromothymol.....	0,08g/l
Agar.....	15g/l

➤ **Milieu Clark et Lubs**

Peptone trypsique ou polypeptone.....	5 à 7 g/l
Glucose.....	5 g/l
Phosphate bi potassique.....	5 g/l

➤ **La composition du milieu Urée indole**

Tryptophane.....	0,3g
KH ₂ PO ₄	0,1g
K ₂ HPO ₄	0,1g
Na Cl	0,5g
Urée.....	2g
Alcool a 95°	1 ml
Rouge de phénol à 1%.....	0,25ml
Eau distillée.....	100ml

➤ **La composition du milieu Mannitol :**

Peptone tryptique de viande.....	20 g/l
Agar.....	4g/l
<i>Mannitol</i>	2 g/l
K NO ₃	1g/l
<i>Rouge de phénol</i>	4ml

Réactifs et additifs

- α -naphthol,
- Acétate,
- Acide chlorhydrique concentré,
- Alcool,
- Benzène,
- Chloroforme,
- Disque d'oxydases,
- Eau distillée,
- Eau oxygénée 10 V,
- Eau distillée salée à 25%,
- Ethanol absolu,
- Fuchsine,
- Gasoil,
- Huile de vaseline,
- Huile à immersion,
- Molybdate d'ammonium,
- Mercure,
- Méthanol,
- NaCl,
- Poudre de Zinc,
- Réactifs de Kovacs,
- Solution de lugol,
- Solution de HCl (1N),
- Solution de NaOH (1N).
- Acide sulfurique concentré,
- Violet de gentiane.

Annexe IV

Mesure de la densité optique (spectrophotométrie)

La détermination de la biomasse dans les cultures est opérée par la mesure de la turbidité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre UV- visible. La longueur d'onde est maintenue à 600 nm (elle est retenue dans les publications).

Pour la mesure de la densité optique, on se base sur la loi de Beer-Lambert

$$A = \lg(I_0 / I) = \epsilon.l.C$$

A : densité optique.

I_0 : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière émergente.

ϵ : absorption molaire (absorption d'une solution $c = 1$ mole/l dans une cuvette de dimension de $l = 1$ cm) [l / mole. cm].

C : concentration molaire [mole/l].

l : épaisseur de la cuvette [cm].

La loi de Beer- Lambert est valable seulement pour les solutions suffisamment diluées. Dans ces conditions la courbe obtenue est une droite (la densité optique est proportionnelle au nombre de molécules absorbantes).

Principe de la centrifugeuse réfrigérée

C'est une méthode qui permet de séparer des particules d'un solvant. En biologie, ces particules sont soit des cellules, organites subcellulaires ou des macromolécules. La séparation est assurée par l'action de deux forces opposées, l'une due à la viscosité du milieu et l'autre à l'apesanteur, qui dirige vers le fond du tube.

La centrifugation peut se faire à des températures très basses pouvant aller jusqu'à -20°C .

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette technique est basée principalement sur le phénomène d'adsorption :

La migration des l'échantillons est assurée par une phase mobile (solvant ou un mélange de solvant) progresse sur le long d'une phase stationnaire (gel de silice par exemple) fixée sur une plaque en verre ou sur une feuille semi-solide de plastique ou d'aluminium. La vitesse de cette migration dépend de la nature des substances testées et de celle du solvant. Pour avoir une bonne migration, il faut :

- Sécher la plaque dans le four Pasteur pour éliminer l'humidité,
- Saturer la cuve avec le solvant ou le mélange de solvants,
- Déposer les spots à 3 cm du fond de la plaque pour éviter leur dissolution dans le solvant,
- Sécher les spots avant la déposition de la plaque dans la cuve (réaliser des répétitions).

Lorsque le solvant atteint à environ 2 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, retirer la plaque, marquer le front puis sécher.

▪ Révélation et calcul de Rf

La révélation est réalisée par la pulvérisation de la plaque par différents réactifs, à savoir le type du composé recherché (soit glycolipides, phospholipides, glucides, protéines ou lipides).

On détermine les taches et leur centre (par un crayon), puis on procède au calcul de Rf (retarding factor ou rapport frontal) d'après la formule suivante :

$$Rf = d_f / d_s$$

d_f : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache).

d_s : distance parcourue par le solvant.

