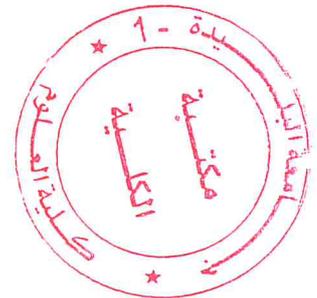


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
CHEDED Khadidja

En vue d'obtenir le diplôme de Master



Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Produits Naturelles

Titre

**Effet de la composition du milieu sur les propriétés de biosurfactant
produit par une souche hydrocarbonoclaste *Paenibacillus popilliae***

Soutenu publiquement le 04 juillet 2017 devant le jury composé de :

W. Touafek	MCB	Président	Université de Blida 1
F/Z. Ferradji	MCB	Membre	Université de Blida 1
A.Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida 1
F/Z.Mesbaiah	CNRDPA	Co-Promotrice	Université de Blida 1

Promotion 2016-2017

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى اختبار قدرة سلالة بكتيرية *1C paenibacillus popilliae*، قادرة على تفكيك الهيدروكربونات، عزلت من تربة ملوثة بالبترول الخام (منطقة حاسي مسعود جنوب الجزائر)، على إنتاج المفاعلات السطحية.

أظهرت النتائج أن السلالة قادرة على إنتاج مفاعل سطحي باستعمال المازوت، الجلسرين وزيت المحركات المستعمل كمصدر للكربون، وهذا من خلال خفض توتر السطح إلى 34،37 و35 على التوالي. يكون الإنتاج أفضل في وسط كامل بالنسبة للمازوت وزيت المحركات المستعمل وفي وسط معدني بالنسبة للجلسرين. هذا الأخير يحافظ على خصائصه في مجال واسع لدرجة الحرارة، الحموضة والملوحة. كما أظهرت النتائج انه ذو طبيعة غليكوليبيدية.

الكلمات المفتاحية: المفاعل السطحي - إنتاج - مقاومة - توتر السطح - سلالة بكتيرية 1C.

Résumé

Dans ce travail nous avons entrepris une étude sur la production de biosurfactants par une souche hydrocarbonoclaste *Paenibacillus popilliae* 1C isolée à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie).

Les résultats obtenus révèlent que : (a) La souche thermophile 1C produit de biosurfactant en utilisant le gasoil, le glycérol et l'huile de moteur usagée comme substrats, cette production est traduite par la réduction de la tension superficielle (34, 37 et 35 mN/m respectivement). (b) la tension de surface la plus faible a été enregistré lors de la croissance de la souche 1C sur le gasoil et l'huile de moteur usagée en milieu synthétique LB et le glycérol sur milieu MSM, (c) le biosurfactant produit en utilisant le glycérol comme substrat montre une stabilité sur une large gamme de température [4 à 120 °C], également, il présente une bonne résistance dans les milieux acide, basique et salins . (d) l'analyse FTIR montre que ce produit est de nature glycolipidique.

Mots clés : biosurfactant, production, stabilité, tension de surface, souche bactérienne *Paenibacillus popilliae* 1C.

Abstract

In this work we undertook a study on the production of biosurfactants by a hydrocarbonoclast strain isolated from a sandy soil contaminated by petroleum hydrocarbons (HassiMessaoud region, southern Algeria). The results obtained show that: (a) The thermophilic strain 1C produces biosurfactants using gas oil, glycerol and used motor oil as substrates, this production is translated by the reduction of the surface tension (34, 37 and 35 MN / m respectively). (B) the lowest surface tension was recorded on growth of strain 1C on gas oil and used engine oil in LB medium and glycerol on MSM medium, (c) the biosurfactant produced using Glycerol as substrate exhibits stability over a wide temperature range [4 to 120 ° C], it also exhibits good resistance in acidic, basic and saline media. (D) FTIR analysis shows that this product is glycolipid in nature.

Key words: biosurfactant, production, stability, surface tension.

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Introduction générale.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIE	3
1. Les surfactants et les biosurfactants	3
1.1 Les surfactants	3
1.2 Classification des surfactants	3
1.3 Les biosurfactants	5
1.4 Classification des biosurfactants.....	6
1.5 Production des biosurfactants.....	11
1.6 Paramètres influençant la production.....	13
1.7 Propriétés des biosurfactants	14
1.8 Les avantages des biosurfactants	17
1.9 Les domaines d'applications	18
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	21
2.1 Origine et isolement de la souche bactérienne 1C.....	21
2.2 Isolement de la souche bactérienne	21
2.3 Repiquage des souches et préparation des précultures	21
2.4 Préparation des milieux de production.....	22
2.5 Production de biosurfactant.....	22
2.6 Techniques de mesure de production de biosurfactant	22
2.7 Extraction du biosurfactant	24
2.8 Etude de la stabilité des biosurfactants	24
2.9 Caractérisation structurale du biosurfactant	25
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	26
3.1 Production de biosurfactant par la souche hydrocarbonoclaste 1C	26
3.2 Effet de la composition du milieu sur la production de biosurfactant	26
3.3 Etude de la stabilité des biosurfactants	30
3.4 Extraction de biosurfactant.....	37
3.5 Caractérisation préliminaire des biosurfactants.....	38
Conclusion	41
Références bibliographiques	42
Annexe	49

LISTES DES FIGURES ET GRAPHIQUES

Figure (1) : Schématisation de l'organisation des tensioactifs	3
Figure (2) : Différentes classes des surfactants selon la nature de groupements fonctionnels	4
Figure (3) : Détermination de la CMC en fonction de la tension superficielle	5
Figure (4) : Schéma représentatif d'une molécule tensioactif	6
Figure (5) : Structure de rhamnolipide produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Figure (6) : Structure du tréhalose lipide produit par <i>Rhodococcus erythropolis</i>	8
Figure (7) : Structure de sophorolipide (glycolipides)	8
Figure (8) : Structure du surfactin produite par <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	9
Figure (9) : Structure de phosphatidylthanolamine (phospholipide)	10
Figure (10) : Structure d'emulsan (biosurfactants polymériques)	10
Figure (11) : Domaine d'application des biosurfactants	19
Figure (12) : Sols contaminés par le pétrole (Hassi-Messaoud)	21
Figure (13) : Schéma représentatif de test d'émulsification	23
Figure (14) : Méthode de déplacement de l'huile	24
Figure (15) : Production de la souche 1C sur le milieu LB	27
Figure (16) : Production de la souche 1C sur le milieu MSM1	28
Figure (17) : production de la souche 1C sur le milieu MSM2	29
Figure (18) : Influence de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant de 1C (Gasoil)	30
Figure (19) : Effet de variation du pH sur la stabilité du biosurfactant (Glycérol source de carbone)	31
Figure (20) : Effet de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur usagée)	32
Figure (21) : Influence de la variation de la température sur la stabilité du biosurfactant de la souche 1C (Gasoil)	33
Figure (22) : Effet de variation de la température sur la stabilité du biosurfactant (Glycérol source de carbone) .	34
Figure (23) : Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur usagée)	35
Figure (24) : Influence de la variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Gasoil source de carbone) .	35

- Figure (25) :** Effet de variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant 36
(Glycérol source de carbone)
- Figure (26) :** Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur 36
usagée)
- Figure (27) :** Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche 1 C en utilisant le 39
Glycérol (a : milieu LB, b : milieu MSM1, c : milieu MSM2).

Liste des tableaux

Tableau .1. : Différents biosurfactants avec leur source microbienne	10
Tableau .2. : Source des microorganismes et propriétés des biosurfactants	15
Tableau .3. : Utilisation des biosurfactants	20

Liste des abréviations

CMC : Concentration micellaire critique

LB : Milieu Lauria Bertani

TS : Tension du surface

ATCC : American Type Culture Collection

°C : Celsius

TI : Tension interracial

MSM : Milieu minimum

DDP : Diamètre du déplacement du pétrole brut

E24 : Activité émulsifiante (indice d'émulsion)

HAP : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Remerciements

Avant toute chose, je remercie *Dieu*, le tout puissant pour m'avoir donnée la force et la patience tout le long de mes études.

Je remercie spécialement mon Promoteur Monsieur Badis A, Professeur à l'Université Saad Dahlab de Blida, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vie à ce travail.

Je tiens à remercier la personne sans qui ce présent travail n'aurait jamais vu le jour : mon Co-promotrice Mesbaiah Fatma zohra pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé. Qui a su trouver les mots pour m'amener à exprimer mon rêve, faire de la recherche et transmettre les connaissances ainsi mise en évidence, Je la remercie aussi pour ses qualités humaines qu'elle trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime.

J'adresse mes remerciements à Mme Touafek responsable de spécialité, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses conseils .

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Mr ANNANE, directeur de CNRDPA, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de CNRDPA de Bousmail qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Je remercier également tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés de juger ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Je remercie sincèrement Mr Mezrag pour sa disponibilité en tout moment, son aide précieux, ces conseils et ses encouragements.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr Tafahi Djamel et l'équipe du laboratoire d'hygiène, et aux personnels de département de chimie.

Je touche aussi par mes remerciements tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors de la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail:

A ma famille avec amour et gratitude

A ma chère maman et Mon Cher papa

Qui sont les meilleurs parents dans ce monde, en témoignage

*de ma profonde gratitude et de mon incontestable reconnaissance pour tous les sacrifices
qu'ils me contentent toute la confiance qu'ils*

*m'accordent et tout l'amour dont ils m'entourent C'est Grâce à votre encouragement et votre
soutien que je suis arrivée jusqu'ici*

A ma très chère sœur

À mes frères

Que dieu vous protège et vous offre tout le bonheur que vous méritez pour votre avenir.

En témoignage de mon amour et de ma profonde admiration

A deux grandes mères, mes chères tantes, mes chères cousines : Djihad et Ibtissem.

A toutes ma famille

A mes chères amies

*En fin à tous les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou
à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis aujourd'hui.*

Introduction générale

Les tensioactifs sont généralement des composés organiques utilisés dans de nombreuses industries (textiles, cuir, métallurgie, pétrolière, pétrochimie, etc.) et sont également présents dans les formulations de produits de consommation courante tels que les détergents, les cosmétiques, les produits agroalimentaires, les produits pharmaceutiques [1]. En outre, ils sont utilisés dans le domaine environnemental comme la dispersion des nappes de pétrole déversé en milieu marin, ainsi la remobilisation des sols contaminés par les substances insolubles (hydrocarbures) [2].

En raison de leur toxicité, les tensioactifs chimiques sont de plus en plus remplacés par des molécules issues des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelées biosurfactants [48]. Ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et efficaces.

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes, notamment les bactéries, ayant une capacité élevée de production de biosurfactants. A cet effet une collection des souches bactériennes, isolées à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut et qui ont déjà montré des aptitudes à dégrader le pétrole et certains composés aromatiques, a été mise sur place afin d'investir sur le plan de la recherche appliquée dans le domaine de la biotechnologie environnementale et industrielle. Ces souches ont été isolées dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de biomolécules au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioMol) de l'université Saad Dahlab de Blida 1.

L'objectif principal de ce travail est l'étude de la production de biosurfactant par une souche hydrocarbonoclaste isolée localement à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures de l'industrie pétrolière (Hassi Messeaoud, Algérie) en utilisant plusieurs substrats. L'influence de la composition du milieu sur les propriétés des biosurfactants sont fortement recherchés.

Le présent mémoire se subdivise en trois parties, La première partie est une approche bibliographique où sont exposées les données relatives aux biosurfactants (définition, classification, propriétés, ...) et leurs différentes applications. La seconde partie est

réservée au principal matériel et méthodes utilisés pour concrétiser l'expérimentation. La troisième partie de ce mémoire est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus. Le manuscrit est achevé par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE : 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIE

1. Les surfactants et les biosurfactants

1.1 Les surfactants chimiques

Les surfactants ou tensioactifs sont des composés amphiphiles ayant des propriétés tensioactifs, ils ont donc comme effet de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Ces molécules sont formées d'une partie hydrophobe ainsi qu'une partie hydrophile qui leur confèrent une affinité particulière pour les interfaces air /eau ou eau/huile [1].

A la surface d'un liquide, les tensioactifs s'organisent de telle sorte que la tête hydrophile soit au contact de l'eau et la chaîne hydrophobe orientée vers l'extérieur (figure 1).

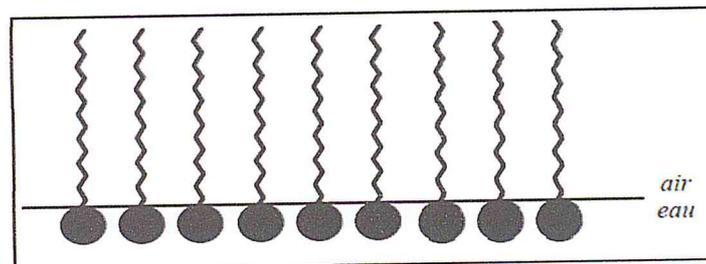


Figure (1) : Schématisation de l'organisation des tensioactifs [2].

L'extrémité apolaire des surfactants est normalement composé d'une chaîne d'acide gras tandis que l'extrémité polaire peut être formé à partir de sucre ,de phosphate ,d'acide carboxylique ou bien alcool [3].Donc on peut noter que toutes ces formulation que ce soit dans les détergents, les agents moussants, les agents dispersants ainsi que dans les émulsifiants sont généralement à base de composé chimique [4].

1.2 Classification des surfactants

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques des surfactants [5] :

- **Surfactants anioniques** : leur partie hydrophile est chargée négativement, Ils ont une tendance hydrophile plus marquée. Ils ne sont pas compatibles avec les tensioactifs cationiques, la plus connue est le dodécylsulfate de sodium (SDS).
- **Surfactants cationiques** : leur partie hydrophile est chargée positivement, Le plus souvent ce sont des sels d'ammonium quaternaires triméthylés ou des sels de pyridinium.
- **Surfactants non ioniques** : la molécule ne comporte aucune charge nette. Ils sont les meilleurs détergents, grâce à leur tension superficielle et la capacité de solubilisation sont plus élevées, ils ont de très faibles valeurs de CMC. Le Tween 80 est l'un des plus usuels.
- **Surfactants zwitterioniques ou amphotères** : leur partie hydrophile comporte une charge positive et une charge négative, la charge globale est nulle. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre, ils sont utilisés comme détergents.

Les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [6]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelés biosurfactants.

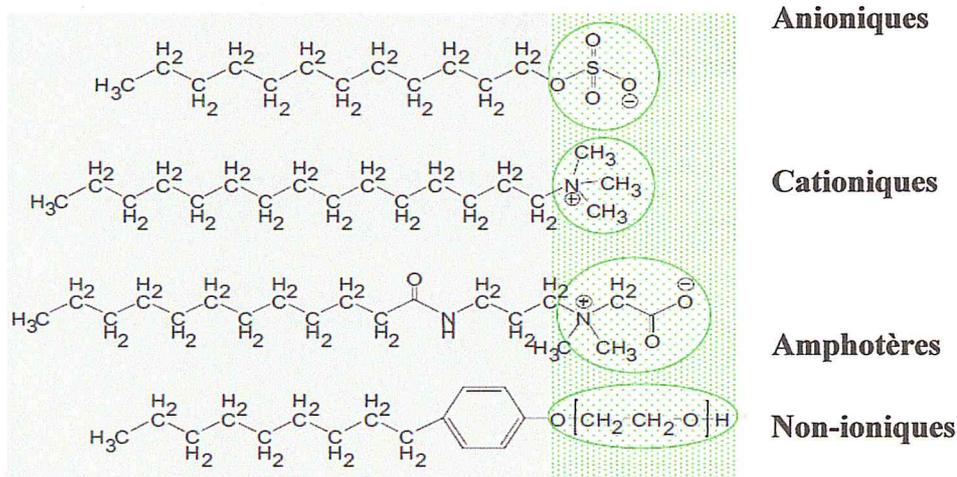


Figure (2) : Différentes classes des surfactants selon la nature de groupements fonctionnels.

