

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE BLIDA 1



FACULTE DE TECHNOLOGIE
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

*Option : Procédés de traitement des effluents et protection de
l'environnement*

PAR

BENALI KENZA

THEME

*Optimisation de la production du biosurfactant par des souches
bactériennes isolées à partir d'un sédiment marin portuaire
contaminé par des hydrocarbures pétroliers*

Encadreur :

K .EDOUAOUDA

Co- Encadreur:

B. ZENATI

Promotion 2013-2014

Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH le tout puissant de m'avoir accordé le courage, la force et les moyens pour accomplir ce modeste travail.

Un remerciement spécial pour Monsieur BADIS A., Professeur à l'Université BLIDA 1, pour sa gentillesse, sa patience, son aide et ses conseils utiles qui ont donné vie à ce travail scientifique.

Je remercie spécialement mon Encadreur Dr Eddouaouda K. pour sa disponibilité, ses précieuses remarques et sa compréhension ; merci profondément pour les temps consacré.

Je remercie également mon Co-Encadreur, le doctorant Zenati B. pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses conseils qui ont été pour moi une aide inestimable. MERCI

Je tiens à remercier le président du juré Mr BOUZID, et les membres de juré Mme LARIBI et Mme HADJ ZIANE.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à l'ingénieur de laboratoire de Biochimie et Microbiologie et tous les enseignants et les techniciens et du département de chimie industrielle pour leur aide et soutien.

Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail spécialement à mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Qu'ALLAH leur procure bonne santé et longue vie.

Avec un énorme plaisir et une immense joie, que je dédie ce travail A :

Mes frères et mes sœurs, mon fiancé et à tous mes amis

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études. J'espère que j'étais à la Hauteur de ce que vous attendez de MOI.

ملخص:

في العمل الحالي، حاولنا تقليل تكلفة إنتاج المفاعل السطحي عن طريق استخدام ركائز كربونية متجددة وتحسين كفاءة العمليات الحيوية. للقيام بذلك، سلالات بكتيرية بحرية معزولة من الرواسب البحرية الملوثة بالمنتجات البترولية فحصت قدرتها على إنتاج المفاعلات السطحية.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن: سلالة SdK644 هي الأفضل. وينعكس ذلك في انخفاض قيمة التوتر السطحي إلى (29.2 mN/m) ونشاط استحلابي E24 جيد وجها لوجه مع النفط وزيت المحركات (99% و 79% على التوالي). تم اختيار زيت القلي كأفضل مصدر الكربون. تم إنجاز الكفاءة المثلى من العمليات الحيوية مع NH_4Cl كمصدر النيتروجين، ونسبة C / N (g/g) 50، وملوحة NaCl 23 g/l، ودرجة الحموضة (5pH) ووقت للحضانة ثلاثة (03) أيام. فيظل هذه الظروف، تم تخفيض التوتر السطحي إلى 28.9 mN/m واستحلاب E24 المخصب إلى قيمة 78%. واقتراح مصدر حركية إنتاج المفاعل السطحي والنمو الذي يتم من خلالهم إنتاج المفاعل السطحي كما انه المستقلب الرئيسي المرتبط بحركية النمو. وأخيرا، أظهرت الدراسة إمكانية إنتاج المفاعل السطحي من سلالة SdK644 في وسط مياه البحر فقط مع مصدر الكربون (زيت الطبخ).

كلمات البحث: المفاعل السطحي، البكتيريا البحرية، زيت القلي، العمليات الحيوية، التحسين.

Résumé

Dans le présent travail, nous avons essayé de minimiser le coût de production de biosurfactant par l'utilisation des substrats carbonés renouvelés et l'optimisation de l'efficacité du bioprocédé. Pour cela, des souches bactériennes marines isolées à partir d'un sédiment portuaire contaminé par des produits pétroliers ont été criblé pour leur capacité à produire des biosurfactants.

Les résultats obtenus ont révélé que : la souche SdK644 possède une capacité de production de biosurfactant très marquée. Cela, se traduit par la plus faible valeur de la tension de surface (29,2 mN/m) et une bonne activité émulsifiante vis-à-vis le pétrole (E24 = 99 %) et l'huile moteur (E24 = 79 %), L'huile de friture a été sélectionnée comme étant la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactant, NH_4Cl présente une bonne source d'azote avec un rapport C/N (g/g) de 50, une salinité de 23 g/l NaCl , un pH de 5 et un temps d'incubation de trois (03) jours. Dans ces conditions, la tension de surface a été réduite jusqu'à 28,9 mN/m et l'indice d'émulsification E24 a atteint une valeur de 78 %. L'étude de la cinétique de production de biosurfactant et de la croissance a montré que le biosurfactant est produit autant que métabolite primaire associé à la cinétique de croissance. Enfin, la

production de biosurfactant est possible par la souche SdK644 dans un milieu d'eau de mer supplémenté seulement de source carbone (huile de friture).

Mots clés : Biosurfactant, bactérie marine, huile de friture, bioprocédé, optimisation.

Abstract:

In the present work, we tried to minimize the cost of production of biosurfactant by the use of carbon substrates renewed and optimizing the efficiency of the bioprocess. To do this, marine bacterial strains isolated from a marine sediment contaminated with petroleum products have riddled their ability to produce biosurfactants .

The results obtained showed that: the strain SdK644 being the best. This is reflected in the lower value of the surface tension (29.2 mN/m) and good emulsifying activity against crude oil and motor oil (E24 of 99% and 79% respectively). The waste frying oil was selected as the best carbon source. The optimal efficiency of the bioprocess was accomplished with NH_4Cl as a nitrogen source, a C/N (g/g) of 50, a salinity of 23 g NaCl/l, pH of 5 and an incubation time of three (03) days. Under these conditions, the surface tension was reduced to 28.9 mN/m and the emulsification E24 reached an index value of 78%. Monitoring biosurfactant production kinetics and growth suggested that the biosurfactant is produced as a primary metabolite associated with the growth. Finally, the study showed the possibility of the production of biosurfactant by SdK644 strain in a sea water medium with only the carbon source (waste frying oil).

Keywords: biosurfactant, marine bacterium, waste frying oil, bioprocess, optimization.

Sommaire

Liste des figures	6
Liste des tableaux et des abréviations	7
Introduction générale	8

CHAPITRE 01 : Généralité sur les biosurfactants

1.1 Généralité sur les surfactants	10
1.2 Définition des biosurfactants	11
1.3 Classification des biosurfactants	11
1.3.1. Selon leurs compositions chimiques et microorganismes producteurs	
1.3.2. Selon leurs poids moléculaires	
1.4 Microorganismes producteurs de biosurfactants.....	14
1.5 Biosurfactants issus de microorganismes marins.....	16
1.6 Propriétés des biosurfactants	17
1.7 Techniques de mesure de la production de biosurfactants	18
1.8 Production des biosurfactants.....	20
1.9 Utilisation des substrats renouvelables	22
1.10 Application des biosurfactants	23

CHAPITRE 02 : matériels et méthodes

2.1 Isolement des souches bactériennes	25
2.1.1. Matériel biologique	
2.1.2. Isolement, purification et conservation des souches	
2.1.3. Criblages des souches productrices de biosurfactants	
2.2 Examen morphologique de la souche performante Sdk644.....	26
2.3 Production de biosurfactant par la souche performante	28
2.3.1. Milieu de production	
2.3.2. Techniques employées dans le suivi de la production de biosurfactants	
2.3.3. Optimisation de la production du biosurfactant	
2.3.4. Production du biosurfactants dans l'eau de mer	

CHAPITRE 03 : résultats et discussion

3.1 Criblage des souches productrices de biosurfactants	33
3.2 Examen morphologique de la souche Sdk644	33
3.3 Production de biosurfactants par la souche Sdk644.....	35
3.1.1. Activité émulsifiante vis-à-vis différents substrats	
3.1.2. Optimisation de la production du biosurfactant	
3.1.3. Production de biosurfactant dans milieu d'eau de mer	
Conclusion générale	52
Références bibliographiques	54

Listes des figures

Figure 1.1	Représentation schématique d'un surfactant	10
Figure1.2	Structures des types de quelques surfactants chimiques	10
Figure1.3	structure chimique de quelques glycolipides	12
Figure1.4	Structure d'une surfactine produite par <i>Bacillus Substilis</i>	12
Figure1.5	Structure d'un phosphatidyle-éthanol-amine, un puissant biosurfactant produit par <i>Acinetobacter</i> sp	13
Figure1.6	structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d' <i>Acinetobacter</i>	13
Figure1.7	Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant	17
Figure2.1	localisation de la station de prélèvement	24
Figure2.2	Test de mobilité	26
Figure2.3	Test de déplacement d'huile	29
Figure2.4	Mesure de l'indice d'émulsification	29
Figure3.1	Activité de surface des cultures de souches bactériennes criblées pour la production de biosurfactants	32
Figure3.2	Prise photo des colonies de la souche SdK644 cultivée sur milieu LB modifié après 48 h d'incubation à 30 °C.	33
Figure 3.3	Activité émulsifiante de la souche SdK644 vis-à-vis différents substrats	34
Figure 3.4	Effet de la nature de la source de carbone sur la cinétique de croissance	37
Figure 3.5	Effet de la nature de la source de carbone sur l'activité de surface du biosurfactant	38
Figure 3.6	Effet de la nature de la source d'azote sur la cinétique de croissance microbienne.	40
Figure 3.7	Effet de la nature de la source d'azote sur l'activité de surface du biosurfactant	40
Figure 3.8	Influence du rapport C/N sur la croissance microbienne	42
Figure 3.9	Effet du rapport C/N sur l'activité de surface du biosurfactant	42
Figure 3.10	Effet de la salinité sur la cinétique de croissance de la souche SdK644	43
Figure 3.11	Effet de la salinité sur l'activité de surface de biosurfactant	44
Figure 3.12	Effet de la salinité sur la tension de surface TS et le déplacement d'huile DH après 3 jours d'incubation	44
Figure 3.13	Effet du pH sur la cinétique de croissance de la souche SdK644	45
Figure 3.14	Effet du pH initial du milieu sur l'activité de surface de biosurfactant	46
Figure 3.15	Effet du pH initial du milieu sur la tension de surface TS et le déplacement d'huile DH après 3 jours d'incubation	46
Figure 3.16	Cinétiques de croissance et de production de biosurfactant par la souche SdK644	48
Figure 3.17	Cinétiques de croissance et de production de biosurfactant par la souche SdK644 dans un milieu EM	49

Listes de tableaux

Tableau 1.1	Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface modifié	15
Tableau 1.2	Utilisation des matières premières économiques dans la production des biosurfactants par diverses souches microbiennes adapté	23
Tableau 3.1	Macromorphologie de la souche performante SdK644	34
Tableau 3.2	Description microscopique de la souche performante SdK644	35

Liste des abréviations

MELs	Mannosylerythritolipides
HAP	<i>Hydrocarbures aromatiques polycycliques</i>
CMC	Concentration micellaire critique
C/N	Rapport carbone/ azote
EM	Eau de mer
MMB	Milieu minimum de base
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
E24	Indice d'émulsification
DCO	Demande chimique en oxygène
TS	Tension de surface
DH	Déplacement d'huile
LB	LuriaBertani

Chapitre 01 : Partie bibliographie

CHAPITRE 02 :

Matériels et méthodes

CHAPITRE 03 :

Résultats et discussion

Conclusion générale

Introduction générale

Dans une nouvelle ère d'industrialisation mondiale où de nombreuses industries classiques se sont réformées et redirigées vers des technologies d'urgence, la biotechnologie est en face d'un âge de défi qui offrira une multitude d'opportunités recherchées. Le marché mondial de la biotechnologie est en progression continue. Il était à 25 millions de Dollars en 1980 et a augmenté à 1,7 milliard de Dollars en 1992 [1]. Les surfactants constituent une classe importante de produits industriels largement utilisés dans divers secteurs. Durant les deux dernières décennies, la demande sur les surfactants est multipliée de 300 % [1].

La majorité des surfactants produits sont de nature chimique dérivés de pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [2]. C'est pourquoi, depuis quelques années, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques ou **biosurfactants**. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, moins toxiques et sont également efficaces dans les conditions extrêmes de températures, de pH et de salinités [1].

Jusqu'ici, les biosurfactants ne peuvent pas concurrencer économiquement les surfactants chimiques disponibles sur le marché, dû à leurs coûts de production élevés résultant des faibles rendements obtenus et des coûts de récupération et de purification [3]. Différentes stratégies ont été proposées dont le but de rendre leur coût de production acceptable. Elles incluent, entre autre l'utilisation des substrats renouvelés et à bas prix ainsi que l'optimisation de l'efficacité du bioprocédé.

La réduction du coût de production de biosurfactants nécessite l'amélioration de l'efficacité du bioprocédé, et la sélection des composés les moins coûteux de milieu de culture car ils constituent 50 % du coût total de production. Entre autre, la source de carbone [4]. De ce fait, de nombreux substrats à faible coût ont été employés avec succès dans la synthèse des biosurfactants. Elles comprennent des huiles végétales (huile de maïs, huile de tournesol, huile de soja) [5,6] et huiles végétales utilisées (huile de friture, déchets des raffineries d'huile) [7,8], du lactosérum et des déchets de distillation [9, 10], des déchets des raffineries de sucre (mélasse) [11] et des huiles lubrifiants de moteur [4, 12].

De l'autre côté, la croissance microbienne et l'accumulation des produits métaboliques à l'instar des biosurfactants est fortement influencés par la composition du milieu telle que les sources de carbone, d'azote et les facteurs environnementaux. L'optimisation du bioprocédé pourrait conduire à des rendements maximums de métabolites [13].

L'objectif principal de ce travail de mémoire est l'optimisation de la production de biosurfactant, par une bactérie marine isolée à partir d'un sédiment portuaire, via l'utilisation des substrats déchets et l'étude des principaux facteurs affectant le bioprocédé.

Le mémoire est structuré selon le plan suivant :

Un premier chapitre de bibliographie faisant points sur les biosurfactants, leur classification et les microorganismes producteurs, les techniques d'analyse employées à leur détection et les facteurs affectant leur production,

Un deuxième chapitre réservé à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de ce travail,

Un troisième chapitre consacré à l'exposition des résultats obtenus ainsi que les interprétations et les discussions par rapport aux travaux effectués dans ce domaine.

Enfin, une conclusion générale met en valeurs l'ensemble des résultats obtenus.

1.1. Généralités sur les surfactants

Les surfactants (du terme anglais "Surface Active Agent") sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (tête) et d'une partie hydrophobe non polaire (queue) (figure 1.1) agissant préférentiellement à l'interface entre deux phases fluides tel que l'interface air/eau ou huile/eau. Cette propriété des surfactants leur permet de réduire les tensions de surface et interfaciales et les rendre ainsi un excellent agent détergent, émulsifiant, dispersant et moussant [3].



Figure 1.1 : Représentation schématique d'un surfactant.

La partie hydrophobe des surfactants est constituée d'une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée de 8 à 18 atomes de carbone. Le degré de ramification, la position du groupement hydrophile et la longueur de la chaîne hydrocarbonée sont autant de paramètres importants dans la spécification des propriétés physico-chimiques du surfactant [14]. Selon la nature de la tête polaire (partie hydrophile) on distingue quatre types de surfactants chimiques (figure 1.2) : cationiques, anioniques, non ioniques et les amphotères (Zwitterioniques) [14,15].

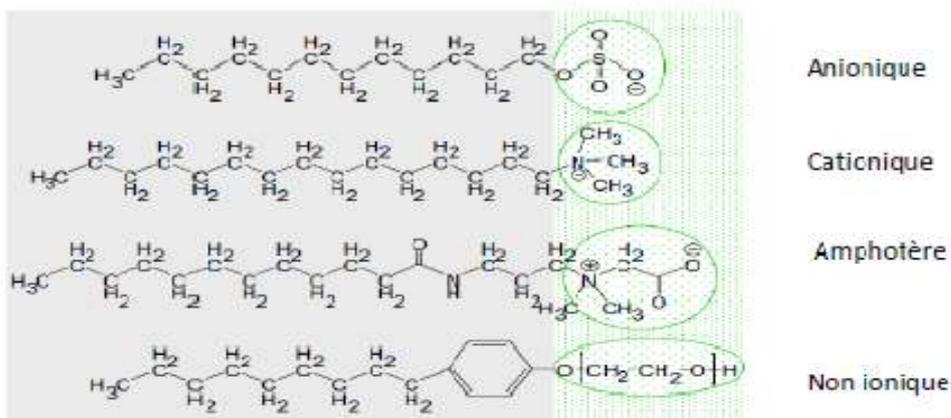


Figure 1.2 : Structures des types de quelques surfactants chimiques

Les surfactants sont parmi les produits les plus utilisés dans divers secteurs d'industrie. La demande pour les surfactants est en nette augmentation. En 2007, toutes les applications des tensioactifs représentent, à travers le monde, une consommation de 11 millions de tonnes par an[16]. La majorité des surfactants produits sont de nature chimique dérivés de pétrole. Cependant, avec le progrès de la biotechnologie et les considérations environnementales de plus en plus exigeantes, les surfactants biologiques pourraient constituer un possible alternatif à leurs homologues chimiques[2]. Les surfactants biologiques ou biosurfactants sont reconnus pour être faiblement toxiques, biodégradables, et peuvent agir dans des conditions environnementales extrêmes [1,17].

