

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA 1

FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

DÉPARTEMENT DE GÉNIES DES PROCÉDES



Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de master

Option : Génie de l'Environnement

Intitulé :

Production des agents biologiques (moussants et antimicrobiens) comme candidats potentiels en détergence

Soutenu publiquement le : 18/07/2023

Présenté par :

- Benhelal Sara.
- Daheur Nour Elimen Khadidja.

Encadré par :

- Pr. Badis Abdelmalek : Promoteur
- Doctorante : Hadjala Soumia

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous remercions notre encadreur M. Badis Abdelmalek, Professeur au département de Génie des Procédés, Faculté de Technologie, Université de Blida 1 ainsi que notre Co-promotrice Mme Hadjala Soumia, Doctorante au département de chimie, faculté des sciences, Université Saàd Dahlab Blida 1, qui nous ont dirigé, encouragé et surtout aidé afin de réaliser ce travail de projet de fin d'étude.

Nos sincères considérations et nos vifs remerciements vont également aux membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce modeste mémoire de fin d'études.

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

Nos vifs remerciements vont également, à tout le personnel du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules, université Saàd Dahlab Blida 1 ainsi qu'à tous les laboratoires pédagogiques de département de génies des procédés de l'université Saad Dahlab Blida 1.

Dédicaces

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

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents, ma sœur Bouchra, mes deux frères Sadek et Abderrahmane et mes deux grand-mères.

A ma tante paternelle et son mari, mes cousines Selma, Assia et Meriem.

A toutes mes tantes et cousines maternelles.

Et enfin à mes deux grands-pères : Sadek qui nous a quitté le 01/06/2011 et Mustapha qui nous a quitté le 01/03/2017, paix à leur âme.

Sara

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

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents Abd elhamid et Lalia, à ma grande mère maternelle Fadjeria et a mon frère Abdel basset.

A mes tantes Nora, Faiza, Warda et mes oncles et toute ma famille paternelle.

A mes oncles Abdelatif, Abdeslam et Yacine et leurs femmes Lamia, Naima et Zahia.

A mes tantes Djamila, Souad et Samia et leurs maris et a toute ma famille maternelle.

A mes cousines : Chahrazed, Fatma Zohra, Sara, Inès, Ikram, Amira, Amina, Bouchera, Meriem, Nada, Zineb, Asma, Nadia, Hanane, Asia, Maria, Nesrine, Rym, Basma, Djamaa, Louiza, Hanan, Hacena, Rania, Sahar, Nadjiba, Amel, Hadjer, Houda, Sara, kawether.

A mes cousins : Abd el samed, Idris, Mahdi, Adem, Ibrahim, Ayoub, Abd el razek, Abd el Kader, Abd el hak, Mohamed, Islem, Fouad, Bilal, Mesbah, Soufiane, Tarek, Khalil, Kamel, Mahefoud, Azzedine, Omar, Diaa el din, Abd el Aziz.

Et à mes amies : Ibtissem, Soumia, Sara, Radia, Nabila, Aicha, Ahlem, Asma et Loubna.

Et enfin à mes deux grands- pères : Mohamed qui nous a quitté le : 08/12/2015 et Mohamed qui nous a quitté le : 19/05/2020 et ma grand-mère paternelle : Rym qui nous a quitté le : 04/04/1993, paix à leur âme.

Imene

ملخص :

الهدف من دراستنا هو إنتاج مخفض التوتر السطحي الحيوي، والذي يعتبر بديلاً بيولوجياً للمواد الكيميائية الخافضة للتوتر السطحي، المنتجة من سلالة بكتيرية معزولة من الرواسب البحرية الملوثة. تمت زراعة السلالة التي تمت دراستها على الحد الأدنى من الوسط لمدة ثلاثة أيام باستخدام زيت الزيتون كمصدر للكربون والطاقة لإنتاج خافض للتوتر الحيوي في ظروف هوائية تحت عملية الرج 150 دورة/دقيقة والتحصين عند 30 درجة مئوية. معايير تتبع الإنتاج هي: التوتر السطحي (TS) ، قطر إزاحة النفط (DDP) ومؤشر الاستحلاب (E24) . تمت عملية فصل مادة التوتر السطحي الحيوي باستخدام طريقة ترسيب حمضية متبوعة بالاستخلاص سائل - سائل بواسطة أسيتات الإيثيل وتحصلنا على منتج خام ب- DDP=7سم، TS = 36.82، مردود الإنتاج 1غ/لتر و CMC=1غ/ل الذي يميز عامل التوتر السطحي الحيوي.

استخدمنا خافض التوتر السطحي الحيوي الفائق S7 وخافض التوتر السطحي الخام BS7 في CMC في تطبيق تركيب المنظفات، تظهر النتائج أن هذا الأخير قد أزال 98% من البقع التي تلوث نسيج القطن و يمتاز هذا المنتج الحيوي بفعالية ضد ميكروبية عالية مما يجعله مكوناً أساسياً في تركيبة المنظفات ذات الصبغة بيو. سيجد هذا المنتج الحيوي تطبيقاً معيناً في مجال التنظيف عن طريق استبدال التوتر الكيميائي النشط، لأن المواد الكيميائية الخافضة للتوتر السطحي مهيجة وليست قابلة للتحلل وسامة جداً للبيئة، وعن طريق استبدال المادة الكيميائية الخافضة للتوتر السطحي بالمادة البيولوجية الخافضة للتوتر السطحي المنتجة، نقلل التلوث والسمية لأنه منتج قابل للتحلل.

الكلمات المفتاحية: المواد الخافضة للتوتر السطحي، الإنتاج، التطبيق البيئي، السلالة البكتيرية، التنظيف

Résumé :

L'objectif de notre étude est de produire un biosurfactant, qui est considéré comme un substitut biologique des surfactants chimiques, issu d'une souche bactérienne isolée à partir d'un sédiment marin contaminé. La souche étudiée a été cultivée sur milieu minimum pendant trois jours en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone et d'énergie pour la production de biosurfactant en aérobiose et sous agitation 150 tr/min en mode batch à 30 °C.

Les paramètres de suivi de la production sont : la Tension Superficielle (TS), le Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP) et l'Index d'émulsification (E_{24}). Nous avons extrait le biosurfactant par une méthode de précipitation d'acide suivie d'une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et nous avons obtenu un produit brut ayant un DDP de 7 cm, un TS = 36,82, un rendement d'extraction égale à 1 g.L⁻¹ et CMC = 1g. L⁻¹ ce qui caractérise un biosurfactant efficace.

Nous avons utilisé le biosurfactant du surnagent S7 et le biosurfactant brut BS7 à CMC dans une application pour formulation de détergent. Les résultats obtenus montrent bien que ce dernier a éliminé 98% des taches contaminant le tissu en coton et doué d'une activité antimicrobienne remarquable. Ce produit **Bio** trouvera une application certaine dans le domaine de détergence en substituant le tensioactif chimique, car les tensioactifs chimiques sont irritants, non biodégradables et très toxiques pour l'environnement, et en remplaçant le tensioactif chimique par le tensioactif biologique qu'on a produit en réduisant la pollution et la toxicité car c'est un produit biodégradable.

Mot clés : Biosurfactants, Production, Application Environnementale, Souche Bactérienne, Détergence.

Abstract:

The objective of our study is the production of a biosurfactant, which is considered a biological substitute for chemical surfactants, derived from a bacterial strain isolated from contaminated marine sediment. The strain studied was grown on a minimum medium for three days using olive oil as a source of carbon and energy for the production of aerobic biosurfactant under agitation 150 tr/min in batch mode at 30°C.

Production tracking parameters are: Surface Tension (TS), Oil Displacement Diameter (DDP) and Emulsification Index (E24). We extracted the biosurfactant using an acid precipitation method followed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate and obtained a crude product with an DDP of 7 cm, a TS = 36.82, an extraction yield of 1g.L⁻¹ and CMC = 1g.L⁻¹ which characterizes a biosurfactant.

We used surnageant biosurfactant S7 and crude biosurfactant BS7 at CMC in a detergent formulation application, the results show that the latter has eliminated 98% of the stains contaminating the cotton fabric and an efficient antimicrobial activity. This Bio product will find a certain application in the field of detergence by substituting the chemical active tension, because the chemical surfactants are irritating, not degradable and very toxic to the environment, and by replacing the chemical surfactant with the biological surfactant produced, we reduce pollution and toxicity because it is a biodegradable product.

Keywords: Biosurfactants, Production, Environmental application, Bacterial strain, Detergence.

Liste des abréviations

BS : Biosurfactant.

MSM : Mineral Salt Medium (Milieu Minimum Salé).

CMC : Concentration Micellaire Critique.

CMD : Dilution Micellaire Critique.

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

E₂₄ : Index d'émulsification.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy).

MALDI-TOF/MS : spectrométrie de Masse par Ionisation par Désorption Laser assistée par Matrice-Temps.

GC/MS : Caractérisation par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

LC-MS/MS : Caractérisation par Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Représentations des deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles.

Figure 2 : Structure de rhamnolipides 1 et 2 produits par *Pseudomonas*.

Figure 3 : Structure de sophorolipide lactone.

Figure 4 : Structure de surfactine produite par *Bacillus subtilis*.

Figure 5 : Milieu de repiquage et de conservation.

Figure 6 : Milieu minimum en cours de préparation.

Figure 7 : Stérilisation de l'huile d'olive.

Figure 8 : Culture de production en cours d'incubation.

Figure 9 : Test d'émulsification E24.

Figure 10 : Test de Déplacement De Pétrole.

Figure 11 : Mesure de la TS à l'aide d'un tensiomètre.

Figure 12 : Etape de la centrifugation.

Figure 13 : Principe de l'extraction par solvant.

Figure 14 : Extraction par acétate d'éthyle.

Figure 15 : Dispositif de concentration du biosurfactant (Rotavap).

Figure 16 : Echantillons de tissu en coton.

Figure 17 : Les étapes pour avoir des échantillons de tissu tachés.

Figure 18 : Les tissus tachés.

Figure 19 : Traitement des tissus contaminés.

Figure 20 : Tissus émergés dans l'eau distillée.

Figure 21 : Tissu traité en cours de séchage.

Figure 22 : Production de biosurfactant par la souche 7.

Figure 23 : Déplacement de pétrole de la souche 7.

Figure 24 : Evaluation de la DDP en fonction de la concentration du biosurfactant.

Figure 25 : Résultat de test E24 de la souche 7 (avec le pétrole et gasoil).

Figure 26 : Résultat de test E24 de la souche 7 (avec l'huile d'olive).

Figure 27 : Evaluation de la TS en fonction de la concentration du BS.

Figure 28 : Evaluation de la TS et la DDP en fonction de la concentration du biosurfactant.

Figure 29 : Evaluation de la TS et la DDP en fonction du facteur de dilution du surnageant.

Figure 30 : Biosurfactant de la souche 7 après l'étape de l'extraction et évaporation.

Figure 31 : Surnageant avant et après extraction avec l'éthanol à froid (4°C).

Figure 32 : Diagramme représentant la zone d'inhibition en fonction des microorganismes pathogènes.

Figure 33 : Diagramme représentant l'absorbance en fonction des microorganismes pathogènes.

Figure 34 : Résultats de l'application en détergence.

Tableau 1 : Biosurfactants produits par certains microorganismes.

Tableau 2 : Avantages des biosurfactants.

Tableau 3 : Différents domaines d'application des biosurfactants.

Tableau 4 : Les valeurs de DDP du BS brut produit par la souche S7.

Tableau 5 : Les valeurs de la TS obtenues pour le biosurfactant produit dans notre cas d'étude.

Tableau 6 : Les valeurs de la TS et DDP obtenues pour déterminer la CMC.

Tableau 7 : Les valeurs de la TS et DDP obtenues pour déterminer la CMD.

Table de matière

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures et tableaux

Introduction générale1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les biosurfactants

I. Définition des surfactants.....	4
I.1. Propriétés physicochimiques des surfactants	4
I.2. Interactions avec les protéines microbiennes	6
I.3 Définition des biosurfactants	7
I.4. Propriétés et classification des biosurfactants	9
I.4.1 Selon le poids moléculaire	11
I.4.1.1 Les BSs de bas poids moléculaire	11
I.4.1.2 Les BSs de haut poids moléculaire	12
I.4.2 Selon la structure chimique	12
I.5. Origine des biosurfactants	15
I.6. Biosynthèse des biosurfactants	15
I.7. Comparaison entre les biosurfactants et les surfactants chimiques	16
I.8. Avantages des biosurfactants	16
I.9. Les biosurfactants et les phénomènes de surface	17
I.9.1. Le processus d'action des biosurfactants	17
I.9.2. L'indice d'efficacité des biosurfactants	18
I.9.3. L'émulsion	18
I.9.4. Notion de la tension superficielle	18
I.9.5. Notion de la tension interfaciale	18
I.9.6. Agent tensio-actif	18
I.10. Influence des biosurfactants sur la TS	18
I.11. Disponibilité	19
I.12. La production à grand échelle de biosurfactants	19

Chapitre II : Production et techniques de caractérisation des biosurfactants

II.1. Production des biosurfactants	20
II.2. Les microorganismes producteurs de biosurfactants	20
II.3. Paramètres influençant la production des biosurfactants	21
II.3.1. Facteurs nutritionnels	21
II.3.1.1 Influence de la source de carbone	21
II.3.1.2 Influence de l'azote	21
II.3.1.3. Influence d'autres sources	22
II.3.2. Facteurs environnementaux	22
II.3.2.1. Influence du pH	22
II.3.2.2. Influence de la température	22
II.3.2.3. Influence des sels minéraux	22
II.3.2.4. Influence de l'oxygène	23
II.3.2.5. Influence de l'âge de la culture et de l'agitation	23
II.4. Techniques de production des biosurfactants	23
II.5. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants	24
II.5.1. Abaissement de la tension interfaciale	24
II.5.2. Abaissement de la tension superficielle	24
II.5.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)	24
II.6. Technique de mesure de la production de biosurfactant	25
II.6.1. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire	25
II.6.2. Tension de surface (TS)	26
II.6.3. Test de déplacement de pétrole (DDP).....	26
II.6.4. Test d'indice d'émulsification (E24)	26
II.7. Techniques de caractérisation des biosurfactants	27
II.7.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	27
II.7.2. Identification par spectrométrie de masse type MALDI	27
II.7.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	27
II.7.4. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse(GC/MS)	28
II.7.5. Caractérisation par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	28

Chapitre III : Différentes applications des biosurfactants

III.1. Les biosurfactant dans Environnement	31
III.2. Les biosurfactants dans l'industrie cosmétique	32
III.3. Les biosurfactants dans l'agriculture	33
III.4. Les biosurfactants dans l'industrie alimentaire	33
III.5. Les biosurfactants dans le domaine médical	33
III.6. Les biosurfactants dans l'industrie pétrolier	34
III.7. Les biosurfactants dans l'industrie de détergence	34
III.8. L'activité antibactérienne du biosurfactant	34

Partie expérimentale

I.1 Matériel et méthodes

I.1. Milieux et conditions de culture	37
I.2. Matériel physique (appareillage)	39
I.3. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant	39
I.3.1. Repiquage des souches	39
I.3.2. Préparation de la pré-culture	40
I.3.3. Préparation de la culture	40
I.3.3.1. Protocole de préparation	40
I.4. Evaluation de la production de biosurfactant	42
I.4.1. L'index d'émulsification E24	42
I.4.2. Déplacement de pétrole (DDP)	43
I.4.3. Tension superficielle (TS)	43
I.5. Récupération de biosurfactant contenu dans le surnageant	43
I.5.1. Centrifugation du surnageant	43
I.5.2. Acidification du surnageant	44
I.5.3. Extraction du biosurfactant	44
I.5.3.1. Extraction liquide-liquide.....	44
I.5.3.2. Extraction à froid	45
I.5.4. Concentration à sec du biosurfactant	46
I.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne de biosurfactant BS-7	46
I.6.1 Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu solide	47
I.6.2. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu liquide	47

I.7. Application de biosurfactant dans la détergence	47
--	----

Résultats et discussion

II.1. Suivre de la production de biosurfactant	52
II.2. Détermination des paramètres d'évaluation de la production	53
II.2.1. Le Diamètre de Déplacement de pétrole (DDP)	53
II.2.2. L'index d'émulsification (E_{24})	54
II.2.3. La tension de surface (TS)	55
II.2.4. La concentration micellaire critique (CMC)	56
II.2.5. La concentration micellaire de dilution (CMD)	57
II.3. Evaluation de l'extraction du biosurfactant	58
II.3.1. Evaluation de l'extraction par solvant	58
II.3.2. Evaluation de l'extraction à froid	59
II.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de surnageant de culture de biosurfactant S7.....	60
II.4.1. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu solide	60
II.4.2. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu liquide	61
II.5. Résultat de l'application de biosurfactant dans la détergence	62
<i>Conclusion générale</i>	63
<i>Références bibliographiques</i>	64
<i>Annexes</i>	77

Introduction générale

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 [1]. 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 des microorganismes extrêmophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes [2]. Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation [3]. Les substrats de croissance pour les microorganismes 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 [4].

Le terme « biosurfactant » concerne les composés amphiphiles produits par les microorganismes. En général, ils ont d'excellentes propriétés tensioactives. Différentes classifications ont été proposées pour les biosurfactants [5]. Par exemple, en se basant sur leurs structures, les biosurfactants ont été regroupés dans quatre classes : glycolipides, lipopeptides, saponines et les polymères. Les glycolipides peuvent être subdivisés en rhamnolipides, sophorolipides, tréhalolipides..., dans lequel le groupe de tête est composé de différents saccharides (rhamnose, sophorose, tréhalose, ...). De même, les lipopeptides peuvent être divisés en plusieurs familles comme la surfactine, l'iturine ou la fengycine [6], certaines d'entre elles ayant une structure de cycle peptidique. La partie hydrophobe est généralement une ou plusieurs chaînes d'hydrocarbures saturés ou insaturés. La saponine Aescin ou l'acide glycérique sont des exemples de biosurfactant de structures complexes [7]. Les surfactants du sucre sont des exemples bien connus dans lesquels le glucose, le galactose, la xylose, le saccharose ou le lactose sont des têtes hydrophiles courantes [8]. Ces biomolécules sont produites au laboratoire en utilisant des microorganismes producteurs [9, 10].

Ils regroupent une classe de molécules tensioactives, structurellement variées, et communément synthétisées par les microorganismes. Ces molécules, comme leurs homologues chimiques, se localisent préférentiellement à l'interface entre deux milieux fluides ayant différents degrés de polarité. Cette propriété rend les surfactants capables de former des émulsions entre le milieu huileux et le milieu aqueux.

L'objectif principal de ce présent travail est de produire un tension actif biologique (biosurfactant) en utilisant une souche bactérienne à fort potentiel de production isolée localement afin de réaliser une application environnementale en détergence. Cette production a commencé à l'échelle du laboratoire à l'Université de Saad Dahlab Blida 1 et elle va être extrapolée à grand échelle de l'industrie car notre sujet a été accepté sous forme de startup.

Ce mémoire est composé de deux parties : *une première partie* consacrée à la synthèse bibliographique retraçant les notions générales, la production et les applications des biosurfactants. Il est structuré en trois chapitres, le première chapitre représente une description générale sur les biosurfactants (structure, origine, avantages...), le deuxième chapitre, est réservée à la présentation de la notion de production des biosurfactants en illustrant les principaux facteurs qui influences la production, la biosynthèse et les techniques d'analyses de caractérisation comme FTIR, GC/MS de ces biomolécules et le dernier chapitre est consacré à la détermination des différentes applications des biosurfactants, et *la deuxième partie* qui est réservée pour la partie expérimentale contenant le matériel et les méthodes ainsi que notre application en détergence et les résultats et discussions. Enfin, le travail est complété par une conclusion générale suivie par des perspectives.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les biosurfactants

I. Définition des surfactants

Les surfactants sont des composés amphiphiles qui peuvent réduire la tension superficielle et interfaciale et augmenter la solubilité, la mobilité et la disponibilité des composés organiques hydrophobes ou insolubles. Ces molécules amphiphiles présentent deux parties de polarité différente, l'une hydrophobe et l'autre hydrophile et polaire.