Révélation des spots de glycolipides :

Dissoudre 0,5 de α -naphtol dans 100 ml de méthanol :eau (1 :1, v/v).

5 ml de H_2SO_4 concentré dans 95 ml d'éthanol 96°.

Révélation des phospholipides :

Solution A : Dissoudre 16g de molybdate d'ammonium dans 120 ml avec de l'eau distillée.

Solution B : 80 ml de la solution A, 40 ml d'acide chlorhydrique concentré, 10 ml de mercure, le mélange a été agité pendant 30 minutes puis filtré. Au moment de l'utilisation, la solution B est diluée dans un rapport 1 :3 (solution B-eau distillée).

Révélation des glucides :

Réactif de Moolish : 0,25g de α -naphtol dans 50 ml Alcool éthylique et au moment de révélation on ajoute à ce mélange 50 ml d' H_2SO_4 à 20%.

Révélation des protéines : nindrine ou la lumière ultra-violette

Révélation des lipides : la vapeur d'iode

Mesure de la tension superficielle

Le tensiomètre est représenté dans la figure suivante :

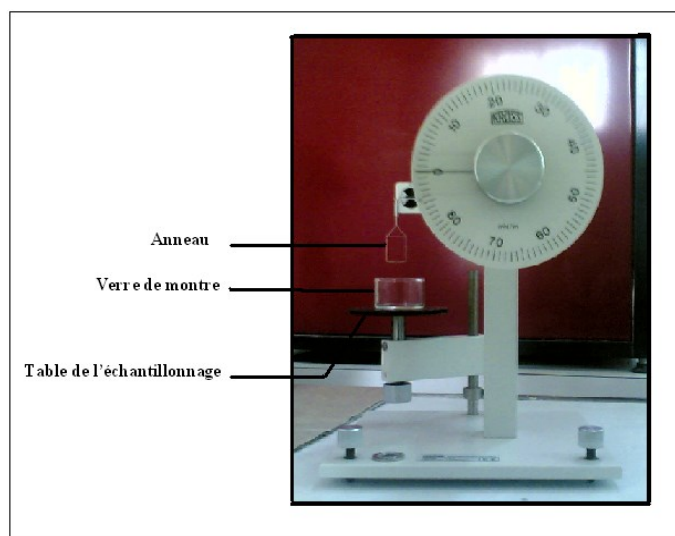


Figure n° : Tensiomètre (KRÜSS).

Pour effectuer des mesures de la tension superficielle, différentes étapes doivent être suivies :

- Etalonner l'appareil ;
- Introduire l'échantillon (10 ml du milieu de culture prélevé aseptiquement) dans un verre de montre ;

- Placer le verre de montre sur la table d'échantillonnage et faire monter la table jusqu'à ce que l'anneau immerge dans le milieu de culture (formation d'un film).
- Réaliser un réglage d'appareil jusqu'à ce que le film casse.
- La valeur sur le cadran au moment de la cassure du film correspond à la tension de surface du liquide.

Annexe V

Résultats de la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm et du pH

Tableau n° XVI: DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents sucres (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

sucres	DO à 600 nm											
	Souche A						Souche D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	T = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
Xylose	0,1	0,088	0,269	0,314	0,31	0,277	0,1	0,104	0,284	0,407	0,587	0,551
Saccharose	0,1	0,866	0,894	0,86	0,716	0,668	0,1	1,201	1,329	1,453	1,422	1,377
Galactose	0,1	0,486	0,859	0,908	0,853	0,711	0,1	0,801	1,174	1,309	1,286	1,245
Fructose	0,1	0,061	0,122	0,322	0,286	0,256	0,1	0,16	0,209	0,282	0,31	0,277
Glucose	0,1	0,553	0,65	0,812	0,797	0,603	0,1	0,873	0,97	1,112	1,223	1,203
Mannose	0,1	0,45	0,87	1,007	0,943	0,721	0,1	0,754	1,174	1,321	1,284	1,256
Cellobiose	0,1	0,946	1,042	1,214	0,893	0,766	0,1	1,152	1,348	1,333	1,266	1,22
Amidon	0,1	0,207	1,28	1,271	1,098	0,817	0,1	0,278	1,35	1,564	1,612	1,607
Maltose	0,1	0,086	0,287	0,413	0,37	0,302	0,1	0,408	0,609	0,796	0,749	0,701
Lactose	0,1	0,111	0,655	0,881	0,751	0,666	0,1	0,236	0,336	0,345	0,797	0,853
Arabinose	0,1	0,242	0,676	0,703	0,62	0,511	0,1	0,047	0,162	0,142	0,098	0,073
Salicine	0,1	0,121	0,181	0,204	0,152	0,117	0,1	0,08	0,186	0,188	0,175	0,142
Raffinose	0,1	0,091	0,145	0,162	0,133	0,098	0,1	0,298	0,438	0,433	0,391	0,368