1.2. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles produites par des organismes vivants avec une activité particulière élevée de surface et une importante capacité émulsifiante [1,18].

1.3. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe de molécules de diverses structures produits par différents microorganismes. Ils se classent principalement selon leur composition chimique et leur poids moléculaire.

1.3.1. Selon leurs structures chimiques

De point de vue structure, ils constituent d'une partie hydrophile qui peut inclure un acide carboxylique, alcool, acide aminé ou peptide cationique ou anionique, ou un saccharide (mono, di ou poly) attachée à une partie hydrophobe constituée de chaîne d'hydrocarbures ou d'acides gras saturée ou insaturée [19, 20, 21]. Il ressort de cette configuration, cinq classes majeures : les glycolipides, les lipopeptides et lipoprotéines, les phospholipides et les acides gras, les surfactants polymériques et les surfactants particuliers [20].

1.3.1.1. Glycolipides

Les glycolipides représentent le groupe le plus important et le plus étudié parmi les biosurfactants produits [22, 23]. Les glycolipides résultent de la combinaison d'un mono, di, tri ou tétra saccharide (glucose, mannose, galactose, rhamnose) avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxy-aliphatique [3].

Les glycolipides de type : rhamnolipides, trehalolipides, sophorolipides et mannosylerythritol-lipides sont les plus étudiés [22, 23]. La figure 1.3 présente les structures de quelques glycolipides.

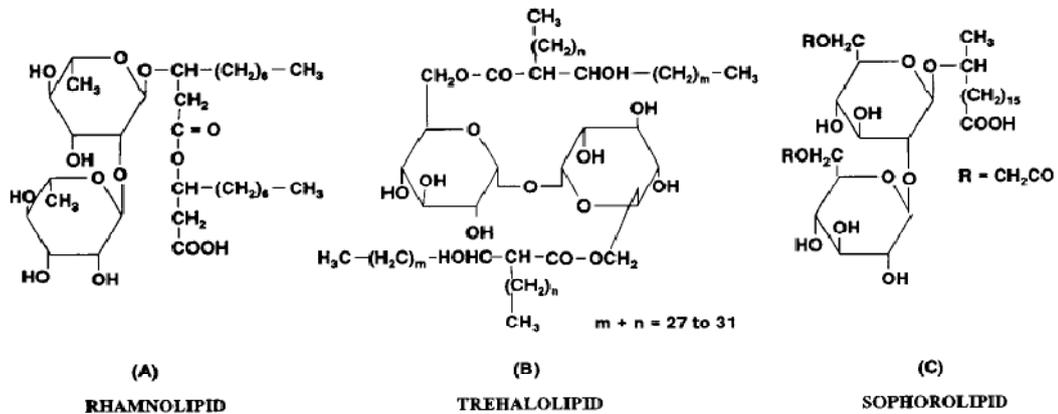


Figure 1.3 : structure chimique de quelques glycolipides [1].

1.3.1.2. Lipopeptides et lipoprotéines

C'est une association de peptides liés à différentes chaînes d'acides gras [24]. Les biosurfactants de nature lipopeptidique sont divisés en quatre familles : les surfactines, les iturines, les fengycines et les plipastatines et les lichenysines[3, 24]. Les surfactines sont la famille la plus importante dans cette classe [1,3]. Ce sont des lipopeptides cycliques (figure 1.4) produites par *Bacillus Subtilis* avec une puissante activité de surface.

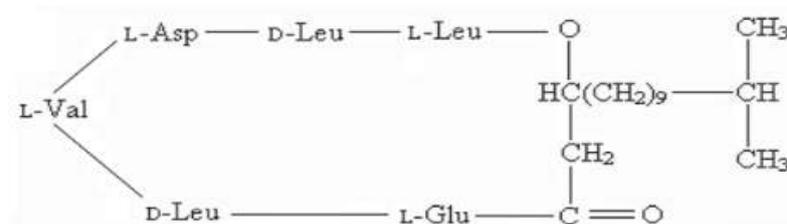


Figure 1.4: Structure d'une surfactine(lipohexapeptide)produite par *Bacillus Subtilis*[1].

1.3.1.3. Phospholipides et acides gras

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphore et de chaîne lipidique[25]. Ils sont classés en deux groupes : glycérophospholipides et glycophospholipides[26]. Tandis que les biosurfactants d'acides gras sont composés de

chaines hydrocarbonées d'acides gras saturés entre C₁₂ et C₁₄ et acides gras complexes qui contiennent des groupements hydroxyles et des alkyles ramifiées [5]. La figure 1.5 présente la structure d'un phospholipide.

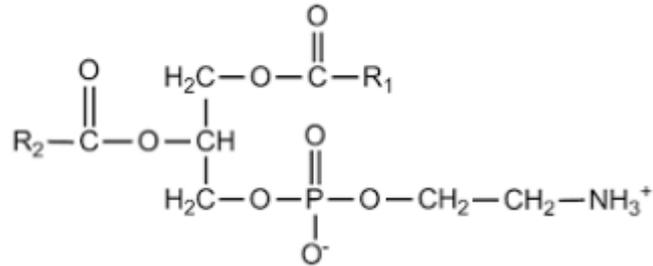


Figure 1.5 : Structure d'un phosphatidyle-éthanol-amine, un puissant biosurfactant produit par *Acinetobacter* sp. R₁ et R₂ sont des chaines hydrocarbonées d'acides gras [1].

1.3.1.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymériques sont des hétéro-polysaccharides poly-anioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines [27]. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevé. A titre d'exemples : Emulsan, Biodispersan, Alasan, Liposan et Manno-protéine [3]. L'Emulsan est le biopolymère le plus étudié. Sa structure est illustrée dans la figure 1.6.

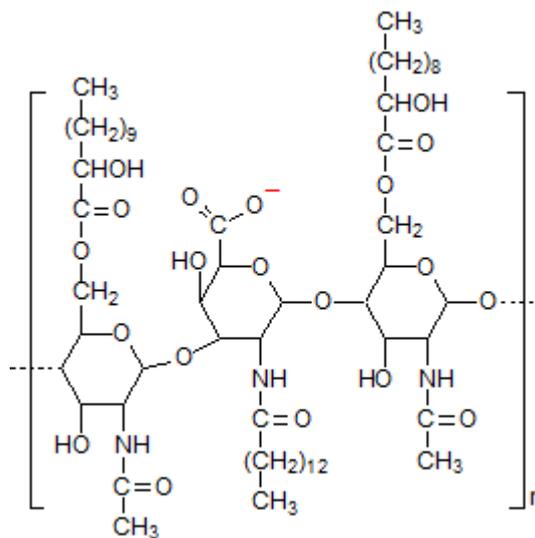


Figure 1.6: structure d'un Emulsan synthétisé par diverses espèces d'*Acinetobacter* [23].

1.3.1.5. Biosurfactants particuliers

Quelques exemples de biosurfactants particuliers sont les vésicules membranaires extracellulaires des cellules microbiennes. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures par formation de microémulsions [1].

1.3.2. Selon leurs poids moléculaires

Les biosurfactants sont ainsi classés en deux catégories : agents de surface à faibles poids moléculaire généralement appelés biosurfactants et bioémulsifiants qui sont des polymères à haut poids moléculaire [19, 28].

1.3.2.1. Composés à faible poids moléculaire

Ils comprennent les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides [29]. Ces molécules communément appelés biosurfactants réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciales [23].

1.3.2.2. Polymères à haute poids moléculaire

On trouve dans cette classe les polysaccharides amphiphiles, les protéines lipopolysaccharides ou les lipoprotéines [23]. Ils sont plus efficace dans la formation des émulsions stables huile dans l'eau sans diminuer beaucoup la tension de surface [23].

1.4. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Une variété de microorganismes notamment les bactéries, sont capables de produire des biosurfactants de diverse composition chimique (tableau 1.1). Leur nature et la quantité produite dépendent du type de microorganisme [19].

Les biosurfactants les plus étudiés sont les glycolipides et les lipopeptides [30]. Toutefois, c'est la classe des biosurfactants glycolipidiques qui a visé une attention toute particulière dans le secteur industriel aux dernières années [31].

Tableau 1.1 : Sources microbiennes des classes majeures des biosurfactants et réduction de la tension de surface [1] modifié.

Biosurfactant	Microorganismes	Tension de surface (mN/m)
Glycolipids		
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
	<i>Pseudomonas sp.</i>	25–30
Trehalolipids	<i>Rhodococcuserythropolis</i>	32–36
	<i>Nocardiaerythropolis</i>	30
	<i>Mycobacteriumsp.</i>	38
Sophorolipides	<i>Torulopsis. Bombicola</i>	33
	<i>Torulopsis. Apicola</i>	30
	<i>Torulopsis. Petrophilum</i>	
Mannosylerythritollipids (MELs)	<i>Pseudozymachurashimaensis</i>	29,2
	<i>Pseudozymahubeiensis</i>	
Lipopeptides et lipoprotéines		
Peptide-lipide	<i>Bacilluslicheniformis</i>	27
Serrawettine	<i>Serratiamarcescens</i>	28–33
Viscosine	<i>Pseudomonasfluorescens</i>	26,5
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	27–32
Subtilisine	<i>Bacillus subtilis</i>	
Acides gras et phospholipides		
Acidesgras	<i>Corynebacteriumlepus</i>	30
Phospholipides	<i>Thiobacillusthiooxidans</i>	
Biosurfactants polymériques		
Emulsan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>	
Biodispersan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>	
Mannan-lipide-protéine	<i>Candida tropicalis</i>	
Liposan	<i>Candidalipolytica</i>	
Carbohydrate-protein-lipid	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
Biosurfactants particulaire		
Les vésiculesdes cellules microbiennes	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>	

1.5. Biosurfactants issus de microorganismes marins

Les microorganismes marins développent des capacités métaboliques et physiologiques uniques leur permettant de s'adapter aux conditions extrêmes des environnements marins et de produire de nouvelles métabolites qui ne sont pas toujours sécrétés par des microorganismes terrestres. Ces caractéristiques du milieu marin offrent des possibilités énormes à la synthèse de nouvelles molécules telles que les biosurfactants/bioémulsifiants et d'autres produits à valeur économique.

Les microorganismes marins producteurs biosurfactants/ bioémulsifiants rapportés dans la littérature incluent : *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* et levures [32].

Dans la classe des glycolipides, un glucose-lipide a été produit par la bactérie *Alcaligenessp.* Ce biosurfactant inhibe la croissance des micro-algues et micro-flagelles. Un tréhalose tétraester anionique a été produit par la souche bactérienne *Arthrobactersp.* EK 1. Le biosurfactant ainsi obtenu réduit efficacement la tension interfaciale avec une importante activité émulsifiante [33].

Dans la classe des biosurfactants lipopetidique, plusieurs types de lipopeptides cycliques sont synthétisés par divers genres de *Bacillus*. Un lipopeptide issu de la souche *Bacillus licheniformis* BAS50 réduit la tension de surface de l'eau de 72 à 28 mN/m, et présente une bonne activité antimicrobienne. Thavasiet al. [34] ont rapporté la production d'un lipopeptide par *Azotobacter chroococcum*. Le biosurfactant obtenu est capable d'émulsifier une variété d'hydrocarbures (lubrifiants, carburants et HAP).

Une variété de microorganismes synthétise des bioémulsifiants à poids moléculaire élevé. D'ailleurs, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG 1 produisant l'Emulsan RAG 1 a été isolée de la mer méditerranéenne. De même, la souche *A. calcoaceticus* A2 produit un bon dispersant des composés insolubles dans l'eau. Les *Streptomyces* sont connues pour produire des bioémulsifiants constitués de protéines et de polysaccharides. La levure *Yarrowialipolytica* est la plus rapportée dans la littérature, elle produit des bioémulsifiants de type lipides, hydrate de carbone et protéine [32].

1.6. Propriétés des biosurfactants

1.6.1. Activité à l'interface (et à la surface)

En termes de propriétés de surface, un efficient biosurfactant diminue la tension de surface de l'eau à 35 mN/m et la tension interfaciales eau /Hexadécane à 1 mN/m[30].

1.6.2. Concentration micellaire critique

Les tensions de surface ou interfaciales diminuent avec la concentration de biosurfactant jusqu'à l'atteinte d'une valeur limite appelé « concentration micellaire critique CMC ». Pour des concentrations de biosurfactants supérieures à la CMC, la tension de surface reste inchangée [35] comme le montre la figure 1.7 :

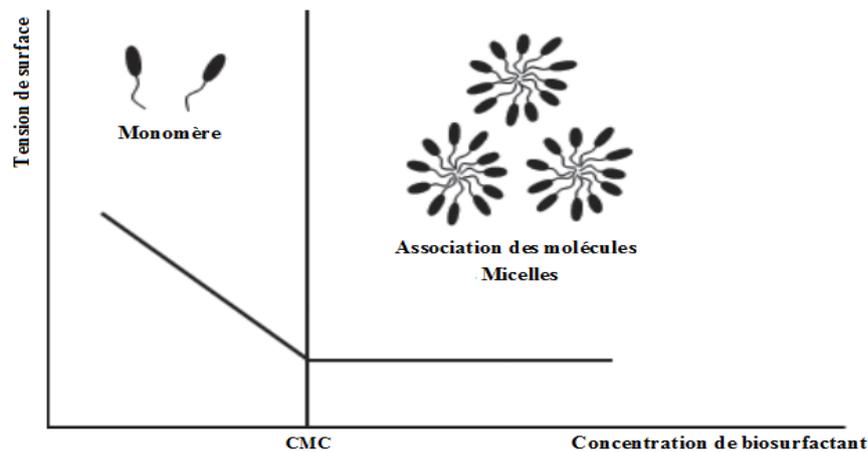


Figure 1.7 : Variation de la tension de surface en fonction de la concentration du biosurfactant

1.6.3. Biodégradabilité

Contrairement aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants sont des composés facilement biodégradables[36. 37] .

1.6.4. Faible toxicité

Ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux.

1.6.5. Pouvoir émulsifiant

Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants). Les biosurfactants à haut poids moléculaire sont en général mieux émulsifiants que ceux à faible poids moléculaire. A titre d'exemple, les Sophorolipides de *Torulopsisbombicola* ont montré leur capacité à réduire les tensions de surface et interfaciale, mais ils ne sont pas de bons émulsifiants [38].

1.6.6. Activité biologique

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les bactéries, champignons, algues et virus. Le biosurfactant (nature lipopeptidique) produit par la *Staphylococcus sp.* 1E a montré une activité bactéricide contre les bactéries *Staphylococcus aureus* (3,374 mg/ml), *Escherichia coli*, (6,75 mg/ml) *Pseudomonas aeruginosa* (6,75 mg/ml) et *Bacillus subtilis* (3,374 mg/ml), en revanche, aucune activité fongique n'a été observée contre la souche *Aspergillus niger* [39]. Les rhamnolipides inhibent la croissance des espèces nuisibles de bloom algale (*Heterosigmaakashivoet Protocentrumdentatum*) pour des concentrations variant de 0,4 à 10 mg/l [40].

1.7. Techniques de mesure de la production de biosurfactants

Plusieurs techniques ont été employées pour la détection et la mesure de la production de biosurfactants. Les techniques utilisées sont : tension de surface et interfaciales, test de déplacement de pétrole, test de l'effondrement de la goutte, indice d'émulsification, test d'hydrophobicité de surface des cellules et l'activité hémolytique [41, 35].

1.7.1. Tensions de surface et interfaciales

Des interactions s'établissent entre les molécules d'un liquide (eau) et celles d'un autre liquide (huile) ou d'une substance gazeuse (air); ces interactions donnent lieu à la formation d'une interface [18]. La tension de surface ou interfaciales mesurée exprime la quantité de travail par unité de surface (J/m^2 ou N/m), exercée à l'interface entre deux phases (eau/air ou eau/huile), qu'il doit fournir pour modifier l'état de cette interface [14].

Un microorganisme est considéré comme producteur de biosurfactant si la tension de surface de la culture est réduite au-dessous de 40 mN/m [42].

1.7.2. Test de l'effondrement de la goutte (Drop collapse)

Cette technique développée par Jain *et al* [43] repose sur la déstabilisation d'une goutte d'huile sous l'effet de l'ajout d'un surfactant. Youssef *et al* [41] recommandent son application au criblage des souches productrices de biosurfactants. Bodour et Miller-Maier, [44] ont établi une relation linéaire entre la concentration de surfactant pur et le diamètre de déformation de la goutte. Cependant, ce test est peu sensible aux faibles concentrations de biosurfactants.

1.7.3. Test de déplacement de pétrole

Cette technique qui fut décrite par Morikawa *et al* [45] mesure le diamètre du halo-claire entraîné par l'ajout d'une goutte de solution de surfactants au centre de surface de l'eau couverte par du pétrole [32]. Le diamètre du halo-claire est corrélé à l'activité de surface de la solution contenant le biosurfactant. C'est une méthode rapide et facile à manipuler. Youssef *et al* [41] ont déterminé une corrélation négative entre le diamètre du halo-claire des différentes cultures microbiennes et leurs tensions de surface. Des travaux ont montré que le test de déplacement de pétrole est relié à la production de biosurfactants par divers microorganismes [41, 46].