La concentration micellaire critique (CMC) est une caractéristique spécifique de chaque surfactant et est un des paramètres pour la quantification de l'efficacité de ces derniers dans certains type d'utilisation, plus précisément la concentration micellaire critique

minimale d'un surfactants requise pour atteindre la valeur de tension de surface, ou interfaciale, la plus basse [7].

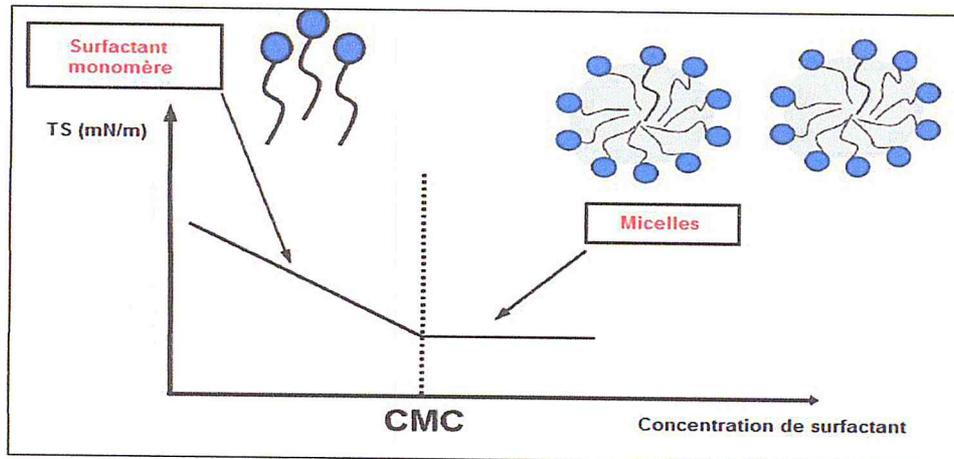


Figure (3) : Détermination de la CMC en fonction de la tension superficielle.

De ce fait, plus la valeur CMC d'un surfactant est plus basse plus que celui –ci est efficace, donc la CMC d'un surfactant à la concentration à laquelle l'interface air/eau en est saturée et il y a la formation spontanée des micelles.

Puisqu'une concentration moindre est nécessaire pour abaisser la tension de surface contrairement à un surfactant dont la CMC est plus haute [8].

Plusieurs facteurs qui peuvent venir influencer sur la CMC chez un surfactant. Premièrement, la température jouent directement sur la CMC [6]. Une étude sur l'effet du pH sur la CMC du sel de sodium du dodécylsulfate (SDS) a démontré qu'à bas PH, la valeur de CMC diminue tandis que qu'à haute pH elle reste constante [7].

Un autre facteur qui affecte grandement le potentiel d'un surface à abaisser la tension de surface est la longueur de la chaîne alkyle qui le compose. En effet, une augmentation du nombre de groupe (-CH₂-) entraîne une augmentation de l'hydrophobicité, ce qui facilite ainsi la formation des micelles [8].

1.3 Les biosurfactants

Les biosurfactants sont définis étant comme des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produite par des cellules vivantes : levures, bactéries, champignons [9], Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues

chimiques, mais ils ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques [10], Ils sont constitués d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe apolaire (figure 4). Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature de substrat et des conditions de production.

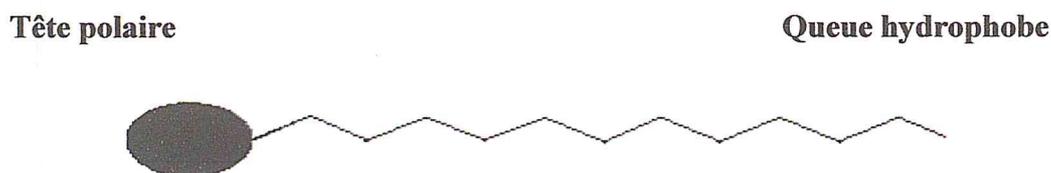


Figure (4) : Schéma représentatif d'une molécule tensioactif [11].

1.4 Classification des biosurfactants

La classification des biosurfactants basées sur leur composition chimiques et types de microbes les produisant, biosurfactant est divisée dans cinq larges groupes c'est à dire, (1) les glycolipides, (2) les lipopeptides et lipoprotéines, (3) les acides gras, les phospholipides, les lipides neutres, (4) les biosurfactants polymériques, et (5) les surfactants particuliers [12-13].

Selon leur poids moléculaire, les biosurfactants sont classées en :

- ✚ Faible masse moléculaire(les glycolipides, les lipopeptides) sont plus efficaces pour réduire la tension superficielle.
- ✚ Haute masse moléculaire (les polysaccharides amphiphiles, les lipoprotéines) qui sont plus efficaces à stabiliser les émulsions (huile/eau) sans réduire de tension superficielle.

1.4.1 Les glycolipides

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydrox aliphatiques, Les meilleurs exemples de glycolipides incluent des lipides tréhalose, des glucides comme mono-, di-, tri-et tétrasaccharides qui inclut le glucose rhamnolipides, sophorolipides, tréhalolipides [14].

▪ Les rhamnolipides

Les glycolipides les mieux étudiés, dans lesquels un ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules des β -hydroxydécanoïque, alors que le groupement OH de l'un des acides est lié à la portion glycosidique, le groupement OH du deuxième acide entre dans la formation d'un ester [15].

Certaines espèces de *Pseudomonas aeruginosa* est caractérisée pour produire de grandes quantités des glycolipides liée par un ou deux molécules rhamnose [16].

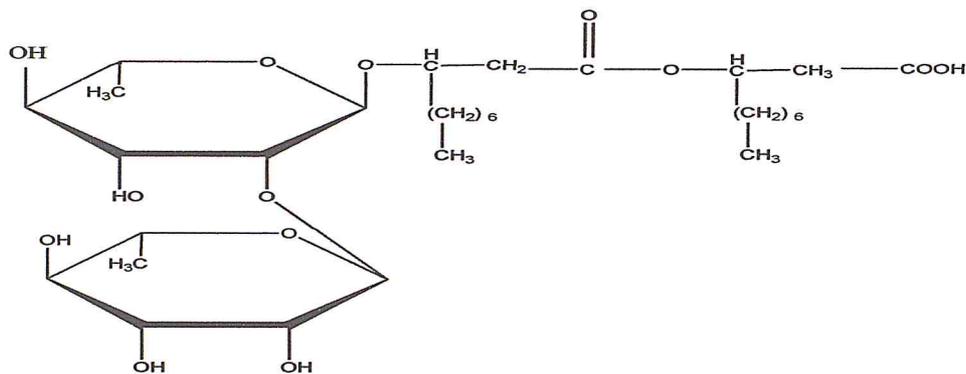


Figure (5) : Structure de rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa*.

▪ Les tréhaloses lipides

Il existe plusieurs types structurels de tréhaloses lipides ont été déjà rapportés, le tréhalose disaccharide lié avec le carbone (C-6) et (C-6') associé à la plupart des espèces des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium* [17]. Les acides mycoliques sont la chaîne longue, des acides gras hydroxylés aux branches. Les Tréhaloses lipides d'organismes différents dans la taille et la structure d'acide mycolique, le nombre (numéro) d'atomes carboniques et le degré (diplôme) d'insaturation [18].

Les tréhaloses lipides produits par *Rhodococcus erythropolis* et *Arthrobacter* sp abaissent la tension superficielle et interfaciale de 25 à 40 et de 1 à 5 mN/m, respectivement [19].

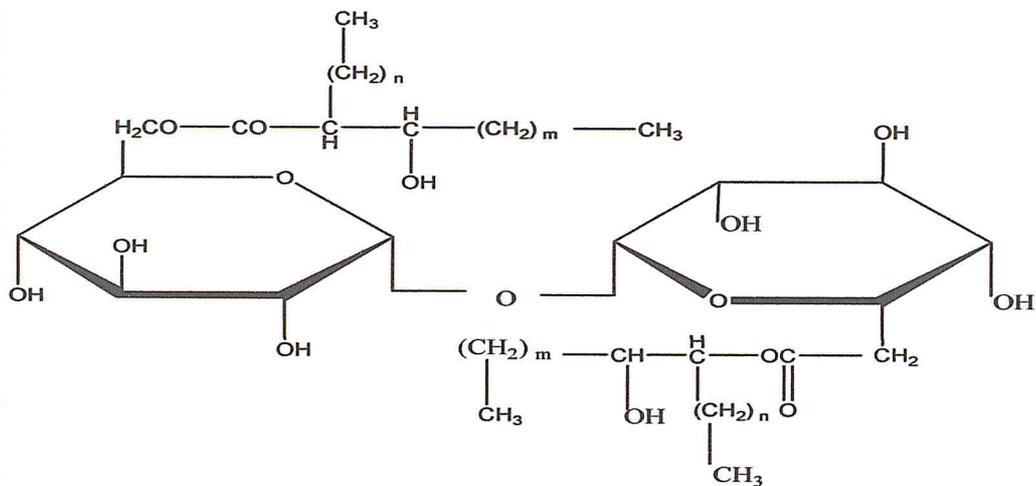


Figure (6) : Structure du tréhalose lipide produit par *Rhodococcus erythropolis* .

▪ Les sophorolipides

Les sophorolipides consistent d'un dimère sophorose glucides attaché avec une longue chaîne hydroxyle. l'acide gras et sont principalement produit par des levures comme *Torulopsis bombicola*, *T. apicolaet* *Wickerhamiella domericqiae* [20]. Les sophorolipides ont la capacité pour baisser la tension superficielle d'eau de (72.8mN/m) à (40/30 N/m), avec une concentration micellaire critique de (40 à 100 mg/l) [21].

Généralement, les sophorolipides sont produits par un mélange de macro-lactones et d'acides. Il a été démontré que la forme de sophorolipides est nécessaire, ou préférable pour de nombreuses applications [22]. Ces biosurfactants sont un mélange d'au moins six à neuf différentes sophorolipides hydrophobes.

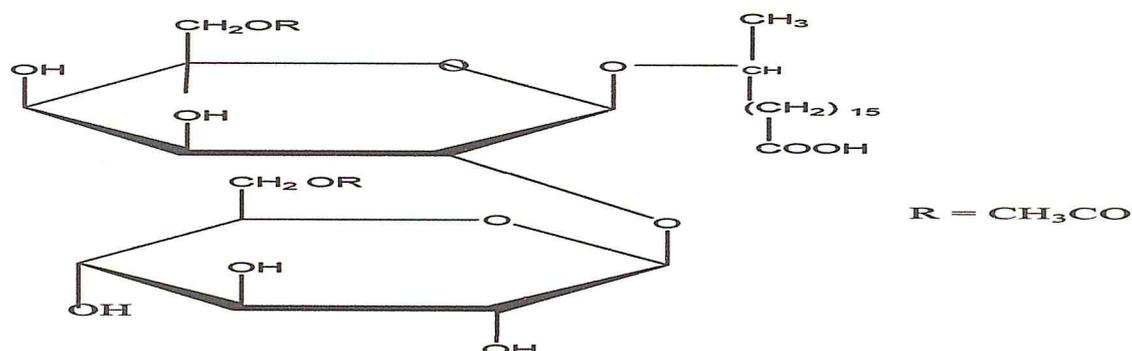


Figure (7) : Structure de sophorolipide (glycolipides).

1.4.2 Les lipopeptides et lipoprotéines

▪ Surfactin

Surfactin est un lipopeptide cyclique est un du plus efficace biosurfactant connu produit par *Bacillus subtilis* ATCC-21332 [23].

Il est composé d'une structure de sept acides aminés couplé à une chaîne d'acide gras par lien lactone. à cause de son activité tensio-active exceptionnelle il est nommé comme surfactin [24], Surfactin peut baisser la tension superficielle de (72 à 27.8 mN/m) [25], avec une concentration micelle critique de (0.017 mg/l) [26]. De telles propriétés de surfactins les qualifient pour des applications potentielles dans la médecine (un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris, les antibiotiques) ou la biotechnologie.

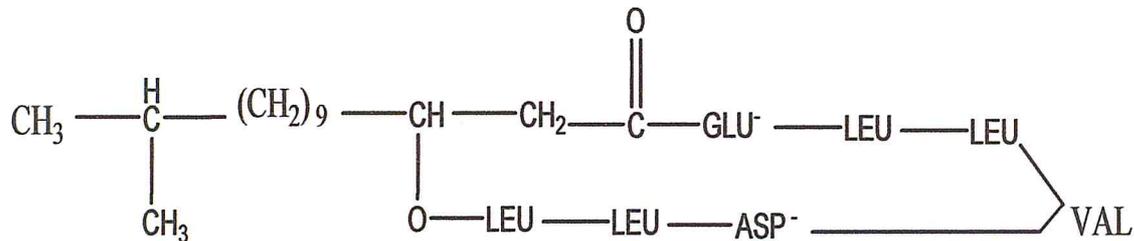


Figure (8) : Structure du surfactin produite par *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

▪ Lichenysin

Il est produit par le *Bacillus licheniformis* expose la structure semblable et des propriétés physico-chimiques à celui de surfactin [27]. *B. licheniformis* produise aussi plusieurs autres agents actifs superficiels qui agissent sur les propriétés thermique et chimique. Le pH et la stabilité de sel Lichenysin un produit par le *Bacillus licheniformis* est caractérisé pour contenir une longue chaîne la molécule d'acide gras bêta-hydroxyle [28].

Les biosurfactants produits par *B. licheniformis* abaisse la tension superficielle de l'eau à 27 mN/m et la tension interfaciale entre l'eau et *n*-hexadecane à 0,36 mN/m.

▪ Iturin

Le premier composé découvert du groupe iturine et son membre le mieux connu, a été isolé d'un *Bacillus subtilis*, sa structure a été élucidée .le nom générique de "iturine" pour ce groupe de lipopeptides .le groupe iturin de composés est lipoheptapeptides cyclique qui contient un β-amino, l'acide gras dans sa chaîne de côté. Lipopeptides appartenant à la

famille iturin sont les agents antimycosiques puissants qui peuvent aussi être utilisés comme bio pesticides pour la protection des plantes [29].

1.4.3 Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Plusieurs microorganismes telles que les bactéries, levures, champignons produisent de grandes quantités d'acides gras et de Le phosphatidyléthanolamine produit par *Rhodococcus erythropolis* cultivée sur *n*-alcanes provoque un abaissement de la tension superficielle entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1mN/m et une concentration micellaire critique (CMC) de 30 mg/l tensioactifs phospholipidiques au cours de la croissance sur *n*-alcanes [30].

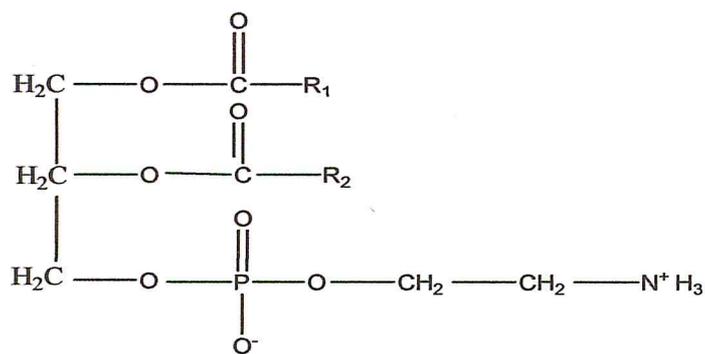


Figure (9) : Structure de phosphatidylthanolamine (phospholipide).

