

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche scientifique  
Université IBN KHALDOUN Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de science de la nature et de la vie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention de diplôme de master académique

**Domaine** : Science de la Nature et de la Vie

**Filière** : Biologie

**Spécialité** : Microbiologie Appliquée à l'Environnement

ISOTHERMES D'IMMOBILISATION DES *STREPTOCOCCUS*  
*THERMOPHILUS* SUR DES PARTICULES ARGILEUSES EN  
SUSPENSION

Présenté et soutenu publiquement par :

- Assi saada
- Azouz malika
- Zerouali soumia

Membres de jury :

**Président** : Mr Boussoum

**Examineur** : Mr Mouchara

**Promoteur** : Mr Hadj Saïd .A

**Co-promotrice** : M<sup>elle</sup> Ait abderrahim .L

Année universitaire : 2014/2015

## **Remerciement**

*Nous remercions avant tout ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a éclairé le chemin du savoir et qui nous a donné la force, le courage, la volonté et la patience d'accomplir ce modeste travail et que ses prières et sa bénédiction soient sur le premier éducateur notre prophète*

*MOHAMMED صلى الله عليه و سلم*

*En second lieu c'est avec beaucoup de respect et d'estime que nous tenons à remercier notre encadreur M<sup>er</sup> hadj Saïd .A et Co-promotrice M<sup>elle</sup> Ait abderrahim .L , pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire ainsi que pour ces discussions enrichissantes, et ces conseils.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury M<sup>er</sup> Mouchara .N et M<sup>er</sup> Boussoum .M pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions .*

*Qui a accepté de présider notre soutenance.*

*Pour avoir accepté de jury notre travail.*

*Nos remercions tous les enseignants, les responsables de laboratoire de microbiologie et biotechnologie et tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à notre formation et à la réalisation de ce travail.*

*MERCI à tous ....*

# Dédicace

*Je dédie ce travail :*

*A mon père Abdelhadi*

*A ma mère Bakhta*

*A mes sœurs Karima, Khadija, Rahaf et Rimasse*

*A mes frères Abdelkader, Mohammed, Youcef et Ibrahim*

*A tout ma famille et particulièrement Sami*

*A mes chères amis Saada, Fatima, Soumia et Zohra*

*Sans oublier Zahra et Hanane*

*A tout mes amis de spécialité de microbiologie appliquée à  
l'environnement*

**MALIKA**

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à tous ceux que j'aime et que j'estime.*

*Ames chère parents qui n'ont pas cessé de m'en courager pour  
achever ce travail.*

*Ames sœurs : Zineb, Abir, et Fatima NourElimane. Elles étaient  
toujours à mes cotés et qui m'ont*

*Beaucoup soutenus et aider.*

*Ames frères : Ayoub et Mohammed Islam.*

*Ames tantes : Rachida, Fatima, Mouchikh, Malika, Mahdjouba,  
et Aicha.*

*Ames oncles : AbdElkader, Mohammed, Houssine, Tayeb, Habib,  
Aïssa, Elhadj, Adda et M'Hamed*

*Ames cousines : Kawther, Chaïmaa B, Chaïmaa Z, Asmaa,  
AbdElkhalak, Elhadj, Meriem, Khadija et Fatima Zohra.*

*A la famille Boudia et Zerouali.*

*Ames amies : Kheira, Rabia, Malika, Saada, Fatima, Houria et  
Hanane.*

*A tous mes collègues de la promotion.*

*Soumia*



# *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A mon père Amar*

*Rien au monde ne remplace vos efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que vous consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A ma très chère mère Aïcha*

*Affable, honorable, aimable: vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Que Dieu vous accorde santé et longue vie*

*A mes chères frères Ahmed, miloud, mouhamed ,*

*A mes sœurs Naïma ,maazouza,*

*A toute la famille particulièrement ma grand-mère et ma grand-père*

*A mes chères amis Malika, fatima, Soumia, zohra, zahia .*

*A nos amis de spécialité microbiologie appliquée à l'environnement qui font notre équilibre, pour leur présence dans notre vie.*

*Saada*

# Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Introduction

## Partie bibliographique

### Chapitre I : bactéries lactiques

1. bactéries lactiques .....	02
1.1. Généralités .....	02
1.2. Origine et habitat .....	02
1.3. Classification des bactéries lactiques .....	02
1.3.1. genre <i>Streptococcus</i> .....	03
1.3.1.1. Classification des <i>Streptococcus</i> .....	03
1.3.1.2. <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	04
a. Caractéristiques de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	05
b. Utilisation industrielle de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	05

### Chapitre II : Les argiles

1. Les argiles .....	07
1.1. Définition.....	07
1.2. Classification des argiles .....	07
1.3. Les différentes familles d'argile .....	07
2. Les bentonites .....	08
2.1. Définition.....	08
2.2. Origine de la bentonite .....	08
2.3. Propriété de la bentonite.....	09
2.4. Application de la bentonite.....	09

### Chapitre III : biofilms bactérien

1. biofilms bactérien.....	11
1.1 Définition du biofilm.....	11
1.2 Formation du biofilm .....	11
1.3. Intérêts des biofilms et leurs composants .....	12
1.4. Inconvénient des biofilms.....	14

## Chapitre IV : Immobilisation des bactéries

1 .Immobilisation des bactéries .....	16
1.1. Définition.....	16
1.2. Techniques d'immobilisation cellulaire .....	16
1.2.1. Liaison covalente .....	16
1.2 .2. Le confinement et l'inclusion dans un gel .....	16
1.2.3. Adsorption à un support préformé1 .....	16
2. Généralité sur l'adsorption.....	17
2.1. Définition.....	17
2.2. types d'adsorption .....	17
2.2.1 Adsorption physique ou physisorption.....	17
2.2.2 Adsorption chimique ou chimisorption.....	17
2.4. Facteurs influençant le phénomène d'adsorption .....	18
2.5 Isothermes d'adsorption .....	18
2.5.1. Classification des isothermes d'adsorption .....	18
2.5.2. Modèles d'adsorption .....	20
a. modèle de Langmuir.....	20
b. modèle de Freundlich.....	21

## Partie expérimentale

### Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Objectif.....	23
2. Lieu et période de l'étude.....	23
3. Matériel et méthodes .....	23
3.1. Matériel.....	23
3.1.1. Appareillages et produits utilisés .....	23
3.2 Méthodologie de travail.....	24
3.2.1. Protocole expérimental.....	24
3.2.1.1. Détermination de la pureté de la souche .....	25
a .Examen macroscopique.....	25
b.Examen microscopique .....	25
c.Characteres biochimiques.....	25
d.Conservation de la souche.....	25
3.2.1.2. Préparation de la suspension d'argile.....	26
3.2.1.3. Immobilisation de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	27
a. Détermination du nombre des cellules bactériennes .....	27

b.Détermination de la vitesse de centrifugation .....	28
c.Immobilisation des <i>Streptococcus thermophilus</i> sur les particules argileuses en suspension .....	28
d.Calcul des quantités (nombre des cellules) fixées .....	28

## **Chapitre II : résultats et discussion**

1. Caractérisation morphologiques des souches .....	30
1.1. Caractérisation macroscopique .....	30
1.2. Caractérisation microscopiques .....	31
2. Caractère biochimique.....	31
2.1. Test de catalase .....	31
3. Immobilisation des <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	31
3.1. La courbe d'étalonnage .....	31
3.2. Vitesse de centrifugation .....	32
3.3. Temps de contact (argile / bactérie) .....	33
3.4. Isothermes d'immobilisation des <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	33
3.5. Modélisation de l'isotherme d'immobilisation de <i>S.thermophilus</i> sur une suspension argileuse .....	34

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

## Liste des figures

<b>Figure 01</b>	<i>Streptococcus thermophilus</i> sous microscope électronique.....	<b>04</b>
<b>Figure 02</b>	les étapes de la formation d'un biofilm microbien.....	<b>12</b>
<b>Figure 03</b>	Différents types d'isothermes d'adsorption.....	<b>19</b>
<b>Figure 04</b>	Protocole expérimental pour la détermination des isothermes d'immobilisation de <i>S. thermophilus</i> sur les particules argileuses en suspension.....	<b>24</b>
<b>Figure 05</b>	Vérification de la pureté de la souche <i>S. thermophilus</i> .....	<b>26</b>
<b>Figure 06</b>	Préparation de la suspension argileuse.....	<b>27</b>
<b>Figure 07</b>	Aspect des colonies des bactéries <i>streptococcus thermophilus</i> sur milieu solide après 24h d'incubation.....	<b>29</b>
<b>Figure 08</b>	Aspect macroscopique des bactéries <i>Streptococcus thermophilus</i> sur milieu M17 liquide.....	<b>29</b>
<b>Figure 09</b>	Aspect microscopique du <i>Streptococcus thermophilus</i> après coloration de Gram.....	<b>30</b>
<b>Figure 10</b>	Courbe d'étalonnage.....	<b>31</b>
<b>Figure 11</b>	Variations de la densité optique en fonction de différentes vitesses de centrifugation....	<b>31</b>
<b>Figure 12</b>	Temps de contact (particules argileuses- cellules bactériennes).....	<b>32</b>
<b>Figure13</b>	Isotherme d'équilibre d'immobilisation des <i>S.thermophilus</i> à $\text{ph}=6$ .....	<b>33</b>
<b>Figure 14</b>	Modèle d'isotherme de Langmuir.....	<b>34</b>
<b>Figure 15</b>	Modèle d'isotherme de Freundlich.....	<b>34</b>
<b>Figure 16</b>	Modèle d'isotherme d'Henry .....	<b>35</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b>	Classification des bactéries lactiques.....	<b>03</b>
<b>Tableau02</b>	différentes familles d'argile et leurs caractéristiques.....	<b>08</b>
<b>Tableau 03</b>	Propriétés des adsorptions physique et chimique.....	<b>18</b>
<b>Tableau 04</b>	Appareillages et les produits utilisés.....	<b>23</b>

## Liste des abréviations

**ARN** :Acide RiboNucléique

**ADN** :Acide DésoxyriboNucléique

**CO<sub>2</sub>** :Dioxyde de Carbone

**°C** :Degré Celsius

**EPS** :Exopolysaccharides

**Kcal** :kilo calorie

**Mg<sup>2+</sup>** :Magnésium

**Mn<sup>2+</sup>** : Manganèse

**mm** :Millimètre

**nm** :Nanomètre

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**UFC** :Unité Formant Colonie

**PH** :Potentiel d'Hydrogène

**RFLP** :Restriction Fragment Length Polymorphisme

**PH** : Potentiel d'hydrogène

**ml** : Millilitre

**DO** : Densité Optique

**T** : Temps

# Introduction



## Introduction

Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'application dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés .... Elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent depuis quelques années un rôle croissant en santé animale et humaine (**Loumani, 2010**).

Le biofilm est une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes facilitée par les matières polymériques qu'ils excrètent. Les biofilms offrent de nombreux avantages pour la survie et la multiplication de l'écosystème bactérien, mais posent également de gros problèmes pour l'homme et ses activités industrielles (**Alnasouri, 2010**).

L'immobilisation des cellules est une application de la biotechnologie, c'est-à-dire l'emploi des micro-organismes pour un meilleur rendement de procédés chimique, industriels, pharmaceutique et autres. Il existe plusieurs types d'immobilisation : l'adsorption, l'encapsulation et la réticulation. L'immobilisation par adsorption présente l'avantage de pouvoir être appliquée au traitement de divers effluents. Plusieurs adsorbants sont utilisés pour le traitement (**Doleyres, 2003**).

expérimentales trouvées.