1.7.4. Indice d'émulsification (E24)

Cette technique repose sur l'ajout d'un substrat hydrophobe (Kérosène ou d'autre hydrocarbure) à la solution de biosurfactant ou de surnageant de la culture. La présence de biosurfactant est révélée par la formation d'une couche émulsifiée. Ce test est largement utilisé pour la détection de biosurfactants [35].

1.7.5. Hydrophobicité cellulaire

Les techniques basées sur l'hydrophobicité de la surface des cellules sont une évaluation indirecte de l'activité de surface. Le caractère hydrophobe des cellules est une caractéristique des microorganismes producteurs de biosurfactants [47]. L'inconvénient des méthodes basées sur l'hydrophobicité cellulaire est qu'elles dépendent de l'aspect physiologique tel que les conditions de culture et l'âge des cellules [35].

1.7.6. Activité hémolytique (Blood agar lysis)

Le test de l'activité hémolytique sur gélose au sang a été largement employé dans le criblage des souches productrices de biosurfactants [41, 46, 48] dans des milieux hydrophiles. Cependant, la méthode n'est pas spécifique, des enzymes lytiques peuvent conduire à des zones claires. Youssef *et al* [41], Plaza *et al* [46] et Afsharet *al* [48] ont constaté que cette méthode donne lieu quelque fois à des faux résultats positifs et négatifs.

1.8. Production des biosurfactants

Les microorganismes capables de produire des biosurfactants sont isolés à partir de biotopes différents qui ont un historique de contamination par les hydrocarbures. C'est le cas de sédiment marin, de boues d'huiles et de sol [49]. La synthèse des biosurfactants se fait en majeure partie à partir des sources de carbone insolubles tels que les huiles et les hydrocarbures [19, 18].

1.8.1. Facteurs affectant la production de biosurfactants

Le développement d'un efficient bioprocédé est l'autre stratégie à adopter pour avoir un rendement maximal de la production des biosurfactants. Le choix des sources de carbone et d'azote et leurs concentrations, l'influence des paramètres biotiques et abiotiques sont autant de facteurs à optimiser pour aboutir à cette fine.

1.8.1.1. Source de carbone

La nature du substrat carboné influence le type, la quantité et la qualité du biosurfactant [50, 51]. Des sources de carbones solubles tels que glycérol, glucose, mannitol, et éthanol ont été utilisé avec succès pour la synthèse du rhamnolipide par *Pseudomonas sp.* Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles[20].

En utilisant une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, Mata-Sandoval *et al.* [52] ont rapporté que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés. La composition du biosurfactant produit par l'espèce *Pseudomonas* semble être affectée par les différentes sources de carbones utilisées. Dans le cas des glycolipides, l'utilisation des substrats à différente longueur de chaîne n'a aucun effet sur le changement de la structure de la chaîne d'acide gras du biosurfactant [53, 54].

1.8.1.2. Source d'azote

L'azote peut être apporté sous différentes formes (les sels d'ammonium, nitrates, l'urée, ...). Par exemple, la production de tensioactif par *Arthrobacterparaffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates [55]. Par contre, Robert *et al.* [56] ont indiqué que la production de surfactant à partir de *Pseudomonas* 44T1 cultivée sur l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements en présence de nitrate de sodium. Hommelet *al.* [57] ont mentionné que la production des sophorolipides, issus de la levure *Candida apicola*, augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium, la proportion des deux isomères produits dépend de la concentration initiale en ammonium.

1.8.1.3. Rapport C/N

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal. Par exemple, Guerra-Santos *et al.* [58] ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé de production pour des rapports inférieurs à 11/1, où l'azote n'est pas limitant.

1.8.1.4. pH

Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipide par *Candida (Torulopsis) bombicola* [59]. Une production maximale de rhamnolipide est obtenue dans une gamme de pH de 6 à 6,5, un pH supérieur à 7 diminue la production [58]. En revanche, la production de penta et disaccharide lipidique par la souche *Nocardiacorynbacteroides* n'est pas affectée par un pH allant de 6,5 à 8 [60].

1.8.1.5. Température

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques (tensions de surface et interfaciales, et E24) des biosurfactants, produits par *Bacillus sp.* à des températures supérieures à 40 °C, restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [61].

1.8.1.6. Salinité

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants [61].

1.8.1.7. Oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures [20].

1.9. Utilisation des substrats renouvelables

L'inconvénient majeur des biosurfactants par rapport à leurs homologues chimiques est leur coût de production assez élevé ainsi que les faibles rendements obtenus [3]. Par conséquent, les stratégies visent à optimiser le processus de production et à minimiser les coûts trouvent un intérêt tout particulier

L'utilisation des substrats carbonés ou azotés à bas prix conduit à une diminution allant jusqu'à 50 % du coût total de la production [62]. Une variété des matières premières et des substrats recyclés tels que les huiles végétales, des déchets d'huiles, des substances à base d'amidon, du lactosérum et des déchets de distillation sont communément employés comme substrats pour la culture des microorganismes. Le tableau 1.2 rapporte une liste des différents substrats à bas prix et les microorganismes producteurs.

Tableau 1.2 : utilisation des matières premières économiques dans la production des biosurfactants par diverses souches microbiennes [3] adapté.

Matières premières à bas prix ou déchets	Biosurfactant	Souche microbienne productrice
Huile de Colza	Rhamnolipides	Espèces de <i>Pseudomonas</i> DSM 2874
Huile de Babassu	Sophorolipides	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055
Huile de maïs turc	Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214
Huile de tournesol et huile de soja	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS 10-129
Huile de tournesol	Lipopeptide	<i>Serratiamarcescenes</i>
Huile de soja	Lipide de mannosyl-erthritol	<i>Candidasp.</i> SY 16
Huile de friture (de tournesol et d'olive)	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044
Déchets de soja	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI
Déchets d'huile de tournesol	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI
Déchets des raffineries d'huile	Glycolipide	<i>Candida antarctica</i> , <i>Candida apicola</i>
Déchets des raffineries d'huile de soja	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10
Lactosérum et déchets de distillation	Rhamnolipide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2
Effluents des procédés de pomme de terre	Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i>
Eaux usées de farine manioc	Lipopeptide	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21332, <i>Bacillus subtilis</i> LB5a

1.10 Application des biosurfactants

D'après la littérature, les biosurfactants possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants chimiques tels que la biodégradabilité, la faible toxicité, une meilleure compatibilité avec l'environnement, une plus grande sélectivité, plus moussants et une stabilité thermique et chimique élevée, et ayant une forte capacité à être synthétisé à partir de matières premières renouvelables [63]. Donc, ces propriétés intéressantes permettent d'appliquer les biosurfactants dans de nombreux domaines :

- Biotechnologie industrielle : cosmétiques, peintures, pharmaceutique, médecine, pétrochimie, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, produits de l'agriculture et récupération assistée de pétrole.
- Biotechnologie environnementale : la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures et la dispersion des nappes de pétrole.

L'objectif principal entretenu dans ce mémoire est l'optimisation de la production de biosurfactant par des isolats bactériens isolés à partir d'un sédiment marin portuaire situé sur le littoral de la wilaya de Tipaza. Nous décrivons dans ce chapitre le matériel utilisé et la méthodologie suivie pour réaliser les différentes essais et analyses.

2.1. Isolement des souches bactériennes

2.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est représenté par des souches bactériennes isolées antérieurement (Zenati, *Travaux de thèse de doctorat non encore soutenus*) à partir d'un sédiment portuaire contaminé par des produits pétroliers.

Le lieu de prélèvement de sédiment est le port de la pêche de Khemisti, un site fortement contaminé par des produits pétroliers (carburants et huiles de vidange).

La figure 2.1 montre la localisation de la station de prélèvement.



Figure 2.1 : localisation de la station de prélèvement.

2.1.2. Isolement, purification et conservation des souches

La méthode d'isolement adoptée est la méthode classique d'enrichissement liquide basée sur la capacité des souches à croître sur un substrat hydrocarboné unique dans un milieu constitué d'eau de mer (EM) pure de salinité 35 ‰ (g de sels /Kg d'eau) pauvre en éléments nutritifs et en source de carbone. La seule source de carbone et d'énergie qui sera disponible aux bactéries pour leurs besoins synthétique et métabolique est le pétrole brut.

Les colonies obtenues de cette étape ont été repiquées sur différents milieux solides pour s'assurer de leur pureté puis conservées en tubes inclinés à une température de +4 °C.

C'est une collection de souches bactériennes ayant la capacité de dégrader le pétrole dans des conditions de salinité assez élevées.

2.1.3. Criblage des souches productrices de biosurfactants

Le criblage est basé sur la capacité des souches à sécréter les biosurfactants dans un milieu minéral de base en présence d'un excellent substrat carboné pouvant induire cette capacité.

La meilleure souche productrice de biosurfactant est celle que nous allons prendre pour l'optimisation de la production.

2.2. Examen morphologique de la souche performante SdK644

Les colonies obtenues après purification par dissémination doivent faire l'objet d'une étude macro et microscopique afin de contrôler leur état de pureté.

2.2.1. Etude macroscopique

Elle consiste à décrire les colonies isolées à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire lorsque les colonies sont de très petite taille.

Les caractères de la colonie à retenir sont : la taille, la forme, l'élévation, l'aspect de la surface, la consistance, la transparence et la coloration de pigments.

2.2.2. Etude microscopique

À l'aide d'une pipette pasteur, une goutte de culture est déposée sur une lame très propre. Le montage de la préparation nécessite une lamelle puis une observation qui se fait à "x40" puis à "x100" en déposant au préalable une goutte d'huile pour ce dernier grossissement.

- **Description**

La description microscopique des colonies est basée sur la forme (cocci, bâtonnet, coccobacille, etc.), le mode de regroupement (diplocoque ou diplobacille, streptocoques ou streptobacilles, etc.), mobilité des germes (mobiles ou immobiles).

Test de mobilisation

Dans un tube à essai contient le milieu MANNITOL (rouge) gélosé : Ensemencer la souche par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur, puis incuber à 30° pendant 24 h. Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose. Dans notre cas, la bactérie est immobile.

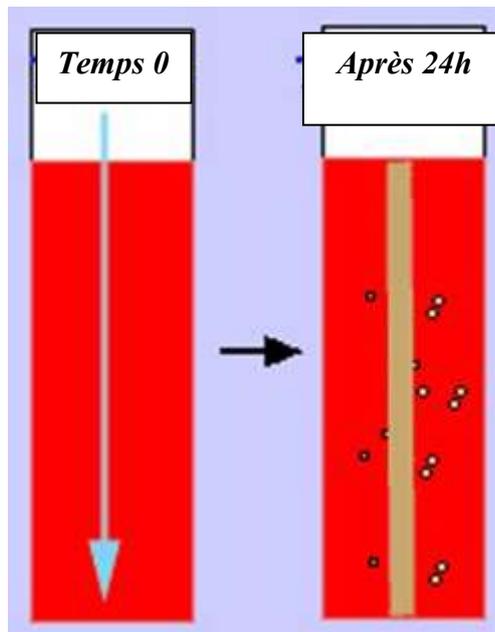


Figure 2.2 : test de mobilité

- **Coloration de gram**

C'est la coloration dite non vitale de la paroi des bactéries. Elle s'applique à des germes morts par fixation, afin de donner des préparations stables et durables. Les étapes de réalisation de la coloration de Gram sont résumées comme suit :

- Réalisation du frottis : à partir d'une culture jeune (ne dépassant pas les 24 heures) sur milieu LB solide et à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie, une très petite parcelle de la colonie est déposée dans une goutte d'eau sur une lame. La suspension bactérienne est ensuite bien étalée sur toute la surface de la lame.
- Fixation : Cette étape a pour but de tuer les germes, de fixer leurs structures cytoplasmiques sans altération, de les faire adhérer à la lame et d'augmenter leur perméabilité membranaire aux colorants. La fixation est faite le plus souvent par

la chaleur, en passant plusieurs fois la lame au-dessus de la flamme du bec Bunsen. L'eau doit être complètement évaporée.

○ **Coloration**

- 1- Recouvrir le frottis fixé avec le colorant primaire. Laisser agir deux (2) minutes.
Jeter le colorant.
- 2- Recouvrir la préparation de lugol. Laisser agir 20 seconds. Jeter le mordant.
Recommencer une deuxième fois (20 seconds).
- 3- Rincer la lame à l'eau.
- 4- Incliner la lame, laisser tomber goutte à goutte l'agent de décoloration jusqu'à ce qu'il s'écoule incolore à l'extrémité de la lame.
- 5- Laver abondamment à l'eau distillée.
- 6- Recolorer à l'aide du colorant de contraste. Laisser agir une minute.
- 7- Rincer à l'eau distillée.
- 8- Sécher la lame au-dessus de la flamme du bec Bunsen ou sur la plaque chauffante.
- 9- Observer au microscope.

2.3. Production de biosurfactant par la souche performante

2.3.1. Milieu de production

2.3.1.1. Préparation des cultures jeunes

La culture jeune de la souche a été préparée dans le milieu LB modifié. Sa composition (g/l d'eau distillée) est : 10 peptone, 5 extrait de levure et 23 NaCl. Le pH du milieu a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH de 1 N. Après stérilisation à 120 °C pendant 20 min, le milieu a étéensemencé par une petite quantité de colonies de la souche SdK644, conservées en tubes inclinés, puis incubés à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant une nuit.

2.3.1.2. Milieu minéral de base (MMB)

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, (MMB), sa composition (g/l d'eau distillée)est :23 NaCl ; 0,4 NH₄Cl ; 0,3 KH₂PO₄ ; 0,3 K₂HPO₄ ; 0,33 MgCl₂ ; 0,05 CaCl₂ ; 0,1 extrait de levure et 1 ml de solution d'oligo-éléments des éléments traces métalliques (composition en annexe). Le pH du milieu a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH de 1N. Le milieu MMB a été stérilisé à 120°C pendant 20 min.

2.3.1.3. Inoculation

Le volume d'inoculum microbien de la culture jeune à introduire dans le milieu MMB est calculé pour avoir une absorbance initiale d'environ 0,1 unité (DO à 600nm = 0,1).

2.3.1.4. Sources de carbone

Sauf en cas d'indication contraire, la source de carbone est ajoutée au milieu MMB à raison de 1% (m/v) après stérilisation à 120 °C pendant 20 min ou par filtration sur filtre à seringue stérile de 0,45 µm.

2.3.1.5. Incubation

La production de biosurfactant a été réalisée à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min pendant 3 jours.

2.3.2. Techniques employées pour suivre la production de biosurfactants

Le milieu de culture a été incubé à 30 °C pendant 3 jours sous une agitation de 150 tr/min. La détection de biosurfactants a été mesurée par le test de déplacement d'huile et la réduction de la tension de surface (TS). D'autre technique complémentaire (indice d'émulsification, E24) a été employée pour l'optimisation de la production.

Pratiquement, un volume de la culture microbienne a été centrifugé à 3900 tr/min. Le surnageant ainsi récupéré est filtré sur papier filtre ordinaire Wattman. Le volume de surnageant de culture utilisé dépend de la technique de mesure employée.

2.3.2.1. Tension de surface (TS)

Un volume d'environ 15 ml de surnageant de culture est nécessaire pour la mesure de la tension de surface. La mesure a été réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine à l'aide d'un tensiomètre (Tensiomètre K6, Krüss Gmb H, Hamburg, Allemagne) [64]. Trois lectures ont été effectuées pour chaque échantillon. L'unité de la tension de surface est le mN/m.

2.3.2.2. Test de déplacement d'huile (DH)

Dans une boîte de Pétri contenant 10 ml d'eau distillée, un volume de 100 µl de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau distillée. Ensuite, 10 µl du surnageant de culture

est légèrement placés au centre du film de pétrole. Le diamètre (en cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes [65]. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante (Figure 2.3).



Etape 1 : Couche huileuse de pétrole noir Etape 2 : Effet de l'ajout d'un biosurfactant sur le pétrole (formation du halo-clair)

2.3.2.3. Indice d'émulsification (E₂₄)

L'activité émulsifiante (indice d'émulsification) a été testée contre différents substrats hydrophobes à savoir : huile moteur, pétrole brut, huile d'olive, gasoil et kérosène. Après trois jours d'incubation, un volume de 4 ml de surnageant de culture a été mélangé avec 4 ml de substrat hydrophobe. Ensuite, le mélange est agité au vortex pendant 2 min, puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure [64].