Cette structure amphiphile, leur confère une affinité particulière pour les interfaces de type air/eau et eau/huile et donc, par la même, leur donne la capacité d'abaisser l'énergie libre de ses interfaces. Ce phénomène est à la base de la stabilisation des systèmes dispersés.

Les tensioactifs ne sont pas utilisés comme des émulsionnants comme il existe des émulsionnants qui ne sont pas des tensioactifs [11]. Il est donc important de faire la distinction entre un émulsionnant et un surfactant, car l'émulsionnant est un produit chimique ou naturel utilisé pour augmenter l'onctuosité de certains produits et stabiliser une émulsion, tandis qu'un surfactant est un composé chimique qui diminue la tension superficielle entre deux surfaces.

I.1. Propriétés physicochimiques des surfactants

La présence des molécules du surfactant aux interfaces air-eau entraînent une réduction de la tension superficielle de la solution et conduisent à la stabilisation des mousses. De nombreux surfactants peuvent réduire la tension superficielle des solutions aqueuses de 72 mN/m (valeur pour l'eau) à 30 5 mN/m, selon le type et la concentration du surfactant [12].

Une autre caractéristique des surfactants est la formation de micelles, de petits agrégats de molécules de surfactant. À de faibles concentrations en solutions aqueuses, des molécules uniques sont présentes. Au-delà d'une certaine concentration, appelée concentration de micelles critiques (CMC), les molécules de surfactant se regroupent, formant des agrégats de 20 à 200 molécules. En termes simples, les micelles peuvent être vues comme des gouttes faibles (2-4 nm) avec un noyau hydrophobe et une coquille hydrophile. La présence de micelles entraîne une augmentation de la solubilité apparente des HFC, aussi appelée « solubilisation » [12].

Selon la nature du groupe hydrophile, on peut distinguer quatre types de surfactants : les surfactants anioniques, cationiques, zwitterioniques et non ioniques. Les surfactants peuvent être produits chimiquement (surfactants synthétiques) et biologiquement (biosurfactants). Les

parties hydrophobes les plus courantes des surfactants synthétiques sont les paraffines, oléfines, alkylbenzènes, alkylphénols et les alcools ; le groupe hydrophile est habituellement un groupe sulfate, un groupe sulfonate, ou un groupe carboxylate (surfactants anioniques), un groupe quaternaire ammonium (surfactants cationiques), polyoxyéthylène, saccharose ou polypeptide (non ionique). Les principales classes de biosurfactants comprennent les glycolipides, les phospholipides, les acides gras, les lipopeptides/lipoprotéines et les surfactants bio-polymériques. Les surfactants sont produits à grande échelle et ont de nombreuses applications, par exemple comme additifs dans les produits de nettoyage, les aliments et les cosmétiques, ainsi que dans la construction minière et routière.

L'introduction d'un surfactant dans l'environnement entraînera toujours une contamination par ce surfactant et est donc peu utile lorsque le composé lui-même suscite des préoccupations environnementales. Par conséquent, la toxicité du surfactant et de ses produits de dégradation potentiels est l'un des critères les plus importants pour le choix du surfactant dans le nettoyage des sols. En raison de l'utilisation de surfactants à grande échelle dans les détergents, la toxicité de ces composés a été relativement bien testée. De Oude (1992) donne un aperçu de la toxicité des différents types de surfactants pour de nombreuses espèces, comparativement aux surfactants synthétiques, on peut s'attendre à une toxicité plus faible de la plupart des biosurfactants [12].

L'effet toxique des surfactants sur les bactéries peut s'expliquer par deux facteurs principaux : (i) perturbation des membranes cellulaires par interaction avec les composants lipidiques et (ii) réactions des molécules de surfactant avec les protéines essentielles au fonctionnement de la cellule [12].

Les tensioactifs peuvent exercer des effets toxiques en provoquant une perturbation membranaire conduisant à une lyse cellulaire, en augmentant la perméabilité membranaire provoquant une fuite de métabolites, en modifiant la structure physique de la membrane ou en perturbant les conformations protéiques, interférant ainsi avec d'importantes fonctions membranaires telles que la production et le transport d'énergie. La réponse d'un micro-organisme donné à un surfactant ou à un biosurfactant dépendra de divers facteurs, comme l'ultrastructure cellulaire, la capacité de biodégradation ou d'efflux, la concentration et la biodisponibilité des surfactants et d'autres conditions environnementales et culturelles [13].

1.2. Interactions avec les protéines microbiennes

Les surfactants peuvent également interagir avec les protéines produites par les microbes, modifiant leur conformation et potentiellement leurs fonctions physiologiques et leurs applications biotechnologiques. Dans le cas des enzymes, ces interactions peuvent modifier la spécificité/activité et/ou les caractéristiques de stabilité des enzymes. Goncalves et al ont utilisé des techniques spectroscopiques pour caractériser l'interaction du surfactant anionique, l'acide bis[2-éthylhexyle] sulfosuccinique sodique (AOT), avec une cutinase recombinante de *Fusarium solani*. Ils ont conclu que le surfactant favorise la perturbation localisée ou la déstabilisation des interactions électrostatiques natives cruciales, initiant ainsi la perte conformationnelle de la structure tertiaire. À des rapports molaires enzymatiques de 0 à 5, la structure de la protéine est restée intacte. Plus le rapport molaire surfactant-enzyme est élevé, plus la dénaturation des protéines est importante [13].

Des techniques génétiques ont été explorées pour conférer une résistance détergente aux lipases en modifiant la polarité et les propriétés hydrophobes de la surface hydrophobe enzymatique près du site actif. Résistance accrue des lipases de *Pseudomonas* spp a été réalisée par l'étude de modèles 3D des protéines et par mutagenèse spécifique aux sites considérés comme les plus susceptibles d'interagir avec les surfactants. Les enzymes résultantes présentaient jusqu'à 10 fois plus de stabilité (demi-bulles) en présence de surfactants anioniques et avaient jusqu'à 3 fois plus d'activité lipase. Les lipases modifiées par surfactant peuvent également être configurées pour être très solubles sur des solvants organiques [13].

1.3. Définition des biosurfactants

Les surfactants produits par différentes familles de microorganismes tels que les bactéries, les levures et les champignons sont connus comme biosurfactants. Les biosurfactants réduisent la tension superficielle et la tension interfaciale dans les mélanges aqueux et d'hydrocarbures. Une faible toxicité, une biodégradabilité élevée et une acceptabilité écologique figurent parmi les principales caractéristiques de ces matériaux de surface. Ces caractéristiques favorables font des biosurfactants des solutions de rechange potentielles aux surfactants synthétisés chimiquement dans diverses applications [14].

Dans la nature, les biosurfactants jouent un rôle physiologique dans l'augmentation de la biodisponibilité des molécules hydrophobes, et ils sont impliqués dans la promotion de la motilité des essaims de microorganismes et participent aux processus physiologiques

cellulaires de signalisation et de différenciation [15]. Ils sont également impliqués dans les processus de formation du biofilm. Les surfactants peuvent interagir avec les protéines microbiennes et peuvent être manipulés pour modifier la conformation enzymatique d'une manière qui modifie l'activité enzymatique, stabilité et/ou spécificité [16]. Les surfactants chimiques peuvent imiter ces derniers.

Ils ont d'abord été découverts comme composés extracellulaires par l'étude de la fermentation des hydrocarbures. Ils ont reçu de l'attention en tant que « surfactants de remplacement » puisqu'ils présentent plusieurs avantages supérieurs aux surfactants synthétiques. Ces avantages comprennent une bonne biodégradabilité, une faible toxicité pour les cellules et les tissus de mammifères, la sélectivité, une faible irritabilité, l'efficacité dans des conditions extrêmes de température ou de pH, l'aptitude à la production à grande échelle et l'acceptabilité écologique.

Les biosurfactants sont un groupe différent de biomolécules tensioactives produites par plusieurs organismes vivants, avec des composés amphiphiles composés de queues hydrophobes et hydrophiles (*figure 1*).

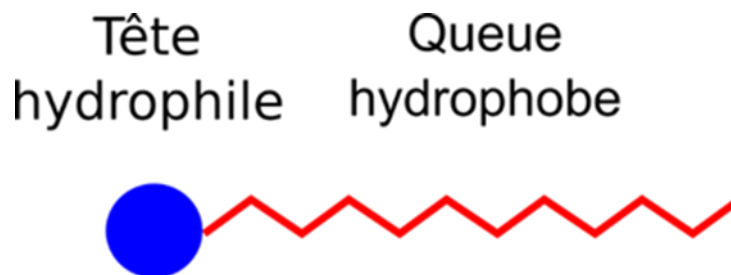


Figure 1 : Représentations des deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles.

La tête hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques [17] :

- 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 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 biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification [18].

Aujourd'hui, les biosurfactants sont utilisés dans diverses industries telles que les cosmétiques, l'agriculture, la pharmacie...etc [19].

Ce sont des biomolécules actives en surface, produits par des microbes (bactéries, champignons et levures), ils ont plusieurs avantages par rapport aux tensioactifs chimiques, tels que la faible toxicité, la biodégradabilité élevée, la compatibilité environnementale, la mousse élevée, la haute sélectivité et l'activité spécifique à l'extrême conditions telles que les températures, le pH et la salinité [19].

Presque tous les tensioactifs marchés sont synthétisés chimiquement. Récemment, l'attention vers les biosurfactants a été doublé et principalement due à leur large gamme de propriétés fonctionnelles et la diversité des capacités synthétiques des microbes. Les biosurfactants microbiens ont des applications différentes, tel que l'amélioration de la récupération des hydrocarbures, la détoxification des effluents industriels et des sols contaminés par le pétrole, les différents domaines pharmaceutique/médical, alimentaire, cosmétique, les industries des pesticides, et de la biodégradation [19].

En général, les biosurfactants sont moins toxiques et plus inoffensifs pour l'environnement que les surfactants chimiques lorsqu'ils sont utilisés à des fins industrielles. Cependant, les biosurfactants peuvent avoir une activité antimicrobienne et il est probable que les microorganismes produisent de telles molécules en tant qu'agents antagonistes pour obtenir un avantage concurrentiel dans les communautés microbiennes (c.-à-d. amensalisme). Des études sur les tensioactifs chimiques ont montré que la charge a un impact sur la toxicité. De façon générale, les surfactants cationiques sont les plus toxiques et ont toujours été utilisés comme antimicrobiens, tandis que les anioniques sont moins toxiques et plus actifs contre les Gram positifs que les Gram négatifs, et les non-ioniques sont souvent considérés comme non toxiques [13].

Les biosurfactants produits par certains microorganismes deviennent des produits biotechnologiques importants pour les applications industrielles et médicales en raison de leurs modes d'action spécifiques, de leur faible toxicité, de leur facilité de préparation et de leur applicabilité généralisée. Ils peuvent être utilisés comme agents émulsifiants, agents mouillants et moussants, ingrédients d'aliments fonctionnels et comme détergents dans le

pétrole, la pétrochimie, la gestion de l'environnement, les produits agrochimiques, les aliments et les boissons, les cosmétiques et les produits pharmaceutiques.

L'utilisation de systèmes de surface actifs a des répercussions sur divers marchés comme la biorestauration, les cosmétiques, l'alimentation, l'agriculture, la production d'huile, les soins de santé et les produits de soins personnels. L'intérêt émergent pour les surfactants naturels, également les biosurfactants, fait référence à leurs propriétés perçues de sécurité et de douceur, ainsi qu'à leurs propriétés physiques, qui sont égales, sinon supérieures, aux surfactants synthétiques.

Les biosurfactants dérivés de sources microbiennes représentent un large éventail de biomolécules, y compris les acides gras normaux et hydroxy, les glycolipides, les lipopeptides cycliques, les acides aminés N-acyles, les lipopeptides, les monoet diglycérides et les phospholipides [20]. Ces biosurfactants présentent des propriétés physiques et chimiques qui permettent leur concentration et leur physique aux interfaces air-eau, huile-eau et solide-liquide, réduisant ainsi les forces physiques qui agissent à ces limites. Cette propriété physique des biomolécules actives en surface produit des effets, y compris la solubilisation, l'émulsification, la dispersion, l'humidification, la mousse et la capacité de détergent, ainsi que l'activité antimicrobienne dans certains cas.

1.4. Propriétés et classification des biosurfactants

Les surfactants microbiens ou biosurfactants (BS) sont des molécules amphiphiles composées d'un groupement hydrophobe et d'un groupement hydrophile (d'où leurs propriétés émulsifiantes), ces composés sont capables de réduire la tension superficielle entre liquides, solides ou gaz, et d'augmenter la solubilité des hydrophobes composés dans l'eau. Ils sont considérés comme des produits naturels ayant un pouvoir tensioactif égal ou supérieur aux tensioactifs synthétiques.

Les biosurfactants sont des surfactants qui sont produits par des microorganismes et qui ont fait l'objet d'une grande attention en ce qui concerne leur biodégradabilité, leur faible toxicité, leur acceptabilité écologique et leur disponibilité à partir de sources renouvelables, leurs nature tout comme leur pouvoir tensioactif est fortement dépendant du type de micro-organisme utilisé (bactéries, levures, champignons), de la souche testée ainsi que du substrat nutritif disponible pour le développement cellulaire [21].

Les BS ont une propriété distinctive qui est le pouvoir de modifier les caractéristiques des interfaces des systèmes poly-phasiques dans lesquels ils sont introduits, en réduisant les tensions superficielles et interfaciales [22].

Les biosurfactants possèdent plusieurs autres propriétés, tel que :

- Le surfactant est le produit d'une fermentation bactérienne, il est excrété dans le milieu de fermentation.
- Le produit final est solide, blanc, pure, plus de 98% est appelé « Bioémulsifiant » [23].
- Ils sont biodégradables et moins toxiques que les surfactants synthétiques [24].
- Plusieurs surfactants sont doués des caractéristiques thermiques plus stables, par exemples : les lipopeptides de *Bacillus licheniformis* sont stables à une température supérieure à 75°C pendant 140 heures [25], et l'autoclavage pendant 1 heure à 121°C ne diminue pas leur activité émulsifiante.
- Les surfactants sont actifs à des pH compris entre 5,5 et 12, mais ils perdent progressivement leurs activités dans des conditions plus acides [25].
- Les propriétés interfaciales des surfactants dépendent de la composition ionique de la phase aqueuse.

On sait depuis plus de 50 ans que des microorganismes produisent des composés actifs en surface [7]. Tous les biosurfactants décrits possèdent un composant lipidique, généralement la chaîne des hydrocarbures d'un acide gras. Trois grandes classes de biosurfactant ont été identifiées : glycolipides, lipopeptides et phospholipides. Les phospholipides, bien que présents dans tous les organismes, sont rarement excrétés sous forme de produits extracellulaires. Les glycolipides et les lipopeptides sont produits par de nombreux microorganismes différents et peuvent être libérés dans le bouillon de culture en quantités importantes.

Le tableau 1 énumère certains des microorganismes qui produisent des biosurfactants :

Tableau 1 : Biosurfactants produits par certains microorganismes [26]

Organisme :	Biosurfactant :
Bacillus subtilis	Peptidelipid
Bacillus licheniformis	Lipopeptide
Pseudomonas aeruginosa	Rhamnolipid
Arthrobacter sp	Glycolipide
Ustilago maydis	Cellobiose lipides
Rhodococcus erythropolis	Trehalose-tetraester
Torulopsis bombicola	Sophorolipide
Penicillium spiculisporum	Spiculisporic acide
Corynebacterium lepus	Lipopeptide, Phospholipide

Il existe une grande variété de paramètres qui peut influencer sur les caractéristiques physicochimiques des biosurfactants, en particulier les propriétés de surface, par exemple, les propriétés émulsifiantes et moussantes ainsi que les propriétés biologiques [27], cette diversité fonctionnelle permet donc une variété d'applications en fonction des propriétés de surface bénéfiques des biosurfactants qui sont stables aux extrémités du pH, de la salinité et de la température [28].

La majorité des biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique [9, 21]. Il existe peu de structures cationiques : 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. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [1].

Contrairement aux tensioactifs synthétisés chimiquement, qui sont classés en fonction de leur dissociation dans l'eau, les BS peuvent être classés en fonction de leur structure chimique et leur origine microbienne. Ils sont classés en deux catégories, l'une comprend les molécules de faible poids moléculaire et l'autre les molécules de poids moléculaire élevé.

On peut aussi classer les biosurfactants selon :

1.4.1 Selon le poids moléculaire

On distingue deux types de BS :

1.4.1.1 Les BSs de bas poids moléculaire

Il comprend des molécules qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et interfaciale, tels que les glycolipides dans lesquels les glucides sont liés à un acide aliphatique à longue chaîne, lipopeptides, phospholipides [29].

1.4.1.2 Les BSs de haut poids moléculaire

Ils sont appelés collectivement bio-émulsines ou des bio-émulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces. Ces derniers sont des polymères amphiphiles et polyphiles qui sont généralement plus efficaces dans les émulsions stabilisantes l'huile dans l'eau, tel que les polysaccharides, lipopolysaccharides des protéines ou lipoprotéines [30].

Ces molécules sont utilisées dans l'objectif de stabiliser les huiles dispersées dans l'eau, mais sans réduire la tension superficielle de cette émulsion huile/eau. Elles sont très efficaces à faibles concentrations, composées de lipoprotéines (LP) et d'acides gras (AG). Les émulsifiants alimentaires (lécithine de soja (E322), lécithine de tournesol (E471), gomme d'acacia (E414), polysorbates...) sont quelques-uns des exemples de polymères de masse moléculaire élevée.

1.4.2 Selon la structure chimique

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. On distingue Cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres [31].

- **Les glycolipides**, Ce sont les BS les mieux étudiés qui contiennent des mono-ou disaccharides (fraction hydrophile), liées à une longue chaîne d'acide aliphatique ou d'acide hydroxy aliphatique (fraction hydrophobe) par une liaison ester ou éther. Ils sont dénommés selon les glucides présents dans leurs structures. Les bio-émulsifiants glycolipides les plus étudiés sont : les rhamnolipides, les lipides tréhalose et les sophorolipides [32], les glycolipides peuvent être classés comme suit :
 - **Les rhamnolipides** : Certaines espèces de *Pseudomonas* produisent de grandes quantités de glycolipides constitué de deux molécules de rhamnose et de deux molécules d'acide B-hydroxy-decanoïque [33], Le L Rhamnosyl-L-rhamnosyl-B-hydroxydecanoyl-B-hydroxydecanoate et le L-rhamnosyl-B-hydroxydecanoyl-B-hydroxydecanoate, désignés sous le nom de rhamnolipides

1 et 2 respectivement, sont les principaux glycolipides produits par *P. aeruginosa* [34] (*figure 2*).