1.4.4 Les biosurfactants polymériques

Les biosurfactants mieux étudiés se sont les polymères de haut poids moléculaires, qui expose des propriétés comme la haute viscosité : Emulsan, Liposan ,Biodespersan ,Alasan et d'autre composés complexes polysaccharides-protéines .

- **Emulsan**

Acinetobacte rcalcoaceticus RAG-1 produit un bioémulsifier polymère extracellulaire puissant appelé emulsan qui est caractérisé comme polyanionique hétéro polysaccharide [31].

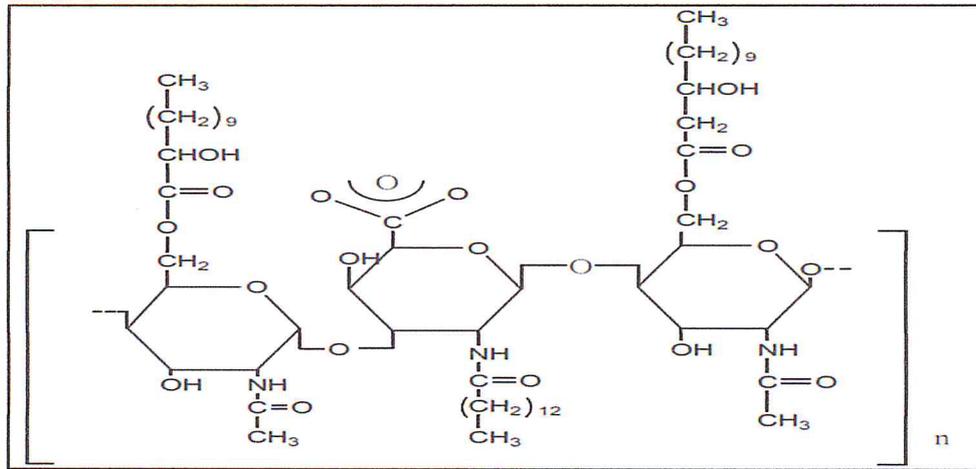


Figure (10) : Structure d'emulsan (biosurfactants polymériques).

1.4.5 Les biosurfactants particuliers

Les biosurfactants particuliers jouent un rôle important dans l'absorption d'alcanes par les cellules microbiennes. Les vésicules produites par la souche *Acinetobacter sp.* Ils sont composés de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharide [32].

1.5 Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par une grande variété des microorganismes procaryotes et eucaryotes qui se développent de manière dans un milieu aqueuse contenant une ou plusieurs sources de carbone, généralement les hydrocarbures et les huiles végétales.

Tableau .1. : Différents biosurfactants avec leur source microbienne [33 ,34].

Biosurfactant	Microorganismes
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.DMS 2847</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas sp.MUB</i>
Tréhalose lipides	<i>Serratia rubidea</i>
Tréhalose dicorynemycolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i> et <i>Arthrobacter sp</i>
Sophorolipides	<i>Nocardia sp</i> <i>Rhodococcus sp</i> <i>Arthrobacterium sp</i> <i>Corynebacterium sp</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida bombicola</i>
Lipopeptides	
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Lichenysin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	
Acides gras et lipides naturels	<i>Acinetobacter sp</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Corynebacterium salvonicum SFC</i> <i>Nocardia erythropolis</i>

Biosurfactant polymérique

Emulsan

Acinetobacter calcoaceticus RAG -1

Liposan

Candida lipolytica

Alasan

Acinetobacter radioresistens

Biosurfactants particuliers

Vesicules

Acinetobacter calcoaceticus

1.6 Paramètres influençant la production

Plusieurs paramètres influencent la production des biosurfactants (type, la qualité, la quantité) par la nature de la source de carbone et l'azote aussi bien que la présence de fer, le magnésium, le manganèse, le phosphore et le soufre, et aussi les conditions de culture (température, pH, agitation, etc....).

▪ Source de carbone

Généralement, la source de carbone est le facteur le plus important lors de la production de biosurfactant. Elle détermine le type et la quantité du biosurfactant et elle est divisée en trois catégories à savoir: les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales [35].

De nombreux travaux ont montré que le gasoil et le pétrole ont été trouvés une bonne source de carbone [36], les substrats hydrophobes sont initialement métabolisés par des microorganismes pour des exigences énergétiques et ensuite il utilise dans la synthèse de la molécule biosurfactant (100-165 mg/g de substrat) [36].

▪ Source d'azote

La source d'azote est un des paramètres importants de production des biosurfactants parce que c'est essentiel pour la croissance microbienne comme les protéines. Certaines souches préfèrent les sels d'ammonium, nitrate de sodium, peptone comme source inorganique.

Un paramètre important étudié par plusieurs chercheurs est le rapport quantitatif entre le carbone et la source d'azote (C/N) utilisé dans la production du biosurfactant. L'activité émulsionnante est montée avec l'augmentation de rapport (C/N) [37].

▪ pH

La production de biosurfactant est influencée par le pH du milieu et généralement les milieux acides-basiques sont défavorables pour la production par exemple, pour la souche *candida antarctica* pH du milieu de culture doit se situer entre 4 à 8 [39].

En revanche, la production de penta et disaccharide lipidique n'est pas affectée par le pH allant de 6,5 à 8 [40].

▪ Température

La plupart des productions des biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants produits par *Bacillus* sp à des températures supérieures à 40 °C, bien que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [41].

▪ Agitation et l'aération

L'aération et l'agitation sont l'un de deux facteurs importants qui influencent la production des biosurfactants, l'augmentation de vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement avec un rendement moindre.

La présence de l'oxygène peut affecter la production à travers son effet sur la croissance (transport nutritif) et l'activité cellulaire (Dessai et Bannat) [42].

▪ Salinité

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques [41].

1.7 Propriétés des biosurfactants

Les biosurfactants ont d'intérêt croissant pour l'utilisation commerciale à cause de leurs propriétés moussantes.ils sont moins sensibles aux facteurs de production comme la température, le pH et la salinité .ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs application environnementales très intéressantes.

▪ Réduction des tensions superficielle et interfaciale

L'efficacité d'un biosurfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension de surface, un bon biosurfactant peut diminuer la tension de surface (TS) de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale (TI) eau/hexadécane de 40 à 1 mN/m.

Le surfactin de *Bacillus subtilis* peut réduire la tension superficielle d'eau 25 mN/m avec une tension interfaciale d'eau /hexadécane inférieure à (< 1mN/m) [43].

Le rhamnolipide de *pseudomonas aeruginosa* diminue la tension superficielle d'eau de 26 mN/m et tension interfaciale d'eau/hexadécane à (< 1mN/m) [45].

▪ Biodégradabilité

Contrairement aux surfactants synthétiques, les biosurfactants sont facilement dégradables et adaptés particulièrement pour l'utilisation environnementale comme la dépollution et la dispersion de fuites de pétroles.

▪ Faible toxicité

On considère généralement les biosurfactants comme des produits peu ou non-toxiques et ils sont appropriés aux industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires et encore environnementaux.

La LC50 (concentration mortelle de 50% d'espèce de test) du tensioactif anionique synthétique (Corexit) est dix fois plus élevée que celui de rhamnolipides, démontrant une toxicité plus élevée du tensioactif chimique [44].

▪ Pouvoir émulsifiant

L'émulsion est un système hétérogène composé d'au moins un liquide non miscible intimement dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre dépasse en général 0,1 µm. La phase dispersée est aussi appelée phase interne, et la phase dispersante peut être appelée phase externe ou continue. Donc, il y a généralement deux types d'émulsions : huile /eau ou eau/huile, ces systèmes possèdent une stabilité minimale pouvant être accrue par des additifs tels que les agents actifs.

Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants), les biosurfactants de plus haute masse moléculaire est le meilleur émulsifiant en générale que ceux à faible masse. Par exemple :

Les sophorolipides de *Torulopsis bombicola* ont la capacité de réduire leur tension superficielle et interraciale mais ils ne sont pas des bons émulsifiants, par contre liposan a montré une mauvaise réduction de tension superficielle mais il est utilisé avec succès pour émulsionner les huiles comestibles [45].

▪ **Activité biologique**

Plusieurs biosurfactants ont montré une activité contre les bactéries, champignons, algues et virus. Le lipopeptide iturin de *Bacillus subtilis* a montré une activité puissante antifongique [46]. Le ramnolipide synthétisé par *Pseudomonas aeruginosa* a montré une activité inhibitrice contre les bactéries : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Alcaligenes faecalis* (32 mg/ml), *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* (16 mg/ml) et *Staphylococcus epidermidis* (8 mg/ml) et aussi une excellente propriété antifongique : *Aspergillus niger* (16 mg/ml), *Chaetomium globosum*, *Penicillium crysogenum* et *Rhizoctonia solani* (18 mg/ml).

Tableau .2. Source des microorganismes et propriétés des biosurfactants [17 ; 48].

Biosurfactant	Microorganisme	Tension de surface (mN/m)	Concentration micellaire critique CMC (mg/l)	Indice d'émulsification (E ₂₄)	Référence
Glycolipides Rhamnolipide	<i>P. aeruginosa</i>	29	0.1 - 10	/	[17 ; 48]
	<i>Pseudomonas sp</i>	25 -30		94	
	<i>Serratia marcescens</i>	/		/	
Tréhalolipide	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	32 -36	4	/	[17 ; 48]
	<i>Nocardia erythropolis</i>	30	20	/	
	<i>Mycobacterium sp</i>	38	0.3		
Sophorolipide	<i>Torulopsis bombicola</i>	33	/		[17 ; 48]
	<i>Torulopsis apicola</i>	30			
Lipopeptides et lipoprotéines Viscosin Surfactin	<i>B.lichenformis</i>	27	12 -20	60	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26.5			
	<i>Bacillus sp</i>	27 -32	150		
			23 - 160		

1.8 Les avantages des biosurfactants

Les biosurfactants augmentent l'intérêt pour l'utilisation commerciale, il existe beaucoup des avantages des biosurfactants possèdent les même propriétés tensioactifs que leur homologue chimique, parmi ceux-ci on peut classer [47] :

- Biodégradabilité : Contrairement au tensioactifs synthétique, les biosurfactants sont des composés sont facilement biodégradables et ainsi particulièrement adopté pour des applications environnemental comme la dépollution et la dispersion du pétrole.
- La diversité chimique la diversité chimique d'amphiphiles naturellement produit offre une plus large sélection d'agent actif superficiel avec propriétés étroitement lié à l'application spécifique.
- Biocompatibilité et digestibilité : qui permet leur application dans des produits pharmaceutiques cosmétiques et comme des additifs alimentaires fonctionnels.
- La disponibilité de matière première des processus microbiens des matières premières qui sont disponibles en grandes quantités peut produire biosurfactants.
- Economie de production acceptable du biosurfactant peut aussi produit de déchet industriels et par des produits particulièrement intéressant pour la production de vrac (pour l'utilisation dans la technologie pétrolière).
- Le contrôle environnemental : un biosurfactant peut être efficacement utilisé dans le traitement du contrôle d'émulsion industriel de biodégradation de fuites de pétrole et la désintoxication d'effluent industriel et dans la dépollution de sol.
- Bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), salinité (jusqu'à 30%) et de température (jusqu'à 100 °C).

1.9 Les domaines d'applications

Les biosurfactants sont largement utilisées dans différentes domaines d'applications potentielles telles que :

- ❖ Biotechnologie industrielle : cosmétiques, peintures, pharmaceutique, médecine, pétrochimie, transformation alimentaire, industrie textile, solubilisation des produits agrochimiques, agroalimentaires, nettoyeurs ménagers, 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 [48].

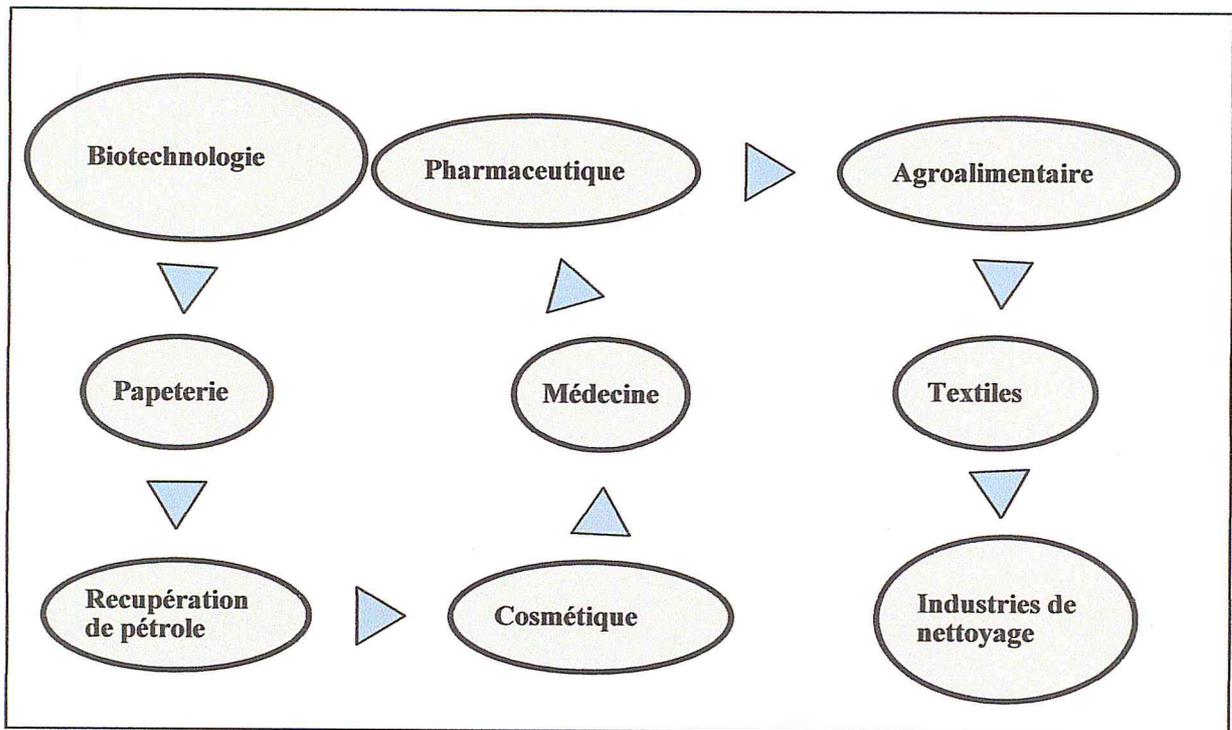


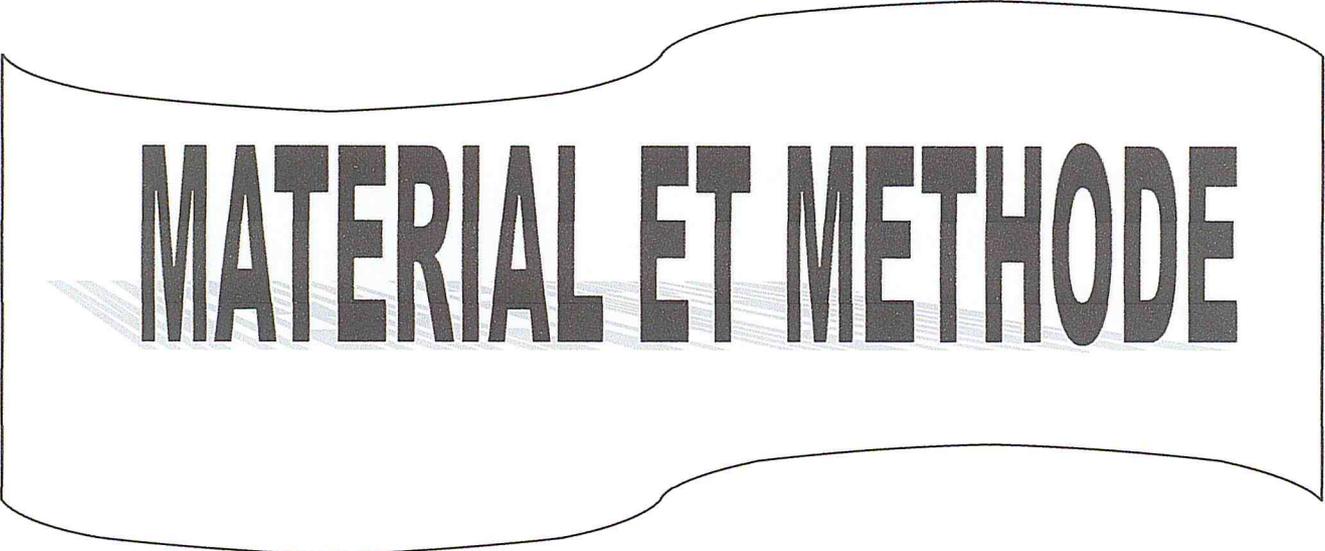
Figure (11) : Domaine d'application des biosurfactants .