Tableau n°XVII : Les valeurs du pH des cultures des souches bactériennes A et D cultivées sur différents sucres (40°C, 120 trs/min)

sucres	DO à 600 nm											
	Souche bactérienne A						Souche bactérienne D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
Xylose	7	6,7	5,7	5,3	4,9	4,8	7	6,8	4,4	3,9	3,7	4
Saccharose	7	6,6	5,05	5,1	5,4	5,8	7	6,5	5,1	4,8	4,6	4,7

Galactose	7	6,8	6,3	6,1	5,8	5,2	7	6,7	5,5	5,09	4,6	4,9
Fructose	7	6,5	4,7	4,6	4,2	4	7	6,2	4,6	4,2	4	4
Glucose	7	6,1	4,8	4,6	4,1	3,9	7	5,9	4,5	4,1	3,8	4,1
Mannose	7	6,7	6,4	6,2	5,8	5,4	7	6,8	6,5	6,4	6,4	6,1
Cellulose	7	6,7	6,4	4,8	4,8	4,9	7	6,1	4,6	4,3	4,2	3,8
Amidon	7	6,8	6,7	6,7	6,8	6,9	7	6,9	6,9	6,8	6,7	6,7
Maltose	7	6,9	6,8	6,7	6,5	6,3	7	6,9	6,7	6,7	6,7	6,8
Lactose	7	6,8	7,2	7,07	7	7,05	7	7,6	7,1	7,02	6,6	7
Arabinose	7	6,9	7,02	6,8	6,8	7,01	7	6,2	6,6	6,7	6,7	7
Salicine	7	6,9	7,07	6,9	7	7,04	7	7,2	6,9	6,8	7	7,3
Raffinose	7	6,9	7,05	6,6	6,6	6,8	7	6	6,04	5,9	6,3	6,2

Tableau n°XVIII : DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents alcools (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

alcools	DO à 600 nm											
	Souche bactérienne A						Souche bactérienne D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
Adonitol	0,1	0,111	0,525	0,739	0,787	0,722	0,1	0,196	0,285	0,305	0,615	0,678
Sorbitol	0,1	0,066	0,314	0,528	0,623	0,612	0,1	0,307	0,355	0,382	0,859	0,882
Mannitol	0,1	0,133	0,447	0,652	0,523	0,488	0,1	0,225	0,54	0,616	0,713	0,683
Glycerol	0,1	0,154	0,273	0,485	0,445	0,302	0,1	0,261	0,189	0,189	0,078	0,058

Tableau n°XIX : Les valeurs du pH des cultures des souches bactériennes A et D cultivées sur différents alcools (40°C, 120 trs/min)

alcools	DO à 600 nm											
	Souche bactérienne A						Souche bactérienne D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
Adonitol	7	6,8	7,02	6,8	6,8	6,7	7	7,8	7,2	7,1	6,5	6,7
Sorbitol	7	6,9	7,1	6,8	6,9	7	7	7,5	6,9	6,8	7,2	7,1
Mannitol	7	6,9	7,02	6,6	6,6	6,7	7	6,3	6,08	5,8	6	5,9
Glycerol	7	6,8	6,9	6,5	6,5	6,6	7	6,2	5,4	6,3	6,5	6,6