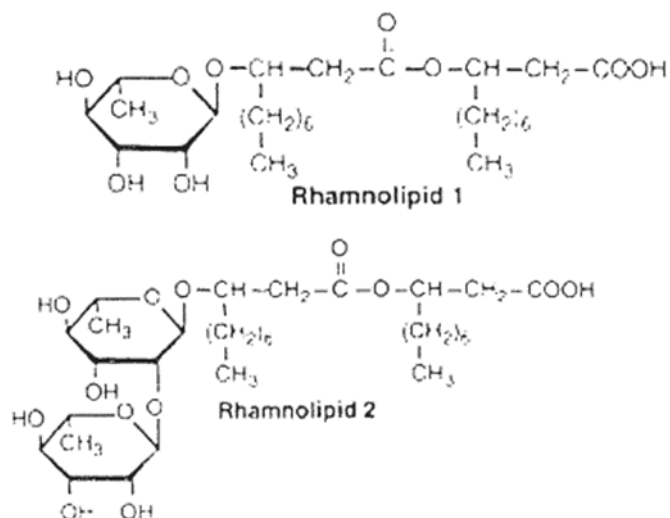


Figure 2 : Structure de rhamnolipides 1 et 2 produits par *Pseudomonas*

- **Les sophorolipides** : Les sophorolipides sont des biosurfactants produits par plusieurs espèces de *Candida*. Ils sont composés d'un disaccharide (sophorose) lié à un oméga-hydroxyacide gras par une liaison hétéroside. Ils réduisent la tension de surface (superficielle) entre des molécules individuelles à la surface, ce sont des agents d'émulsification efficaces [33] (*figure 3*).

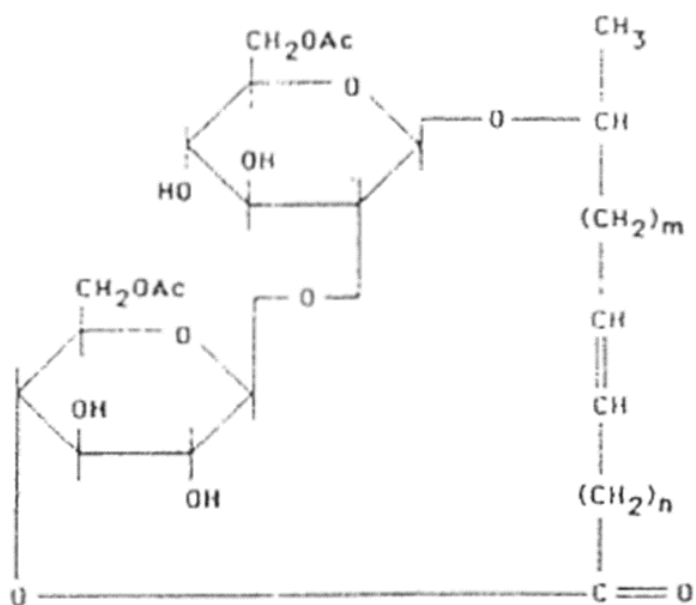


Figure 3 : Structure de sophorolipide lactone

- **Les tréhalolipides** : La croissance en serpentin retrouvée chez plusieurs espèces du genre *Mycobacterium* est due à la présence des esters de tréhalose à la surface de la cellule [33].
- **Les lipopeptides**, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornitine sont les plus connus [1]. Parmi les biosurfactants bactériens de nature lipopeptidique, on distingue :
 - **La Surfactine** : Le lipopeptide cyclique surfactine par *Bacillus subtilis*, est l'un des biosurfactants les plus puissants. Il est composé de sept acides aminés à une structure cyclique couplée à une chaîne d'acide gras par une liaison lactane [33] (*figure 4*).

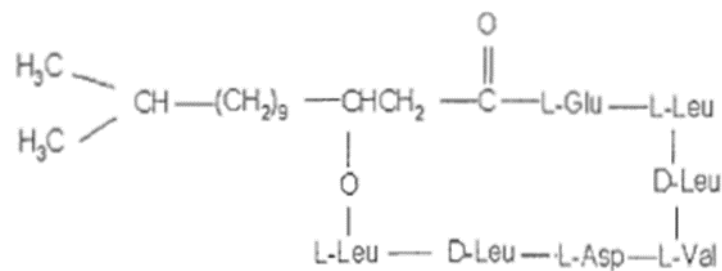


Figure 4 : Structure de surfactine produite par *Bacillus subtilis*

- **La lichenysine** ;
 - **Les lipoamino-acides (l'ornitine)** ;
 - **Les antibiotiques.**
- **Les phospholipides**, sont soit des glycérides dont la structure de base est l'acide phosphatidique, composés d'une molécule de glycérol estérifiée par deux acides gras et un acide phosphorique, soit des sphingomyélines [17], ils sont formés de groupement alcool et phosphate et de chaîne lipidique [1, 35].
- **Les lipopolysaccharides** ou polymériques, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras [36] Les biosurfactants polymères sont des biosurfactants de haut poids moléculaire et ont un squelette de trois ou quatre sucres répétés avec des acides gras attachés aux sucres. Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont les émulsanes. L'émulsane est un émulsifiant extracellulaire soluble dans l'eau produit par les bactéries [35].
- **Les acides gras et lipides neutres**, sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée [36]. Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités de ces tensioactifs lors de leur croissance, par exemple la phosphatidyléthanolamine qui est produit à partir d'*Acinetobacter* sp et forme des microémulsions dans l'eau [37].

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [38].

Tous comme leur analogue de synthèse chimique, ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes. Certaines de ces propriétés peuvent, de plus, être conservées dans des conditions extrêmes telles que pH acides, température élevée, etc [39].

1.5. Origine des biosurfactants

Les biosurfactants sont des surfactants naturels synthétisés par des plantes (par exemple, la saponine), les animaux (par exemple, les phospholipides) et les microorganismes (par exemple, les glycolipides). Les biosurfactants dérivés de microbes présentent des propriétés tensioactives car ils diminuent la tension superficielle et ont un fort pouvoir émulsifiant [40].

Ils sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries [41].

1.6. Biosynthèse des biosurfactants

Vu la diversité des biosurfactants leur formation implique plusieurs voies de synthèse, elles sont classées selon le domaine hydrophobique, hydrophilique ou les 2 à la fois. Les deux domaines sont élaborés de nouveau mais ils peuvent être formés par modification de la source du carbone [42], L'exemple le plus frappant c'est celui sur des expériences faites sur *Arthrobacter*, ont montré le surfactant trihalose-lipide est remplacé par le saccharose-lipide lorsque cette bactérie pousse sur un milieu contenant le saccharose comme source de carbone [43].

Donc le domaine hydrophilique du biosurfactant représente une complexité de mécanisme de synthèse. Les surfactants de nature lipopeptidique ne sont pas synthétisés de point de vue biogénétique par voie ribosomiale, mais par un système enzymatique multifonctionnel.

En général la synthèse de la fraction lipidique et hydrophilique dérive du métabolisme primaire mais elle est reliée à deux autres voies de dégradation celle des hydrocarbures et carbohydrates (Glucides et produit d'origine pétrolier respectivement).

Le biosurfactant a un rôle physiologique lors de la croissance sur des composés insolubles dans l'eau par l'abaissement de la tension superficielle, il laisse le substrat à la disposition de la bactérie par un contact avec la micelle, c'est-à-dire avec adhésion.

1.7. Comparaison entre les biosurfactants et les surfactants chimiques

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. 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 microorganismes vivants : les biosurfactants [48]. Ceux-ci offrent plusieurs avantages par rapport au surfactants chimiques comme l'abaissement de toxicité, la biodégradabilité, la disponibilité des matières premières, l'économie de production acceptables [49]. Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont facilement dégradables et particulièrement bien adaptés pour des applications telles que l'environnement et la bioremédiation [48].

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, Edwards et al. [47] ont comparés la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menedia Beryllina*), Ces auteurs concluent que les bio-tensioactifs ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques [48].

1.8. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages. Ils sont respectueux de l'environnement, moins toxiques et biodégradables. Ils sont doués des activités antimicrobienne, antivirale, anti-tumorale, antiadhésive, anti-biofilm, etc... Certains peuvent être actifs à des pH, des températures et des salinités extrêmes [49]. Les principaux avantages des surfactants dérivés des microorganismes sont discutés ci-dessous :

Les biosurfactants à l'opposé des surfactants chimiques ne sont pas des dérivés du pétrole et ont l'avantage d'être produits rapidement, leurs caractéristiques structurales et propriétés physiques sont supérieures ou comparables à celles des surfactants synthétiques [50].

Ils sont biodégradables et plus acceptés écologiquement que les surfactants chimiques dont l'usage doit être limité car ils sont toxiques, non biodégradables, donc sources de pollution [51].

Ils peuvent réduire la viscosité du pétrole par la formation d'émulsion huile dans l'eau [52], résistent à l'autoclavage à 121°C pendant une heure et gardent leur pouvoir émulsifiant [53], et aux facteurs environnementaux extrêmes tels que la température, la salinité et le pH [54].

Le tensioactif aide à réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Des biosurfactants sont plus efficaces que les tensioactifs chimiques en raison de leur faible concentration micellaire critique (CMC) [55].

Les biosurfactants sont caractérisés par leur biocompatibilité et leur digestibilité, ce qui permet leur application dans des produits de détergence, pharmaceutiques, alimentaires et des produits cosmétiques [56].

Tableau 2 : Avantages des biosurfactants [57].

<p>Caractéristiques techniques excellentes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Abaissement de la tension interfaciale (~ 0,1 dyne/cm) ; • Abaissement de la tension superficielle (~ 27 dyne/cm, • Emulsification (50-100%) ; • Pouvoir moussant (mousse stable (15min)) ; • Pouvoir mouillant (abaissement de l'angle de contact >30%) ; • CMC (20-2000mg/l) ; • Pouvoir antibiotique ou fongicide.
<p>Stabilité thermique et chimique</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plus stables que les surfactants synthétiques ; • T° (4-100°C) ; • pH (4-9) ; • Salinité (5-20%).
<p>Caractéristiques écologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Biodégradable 100%, non toxiques, biocompatibles, d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques et agroalimentaire.

1.9. Les biosurfactants et les phénomènes de surface

1.9.1. Le processus d'action des biosurfactants

Ce processus dynamique est basé sur la capacité de surfactant pour réduire la tension superficielle par gouvernement de l'arrangement des molécules liquides, ainsi influence la formation des liaisons hydrogène et les interactions hydrophobe hydrophile [58].

1.9.2. L'indice d'efficacité des biosurfactants

La valeur élevée de la tension superficielle minimum et le besoin de la Concentration Critique de Micelles (CMC), sont les paramètres utilisés pour mesurer l'efficacité d'un surfactant (la concentration critique de micelle et en effet la solubilité d'un surfactant dans une phase aqueuse) [58].

1.9.3. L'émulsion

L'émulsion c'est une dispersion d'un liquide dans un autre liquide et pour que les deux liquides se mélangent, il faut que l'un des deux contiennent un agent capillairement actif, qui se concentre à la surface de séparation des deux phases et forme un film interfacial, le film englobe les gouttelettes et les rend superficiellement solubles [59].

1.9.4. Notion de la tension superficielle

Les molécules superficielles d'une surface condensée ne sont pas dans le même état thermodynamique que celle de l'intérieur du liquide, sont effet sous l'influence de forces non équilibre cette attraction uniforme provoque une tension superficielle [59].

1.9.5. Notion de la tension interfaciale

Lorsqu'on parle de la tension superficielle d'un liquide celui est supposé au contact de sa vapeur ou de l'air ce qui revient à dire que la surface libre d'un liquide et l'air en réalité une interface liquide-air. On est ainsi conduit à généraliser cette notion et à conduire les interfaces liquide-liquide, liquide-gaz, liquide-solide, gaz-solide [59].

1.9.6. Agent tensio-actif

On parle d'un agent tensio-actif lorsque celui-ci est capable de diminuer la tension superficielle, les expériences montrent que les corps les plus tensio-actif qui possèdent le plus de groupements hydrophobes par leur hydrophobie à l'eau ont tendance à flotter à la surface donc ils remplacent dans la couche superficielle un certain nombre de molécules d'attraction plus faible donc abaissement de la TS [59].

1.10. Influence des biosurfactants sur la TS

Le biosurfactant peut s'insérer entre deux phases ayant des polarités différentes tels que l'huile et l'eau en gouvernant l'arrangement des molécules du liquide influençant la formation de liaisons d'hydrogènes cela provoque la diminution de la TS. L'apport du biosurfactant

nécessaire pour donner la plus basse TS est appelé concentration micellaire critique (CMC) [59].

La CMC maximale varie entre 1 et 200 mg/l, en résumé le biosurfactant augmente la dispersion des composés organiques insolubles dans l'eau par deux façons :

- ❖ Soit cette dispersion est grande au-dessous de la CMC dû aux interactions hydrophobiques entre le surfactant et le composé lui-même [60].
- ❖ Soit elle est importante au-dessus de la CMC qui est en relation avec encapsulation du composé par la micelle du surfactant [60].

I.11. Disponibilité

Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières peu coûteuses et disponibles en grande quantité ou des déchets industriels. La source de carbone peut provenir d'hydrocarbures, de glucides et/ou de lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres [61].

I.12. La production à grand échelle des biosurfactants

Les BS sont largement utilisés dans presque tous les secteurs de l'industrie moderne [54]. Ils peuvent également être produits à partir de déchets industriels et de sous-produits, ce qui est particulièrement intéressant pour la production en vrac (par exemple, pour une utilisation dans les technologies liées au pétrole). A cet effet l'économies de production des BS est acceptables [61].

Chapitre II : Production et techniques de caractérisation des biosurfactants

II.1. Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par un groupe diversifié de microorganismes, principalement les bactéries, les champignons et les levures. La quantité de biosurfactants produits dépend du type de microorganismes et de leurs sources.

Les biosurfactants microbiens sont des produits extracellulaires contenant des groupes hydrophiles et hydrophobes capables de réduire la tension superficielle et de faciliter la dégradation des substrats insoluble comme les hydrocarbures (Cx Hy), l'absorption et l'émulsification / la dispersion. Ils peuvent améliorer la biodisponibilité des hydrocarbures aux cellules microbiennes par augmentation de la surface de contact au niveau de l'hydrocarbure aqueux / interface. Certaines bactéries et levures produisent des biosurfactants ioniques qui émulsifient le substrat Cx Hy dans le milieu de croissance [61].

Il existe une grande variété de biosurfactants microbiens. Leur type, leur quantité, et leur qualité sont principalement influencés par la nature du substrat carboné et par la concentration en azote, phosphore, magnésium, fer et manganèse dans le milieu et les conditions de culture, qui comprennent le pH, la température, l'agitation, le taux de dilution, etc. [62].

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indique une production efficiente. La présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscible [63].

L'utilisation des déchets et des produits agricoles comme substrats de la production des biosurfactants est largement étudié et appliqué pour baisser les coûts de production et réduire les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...) [64].

II.2. Les microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les Rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactine à partir de *Bacillus subtilis*, l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* et sophorolipides de *Candida bombicola* sont quelques exemples d'agents tensioactifs microbiens [65]. La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat insoluble. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire [66].

Les bactéries utilisées pour produire de biosurfactants sont en général issus de sols contaminés par des composés insolubles (hydrocarbures). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de sélectionner les souches productrices de biosurfactants et d'optimiser les paramètres abiotiques influençant la production (sources de carbone et d'azote, température, salinité, pH...) [83].

II.3. Paramètres influençant la production des biosurfactants

Mulligan et collaborateurs [61] ont précisé que certain nombre d'études ont indiqué que le type et le rendement du biosurfactant est influencé par le type de milieu (source de carbone et autres nutriments) et les conditions de croissance (température, agitation, pH, etc.), donc l'optimisation de la production des biosurfactants affectant par déverse facteurs nutritionnels et facteurs environnementaux comme suivant :

II.3.1. Facteurs nutritionnels

II.3.1.1 Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. 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. La qualité et la quantité de la production de biosurfactant sont affectées et influencées par la nature du substrat de carbone. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose, le glycérol ont été signalés comme étant une bonne source de carbone pour la production de biosurfactants [67].

II.3.1.2 Influence de l'azote

De nombreuses études ont montrés que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices [68].

L'azote est important et est essentiel à la croissance microbienne. Différents composés azotés ont été utilisés pour la production de biosurfactants, notamment comme la peptone d'urée, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, l'extrait de viande et les extraits de malt. Bien que l'extrait de levure soit la source d'azote la plus utilisée pour la production de biosurfactants, son utilisation en termes de concentration dépend de l'organisme et du milieu de culture. Les sels d'ammonium et l'urée sont les sources d'azote préférées pour la production de biosurfactants par les bactéries. Pour la production de

biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* tandis que le nitrate permet une production maximale de tensioactifs chez *P. aeruginosa* [67].

Pour avoir des rendements de production optimum, il est nécessaire d'avoir un rapport C /N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant [48].

II.3.1.3. Influence d'autres sources

L'influence de divers nutriments ou suppléments nutritionnels sur la production de biosurfactant ne peut être exclue. La croissance et la production de biosurfactants sont affectées considérablement par la quantité de phosphate, de fer, de manganèse, de calcium et d'oligo-éléments dans le milieu [69].

II.3.2. Facteurs environnementaux

Il existe de nombreux rapports scientifiques où les effets individuels du pH, de la température, d'oxygène, d'agitation et de la salinité sur la production de biosurfactants ont été examinées [70].

II.3.2.1. Influence du pH :

Le pH est également un facteur environnemental important et influe la stabilité et la solubilité des métabolites [71]. Généralement, le milieu acido-basique est défavorable lorsque la productivité des BS chez les souches de *P. aeruginosa* produisent des rendements biosurfactants maximaux dans une large gamme de pH entre 6,0 et 6,5 et la productivité décroît rapidement à des pH inférieurs ou supérieurs.

II.3.2.2. Influence de la température

L'activité d'émulsification et la tension superficielle du biosurfactant qui sont produites par les souches thermophiles tout au long de la plage de température supérieures à 40°C restent constantes après autoclavage à 120°C pendant 20 min [72].

II.3.2.3. Influence des sels minéraux

La concentration en sels influence la production de certaines BS, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectant pas certaine BS, bien qu'il soit observé une légère diminution sur la concentration micellaire critique [73].

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [74].

II.3.2.4. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance [48].

II.3.2.5. Influence de l'âge de la culture et de l'agitation

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 [55], l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. Par contre chez les levures l'effet inverse est observé [75].

II.4. Techniques de production des biosurfactants

Pour produire des biosurfactants, une combinaison de diverses techniques a été utilisée [76]. Tout d'abord la préparation de milieu de culture liquide à base de sels minéraux, milieu minimum.

Les souches bactériennes ont été isolées et criblés pour la production des biosurfactants. On applique le processus de la fermentation par l'utilisation de milieu minimum minéral (MSM) de production de biosurfactant, qui a été ajusté à pH 7 et passé par l'autoclave à 120 ° C pendant 20 min.

La production de biosurfactants a été réalisée dans des erlenmeyers (capacité de 2 Litres), contenant 1l de milieu de production MSM qui a été complété par 100 ml de bactérie (pré-culture), 10 ml de source de carbone (huile d'olive) et quelques gouttelettes de FeCl₃.

Les solutions ont été maintenues à 150 tr/min d'agitation orbitale à 30 ° C pendant 3 jours. Par la suite les moûts de fermentation ont été centrifugés (12 000 g, à 4 °C pendant 30 min). Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture par centrifugation (comme dans notre travail), suivi par une filtration pour éliminer la matière organique et éviter tout type de contamination.

La récupération des BS dépend principalement de leur charge ionique et de leur solubilité, les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après

sédimentation des cellules productrices [55], Il est nécessaire d'acidifier le milieu pendant 24h puis d'extraire le tensioactif par un solvant (acétate d'éthyle). Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif.

Le bouillon de culture a été extrait deux fois avec 2 volumes de l'acétate d'éthyle, et la phase d'acétate d'éthyle a été traitée avec Na₂ S04 pour éliminer l'eau résiduelle.

Après l'extraction deux phase sont obtenues : une phase aqueuse et une autre organique (qui contient le biosurfactant), la phase organique obtenue est mise sous rotation dans un évaporateur rotatif (Rotavap) afin de distiller rapidement la phase, dans le but de concentrer le biosurfactant.