Ils ont utilisés pour la formation d'émulsion et la dispersion, agent de solubilisation, agent moussant et comme épaississant. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, antitumeur et antimycoplasique.

Tableau .3. Utilisation des biosurfactants .

Type de biosurfactant	Fonction	Domaine d'application	Référence
<p>Glycolipides <u>Rhamnolipides</u> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>sp</i></p>	<p>Agent de solubilisation, Métal isolant agent, Emulsifiant Agent dépollution Activité antifongique</p>	<p>Bioremediation, traitement des déchets et récupération pétrolière, peinture et produits alimentaires (les huiles végétales). Pharmaceutique et fabrication des produits hygiène.</p>	[49,50]
<p><u>Sophorolipides</u> <i>Candida</i> <i>Bombicola ATCC 22214</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Torulpsis bombicola</i> KSM35</p>	<p>Emulsifiant et dispersant Mobilisation pétrolière Détergent Nettoyeur Conservation d'humidité Agent de pénétration</p>	<p>Cosmétique, peintures, fabrication des agents de surfaces Récupération assistée au pétrole Pharmaceutique et textiles Produits d'hygiène</p>	[49 ; 50]
<p><u>Tréhalose lipides</u> <i>Rhodococcuss sp</i> <i>Tsakamurella sp</i> <i>Arthrobactersp.</i> EK 1</p>	<p>Bioremediation Propriétés antimicrobiennes</p>	<p>Amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures. Pharmaceutiques</p>	[49 ; 50]
<p><u>Lipopeptides</u> Surfactin iturin/fengycine <i>Bacillus subtilis</i></p>	<p>Agent Antimycoplasmique Antifongique et antitumer et Antivirale</p>	<p>Pharmaceutique et amélioration de dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques.</p>	[49 ,50]
<p><u>Lipides</u> <i>Candida sp</i></p>	<p>Emulsifiant et dispersant antiantimicrobienne</p>	<p>Cosmétique, agroalimentaires Pharmaceutique, contrôle biologique et phytopathogène</p>	[49,50]

CHAPITRE : 2



MATERIAL ET METHODE

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1 Origine et isolement de la souche bactérienne 1C

Le biotope utilisé, pour isoler la souche bactérienne aérobie hydrocarbonoclaste, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messoud (sud d'Algérie). La figure (12) représente le biotope utilisé pour l'isolement.

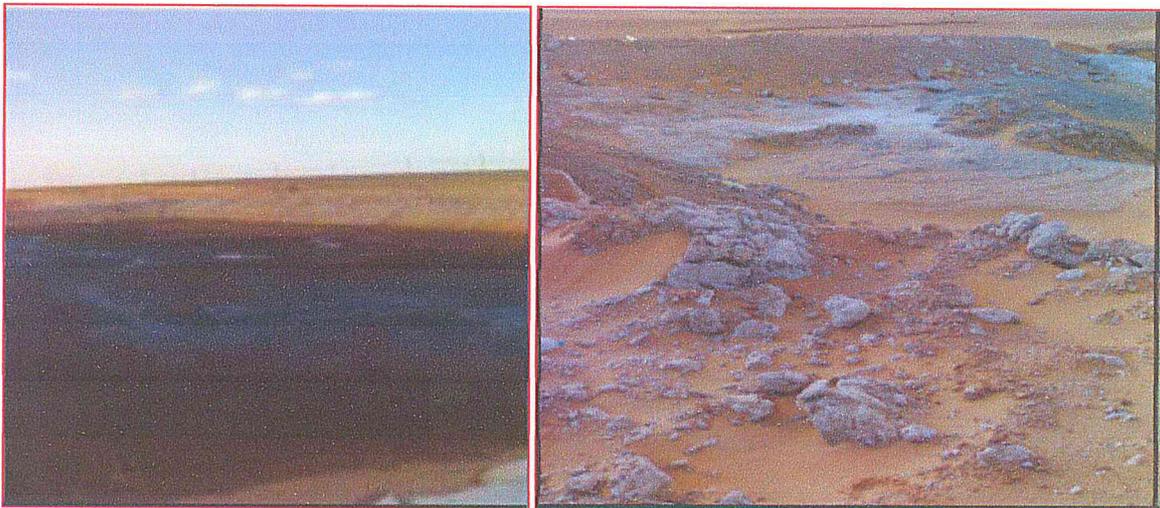


Figure (12) : Sols contaminés par le pétrole (Hassi-Messaoud) utilisé pour l'isolement de la souche bactérienne 1C. [51]

2.2 Isolement de la souche bactérienne

Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées dans le cadre de travaux de thèse de doctorat de Mr. Eddouaouda (2012) (voir annexe I).

2.3 Repiquage des souches et préparation des précultures

Repiquage: Les souches bactériennes utilisées dans cette étude (cinq boîtes) ont été repiquées etensemencé sur milieu solide (Gélose nutritif) en boîtes de Pétri. Après l'incubation à 45 °C pendant 24 heures, les souches sont conservées à 4 °C.

Préculture: La préparation d'un milieu Luria-Bertani (LB) liquide 50 ml dont la composition (g/l) est :10 g de peptone ,5 g de l'extrait de levure et 10 g de NaCl. Après l'ajustement du pH à $7,0 \pm 0,2$; suivie par la stérilisation par autoclavage à 120 °C pendant

20 min. La préculture a été obtenue par incubation à 45 °C pendant 24 h et sous agitation (150 tr /min).

2.4 Préparation des milieux de production

On utilise trois milieux différents, le milieu LB et les milieux MSM1 et MSM2 (milieux à base de sels minéraux).

Le milieu MSM1 est (g/l) : K₂HPO₄ (0.8), KH₂PO₄ (0.2), CaCl₂ (0.05), MgCl₂ (0.5),

FeCl₂ (0.01) NaCl (5) NH₄Cl (0.4 g/l). La composition du milieu MSM2 est (g/l) : NH₄Cl (0,4), K₂HPO₄ (0,3), KH₂PO₄ (0,3), NaCl (10), MgCl₂ (0,33), CaCl₂ (0,05) et 1 ml de la solution d'oligoéléments.

Après l'ajustement du pH à 7,0 ± 0,2, les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20 min.

2.5 Production de biosurfactant

Le glycérol (2%) ,huile de moteur usagé (1%) et gasoil (1%) sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie.

Ces expériences ont été réalisées dans des flacons de volume 180 ml contenant 100 ml de milieu. Ce milieu liquide est inoculé à 2 % d'une préculture bactérienne. L'incubation s'effectue à 45 °C sous agitation 150 tr /min pendant 48 h pour le milieu MSM1 et MSM2 et après 24 h pour LB. Le suivi de croissance par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

2.6 Techniques de mesure de production de biosurfactant

La diversité d'application de biosurfactant conduit à des méthodes faciles et fiables, dans cette partie de l'étude nous avons utilisé la souche thermophile *Paenibacillus popilliae*.

L'évaluation de la production a été réalisée par la mesure de la tension de surface, l'indice d'émulsification (E24) et le test de déplacement du pétrole (DDP).

▪ Mesure de la tension de surface

La mesure de la tension de surface a été réalisée par l'utilisation d'un tensiomètre (GIBERTINI TSD 132389, Italie), qui détermine la tension de surface ou interfaciale à l'aide d'une sonde idéale, permettant un mouillage parfait quels que soient les liquides étudiés. Le périmètre de mouillage de la sonde étant parfaitement défini et connu (longueur

de la lame), nous pouvons utiliser la force mesurée pour calculer la tension de surface ou interraciale.

Vingt (20) ml de culture ont été prélevés et centrifugés (4000 tr/mn pendant 20 min). Le surnageant de culture est filtré à travers un papier filtre Wattman avant d'effectuer la mesure de la tension de surface.

▪ Mesure de l'activité émulsifiante

La mesure de l'activité émulsifiante a été décrite par Cooper et Goldenberg[52] afin de vérifier la capacité de la souche à émulsionner des substrats hydrophobes par rapport à une phase hydrophile (la solution de biosurfactant).

On mélange un volume de 2 ml de culture avec un 2 ml de substrat hydrophobe, puis agiter au vortex pendant 2 min et laisser au repos pendant 24 h à température ambiante. L'indice d'émulsification (E_{24}) est calculé comme suit [53] :

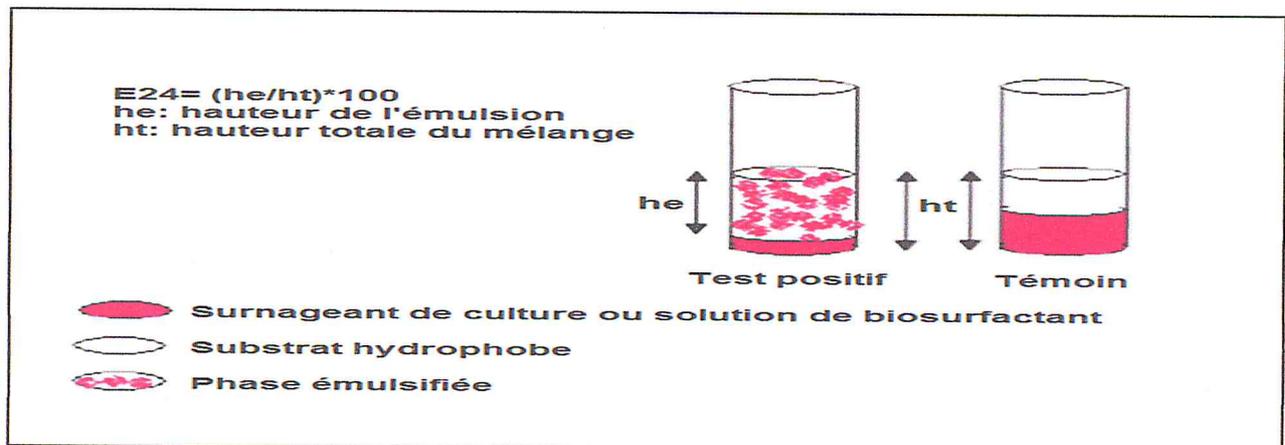


Figure (13) : Schéma représentatif de test d'émulsification.

▪ Test de déplacement de l'huile

Le test de déplacement est décrit par Morikawa *et al.* [54], avec quelques modifications. Un (01) ml de pétrole brut est étalé sur toute la surface d'eau distillé (25 ml) remplissant une boîte de Pétrie (90 mm de diamètre). Par la suite, 200 μ l de sur surnageant ont été déposés doucement au centre de la couche d'huile, entraînant la formation d'un halo claire. Le diamètre de cercle ainsi formé est mesuré en cm.

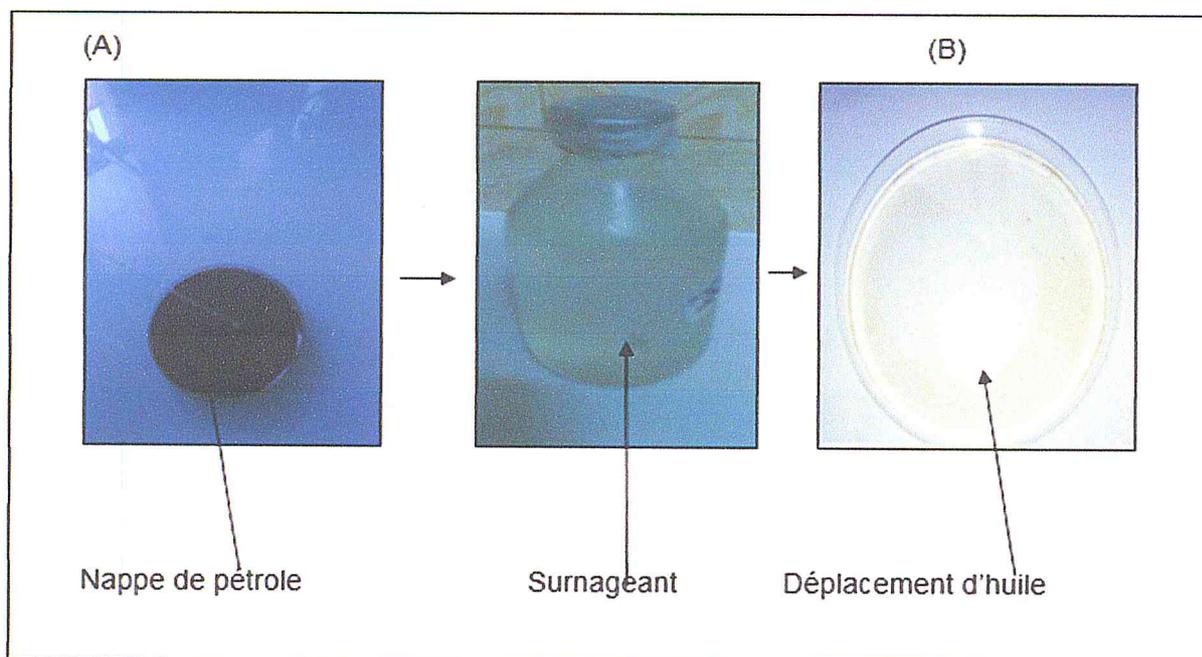


Figure (14) : Méthode de déplacement de l'huile. Couche huileuse du pétrole noir. **(B) :** Effet de l'ajout d'un biosurfactant sur la couche de pétrole (formation de l'un halo clair).

2.7 Extraction du biosurfactant

Généralement, l'extraction du biosurfactant est utilisée pour éliminer les composés hydrophiles qui constituent le produit. Les solvants individuels ou mixtes les plus employés sont : Acétate d'éthyle, chloroforme/méthanol (2/1), butanol, hexane et acide acétique [55].

L'extraction a été effectuée après 24 h d'incubation lorsque la production est maximale dans le surnageant (prouvée par la mesure de TS et DDP), pour le milieu LB et 48 h pour les milieux MSM, le milieu de culture a été centrifugé à 4000 tr /min pendant 20 min afin d'éliminer la biomasse.

Ce dernier est filtré et acidifié à un $\text{pH} = 2$ avec la solution d' HCl (3 N). Ensuite, il est laissé au repos une nuit à 4°C .