Tableau n°XX : DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différents acides organiques (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

acides organiques	DO à 600 nm											
	Souche bactérienne A						Souche bactérienne D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
Acide acétique	0,1	0,138	0,198	0,211	0,185	0,142	0,1	0,176	0,257	0,227	0,178	0,153
Acide citrique	0,1	0,143	0,159	0,191	0,161	0,123	0,1	0,144	0,298	0,319	0,252	0,133
Acide oxalique	0,1	0,926	1,072	0,926	0,755	0,622	0,1	0,124	0,91	0,984	0,953	0,667

Tableau n°XXI : DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D à différentes température (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

Température (°C)	DO à 600 nm											
	Souche bactérienne A						Souche bactérienne D					
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J	T = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 15J
4	0,1	0,118	0,127	0,13	0,093	0,04	0,1	0,157	0,207	0,121	0,092	0,038
25	0,1	0,167	0,225	0,287	0,199	0,135	0,1	0,176	0,237	0,271	0,188	0,115
30	0,1	0,213	0,362	0,383	0,425	0,364	0,1	0,162	0,292	0,306	0,356	0,326
35	0,1	0,46	0,84	1,059	1,256	1,309	0,1	0,351	0,755	0,938	0,993	0,977
40	0,1	0,817	1,02	1,165	1,381	1,402	0,1	0,278	1,35	1,565	1,581	1,502
50	0,1	0,161	0,173	0,126	0,091	0,049	0,1	0,142	0,17	0,127	0,108	0,072

Tableau n°XXII : DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D à différentes valeurs de pH (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

Valeurs de pH	DO à 600 nm									
	Souche bactérienne A					Souche bactérienne D				
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 11J	t = 16J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 11J	t = 16J
5	0,1	0,003	0,0258	0,0407	0,007	0,1	0,191	0,217	0,235	0,238
6	0,1	0,0334	0,202	0,0595	0,0228	0,1	0,208	0,769	0,756	0,789
6,5	0,1	0,2603	0,1029	0,0878	0,0669	0,1	0,769	0,922	0,935	0,882
7	0,1	1,318	1,378	1,358	1,318	0,1	0,899	1,35	1,393	1,408
7,5	0,1	0,7567	0,8578	0,8832	0,7355	0,1	0,653	0,706	0,935	0,925
8	0,1	0,2718	0,8864	0,7721	0,7373	0,1	0,171	0,193	0,125	0,175
8,5	0,1	0,247	0,6932	0,6762	0,5063	0,1	0,105	0,148	0,152	0,108
9	0,1	0,3989	0,6426	0,5243	0,4999	0,1	0,098	0,117	0,123	0,07

Tableau n°XXIII : DO(s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentrations de NaCl (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

NaCl (%)	DO à 600 nm													
	Souche bactérienne A							Souche bactérienne D						
	t=0J	t=3J	t=7J	t=10J	t=13J	t=15J	t=17J	t=0J	T=3J	t=7J	t=10J	t=13J	t=15J	t=17J
0	0,1	0,091	0,063	0,04	0,027	0,018	0,004	0,1	0,046	0,027	0,014	0,007	0,001	0
5	0,1	0,267	0,634	0,777	0,976	0,97	0,883	0,1	0,055	0,243	0,609	0,691	0,578	0,488
10	0,1	0,885	0,921	0,989	0,806	0,756	0,691	0,1	0,297	0,526	0,653	0,916	0,923	0,867
15	0,1	1,412	1,519	1,57	1,57	1,485	1,423	0,1	1,095	1,189	1,164	1,128	1,128	1,008
20	0,1	1,145	1,27	1,332	1,215	1,192	1,055	0,1	1,007	1,269	1,015	0,71	0,483	0,377
25	0,1	1,027	1,191	1,216	1,203	1,155	1,006	0,1	0,94	1,212	1,059	0,678	0,455	0,343
30	0,1	0,859	1,166	1,233	1,13	1,085	0,996	0,1	0,523	0,989	0,701	0,345	0,288	0,183
35	0,1	0,983	1,208	1,296	1,195	1,096	0,884	0,1	1,182	1,267	0,827	0,456	0,394	0,302