Les argiles présentent un intérêt croissant car leurs applications industrielles ne cessent de se diversifier. C'est dans ce cadre, que nous avons utilisé dans ce travail, l'argile naturelle de Maghnia comme un support solide pour immobiliser les *Streptococcus thermophilus*, afin de connaître et d'étudier leurs isothermes d'équilibre par application des modèles de Langmuir et de Freundlich.

# Partie bibliographique

# Chapitre I : bactéries lactiques

## 1. bactéries lactiques

### 1.1. Généralités

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini par ORLA JENSEN (1919), et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. La fermentation est dite «homolactique» si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et «hétérolactique», si d'autres produits sont aussi présents (acide acétique, éthanol, CO<sub>2</sub>). Ce sont des bactéries exigeantes concernant les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines les glucides fermentés cibles et les sels. Elles servent à de très nombreux procédés, aussi bien la transformation du lait, que dans la fermentation des végétaux, dans l'œnologie et dans la production des produits carnés fermentés (Leveau *et al.*, 1993; Bennama, 2012).

### 1.2. Origine et habitat

Les bactéries lactiques ont pour habitat de nombreux milieux naturels, des végétaux (plantes et fruits), des animaux et des humains (cavités buccales et vaginales, fèces et dans le lait). Mais certaines espèces semblent s'adapter à un environnement spécifique et ne sont guère trouvées ailleurs que dans leurs habitats naturels (Bekhouche, 2006)

### 1.3. Classification des bactéries lactiques

Traditionnellement, les bactéries lactiques ont été classées sur la base des propriétés phénotypiques la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance à différentes températures, l'isomère de l'acide lactique produit et la fermentation des différents hydrates de carbone. Cependant, les études basées sur la comparaison des séquences de l'ARN ribosomal 16S ont montré que certains taxons générés sur la base de la caractérisation phénotypique ne concordent pas avec les relations phylogénétiques suggérées. Ainsi, certaines espèces ne sont pas faciles à distinguer par des caractéristiques phénotypiques. Par conséquent, Les méthodes de typage moléculaire, la réaction de polymérisation en chaîne utilisant des éléments répétés (repPCR), ainsi que les Restriction Fragment Length Polymorphisme (RFLP) sont extrêmement précieux pour la caractérisation et la détection des bactéries lactiques (tableau 1)(Ouahghiri, 2009)

**Tableau 1:** Classification des bactéries lactiques (**Bergey's Manuel, 2001**).

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
Firmicutes	Bacillales	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i> <i>Para lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>
			Aerococcaceae	<i>Aerococcus</i> , <i>Abiotrophia</i> <i>Dolobicoccus</i> , <i>Eremococcus</i> <i>Facklamia</i> , <i>Globicattela</i> <i>gnavigranuml</i>
			Enterococcaceae	<i>Atopobacter</i> , <i>Enterococcus</i> <i>Melissococcus</i> , <i>Vagococcus</i>
			Carnobacteriaceae	<i>Alloiococcus</i> , <i>Agitococcus</i> <i>Alkalibacterium</i> , <i>Desemzia</i> <i>Carnobacterium</i> , <i>Dolosigranulum</i> <i>Granulicatella</i> , <i>Isobaculum</i> <i>Lactosphaera</i> , <i>Trichococcus</i> <i>Marinilactibacillus</i>
			Leuconostocaceae	<i>Oenococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>Weissella</i>
			Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i>

### 1.3.1. genre *Streptococcus*

Les *Streptococcus* sont très fréquents dans l'industrie alimentaire comme contaminant et surtout comme agents de fermentation homolactique (avec production d'acide lactique de type dextrogyre). Ils sont très exigeants sur le plan nutritionnel et se développent bien à 37 °C (Bekhouche, 2006).

#### 1.3.1.1. Classification des *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* a fait l'objet de la classification ancienne de **Sherman (1937)** qui est restée commode durant de nombreuses années dans l'attente de critères de classification

plus rigoureux. Celle-ci sur les caractères hémolytiques et culturaux, reconnaissait 4 groupes écologiques (Leclerc *et al.* 1995).

- **Le groupe pyogène** : représenté par l'espèce *S. Pyogenes* pathogène pour l'homme.
- **Le groupe viridans** : comprenant des espèces  $\beta$ -hémolytiques, hôtes habituels de la cavité orale humaine.
- **Le groupe lactique** : avec des espèces communes du lait de vache.
- **Le groupe entérocoque** : qui rassemble les espèces d'origine intestinal

### 1.3.1.2. *Streptococcus thermophilus*

*S. thermophilus* se retrouve au sein du groupe "salivarius". Au sein du genre *Streptococcus*, c'est la seule espèce "alimentaire" parmi des espèces commensales, opportunistes et pathogènes. Elle est ainsi la seule espèce de streptocoque à être GRAS (Generally Recognized As Safe) (Chang, 2011). Pourtant, Elle est liée à d'autres streptocoques pathogènes tels que *S.pneumoniae* et *S. pyogenes*. Les gènes de la virulence (VRGs) sont absents du génome de *S. thermophilus* ou sont présents seulement comme pseudogènes (Bennama, 2012). *S. thermophilus* est l'une des bactéries lactiques thermophiles, largement employée en tant que levain dans la fabrication de certains produits laitiers fermentés tels que le yaourt (en culture mixe avec *Lb. bulgaricus*) et les fromages à pâte cuite (en culture mixe avec *Lactobacillus helveticus*), cette espèce est caractérisée par l'utilisation du glucose seul à partir du lactose, ayant pour résultat des produits fermentés contenant du galactose résiduel.



Figure 1 : *Streptococcus thermophilus* sous microscope électronique (Boudjema, 2008).

**a. Caractéristiques de *Streptococcus thermophilus***

*S. thermophilus* est une bactérie lactique thermophile anaérobie et aérotolérante dont la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 42°C. Elle se présente sous forme de cellules sphériques ovoïdes (0.7 à 0.9 µm de diamètre) en paires, en chaînettes ou en longue chaîne. C'est l'une des espèces les plus thermorésistantes car elle survit à un chauffage de 65°C pendant 30 min. Elle est halotolérante et fermentaire en produisant exclusivement de l'acide lactique. Elle dégrade le lactose et le saccharose mais attaque aussi le fructose et le glucose. Cette espèce est capable de synthétiser les exopolysaccharides (EPS) seule en monoculture, soit en association avec la souche *Lactobacillus bulgaricus*. Elle possède une β-galactosidase active en présence de cations monovalents ou divalents Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>. Elle se trouve dans le lait et produits laitiers. Elle est caractérisée par l'absence d'antigène. Elle contient environ 40% de G+C dans son ADN. (Boudjema, 2008)

**b. Utilisation industrielle de *Streptococcus thermophilus***

En industrie agro-alimentaire, *S. thermophilus* est en deuxième position derrière *Lactococcus lactis* dans le classement des bactéries lactiques utilisées. De nombreuses souches de *S. thermophilus* ont été utilisées dans les procédés agroalimentaires dont plusieurs ont été isolées et étudiées et cinq ont été séquencées (Chang, 2011; Sun et al., 2011). L'un des principaux rôles joués par *S. thermophilus* en industrie laitière est de garantir une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Cette vitesse d'acidification dépendra bien sûr de la souche utilisée, de sa vitesse de production de lactate mais aussi de son potentiel génétique par rapport au système protéolytique et à l'activité uréasique. Toutefois, l'utilisation de *S. thermophilus* ne repose pas uniquement sur la production d'acide lactique mais également à des niveaux moindres de formate, d'acétoïne, de diacétyl et d'acétaldéhyde qui participent également à la saveur du produit fini. D'autres aspects technologiques importants tels que la production d'exopolysaccharides (EPS) ou de bactériocines dépendent également du potentiel génétique de la souche employée (Mora et al., 2004). L'intégration de souches lactiques productrices d'EPS comme ferments fonctionnels dans la production d'aliments laitiers fermentés a acquis beaucoup d'intérêt. L'utilisation de polysaccharides excrétés d'une façon naturelle au cours de la production d'aliment s'avère très intéressante pour l'industrie laitière. Ces polysaccharides devraient constituer une nouvelle génération d'épaississeurs qui ont un impact direct sur les propriétés rhéologiques des produits laitiers fermentés (Bennama, 2012).

# Chapitre II : argiles



## 1. Argiles

### 1.1. Définition

Les argiles sont des produits de décomposition des roches siliceuses, par désagrégation physique et mécanique puis par altération chimique.

L'argile brute contient généralement des particules élémentaires dont le diamètre des grains est inférieur à deux micromètres ( $2\mu\text{m}$ ) qui représentent les individus cristallins (phase minérale pure), appelés minéraux argileux responsables de ses propriétés telles que le gonflement, la plasticité, et les propriétés d'adsorption (**ChauveletMonnier, 1967**).

### 1.2. Classification des argiles

Les argiles peuvent être classées en trois groupes: type 1:1, type 2:1 et 2:1:1. Leur structure est décrite ci-dessous (**Gobatet *al.*, 2003**).

- **Type 1:1**: Leur structure consiste en un feuillet tétraédrique «T» juxtaposé à un autre octaédrique «O» relié par leur base.


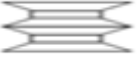

- **Type 2:1**: Ces types d'argiles appartiennent au groupe des smectites. Ils sont formés d'une couche octaédrique entourée de deux couches tétraédriques.

**Type 2:1:1**: Ils ont une couche octaédrique encadrée par deux couches tétraédriques, et un interfeuillet constitué par une couche d'octaédres ; l'équidistance caractéristique est alors d'environ  $15\text{Å}^0$ ; à ce type correspond le groupe du chlorite.

### 1.3. Différentes familles d'argile

Il existe différentes classifications des argiles, basées sur l'épaisseur et la structure du feuillet. On distingue ainsi trois groupes: la kaolinite, l'illite et la montmorillonite (**Mouaziz, 2012**). Leurs caractéristiques sont représentées dans le tableau 2.

**Tableau 2:** les différentes familles d'argile et leurs caractéristiques (Mouaziz, 2012).

Type d'argile	Feuillets Elémentaire	Nombre de feuillets par particule	Larguer en $\mu\text{m}$	épaisseurs
<b>Kaolinite</b>		100-150	1	0,1
<b>Illite</b>		10	0,3	0,01
<b>Montmorillonite (Na)</b>		1	0,1	0,001

## 2.bentonites

### 2.1. Définition

Les bentonites sont des argiles du type montmorillonite que l'on exploite en carrières. Ces minéraux sont surtout des silicates d'alumine dont la forme cristallographique est très stable et composée d'empilements de feuillets. La cohésion entre feuillets est faible, ainsi le clivage est aisé et spontané dans l'eau (Artep, 1989).

Les bentonites disponibles sur le marché sont séparées en deux groupes: les sodiques et les calciques. Elles se distinguent par (Mandroux, 2011):

- leur rapport sodium/calcium ( $> 1$  pour les sodiques et  $< 1$  pour les calciques).
- un gonflement plus important pour les sodiques.
- les sodiques adsorbent plus les protéines).

### 2.2. Origine de la bentonite

L'altération et la transformation hydrothermale de cendres des tufs volcaniques riches en verre entraînent la néoformation des minéraux argileux, qui font partie principalement du groupe des smectites. Les roches argileuses ainsi formées portent le nom de bentonites, d'après le gisement situé près de Fort Benton (Wyoming, Etats-Unis). la bentonite est un mélange naturel de minéraux, composé en majeure partie de montmorillonite (contient plus de 80%); cette dernière fut découverte pour la première fois en

1847 par Damour et Selveta, près de Montmorillon, dans le département de la Vienne (France) (**Bergya, 1978**).