L'extraction a été réalisée en utilisant le solvant l'acétate d'éthyle (v/v). La phase organique ainsi obtenue contenant le biosurfactant, séchée par l'évaporateur rotatif à 45°C .

2.8 Etude de la stabilité des biosurfactants

Les paramètres étudiés sont : la température, le pH et la salinité en mesurant la TS.

- **Stabilité chimique**

Le pH du surnageant a été ajusté à différentes valeurs (3, 5, 7,9 et 11) en utilisant des solutions HCl ou NaOH. Pour examiner également l'effet de la salinité, le surnageant a été soumis à différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) : 10, 30, 100, et 150 g/l. Les solutions sont laissées à la température ambiante pendant 24 h avant de mesurer la TS.

- **Stabilité thermique**

Afin d'évaluer la thermostabilité des biosurfactants, le surnageant a été incubé à différentes températures : 4, 30, 50, 70 et 120°C pendant 24h.

2.9 Caractérisation structurale du biosurfactant

Les biosurfactants GLY-LB, GLY-MSM1 et GLY-MSM2 sont analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, série 8400, Shimadzu, Japon) en balayant dans la gamme de 500 -4000 cm^{-1} à une résolution de 4 cm^{-1} .

CHAPITRE : 3



RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 3

RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Production de biosurfactant par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C

Plusieurs travaux ont montré la capacité des souches hydrocarbonoclastes à produire des biosurfactants en utilisant différents sources de carbone.

Les travaux de Mnifet *al.* [56] ont montré que *Halomonas* sp. C2SS100 est capable de dégrader les hydrocarbures dans des conditions extrêmes de salinité. Cette dégradation est associée à la production de biosurfactant. Ganesh et lin [57] ont signalé que *Paenibacillus* sp. Est capable de dégrader le gasoil en produisant de biosurfactant. Egalement, Joo et Kim, 2013) [58] ont prouvé que *Bacillus subtilis* JK-1 pouvait croître sur le pétrole brut avec production de biosurfactant.

La souche 1C utilisée dans la présente étude a été isolée en se basant sur sa capacité de dégrader les hydrocarbures, cette souche est capable de dégrader efficacement les HAP (Mesbaiah et al.) [59], et de produire de biosurfactant en utilisant les HAP et les huiles comme source de carbone.

Les résultats obtenus par Mesbaiah et al. [60] montrent que la souche 1C produit un biosurfactant très efficace après 24h d'incubation en utilisant l'huile d'olive comme substrat avec une réduction de la tension de surface jusqu'à 33.2 mN/m. La souche 1C, utilisée dans cette étude, est considérée comme hydrocarbonoclaste productrice de biosurfactant.

3.2 Effet de la composition du milieu sur la production de biosurfactant

La production de biosurfactant est influencée par la composition du milieu, trois source de carbone ont été utilisées : le gasoil, le glycérol et l'huile de moteur usagée.

Trois milieux ont été testés à savoir : milieu LB (milieu riche), milieu MSM1 (milieu minimum à base des sels minéraux) et le milieu MSM2 (milieu minimum à base des sels minéraux plus ETM), la composition de trois milieux est donnée dans la partie matériel et méthodes.

3.2.1 Production de biosurfactant sur le milieu LB

La croissance de la souche 1C sur les trois substrats ainsi que la production de biosurfactant ont été suivies.

Les résultats obtenus (Figures 15-grf17) montrent une bonne croissance de la souche 1C sur le gasoil et le glycérol, alors qu'une faible croissance a été observée sur l'huile de moteur usagée.

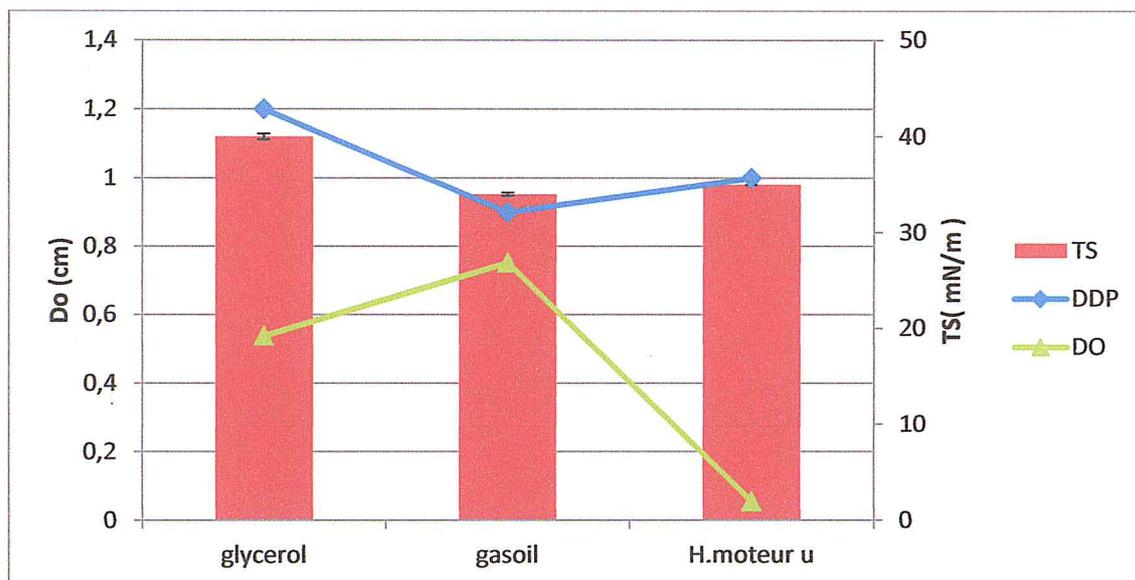


Figure (15) : production de biosurfactant par la souche 1C sur le milieu LB.

Le diamètre de déplacement de pétrole (DDP) est de 0.9, 1.2 et 1 cm pour le gasoil, le glycérol et l'huile de moteur usagée respectivement. Une réduction de la tension de surface a été observée dans les trois milieux, le maximum est enregistré avec le gasoil (34 mN/m) suivi par l'huile de moteur usagée (35 mN/m).

3.2.2 Production de biosurfactant sur le milieu MSM1

La croissance la souche 1C sur les trois substrats ainsi que la production de biosurfactant ont été suivies.

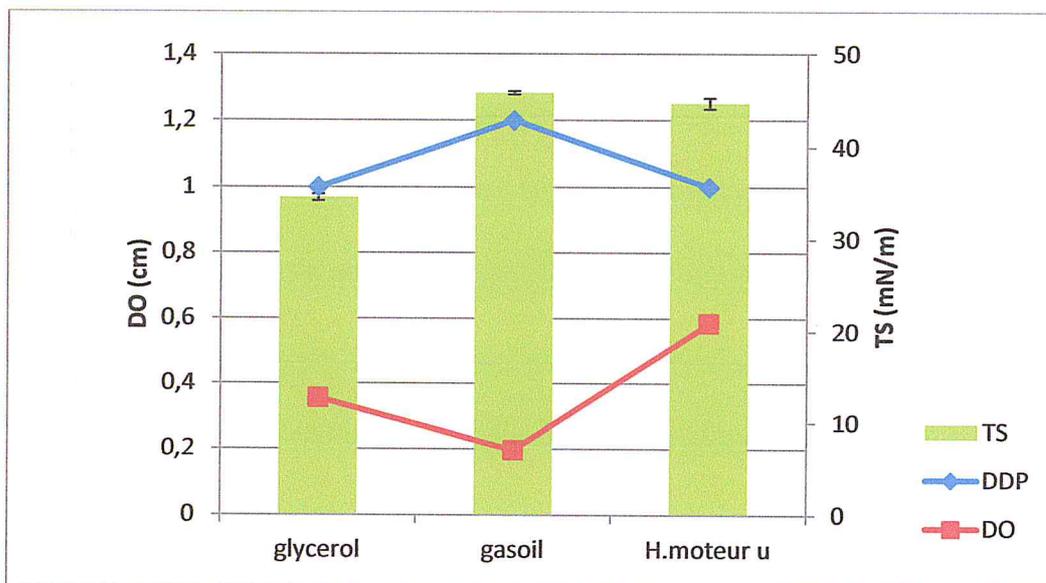


Figure (16) : production de biosurfactant par la souche 1C sur le milieu MSM1.

Les résultats obtenus (Figures 15-17) montrent une croissance de la souche 1C sur les trois substrats, le maximum de croissance a été enregistré avec l'huile de moteur usagée.

Cette croissance est moins importante en la comparant avec celle enregistrée sur le milieu LB, le diamètre de déplacement de pétrole enregistrée est proche à celui enregistré sur le milieu LB pour les trois substrats. La réduction de la tension de surface est moins importante pour le gasoil et l'huile de moteur (TS= 44 et 51 mN/m pour le gasoil et l'huile de moteur usagée respectivement). La faible tension de surface enregistrée est lorsque le glycérol est utilisé comme substrat (TS=37 mN/m).

3.2.3 Production de biosurfactant sur le milieu MSM2

La croissance la souche 1C sur les trois substrats ainsi que la production de biosurfactant ont été suivies.

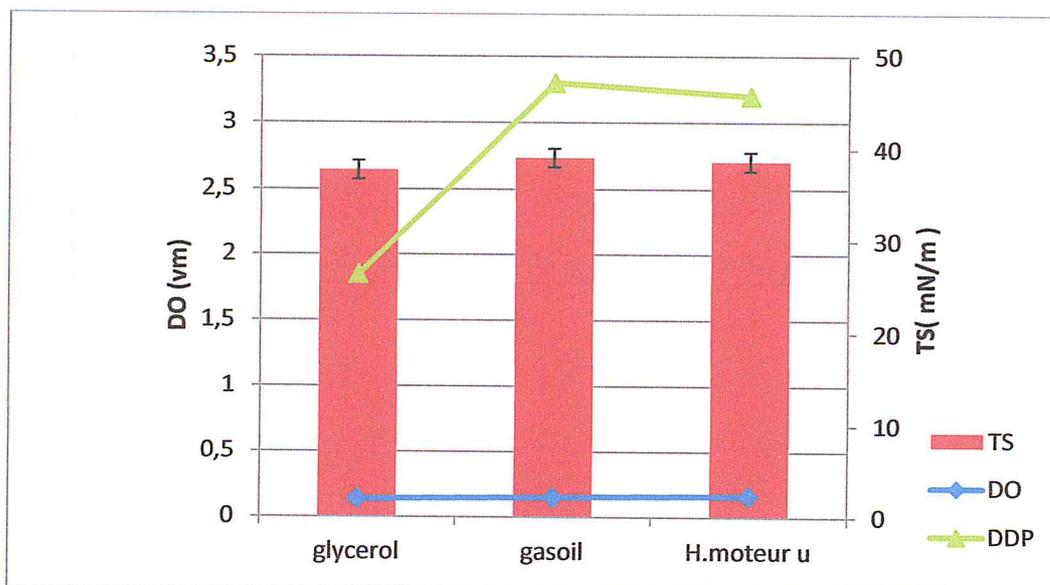


Figure (17) : production de biosurfactant par la souche 1C sur le milieu MSM2

Les résultats obtenus (Figures 15, 16,17) montrent une diminution dans la croissance de la souche 1C sur les trois substrats en comparaison avec le milieu LB et le milieu MSM1. Concernant la production de biosurfactant, ces résultats montrent un diamètre de déplacement de pétrole très important avec le gasoil (3.3 cm) et l'huile de moteur usagée (3.2 cm) alors que celui de glycérol est de 1.85 cm. Les valeurs de la tension de surface enregistrées sont proches et varient de 37.7 à 39.1 mN/m. la faible valeur est enregistrée avec le glycérol comme substrat.

Les résultats obtenus montrent que la production de biosurfactant par la souche 1C est affectée par la composition de milieu et que les ETM ont un effet positif sur la production.

Pour le gasoil et l'huile de moteur, la production de biosurfactant est importante sur le milieu LB, alors que la production de biosurfactant en utilisant le glycérol comme substrat est importante dans les milieux MSM.

Les biosurfactants sont synthétisés par les microorganismes (notamment les hydrocarbonoclastes) en utilisant plusieurs sources de carbone, généralement les hydrocarbures, les carbohydrates et les huiles végétales (Banat *et al.*) [61].

Thavasi *et al.* [62] ont rapporté la production du biosurfactant par *Corynebacterium. Kutscheri* en utilisant l'huile de moteur usagée comme substrat.

La souche *Trichosporonasahi* utilise le gasoil comme substrat pour produire un biosurfactant selon Chandran *et al.* [63]. De même, Ganesh et lin [57] ont signalé que *Paenibacillus sp.* est capable de dégrader le gasoil en produisant de biosurfactant.

Pseudomonas aeruginosa produit un biosurfactant en utilisant le glycérol comme source de carbone et le chlorure d'ammonium comme source d'azote. La production est optimale après 96 h d'incubation à 45°C [64]. Nitschke et al. [65] ont rapporté que une production de biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* durant la croissance de la souche sur le glycérol en milieu LB.

3.3 Etude de la stabilité des biosurfactants

L'application des biosurfactants dans plusieurs domaines dépend de leur stabilité dans différentes conditions environnementales. La stabilité des biosurfactant a été testée sur une large gamme de température, de pH et de salinité.

3.3.1 Stabilité vis-à-vis le pH

Les résultats sont regroupés sur les figures (18-20).

- **Le gasoil comme substrat**

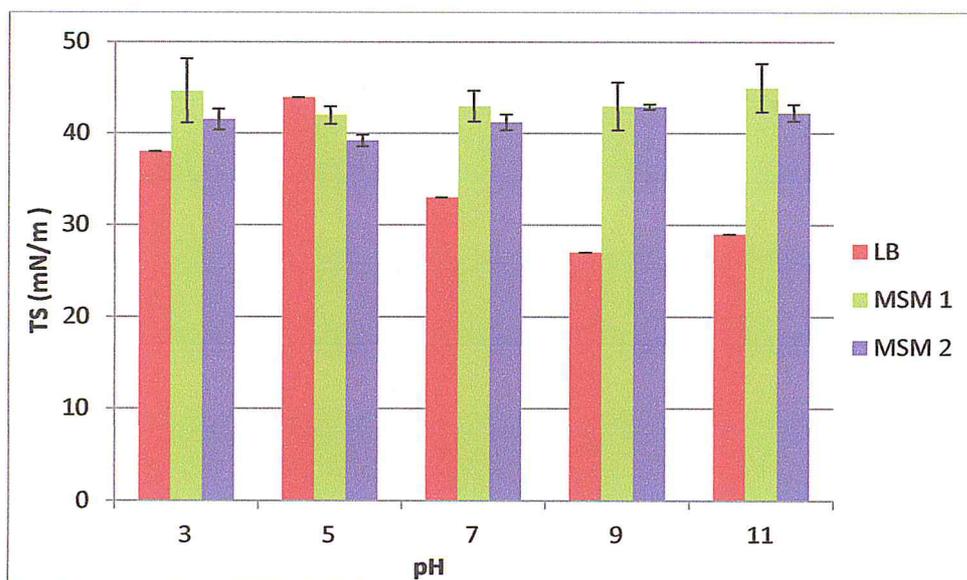


Figure (18) : Influence de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant (Gasoil).

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant GAS-LB est moins stable au changement du pH, une augmentation de la tension de surface a été enregistrée dans les milieux acides. Bien que la TS est élevée par rapport au milieu LB. Les biosurfactants GAS-MSM1 et GAS-MSM2 sont plus stables vis-à-vis le changement du pH.