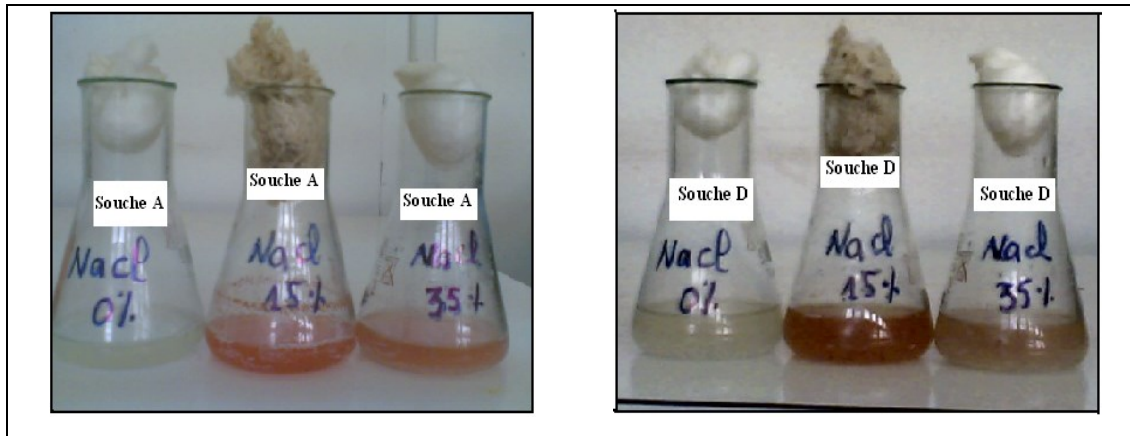


Figure représentative des pigmentations des souches bactériennes A et D à différentes concentrations de NaCl.

Tableau n°XXIV : DO (s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentrations de Mg⁺⁺ (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

Mg ⁺⁺ (M)	DO à 600 nm													
	Souche bactérienne A							Souche bactérienne D						
	t=0J	t=5J	t=7J	t=10J	t=12J	t=14J	t=17J	t=0J	t=5J	t=7J	t=10J	t=12J	t=14J	t=17J
0	0,1	0,128	0,269	0,248	0,188	0,139	0,087	0,1	0,103	0,131	0,208	0,381	0,285	0,153
0,01	0,1	0,212	0,217	0,223	0,238	0,277	0,199	0,1	0,140	0,141	0,393	0,391	0,326	0,101
0,02	0,1	0,103	0,137	0,184	0,325	0,330	0,289	0,1	0,753	0,798	0,743	0,511	0,448	0,436
0,05	0,1	0,22	0,344	0,382	0,333	0,260	0,161	0,1	0,707	0,711	0,731	0,453	0,433	0,389
0,08	0,1	0,270	0,335	0,382	0,522	0,380	0,311	0,1	0,612	0,636	0,645	0,664	0,668	0,575
0,1	0,1	0,118	0,282	0,487	0,579	0,572	0,524	0,1	0,698	0,754	0,724	0,669	0,643	0,510
0,2	0,1	0,325	0,401	0,580	0,526	0,693	0,601	0,1	0,743	0,760	0,824	0,901	0,856	0,812
0,3	0,1	0,387	0,484	0,588	0,597	0,521	0,342	0,1	0,572	0,590	0,593	0,835	1,199	1,098
0,5	0,1	0,434	0,564	0,606	0,683	0,617	0,479	0,1	1,060	1,241	1,321	1,354	1,309	1,301
0,8	0,1	0,769	0,917	0,923	0,957	0,962	0,788	0,1	0,774	0,794	0,814	1,171	1,045	0,759
1	0,1	0,635	0,907	0,903	0,860	0,855	0,688	0,1	0,733	0,796	0,808	0,836	0,557	0,373
1,2	0,1	0,107	0,129	0,140	0,196	0,201	0,092	0,1	0,602	0,659	0,445	0,443	0,429	0,394

Résultats de l'analyse quantitative de la lyse cellulaire

Tableau n° XXVI (a): Résultats de la lyse quantitative souches A

Souche bactérienne A				
Temps (heures)	DO à 600 nm			
	Témoin	Taux de lyse (%)	Essai	Taux de lyse (%) par rapport au témoin
0	0,420	-	0,149	27,1
1	0,417	0,3	0,144	27,6
4	0,410	1,0	0,143	27,7
5	0,409	1,1	0,132	28,8
16	0,406	1,4	0,127	29,3
24	0,406	1,4	0,069	35,1