L'activité émulsifiante ou l'indice d'émulsification (E₂₄) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion (H_e) formée et la hauteur totale (H_T) du mélange [66.67]. Il est exprimé en pourcentage comme l'indique la formule suivante :

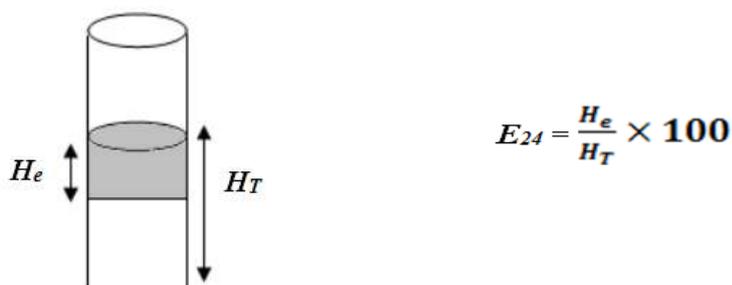


Figure 2.4 : Mesure de l'indice d'émulsification

2.3.3. Optimisation de la production du biosurfactant

Afin de déterminer les meilleures conditions pour une production maximale du biosurfactant, plusieurs facteurs ont été déterminés (source de carbone, source d'azote, rapport C/N, pH et salinités).

2.3.3.1. Influence de la source de carbone

Six sources de carbone ont été utilisées à savoir : huile d'olive, le glucose, la mélasse, l'huile de friture, huile moteur usagée et margine. L'huile d'olive et le glucose sont stérilisés par filtration sur filtre seringue (0,45 μm), tandis que les autres substrats sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min. Les substrats hydrophobes sont ajoutés au milieu MMB (NH_4Cl utilisé comme source d'azote) à raison de 1 % (m/v), alors que les composés solubles sont additionnés à une concentration de 20 g/l. Le milieu de production a été incubé à 30°C pendant 3 jours.

2.3.3.2. Influence de la source d'azote

Cinq sources d'azote (0,4 g/l) ont été évaluées avec la meilleure source de carbone : NH_4Cl (chlorure d'ammonium), KNO_3 (nitrate de potassium), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (urée), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfate d'ammonium) et NH_4NO_3 (nitrate d'ammonium). Ces composés ont été stérilisés par filtration sur filtre seringue (0,45 μm). Le milieu de production a été incubé à 30°C sous une agitation de 150 tr /min pendant 3 jours.

2.3.3.3. Influence du rapport C/N

Les meilleures sources de carbone et d'azote ont été expérimentées de façon à obtenir cinq rapports C/N (massique) de 5, 10, 25, 40 et 50. Pour cela, la concentration de l'azote a été fixée à 0,4 g/l alors que la concentration de la source carbone était variable.

2.3.3.4. Effet du pH

L'effet du pH sur la production de biosurfactant a été déterminé en faisant varier le pH du milieu MMB, en utilisant les meilleures sources de carbone, d'azote et le rapport C/N optimal. Le pH du milieu a été ajusté avec une solution de HCl 1N ou NaOH 1N pour se situer dans la gamme de pH suivante: 4, 5, 6, 7, 8 et 9.

2.3.3.5. Effet de la salinité

L'effet de la salinité a été également étudié. En effet, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au milieu MMB (avec les paramètres optimisés) à différentes concentrations : 0,5 ; 10 ; 23 ; 50 ; 100g/l NaCl.

2.3.3.6. Cinétique de production du biosurfactant

La cinétique de production de la souche SdK644 dans le milieu MMB (dans les conditions optimisées) pendant 7 jours pour déterminer le temps d'incubation optimal.

2.3.4. Eau de mer : milieu de production du biosurfactant

Une eau de mer saine a été testée pour la production du biosurfactant, et supplémenté de 2% (m/v) d'huile de friture (source de carbone). Le milieu a été stérilisé à 120 °C pendant 20 min. L'inoculation se fait de la même façon avec la souche performante SdK644.

La croissance microbienne a été suivie par l'absorbance à 600 nm. La production du biosurfactant a été évaluée en mesurant la tension de surface, le diamètre du halo clair du pétrole et l'indice d'émulsification.

3.1. Criblage des souches productrices de biosurfactants

Treize (13) souches bactériennes, isolées à partir d'un sédiment marin, ont été criblées selon leur pouvoir à produire de biosurfactants. Les souches ont été inoculées dans un milieu minéral de base dont la concentration en sel (NaCl) est proche à celle de l'eau de mer (23 g/l NaCl) [68]. La source de carbone choisie était l'huile d'olive qui est considérée parmi les meilleurs substrats d'induction de biosurfactants [69, 70, 71].

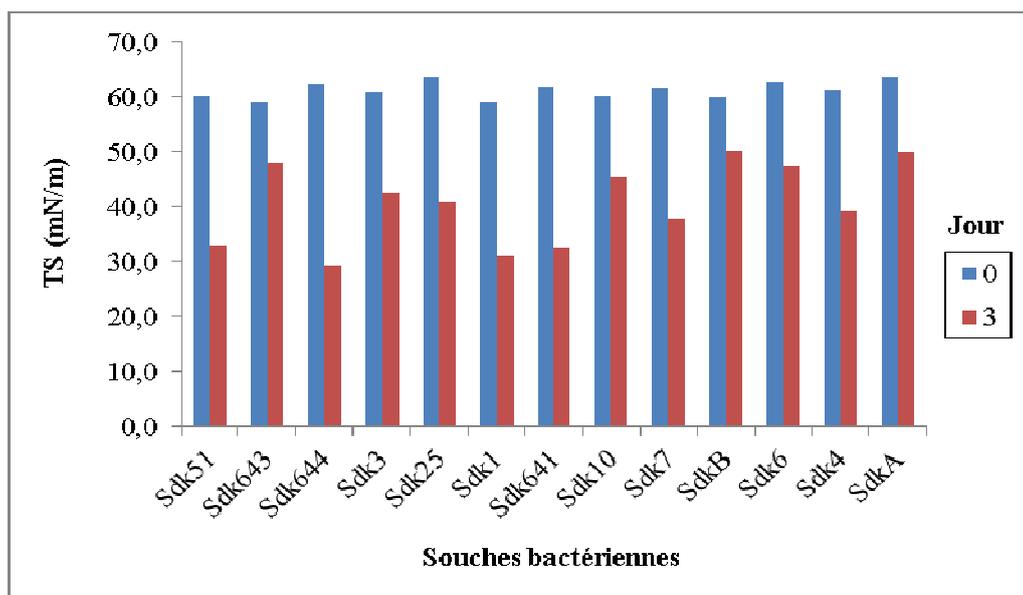


Figure 3.1 : Sélection de la souche performante productrice de biosurfactant basée sur la réduction minimale de la TS (1 % huile d'olive, 30 °C et 150 tr/min).

Les résultats obtenus montrent que six (06) souches ont réduit la tension de surface du milieu au-dessous de 40 mN/m. Les souches Sdk51, Sdk641, Sdk1 et Sdk644 présentent une activité à la surface très marquée, traduit par la diminution de la tension de surface jusqu'à des valeurs inférieures à 35 mN/m. La meilleure souche dans cette collection était la souche Sdk644 qui a réduit la tension de surface de 62,3 à 29,2 mN/m. Egalement, cette souche a montré une capacité intéressante de la dégradation de pétrole. La souche Sdk644 a été retenue pour la suite du travail.

3.2. Examen morphologique de la souche performante Sdk644

L'identification de la bactérie **Sdk644** permet son classement parmi les familles productrices de biosurfactants et facilite ainsi sa caractérisation.

3.2.1. Etude macroscopique

Les caractères macromorphologiques de la souche SdK644 sont regroupés dans le tableau 3.1 et sont visualisés sur la figure 3.2.

Tableau 3.1 : Macromorphologie de la souche performante SdK644

Caractère	Description
Taille (diamètre en cm)	0,5
Forme (allure du contour)	Circulaire régulier
Elévation	Plate
Aspect de la surface	Lisse
Consistance	Gluante (difficile à prendre les colonies avec l'anse)
Transparence	Translucide
Coloration de pigments	Marron claire à sécrétion abondante



Figure 3.2 : Prise photo des colonies de la souche SdK644 cultivée sur milieu LB modifié après 48 h d'incubation à 30 °C.

3.2.2. Etude microscopique

D'après l'observation microscopique, le test de mobilité et la coloration de Gram, il ressort que la bactérie sdk644 est immobile et à Gram négatif, avec une forme **coccobacille**. Les résultats obtenus sont schématisés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Description microscopique de la souche performante Sdk644.

Critères	Forme	Gram	Mobilité
Sdk644	Coccobacille (isolées)	Négatif –	Immobile

L'ensemble des critères cités ci-dessus ne permet pas l'identification du genre ou encore de l'espèce qu'appartenant la bactérie. D'autres tests sont alors nécessaires pour une identification complète comme les tests biochimiques et le séquençage de l'ADN correspondant à l'ARN ribosomal 16S.

3.3. Production de biosurfactant

3.3.1. Activité émulsifiante contre différents substrats

Afin d'évaluer la capacité émulsifiante du biosurfactant issu de la souche Sdk644, différents substrats hydrophobes ont été utilisés. En présence de 1% d'huile d'olive, le milieu MMB a été incubé à 30 °C pendant trois (03) jours d'incubation. Le surnageant a été testé contre cinq liquides hydrophobes comme le montre la figure 3.3.

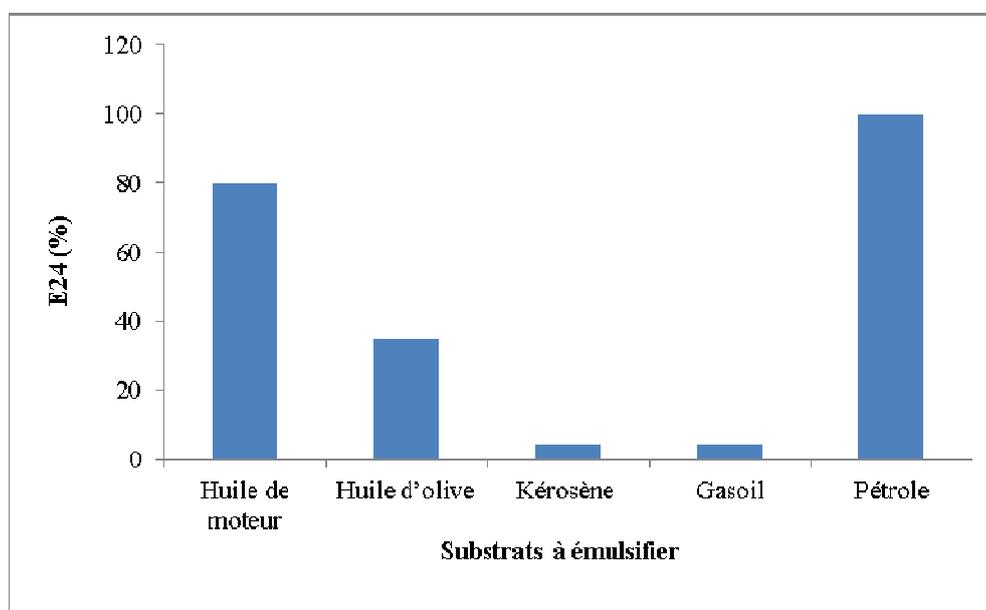


Figure 3.3 : Activité émulsifiante de biosurfactant contre différents substrats.

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant produit par la souche Sdk644 possède une activité émulsifiante très prononcée vis-à-vis le pétrole et l'huile moteur avec un indice

d'émulsification de 100 et de 80 % respectivement. Contrairement, une faible émulsification a été observée pour les autres : le gasoil et le kérosène (E24 de 4,35 % les deux) ou l'huile d'olive (E24 de 34,72 %).

Eddouaouda *et al* [29] ont obtenu des résultats similaires avec le pétrole brut et l'huile moteur (E24 de 98,9 % et de 78,57 % respectivement) et une émulsification modérée avec le gasoil, l'huile d'olive et l'huile végétale (42,85% ; 42,48 % et 51,14 % respectivement) en utilisant un biosurfactant produit par une souche *Staphylococcus* sp. 1E cultivée sur l'huile d'olive.

Ferhat *et al.* [72] ont obtenu un E24 de 95,23 % avec huile moteur et 52,2 % avec l'huile de tournesol en utilisant un biosurfactant synthétisé par une souche de *Brevibacterium lutescens* 7G cultivée sur l'hexadécane. La même souche n'a pas émulsionnée du tout le kérosène ni le gasoil.

Saimmaiet *al* [73] ont isolé une souche bactérienne marine *Inquiliinus limosus* KB3 à partir d'un sédiment marin qui est capable à émulsifier une large gamme de substrats, entre hydrocarbures aromatiques (benzène, xylène et toluène) aliphatiques (hexadécane et hexane), mélange d'hydrocarbures (huile moteur et huile moteur usagée, kérosène) et huiles végétales (huile d'olive et huile de soja). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'huile de soja, l'huile d'olive et le toluène (E24 de plus de 70 %) suivi par l'hexadécane, l'hexane, le kérosène, l'huile moteur et le benzène (E24 de plus de 60 %) puis le xylène et l'huile moteur usagé (E24 de plus de 50 %).

L'émulsification est l'une des propriétés tensioactives les plus intéressantes relative à l'application pratique des biosurfactants. Le pouvoir émulsifiant important du biosurfactant produit par la souche SdK644 vis-à-vis le pétrole et l'huile moteur suggère qu'il pourrait employer dans la récupération assistée par voie microbienne du pétrole (MEOR) [73, 74] et dans la dispersion des nappes de pétrole dans les milieux marins [73, 12].

Pour la suite de ce travail, l'indice d'émulsification a été évalué en utilisant l'huile moteur. La couche émulsifiée est bien claire par rapport à celle obtenue avec le pétrole.

3.3.2.Optimisation de la production du biosurfactant

Afin d'obtenir de meilleurs rendements, nous avons étudié les principaux facteurs affectant la production de biosurfactant : la source de carbone, la source d'azote, le rapport C/N, la salinité et le pH et la cinétique de production.

3.3.2.1.Influence de la source de carbone

Outre l'effet de la nature de la source de carbone sur la quantité et la qualité du biosurfactant produit. Le choix des substrats carbonés recyclés et à bas prix est un facteur clés pour réussir une production à grande échelle avec un coût de revient acceptable.

Dans cette optique, quatre substrats déchets ont été retenus : la margine, la mélasse, l'huile de friture et l'huile moteur usagée. Ainsi, deux autres substrats ont été utilisés : l'huile d'olive et le glucose. Ce sont les sources de carbone conventionnelles les plus utilisées induisant la production des biosurfactants[8, 13, 64, 75, 76, 77]. Dans notre cas, l'huile d'olive c'est un substrat de référence qui a baissé la tension de surface jusqu'à 29 mN/m.

La mélasse est un sous-produit de l'industrie du sucre généré lors des processus de fabrication du sucre de canne et de betterave. C'est une source très riche en carbone (75 % de la matière sèche), sa composition est : saccharose (48-56%), matière organique non sucrée (9-12 %), protéine (2,5%), potassium (1,5-5,0 %), calcium (0,4-0,8%), Magnésium (0,06 %), phosphore (0,06-2%)[78]. La mélasse constitue un bon substrat pour la production des biosurfactants. [78, 79, 80].

La margine résulte du processus d'extraction de l'huile d'olive. C'est un rejet liquide contenant des teneurs en carbone très élevées (DCO jusqu'à 220 g/l). La richesse en divers composés (sucres, composés azotés, acides organiques et huiles résiduelles), la margine est considérée comme la source la plus économique disponible qui pourrait être utilisée dans la production des biosurfactants[19].

L'huile de friture et les huiles résiduelles de cuisson sont parmi les déchets à bas prix les plus riches en nutriments [81]. Des quantités importantes des huiles végétales rejetées sont générées par les restaurants partout dans le monde. Les états unis seule produit 100 milliard litres de rejet d'huile/semaine [82]. Après son utilisation, l'huile de table (ou de cuisson) change en composition[83]. Comparées aux huiles végétales (huile de soja, de

mais, de tournesol, etc.), peu de travaux ont été publiés sur l'utilisation des huiles de friture dans la production des biosurfactants [7, 84, 85].

L'huile lubrifiant à moteur usagée est un mélange altéré d'hydrocarbures pétroliers (où la fraction légère est évaporée) beaucoup moins cher par rapport à d'autres hydrocarbures utilisés comme substrats pour la production des biosurfactants (pétrole brut, gasoil, Hexadécane). Thavasiet *al* [12, 34] ont pu utiliser l'huile moteur usagée pour la synthèse d'un glycolipid par *Bacillus megaterium* et d'un lipopeptide par *Pseudomonas aeruginosa* respectivement.

Les figures 3.1 et 3.2 montrent respectivement les cinétiques de croissance (absorbance à 600 nm) et l'évolution du diamètre du halo-claire de surnageant de culture (déplacement d'huile) en utilisant les six substrats mentionnés.