### **2.3. Propriété de la bentonite:**

Les bentonites se caractérisent par une capacité élevée d'adsorption, d'échange ionique et de gonflement, ainsi que par des propriétés rhéologiques particulières (thixotropie). La bentonite a la propriété de gonfler au contact de l'eau en donnant un gel plus ou moins épais. Dans le gel de bentonite, les charges de surface sont négatives. Ceci explique la réactivité de la bentonite vis des protéines du vin (**Bouazza, 2012**).

### **2.4. Application de la bentonite**

Les bentonites ont de larges applications dans différents domaines (forage, fonderie, céramique, peinture, pharmacie, terres décolorantes, ..., etc.). La majeure partie de la bentonite exploitée dans le monde est utilisée comme liant du sable de moulage, dans l'industrie de la fonderie et aussi pour épaissir les fluides de forage (**Youcef et Achour; 2004**).

# Chapitre III : biofilms bactériens

## 1. biofilms bactérien

### 1.1 Définition du biofilm

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes contenant des bactéries et des champignons. Ces micro-organismes synthétisent et sécrètent une matrice protectrice qui lie fortement le biofilm à une surface vivante ou non. Les biofilms sont des communautés hétérogènes dynamiques en constant changement. Ils peuvent se composer d'une seule espèce de bactéries ou de champignons ou, plus fréquemment, ils peuvent être polymicrobiens, c'est-à-dire qu'ils contiennent de multiples espèces variées. Au niveau le plus élémentaire, un biofilm peut être décrit comme des bactéries englobées dans une barrière fine et visqueuse composée de sucres et de protéines. La barrière du biofilm protège les micro-organismes contre les menaces externes (**Phillips *et al.*, 2011**).

### 1.2 Formation du biofilm

La plupart des bactéries produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS : exopolysaccharides) d'origine biologique qui participent à la formation des agrégats microbiens. La composition générale de l'EPS bactérien comprend des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides, phospholipides et des substances organiques. Les protéines et les polysaccharides comptent pour 75–89 % de la composition des EPS du biofilm, indiquant qu'ils sont les principaux composants (**Merzougui *et al.*, 2013**). La formation d'un biofilm se déroule en cinq grandes étapes (figure 1) (**Dubois *et al.*, 2006**):

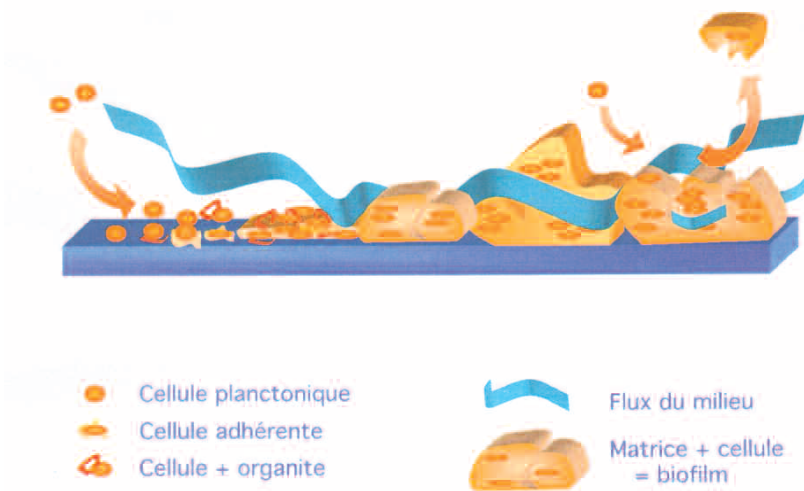
- **Etapes 1-2 : Transport** des cellules microbiennes vers la surface du support récepteur. L'adhésion faisant appel à une notion de proximité, les micro-organismes, pour pouvoir adhérer doivent venir au voisinage de la surface réceptrice. Ce transport s'effectue par sédimentation, mouvement brownien, forces de gravité, caractéristiques hydrodynamiques du fluide environnant ou encore par un mouvement autonome dans le cas de micro-organismes mobiles (bactéries ciliées ou flagellées) ;

- **Etapes 3 : adhésion initiale** d'une première couche de micro-organismes par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques entre la surface du micro-organisme et la surface réceptrice. Ces mécanismes supposent l'intervention de structures glucidiques, des adhésines, des pilis ou encore des protéines de surface.

- **Etapes 4 : consolidation** de la position du micro-organisme sur la surface

réceptrice par le biais d'organites extracellulaires et, si les cellules possèdent l'information génétique et le substrat nutritif, par la synthèse de polymères extracellulaires.

- **Etapes 5 : colonisation** de la surface par multiplication, co-agrégation cellulaire et, dans certains cas, formation d'une couche muqueuse d'exopolymères microbiens. Outre leur caractère bioadhésif, les exopolymères peuvent également servir de réservoir alimentaire pour les microorganismes et les protègent contre un grand nombre d'agressions (par exemple, par des désinfectants ou des antibiotiques)



**Figure 2:** les étapes de la formation d'un biofilm microbien (Dubois et al., 2006).

### 1.3. Intérêts des biofilms et leurs composants

Dans la nature, tout tend vers la stabilité pour économiser le maximum d'énergie. Les microorganismes tendent à accéder aux matières nutritives nécessaires pour la croissance et la multiplication via le minimum d'énergie dépensée. La production d'exopolymères dans la formation du biofilm va dans ce sens et procure à la bactérie un certain nombre d'avantages (Alnasouri, 2010):

- Renforcement des forces de cohésion dans le biofilm et de l'ensemble sur la surface.
- Absorption/adsorption de nutriments organiques et inorganiques et des produits microbiens secondaires, grâce à leurs charges électriques ou par d'autres forces physico-chimiques locales.
- Protection des cellules immobilisées contre les modifications rapides de l'environnement comme la température, le séchage et le pH, grâce à la phase liquide qui peut circuler dans les canaux d'exopolymères, l'eau ayant une grande valeur de capacité calorifique.
- Stockage d'énergie et communication intercellulaire.

- Maintien à proximité de cellules avec lesquels elles ont des relations de type neutralisme, mutualisme, commensalisme, amensalisme, proies - prédateurs ou concurrence.
- Protection envers plusieurs mécanismes antimicrobiens, comme l'application de biocides, d'antibiotiques et l'action de prédateurs.

Dans l'industrie laitière l'utilisation d'EPS est basée principalement sur les aptitudes épaississante, gélifiante, stabilisante et émulsifiante de ces composés. Ils jouent donc un rôle important dans la formation de la texture des aliments. Les bactéries lactiques mésophiles et thermophiles sont employées pour améliorer le comportement rhéologique des laits fermentés et des yoghourts. Ces souches offrent la possibilité d'augmenter la viscosité du yoghourt et de diminuer la susceptibilité à la synérèse ce qui est particulièrement intéressant pour les pays interdisant l'addition des gélifiants ou épaississants aux laits fermentés. En outre, ceci permet de diminuer la teneur en solides totaux du lait standardisé pour la fabrication de yoghourt, tout en conservant des propriétés rhéologiques et organoleptiques comparables aux yoghourts témoins produits avec des cultures non épaississantes et enrichis en solides du lait. De plus, en employant les EPS des bactéries lactiques comme bioingrédients fonctionnels dans les produits laitiers pour remplacer des agents polysaccharidiques d'autres origines, on peut produire des produits plus naturels et ainsi répondre à une demande des consommateurs pour des produits sans additifs.

Une autre application possible des bactéries lactiques productrices d'EPS est leur utilisation dans le levain. Les EPS aident à ramollir le gluten et ainsi à améliorer la texture du levain et à augmenter le volume spécifique du produit boulanger.

Appartenant à la classe des fibres alimentaires, les EPS peuvent servir de substituts à basse teneur en calories pour remplacer le gras. C'est ainsi qu'on peut produire des aliments avec moins de gras et de solides totaux, mais avec des propriétés organoleptiques comparables aux produits traditionnels. De cette façon, les EPS pourraient contribuer à offrir une source d'aliments plus sains aux consommateurs.

La technologie des cellules immobilisées est un procédé traditionnel. Cette technique comporte de nombreux avantages, mais aussi des inconvénients, comparé à des procédés utilisant des cellules libres. Les avantages majeurs sont, sans doute, une productivité augmentée de la fermentation et une rétention des cellules, même à de hauts taux de dilution. D'autres avantages sont une réutilisation possible des cellules, une protection contre des forces de cisaillement et une stabilité biologique élevée, lors de fermentations en continu. De plus, il est possible que les systèmes avec des

cellules immobilisées soient moins susceptibles aux attaques des bactériophages et à la contamination microbienne (**Bergmaier, 2002**).

#### **1.4. Inconvénient des biofilms**

Les biofilms peuvent avoir des effets négatifs pour l'homme ou ses activités selon leur existence dans l'environnement et les installations. De nombreuses études ont montré que les bactéries présentes dans les biofilms sont moins sensibles à l'action des détergents et des désinfectants que les bactéries présentes à l'état libre (**Laithier *et al.*, 2005**). Les biofilms peuvent entraîner de sévères problèmes de santé lorsqu'ils induisent l'apparition d'espèces pathogènes. Malgré les procédures de nettoyage et de désinfection, les biofilms posent des problèmes divers en médecine (biofilm de bactéries pathogènes se développant dans des systèmes digestifs, urinaire et respiratoire ou contamination d'implants ou de tubulures lors des opérations médicales). L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (contamination, mauvais goût). Les biofilms sont responsables de la dégradation de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agro-alimentaire. La formation de biofilms sur les plaques de certains échangeurs de chaleur à température basse, dans l'industrie alimentaire, peut diminuer leur capacité de transfert thermique et entraîner l'augmentation de pression sur les pompes à cause de la diminution de diamètres dans ses tuyaux (**Alnnasouri, 2010**).



Chapitre IV :  
immobilisation  
bactérienne

## 1. Immobilisation des bactéries

### 1.1. Définition

L'immobilisation cellulaire résulte en des modifications physiologiques et morphologiques par rapport aux cellules en suspension. Des modifications morphologiques ont par ailleurs été également observées avec différents micro-organismes (**Doleyres, 2003**).

### 1.2. Techniques d'immobilisation cellulaire

Pour assurer la bonne détection du signal biochimique. Les bactéries peuvent être immobilisées par des méthodes physiques ou chimiques. Les procédés classiquement utilisés consistent à fixer les cellules sur un support par adsorption ou par liaison covalente, ou à les confiner dans une matrice par inclusion.

#### a. Liaison covalente

Cette technique d'immobilisation exige la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur telles que la fonction carboxylique (-COOH), la fonction amine (-NH<sub>2</sub>), la fonction hydroxyle (-OH) ou la fonction thiol (-SH).

#### b. Confinement et l'inclusion dans un gel

La bactérie est confinée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de la bactérie, cette technique est fréquemment utilisée. Cette matrice peut être constituée d'un polymère plus ou moins rigide et synthétique (polyacrylamide par exemple) ou naturel (protéine comme la gélatine ou polysaccharide comme la cellulose, l'agar-agar ou les alginates). C'est à ce jour la seule technique qui ait un réel développement industriel. (**Gammoudi,2012**).

#### c. Adsorption à un support préformé

L'immobilisation cellulaire par adsorption à une matrice préformée ou support solide est basée sur l'affinité des cellules pour certaines surfaces. Cette technique imite l'environnement naturel des bactéries presque toujours associées à des surfaces et se développant en biofilms. (**Doleyres,2003**).

## 2. Généralité sur l'adsorption

### 2.1. Définition

L'adsorption est un phénomène physico-chimique de transfert de matière d'un fluide vers la surface d'un solide. La substance qui se fixe est appelée adsorbat, le solide qui est le siège de l'adsorption est nommé adsorbant. Ce phénomène spontané provient de l'existence de forces non compensées à la surface de l'adsorbant (**Naija, 2010**). Il se traduit en particulier par une modification de concentration à l'interface de deux phases non miscibles (gaz /solide ou liquide/solide) (**Bounour, 2009**).