▪ **Le glycérol comme substrat**

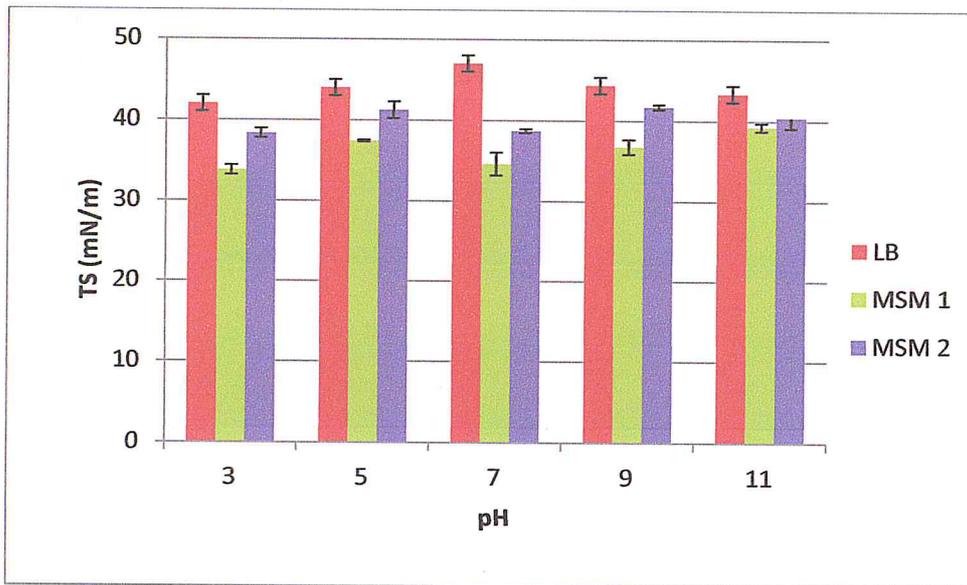


Figure (19) : Effet de variation du pH sur la stabilité du biosurfactant (Glycérol).

Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants produits en utilisant le glycérol sont plus stables au changement du pH, une légère augmentation de la tension de surface a été enregistrée à pH = 3 pour le biosurfactant GLY- MSM2.

▪ L'huile de moteur usagée comme substrat

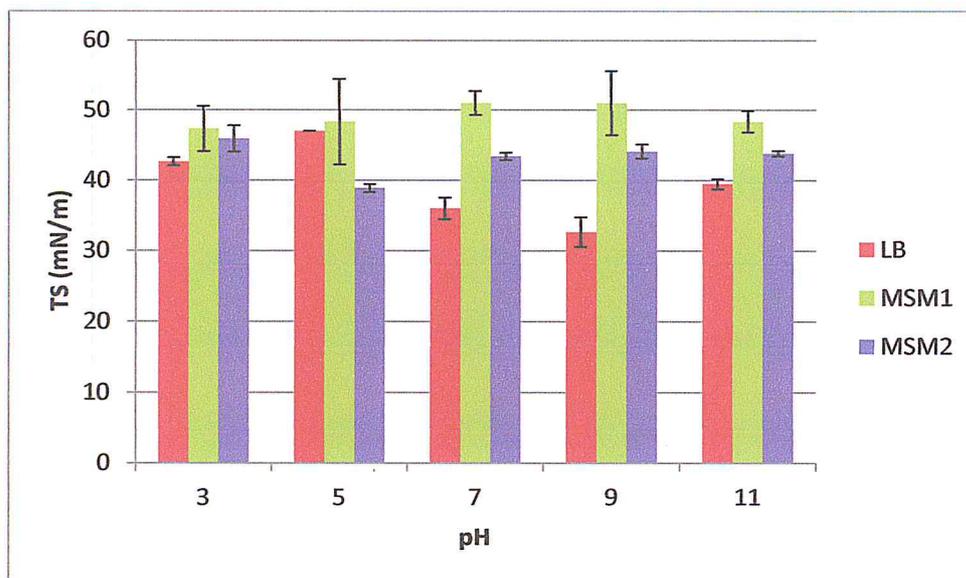


Figure (20) : Effet de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur usagée).

Les résultats obtenus montrent que le biosurfactant HMU-LB est moins stable dans les pH acides où une augmentation de la tension de surface a été observée. Par contre les biosurfactants HMU-MSM1 et HMU-MSM2 sont stables au changement de pH, on enregistre une légère augmentation à pH 3 et 9 pour le biosurfactant HMU-MSM2.

Plusieurs études ont montré la stabilité des biosurfactants vis-à-vis le changement du pH, le biosurfactant produit par la souche *P. macerans* TKU029 reste stable sur une large gamme du pH (3-11) [57].

Haddad *et al* [64] ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN/m. Khopade *et al.* [66] ont aussi rapporté l'instabilité de biosurfactant produit par *Nocardioopsis* sp. B4 dans les milieux acides. Cette instabilité peut être due à la précipitation du biosurfactant en milieu acide.

3.3.2 Stabilité thermique :

Les résultats obtenus sont regroupés sur les figures (21-23).

▪ Le gasoil comme substrat

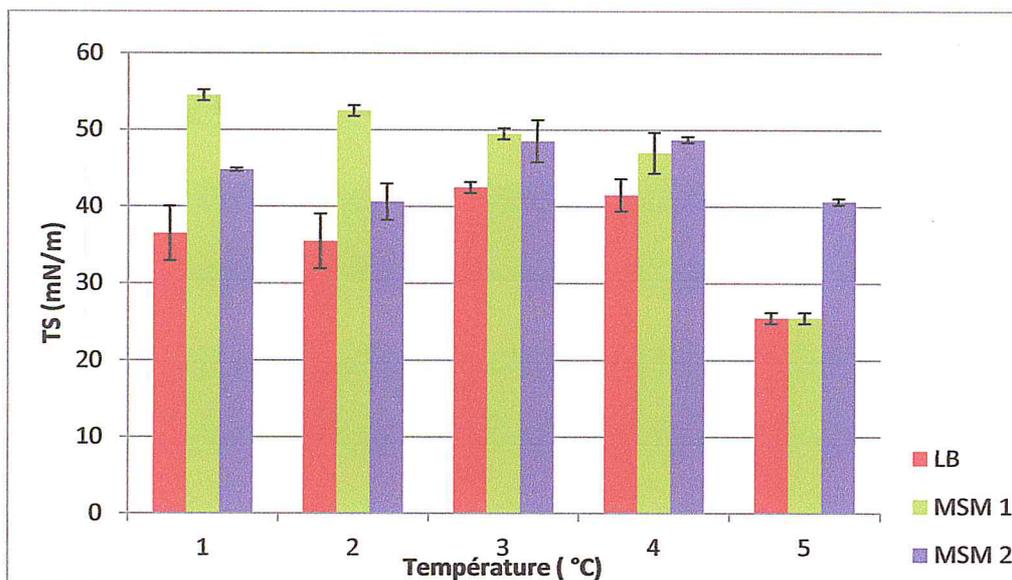


Figure (21) : Influence de la variation de la température sur la stabilité du biosurfactant de la souche 1C (Gasoil).

Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants GAS-LB et GAS-MSM2 sont moins stables dans les températures élevées, alors que le biosurfactant GAS-MSM1 est plus sensible à la diminution de la température. La tension de surface augmente jusqu'à 54 mN/m à T= 4°C.

▪ Le glycérol comme substrat

D'après les résultats, on remarque une légère augmentation de la tension de surface mais on peut dire que les biosurfactants GLY-MSM1 et GLY-MSM2 sont stables vis-à-vis le changement de la température. Le biosurfactant GLY-LB est le plus sensible au changement de température, la tension de surface augmente avec l'augmentation de la température.

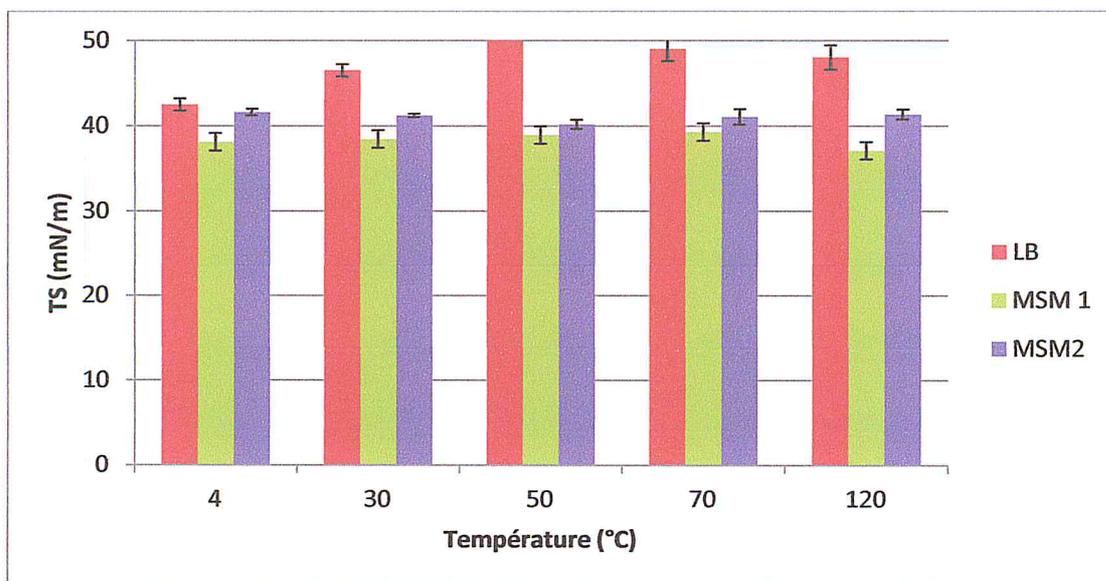


Figure (22) : Effet de variation de la température sur la stabilité du biosurfactant (Glycérol).

Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants GLY-MSM1 et GLY-MSM2 sont thermostables alors que le biosurfactant GLY-LB est sensible à la variation de la température.

- **L'huile de moteur usagée comme substrat**

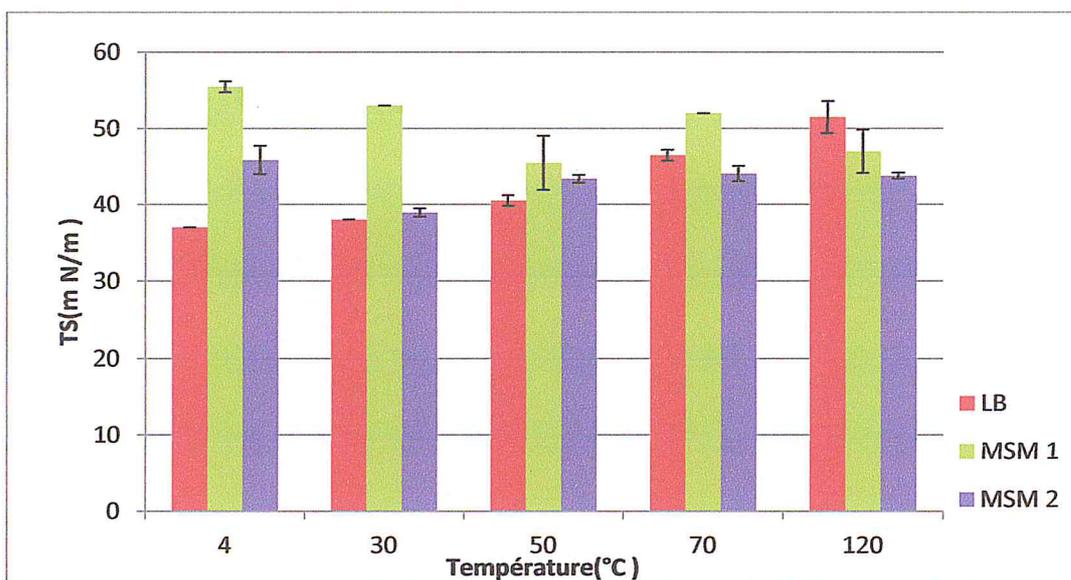


Figure (23) : Effet de la température sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur usagée).

Les résultats obtenus montrent que biosurfactant HMU-LB est moins actif dans les températures supérieures à 50°C. Alors que les biosurfactants HMU-MSM1 et HMU-MSM2 sont sensibles à la variation de la température, la tension du surface augmente avec l'augmentation et la diminution de la température.

Plusieurs travaux ont rapporté la stabilité thermique des biosurfactants, Makkar et Cameotra [67] ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C. Le biosurfactant produit par *P. macerans* TKU029 est stable dans un intervalle de température (4–70 °C) [57].

3.3.3 Stabilité vis-à-vis la salinité

L'influence de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par la souche 1C a été étudiée.

▪ Le gasoil comme substrat

Les résultats obtenus (Figure 24) montrent que les biosurfactants GAS-MSM1 et GAS-MSM2 sont stables à la variation de salinité, par contre le biosurfactant GAS-LB est sensible à la variation de salinité. Le biosurfactant GAS-MSM2 est le plus efficace.

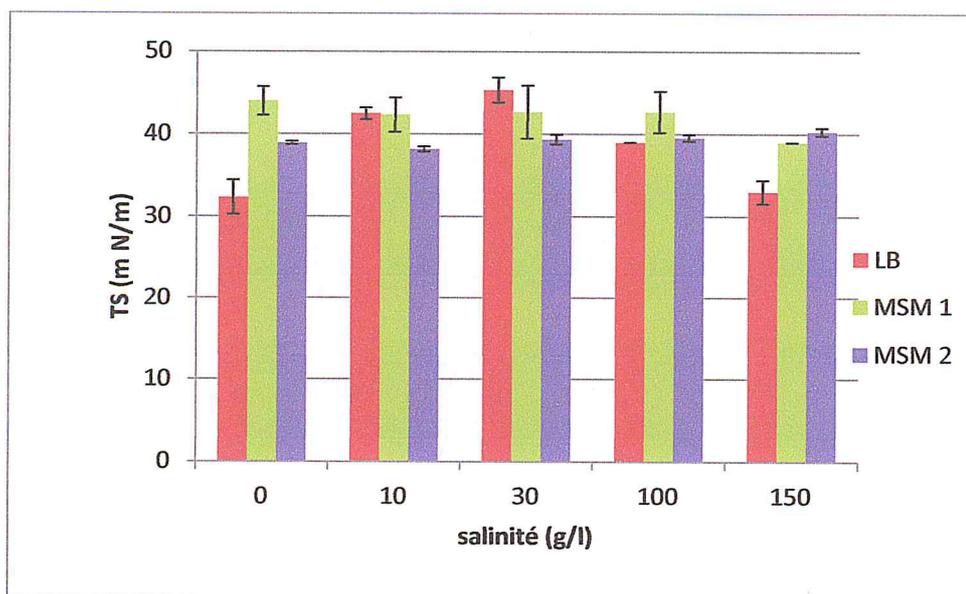


Figure (24) : Influence de la variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Gasoil).