II.5. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

II.5.1. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles [77]. 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 [78].

II.5.2. 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 [79], elle 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, L'adsorption des biosurfactants et la diminution de la tension superficielle sont responsables de la formation de mousses.

II.5.3. 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 [80].

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créant une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles [81]. En effet, dans les micelles, les

parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau.

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). Elle varie en fonction de leur structure, la température de la solution et la présence d'électrolytes ou de composés organiques. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure [82].

II.6. Technique de mesure de la production de biosurfactant

La mesure production de biosurfactant est estimée par le test d'hydrophobicité, l'activité hémolytique, tension de surfaces, test de déplacement d'huile [83].

II.6.1. Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

Une hydrophobicité cellulaire élevée permet aux micro-organismes d'entrer directement en contact avec les gouttes d'huile et les hydrocarbures solides tandis que l'hydrophobicité cellulaire faible permet leur adhésion aux micelles ou aux huiles émulsionnées [84].

D'après Satpute et al [85], Le protocole de ce test a été préparé comme suivant :

- Le lavage de suspension bactérienne par le tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) deux fois et en utilisant le même tampon jusqu'à absorption A₆₀₀ (Absorption 600 nm) de 0,5, puis l'agitation au vortex de 3 ml de cette suspension sont avec 0,5 ml des hydrocarbures pendant 3 min et laissées à décanter pendant 10 min pour que la phase d'hydrocarbure monte complètement.
- Le transfert de la phase aqueuse dans une cuve de 1 ml pour mesurer A₆₀₀.
- Il existe une corrélation directe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la production de BS. La diminution de A₆₀₀ de la phase aqueuse est prise comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, qui est calculée comme suit :

$$H\% = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

Où **A₀** et **A** sont les absorptions à 600 nm, A₆₀₀, avant et après mélange avec des hydrocarbures respectivement (Satpute, 2008).

II.6.2. Tension de surface (TS)

C'est la mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface, pour minimiser le coût de l'énergie la plupart des liquides prennent la forme de la plus petite des surfaces (la forme sphérique, c'est la plus petite), elle s'exprime en J/m² ou mN/m.

Le criblage des microorganismes producteurs du biosurfactant repose sur la mesure de la tension superficielle du milieu de croissance, car un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle.

II.6.3. Test de déplacement de pétrole (DDP)

Ce test est défini comme un test qualitatif de criblage des souches productrices des biosurfactants facile à réaliser, simple, sensible et reproductible est basé sur la caractéristique des biosurfactants à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau [86, 87], la pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile.

Les protocoles ont été préparés comme suivant :

- Sur des boîtes de Pétri, 40 ml d'eau distillée a été versée puis l'ajoute 100 µl de pétrole à la surface de l'eau ;
- Ensuite, 200 µl des surnageants de culture ont été introduit sur la surface du pétrole ;
- Une zone claire apparue est considérée comme positive pour la production de BS.

II.6.4. Test d'indice d'émulsification (E24)

D'après Bezza et Chirwa (2015), l'activité d'émulsification a été mesuré par l'addition des volumes identiques, l'hydrocarbure (huile brute) et la suspension bactérienne dans un tube à essai à bouchon à vis et agitée en vortex à grande vitesse pendant 2 min à température ambiante puis incubés à 25°C pendant 24 h.

L'activité d'émulsification estimée par l'indice d'émulsification (E24) qui définit comme étant le rapport de la hauteur mesurée de la couche d'émulsion divisée par la hauteur totale du mélange et en la multipliant par 100, l'équation suivante a été exprimée en pourcentage :

$$E24 = \frac{HE (mm)}{Ht (mm)} \times 100$$

Où : **He** : c'est la hauteur de l'émulsion ;

Et : **Ht** : c'est la hauteur totale.

La capacité de maintenir au moins 50 % du volume initial de l'émulsion après 24 h de sa formation est considéré comme un critère cité pour confirmer la production des biosurfactants [88].

II.7. Techniques de caractérisation des biosurfactants

La purification et la caractérisation des BS doit être réalisée selon leur charge ionique, leur solubilité et leur localisation, d'après les techniques suivantes : MALDI-TOF/MS, CCM, FTIR, LC-MS/MS, GC-MS [89].

II.7.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La méthode CCM (Chromatographie sur Couche Mince) est réalisée, dans un but d'analyse des composés des surnageant des milieux de fermentation [90], elle permet d'évaluer et détecter les caractéristiques chimiques du biosurfactant dans des bouillons de culture et confirmer la pureté du biosurfactant.

Il s'agit d'une technique d'analyse qui s'appuie sur les différences d'affinités de substances chimiques entre une phase fixe, la plaque, et une phase mobile, l'éluant. Cette différence va permettre la séparation de ces différentes substances sur la plaque, chaque espèce chimique s'élève à une hauteur spécifique, c'est ce qui permet de l'identifier par comparaison avec l'élévation d'une espèce témoin.

Si on observe qu'un même dépôt s'est divisé en plusieurs taches, alors celui-ci est un mélange, attention, si le dépôt ne se divise pas, il ne s'agit pas forcément d'un corps pur.

À la fin de la CCM, chaque espèce chimique s'est élevée à une hauteur qui lui est propre. Si on observe deux taches situées à la même hauteur, il s'agit de la même substance [91].

II.7.2. Identification par spectrométrie de masse type MALDI - TOF

Au cours de la dernière décennie, la spectrométrie de masse (MS) à temps de vol (TOF) à désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est devenue l'un des outils polyvalents les plus puissants pour nucléiques et les protéines et crée des nouvelles opportunités. Le principe se base sur l'obtention de pics caractéristiques (spectres) par ionisation de l'échantillon ciblée (le biosurfactant) par un rayon laser. A partir d'une base de données spectres, le logiciel associé recherche puis cohère entre les deux spectres [92].

La caractérisation peut être réalisée par la technologie MALDI-TOF en quelques minutes, et ne nécessite qu'une petite quantité de biosurfactant purifié qui a été repéré sur la position de la puce d'ancrage sur une plaque de désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI), et une goutte de matrice ajoutée à la tâche d'échantillon. En outre, la matrice était une solution saturée d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans l'eau et 0,3 mg /ml d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans l'acétone /éthanol (2 /1, v/v). Un standard peptidique a également été repéré pour un étalonnage externe. Les taches ont été laissées à température ambiante pour sécher et analysées sur le spectromètre de masse [93].

Les composés ionisés issus de l'échantillon cible (le biosurfactant) vont être accélérés par un champ électrique dans une colonne, avant de pénétrer dans un tube de vol, libre de tout champ permettant de séparer les molécules selon leur rapport masse/charge (m/z). L'intensité des pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre spécifique d'un biosurfactant qui a été créé par le passage des ions [93, 94].

II.7.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge d'absorption est une technique spectroscopique sensible et plus fiable, utilisée dans plusieurs domaines d'application, notamment en biologie. Elle permet via une observation directe des fréquences caractéristiques des modes de vibration d'une molécule irradiées par une onde électromagnétique de fréquence comprise dans le domaine de l'infrarouge de longueur d'onde sondée est comprise entre 2.5 μ m et 25 μ m.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour la détection et l'analyse des groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présentes dans la fraction biologiquement active du biosurfactant et ainsi de déterminer sa nature chimique [95].

Le principe général d'un spectromètre FTIR est proportionnellement simple. La lumière polychromatique provenant d'une source traverse un interféromètre où elle est convertie en un faisceau dont l'énergie est modulée en fonction du temps. Cette modulation est caractéristique du spectre de fréquences initial de la source. Après absorption par l'échantillon, le signal détecté se présente sous la forme d'un interférogramme correspondant à chaque coordonnée de vibration. En dernière étape, cet interférogramme est converti numériquement en un spectre de fréquences par application de la transformée de Fourier.

II.7.4. Caractérisation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (GC/MS)

La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est la méthode la plus sensible pour l'identification et la quantification des lipopeptides et les biosurfactants à poids moléculaire élevés. Par conséquent, l'analyse de la fraction lipidique de BS est cruciale pour l'élucidation structurale détaillée pour l'identification des structures d'acides gras. Le processus implique le clivage hydrolytique du lien entre l'hydrate de carbone ou partie peptide/protéine de la BS et les parties lipidiques.

D'après Vater et al [96], les analyses GC/MS peuvent être effectuées en utilisant une variété de colonnes telles que la colonne capillaire DB-23 ou supelco omegawax (Sigma- Aldrich, Dorset, UK) (30 M 0,25 mm 0,25 mm id), Cette analyse fait sous réserve les conditions analytiques suivant : température de l'injecteur 250 °C, maintenir pendant 1 min, puis rampe à 40°C par minute à 250°C et maintenir pendant 25 minutes. Les paramètres de la spectrométrie de masse : L'impact électronique à 70 eV avec une plage de balayage 50-650 m/z et d'un volume d'injection de 1 ml. Le temps de rétention de FAME augmente avec la longueur de la chaîne et le degré de séparation.

II.7.5. Caractérisation par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Selon Eddouaouda ; Bezza et Chirwa [97], le principe de cette technique est basé sur la séparation efficace des particules chargées en fonction de leur rapport masse/charge. Cette séparation a été réalisée sur colonne C18 (150 mm × 2,1 mm, taille de particule 5µm) d'un système UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Waters Acquity couplé à un spectromètre de masse Waters Synapt G2, qui étalonnée dans les modes de résolution des ions positifs et négatifs sur la plage de masse de 100–2000, en utilisant typiquement des grappes de formiate de sodium Na(HCOO) dans des conditions suivant : 0,5s de temps de balayage, 30 V de tension conique, 2,8 kV de tension capillaire, 100°C de température source; 300°C de température de désolvatation; 100 l/h de gaz conique; 500 l/h de gaz de désolvatation. L'injection de 5µl de volume d'échantillons dans la colonne C18 et de débit de 250 ml/min, puis l'implication d'une étape isocratique 25% (v/v) d'ACN, puis l'implication d'une élution par gradient linéaire à 50% d'ACN pendant 30 min et à 90% d'ACN pendant 15 min (Mulligan et al., 2014). Un lavage de 500 l/h colonne est nécessaire pendant 0,1 min.

Finalemant, il doit être rééquilibrée à 25% d'ACN pendant 30 min. La lyophilisation des fractions collectées se fait directement et les lyophilisats sont conservées à -20 °C [89, 97].

Chapitre III : Les différentes applications des biosurfactants

Ces dernières années, l'intérêt pour les biosurfactants s'est accru en raison de leurs propriétés fonctionnelles étendues [98], plusieurs applications des biosurfactants ont été spéculées. Mais à l'heure actuelle, ils ont encore un fort potentiel. Dans l'industrie, l'environnement et le médical.

Les biosurfactants sont reconnus d'être non toxiques, biodégradables et restent fonctionnels malgré des conditions extrêmes (pH, température et salinité) [99].

Ils sont largement utilisés dans de nombreuses applications telles que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique et cosmétique (tableau 3).

Depuis quelques années, les biosurfactants ont été utilisés comme alternative aux tensioactifs chimiques et devraient trouver de nombreuses applications environnementales et industrielles telles que la bioremédiation des polluants, la récupération améliorée du pétrole, la lubrification, la décontamination, la solubilisation et la dispersion. [100]

Tableau 3 : Différents domaines d'application des biosurfactants [99, 100].

Domaine	Application
Agriculture	Bio-pesticides; fongicides; antiparasites.
Aliments	Solubilisation des huiles aromatisées ; Amélioration de la texture des produits à base de matières grasses.
Chimie	Détergent domestique et industriel ; Peinture : dispersant, émulsifiant. Textile: agent de mouillage.
Domestique	Nettoyant ; Préparation des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles, les crèmes antirides.
Environnement	Bioremédiation : Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures ; Assainissement et rinçage du sol ; Solubilisation des huiles.
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds : Elimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments.
Medicament	Agents antiadhésifs ; antifongiques ; antibactériens ; antiviraux ; Anti-cancéreux, cicatrisants.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole (MEOR).

III.1. Les biosurfactant dans l'environnement

Dans le domaine environnemental, les biosurfactants dissolvent les composés xénobiotiques tels que les hydrocarbures, augmentant ainsi leur biodégradabilité, et chélatent les métaux lourds tels que le zinc, le plomb, le cadmium et le cuivre, les éliminant ainsi des sites contaminés [102].

La plupart des travaux sur les applications des biosurfactants se sont concentrés en raison de leur variété d'utilisation dans des applications environnementales et leur caractère respectueux de l'environnement Rodrigues [103], à l'opposé les tensioactifs synthétiques, les composés microbiens se dégradent facilement et en particulièrement adapté aux applications environnementales telles que la bioremédiation contaminants [104].

La pollution des eaux et des sols est un problème mondial cela peut être du à l'absorption et à l'accumulation de produits chimiques toxiques dans la chaîne alimentaire [105]. Le traitement biologique des sols contaminés par des produits organiques nécessite la promotion de l'accessibilité microbienne aux contaminants.

Bien qu'ils soient utilisés dans de nombreux domaines, les biosurfactants gagnent du terrain dans les technologies d'assainissement des sites contaminés [106].

La restauration assistée par biosurfactant présente de nombreux avantages. En effet, les biosurfactants augmentent la surface des hydrocarbures peu solubles en réduisant les tensions interfaciales et superficielles, augmentant ainsi la biodisponibilité et la mobilité des polluants [107].

Ainsi, en introduisant des tensioactifs bio-dérivés dans des sites contaminés, une biodégradation améliorée peut être obtenue par dissolution, mobilisation ou émulsification des hydrocarbures [106].

III.2. Les biosurfactants dans l'industrie cosmétique

En raison de leurs propriétés de surface uniques, les biosurfactants possèdent des propriétés intéressantes qui pourraient jouer un rôle potentiel dans l'industrie cosmétique en exerçant des effets antirides et hydratants sur la peau humaine. De plus, ces biomolécules se caractérisent par des activités antioxydants et antimicrobiennes intéressantes [108].

En raison de leurs propriétés anti-radicalaires et hydratantes, elles sont utilisées comme nettoyants et agents antirides qui stimulent la production de collagène et d'élastine. Cela ouvre

la possibilité que des biosurfactants puissent être utilement incorporés dans divers produits de soin de la peau à la place de surfactants chimiques, ce qui aurait l'avantage supplémentaire de faciliter la cicatrisation des lésions cutanées mineures [109].

Les rhamnolipides se sont avérés efficaces en tant que composés tensioactifs dans de nombreux traitements de la peau, y compris la cicatrisation des plaies, la cicatrisation des brûlures et le traitement des rides. Les entreprises américaines de cosmétiques développent et commercialisent déjà des produits contenant des lipopeptides qui aident directement à stimuler la production de collagène et d'élastine comme agents anti-âge [110].

III.3. Les biosurfactants en Agriculture

Les biosurfactants peuvent être utilisés pour éliminer les agents pathogènes des plantes et augmenter la biodisponibilité des nutriments pour les micro-organismes bénéfiques associés aux plantes. Agit comme un antagoniste, empêchant la propagation des zoospores dans les systèmes de culture hors-sol. Ils peuvent s'étendre sur une large zone utilisée pour améliorer la qualité des sols agricoles grâce à l'assainissement des sols.

Pour les champignons porteurs de zoospores est l'un des pathogènes racinaires les plus destructeurs [111].

Evaluation des effets des biosurfactants rhamnolipides et saponines sur les champignons pathogènes avec zoospores. Ces chercheurs rapportés que les biosurfactants combattent la pourriture des racines. Rhamnolipid ajouté ou convertit les saponines en une solution de surfactant récupérée qui tue sélectivement les zoospores, Empêche complètement la propagation des agents pathogènes.

III.4. Les biosurfactants dans l'industrie alimentaire

Les biosurfactants sont utilisés dans le traitement des matières premières, comme émulsifiants dans la viande et les vinaigrettes, et comme additifs alimentaires, et ils aident également à améliorer la stabilité, le volume, la texture et la durée de conservation de la pâte. Les produits de boulangerie peuvent être obtenus en ajoutant un tensioactif rhamnolipidique [112].

III.5. Les biosurfactants dans le domaine médical

La dernière décennie a vu une augmentation de l'utilisation des biosurfactants dans le domaine médical. Nous avons rendu ces molécules appropriées en tant qu'agents thérapeutiques à activité antibactérienne, antifongique et antivirale, avec des applications dans

de nombreux domaines de la lutte contre les maladies infectieuses, des soins infirmiers et de la santé publique sans l'utilisation de médicaments synthétiques ou de produits chimiques [113].

L'utilisation de biosurfactants est également bénéfique dans d'autres domaines tels que :

Domaine de la haute technologie : Il comprend l'impression électronique, l'enregistrement magnétique et la microélectronique [114]. Ainsi que les nanotechnologies telles que la production de nanoparticules d'argent et de bâtonnets de NiO [115].

III.6. Les biosurfactants dans l'industrie pétrolier

Les biosurfactants sont des composés stables avec de nombreux avantages par rapport aux tensioactifs chimiques. Leur importance dans diverses industries est notamment en raison de leurs capacités émulsifiantes, mouillantes, moussantes, solubiliser et réduire la viscosité [8].

Les biosurfactants sont biodégradable, améliorant également la biodégradation du pétrole en augmentant la biodisponibilité des composés hydrophobes [116].

La demande de pétrole dans le monde d'aujourd'hui est en augmentation selon (Matsui, 2012), les déversements de pétrole peuvent être causés par diverses défaillances opérationnelles, pannes d'équipement, accidents ou catastrophes naturelles pendant la production, le transport, le stockage et l'utilisation du pétrole. Les fuites de ces derniers sur terre dans les rivières et dans la mer ont causé des problèmes majeurs pour l'environnement [117].

III.7. Les biosurfactants dans l'industrie de détergence

Les tensioactifs sont utilisés dans toutes les formulations de détergents à lessive, représentant en moyenne 20 % de la composition [118]. Les lipopeptides cycliques (CLP) sont stables sur une large plage de pH (7,0 à 12,0). De plus, il ne perd pas ses propriétés de tensioactif même lorsqu'il est chauffé à des températures élevées. Ils présentent une bonne capacité émulsifiante avec les huiles végétales et présentent une bonne compatibilité et stabilité avec les détergents commerciaux, ce qui est avantageux pour l'incorporation dans les formulations détergentes [118].

III.8. L'activité antibactérienne du biosurfactant

L'activité antibactérienne des biosurfactants a été rapportée dans la littérature. Plusieurs biosurfactants ont montré une efficacité antimicrobienne contre les bactéries, les champignons, les algues et les virus [113, 46].

Une des premières activités antimicrobiennes des biosurfactants était notée par l'iturin A, un lipopeptide antifongique puissant produit par des souches de *B. subtilis*, dans les cellules des levures, l'iturin A dissocie la membrane du plasma par la formation des petites vésicules et l'agrégation des particules intra membranaires [64]. Ainsi un membre d'iturin comme le groupe de biosurfactant a le potentiel d'être utilisé comme agent antifongique puissant altératif [113].

Les sophorolipides et les rhamnolipides sont des agents antifongiques contre les champignons pathogéniques, le lipide Mannosylerythritol (UvfE), est un surfactant glycolipidique produit par *Candida antarctica*, il démontrait des activités Antimicrobiennes particulières contre les bactéries Gram- positives [120].

Les effets antibactériens et anti-phytovirales de plusieurs rhamnolipides ont été décrits dans différentes littératures. Sept différents rhamnolipides sont identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* A T1 0, ceux-ci montrent des propriétés antifongiques excellentes contre plusieurs champignons [113] tel que *Aspergillus Niger*, *Chaetium globosum*, et *Penicillium chrysogène* et ont aussi des activités inhibitrices contre plusieurs bactéries *Escherichia coli*, *Microcoques l'uteus*, *Alcali gènes faecalis* et *Staphylococcus epidermidis*.