### 2.2. Types d'adsorption

Les interactions adsorbat-adsorbant mettent en évidence deux types d'adsorption :

#### 2.2.1 Adsorption physique ou physisorption

L'adsorption physique est un phénomène réversible gouverné par des forces attractives de nature physique, comprenant les forces de VanderWaals. Ces forces ne détruisent pas l'individualité des molécules adsorbées et lorsqu'elles opèrent, elles correspondent à des énergies faibles qui sont de l'ordre de 10 Kcal par mole. Ce phénomène consiste essentiellement en la condensation de molécules sur la surface du solide est favorisé par un abaissement de la température (**Arris et Chebira, 2008**).

#### 2.2.2 Adsorption chimique ou chimisorption

L'adsorption chimique est un phénomène irréversible géré par des interactions chimiques qui provoquent un transfert ou une mise en commun d'électrons entre l'adsorbat et la surface de l'adsorbant. On assiste donc à une destruction de l'individualité des molécules adsorbées et la formation de nouveaux composés à la surface de l'adsorbant. Ce type d'adsorption se développe à haute température et met en jeu une énergie élevée variant de 10 à 100 Kcal par mole (**BENDOU, 2009**).

Le tableau E3 présente les principales propriétés des deux types d'adsorption.

**Tableau 3:** Propriétés des adsorptions physique et chimique (BENDOU, 2009)

propriétés	Adsorption physique	Adsorption chimique
Energie d'adsorption	5 à 10 Kcal/mole	10 à 100 Kcal/mole
Température	Basse	élevée
Nature de liaison	Physique	chimique
Energie d'activation	Non appréciable	importante
Cinétique	Trrés rapide	lente
Etat de surface	Formation de multi-couches	Formation d'une monocouche

#### 2.4. Facteurs influençant le phénomène d'adsorption

L'équilibre d'adsorption dépend de nombreux facteurs dont les principaux (Reffas, 2010).

- Pour l'adsorbant : polarité, volume poreux, surface spécifique et fonction superficielles
- Pour l'adsorbat : polarité, solubilité et poids moléculaire
- Les paramètres physico-chimiques du milieu : température et pH

#### 2.5 Isothermes d'adsorption

Tous les systèmes adsorbant/adsorbat ne se comportent pas de la même manière. Les phénomènes d'adsorption sont souvent abordés par leur comportement isotherme. Les courbes isothermes décrivent la relation existante à l'équilibre d'adsorption entre la quantité adsorbée et la concentration en soluté dans un solvant donné à une température constante (Mouaziz, 2012).

##### 2.5.1 Classification des isothermes d'adsorption

Pour décrire l'équilibre d'adsorption à l'interphase liquide/solide, il est recommandé de présenter la variation de la quantité de soluté adsorbée par unité de masse d'adsorbant ( $Q_e$ ) en fonction de la concentration restante dans la solution ( $C_e$ ) à l'équilibre à une température constante en employant l'équation suivante :

$$Q_e = (C_0 - C_e) * V / m \quad (\text{équation 1})$$

Où

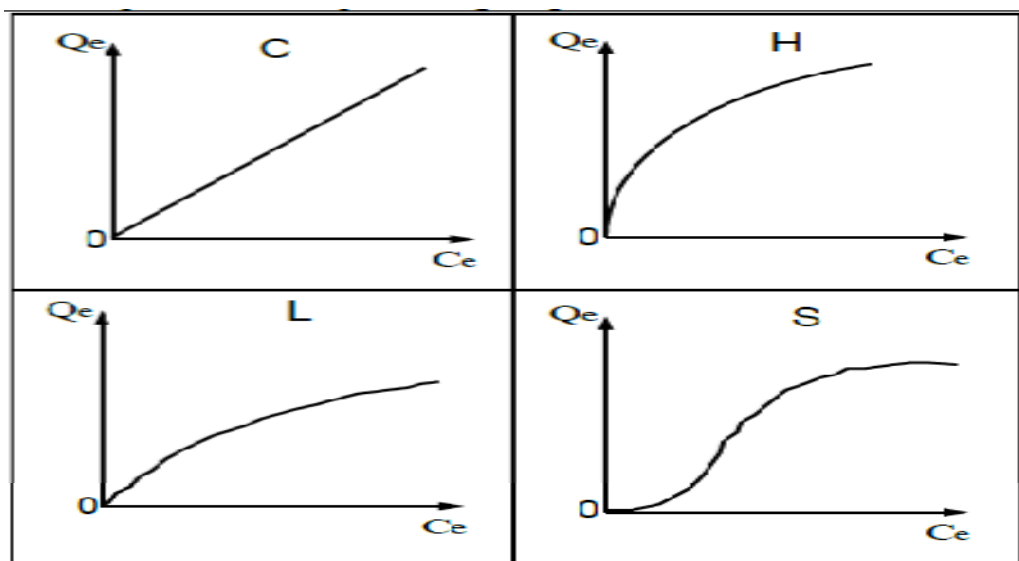
$V$  : volume de la solution (l).

$C_0$  : concentration initiale de l'adsorbat dans la phase liquide ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).

$C_e$ : concentration de l'adsorbat dans la phase liquide à l'équilibre ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).

$m$  : masse de l'adsorbant (g).

- ❖ L'allure de l'isotherme varie selon le couple adsorbat - adsorbant étudié. Les isothermes d'adsorption ont été classées par Giles et coll en quatre types principaux, comme l'indique la figure 3 (Boucif et Allam, 2008).
- Les isothermes de Types S s'obtiennent lorsque les molécules du soluté ne s'accrochent au solide que par l'intermédiaire d'un seul groupement.
- Les isothermes de type L (dites de Langmuir) se rencontrent dans le cas où l'adsorption du solvant est faible et lorsque les molécules de l'adsorbat sont orientées à plat.
- Les isothermes de type H (haute affinité) s'obtiennent lorsqu'il y a chimisorption du soluté indiquant une forte affinité entre l'adsorbat et l'adsorbant.
- Les isothermes de type C s'observent lorsqu'il y a compétition entre le solvant et le soluté pour occuper les sites de l'adsorbant



**Figure 3** : Différents types d'isothermes d'adsorption

### 2.5.2. Modèles d'adsorption

Différents modèles mathématiques ont été établis pour représenter l'équilibre d'adsorption. Les modèles les plus souvent utilisés sont :

#### a. modèle de Langmuir

Etabli en 1918, ce modèle d'adsorption en monocouche est basé sur les hypothèses suivantes et représenté par l'équation 2, sous sa forme linéaire par l'équation 3 (Amirouche et Outioua, 2011):

- La molécule est adsorbée sur un site bien défini de l'adsorbant (adsorption localisée);
- Chaque site ne peut fixer qu'une molécule;
- L'énergie d'adsorption est identique pour chaque site et indépendante de la présence de molécules adsorbées sur les sites voisins (pas d'interaction entre les molécules)

L'équation de Langmuir s'écrit comme suit :

$$Q_e = Q_m b C_e / (1 + b C_e) \text{ (équation 2)}$$

La linéarisation de cette équation donne :

$$C_e / Q_e = C_e / Q_m + 1 / b Q_m \text{ (équation 3)}$$

Où

$Q_e$ : quantité de l'adsorbant adsorbée par unité de masse de l'adsorbant ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).

$Q_m$ : capacité maximale de l'adsorbant appelée aussi capacité ultime ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).

$b$ : constante de Langmuir ( $1/\text{mg}$ ).

$C_e$ : concentration de l'adsorbant dans la phase liquide à l'équilibre ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

#### b. modèle de Freundlich

En 1926, Freundlich a établi une isotherme très satisfaisante qui peut s'appliquer avec succès à l'adsorption des gaz, mais qui a été principalement utilisée pour l'adsorption en solution dilués. Il a constaté que le mécanisme de ce processus est assez complexe, du fait de l'hétérogénéité de la surface, ce qui rend la chaleur d'adsorption variable. L'équation de Freundlich s'écrit comme suit (Amirouche et Outioua, 2011):

$$Q_e = k_f C_e^{1/n} \text{ (équation 4)}$$

**K<sub>f</sub>** et **n** sont des constantes de Freundlich qu'il faut évaluer pour chaque solution et pour chaque température et sont uniques pour un composé donné. **K<sub>f</sub>** caractérise le pouvoir adsorbant du support et **1/n** l'affinité du soluté pour l'adsorbant

L'équation de Freundlich est cependant utile sous sa forme logarithmique, soit :

$$\ln(Q_e) = \ln(K_f) + 1/n \ln C_e \quad \text{(équation 5)}$$

# Partie Expérimentale



# Chapitre I : matériels et méthodes

### 1. Objectif

L'objectif de notre travail est d'étudier les isothermes d'immobilisation de la bactérie *Streptococcus thermophilus* sur des particules argileuses (bentonite), en suspension, prélevées de la région de Maghnia (Tlemcen).

### 2. Lieu et période de l'étude

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de microbiologie et de technologies agroalimentaires de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun de Tiaret, durant la période allant du 11 février au 04 juin 2015.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Matériel

##### 3.1.1. Appareillages et produits utilisés

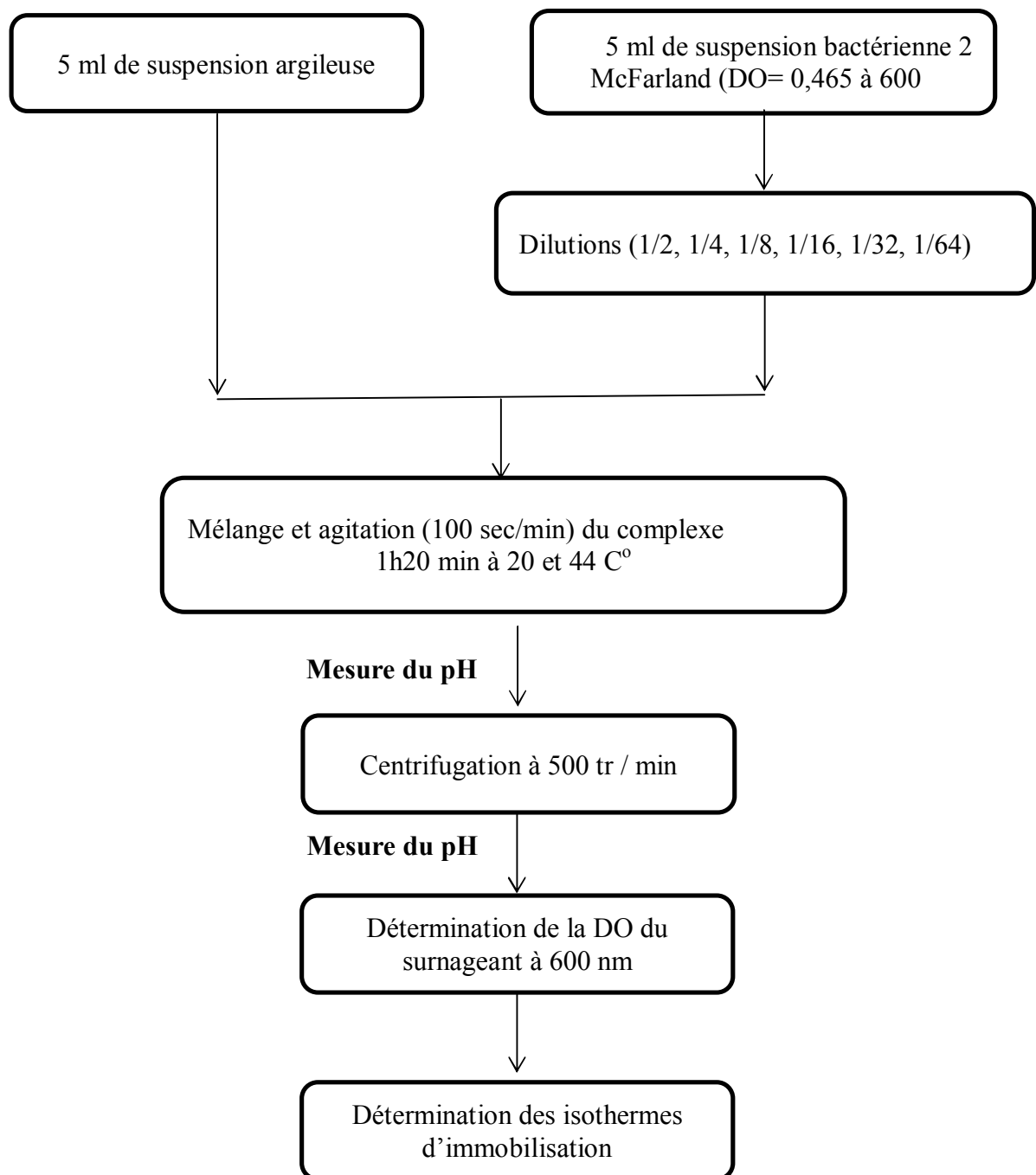
Dans le tableau 4 sont indiqués tous les appareils, produits et matériels utilisés dans ce travail.