▪ **Le glycérol comme substrat**

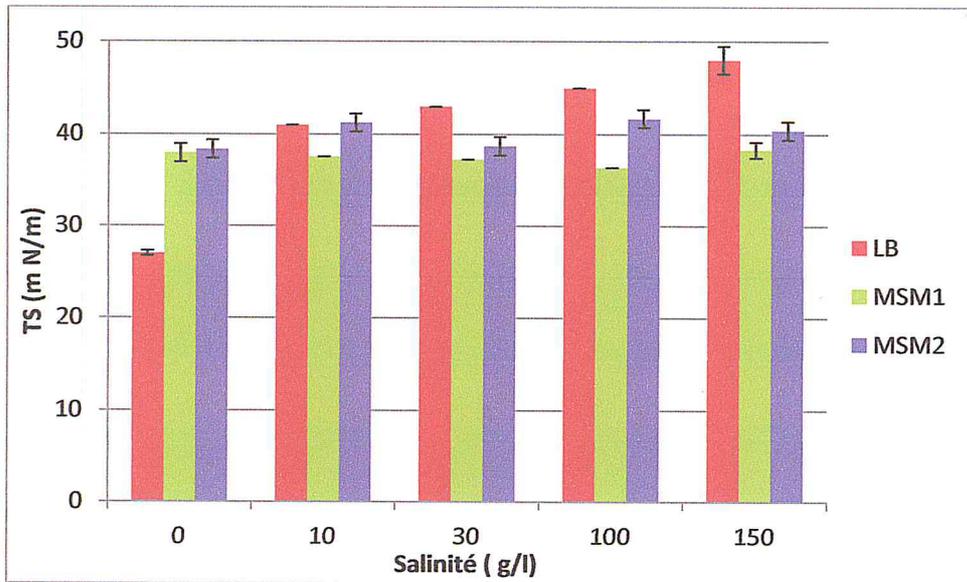


Figure (25) : Effet de variation de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Glycérol).

D'après les résultats (Figure 25), le biosurfactant GLY-LB n'est pas stable dans les milieux salins. Les biosurfactants GLY-MSM1 et GLY-MSM2 sont stables à la variation de la salinité.

▪ **L'huile de moteur usagée comme substrat**

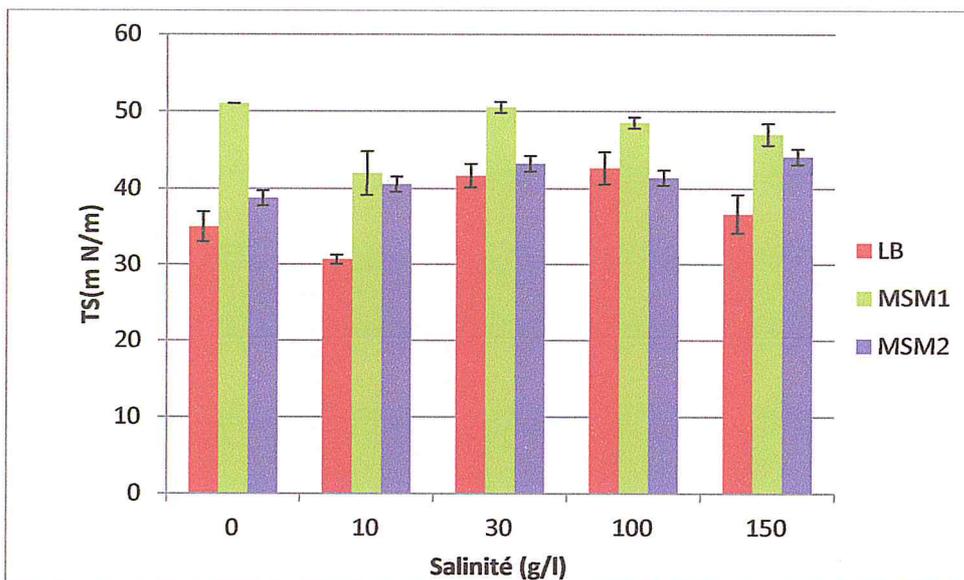


Figure (26) : Effet de la salinité sur la stabilité du biosurfactant (Huile de moteur usagée).

Les biosurfactants HMU-LB et HMU-MSM1 sont sensibles à la variation de salinité, la tension de surface augmente lorsque la salinité du milieu augmente. Le biosurfactant HMU-MSM2 est stable jusqu'à une salinité de 100 g/l, au-delà de cette valeur la tension de surface augmente et le produit perd son efficacité.

Selon Desai et Banat [2] des concentrations en sel supérieures à 20 g/l sont suffisantes pour inactiver les tensioactifs synthétiques. Le biosurfactant produit par *Paenibacillus macerans* TKU029 conserve sa stabilité pour des salinités < 5% [57]. Le biosurfactant produit par la même souche en utilisant l'huile d'olive comme substrat garde son activité pour des salinités arrivant à 200 g/l [60].

Le biosurfactant, produit par *Pseudomonas aeruginosa* RS29 en utilisant le glycérol comme source de carbone, garde son activité dans un intervalle de salinité de 20 à 100 g/l [68].

3.4 Extraction de biosurfactant

Parmi les trois substrats utilisés, le glycérol présente les résultats les plus importants (réduction de la TS et stabilité). Les biosurfactants produits par la souche 1C en utilisant le glycérol sur les trois milieux ont été récupérés après extraction par l'acétate d'éthyle. Les résultats obtenus sont regroupés sur le tableau (4) :

Milieu	LB	MSM 1	MSM 2
Aspect	Liquide visqueux (coloration crevât)	Liquide jaune visqueux marron	– Liquide visqueux jaune
			
Rendement	3,94g/l	3,84 g/l	13,3 g/l

On remarque que l'aspect des biosurfactants est différent (selon le milieu) et le rendement est proche pour les milieux LB et MSM1, alors que le rendement le plus important est enregistré pour le milieu MSM2.

Des résultats similaires ont été rapportés par Arino *et al.*[69], un rendement de 3.5 g/l a été enregistré pour le biosurfactant produit par *Pseudomonas* sp. En utilisant le glycérol

comme substrat. Rahman *et al.* [67] ont enregistré un rendement de 1.77 g/l par la souche *Pseudomonas aeruginosa*. Alors qu'un rendement plus important de 8.05 g/l par *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant le glycérol a été enregistré par Nitschke *et al.* [65].

3.5 Caractérisation préliminaire des biosurfactants

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans les biosurfactants produits par la souche 1C et donc de prédire leurs structures. Les spectres d'infrarouge obtenu pour le biosurfactant produit par le glycérol comme source d'énergie et carbone sont regroupés sur la figure 27.

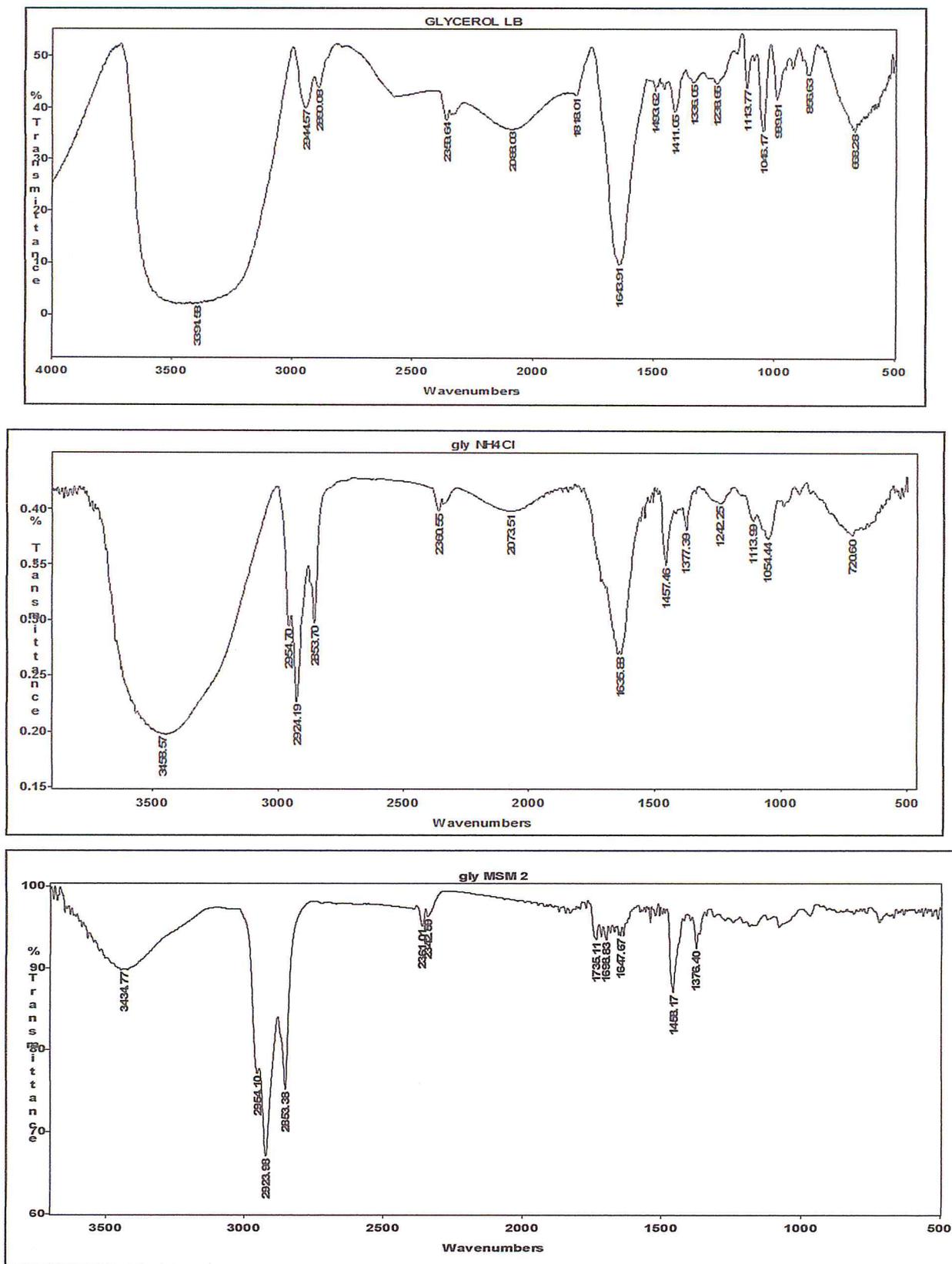


Figure (27) : Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche 1 C en utilisant le Glycérol (a : milieu LB, b : milieu MSM1, c : milieu MSM2).

On remarque que la présence de ces bandes dans les trois spectres :

- Les bandes situées à 3400, 3434.75 et 3478.88 cm^{-1} variables et fines correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons O-H dans les alcools.
- Les bandes situées à 2948.43 ; 2923.98 et 2924,37 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons -C-H dans les alcanes (-CH₃ et -CH₂-).
- Les bandes situées à 2893.07 ; 2853.38 ; 2853.80 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation des liaisons (-CH₂-) ou (-CH-) aliphatique.
- Les deux pics d'élongations situées à 1113.75 et 1238.97 cm^{-1} sont affectés aux liaisons de C-O dans les alcools.
- Deux bandes intenses situées à 1643.86 et 1646.14 cm^{-1} résultent probablement des vibrations d'élongation des liaisons C=C dans alcènes ou des liaisons C=O dans les acides carboxyliques (élongation forte).
- Les trois pics situés à 1410.58 et 1457.46 et 1458.06 cm^{-1} résultent de vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcanes.
- Les deux bandes 1045.95 et 1055.02 cm^{-1} sont probablement dues aux vibrations déformation des liaisons C-O dans les alcools secondaires C-O-C dans les éthers.
- Le pic situé à 853.98 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation des liaisons C-H dans les alcènes (C=C).

D'après ces observations, le biosurfactant de la souche 1C est probablement de nature glycolipidique (combinaison entre les glucides et chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques). Cependant, d'autres types d'analyses sont nécessaires pour une identification plus détaillée, telles que les analyses biochimique (identification des lipides, glucides et protéines) et LC-MS (détermination de la masse moléculaire du produit et des masses des fragments (ions) et RMN.

Des résultats similaires ont été rapportés par Saikia *et al* [68] et Nitschke *et al* [65] où les biosurfactants produit par les souches *Pseudomonas* sp en utilisant le glycérol comme substrat sont de nature glycolipidique.

Conclusion

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude de la production des biosurfactants issus d'une souche hydrocarbonoclaste rattachée à l'espèce *Paenibacillus popilliae* isolée à partir d'un sol contaminé par pétrole brut de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie).

Les résultats obtenus ont révélé que la composition du milieu influe sur la production de biosurfactant par la souche 1C. Les trois substrats testés : le gasoil, le glycérol et l'huile de moteur usagée peuvent être utilisés par la souche 1C pour produire des biosurfactants.

La comparaison de la production de biosurfactant en différents milieux a montré que la production est maximale en milieu MSM lorsque le glycérol est utilisé comme substrat alors que la production est maximale en milieu LB pour le gasoil et l'huile de moteur usagée.

L'étude de la stabilité a montré que les biosurfactants produits en utilisant le gasoil, et l'huile de moteur usagée comme substrats perdent leurs activités dans les conditions extrêmes de la température, pH et salinité, seul le biosurfactant produit en utilisant le glycérol qu'est stable dans ces conditions.

Le rendement de production et l'aspect de biosurfactant dépend de la composition du milieu, l'analyse structurale a montré que le biosurfactant produit par la souche 1C en utilisant le glycérol est un glycolipide.

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

- Etude d'autres caractéristiques de biosurfactant issu de la souche thermophile 1C comme l'activité antimicrobienne et la détermination de la concentration micellaire critique (CMC),
- Utilisation d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et LC-MS) pour caractériser structurellement le biosurfactant,

الحمد لله الذي تمت بنعمته الصالحات

Références bibliographiques

- [1] Mulligan, C.N, 2005, Environmental application for biosurfactants. Environ Pollut 133(2) :183-198.
- [2] Dessai J.D et bannatIM ,(1997).Microbial production of surfactant and their commercialpotencial . Microbiology and Molecular biology Review (61) 1 :47-64.
- [3] Rahman ,A et C.W.Brown.1983.Effet of PH on the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate .Journal of applied polymer science 28 (4) : 1331-1334.
- [4] Kosaric ;N .1992.biosurfactants in industry pure .Applied chem 64(11) :1731-1737
- [5] Puisieux .F.Seiller M. "Les systèmes disperses" : Agent de surface et émulsion ,Edition ,Tec et Doc –Lavoisier (1983).
- [6] Healy M. G., Devine C. M. and Murphy R., "Microbial production of biosurfactants", Resources, Conservation and Recycling, 18, (1996), 41 - 57.
- [7] Lin ;S-C.1996.Biosurfactants : Recent Advances.J. chem Tech Biotechnol 66:109-120.
- [8] Becher ,P.1965.Emulsion ;Theory and Practice Newyork ; Rheinhold Publishing .
- [9] Mulligan C.N. 'Environmental application for biosurfactants'. Environmental Pollution, 133 (2005) 183 – 198.
- [10] Parra J. L., Guinea J., Manresa M. A., Robert M., Mercadé M. E., ComellesF. and Bosch M. P., "Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants", J.A.O.C.S., 66 (1), (1989), 141 - 145. .
- [11] Ferhat.S ,La production de biosurfactant par des souches de *Brevibacterium* et *Ochrobactrum* isolées localement a partir d'un sol contaminé par le pétrole brut - Thèse de Doctorat – 2012 .
- [12] Lang S ,Wagner F .Structure and propeties of biosurfactant.InKosaricN;carinsWL,Gray NCC eds ;Biosurfactant and biotechnology .New York .Marcel Dekker ; in 1987 : 21-47 .