Tableau n° XXVI (b): Résultats de la lyse quantitative souches D

Souche bactérienne D				
Temps (heures)	DO à 600 nm			
	Témoin	Taux de lyse (%)	Essai	Taux de lyse (%) par rapport au témoin
0	0,369	-	0,171	19,8
1	0,367	0,20	0,167	20,2
4	0,367	0,20	0,141	22,8
5	0,361	0,8	0,139	23,0
16	0,360	0,9	0,129	24,0
24	0,259	1,0	0,052	31,7

Caractérisation des Biosurfactants produits

Tableau n°XXIX: DO(s) des cultures des souches bactériennes A et D sur différentes concentrations de gasoil (40°C, 120 trs/min, pH = 7)

gasoil (%)	DO à 600 nm									
	Souche bactérienne A					Souche bactérienne D				
	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J	t = 0J	t = 3J	t = 7J	t = 10J	t = 13J
1	0,1	0,398	0,55	0,592	0,393	0,1	0,598	0,743	0,853	0,562
2	0,1	0,281	0,531	0,636	0,5	0,1	0,721	0,79	0,833	0,643
3	0,1	0,253	0,453	0,589	0,56	0,1	0,644	1,044	1,017	0,777
4	0,1	0,4	0,554	0,653	0,659	0,1	0,683	0,952	1,083	1,112
5	0,1	0,771	1,149	1,221	1,25	0,1	0,601	1,086	1,187	1,264
6	0,1	0,376	0,433	0,501	0,339	0,1	0,523	1,003	1,036	0,904

Résultats de la tension superficielle

**Tableau n°XXX : Résultats de mesure de la tension superficielle (T.S)
au cours de temps des deux souches bactériennes A et D**

Temps (jours)	Souche A	Souche D
	T.S (mN /m) à 40 °C	T.S (mN/m) à 40°C
0	61,5	61,5
3	52,5	57,2
4	45	55,9
5	43,2	53,3
6	49,0	52,7
7	41,1	45,2
8	37,6	43,9
9	36,9	39,2
10	30,1	37,6
11	28,00	34,00

Résultats de l'étude de la relation entre les différents paramètres

**Tableau n°XXXI : Valeurs des résultats de la variation de la densité
optique, l'index d'émulsification, le pH et la tension superficielle au cours
de temps**

(Souches bactériennes A et D)

Temps (jours)	Souche A				Souche D			
	DO à 600nm	pH	E ₂₄ (%)	T.S (mN /m) à 40 °C	DO à 600 nm	PH	E ₂₄ (%)	T.S (mN/m) à 40°C
0	0,133	7,05	00,0	61,5	0,067	7,05	0,00	61,5
3	1,185	7,21	52,2	52,5	1,251	6,12	31,0	57,2
4	1,245	7,41	52,9	45	1,334	7,53	43,6	55,9
5	1,185	7,38	54,1	43,2	1,233	7,75	45,9	53,3
6	1,225	7,30	50,25	49,0	1,271	7,46	51,72	52,7
7	1,288	7,68	57,89	41,1	1,307	7,82	54,1	45,2
8	1,301	7,75	58,06	37,6	1,245	7,73	56,25	43,9
9	1,272	7,62	58,87	36,9	1,211	7,93	54,83	39,2
10	1,198	7,94	58,90	30,1	1,198	8,73	56,25	37,6
11	1,187	8,70	62,3	28,0	1,187	9,01	57,89	34,0

Résultats de la mesure d'index d'émulsification (E_{24})

Tableau n° XXXII : Valeurs de test E_{24} en fonction de la variation du pH

pH	E_{24} (%) après 1 heure	E_{24} (%) après 24 heures
2	54.54	54.54
3	68.96	68.96
4	71.87	71.87
5	64.51	64.51
6	63.33	63.33
7	62.06	63.33
8	70.96	68.51
9	100	100
10	100	91.94
11	100	92.54

Tableau n° XXXIII : Valeurs de test E_{24} en fonction des concentrations d'éthanol

Concentration d'éthanol (%)	E_{24} (%) après 1 heure	E_{24} (%) après 24 heures
0	58	58
5	69	69
10	79	74.51
25	93	91.54
50	88	84.33