**Tableau 4 :** Appareillages et produits utilisés

Verreries	Matériels	Produits et réactifs	Milieus de culture
-Pipette Pasteur -Eprouvette graduée -Pince -Boîtes de Petri -Tubes à essais -Bécher - Lames	-Microscope optique -Balance électrique -Etuve -Autoclave -Bec bunsen -Bain marie -Spectrophotomètre -Centrifugeuse (SIGMA) -Agitateur magnétique thermique (IKAMAG RH)	-Violet de gentiane -Fuchsine -Lugol -Alcool -Eau oxygénée -Eau distillée -argile de Maghnia	-Gélose et bouillon M <sub>17</sub>

### 3.2 Méthodologie de travail

#### 3.2.1. Protocole expérimental



**Figure4.** Protocole expérimentale pour la détermination des isothermes d'immobilisation de *S. thermophilus* sur les particules argileuses en suspension.

### 3.2.1.1. Détermination de la pureté de la souche

La souche *S. thermophilus* a été obtenue à partir de la laiterie Sidi Khaled de Tiaret. La pureté de la souche a été testée en se basant sur les caractères morphologiques et biochimiques.

- a. Examen macroscopique :** l'étude macroscopique permet de décrire les cultures bactériennes sur milieu solide et milieu liquide.

❖ **Sur milieu solide**

Cette étude consiste à décrire l'aspect, le contour, la couleur des colonies obtenues sur milieu M17 solide

❖ **Sur milieu liquide**

On révèle l'aspect de la culture.

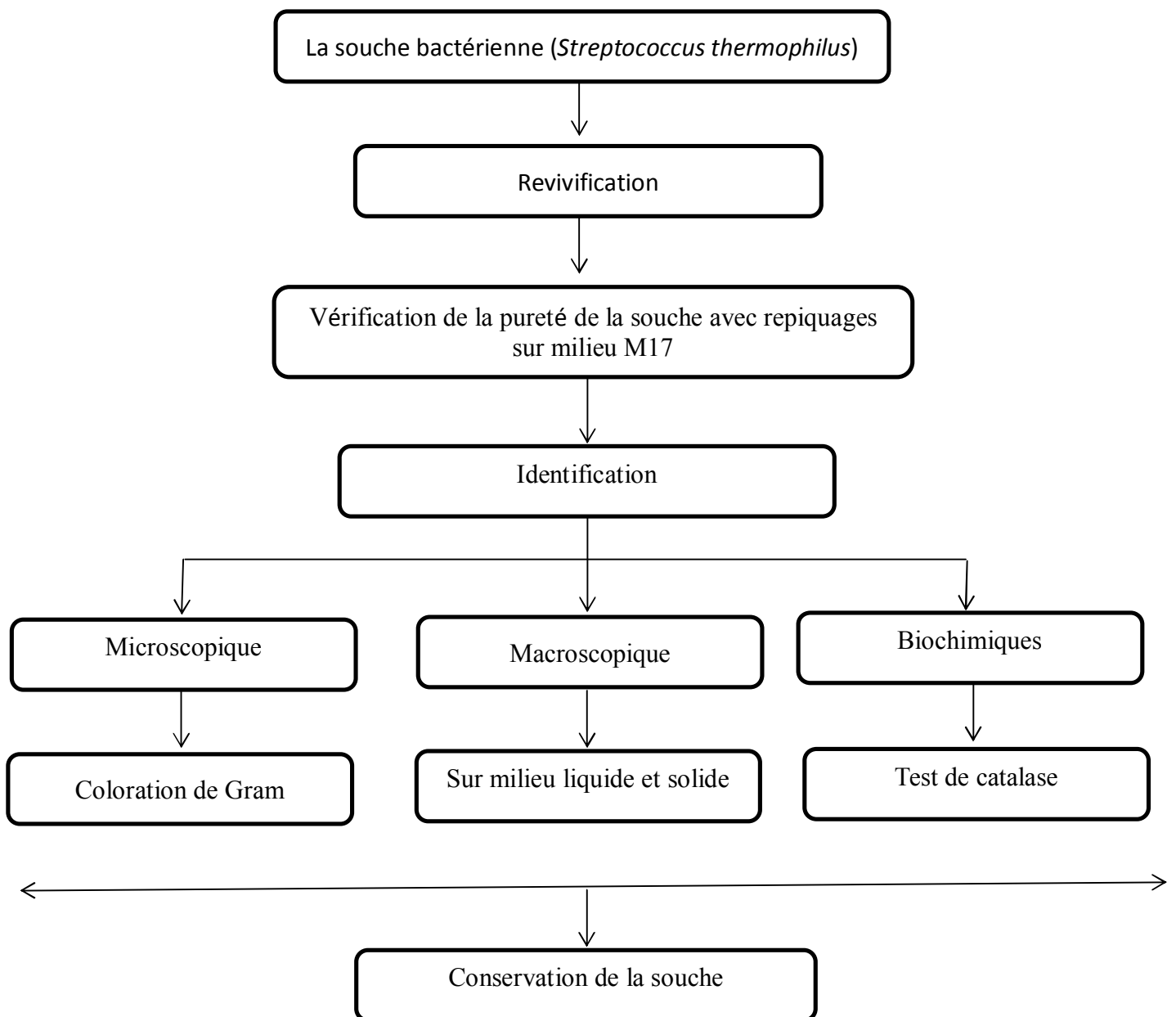
- b. Examen microscopique :** Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies développées, fixé et coloré par la méthode de Gram (coloration de Gram annexe 1).

**c. Caractères biochimiques**

- **Test de catalase:** C'est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries Gram positive.

**d. Conservation de la souche**

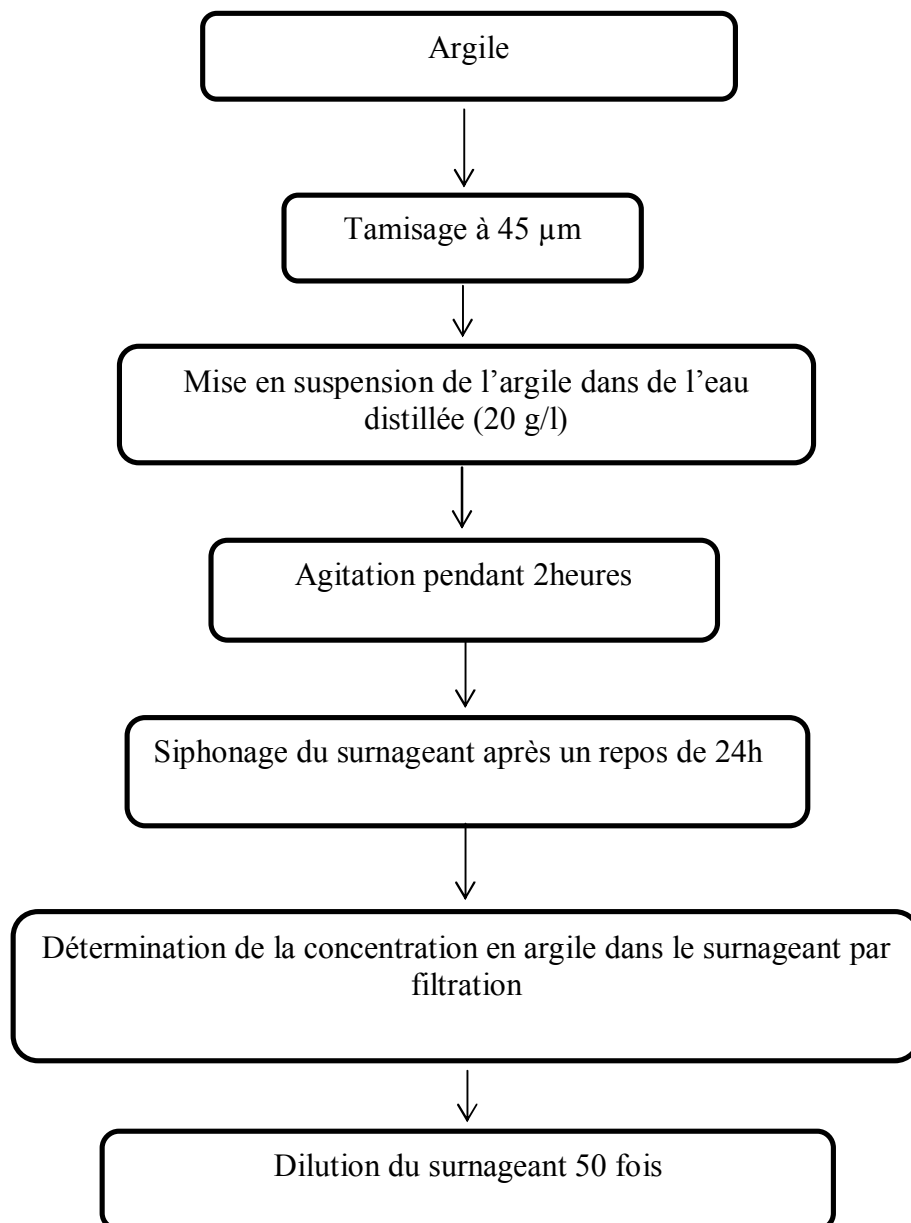
Les souches sont conservées dans le milieu M17 solide incliné dans des tubes à essai stériles. Après ensemencement et incubation en conditions optimales de 44°C pendant 24h à 48h, les tubes sont conservés au réfrigérateur à + 4°C pendant trois à quatre semaines.



**Figure 5.** Vérification de la pureté de la souche *S. thermophilus*

### 3.2.1.2. Préparation de la suspension d'argile

L'argile utilisée dans cette étude, nous a été offerte par l'entreprise ENF de Tiaret, elle provient d'un gisement près de Hammam Boughrara à Maghnia, située à 60 km à l'ouest de Tlemcen. Dans la figure 6 est indiquée la méthode de préparation de la suspension argileuse.



**Figure 06.** Préparation de la suspension argileuse

### 3.2.1.3. Immobilisation de *Streptococcus thermophilus*

#### a. Détermination du nombre des cellules bactériennes

Nous avons utilisé les standards de McFarland pour tracer une courbe d'étalonnage, qui nous permet d'en déduire le nombre de cellules bactériennes dans les suspensions bactériennes et le surnageant après centrifugation et immobilisation sur les particules d'argile.