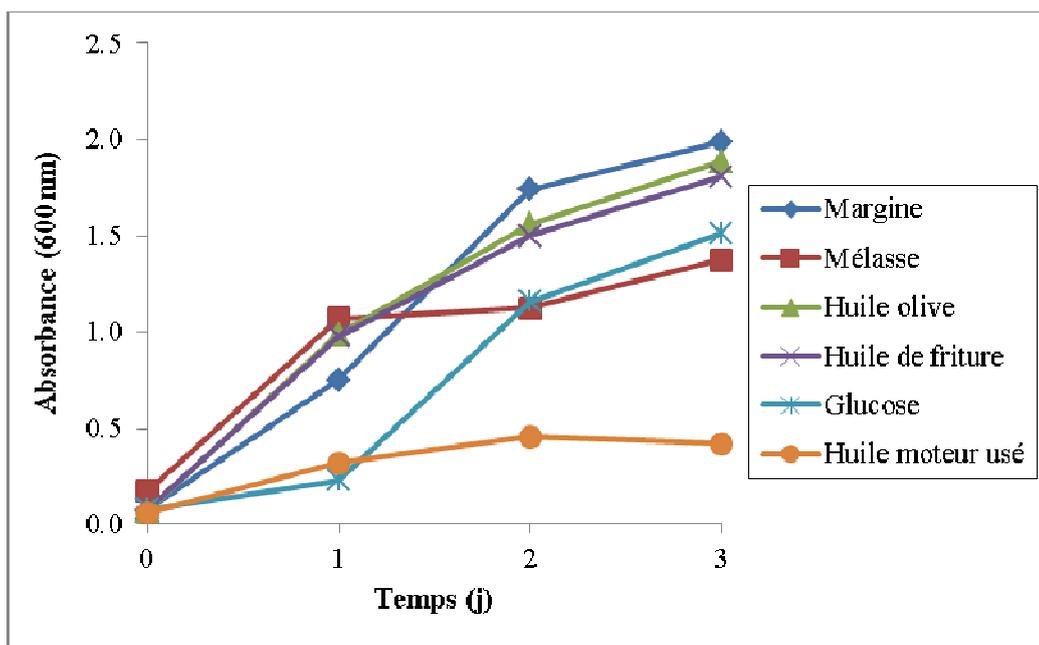


Figure 3.4 : Effet de la nature de la source de carbone sur la cinétique de croissance (1% substrat, pH = 7, $T_{\text{incub}} = 30^{\circ}\text{C}$, Agitation = 150 tr/min).

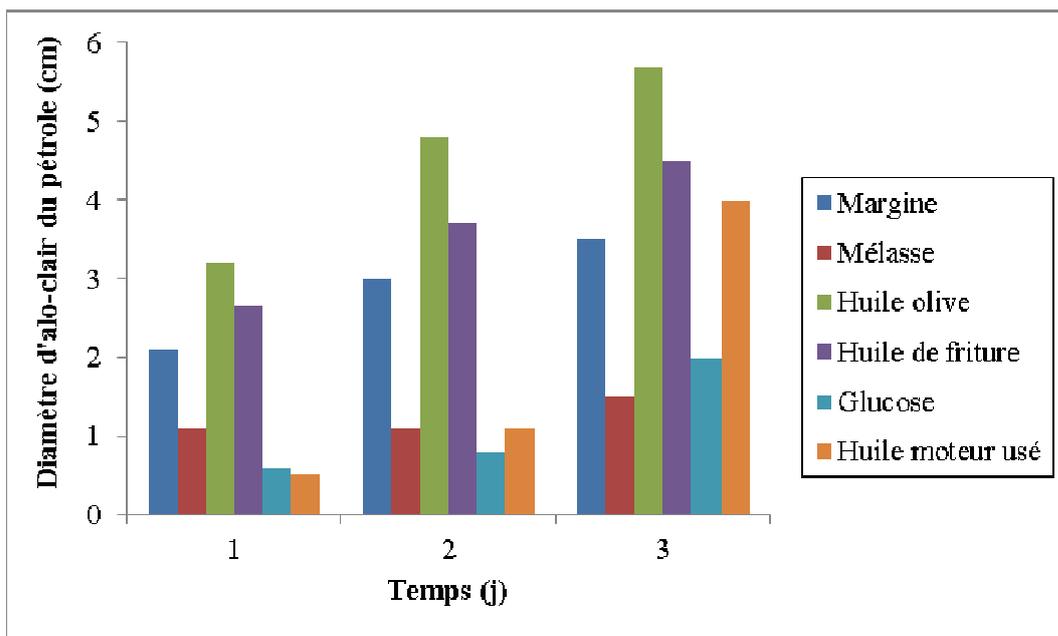


Figure 3.5 : Effet de la nature de la source de carbone sur l'activité de surface du biosurfactant (1% substrat, pH = 7, $T_{incub} = 30^{\circ}C$, Agitation = 150 tr/min).

D'après ces résultats, l'huile d'olive et l'huile de friture présentent les meilleures sources de carbone pour production de biosurfactants. Une activité de surface importante a été observée (diamètre d'halo-clair supérieur à 4cm). Après 3 jours d'incubation, les valeurs du diamètre d'halo-clair sont 4,5 et 5,7 cm pour l'huile de friture l'huile d'olive respectivement. Cela traduit par une bonne production de biosurfactants. La margine et l'huile moteur usagée ont aussi montré une activité relativement élevée. La mélasse et le glucose étant les plus faibles en terme d'activité de surface.

L'indice d'émulsification E24 a révélé la formation d'émulsions stables avec l'huile de friture, la margine, l'huile d'olive, la mélasse et l'huile à moteur usagée (E24 de 75, 64, 63, 51 et 50 % respectivement) et un E24 faible avec le glucose (E24 de 32 %).

Concernant la croissance microbienne, il paraît que la souche SdK644 se développe très bien sur toutes les sources de carbone à part l'huile à moteur usagée où une faible croissance a été constatée. Les résultats obtenus corroborent avec de nombreux travaux publiés [19]. Eddouaouda *et al* [86] ont trouvé que l'huile d'olive est la meilleure source de carbone suivie par l'huile végétale, l'hexadécane et le pétrole. De même, Abousaoud *et al* [64] ont obtenu une réduction de la tension de surface similaire en utilisant l'huile d'olive, le glucose et l'hexadécane alors que l'activité émulsifiante était la plus élevée avec l'huile

d'olive. Sadouket *al* [87] ont trouvé que l'huile de tournesol résiduelle de friture est un bon substrat carboné. Selon Ferhat [88], l'hexadécane a été trouvé comme étant la bonne source de carbone par rapport au pétrole, l'huile d'olive et le glucose respectivement. Les huiles végétales demeurent les meilleurs substrats d'induction des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* [22, 52, 89].

Nous concluons que les huiles végétales (raffinées ou déchets) représentent la bonne source de carbone, en raison leurs riches en acides oléique et linoléique [87]. Une autre raison probable est que les microorganismes ont une activité lipasique facilitant l'assimilation des acides gras contenants dans les huiles [89, 64].

La source de carbone sélectionnée dans la suite du travail est l'huile de friture. Un substrat déchet très riche favorisant la croissance microbienne avec une activité de surface importante.

3.3.2.2. Influence de la source d'azote

Des sources d'azote de différentes natures ont été essayées dans la production de biosurfactants. Il s'agit de : chlorure d'ammonium, sulfate d'ammonium, nitrate d'ammonium, nitrate de potassium et de l'urée comme une source d'azote organique. Les sources d'azote ont été ajoutées séparément dans le milieu MMB à une concentration de 0,4 g/l avec 1 % (m/v) de l'huile de friture. Leur influence sur la croissance microbienne et la production de biosurfactant est illustré dans les figures 3.6 et 3.7.

Nous remarquons d'après la figure 3.6 que toutes les sources d'azote ont un effet positif sur la croissance microbienne et la production de biosurfactant. Ces résultats concordent avec de nombreux travaux publiés. En effet, Lotfabadet *al* [76] a constaté que NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Urée, extrait de levure et peptone stimule la croissance microbienne. En utilisant plusieurs sources d'azote (NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3), Saikia *et al* [90] ont obtenu une bonne croissance avec NH_4NO_3 . Toutefois, la réduction maximale de la tension de surface a été obtenue avec KNO_3 et NaNO_3 . Khopadeet *al* [21] ont constaté la même chose avec NH_4Cl permettant le développement microbienne sans être la meilleure source en production de biosurfactants.

Abousaoudet *al* [64] ont signalé une croissance très faible avec NH_4Cl (1 g/l) comparée à NaNO_3 (Biomasse de 3,3 g/l) et NH_4NO_3 (Biomasse de 2,2 g/l). La meilleure source en production été NH_4NO_3 .

Il semblerait d'après ces résultats que la croissance microbienne est indépendante de la production de biosurfactants.

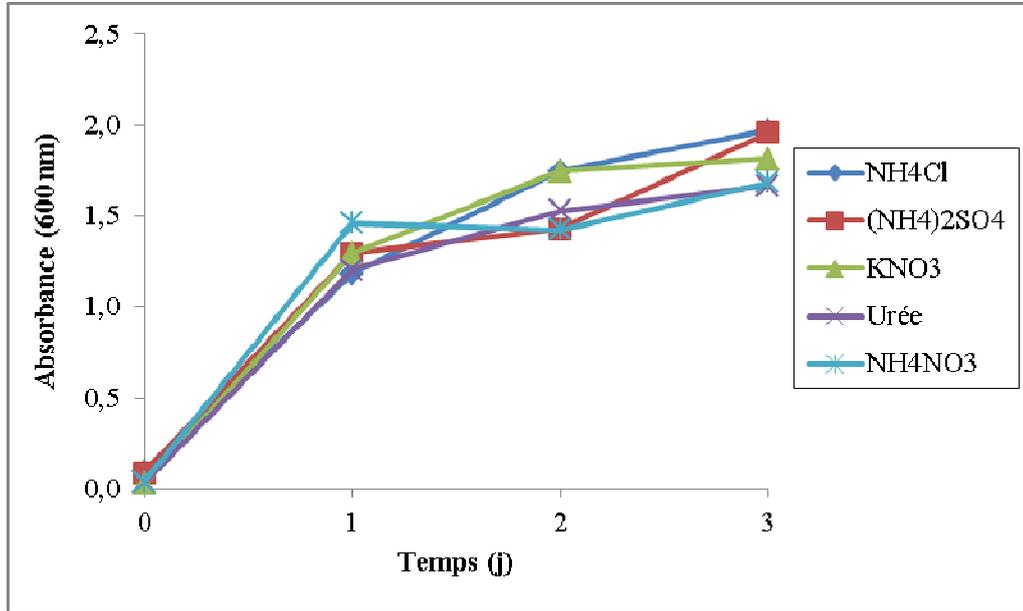


Figure 3.6 : Effet de la nature de la source d'azote sur la cinétique de croissance microbienne (1% (m/v) huile de friture, pH = 7, $T_{incub} = 30^{\circ}C$, Agit. = 150 tr/min).

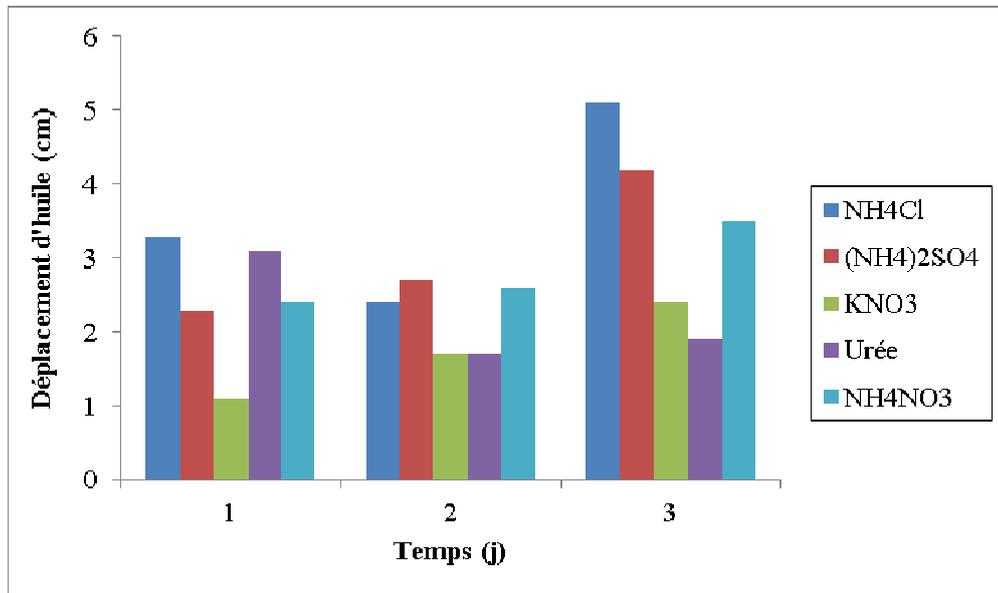


Figure 3.7 : Effet de la nature de la source d'azote sur l'activité de surface du biosurfactant. (1% (m/v) huile de friture, pH = 7, $T_{incub} = 30^{\circ}C$, Agit. = 150 tr/min)

Considérant l'activité de surface du biosurfactant produit (surnageant de culture) par rapport aux différentes sources d'azote, nous constatons que les bonnes sources sont les sels d'ammonium (NH_4Cl suivie par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). L'urée a donné une activité de surface la plus faible. Signalons que l'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices de biosurfactats. [49,73, 76]

Nous avons constaté une diminution significative de pH du milieu avec NH_4Cl comparé aux $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3 et urée (4,9 ; 5,3 ; 5,22 ; 6,33 ; 5,87 respectivement) sans affecter la production de biosurfactant. Cette diminution de pH est en accord avec d'autres travaux antérieurs [21, 64].

Le chlorure d'ammonium a été choisi comme source d'azote optimale de la production de biosurfactant dans la suite du travail.

3.3.2.3. Influence du rapport C/N

Un autre facteur qui a une influence significative sur la production des biosurfactants est le rapport quantitatif C/N. Il traduit le plus souvent la concentration optimale de la source de carbone par rapport à une concentration fixée de la source d'azote.

Le milieu MMB inoculé de la culture microbienne a été cultivé sur l'huile de friture à différentes concentrations de telle façon à avoir des rapports C/N de 5, 10, 25, 40 et 50 tout en gardant une concentration constante de la source d'azote de 0,4 g/l. Les résultats de la cinétique de croissance et du déplacement d'huile sont portés sur les figures 3.8 et 3.9 respectivement.

Il ressort de la figure 3.8 que la croissance microbienne n'a pas été affectée par les rapports C/N. Les valeurs de l'absorbance (à 600 nm) varient dans la gamme de 1,5 à 2,0. Les résultats de déplacement d'huile montrent que le rapport C/N de 50 a donné une meilleure activité de surface traduit par un diamètre de déplacement d'huile de 6,8 cm.

Lotfabadet *al* [76] ont remarqué que des rapports C/N allant de 10 à 30 donnent des taux de croissance maximale alors qu'ils chutent rapidement au-delà de 30. Cependant, Summai et al [73] ont constaté qu'un rapport C/N de 10 diminue la croissance microbienne de 80% par rapport à 50.

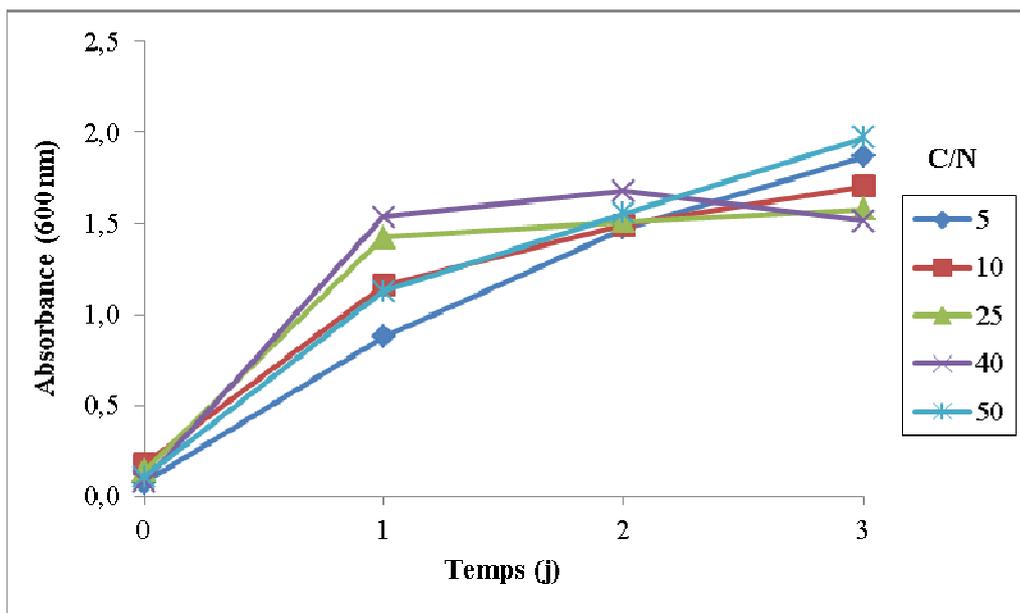


Figure 3.8 : Influence du rapport C/N sur la croissance microbienne(0.4g/l de NH_4Cl , pH = 7, $T_{\text{incub}} = 30^\circ\text{C}$, Agit. = 150 tr/min).