Conclusion :

Les biosurfactants sont des tensioactifs considérés comme alternatives de leur homologue chimique plus leur biodégradabilité et non toxicité. Ces biomolécules sont incorporées dans un large éventail d'application tel que la détergence, on peut les utiliser comme un agent moussant, stabilisant et surtout un agent antimicrobien.

Partie expérimentale

I.1 Matériel et méthodes

Notre travail de recherche a pour objectif la production de biosurfactants locaux en visant une application en détergence, toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans le travail microbiologique, en utilisant un matériel stérilisé à proximité de la flamme d'un bec benzène, en passant à la flamme les orifices des tubes et des flacons et tous les instruments de manipulation (anse, pinces, spatule) et une stérilisation de tous les milieux de cultures par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

I.1.1. Milieux et conditions de culture

- ***Milieu LB (Luria Bertani)*** : Milieu de repiquage et de conservation (***figure 5***).
 - 10g peptone ;
 - 5g extrait de levure ;
 - 30g NaCl ;
 - 1L d'eau distillée.

Le pH du milieu est ajusté à $7,0 \pm 0,2$ avec une solution de NaOH ou HCl (1 mol/L). Pour la préparation de LB solide, 18 g/L d'agar sont ajoutés au milieu liquide.



Figure 5 : Milieu de repiquage et de conservation

- ***Milieu Minimum (MM)*** : Milieu de production (***figure 6***).
 - 0,2g K_2HPO_4 .

- 1g KH_2PO_4 .
- 0,2g MgSO_4 .
- 0,02g CaCl_2 .
- 1g NH_4NO_3 .
- 1L eau distillée.
- 1 mL de solution d'oligoéléments préparée dans 1L d'eau distillée (0.64g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.11g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.79g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 0.15g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Le pH du milieu est ajusté à $8,0 \pm 0,2$ avec une solution de la soude caustique NaOH ou HCl (1 mol/L).



Figure 6 : Milieu minimum en cour de préparation Annexe

Les milieux de culture, remplis dans des erlenmeyers fermés hermétiquement avec des cotons cardés ont été stérilisés par autoclavage à $120\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min.

❖ *Sources de carbone*

Nous avons utilisé comme source de carbone hydrophobe pour la production de biosurfactant l'huile d'olive. Elle est ajoutée au milieu après sa stérilisation sur des filtres à seringue de $0,45\mu\text{m}$ stérile (*figure 7*).



Figure 7 : Stérilisation de l'huile d'olive

1.1.2. Matériel et appareillage : Etuve - Bain marie – centrifugeuse de la marque SIGMA - Rotavapeur de la marque REIDOLPH - Autoclave - Incubateur - Agitateur magnétique avec plaque chauffante – pH mètre – plaque chauffante thermocouple – Tensiomètre – FTIR (voir *Annexe 1*).

1.3. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant

1.3.1. Repiquage des souches

Le repiquage de nos souches, issues de la collection du laboratoire de recherche de chimie de substances naturelles et de biomolécules (université Blida 1), est fait par la technique d'ensemencement en stries lâches sur le milieu nutritif LB. La colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'un anse stérile et ensemencée dans les boîtes de Pétri contenant le milieu solide. Ces boîtes sont étiquetées et déposées dans l'incubateur à 30 °C pendant 24h et après une bonne croissance ont été conservées à +4 °C pour une courte durée (4 semaines) et dans le milieu LB liquide à 30% glycérol et puis conservée à -40 °C à long terme (1 année ou plus).

1.3.2. Préparation de la pré culture

La préparation du milieu LB liquide passe par plusieurs étapes :

- Peser : 10g de peptone, 5g d'extrait de levure et 30g de NaCl ;
- Mettre les produits dans un Erlenmeyer de 1l et ajouter 1l d'eau distillée ;
- Agitation magnétique ;
- Mettre sur la plaque chauffante pour l'agitation ;
- Ajuster le pH de la solution jusqu'à pH=7 ;
- Fermer hermétiquement les Erlenmeyers avec du coton cardé et l'aluminium ;
- Mettre les flacons dans l'autoclave pendant 20min à 120°C.

La pré culture est effectuée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu LB. Après avoir stérilisé le milieu LB par autoclavage, on prélève un échantillon de la souche bactérienne à l'aide d'une anse en platine stérile, et on le met dans le milieu LB, ensuite l'erlenmeyer est mis dans un incubateur (shaker) à 30 °C sous agitation (200 rpm) pendant 24h.

1.3.3. Préparation de la culture de production de biosurfactant

1.3.3.1. Protocole de préparation

- ***La préparation du MM (milieu minimum) :***
 - Peser : 0,2g de K_2HPO_4 , 1g de K_2HPO_4 , 0,2g de $MgSO_4$, 0,02g de $CaCl_2$, 1g de NH_4NO_3 ; 30g de NaCl.
 - Mettre les produits dans un Erlenmeyer de 2L et ajouter 1L d'eau distillée ;
 - Agitation magnétique ;
 - Mettre l'Erlenmeyer sur une plaque chauffante pour l'agitation ;
 - Ajouter les 30g de NaCl ;
 - Ajuster le pH du MM (pH=7) ;
 - Fermer hermétiquement l'Erlenmeyer avec un coton cardé et l'aluminium ;
 - Mettre le flacon dans l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

- ***La préparation de la culture de production :***

On ramène un Erlenmeyer de 2L, qui est bien nettoyé et on le ferme avec le coton cardé et l'aluminium, puis on le met dans l'étuve pour la stérilisation (à 190 °C pendant 1h).

Une fois le MM est autoclavé et l'Erlenmeyer est stérile et la pré culture est prête, on passe à l'étape de la production de notre biosurfactant où on a besoin de :

- 1L de MM.
- 100 mL de pré-culture.
- 10 mL d'huile d'olive stérile.
- Quelques gouttelettes de FeCl_3 .

Dans un Erlenmeyer de 2L stérilisé on met 1L de MM, 100 mL de pré culture, 10 mL de la source de carbone sous forme d'huile d'olive et quelques gouttelettes de FeCl_3 , toute cette procédure est faite en conditions stériles à proximité de la flamme d'un bec benzène. Puis l'erlenmeyer est incubé à 30 °C sous une agitation de 200 tr/min pendant 3 jours (*figure 9*).



Figure 8 : Culture de production en cours d'incubation

I.4. Evaluation de la production de biosurfactant

L'évaluation de notre production est déterminée par trois tests : L'index d'émulsion (E24), le déplacement de pétrole (DDP) et la tension superficielle (TS). Un volume de la culture

bactérienne a été centrifugé pendant 30 min à 4 °C puis le surnageant récupéré est utilisé pour les techniques de mesure ci-dessous :

1.4.1. L'index d'émulsification E_{24}

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (huile d'olive) dans une phase hydrophile (le milieu aqueux de culture) (*Annexe 13*).

Le test consiste à mélanger 4 mL de surnageant avec 4 mL d'huile d'olive dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 2 min puis laissés se reposer pendant 24h à l'obscurité. Nous avons calculé l'indice d'émulsion (E_{24}) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante :

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

Avec :

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

He : Hauteur de l'émulsion formée.

Ht : Hauteur totale du mélange.

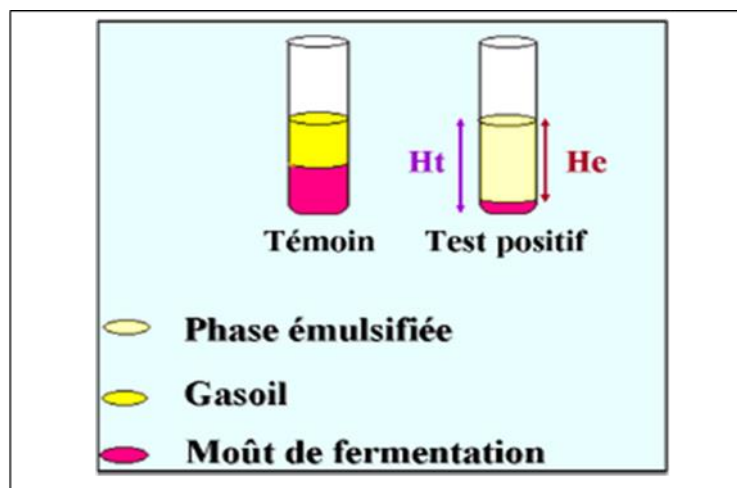


Figure 9 : Test d'émulsification E24

1.4.2. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)

Dans une boîte de Pétri on dépose 40 mL d'eau distillée, puis on rajoute une quantité de 100 µl de pétrole à l'aide d'une micropipette sur la surface de l'eau et on dépose 100 µl de surnageant de culture au centre délicatement. Après 30 secondes, on mesure le diamètre de

déplacement de pétrole sous forme d'un halo (zone claire). Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante (*Figure 10*).

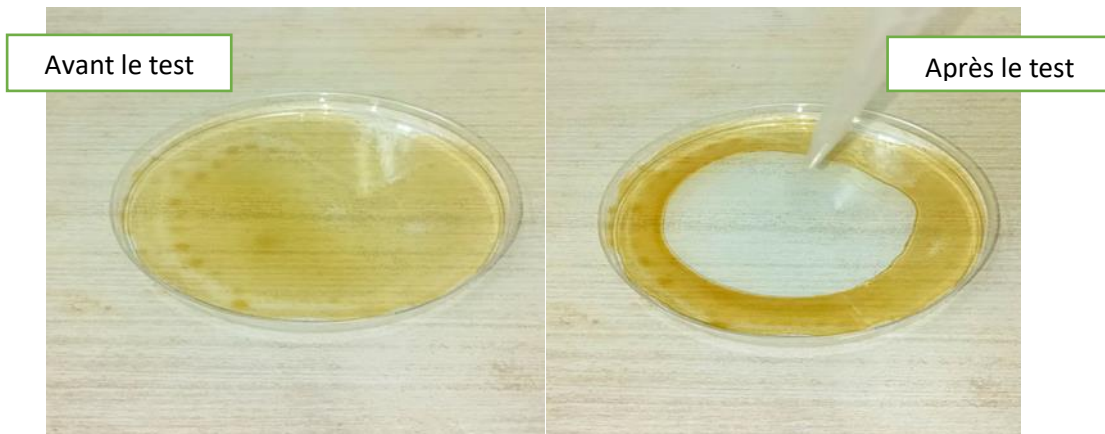


Figure 10 : Le test de Déplacement De Pétrole.

1.4.3. Tension superficielle (TS)

La TS de surnageant de culture est mesurée par un tensiomètre de la marque « Gibertini» (*figure 11*).



Figure 11 : Mesure de la TS à l'aide d'un tensiomètre

1.5. Récupération de biosurfactant contenu dans le surnageant

1.5.1. Centrifugation de la culture bactérienne

Après trois 72h d'incubation de la culture de production vient à l'étape de la centrifugation par une centrifugeuse réfrigérée de marque SIGMA. Cette étape consiste à séparer la biomasse au milieu de culture à 4500 tr/min à 4°C. Le surnageant qui contient le biosurfactant est récupéré pour servir aux différentes analyses et caractérisations (*figure 12*).



Figure 12 : Etape de la centrifugation

Une fois cette étape est terminée on prend les flacons et on passe à l'étape de la filtration avec du papier filtre ($0,22\mu\text{m}$) afin d'éliminer le reste de la biomasse du surnageant pour éviter la contamination.

1.5.2. Acidification du surnageant

Nous avons abaissé le pH de surnageant à 2, en ajoutant une solution de HCl (6M), puis on les laisse au réfrigérateur pendant 24h. Cette étape permettra la précipitation de notre biosurfactant.

1.5.3. Extraction du biosurfactant

1.5.3.1. Extraction liquide – liquide

Le surnageant récupéré qui contient le biosurfactant est extrait par mélange avec l'acétate d'éthyle. Dans une ampoule de 1L, on met 400 mL de surnageant de la souche productrice et on rajoute 400 mL d'acétate d'éthyle, puis le mélange est soumis à une agitation vigoureuse dans une ampoule à décanter puis laissé au repos quelques min (*figures 13 et 14*).

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

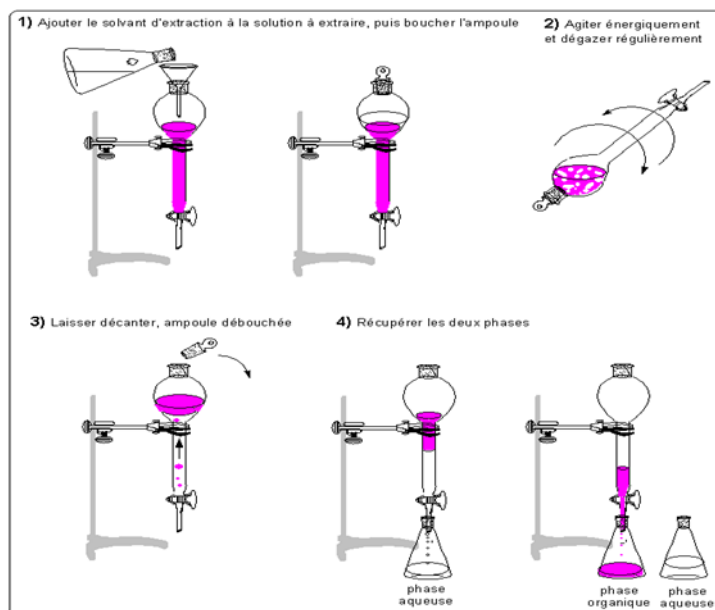


Figure 13 : Principe de l'extraction par solvant

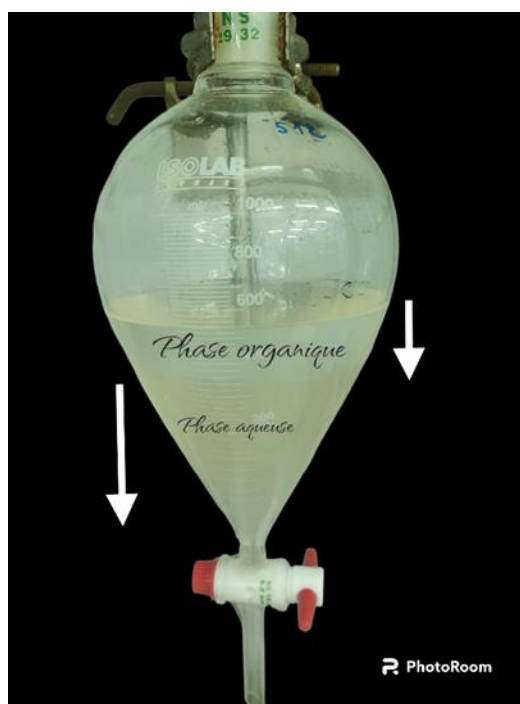


Figure 14 : Extraction par acétate d'éthyle

1.5.3.2. Extraction à froid

Nous mettons un volume de surnageant (500 mL) dans un erlenmeyer et nous l'ajoutons de l'éthanol (500 mL) goutte à goutte, puis le surnageant est précipité avec l'éthanol/surnageant (v/v).

La précipitation est favorisée par le froid en mettant de la glace autour de l'erenmeyer qui contient le surnageant. La solution obtenue est laissée au réfrigérateur à +4°C pendant une nuit, par la suite elle est centrifugée au froid (à une température de +4°C) [121]. Enfin le produit est solubilisé dans un volume minimal d'eau distillée, séché puis pesé.

1.5.4. Concentration à sec du biosurfactant

Cette étape se fait en utilisant un rotavapeur de marque HEIDOLPH afin de distiller rapidement les solvants utilisés dont le but de concentrer partiellement une solution ou pour concentrer à sec (on enlève tout le solvant) une solution ou une suspension (*Annexe 19*).

On utilise un bain thermostaté car l'évaporation est endothermique ; sans cela, la température baisserait rapidement au sein du ballon (il se recouvrirait de givre). Le ballon est mis en rotation pour maintenir une température uniforme au sein du mélange à évaporer.



Figure 15 : Dispositif de concentration du biosurfactant (Rotavap)

Le rendement d'extraction est calculé par l'équation :

$$\mathbf{R} = (\mathbf{m} \text{ Biosurfactant récupéré} / \mathbf{V} \text{ culture de production}) \times 100$$

Avec : **m** Biosurfactant récupéré : masse de biosurfactant récupéré en grammes. **V** est le volume de culture de production : volume de la culture de production en mL.

1.6. Évaluation de l'activité antimicrobienne de biosurfactant produit :

1.6.1 Activité antimicrobienne de surnageant de culture de biosurfactant par diffusion sur milieu solide :

L'activité antimicrobienne de surnageant de biosurfactant a été testée par la méthode d'antibiogramme [122] *vis-à-vis* un panel de microorganismes comprenant quatre bactéries : *Staphylococcus aureus* ATCC 6535, *Bacillus subtilis* ATCC 6655, *Echerichia coli* ATCC 8139 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 902 et une levure *Candida albicans* ATCC 10231. Les résultats ont été évalués en mm par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition.

1.6.2. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu liquide :

L'activité antimicrobienne de surnageant de biosurfactant a été testée sur milieu liquide dans une gamme de volume de surnageant de 50 μ L jusqu'à 100 μ L sur les mêmes microorganismes pathogènes testés auparavant. La lecture des résultats a été faite par spectrophotomètre UV-vis à $\lambda=620$ nm.

1.7. Application de biosurfactant dans la détergence

Cette application est inspirée par la méthode de (Helmy et al, 2020) dont nous avons coupé les échantillons de tissu coton de couleur blanche en 4x10 cm rectangle (**figure 16**), et chacun d'eux était taché avec 2ml de chocolat au lait (Candy Choco) (**figures 17 et 18**), et on les a laissés sécher toute la nuit. [123].

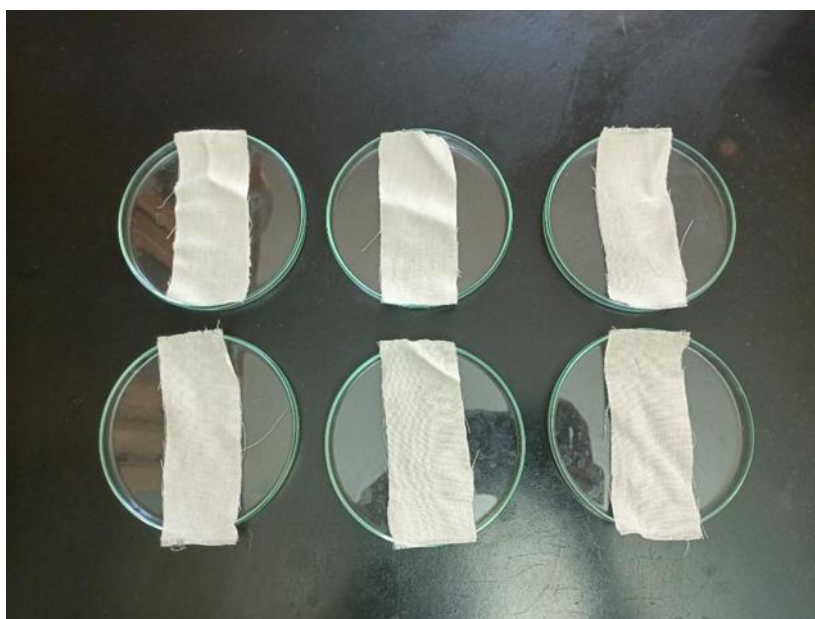


Figure 16 : Echantillons de tissu en coton.