**b. Détermination de la vitesse de centrifugation**

Afin de connaître la bonne vitesse de centrifugation nécessaire à la séparation entre les particules argileuses et les cellules bactériennes, nous avons effectué des essais de centrifugation pendant cinq minutes à différentes vitesses en fonction de la DO à 600 nm des surnageants respectivement pour la suspension en particules argileuses et celle des cellules bactériennes de la souche étudiée.

**c. Immobilisation des *Streptococcus thermophilus* sur les particules argileuses en suspension**

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer le temps de contact nécessaire à l'immobilisation des cellules sur les particules argileuses, nous avons donc réalisé une étude cinétique de fixation des cellules par mesure de la DO à 600 nm du surnageant après 10, 20, 40, 60, 80 et 100 minutes de mise en contact entre les cellules et les particules argileuses.

**d. Calcul des quantités (nombre des cellules) fixées**

La relation suivante permet de calculer, le nombre des cellules qui se fixent sur les particules d'argile en suspension (Mouaziz, 2012).

$$Q_e = (N_i - N_e) V / m$$

Où :

$Q_e$  : la quantité des cellules qui se fixent (exprimée en cellule/g de bentonite).

$N_i$  : le nombre des cellules initial (cellule/ml).

$N_e$  : le nombre des cellules résiduelles à l'équilibre (cellule/ml); obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

$V$  : volume de la solution (ml).

$m$  : poids de l'argile (g).

# Chapitre II : résultats et discussions

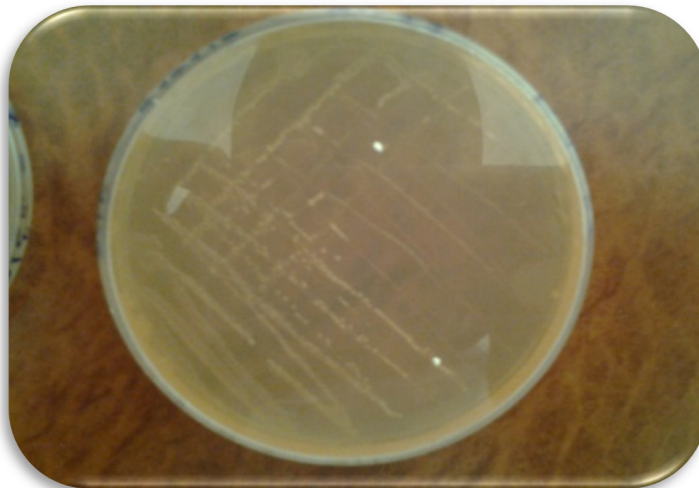


## 1. Caractérisation morphologiques des souches

L'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques servent de base à l'identification des genres et de l'espèce dans certains cas.

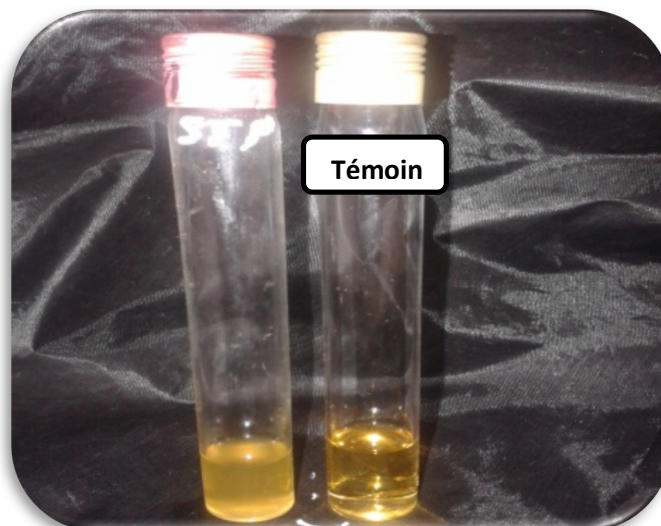
### 1.1. Caractérisation macroscopique :

- **Sur milieu solide** : l'examen macroscopique des colonies sur milieu M17 solide, après 24h d'incubation à des températures de 37°C et 44°C, montre que la souche étudiée forme des colonies de différents tailles mais généralement petites bien rond, de couleur blanchâtres, la figure suivante représente l'aspect des colonies de la bactérie sur M17 solide.



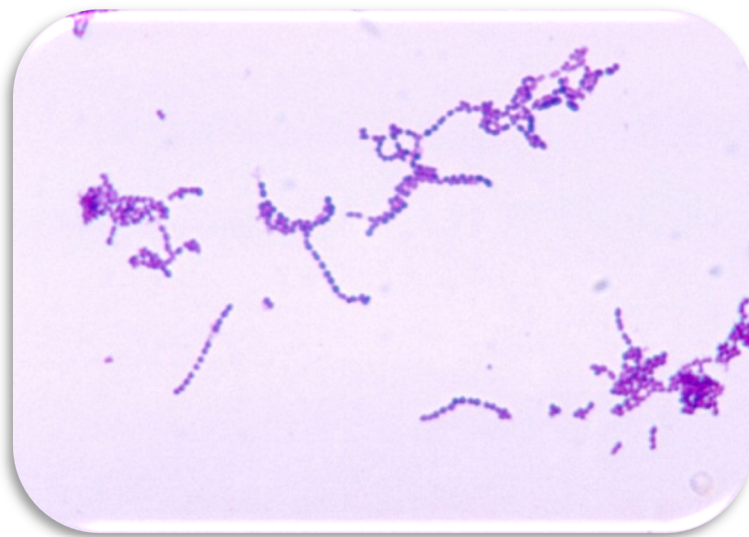
**Figure 07.** Aspect des colonies des bactéries *streptococcus thermophilus* sur milieu solide après 24h d'incubation.

- **Sur milieu liquide** : le résultat sous forme de trouble (figure 08).



**Figure 08.** Aspect macroscopique des bactéries *Streptococcus thermophilus* sur milieu M17 liquide.

**1.2. Caractérisation microscopiques :** l'observation microscopique après la coloration de gram montre que cette souche à gram positive, se présente en forme des coques disposées soit en paire soit en chainettes, la figure 09 montre l'aspect microscopique de la bactérie après coloration de gram.



**Figure 09.** Aspect microscopique du *Streptococcus thermophilus* après coloration de Gram

## 2. Caractère biochimique :

### 2.1. Test de catalase :

Ne possède pas d'activité catalytique test de catalase est négatif

## 3. Immobilisation des *Streptococcus thermophilus*

### 3.1. Courbe d'étalonnage :

La courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction du nombre des cellules bactériennes par millilitre est représentée dans la figure 10. Elle permet de déterminer le nombre de cellules bactériennes dans le surnageant après centrifugation de la suspension. Les standards de MacFarland ont été utilisés pour obtenir cette courbe d'étalonnage d'équation :  $y = 0,062x$

Où :

y : la densité optique à 600 nm

x : le nombre de cellules bactériennes par ml.

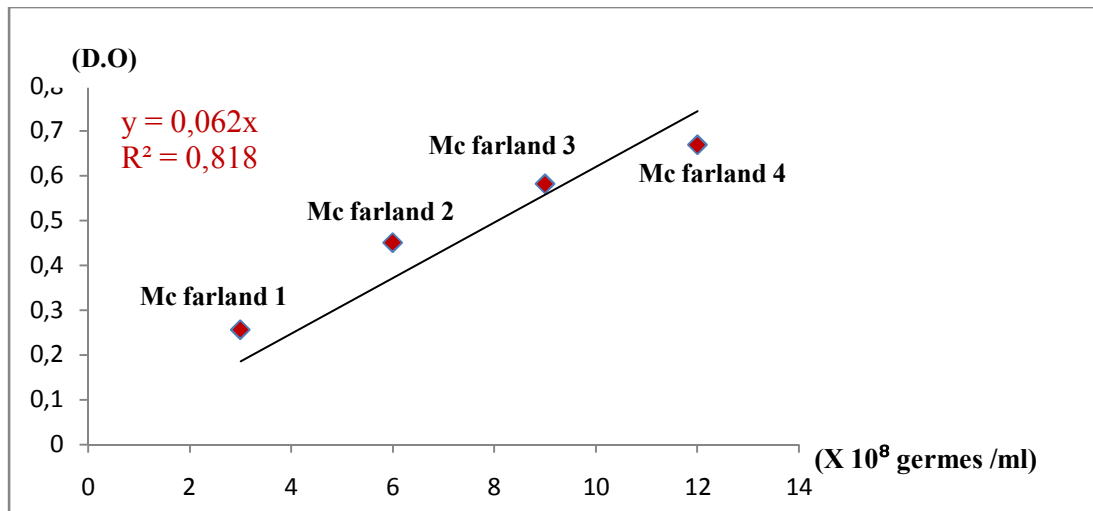
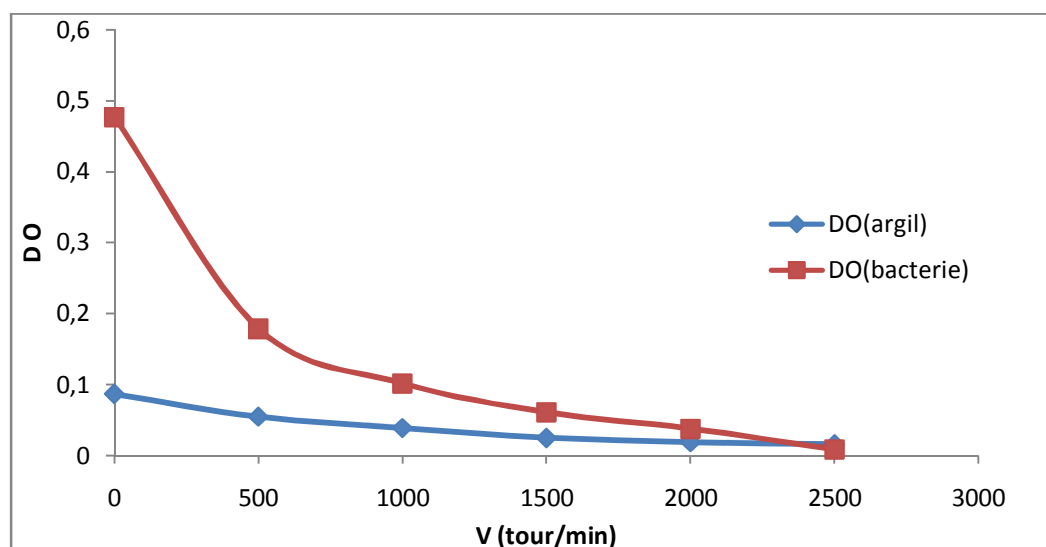


Figure 10. Courbe d'étalonnage

### 3.2. Vitesse de centrifugation

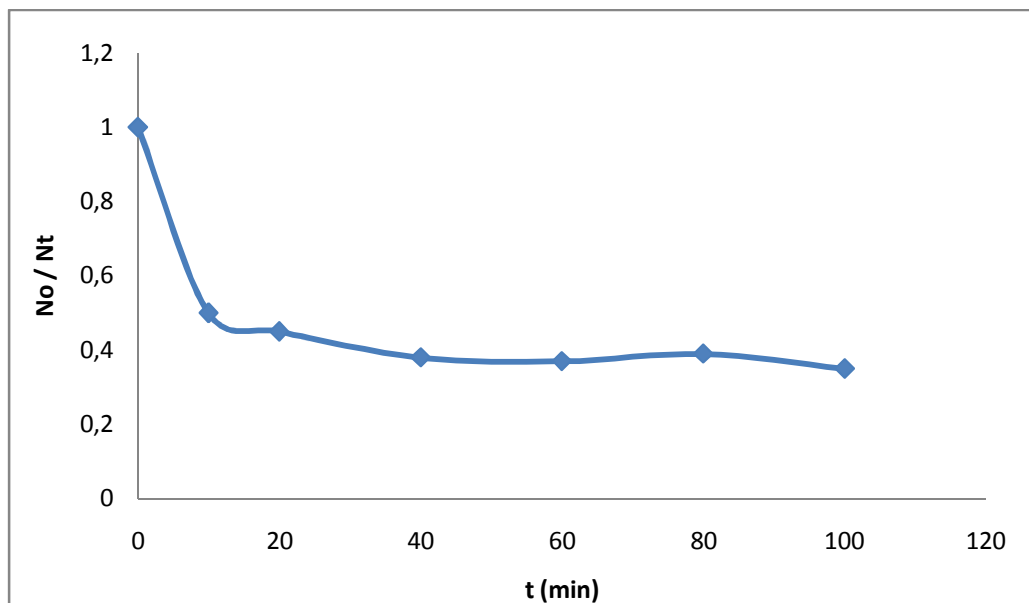
En utilisant la figure 11, qui représente nos résultats indiqués dans le tableau 1. En annexe 2, on peut remarquer qu'à la vitesse de centrifugation de 500 tr/min, elle permet une bonne séparation entre les particules argileuses et les cellules microbiennes. C'est cette vitesse que nous avons utilisé pour réaliser nos essais.