- [13] Maier RM .Biosurfactant :Evolution and diversity in bacteria. Ad ApplMicrobiol2003 ; 52:101-121.
- [14] Kim HS;Lim EJ; Lee SO et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardiasp.L-417*. BiotechnolApplBiochem 2000;31:249-253
- [15] Thèse de Doctorat – Ferhat.S, chimie industrielle La production de biosurfactant par des souches de *Brevibacterium* et *Ochrobactrum* isolées localement à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut; Caractérisation et application en vue d'une dépollution ;université de Blida ;Année 2012 .
- [16] Benissa M; Abalos ;diveria I et al . chemical structure ,surface proprietes and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*; LBI from soapstock ; Antoine Van Leeu – Wenhoeck 2004 ;85:1-8 .
- [17] DessaiJD.Bannat .Microbial production of surfactants and their commercial potential .Microbial Mol .Bio Rev 1997;61:47-64 .
- [18] Cooper DG ; Liss SN ; Longay R et al ; Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas* .J FermetTechnol 1989 ; 59:97-101.
- [19] Kretschmer ; A ; Bock ; H.et Wagner F ; Chemical and physical characterization of interfacial active lipids from *Rhodococcus* grown on n-alkane ; Appl Environ .Microbiol , V.44 n^o 4 ;(October 1982) 864 – 870.
- [20] TullokP ; Hill A ; Spencer JFT .A. New type of manocyclic lactone from *torulopsisapicola*.Jchemsoc ,chemcommun 1967; 584-586 .
- [21] Van Bogaert IN; SaerensK ; De Muynck C et al .Microbiol production and application of sophorolipids .ApplMicrobiolBiotechnol 2007 ; 76 :23-34.
- [22] Hu.Y et Ju ; LK ; Purification of lactonicophorlipids by crystallization . J Biotechnol; V.87 n^o3 ; (May 2001) ; 263-272 .
- [23] Arima ,K,Kakinuma A .Tamura G.Surfactatina crystalline peptid lipid .Surfactant produced by *bacillus subtilus*: isolation ;characterization and its inhibition of fibrin clot formation .BiochemBiophysRescommun 1968; 31 : 488 – 494.

- [24] Peypoux F ; Bonmatin JM ; Wallach Recent Trend in the biochemistry of surfactin .Appl Microbiol Biotechnol 1999 ; 51 : 553-563 .
- [25] Mukherjee AK ; Das K .correlation between diverse cyclic lipopeptide production and regulation of growth and substrats utilization by *bacillus subtilus* strains in a particular habitat .FEMS Microbiol ECO 2005 ; 54 : 479 – 489.
- [26] Sen R ; Swaminatham T ; Characterization and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin; Process Biochem 2005; 2953 – 2958.
- [27] MC Inerney MJ ; Jav ; Javaheri M ; Nagle DP ; Properties of the biosurfactant produced by *bacillus licheniformis* strain JF-2 ; J Ind Microbiol 1990; 5: 95 -102 .
- [28] Yakimov MM ; Fredrick HL ; Timmis KN .Effet of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of *LichenysinA* ; a lipopeptide biosurfactant from *bacillus licheniformis* BAS 50. Biotechnol Appl Biochem 1996 ; 23 : 13 -18.
- [29] Livre de biosurfactant ; Ramkrishna Sen ; chapitre 4 (Microbiol surfactants and their potential application) ; page 56 ; volume 672.
- [30] Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. et Gutinck, D.L., “Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties”. Appl. Environ. Microbiol., V. 37, n° 3, (March 1979), 402–408.
- [31] Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. et Gutinck, D.L., “Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties”. Appl. Environ. Microbiol., V. 37, n° 3, (March 1979), 402–408.
- [32] Kappeli O ; Finnerty WR .Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. J Bacteriol 1979 ; 140 : 707 -712 .
- [33] N.Kosaric ; Biosurfactants and their application for soil bioremediation ; Food Technol .Biotechnol .39(4) ;245-304(2001).
- [34] Karanth N.G.K; Deo PG and Veenanding N.K; Microbiol biosurfactant and their importance ; current science ; 77(1999);116 – 126 .
- [35] Rahman.K.S.M and Gakpe ; Production ,characterization and application of biosurfactant ; E(2008) Review Biotechnology 7.20 :360 -370 .

- [36] Kamel EDDOUAOUDA ; Etude du potentiel biodegradatif de souches isolées du sol de Hassi Messaoud contaminé par du pétrole : Criblage ,Biodegradation de HAP et production de biosurfactant , Thèse du doctorat université de Blida ; Année 2012.
- [37] Biosurfactant, edited by RamkrishnaSen ;chapitre 18 ; Biosurfactant from yeasts :Characteristics ,Production and Application (chapitre 18) ,page 241.
- [38] Bannat IM. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation ; A review . BiosourceTechnol1995 ; 51 : 1- 12.
- [39] Kitamoto D; Ikergami T .; Suzuki GT et al .Microbiol conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactantmannosylerythriol lipids ; by *Pseudozyma (candida Antarctica)*.BiotechnolLett 2001 ; 23 : 1709 – 14 .
- [40] Powalla ;M; Lang; S.and Wray V ; Penta and dissacharide lipid formation by *Nocardiacorynebacteroides*grown on n-alkanes ; ApplMicrobiolBiotechnol ; 31 (1989) ;473-479.
- [41] Dessai and Bannat ;Microbiol production of surfactants and their commercial potential ; Appelied Biology and Environment science divison : Review ;Mars ,1997,P (47-64) .Vol 61.No.1.
- [42] Dessai JD ; Bannat IN .Microbiol production of surfactants and their commercial potential .MicrobiolMolBiol review 1997 ; 61: 47 – 61 .
- [43] Cooper DG ; Mac Donald CR et al .Enhanced production of surfactin from *bacillus* by continuous product removal and metal cations addition .Appl Environ Microbiol 1981; 42 : 408 – 412 .
- [44] Hisatsnka K ; Nakahra T et al .Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation .AgricBiolchem 1971 ; 35 : 686 – 692.
- [45] Poremba K ;Gunkel W et al ; Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms .Environ Toxicol Water Qual 19991 ; 5 : 95 -102 .
- [45] S.K.Mehta ;Shweta Sharma ; Neena Mehta and Swaranjit Singh Cameotra .Biomimetic proprieties and potential use (chapitre 8 page 115) ; livre de biosurfactantRamkrishnaSen ,volume 672 .

- [46] Besson F ; Peypoux ; Michel G and Delcambe ; Characterisation of iturin A in antibiotic from various strains of *Bacillus* .Journal of Antibiotic 29 (10) ; (1976) ; 1043 - 1049 .
- [47] K.K .Gautam and V.K. Tyagi .Microbiolsurfactants : A Review .Journal of deo science ; vol 55 .No .4; 155 – 166 (206) .
- [48] I.M Bannat .R.S.Makkar .S. S.Cameotra ;Potentiel commercial applications of microbiol surfactants .ApplMicrobiolBiotechnol (2000) ;53 : 495-508.
- [49] Swaranjit Singh Cameotra,* Randhir S. Makkar, JasminderKaurand S.K. Mehta ;Livrebiosurfactant ;RamkrishnaSen;Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind (chapitre 20; page 263) ; vol 672.
- [50] Jenyffer Medeiros. Leonie asfora and Ibrahim M.Bannat . Microbiolbiosurfactant as additives for food industries .Biotechnol .Prog ;2013 ; vol 00 ; No .00 .
- [51] Fatma Zohra MESBAIAH, Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et production de biosurfactants par des souches bactériennes thermophiles isolées à partir d'un sol contaminate par le pétrole brut de la région de Hassi-Massoud ,thèse de doctorat,Université de Blida 1 2015.
- [52] Cooper D. G. and Goldenberg, B. G., "Surfaceactive agents from two *Bacillus* species", *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, (1987), 224 - 229.
- [53] Samira Ferhat,, Sami Mnif ,AbdelmalekBadis, KamelEddouaouda, RedhaAlouaoui, Ahmed Boucherit, NajlaMhiri, NadjiMoulai-Mostefa, 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) .
- [54]Vasudevan, N., Rajaram, P., "Bioremediation of oil sludge contaminated soil", *Environ international Journal*, V. 26, (2001), 409 – 411.
- [55]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 ofChromatography A*, 864, (1999), 211 – 220.

- [56] Mnif .S ;Chamikha .M ;Sayadi .S , "Isolation and characterisation of *Halomonassp.* C2SS100, a hydrocarbon bacterium under hypersaline conditions". *Journal of Applied Microbiology* ,2009 ,wiley online Library .
- [57] Ganesh ;Tzu-Wen Liang ; " Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029".*Journal ApplBiochemBiotechnol.* 2009; 172(2): 933–950.
- [58] JooMyeongHoon ; Kim JiYeon ;"Characterisation of crude oil biodegradation by biosurfactant producing bacterium *Bacillus subtilis JK* ".*Journal of the Korean society for Applied Biological Chemistry* . (2013) ; Volume 56 ; Issue 2 ; pp 193 -200.
- [59] Mesbaiah F/Z ;F.Mansour ; K . Eddouaouda ;A.Badis ; "Surfactant effet on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons ".*Journal of Desalination and water Treatment* ". 2014.
- [60] FatmaZohraMesbaiah ; KamelEddouaouda ; AbdelmalekBadis ; AlifChebbiDorraHentati ; Sami Sayadi ; Mohamed Chamkha ;" Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus sp.* under thermophilic conditions ".*Journal of Environ SciPollut Res* DOI 10.1007/s11356-016-6526-3, (2016).
- [61] IM Bannat ;Dessai JD ; "Characterisation of biosurfactant and their use in pollution removal – state of the art ".*Journal of Engineening in life sciences* 1995 .
- [62] R. Thavasi ; S. Jayalakshmi ; T. Balasubramanian and Ibrahim M. Banat ; "Biosurfactant production by *Corynebacteriumkutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake" .*Journal Applied Microbiology* ISSN 0266-8254 (2007) .
- [63] ChandranPrethy and NilanjanaDas ;"biosurfactant production and Diesel oil degradation by yeast species *trichosporonasahii* Isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil " . *International Journal of Engineering Science and Technology* Vol. 2(12), 2010, 6942-6953 .
- [64] Das ;Mukherjee .S ; Haddad ;R.Sen ;"Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by marine bacteruim " .*Journal of BioresourceTechnologie* (2009) .

- [65] Marcia Nitschke ; Siddhartha G. V. A. O. Costa ; Renato Haddad ; Lireny A. G. Goncalves ; Marcos N. Eberlin ; and Jonas Contiero ; "Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI "Journal Biotechnol. Prog. 2005, 21, 1562-1566.
- [66] A. Khopade ; R. Biao ; X. Liu ; K. Mahadik ; L. Zhang ; C. Kokare ; " Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4 ".Journal of Desalination 285 (2012) 198–204.
- [67] Coemetra and Rahman, K. S. M ; Banat, I. M ; "Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials', Biotechnology Progress, 18 (6), pp.1277-1281(2002).
- [68] RashmiRekhaSaikia ; Suresh Deka ; ManabDeka and Ibrahim M. Banat ; " Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production".Journal Ann Microbiol (2012) 62:753–763 .
- [69] Arino ;ElionaZ.Ron ; Eugene Rosenberg ; "Natural roles of biosurfactants ". Journal Environmental Microbiologie (1996) .

Annexe 1 : Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches

Deux borbiers fait l'objet de la présente étude, les prélèvements ont été effectués le 13 Mars 2007 à 16h (heure locale) à l'aide d'une spatule désinfectée par l'éthanol à une profondeur de 20 à 50 cm. Pour chaque échantillon, 1Kg de sol prélevé est mis dans un sachet en plastique stérile. La température des échantillons *in situ* est égale à 22 °C. Les échantillons ont été placés dans un frigorifiant (+4 °C) jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été ensuite conservés au réfrigérateur en attendant les analyses.

Le dosage du carbone organique total (COT) et les hydrocarbures totaux (HT) ont été réalisés, respectivement, au sein du laboratoire de géochimie minérale et le laboratoire des méthodes spectrales au niveau du Centre de Recherche et Développement de Boumerdes.

Tableau: Caractéristiques physico-chimiques du biotope

Paramètres	Echantillon N° 01		02		03
	Puits #472	OMOZ	Puits #32	OMKZ	Puits OMKZ#502
COT (%)	2,30		7,1		3,5
N _T (%)	0,42		1,18		0,51
COT/N _T	54,7		60,1		68,6
HPT (g/kg du sol)	27,83		59,07		36,05
Conductivité (mS/cm)	17,32		13,06		13,95
pH	7,50		7,57		7,25

COT : Carbone Organique Total ; N_T : Azote total Kjeldahl et HTP : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

Annexe 2 : Isolement des souches bactériennes

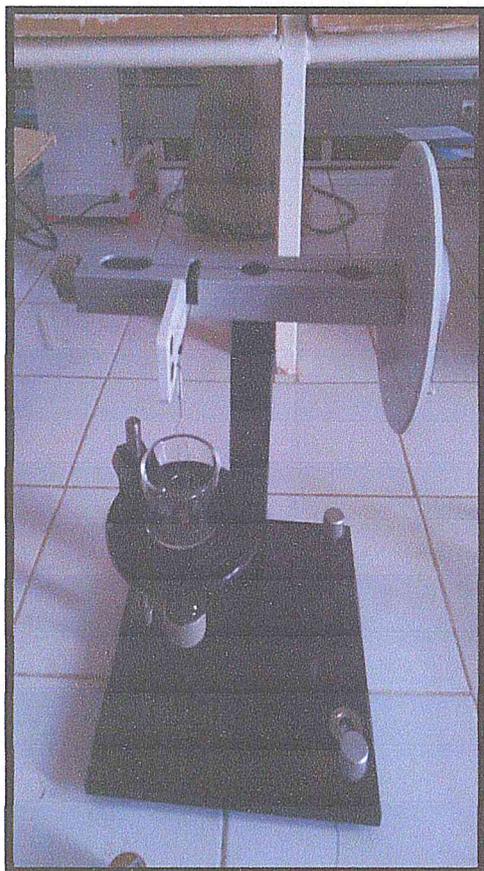
Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre): H_3BO_4 (0,25g), $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g), NaMoO_4 (0,06g), $\text{ZnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,7g). Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min (Eddouaouda, 2012).

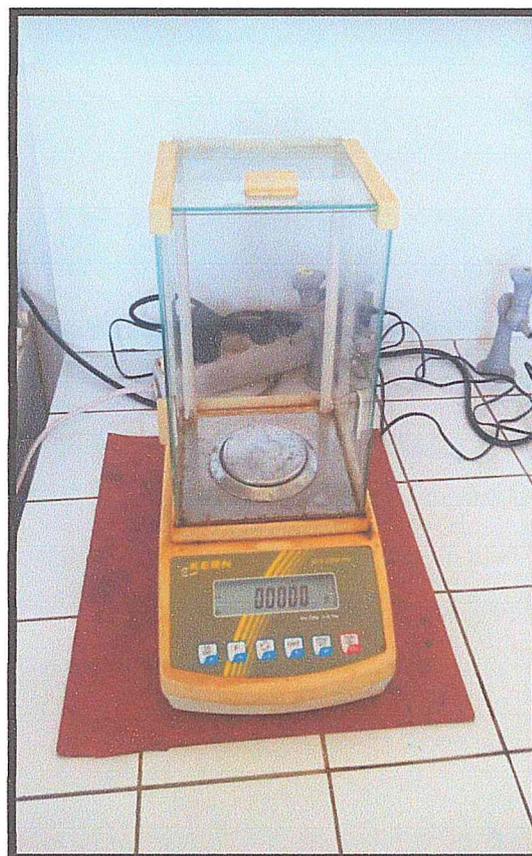
Afin d'obtenir une culture microbienne active, des repiquages successifs ont été effectués toutes les 48 h dans un milieu neuf. La croissance bactérienne a été suivie par :

- ✓ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).
- ✓ La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- ✓ Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

Annexe III



Tensiomètre K6, Krüss



Balance analytique



Centrifugeuse



Spectrophotomètre



Incubateur – Agitateur



Spectroscopie IR