Figure 17 : Les étapes pour avoir des échantillons de tissu tachés

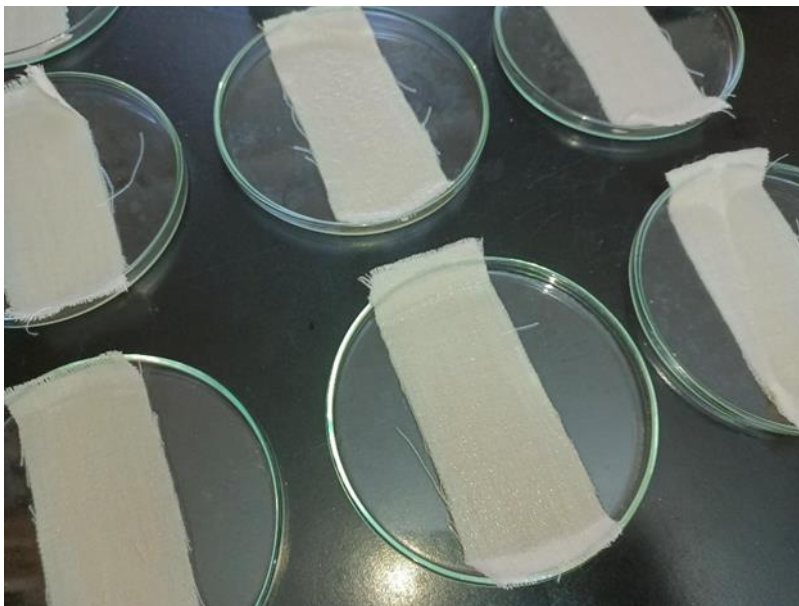


Figure 18 : Les tissus tachés

Une fois 24h est passée et les échantillons de tissu ont été séchés, on prend nos tissus et on les met dans des erlenmeyers de volume de 250 mL : un pour le T- (contenant 50 mL de l'eau distillée), un pour le biosurfactant formulé (50 ml) et un pour le surnageant formulé (50 mL).

❖ **Formulation de détergent à base de biosurfactant :**

- 50mL solution de BS à CMC ;
- 0,75mg Na-Bicarbonate ;

- 0,75mg Na-Citrate ;
- 2,4mg Na-Sulfate ;
- 0,1mg Na-Carboxymethyl cellulose.

❖ **Formulation de détergent à base de surnageant de culture :**

- 50ml solution de surnageant de culture :
- 0,75mg Na-Bicarbonate ;
- 0,75mg Na-Citrate ;
- 2,4mg Na-Sulfate ;
- 0,1mg Na-Carboxymethyl cellulose.

❖ **Le témoin :**

- 50mL de l'eau distillée.

Une fois les formulations sont faites, on met nos tissus dans les erlenmeyers correspondants et on les traite dans un bains-marie à agitation à 90 °C pendant 20 min (*figure 19*).



Figure 19 : Traitement des tissus contaminés

Ensuite, on met les échantillons de tissu dans 100mL d'eau distillée pendant 20min (*figure 20*).

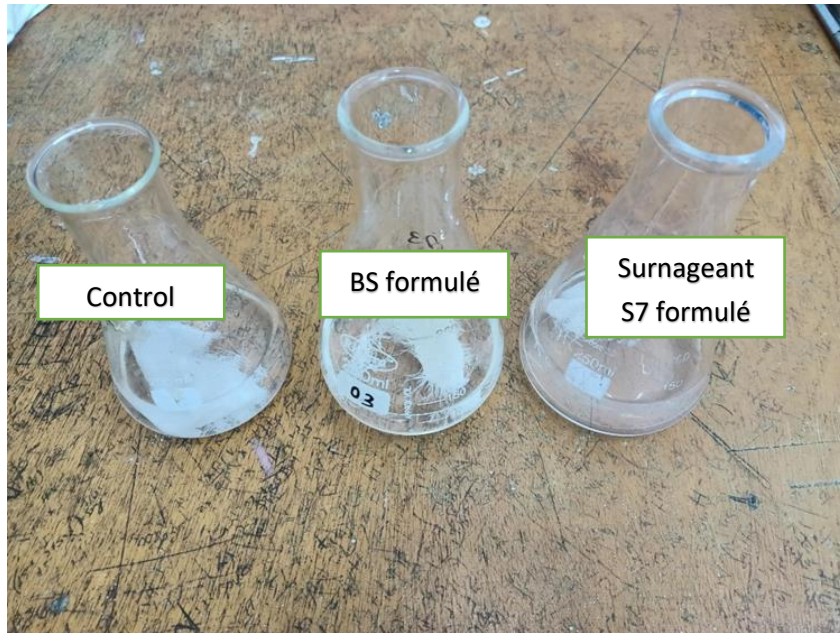


Figure 20 : Tissus émergés dans l'eau distillée

Enfin, on enlève nos tissus et on les met dans des boîtes de Pétri et on les laisse sécher durant la nuit, et on note les résultat le lendemain (**figure 21**).

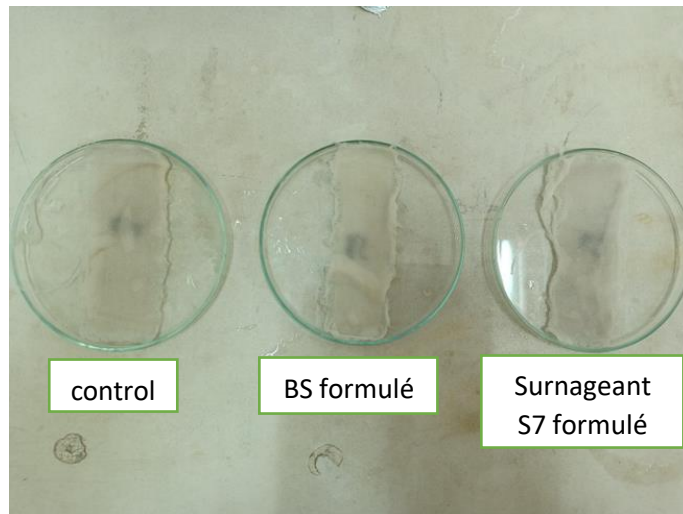


Figure 21 : Tissus traités en cours de séchage

Résultats et discussions

En effet, une collection de 16 isolats aérobies a été isolée d'un site marin du port de Khemisti (Tipaza), purifiée, puis criblée pour leur pouvoir producteur de biosurfactants par l'équipe du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules (Université Saad Dahlab Blida 1).

Une souche bactérienne codée S7 a été choisie pour réaliser notre travail vu la production maximale de biosurfactant en tenant compte l'abaissement de la Tension de surface, le grand Diamètre de Déplacement de Pétrole et la formation des émulsions.

II.1. Suivre de la production de biosurfactant

Après 72h d'incubation dans les conditions optimales, la production de biosurfactant par la souche bactérienne S7 a été étudiée sur le milieu MM, nous avons remarqué l'apparition d'une couleur blanche comme le lait et la consommation totale de la couche huileuse comme le montre la *figure 22*.

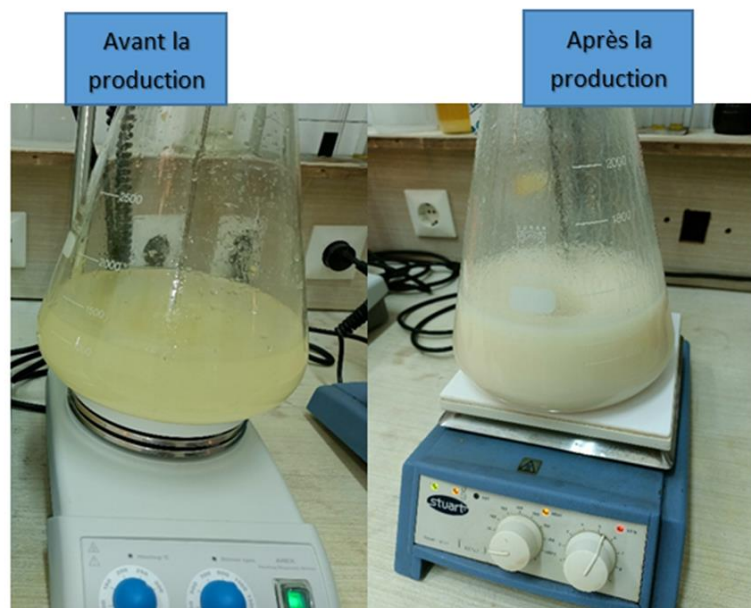


Figure 22 : Production de biosurfactant par la souche 7.

II.2. Détermination des paramètres d'évaluation de la production

II.2.1. Diamètre de Déplacement de Pétrole (DDP)

Les résultats du test de déplacement de pétrole montrent que le surnageant de culture a provoqué une zone de déplacement de pétrole visible (**figure 23**) ; ce qui suggère une activité de surface, ce qui est un indicateur de présence de biosurfactant.

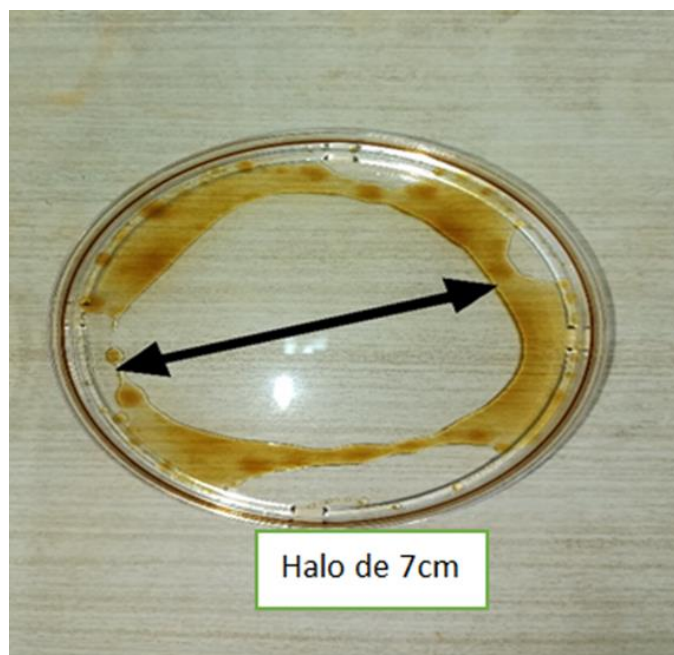


Figure 23 : Déplacement de pétrole de la souche 7

Alors que le BS brut a donné les résultats présentés dans le tableau 4 et la **figure 24**.

Tableau 4 : Les valeurs de DDP du BS brut produit par la souche S7

[BS] (mg.L ⁻¹)	0	500	1000	1800
DDP (mm)	0	5	80	80

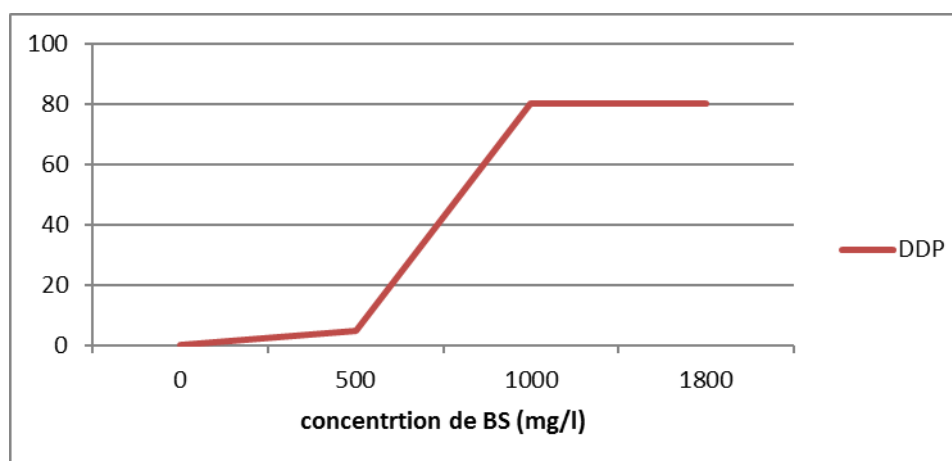


Figure 24 : Evaluation de la DDP en fonction de la concentration du BS

Noha et al ont rapporté que la technique de « Déplacement du pétrole » est une méthode fiable pour mise en évidence de la production de biosurfactants. Čipinytė, et al ont rapporté la

présence d'une relation proportionnelle entre la concentration des biosurfactants et la surface de la zone claire de déplacement du pétrole. [124, 125]

II.2.2. L'index d'émulsification (E_{24})

L'index d'émulsification consiste à l'homogénéisation d'un volume de milieu de culture avec le même volume de l'huile d'olive et du pétrole (*figure 25 et 26*).

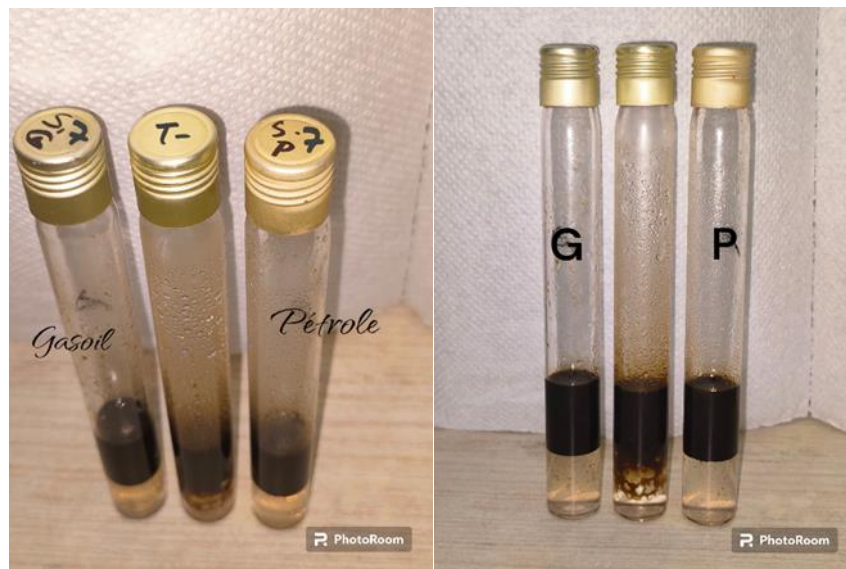


Figure 25 : Résultat de test E24 de la souche S7 (avec le pétrole et gasoil)

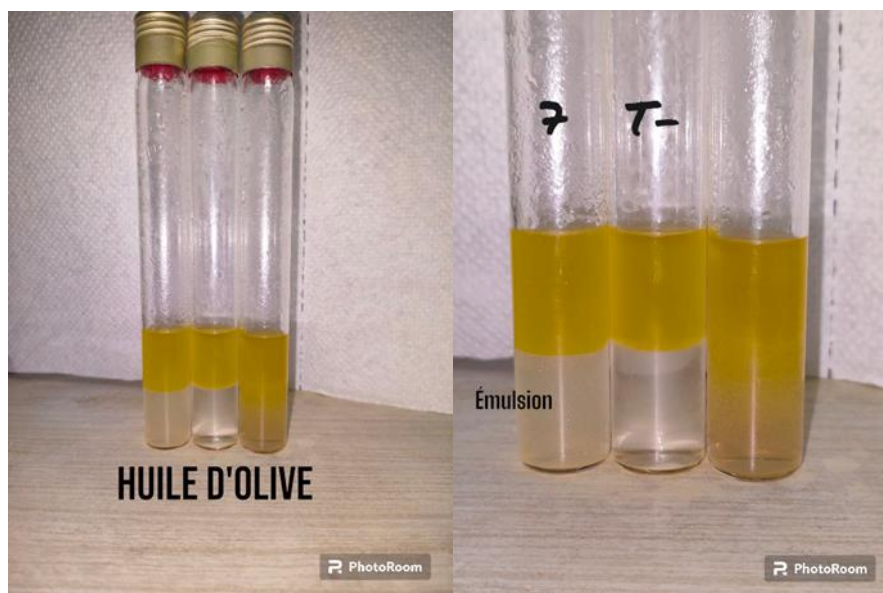


Figure 26 : Résultat de test E24 de la souche S7 (avec l'huile d'olive)

Les résultats obtenus indiquent clairement que la souche S7 est productrice de biosurfactants avec un indice émulsifiant de 74% par rapport à l'huile d'olive et 72% par rapport au pétrole,

vu les résultats obtenus ; on déduit que le biosurfactant a une activité émulsifiante *vis- à- vis* l'huile d'olive et le pétrole.

Mukesh et al [76] ont montré que l'indice d'émulsification diffère selon la nature du biosurfactant et du microorganisme producteur et que l'activité d'émulsification du biosurfactant produit par *Bacillus* spp, testée avec différents hydrocarbures, a montré que l'indice le plus élevé a été obtenu avec l'huile de maïs, suivi par le kérosène et l'huile de tournesol.

Wei et al. [81] ont rapporté que différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles, nous pouvons dire que dans ce cas le biosurfactant peut faire l'objet d'une application environnementale, notamment, dans la dispersion de pétrole rejeté dans le milieu marin surtout en cas de marées noires causée par les accidents de transport de pétrole.

II.2.3. La tension de surface (TS)

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles.

Les résultats obtenus concernant la TS sont représentés dans le tableau 5 et la figure 27.

Tableau 5 : Les valeurs de la TS obtenues pour le biosurfactant produit dans notre cas d'étude.

[BS] (mg/L)	0	500	1000	1800
TS (mN/M)	46,79	42,52	36,82	33,36

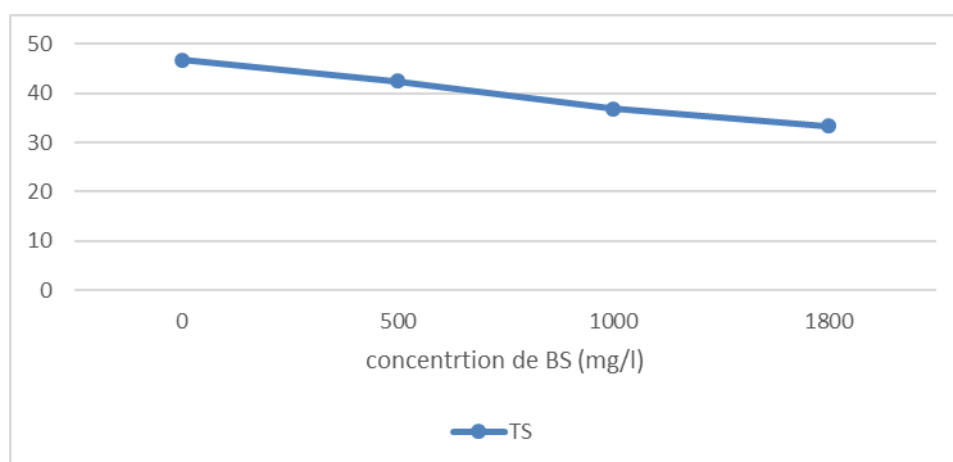


Figure 27 : Evaluation de la TS en fonction de la concentration du BS

Les résultats obtenus montrent que la TS du surnageant décroît avec le temps pour atteindre une valeur minimale de 36,82 mN/m.

Mulligan et al. [126] ont indiqué qu'un bon biosurfactant peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72mN/cm à 35mN/cm, et la tension interfaciale (entre un liquide polaire et apolaire) de l'eau contre le n-hexadécane de 40 mN/cm à 1 mN/cm. Banat et al. [14] ont isolé de nombreuses bactéries capables de réduire la tension superficielle du milieu de culture même à des valeurs inférieures à 40 mN/m et ont constaté que les rhamnolipides et les surfactines produites chez *P. aeruginosa* et *B. subtilis* ont manifesté une importante capacité de réduction de la tension superficielle de l'eau de 72 à 30 mN/m.

II.2.4. La concentration micellaire critique (CMC)

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 et la **figure 28** :

Tableau 6 : Les valeurs de la TS et DDP obtenues pour déterminer la CMC.