**Figure11.** Variations de la DO des suspensions en fonction de la vitesse de centrifugation.

### 3.3. Temps de contact (argile / bactérie) :

Dans la figure 12, qui représente nos résultats indiqués dans le tableau 2. En annexe 2, on peut remarquer que la fixation des cellules bactériennes sur les particules argileuses en suspension devient stable à partir de 40 minutes, pour s'assurer de l'équilibre de fixation des cellules, nous avons utilisé un temps de contact de 80 minutes pour effectuer nos essais.



**Figure12.** Temps de contact (particules argileuses- cellules bactériennes)

### 3.4. Isothermes d'immobilisation des *Streptococcus thermophilus*

La figure 13 représente les isothermes à 20 et 44 °C des équilibres d'immobilisation des cellules sur les particules argileuses. Les valeurs des résultats sont indiquées dans le tableau 5 en annexe 2. Les courbes tracées montrent qu'il existe pour chaque température un seuil du nombre de cellules en dessous duquel leur immobilisation est pratiquement inexistante et au-delà elle commence à se manifester d'une manière linéaire, ceci montre que nos essais ont été effectués avec des nombres de cellules faibles. Pour modéliser les

données d'immobilisation de *S.thermophilus* par l'argile, nous avons utilisé trois modèles, de Langmuir et de Freundlich et modèle d'Henry.

L'équation de Freundlich est cependant utile sous sa forme logarithmique :

$$\ln(Q_e) = \ln(K_f) + 1/n \ln C_e$$

La linéarisation de l'équation de Langmuir :

$$C_e / Q_e = C_e / Q_m + 1 / b Q_m$$

La linéarisation de l'équation d'Henry :

$$Q = K_H . C$$

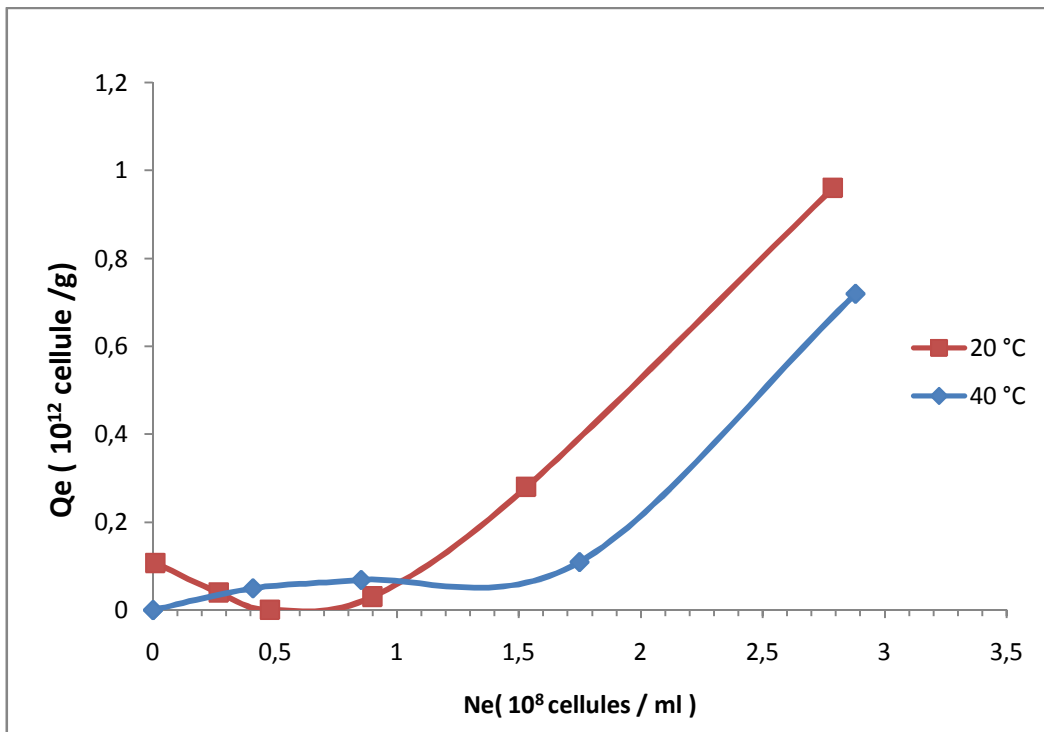


Figure13 .Isothermes d'équilibre d'immobilisation des *S. thermophilus* à pH=6

### 3.5. Modélisation de l'isotherme d'immobilisation de *S.thermophilus* sur une suspension argileuse

Les résultats de modélisation de l'isotherme d'immobilisation de *S. thermophilus* sur des particules argileuse en suspension, selon les modèles de Freundlich, de Langmuir et d'Henry sont représentés dans les figures 13,14 et 15.

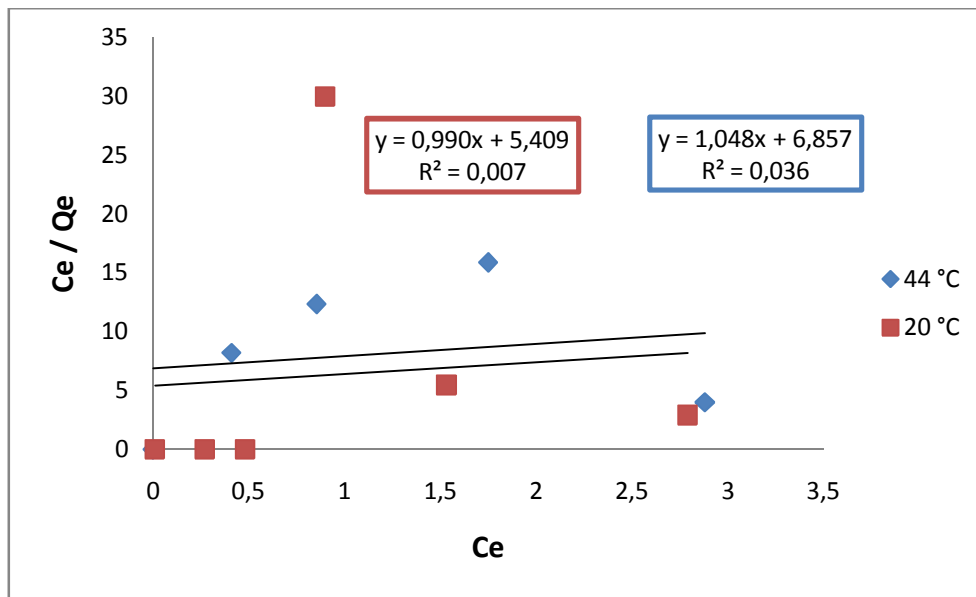


Figure 14. modèle des isothermes de Langmuir.

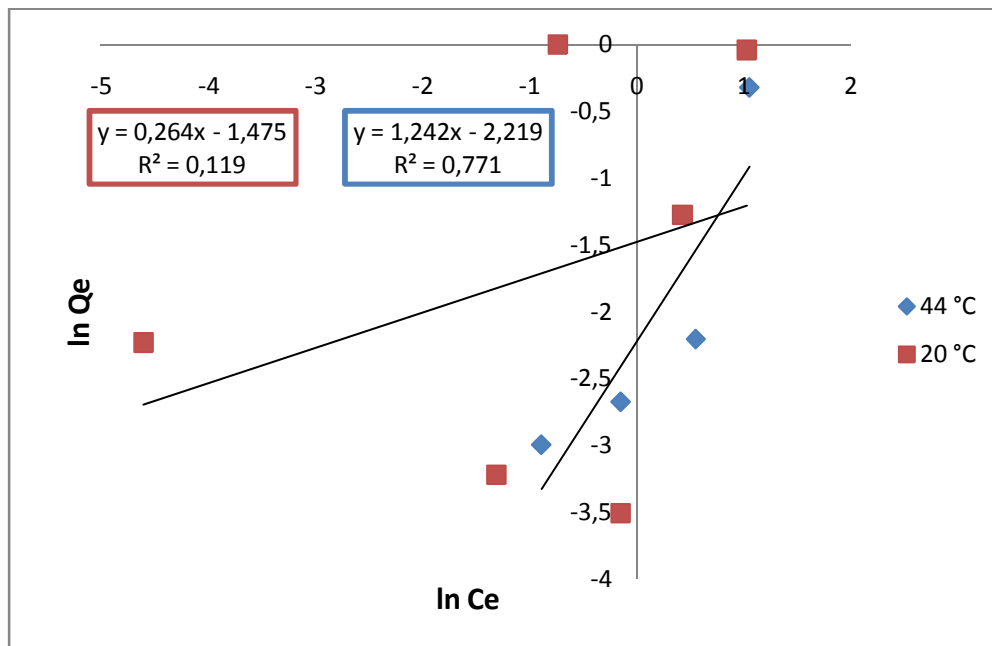
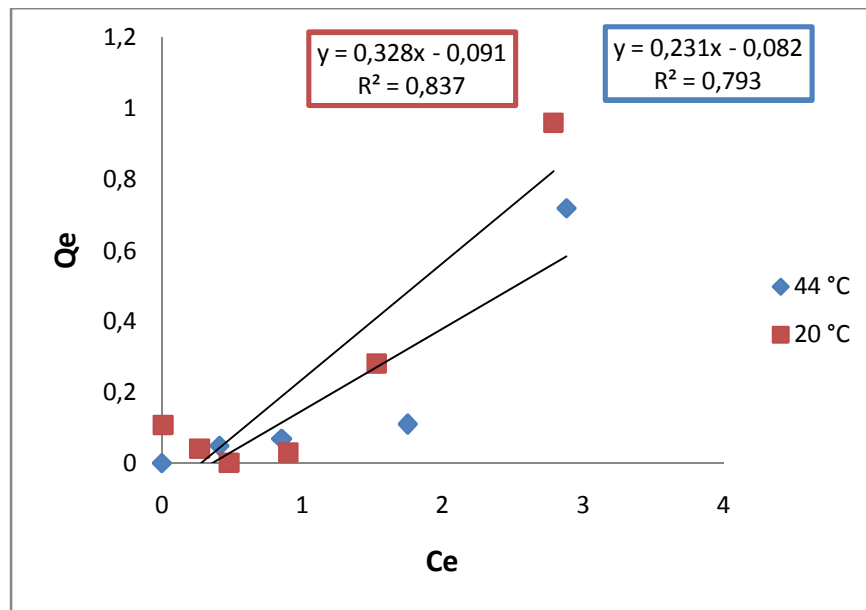


Figure 15 .modèles isothermes de Freundlich.