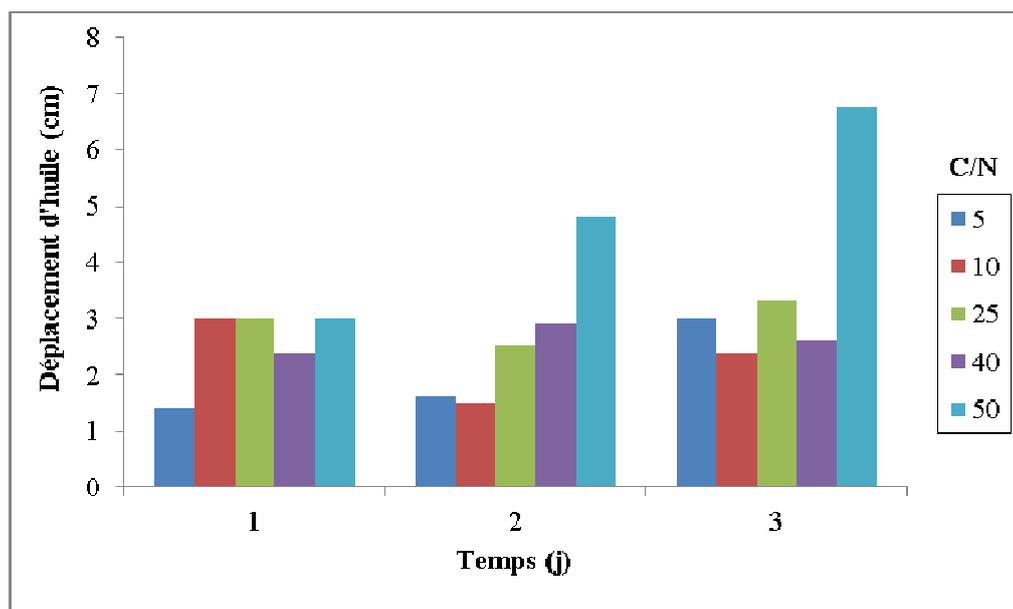


Figure 3.9 : Effet du rapport C/N sur l'activité de surface du biosurfactant. *Le diamètre du halo-clair de pétrole avec l'eau distillée est $0,6 \pm 0,2$ cm.*

Plusieurs travaux ont remarqué que l'augmentation de la concentration de l'azote dans le milieu de 4 g/l (C/N=8/1) à 7 g/l(C/N = 4,6/1) diminue significativement le taux de rhamnolipide synthétisé. Haba *et al* ^[7] a cultivé la souche *Pseudomonas* 47T2 avec 4 % (m/m) de l'huile de friture et à différents rapports C/N (g/g) : 5,7 ; 8 ; 10 et 13,3. Le

maximum de biosurfactant a été abouti avec un rapport C/N de 8. Des rapports supérieurs ont un effet négatif sur la production de biosurfactant.

Zhu *et al* [91] ont trouvé que l'augmentation de la concentration de l'huile de friture de 1 à 4 % dans un milieu minéral à 4 g/l NaNO₃ augmente la concentration de rhamnolipide synthétisé par la souche *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M.

Egalement, nous remarquons que le diamètre le plus grand a été achevé dans le troisième jour. Donc, après que la concentration de l'azote soit en conditions de stress qui est en accord avec les résultats publiés.

Dans ce qui suit, un rapport C/N de 50 a été choisi pour l'étude du reste des facteurs à optimiser.

3.3.2.4. Influence de la salinité

L'effet de la salinité du milieu sur la production de biosurfactant a été également étudié, en faisant varier la concentration du chlorure de sodium (0,5 ; 10 ; 23 ; 50 ; 100 et 150 g/l NaCl).

Les figures 3.10, 3.11 et 3.12 représentent respectivement la cinétique de croissance, l'évolution temporelle du diamètre d'halo-clair du pétrole et la réduction de la tension de surface du surnageant de culture, après trois jours d'incubation.

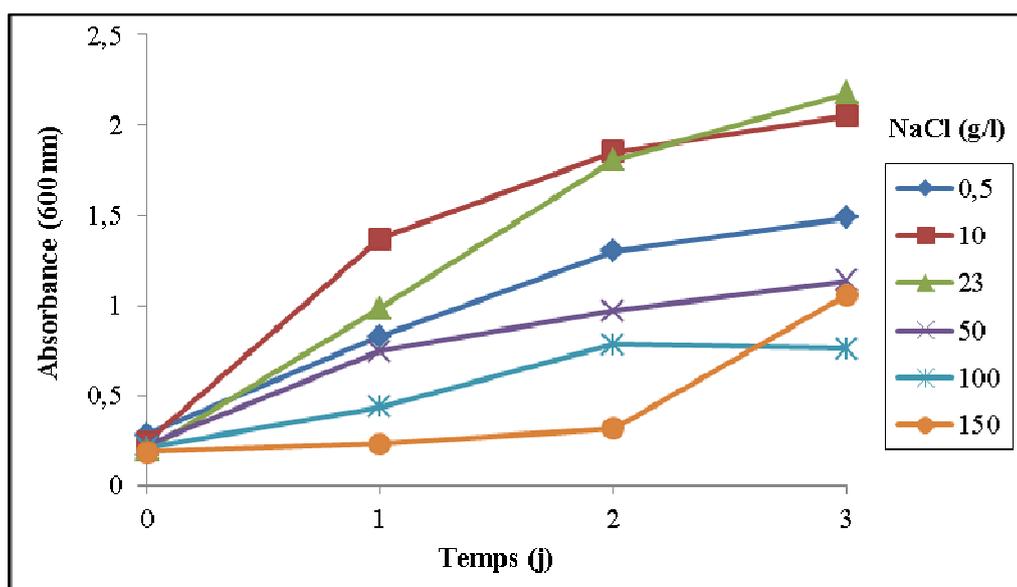


Figure 3.10 : Effet de la salinité sur la cinétique de croissance de la souche SdK644(2% m/v de huile friture, 0.4 g/l NH₄Cl, C/N = 50, T_{incub} = 30°C, Agit. = 150 tr/min).

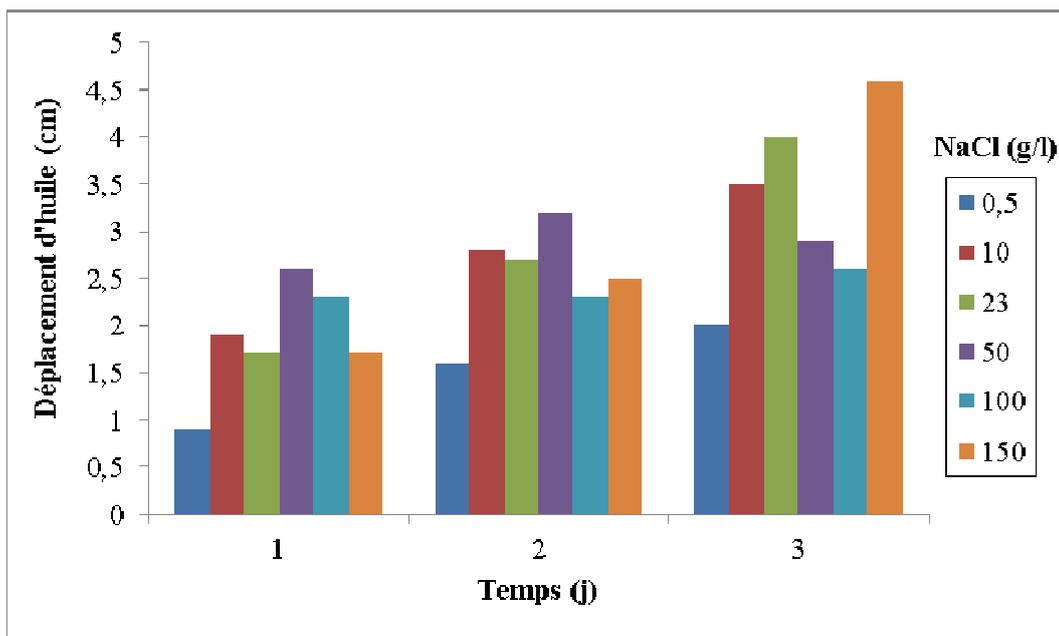


Figure 3.11 : Effet de la salinité sur l'activité de surface de biosurfactant. (2% m/v de huile friture, 0.4 g/l NH_4Cl , C/N = 50, $T_{\text{incub}} = 30^\circ\text{C}$, Agit. = 150 tr/min)

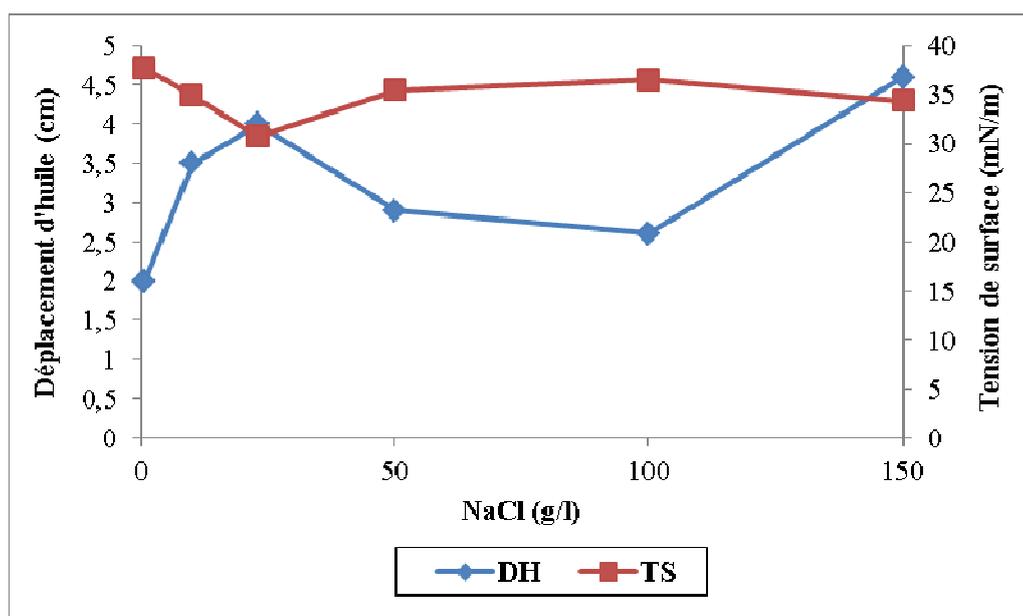


Figure 3.12 : Effet de la salinité sur la tension de surface TS et le déplacement d'huile DH (2% m/v de huile friture, 0.4 g/l NH_4Cl , C/N = 50, $T_{\text{incub}} = 30^\circ\text{C}$, Agit. = 150 tr/min, $t_{\text{incub}} = 3$ jours)

La figure 3.10 montre que la croissance microbienne est très prononcée pour les salinités 10 et 23 g/l. La souche bactérienne SdK644 tolère des salinités très faibles (0,5 g/l NaCl) alors que les fortes salinités ralentissent le développement cellulaire. Ces résultats indiquent que la souche est halotolérante avec une salinité optimale de 23 g/l NaCl. Les résultats obtenus révèlent une importante activité de surface (TS inférieure à 40 mN/m)

dans la gamme de salinité étudiée. L'optimum de salinité est de 23 g/l NaCl (TS = 30,77 mN/m).

Selon Pepi et al.[92], la souche *Halomonassp.* ANT3b était capable de produire un glycolipide dans un milieu de base contenant 24 g/l de NaCl et 2% (v/v) d'hexadécane comme source de carbone. En utilisant une souche *Bacillus megaterium*, isolée à partir d'une eau de mer, Thavasiet al [34] ont abouti à une production maximale de biosurfactant à 30 g/l NaCl.

3.3.2.5. Influence du pH initial du milieu

Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de biosurfactant. Par conséquent, l'influence de l'acidité ou de l'alcalinité du milieu sur la production de biosurfactant a été envisagée en faisant varier le pH du milieu pour se situer dans la gamme de 4 à 9.

Les figures 3.13, 3.14 et 3.15 montrent respectivement la cinétique de croissance, l'évolution temporelle du diamètre d'halo-clair du pétrole ainsi que la réduction de la tension de surface du surnageant de culture après trois jours d'incubation.

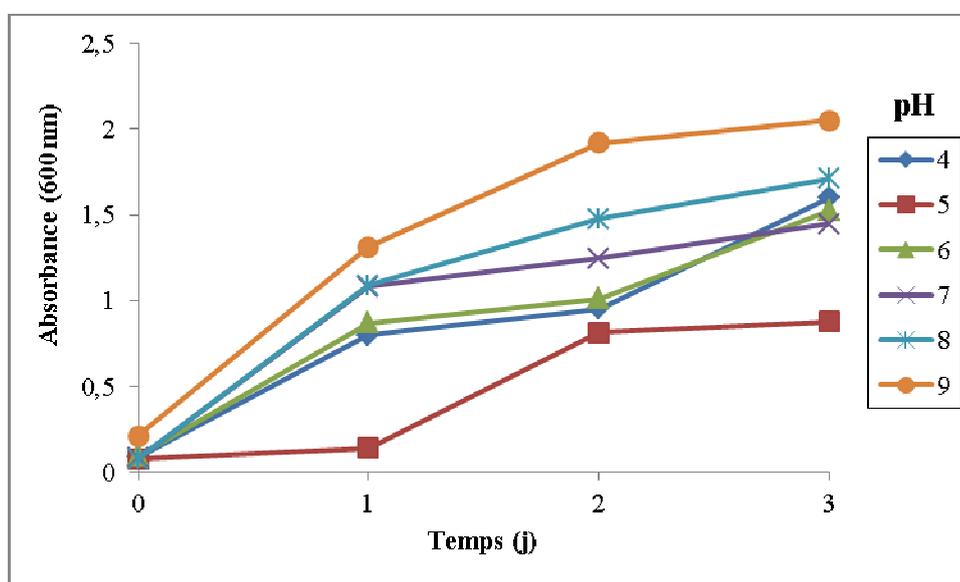


Figure 3.13 : Effet du pH sur la cinétique de croissance de la souche SdK644(2% m/v de huile friture, 0.4g/l NH₄Cl, C/N = 50, T_{incub} = 30°C, Agit. = 150 tr/min).

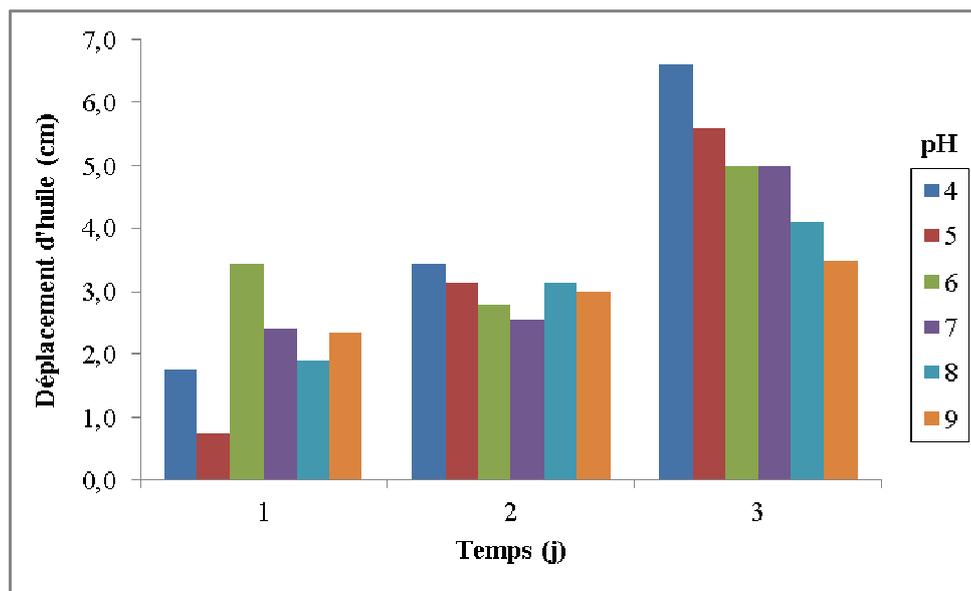


Figure 3.14 : Effet du pH initial du milieu sur l'activité de surface de biosurfactant(2% m/v de huile friture, 0.4g/l NH₄Cl, C/N = 50, T_{incub} = 30°C, Agit. = 150 tr/min)

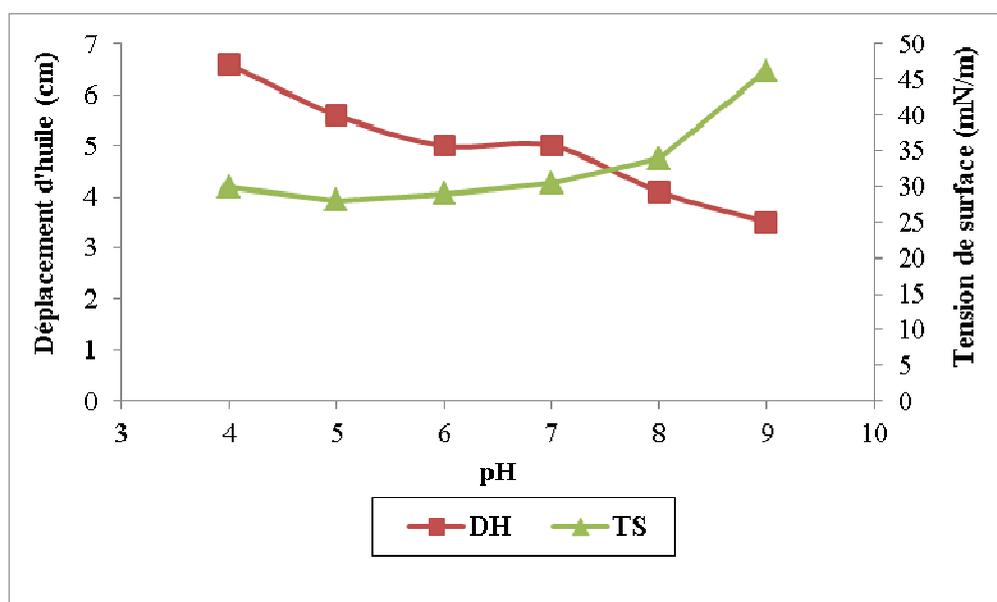


Figure 3.15 : Effet du pH initial du milieu sur la tension de surface TS et le déplacement d'huile DH (2% m/v de huile friture, 0.4g/l NH₄Cl, C/N = 50, T_{incub} = 30°C, t_{incub} = 3 jours, Agit. = 150 tr/min)

Les résultats présentés dans les trois figures montrent que : la croissance de la souche SdK644 est optimale dans un milieu alcalin. Par exemple, pour des pH 8 et 9, les valeurs de l'absorbance (à 600 nm) respectivement. A pH acide, la diminution de la biomasse est remarquable. Par contre, la production de biosurfactant est meilleure à des pH acide

et neutre (4, 5, 6 et 7). Le développement cellulaire de la bactérie dans des conditions alcalines pourrait être expliqué par son origine d'isolement, sachant qu'elle a été isolée à partir d'un sédiment marin dont le pH est proche de 9.