[BS] (mg/l)	0	500	1000	1800
TS (mN/M)	46,79	42,52	36,82	33,36
DDP (mm)	0	5	80	80

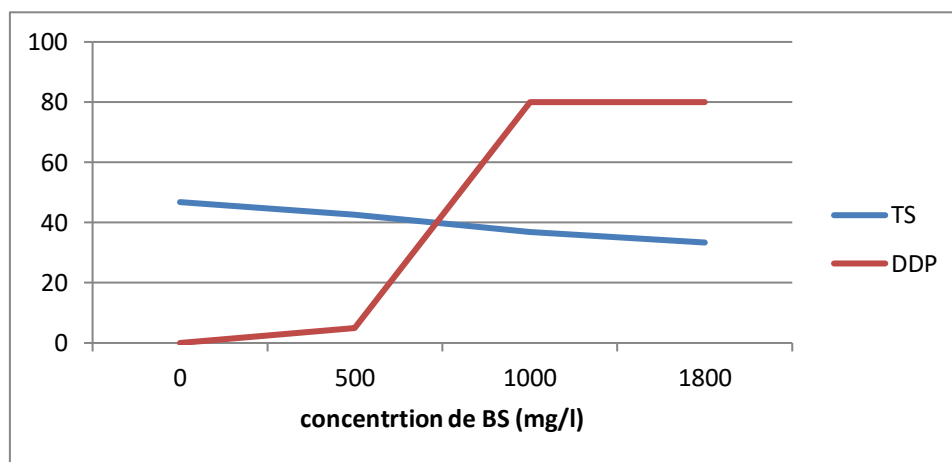


Figure 28 : Evaluation de la TS et la DDP en fonction de la concentration du biosurfactant

La CMC est une concentration à laquelle la tension superficielle d'une solution a atteint un point où tout ajout ultérieur d'agents tensioactifs a peu d'effet sur la réduction de cette valeur et s'accumule sous forme de micelles. La CMC peut être calculé en traçant la tension superficielle en fonction de la concentration de biosurfactant lorsque la pente de la courbe change brusquement au point de CMC, qui est appelé point d'intersection [127]

Il est souvent utile de connaître la valeur de la CMC pour un tensioactif donné car c'est un bon moyen de caractérisation du biosurfactant, elle correspond à la concentration en tensioactif dans un milieu à partir de laquelle les micelles se forment de façon spontanée. En dessous de celle-ci le tensioactif forme une couche en surface du liquide et le reste est dispersé dans la solution.

La CMC du notre biosurfactant a été déterminée par les méthodes standards [128].

II.2.5. La concentration micellaire de dilution (CMD)

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7 et la **figure 29**

Tableau 7 : Les valeurs de la TS et DDP obtenues pour déterminer la CMD.

Facteur de dilution	1	1,5	2	5	10	25	50	100	1000
TS (mN/m)	28,89	29,5	30,72	31,74	33,62	36,62	39,67	42,52	60,02
DDP (mm)	80	75	63	55	50	27,5	22,5	21,6	21

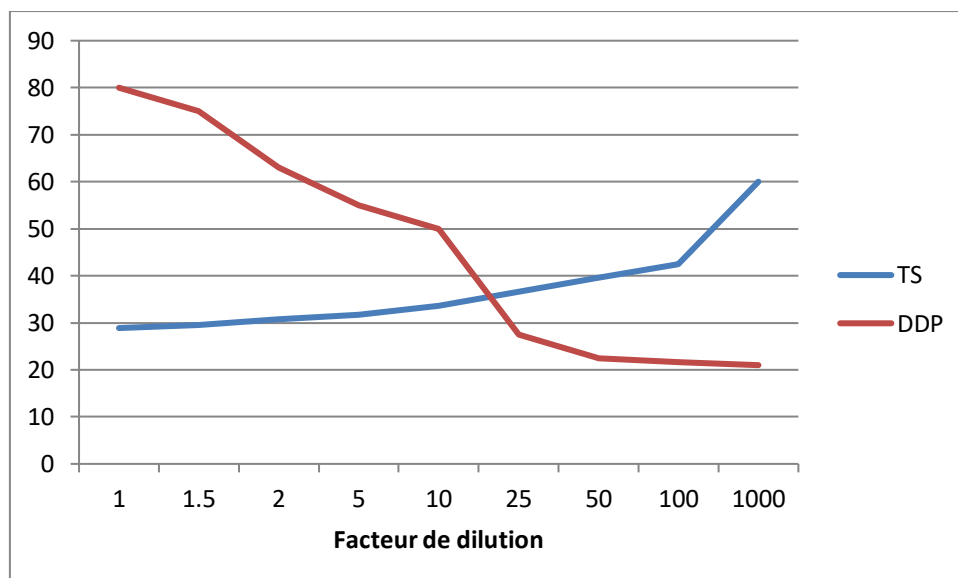


Figure 29 : Evaluation de la TS et la DDP en fct du facteur de dilution du surnageant S7

Le graphe montre que la Tension Superficielle augmente avec l'augmentation de des facteurs de dilution, contrairement au Diamètre de Déplacement de Pétrole.

La dilution micellaire critique (CMD) est définie comme la solubilité d'un tensioactif dans une phase aqueuse et est couramment utilisée pour mesurer l'efficacité d'un tensioactif [55].

II.3. Evaluation de l'extraction du biosurfactant

II.3.1. Evaluation de l'extraction liquid-liquid

Après avoir effectuée l'extraction de biosurfactant par solvant (l'acétate d'éthyle), nous avons obtenu le résultat présenté dans la **figure 30**.



Figure 30 : Biosurfactant de la souche S7 après les étapes de l'extraction et évaporation

La technique d'extraction par l'acétate d'éthyle a donné après évaporation de solvant un extrait sous forme d'une matière huileuse de couleur marron jaunâtre, soluble dans l'eau avec une odeur piquante caractéristique.

Le rendement d'extraction de biosurfactant brut est de l'ordre de 1 g.L^{-1} . Ce rendement de production obtenu avec la souche bactérienne S7 est moyennement faible par rapport aux rendements obtenus cités dans la littérature. Eddouaouda et al. [89] ont trouvé un rendement de 2.1 g/L de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source de carbone. Wadekar et al [129] ont obtenu un rendement de 2.8 g/L avec l'huile de friture à 5% (m/v) par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.3.2. Evaluation de l'extraction à froid

Après avoir effectué l'extraction du biosurfactant à froid (avec de l'éthanol), nous avons obtenu le résultat présenté dans la **figure 31**.

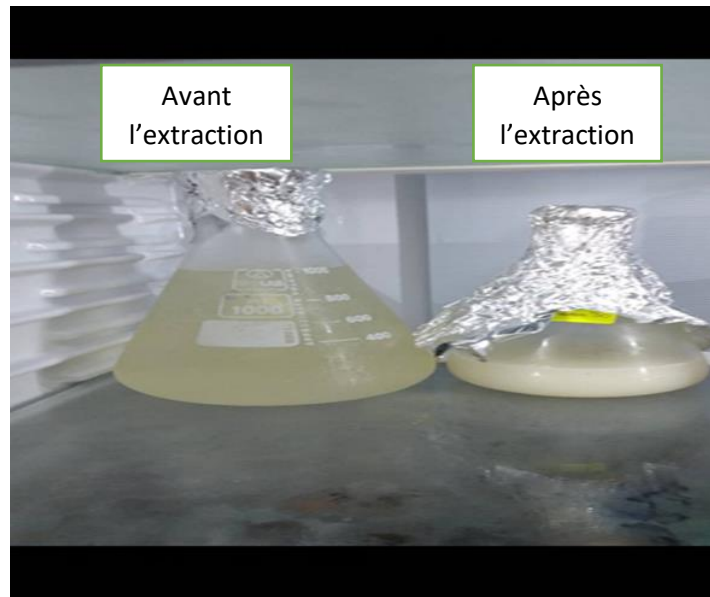


Figure 31 : Surnageant avant et après extraction avec l'éthanol à froid (4°C)

La technique d'extraction à froid par l'éthanol a donné un rendement de $1,238 \text{ mg.L}^{-1}$, qui est à son tour plus élevé par rapport le rendement de l'extraction par solvant (acétate d'éthyle).

II.4. Évaluation de l'activité antimicrobienne de surnageant de culture de biosurfactant BS-7 :

II.4.1. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu solide :

Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 32** :

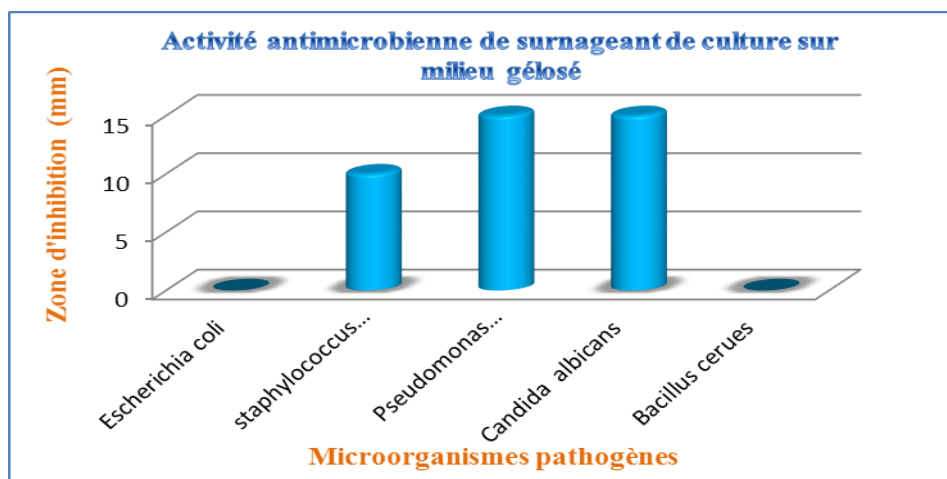


Figure 32 : Diagramme représentant la zone d'inhibition en fonction des microorganismes pathogènes

Une échelle d'estimation des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne a été utilisée pour interpréter les résultats de l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne sur milieu solide.

Nous pouvons constater d'après les histogrammes ci-dessus que sur les cinq souches testées : trois souches sont sensibles au surnageant BS-7, qui sont : *Pseudomonas aeruginosa* (15 mm), *Staphylococcus aureus* (10 mm) et *Candida albicans* (15 mm).

II.4.2. Activité de surnageant de culture de biosurfactant sur milieu liquide

Les résultats obtenus sont présentés dans **la figure 33** :

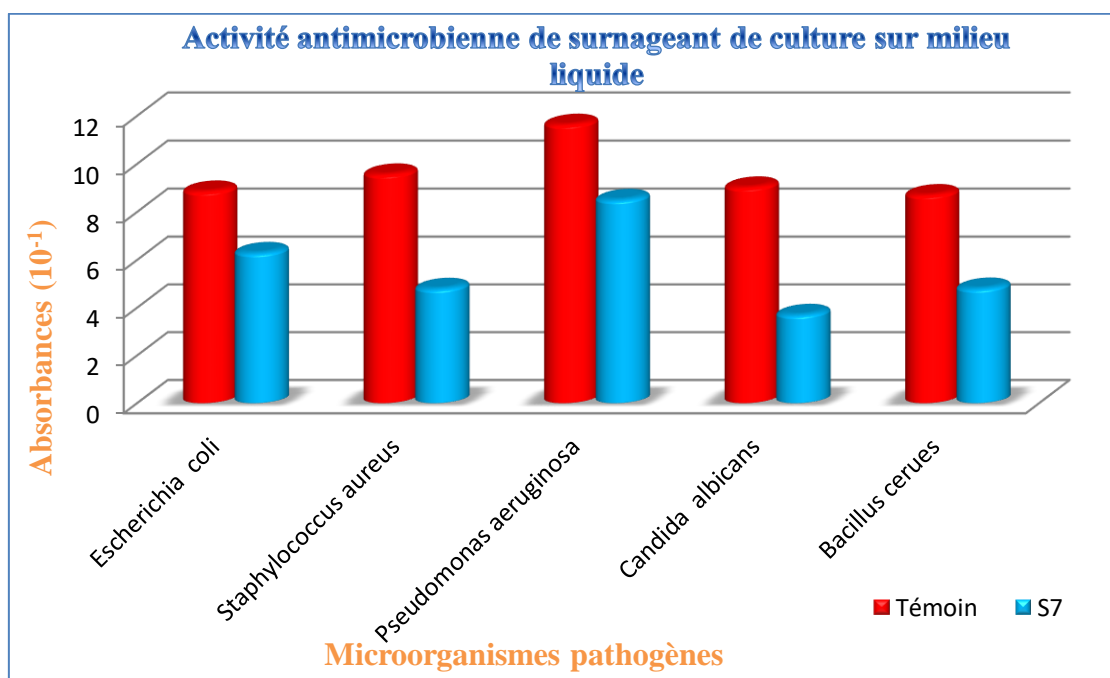


Figure 33 : Diagramme représentant l'absorbance en fonction des microorganismes pathogènes

Les résultats sont mesurés à l'aide d'un spectromètre UV-Visible à 620 nm. L'activité antimicrobienne de surnageant de culture issu de la souche S7 a été évaluée également en milieu liquide, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la réduction de la mesure de la croissance bactérienne pour chaque dilution.

D'après les histogrammes ci-dessus, le surnageant de la souche S7 a révélé une activité importante vis-à-vis les cinq souches pathogènes testées.

À ce jour, un grand nombre de chercheurs ont étudié l'effet antimicrobien des biosurfactants contre plusieurs souches pathogènes. (Sharma, Saharan, et al. 2016) [130], qui ont étudié l'activité antimicrobienne des biosurfactants des *Lb. helveticus* MRTL91 dont les résultats ont

montré qu'une inhibition presque complète a été observée pour tous les microorganismes testés. (Rienzo, Stevenson, et al. 2016) [131], ont confirmé que les biosurfactants présentaient une activité antibactérienne plus importante contre *S. aureus* que contre *P. aeruginosa* et *E. coli*. De même, Morais, Cordeiro, et al. [132], ont évalué les effets antimicrobiens des biosurfactants de *L. jensenii* P6A et de *Lb. gasseri* P65, leurs résultats ont montré une grande efficacité vis-à-vis *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter. aerogenes* et *S. saprophyticus*. De plus, les biosurfactants ont complètement inhibé la croissance de *C. albicans*.

II.5. Résultat de l'application de biosurfactant dans la détergence :

On a obtenu les résultats de l'application après 24h de séchage (**figure 34**).

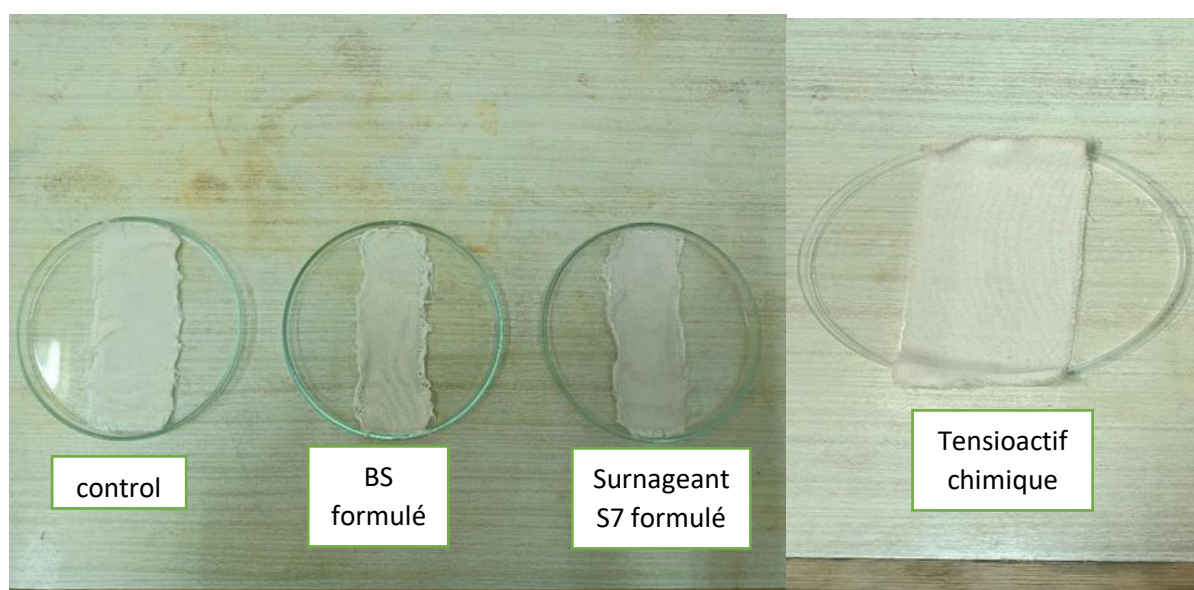


Figure 34 : Résultats de l'application en détergence

Cette figure montre les résultats qu'on a obtenu après 24h de séchage. En comparant entre le tissu « control » et les autres tissus, on remarque :

- Entre « control » et « BS formulé » : on remarque que le BS formulé a enlevé 98% des taches du tissu en coton par rapport au tissu « control » qui a resté tacher.
- Entre « control » et « surnageant S7 formulé » : on voit que le surnageant S7 formulé a enlevé 96% des taches de notre tissu en coton.
- Entre « control » et « tensioactif chimique » : on remarque que le tensioactif chimique a enlevé 98% des taches du tissu en coton.

D'après nos observations visuelles et en comparant avec résultat du tensioactif chimique, nous concluons que la formulation de BS qui est un tensioactif biologique et du surnageant S7 sont très efficaces vis-à-vis l'enlèvement des taches du tissu en coton.

L'efficacité du détergent formulé à base de notre biosurfactant est certaine comme agent nettoyant et antimicrobiens en rapport de ses caractéristiques déterminées par cette application qui nécessitera une analyse de conformité selon la norme ISO. Ces analyses seront réalisées en collaboration de l'entreprise HAYAT-Bingo à Blida.

Conclusion générale

L'objectif de notre travail est la production d'un biosurfactant par une souche bactérienne marine isolée localement afin de l'appliquer dans le domaine de la détergence. Il est à signaler que cette application de l'utilisation de notre biosurfactant produit localement comme agent nettoyant et antimicrobien est acceptée comme Start-up au niveau de l'université de Blida 1 et le brevet d'innovation a été déposé au niveau de l'INAPI-Algérie.

La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant a été fondée sur leur grand pouvoir émulsifiant, la valeur minimale de la tension superficielle et sur le grand diamètre de déplacement de pétrole en utilisant l'huile d'olive comme source du carbone et d'énergie. Cette dernière a montré un fort potentiel de production et un rendement de 1 g.L^{-1} de biosurfactant brut issu d'une extraction par solvant (acétate d'éthyle), et un rendement de $1,238 \text{ g.L}^{-1}$ issu d'une extraction à froid en utilisant l'éthanol.

Le biosurfactant produit est doué d'une activité nettoyante et antimicrobienne (effet bactéricide) en employant le surnageant de culture qui était efficace pour réussir une application environnementale pour laver des tissus en coton contaminé. Idem, la solution de biosurfactant brut formulé a révélé un très bon résultat où elle a éliminé 98% des tâches. C'est un avantage en terme de coût et en terme environnemental en utilisant un produit de notion Bio.

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

- La réduction du coût de production du biosurfactant en testant d'autres substrats à faibles valeurs marchandes (huile de friture, huile de vidange, fractions pétrolières, etc.).
- L'étude de son activité antibactérienne contre d'autres souches microbiennes pathogènes notamment fongiques.
- Il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs afin d'améliorer les rendements de production.