**Figure 16.** modèle des isothermes d'Henry.

Nous remarquons que la linéarisation des isothermes d'immobilisation du *S.thermophilus* sur l'argile ne sont pas satisfaisantes vue les valeurs des coefficients de corrélation. Nous pouvons dire que le modèle de Langmuir et le modèle de Freundlich n'est pas adéquat pour une bonne description de ces isothermes d'adsorption.

Les paramètres équationnels de modèle choisis pour la modélisation des résultats sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Les constantes d'Henry pour la fixation par la bentonite.

T°C	modèle d'Henry	
	K	R <sup>2</sup>
20 °C	0,3283	0,8283
44 °C	0,2312	0,7931

D'après les valeurs des coefficients de corrélation, nous déduisons que le modèle d'Henry peut être adéquat pour modéliser les isothermes d'immobilisation du *S. thermophilus* sur les particules argileuse en suspension.

# Conclusion



## Conclusion

Au terme du présent travail de recherche, nous avons déterminé la capacité d'immobilisation de *Streptococcus thermophilus* sur des particules argileuse en suspension. Il a été démontré que la capacité de fixation à l'équilibre augmente avec l'augmentation de la quantité de cellule microbienne,

L'établissement des isothermes d'immobilisation montre que dans les intervalles expérimentés, la modélisation des isothermes de *S.thermophilus* sur l'argile est du type S selon la classification de GILLES et COLL.

L'isotherme des immobilisations de *S.thermophilus* sur des particules argileuse en suspension est compatible avec le modèle d'Henry avec un coefficient de corrélation de 0,8033 à une température de 20°C et 0,7517 à la température 44°C.

Cette étude trouvera son usage dans les différents domaines industriels où il est question d'utiliser des cellules fixées. En perspective, il serait intéressant de poursuivre cette étude en utilisant des quantités plus importantes des cellules bactérienne, ce qui permettra de mieux étudier des isothermes de fixation.

# Références bibliographiques

## Références bibliographique

- Alnnasouri, M.(2010).**Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau.Thèse de doctorat.Ecole doctorale de Lorraine.
- Amirouche, L.Outioua.(2010).** Etude du pouvoir de sorption du Cuivre (II), du Zinc (II) et des polyphénols par les bentonites sous l'effet des irradiations micro-ondes. Mémoire de magister.Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou.
- Arris, S.Chebira. (2008).**Etude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sur des sous-produits de céréales. Thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine.
- Artep. (1989).** Spécifications des produits minéraux pour fluides de forage. Editions technique. Paris.
- Bekhouche, F. (2006) .**Bactéries lactiques du lait cru de vache et Microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes.Thèse de doctorat.Université de mentouri constantine.
- Bendou, S.(2009).** Utilisation des argiles traitées pour la décoloration des bains de teinture. Mémoire de magistère. Université M'Hamed Bougera Boumerdes.
- Bennama,R. (2012).** Streptococcus thermophilus: Isolement et recherché systématique de souches indigenes productrices d'exopolysaccharides.Thèse de doctorat.Université d'oran Es-Sénia.
- Bergmaier,D.(2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. Rhamnosus RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum.Thèse de doctorat.Uneversité laval.
- Bergey's, M. (2001).**Bergey'smanuel of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> edition. Ed: springer.
- Bergya, L. (1978).**Organisation des molécules polaires par la montmorillonite.Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Boumerdes.
- Bouazza, F. (2012).** Elimination des polluants organiques par des argiles naturelles et modifiées. Mémoire magister en biochimie. Université aboubakrbelkaid, Tlemcen.
- Boucif, A etAllam. (2008).**Etude de la Co-adsorption de deux pesticides (Durion et Metribuzine) sur un charbon actif en poudre. Mémoire d'ingénieur d'état en chimie industrielle. Ecole nationale supérieure polytechnique.
- Boudjema, K. (2008).** Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par streptococcus thermophilus. Thèse de doctorat.Université M'Hamed bougara -Boumerdés.

**Bounour. (2009).**Modélisation des isothermes d'adsorption dans le cas de : phénol et de bleu de méthyle sur le charbon actif en grain. Mémoire d'ingénieur d'état. Ecole nationale supérieure polytechnique.

**Chang, O. (2011).** Caractérisation d'une forme extracellulaire soluble de la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure de Lorraine.

**Chauvel, A. Monnier, G. (1967).** Sur la signification générale de l'analyse granulométrique en pédologie. Examens des problèmes posés par la caractérisation de la structure de certains sols tropicaux. C.R. Acad. Sci., 264, série D.

De la protéase PrtS chez *Streptococcus thermophilus* 4F44 Mise en évidence et détermination de ses sites de coupure sur les caséines. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré.

**Doleyres, Y. (2003).** Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de doctorat. Université Laval

**Dubois, B. Briandet, R et Noelle, M. (2006).** Chemical or natural tools to control microbiological contamination of surfaces. N°2 Tome 159. France.

**Gamoudi, I. (2012).** Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental. Thèse de doctorat. Université Bordeaux.

**Gobat, M. Aragno, M et Mathey, W. (2003).** Le sol vivant, 2<sup>ème</sup> édition revue et augmenté. p:67.

**Laithier, C. Chatelin, Y, M. Talon, R. Barral, J et Tormo, H et Lefrileux, Y. (2005).** Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms. 12<sup>ème</sup> Rencontres autour des recherches sur les ruminants

**Leclerc, H. Gailard, J.L et Simonent, M. (1995).** Microbiologie générale in : la bactérie et le monde bactérien. Ed: Doin, paris. Pp 442.

**Leveau, J.Y et Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec et Doc, Lavoisier. paris.

**Lmouaziz, S. (2012).** Préparation et Caractérisation des bentonites modifiées par des sels de Bis-imidazolium – Application à l'adsorption du bleu Telon. Master en Chimie. Université Aboubekr belkaid Tlemcen .Pp:24.

**Loumani, A. (2010).** Etude microbiologique et hygiénique de yaourt fabriqué et commercialisé dans l'Oust algérien. Thèse de magister .Université d'Oran.

**Mandroux, C. (2011).** Inter Loire 1 septembre 2011.

**Mora, D. Maguin, E. Masiero, M. Parint, C. Ricci, G. Manachini, P.L. et Naidja, L. (2010).** Elimination du colorant orange en solution aqueuse. par voie photochimique et par adsorption, Mémoire de magistère en chimie. Université de Mentouri Constantine.

**Ouadghiri, M. (2009).** biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés "Lben" et "Jben" d'origine marocaine. Thèse de doctorat. Université de mohammes – agdal

**Phillips, P, L. Wolcott, R, D. Fletcher, J et Schultz, G, S. (2011).** Biofilms made easy. volume1, numéro3. Pp: 1

**Reffas, A. (2010).** Etude de l'adsorption de colorants organique (Rouge nylosan et bleu de méthylène) sur des charbons actifs préparés à partir de marc de café. Thèse de doctorat. Université de Mentouri Constantine.

**Sun, Z. Chen, X. (2011).** Complete genome sequence of Streptococcus thermophiles strain ND03. J Bacteriol 193(3): 793-4.

**Youcef, L. Achour, S. (2004).** Etude de l'élimination des fluorures des eux de boisson par adsorption sur bentonite. Larhyss Journal. ISSN 1112-3680. N° 03. Université de Biskra.

# Annexe

## Annexe 1

### Coloration de gram

#### - Préparation du Frottis :

En effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme selon les indications suivantes: sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à l'ansede platine stérilisée une goutte de la colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes. Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

#### - Réalisation de la coloration :

- Coloration primaire : Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

- Mordançage au lugol: étaler le lugol et laisser agir 60 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée.

- Décoloration (rapide) à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

- Contre-coloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.

#### Résultats:

**Les bactéries Gram +:** gardent la coloration violette après décoloration par l'alcool

**Les bactéries Gram - :** décolorent par l'alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent rose ou rouge

## Annexe 2

**Tableau 1:** La densité optique de la suspension bactérienne et suspension d'argile avec différentes vitesses de centrifugation

vitesse	0	500	1000	1500	2000	2500
DO (argile)	0,087	0,055	0,039	0,025	0,019	0,016
DO (bactérie)	0,477	0,179	0,102	0,061	0,038	0,009

**Tableau 2:** la densité optique en fonction de concentration du complexe (argile, bactéries) à des températures différentes.

t (min)	0	10	20	40	60	80	100
DO	0,275	0,237	0,213	0,179	0,176	0,184	0,167
$N_0/N_t$	0,58	0,5	0,45	0,38	0,37	0,39	0,35

**Tableau 03 :** la densité optique en fonction de concentration du complexe (argile, bactéries) à des températures différentes.

DO à 20°C	0,228	0,150	0,111	0,085	0,072	0,056
DO à 40°C	0,234	0,164	0,108	0,081	0,037	0,018

**Tableau 4 :** la quantité de *S. thermophilus* fixée sur une suspension d'argile pH=6, et à une température de 20 et 44°C

Ne	2,79	1,532	0,9	0,48	0,27	0,01
Qe (20°C)	0,96	0,28	0,03	0	0,04	0,107
Ne	2,88	1,75	0,854	0,41	0	0
Qe (40°C)	0,72	0,11	0,069	0,05	0	0



### Annexe 3



Bain marie secousse



Incubateur de 44°C



Centrifugeuse



Agitateur magnétique thermique

## Annexe 4

**Tableau 5** : Paramètres équationnels des modèles de Freundlich, de Langmuir et d'Henry.

	modèle de Langmuir			modèle de freundlich			modèle d'Henry	
	Q max	b	R <sup>2</sup>	n	K	R <sup>2</sup>	K	R <sup>2</sup>
20 °C	1,01	0,18	0,00775	3,786	0,228	0,1192	0,3283	0,8283
44 °C	0,953	0,153	0,0361	0,804	0,108	0,7719	0,2312	0,7931

## Résumé

Cette étude est une pré-identification de la bactérie *Streptococcus thermophilus*, avant le fixer sur l'argile (bentonite) de Maghnia pour obtenir le complexe biofilm (la bactérie avec l'argile), ce dernier est utilisé pour des différents domaines.

Les résultats obtenus, nous ont permis de constater que les bactéries lactiques utilisées adhèrent aux particules argileuses en suspension pour former de complexe biosorbant. Mais en ce qui concerne les isothermes d'immobilisation par le complexe, les deux modèles de Langmuir et de Freundlich ne représentent pas nos valeurs expérimentales. Le modèle d'Henry peut être adéquat pour modéliser les isothermes d'immobilisation du *S. thermophiles* sur les particules argileuses en suspension, puisque la quantité de la souche est très faible.

**Mots clés :** argile, immobilisation, *Streptococcus thermophilus*, Langmuir, Freundlich, Henry.

## ملخص

هذا العمل عبارة عن دراسة تقنية لبكتيريا اللبن *Streptococcus thermophilus*, قبل تثبيتها على طين مغنية لتشكيل معقد حيوي، ليتم استخدامه في مجالات كثيرة . وقد سمحت لنا النتائج ان نرى ان بكتيريا حمض اللاكتيك المستخدمة تثبتت على جزيئات الطين لتشكيل معقد . اما فيما يتعلق بالايسوثرم للتثبيت , فان نموذجي Langmuir و Freundlich لا تمثل القيم التجريبية لدينا . ونموذج Henry فهو يمثل نسبيا القيم التجريبية وهذا نظرا لكمية البكتيريا الضئيلة .

**الكلمات المفتاحية:** الطين, التثبيت, *Streptococcus thermophilus* , Langmuir, Freundlich, Henry.