Guerra-Santos *et al.* [58] ont obtenu une production maximale de rhamnolipides dans une gamme de pH variant de 6 à 6.5, un pH supérieur à 7 a diminué la production. L'Actinomycète marine *Nocardia* sp. B4 réduit efficacement la tension de surface à pH de 7. Des valeurs supérieures ou inférieures augmentent la tension de surface [21].

Cependant, Powalla *et al.* [60] ont constaté que la production de penta et disaccharide lipidique par *Nocardia corynebacteroides* n'est pas affectée par un pH allant de 6,5 à 8. Lotfabadi *et al.* [76] ont obtenu une production maximale de biosurfactant pour des pH de 8 et 9 (TS de 29 et 27 mN/m respectivement). Yin *et al.* [93] ont remarqué que la tension de surface demeure stable dans toute la gamme de pH allant de 6 à 10 en utilisant la souche *Pseudomonas aeruginosa* S6.

L'optimum de pH choisi dans la production de biosurfactant par la souche SdK644 est celui de 5.

3.3.2.6. Cinétique de production de biosurfactant

Afin de déterminer la relation entre la croissance microbienne et la production de biosurfactant et d'optimiser le temps de production, des mesures de l'absorbance du trouble microbien à longueur d'onde de 600 nm, de la tension de surface et de l'activité émulsifiante ont été portées sur la figure 3.16. Les conditions opératoires optimales sont : 100 ml de milieu MMB, 2% m/v de huile friture, 0.4 g/l NH₄Cl, C/N = 50, pH = 5, T_{incub} = 30°C, t_{incub} = 3 jours, Agitation = 150 tr/min.

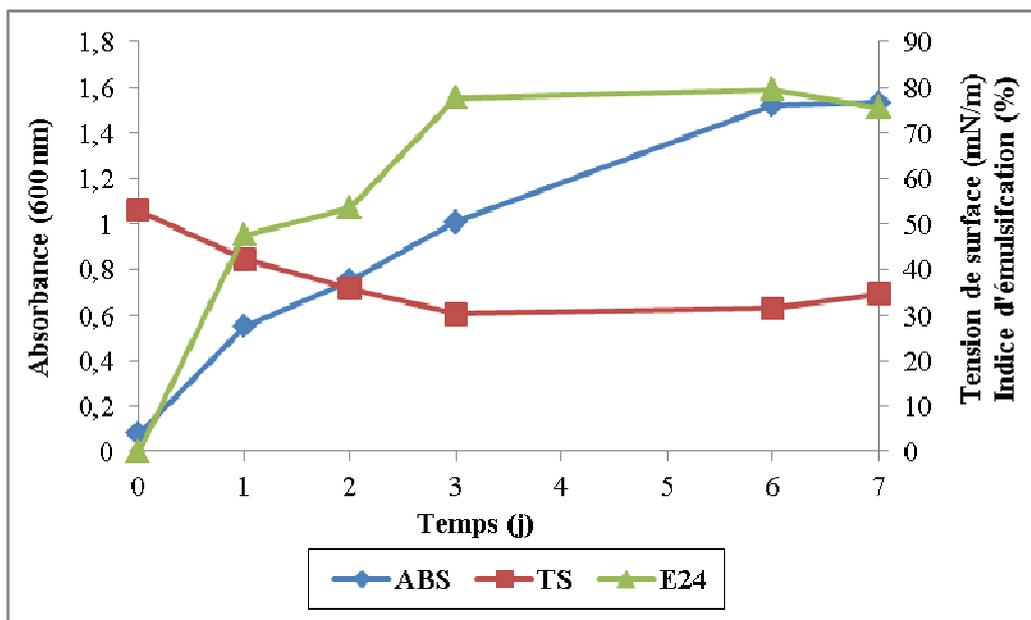


Figure 3.16 : Cinétiques de croissance et de production de biosurfactant par la souche SdK644.

La tension de surface du surnageant décroît rapidement avec le temps pour atteindre une valeur minimale de 30,29 mN/m au bout du 3^{ème} jour. Puis augment légèrement jusqu'au dernier jour. D'autre part, la production de biosurfactant était maximale durant la phase de croissance exponentielle et se stagne avec le début la phase stationnaire. Ce comportement indique que la production de biosurfactant dépend de la phase de croissance microbienne [94].

L'augmentation de la tension de surface après le 3^{ème} jour montre que la biosynthèse du biosurfactant a été arrêtée. Ceci est probablement dû à la formation des métabolites secondaires et à l'adsorption des molécules du biosurfactant à l'interface eau-huile [95].

Ces résultats indiquent que la biosynthèse du biosurfactant à partir de l'huile de friture se produit essentiellement durant la phase exponentielle de croissance, suggérant que le biosurfactant est produit comme un métabolite primaire associé à la cinétique de croissance[64].

Quant à l'activité émulsifiante du surnageant de culture, nous remarquons qu'elle augmente rapidement durant les trois premiers jours, se stabilise dans une période de deux jours (un maximum de 79,54 %) et enfin diminue progressivement dans le dernier jour. Rappelant qu'une bonne activité émulsifiante conduisant à la formation d'une émulsion stable s'exprime par un indice d'émulsification E24 supérieur ou égal à 50 %.

La capacité de la souche SdK644 à croître et à produire de biosurfactant dans conditions environnementales assez particulières (salinité et pH) lui rend convenable dans la récupération assistée de pétrole par voie microbienne ou le nettoyage des réservoirs pétroliers [46].

3.3.3. Production de biosurfactant dans un milieu d'eau de mer

Dans le but de tester la capacité de la souche performante SdK644 à synthétiser de biosurfactants, à partir d'un milieu de production naturel constitué par une eau de mer (EM) saine sans ajout de nutriments (azote, phosphore, fer, etc.), une culture jeune de la souche est servie à l'inoculation du milieu EM (2% v/v) additionné de 2% m/v de l'huile de friture (2% m/v) utilisée comme unique source carbone et d'énergie. La production de biosurfactant est suivie quotidiennement durant une période de trois jours.

La figure 3.17 montre les résultats de la cinétique de croissance, la tension de surface et l'indice d'émulsification.

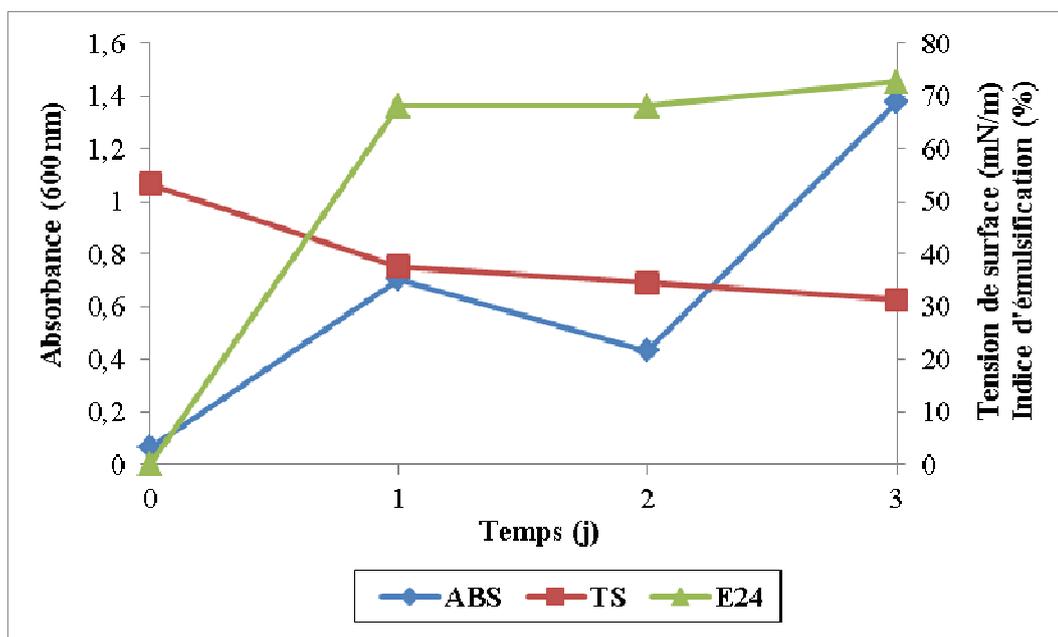


Figure 3.17 : Cinétiques de croissance et de production de biosurfactant par la souche SdK644 dans un milieu EM.

La figure montre que la souche bactérienne supporte la croissance dans l'eau de mer (bien que le taux de croissance soit inférieur à celui dans le milieu MMB) avec une bonne production de biosurfactant (TS max de 31,32 mN/m et E24 max de 72,72 %).

Ces résultats ne sont pas surprenants vu que la souche bactérienne provient d'un enrichissement à partir d'un milieu EM en utilisant le pétrole brut comme unique source de carbone (Chapitre 2, paragraphe 2.1.2).

Les propriétés tensio-actives importantes (activité de surface et formation d'émulsion stable), dans un environnement extrême en l'occurrence de l'eau de mer, permettent de qualifier la souche SdK644 comme étant une bonne candidate dans la bioremédiation de la pollution marine (p.ex. déversement accidentel de pétrole en mer).

Conclusion générale

Par la présente étude, nous avons essayé de minimiser le coût de production de biosurfactant à travers deux stratégies : l'utilisation des substrats carbonés renouvelés et l'optimisation de l'efficacité de bioprocédé de fermentation. Pour cela, des souches bactériennes marines isolées à partir d'un sédiment portuaire contaminé par des produits pétroliers ont été criblés pour leur capacité à produire des biosurfactants. Parmi les treize souches cultivées sur l'huile d'olive comme substrat d'induction, une libellée « SdK644 » a réduit de façon significative la tension de surface du surnageant de culture (29 mN/m) avec une activité émulsifiante importante vis-à-vis le pétrole et l'huile moteur (un indice d'émulsification E24 de 99 % et de 79 % respectivement).

L'examen morphologique de la souche SdK644 a permis de la décrire comme étant une coccobacille, immobile à Gram négatif.

Parmi les six sources de carbone testées, l'huile d'olive et l'huile de friture présentent une bonne production de biosurfactant avec un diamètre d'halo-claire de pétrole de 5,7 cm et 4,5 cm et un E24 de 62,5 % et 75 % respectivement.

La culture de la souche SdK644 sur 1 % (m/v) de l'huile de friture avec les différentes sources d'azote a révélé une activité de surface importante avec les sels d'ammonium (NH_4Cl suivie par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Toutefois, l'utilisation du chlorure d'ammonium a provoqué une chute significative de pH du milieu allant jusqu'à 4,9 sans que cela affecte le développement cellulaire. Également, un rapport de C/N égale 50 (huile de friture/chlorure d'ammonium) a donné une meilleure activité de surface.

L'influence de la salinité et du pH du milieu a montré que l'activité de surface la plus élevée a été achevée avec une salinité de 23 g NaCl/l et un pH de 5 (TS de 30,77 mN/m et 28,9 respectivement).

Le suivi de la cinétique de production de biosurfactant et de la croissance en fonction du temps a révélé une activité de surface maximale durant le troisième jour d'incubation et suggère que le biosurfactant est produit autant que métabolite primaire associé à la cinétique de croissance.

Enfin, la souche bactérienne SdK644 a montré une bonne activité de surface (TS de 31 mN/m) durant sa culture sur un milieu constitué d'eau de mer dépourvue de nutriments supplémenté de 2 % de l'huile de friture.

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

- L'identification microbienne complète de la souche SdK644 par les outils de la biologie moléculaire ;
- L'extraction, purification et caractérisation du biosurfactant produit par la souche SdK644;
- L'application du biosurfactant purifié dans la bioremédiation.

Références bibliographiques

1. Banat, I.M., R.S. Makkar, and S.S Cameotra. "Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants." *Applied and Microbiological Biotechnology* 53, (2000): 495-508.
2. Vipulanandan , C., and X. Ren. "Enhanced Solubility and Biodegradation of Naphthalene with Biosurfactant." *Journal of Environmental Engineering* 126, no. 7 (2000): 629-634.
3. Mukherjee K.A., and Das K. *Microbial Surfactants and Their Potential Applications*. Vol. 625 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media (New York): Ramkrishna S., 2010.
4. Thavasi R., S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian, and Ibrahim M. Banat. "Biosurfactant Production by Coryne Bacterium Kutscheri from Waste Motor Lubricant Oil and Peanut Oil Cake." *Letters in Applied Microbiology* 45, (2007): 686–691.
5. Pekin G, Vardar-Sukan F, and N K. "Production of Sophorolipids from *Candida Bombicola* Atcc 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey." *Engineering in Life Sciences* 5, (2005): 357–362.
6. Rahman KS, Rahman TJ, McClean S, Marchant R, and Banat IM. "Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials." *Biotechnology Progress* 18, (2002): 1277–1281.
7. Haba E., M.J. Espuny, M. Busquets, and A. Manresa. "Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47t2 Ncib 40044 from Waste Frying Oils." *Journal of Applied Microbiology* 88, (2000): 379–387.
8. Bednarski W, Adamczak M, J Tomasi, and Plaszczik M. "Application of Oil Refinery Waste in Biosynthesis of Glycolipids by Yeast." *Bioresource Technology* 95, (2004): 15–18.
9. Dubey, K. , and A. Juwarkar. "Distillery and Curd Whey Wastes as Viable Alternative Sources for Biosurfactant Production." *World Journal of Microbiological Biotechnology* 17, (2001): 61–69.
10. Dubey, K. and Juwarkar, A. "Determination of Genetic Basis for Biosurfactant Production in Distillery and Curd Whey Wastes Utilizing *Pseudomonas aeruginosa* Strain Bs2." *Indian Journal of Biotechnology* 3, (2004): 74–81.
11. Al-Wahaibia Y, S Joshi, S Al-Bahry, A Elshafieb, A Al-Bemani, and B. Shibulal. "Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* B30 and Its Application in Enhancing Oil Recovery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114 (2014): 324–333.
12. Thavasi R., V. R. M. S. Nambaru, S. Jayalakshmi, T. Balasubramanian, and I. M. Banat. "Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources." *Indian Journal of Microbiological Methods* 51, no. 1 (Jan–Mar 2011): 30–36.

13. Gandhi mathi R., G. SeghalKiran, T. A. Hema, J. Selvin, R. Raviji, and S. Shanmughapriya. "Production and Characterization of Lipopeptide Biosurfactant by a Sponge-Associated Marine Actinomycetes *Nocardiopsisalba* Msa10." *BioprocessBiosysteme Engineering* 32, (2009): 825–835.
14. Mehta S.K., Sharma S., Mehta N., and CameotraS. S. *Biomimetic Amphiphiles: Properties and Potential Use*. Vol. 625 Biosurfactants, Edited by Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. New York: Ramkrishna S, 2010.
15. West C.C., and Harwell J. H. "Surfactants and Subsurface Remediation." *Environmental and Science Technology* 36 no. 12 (1992): 2324-2330.
16. RONDEL Caroline. " Synthèses et propriétés des mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles tensioactives." Thèse de doctorat, Université de Toulouse, 2009.
17. Ilori, M.O., C.J. Amobi, and A.C. Odocha. "Factors Affecting Biosurfactant Production by Oil Degrading Aeromonas Sp., Isolated from a Tropical Environment." *Chemosphere*61, (2005): 985-992.
18. Mnif S., « Microbiologie de certains gisements pétroliers tunisiens: Biodégradation des hydrocarbures, production de biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne moyennant la technique de la SSCP ». Thèse de doctorat en sciences biologiques, Faculté des sciences de Sfax, université de Sfax, Tunisie. (2012).
19. Saharan B. S., Sahu R. K., and Sharma D. "A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives." *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, (2012): 14.
20. Desai JD, and Banat IM. "Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential." *Microbiology and MolecularReviews*61, no. 1 (1997): 47-64.
21. Khopade A., Biao R., Liu X., Mahadik K., Zhang L., and Kokare C. "Production and Stability Studies of the Biosurfactant Isolated from Marine *Nocardiopsis* Sp. B4." *Desalination* 285, (2012): 198-204.
22. Henkel M., Müllera M. M., Küglera J. H., Lovagliob R. B., Contierob J., Syldatka Ch., and Hausmann R. "Review: Rhamnolipids as Biosurfactants from Renewable Resources: Concepts for Next-Generation Rhamnolipid Production." *Process Biochemistry* 47, (2012): 1207-1219.
23. Jacques P. *Surfactin and Other Lipopeptides from Bacillus Spp* Biosurfactants, Microbiology Monographs 20, Edited by Soberón-Chávez G. Berlin: Springer-Verlag, 2011.
24. Healy M.G., Devine C.M., and Murphy R. "Microbial Production of Biosurfactants." *Resources, conservation and recycling*. 18, (1996): 41-57.