Références bibliographiques

- [1] Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R., (1996). Microbial production of biosurfactant. Resources conservation and Recycling, 18 : 41-57.
- [2] Banat I. M, Makkar R.S., Cameotra S.S., (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiology Biotechnology, 53(5) :495-508.
- [3] Bognolo, G. 1999. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces. A: Physico-Chemical and Engineering Aspects, 152 (1-2), 41-52.
- [4] Van Dyke M.I., Lee H et Trevors J.T., (1991). Applications of microbial surfactants, Biotechnology Advances, 9 : 241-252.; 94. Fliechter A., (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application, Tibtech, 10: 3-12.
- [5] Nitschke, M. and Pastore, G.M. (2002). Biosurfactants: Properties and applications. Quim. Nova. 25: 772–776.
- [6] Mnif, S and Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. Peptides. 71: 100–112.
- [7] Ishigami, Y. and Suzuki, S. (1997). Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes. Prog. Org. Coat. 31: 51–61.
- [8] Garofalakis, G., Murray, B.S., and Sarney, D.B. (2000). Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar head groups. J. Colloid Interface Sci. 229: 391–398.
- [9] Goueth, P.Y., Gogalis, P., Bikanga, R. et al. (1994). Synthesis of monoesters as surfactants and drugs from D-glucose. J. Carbohydr. Chem. 13: 249–272.
- [10] Sarney, D.B. and Vulfson, E.N. (1995). Application of enzymes to the synthesis of surfactants. Trends Biotechnol. 13: 164–172.
- [11] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences, 17 (3), 401.

- [12] Volkering, F., Breure, A. & Rulkens, W. Aspects microbiologiques de l'utilisation des surfactants pour l'assainissement biologique des sols. *Biodégradation* 8 , 401–417 (1997).
- [13] Département de biologie, Université de Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1
Département des sciences biologiques, Université Thompson Rivers, Kamloops, Colombie-Britannique, Canada V2C 5N3
- [14] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2005. Potential applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495–508.
- [15] Kearns, D.B., and Losick, R. (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49: 581– 590.
- [16] Kamiya, N., Inoue, M., Goto, M., Naruta, Y., 2000. Catalytic and structural properties of surfactant–horseradish peroxidase complex in organic media. *Biotechnol. Prog.* 16, 52–58.
- [17] Parra J.L., Guinea J., Manresa M.A., Robert M., Mercade M.E., Comelles F. et Bosch M P., (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S*, 66 (1): 141-145.
- [18] West C.C. et Harwell J.H., (1992). Surfactants and subsurface remediation, *Environmental Science Technology*, 36 (12) : 2324-2330.
- [19] Shekhar, S., Sundaramanickam, A. & Balasubramanian, T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45, 1522–1554 (2015).
- [20] Volkering, F., Breure, A. & Rulkens, W. Aspects microbiologiques de l'utilisation des surfactants pour l'assainissement biologique des sols. *Biodégradation* 8, 401–417 (1997).
- [21] Makkar, RS et Cameotra, SS Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. *J. Surfact. Deterg.* 2. 237-241
- [22] Markande, A.R., D. Patel, and S. Varjani, A review on biosurfactants : properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 2021: p. 124963.
- [23] Banerjee S., (1992). Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank. *Chemical industry digests.* 4; pp. 75-78.

- [24] Vandyke MI., Hunglee and Trevors JT. Application of microbial surfactants, page : 241-246, 1992.
- [25] Georgiou G. Surface active compounds for microorganisms. Biotechnol. Vol 10, page : 60-64, 1992.
- [26] Biosurfactants for cosmetic applications M.J. Brown Archmu Limited, Queen'S Building, Kidderpore A venue, London hW'3 7ST.
- [27] Ehghan-Noude, G., Housaindok, M. et Bazzaz,BS Isolement, caractérisation et investigation des activités de surface et hémolytique d'un lipopeptidebiosurfactant produit par *Bacillus subtilis* ATCC 6633. J. Microbiol. 436, 272-276 (2005).
- [28] Desai, JD et Banat, IM Production microbienne de tensioactifs et leur potentiel commercial. Microbiol. Mol. Biol. Tour. 61, 47-64 (1997)
- [29] Markande, A.R., D. Patel, and S. Varjani, A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. Bioresource Technology, 2021 : p. 124963.
- [30] Kappeli, O., Finnerty, W.R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol, 140, 707-712.
- [31] Wise, D.L. 1997. Global Environmental biotechnology. 1st Edition. Elsevier Science. 66. 791p.
- [32] Ron E.Z, Rosenberg E, (2002). Biosurfactants and oil remediation. Current Opinion in Biotechnology, 13 : 249-252.
- [33] Karanth N. G. K., DEO P. G. and Veenanadig N. K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. Curr. Sei. 77: 116-123.
- [34] Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Kochupappy R.T. and Sivachidambaram P. (2008). Biosurfactants : Properties, commercial production and application. Curr. Sei. 94 : 736-747.
- [35] Bognolo, G. 1999. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces. A: Physico-Chemical and Engineering Aspects, 152 (1-2), 41-52.
- [36] HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996). Microbial production of biosurfactant. Resources conservation and Recycling, 18 : 41-57.

- [37] Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., Imtiaz, S. 2013. Classification and industrial applications of biosurfactants. *Academic Research International*, 4(3), 243.
- [38] Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- [39] Herry J.M., Meylheuc T. et Bellon-fontaine M.N., (2001). Les biosurfactants, des Biomolécules a forte potentialité d'application, *Journal Sciences des aliments*, Vol.21, No.6, p. 591-649.
- [40] Michele, A. S., Isabella, G. L., Ana, C. A., Erica, S. Patr'icia, M. A., Harish, K.C., João, V. B .2021. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *International Journal of Microbiology*, 10.1155, 11 pages.
- [41] Marchant, R., Banat, I.M. 2012. Microbial biosurfactants : challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30 (11), 558-565; Mokdad K. 2015. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants, optimisation de la production et caractérisation de biosurfactants en vue d'une application en agroalimentaire. Mémoire de Magister en sciences agronomiques : Nutrition et transformation des aliments. Université de Blida. 1. 94 p.
- [42] Georgiou G. Surface active compound for microorganismes. *Biotechnol.* Vol 10, page : 60-64, 1992.
- [43] Fiechter A. Biosurfactants Moving to wards industrial application TIBTECH. Vol 10, page : 208,216, 1992.
- [44] Gabet S. (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique.1-186. Thèse de Doctorat, Université de Limoges.
- [45] Sarubo L. A., Marçal M. C., Neves M. L. C., Silva M. P. C., Porto A. L. F. and compositakaki G.M.C. (1997). Bioemulsifier Production in Batch Culture Using Glucose as Carbon Source by *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 : 59-67; Kosaric N. (2001). Biosurfactants and their Applications for Soil Bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* 39 : 295-304.

- [46] Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Kochupappy R.T. and Sivachidambaram P. (2008). Biosurfactants : Properties, commercial production and application. *Curr. Sei.* 94 : 736-747.
- [47] 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.
- [48] Gabet S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p. 177.
- [49] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (3), 401.
- [50] Zajic J.E et Donaldson E.C., (1985). Microbial biosurfactants In: *Microbs and recovery*. Vol. 1; pp 19-30.
- [51] BENERJEE S., (1991). Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank. *Chemical industry digests*. 4; pp. 75-78.
- [52] Singer M.E., Fennerty W.R., Bolden P. et King A.D., (1983). Microbial processus in the recovery of heavy petroleum. In *proceeding 1982 international conference on microbial enhancement*
- [53] Benergee S., (1991). Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank. *Chemical industry digests*. 4; pp. 75-78.
- [54] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [55] Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- [56] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (3), 401.

- [57] Tabka G., 2014. Cosmétique, Développement de produits cosmétiques, ISBST. PP 96-97
- [58] Zhou QH, Klekner V. Black well scientific, page: 76-79, 1991.
- [59] Chitour C.E. chimie de surface et catalyse chimique, pagel 7-18, Ed. Office des publications universitaires, Algérie 1981.
- [60] Zhang Y., Miller RM. Enhancedoktak-dispersion and biodégradation by *P. aeruginosa*. Appl and environnemental biotechnology, page 3276-3282, 1992.
- [61] Mulligan C.N., Sharma S.K. et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants: research trends and applications. CRC press. 321p.
- [62] Sudhanshu, S., Arumugam, S., Tangavel, B. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 45, 1522-1554.
- [63] Krepsky, N., Da Silva, F. S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C. 2007. Alternative Methodology for Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria. Braz. J. Biol., Vol. 67, N°. 1, p. 117-124.
- [64] Cameotra S.S. et Makkar R.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 428-434.
- [65] Marchant R. et Banat. I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology. 30(11): 558-565.
- [66] Christofi, N., Ivshina I.B. 2002. A review: microbial surfactants and their use in fieldstudies of soil remediation, Journal of Applied Microbiology, 93, 915-929.
- [67] Fakruddin, Md .2012. Biosurfactant: Production and Application. Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, 3 :124,5 pages.
- [68] Lang S. et Wullbrandt D., (1999). Rhamnose lipids biosynthesis □ Microbial production and application potential. Applied Microbiology Biotechnology, 51: 22-3.
- [69] Priya, T., Usharani, G. 2009. Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* Botany Research International, 2(4), 284-287.

- [70] Płociniczak, P.M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12.
- [71] Lee, D.W., Lee, H., Kwon, B., Khim, J.S., Yim, U.H., Kim, B.S., Kim J. 2018. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*, 241, 254-264.
- [72] Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105, 43–50.
- [73] Kosaric, N., Sukan, F.V. 2015. Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. 1st Edition. International Standard Book Number-13 : 978-1-4665-9670-2. 389p.
- [74] GUERRA-SANTOS L.H., et KAPPELIO. et FIECHTERA A., (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and Environmental factors. *Applied Microbiology Biotechnology*, 24: 443-448.
- [75] Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu Z. 1991. Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micellar nonionic surfactant solution, *Environ.Sci. Technol*, 25(1), 127- 133.
- [76] Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T. et Scherr K.E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*. 209: 138–146.4.
- [77] Neindre B.L., (1993). Tensions superficielles et interfaces. *Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques*. 475 : 2-12.
- [78] Holmberg K., (2002). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159.
- [79] Holmberg K., (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159
- [80] Pore J., (1992). Emulsions, microémulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, p 270.

- [81] 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.
- [82] Mata-Sandoval J.C., Karns J., Torrents A., (2001). Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous and soil slurries. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49 : 3296-3303
- [83] Djihed A. (2013). Criblage des souches productrices des biosurfactants. Mémoire de Master 2: Pharmacie industrielle. Université de Saad Dahlab de Blida. 56p.
- [84] Płociniczak, P.M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12.
- [85] Satpute, S.K., Kulkarni, G.R., Banpurkar, A.G., Banat, I.M., Mone, N.S., Patil, R.H., Cameotra, S.S., 2017. Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.* 56, 1140–1158.
- [86] Satpute S.K., Bhawsar B.D., Dhakephalkar P.K., Chopade B.A., (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal Marine Science*, 37 (3): 243-250.
- [87] Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat I. M. et Madani K. (2018). Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 37(1): 189-195.
- [88] Nasr S., Soudi M.R., Mehrnia M.R. et Sarrafzadeh M.H. (2009). Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil. *Iran. J. Microbiol.* 2(1) : 54-61.
- [89] Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S.B., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M., Sayadi, S. 2012. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. Strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of basic-microbiology*, 52(4), 408-418.

[90] Slimani, A, Taleb N. 2018. Isolement des Souches Productrices des Biosurfactants. Mémoire de Master : Microbiologie appliqué. Université de Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent. 66p.

[91]From:<https://www.lelivrescolaire.fr/page/6226010#:~:text=A-Principe,diff%C3%A9rentes%20substances%20sur%20la%20plaque>.

[92] Yalaoui-Guellal D. 2017. Production des biosurfactants par des souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments du bassin versant de la Soummam de Bejaia, Algérie. Thèse de doctorat : Microbiologie. Université A. Mira-Bejaia. 126p.

[93] Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Procha, S., Lal, S. 2015. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. SpringerPlus, 4(1),4.

[94] Yalaoui-Guellal D. 2017. Production des biosurfactants par des souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments du bassin versant de la Soummam de Bejaia, Algérie. Thèse de doctorat : Microbiologie. Université A. Mira-Bejaia. 126p ; Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Procha, S., Lal, S. 2015. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. SpringerPlus, 4(1),4.

[95] Das, P., Mukherjee S., Sen R. 2008. Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25:1, 165-186.

[96] Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., Cameotra, S.S. 2002. Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 6210-6219.

[97] Bezza F.A., Mervyn Beukes M. et Chirwa E.M.N. (2015). Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation, *Process Biochem*. 50(11): 1911-1922.

[98] Desai A.J.and Patel R.M.(1994).Advances in the production of biosurfactants and their commercial applications. *J. Sci. Ind. Res*. 53: 619-629.

- [99] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [100] Silva, R.C.F.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Farias, C.B.B., Filho, H.J.B., Santos, V.A., Singh, P., Patil, Y., Rale, V. 2007. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 1, 12.
- [101] De Almeida, D.G., Soares Da Silva, R.d.C.F., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Banat, I.M., Sarubbo, L.A. 2016. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers in Microbiology*, 7(1718).
- [102] Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198
- [103] Rodrigues L., Teixeira J. and OLIVEIRA R. (2006b). Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem.* 41:1-10.
- [104] Nitschke M. and COAST S.G. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 252-259.
- [105] Makkar R.S. and Rockne K.J. (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol.Chem.*22; 2280-2292.
- [106] Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea - *Current Opinion in biotechnology*, 27, 191-194.
- [107] Mahanty, B., Pakshirajan, K., Dasu, V. 2006. Production and properties of a biosurfactant applied to polycyclic aromatic hydrocarbon solubilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(2), 129-141.
- [108] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (3), 401.
- [109] Marchant, R., Banat, I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, 30 (11), 558-565.

- [110] Mandal, S.M., Barbosa, A.E., Franco, O.L. 2013. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, 31(2), 338-345.
- [111] Nielsen C.J., Ferrin D.M. and Stanghellini M.E. (2006). Efficacy of biosurfactants in the management of phytophthora capsici in recirculating cultural systems. *Can. J. Plant. Pathol.* 28:450-460.
- [112] Kosaric, N., Sukan, F.V. 2015. Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. 1st Edition. International Standard Book Number-13 : 978-1-4665-9670-2. 389p
- [113] Rodrigues L., Banat I.M., Teixeiral J. and Oliveiral R. (2006a). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 609
- [114] Marqués, A.M., Pinazo, A., Farfan, M., Aranda, A. J., Teruel, J. A., Ortiz A., Manresa, A., Espuny, M. J. 2009. The Physicochemical Properties and Chemical.
- [115] Mulligan, C. N. 2009. Recent Advances in The Environmental Application of Biosurfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol. 14, N°. 5, p.372-378.
- [116] Ron E.Z, Rosenberg E, (2002). Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 : 249-252.
- [117] Matsui, T., Namihira, T., Mitsuta, T., Saeki, H. 2012. Removal of oil tank bottom sludge by novel biosurfactant, JE1058BS. *J. Jpn. Pet. Inst*, 55, 138–141.
- [118] Hadj, M.A. 2013. Etude des propriétés thermodynamiques d'un surfactant. Mémoire de Master en chimie : chimie Macromoléculaire. Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen. 68p.
- [119] Fakruddin, Md .2012. Biosurfactant : Production and Application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 3 :124,5 pages.
- [120] Nitschke M. and Coast S.G. (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 252-259.
- [121] Techaoei, S., Leelapornpisid, P., Santiarwarn, D., & Lumyong, S. (2007). Preliminary screening of biosurfactant-producing microorganisms isolated from hot spring and garages in Northern Thailand. *Current Applied Science and Technology*, 7(1-1), 38-43.

- [122] Mani, P., Dineshkumar, G., Jayaseelan, T., Deepalakshmi, K., Ganesh Kumar, C., & Senthil Balan, S. (2016). Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech*, 6, 1-9).
- [123] Q Helmy et al 2020 IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 823 012014.
- [124] Noha H.Y., Kathleen E. D., David P. N., Kristen N. S., Roy M. K et Michael J. M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56, 339– 347
- [125] Čipinytė V., Grigiškis S., Šapokaitė D et Baškys E. (2011). Production of biosurfactants by *arthrobacter* sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment. Technology. Resources*. ISBN 97 8-9984-44-070-5.
- [126] Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 146–154 Lovaglio R. B., dos-santos F. J., Junior M. J., Contiero J. (2011).Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301– 305.
- [126] Mulligan, C.N. et Wang, S. (2004). Remédiation d'un sol contaminé par des métaux lourds par une mousse de rhamnolipique dans *Génie géoenvironnemental, , Gestion intégrée des eaux souterraines et des terrains contaminés*, Londres : Thomas Telford ; pp. 544-551..
- [127] Sheppard, J.D.; Mulligan, C. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 110-116, 1987.
- [128] Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D., Lee, T.H., 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 249–253.
- [129] Wadekar S. D, et al., microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2012. 42: p. 249-266.

[130] Sharma, D., & Saharan, B. S. (2016). Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Reports*, 11, 27-35.

[131] Díaz De Rienzo, MA, Stevenson, P., Marchant, R. et Banat, IM (2016). Propriétés antibactériennes des biosurfactants contre certaines bactéries Gram-positives et négatives. *Lettres de microbiologie FEMS*, 363 (2).

[132] Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., ... & Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P 6A and *Lactobacillus gasserii* P 65. *Microbial cell factories*, 16, 1-15.

ANNEXES

Verrerie et consommables utilisés :

Erlenmeyers de 250 ml, 500ml, 1000ml, 2l, 3l ;

Eprouvettes graduées de 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml et 1000ml ;

Béchers de 80ml, 100ml et 250ml ;

Boîtes de Pétri en plastique (D=80mm) ;

Pipettes Pasteur ;

Anse de platine ;

Tubes à essai de 20ml ;

Seringue ;

Micropipettes (200 μ L ,1000 μ) ;

Ampoule à décanter de 250ml ;

Ballon de 250ml, 1000ml ;

Barreaux magnétiques ;

Coton cardé ;

Papier Aluminium ;

Papier Film ;

Papier Filtre ordinaire ;

Spatules ;

Flacons en verre de 250ml, 500ml ;

Entonnoirs ;

Colonne.

Équipement utilisé :

Autoclave (AESCULAP) ;

pH mètre ;

Étuve (Mettler) ;

Agitateur Magnétique-plaque chauffante ;

Balance (Ohaus carat series) ;

Bec Bunsen ;

Agitateur Shaker ;

Incubateur (Mettler) ;

Centrifugeuse (SIGMA 3-16 kl) ;

Rotavapeur (Heidolph) ;

Réfrigérateur ;

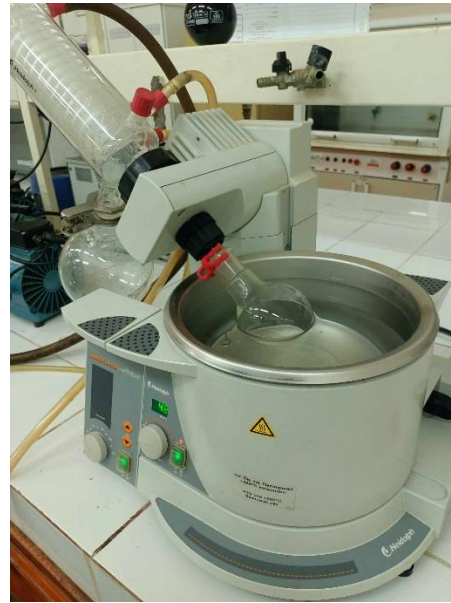
Vortex ;

Tension mètre (Gibertini).

Annexe 1 : Appareillage



Centrifugeuse de la marque SIGMA



Rotavapeur (HEIDOLPH)



Autoclave



Incubateur