25. Hathout Y, Ho YP, Ryzhov V, Demirev P, Fenselau C., and Kurstakins:. "A New Class of Lipopeptides Isolated from *Bacillus Thuringiensis*." *Journal of National Production* 63, (2000): 1492-1496.
26. Laith A-A, Raja N. Z., Mahiran B., and Abu Baker S. "Minireview: Microbial Surfactant." *Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 15 no. 3 (2007): 99-105.
27. Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L, Smyth T, and Marchant R. "Microbial Biosurfactants Production, Applications and Future Potential." *Applied and Microbiological Biotechnology* 87, (2010): 427–444.
28. Franzetti A., Gandolfi I., Raimondi C., Bestetti G., Banat I. M., Smyth T. J., Papacchini M., Cavallo M., and Fracchia L. "Environmental Fate, Toxicity, Characteristics and Potential Applications of Novel Bioemulsifiers Produced by *Variovorax Paradoxus* 7bct5." *Bioresource Technology* 108, (2012): 245-251.
29. Eddouaouda K. « Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de Hassi Massoude contaminate par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio surfactant ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida. université Saad Dahlab-Blida, 2012.
30. Soberón-Chávez G., and Maier R.M. *Biosurfactants: A General Overview* Biosurfactants, Microbiology Monographs 20, Edited by Soberón-Chávez G. Berlin: Springer-Verlag 2011.
31. Marchant R., and Banat I. M. "Biosurfactants: A sustainable Replacement for Chemical Surfactants?" *Biotechnology Letters* 34, (2012): 1597-1605.
32. Satpute S. K., Banat I. M., Dhakephalkar P. K., Banpurkar A. G., and Chopade B. A. "Biosurfactants, Bioemulsifiers and Exopolysaccharides from Marine Microorganisms." *Biotechnology Advances* 28, (2010): 436-450.
33. Maneerat, S." Biosurfactants from marine microorganisms." *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 27, no 6, (2005): 1263-1272.
34. Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, and Banat I M. "Production and Characterization of a Glycolipid Biosurfactant from *Bacillus Megaterium* Using Economically Cheaper Sources." *World Journal of Microbiological Biotechnology* 24, no. 7 (2008): 917–925.
35. Walter V., Sylđatk C., and Hausmann R. *Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms*. Vol. 625 Biosurfactants, Edited by Ramkrishna S. New York: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 2010.
36. Mohan P.K., Nakhla G. and Yunful E.K., "Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions". *Water Research* 40, (2006): 533 - 540.
37. Mulligan C.N., "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution* 133, (2005) : 183 – 198

38. Cooper D.G. and Paddock D.A. (1983). "*Torulopsis petrophilum* and surface activity", *Applied and Environmental Microbiology* 46, (1983): 1426 – 1429
39. Eddouaouda K, Mnif S, Badis A, Ben Younes S, Cherif S, Ferhat S, Mhiri N, Chamkha M and Sayadi S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites. *Journal of Basic Microbiology*. 52(4) : 408-418.
40. Wang X., Gong L., Liang S., Han X. and Zhu C. and Li y. "Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*". *Harmful Algae* 4, (2005): 433 - 443.
41. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savager KN, Knapp RM., and McInerney MJ. "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms." *Journal of Microbiological Methods* 56, (2004): 339–346.
42. Cooper D., and Golden berg B. "Surface-Active Agents from 2 *Bacillus* Species." *Applied and Environmental Microbiology* 53, no. 2 (1987): 224-229.
43. Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H., and Trevors JT. "Adrop-Collapsing Test for Screening Biosurfactant-Producing Microorganisms." *Journal of Microbiological Methods* 13, (1991): 271–279.
44. Bodour, A. A., and R.M. Miller-Maier. "Application of a Modified Drop-Collapse Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant Producing Microorganisms." *Journal of Microbiological Methods* 32, (1998): 273–280.
45. Morikawa M, Daido H, Takao T, Marato S, and Imanaka T. Shimonishi Y. "A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* Sp. Strain Mis 38." *Journal of Bacteriology* 175, (1993): 6459–6466.
46. Plaza GA, Zjawiony I, and Banat IB. "Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated and Bioremediated Soils." *Journal of Petroleum science and engineering* 50, (2006): 71-77.
47. Pruthi V, and Cameotra S. "Rapid Identification of Biosurfactant-Producing Bacterial Strains Using a Cell Surface Hydrophobicity Technique." *Biotechnological Techniques* 11, no. 9 (1997): 671-674.
48. Afshar S, Lotfabad TB, Roostaazad R, Najafabadi AR, and NOGHABI KA. "Comparative Approach for Detection of Biosurfactant-Producing Bacteria Isolated from Ahvaz Petroleum Excavation Areas in South of Iran." *Annals of Microbiology* 58, no. 3 (2008): 555-560.
49. Chiewpattanakul P., "Isolation and structure elucidation of biosurfactant from microorganism and its application model in drug delivery system". Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Lorraine. 2010.
50. Singer ME. "Microbes and Oil Recovery." *Texas : Bioresource publications* (1985).

51. Raza ZA, Rehman A, Khan MS, and Khalid ZM. "Improved Production of Biosurfactant by a *Pseudomonas Aeruginosa* Mutant Using Vegetable Oil Refinery Wastes." *Biodegradation* 18, no. 1 (2007): 115-121.
52. Mata-Sandoval J. C., Karns J., and Torrents A. "High-Performance Liquid Chromatography Methods for the Characterization of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Ug2 on Corn Oil." *Journal of Chromatography A* 864, (1999): 211-220.
53. Syldatk C, Lang S, Matulovic U, and Wagner FZ. "Production of Four Interfacial Active Rhamnolipids from N-Alkanes or Glycerol by Resting Cells of *Pseudomonas* Sp. Dsm 2874." *Zeitschrift für Naturforsch.*, (1985): 61-67.
54. Edmonds P, and Cooney JJ. "Lipids of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Grown on Hydrocarbons and Trypticase Soybean Broth." *Journal of Bacteriology* 98, (1969): 16-22.
55. Karanth N. G. K., P. G. Deo and N. K. Veenanadig, "Microbial production of biosurfactants and their importance." <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul10/articles19.html>.
56. Robert M, Mercadé ME, Bosch MP, Parra JL, Espuny MJ, Manresa MA, and Guinea J. "Effect of Carbon Source on Biosurfactant Production by *Pseudomonas Aeruginosa* 44t1." *Biotechnology letters* 11, no. 12 (1989): 871-874.
57. Hommel RK., Stegner S., Weber L., and Kleber HP. "Effect of Ammonium Ions on Glycolipid Production by *Candida (Torulopsis) Apicola*." *Applied and Microbiological Biotechnology* 42, (1994): 192-197.
58. Guerra-Santos LH., Kappeli O., and Fiechter A. "Dependence of *Pseudomonas Aeruginosa* Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Environmental Factors." *Applied and Microbiological Biotechnology* 24, (1986): 443-448.
59. Gobbert U., Lang S., and Wagner F. "Sophorose Lipid Formation by Resting Cells of *Torulopsis Bombicola*." *Biotechnology letters* 6, (1984): 225-230.
60. Powalla, M., S. Lang, and V. Wray. "Penta- and Disaccharide Lipid Formation by *Nocardia Corynebacteroides* Grown on N-Alkanes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 31, (1989): 473-479.
61. Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Salem A. and Kadri, M., "Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation", *Acta Biotechnologica* 11, (1991): 315 - 324.
62. Makkar, R.S. and S.S. Cameotra. "Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two *Bacillus* Strains at Thermophilic Conditions." *Journal of the American Oil Chemists Society* 74, (1997): 887-889.

63. GABET S., "Remobilisation d'Hydrocarbures 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. 2004.
64. Abouseoud, M., R. Maachi, A. Amrane, S. Boudergua, and I. Nabi. "Evaluation of Different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Pseudomonas Fluorescens*." *Desalination* 223, (2008): 143-151.
65. Morikawa M., Hiromi D., Toshifumi T., Satoru M., Yasutsugu S., and Tadayuki I. "A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* Sp. Strain Mis38." *Journal of Bacteriology* 175, no. 20 (1993).
66. Francy D.S., JM. Thomas, R.L. Raymond, and C.H. Ward. "Emulsification of Hydrocarbon by Surface Bacteria." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 8, (1991): 237-246.
67. Bodour A.A, C. Gerrero-Barajas, and M. Maier. "Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by Flavolipid Sp. Strain Mtn11." *Applied and Environmental Microbiology* 10, no. 6 (2004): 1114-1120.
68. Dyksterhouse, S.E., J.P. Gray, R.P. Herwig, J.C. Lara, and J.T. Staley. "Cycloclasticus pugetiigen. Nov., Sp. Nov., and Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments." *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, (1995): 116–123.
69. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N, Thaniyavarn S, Pinphanichakarn P, Leepipatpiboon N, Morikawa M, and Kanaya S. "Biosurfactant Production by *Pseudomonas Aeruginosa* A41 Using Palm Oil as Carbon Source." *Journal of General Applied Microbiological* 52, (2006): 215–222.
70. Chang JS, Chou CL, Lin GH, Sheu S-Y, and Chen WM. "Pseudoxanthomonas Kaohsiungensis, Sp. Nov., a Novel Bacterium Isolated from Oil-Polluted Site Produces Extracellular Surface Activity." *System of Applied Microbiological* 28, (2005): 137–144.
71. Gobbert U., Lang S., and Wagner F. "Sophorose Lipid Formation by Resting Cells of *Torulopsis Bombicola*." *Biotechnology letters* 6, (1984): 225-230.
72. Ferhat Samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaouic, Ahmed Boucherit, Najla Mhiri, Nadji Moulai-Mostefa, and Sami Sayadi. "Screening and Preliminary Characterization of Biosurfactants Produced by *Ochrobactrum* Sp. 1c and *Brevibacterium* Sp. 7g Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soils." *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, (2011): 1182-1188.
73. Saimmai A., S Udomsilp, and S Maneerat. "Production and Characterization of Biosurfactant from Marine Bacterium in *Quilinus limosus* Kb3 Grown on Low-Cost Raw Materials." *Annals of Microbiology* 63, (2013): 1327–1339.

74. Ghojavand H., F Vahabzadeh, E Roayaei, and A KShahraki. "Production and Properties of a Biosurfactant Obtained from a Member of the Bacillus Subtilis Group (Ptcc 1696)." *Journal of Colloid and Interface Science* 324, (2008): 172–176.
75. Prieto L.M., M.Michelon, J.F.M.Burkert, S.J.Kalil, and C.A.V. Burkert. "The Production of Rhamnolipid by a Pseudomonas Aeruginosa Strain Isolated from as Outhern Coastal Zone in Brazil." *Chemosphere* 71 (2008): 1781–1785.
76. Lotfabad T. B., M. Shourian, R. Roostaazad , A. R. Najafabadi, M. R. Adelzadeh, and K. A. Noghabi. "An Efficient Biosurfactant-Producing Bacterium Pseudomonas Aeruginosa Mr01, Isolated from Oil Excavation Areas in South of Iran." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69 (2009): 183–193.
77. Martia M.E., W.J. Colonna, P. Patrac, C. Greene H. Zhangd, G. Reznikf, M. Pynnf, K. Jarrell f, J.A. Nymand, P. Somasundaranc, C.E. Glatza, and B.P. Lamsal. "Production and Characterization of Microbial Biosurfactants for Potential Use in Oil-Spill Remediation." *Enzyme and MicrobialTechnology* 55 (2014): 31– 39.
78. Makkar, R.S. and S.S. Cameotra. "Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two *Bacillus* Strains at Thermophilic Conditions." *Journal of the American OilChemists Society* 74, (1997): 887-889.
79. Patel R., and Desai A. "Surface-Active Properties of Rhamnolipides from Pseudomonas Aeruginosa Gs3." *Journal of Basic Microbiology* 37, (1997): 281–286.
80. Onbasli D. and Aslim B. "Determination of Rhamnolipid Biosurfactant Production in Molasses by Some Pseudomonas Sp." *New Biotechnology* 25, (2009).
81. Randhir S Makkar, Swaranjit S Cameotra, and Ibrahim M Banat. "Advances in Utilization of Renewable Substrates for Biosurfactant Production." *AMB Express* (2011): 1-5.
82. Shah V., Jurjevic M., and Badia D. "Utilization of Restaurant WasteOil as a Precursor for Sophorolipid Production." *Biotechnology Progress* 23, (2007): 512–515.
83. Kock, J.L.F., A. Botha, J. Blerh, and S. Nigam. "Used Cooking Oil: Science Tackles a Potential Health Hazard." *South African Journal of Science* 50, (1996): 513–514.
84. LUO Z., YUAN X-Z., ZHONG H., ZENG G-M, LIU Z-F, MA X-L, and ZHU Y-Y. "Optimizing Rhamnolipid Production by Pseudomonas Aeruginosa Atcc 9027 Grown on Waste Frying Oil Using Response Surface Method and Batch-Fed Fermentation." *Journal of Central South University* 20, (2013): 1015–1021.
85. Wadekar S. D., S. B. Kale, A. M. Lali, D. N. Bhowmick, and A. P. Pratap. "Microbial Synthesis of Rhamnolipids by Pseudomonas Aeruginosa (Atcc 10145) on Waste Frying Oil as Low Cost Carbon Source." *PreparativeBiochemistry&Biotechnology* 42, (2012): 249–266.
86. Eddouaouda K, Sami Mnif, S. Ben Younes A. Badis, S. Cherif, S. Ferhat, N. Mhiri, M. Chamkha, and Sami Sayadi. "Characterization of a Novel Biosurfactant Produced by

- Staphylococcus Sp. Strain 1e with Potential Application on Bioremediation of Hydrocarbons Contaminated Sites." *Journal of Basic Microbiology* 51, (2012): 1-11.
87. Wadekar S.D., S.B. Kale, A.M. Lali, D.N. Bhowmick, and A.P. Pratap. "Microbial Synthesis of Rhamnolipids by Pseudomonas Aeruginosa (Atcc 10145) on Waste Frying Oil as Low Cost Carbon Source." *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 42, (2012): 249–266.
 88. Ferhat S., « Production de biosurfactants par des souches de Brevibacterium et Ochrobacterium isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminées par le pétrole brut ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida. Université SAAD DAHLAB-BLIDA, (2012).
 89. Anastasia A., Pantazaki, Maria I., Dimopoulou, Olga M. Simou, and Agathi A. Pritsa. "Sunflower Seed Oil and Oleic Acid Utilization for the Production of Rhamnolipids by Thermus Thermophilus Hb8." *Applied Microbiology and Biotechnology* 88, no. 4 (2010): 939-951.
 90. Saikia R.R., S Deka, M Deka, and I M. Banat. "Isolation of Biosurfactant-Producing Pseudomonas Aeruginosa 29 from Oil-Contaminated Soil and Evaluation of Different Nitrogen Sources in Biosurfactant Production." *Annals of Microbiology* 62, (2012): 753–763.
 91. ZHU Y, GAN J-j, ZHANG G-l, YAO B, ZHU W-j, and MENG Q. "Reuse of Waste Frying Oil for Production of Rhamnolipids Using Pseudomonas Aeruginosa Zju.U1m." *Journal of Zhejiang University SCIENCE A* 8, no. 7 (2007): 1514-1520.
 92. Pepi, M., A. Cesaro, G. Liut, and F. Baldi. "An Antarctic Psychrotrophic Bacterium Halomonas Sp. Ant- 3b, Growing on N-Hexadecane, Produces a New Emulsifying Glycolipid." *FEMS Microbial Ecology* 53, (2004): 157-166.
 93. Yin H., J Qiang, Y Jia, J Ye, H Peng, H Qin, N Zhang, and B He. "Characteristics of Biosurfactant Produced by Pseudomonas Aeruginosa S6 Isolated from Oil-Containing Wastewater." *Process Biochemistry* 44, (2009): 302–308.
 94. Chakraborty S., A. Khopade, C. Kokare, K. Mahadik, and B. Chopade. "Isolation and Characterization of Novel α -Amylase from Marine Streptomyces Sp.D1." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58, (2009): 17–23.
 95. Persson A., E. Österberg, and M. Dostalek. "Biosurfactant Production by Pseudomonas Fluorescens 378: Growth and Product Characteristics." *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, no. 1 (1988): 1–4.