

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVESITE SAAD DAHLAB BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Spécialité : Génie de l'Environnement



Présenté par :

NOUAR Naoual

BENZAOUI Sabrina

Titre

**Production de biosurfactant issu d'une souche
bactérienne isolée à partir d'un sédiment marin en vue
d'une application environnementale**

Soutenu publiquement le 04/06/2022 devant le jury composé de :

TAOULIT Nadjet	Dr MCA	Présidente	Université de Blida1
BENSAHLA Gèhane	Dr MCB	Examinatrice	Université de Blida1
BASIS Abdelmalek	Prof	Promoteur	Université de Blida1
HADJALA Soumia	Doctorante	Co-promotrice	Université de Blida1

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr BADIS Abdelmalek, professeur à l'Université de Blida -1- qu'était à l'origine du choix de ce thème, pour avoir dirigé ce travail, nous lui devons beaucoup de respects.

Nous remercions très chaleureusement notre Co-promotrice : Mme HADJALA Soumia qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour. Nous lui exprimons notre gratitude de nous avoir dirigé, encouragé et sur tout aidé afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de nous faire l'honneur du juger ce travail.

Enfin, il nous serait difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

الملخص

لقد قمنا في هذا العمل بإجراء دراسة لإنتاج مواد خافضة للتوتر السطحي والتي تعتبر بديلا بيولوجيا للمواد الخافضة للتوتر السطحي الكيميائية، ناتجة من سلالة بكتيريا معزولة محليا من رواسب بحرية ملوثة بالهيدروكربونات (ميناء الصيد الخميستي بولاية تيبازة)، والتي تتطور بشكل هوائي في وسط ملوث يحتوي على واحد أو أكثر من مصادر الكربون.

لمراقبة إنتاج هذه المواد الحيوية قمنا بقياس قطر إزاحة الزيت والتوتر السطحي ومؤشر الاستحلاب، وكذلك قمنا بتتبع نمو البكتيريا عن طريق قياس الامتصاصية (الكثافة الضوئية عند 600 نانومتر). بناءً على المتابعة تم الحصول على النتائج المثلى في اليوم الأول (DDP = 4cm، TS = 31.4، E24 = 45%).

استخرجنا الفاعل الحيوي بطريقة الترسيب الحمضي متبوعاً باستخلاص سائل-سائل باستخدام أسيتات الايثيل، وحصلنا على عامل خافض للتوتر السطحي خام يتميز بDDP يبلغ 6 سم، مع إنتاجية استخلاص تساوي 25g/l من الفاعل الحيوي الخام.

استخدمنا العامل الحيوي المستنبت (طاف) في تطبيق بيئي، وأظهرت النتائج أن الأخير أزال 98% من زيت المحرك الملوث للرمل مقارنة بالماء المقطر مع إزالة 39%

الكلمات المفتاحية خافض التوتر السطحي البيولوجي، سلالة بكتيرية، إنتاج، تطبيق بيئي.

Résumé :

Dans ce travail, nous avons mené une étude pour produire un biosurfactant, qui est considéré comme un substitut biologique des surfactants chimiques, issu d'une souche bactérienne isolée à partir d'un sédiment marin contaminé par les hydrocarbures (port de pêche de Khemisti, wilaya de Tipaza). L'huile d'olive est utilisée comme source de carbone et d'énergie pour la production en aérobiose et sous agitation en mode batch à 30 °C. Les paramètres de suivi sont : le diamètre de déplacement du pétrole (DDP), la tension superficielle (TS) et l'indice d'émulsification (E₂₄), ainsi que la croissance bactérienne à 600 nm. Les résultats obtenus après un jour d'incubation sont : DDP = 4 cm, TS = 31.4 mN.m⁻¹ et E₂₄ = 45%. Nous avons extrait le biosurfactant par une méthode de précipitation d'acide suivie d'une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle et nous avons obtenu un biosurfactant brut caractérisé par un DDP de 6 cm avec un rendement d'extraction égale à 25g.L⁻¹. Nous avons utilisé le biosurfactant de culture (surnagent) dans une application environnementale, les résultats montrent que ce dernier a éliminé 98% d'huile de moteur contaminant le sable en comparaison avec l'eau distillée avec 39% d'élimination.

Mots clé : Biosurfactant, souche bactérienne, production, application environnementale.

Abstract:

In this work, we conducted a study to produce a biosurfactant, which is considered as a biological substitute for chemical surfactants, from a bacterial strain isolated from a hydrocarbon-contaminated marine sediment (Khemisti fishing port, wilaya of Tipaza). Olive oil is used as a source of carbon and energy for production under aerobiosis and agitation in batch mode at 30°C. The monitoring parameters are: oil displacement diameter (PDD), surface tension (TS) and emulsification index (E₂₄), as well as bacterial growth at 600 nm. The results obtained after one day of incubation are: DDP = 4 cm, TS = 31.4 mN.m⁻¹ and E₂₄ = 45%. We extracted the biosurfactant by an acid precipitation method followed by a liquid-liquid extraction with ethyl acetate and we obtained a crude biosurfactant characterized by a DDP of 6 cm with an extraction yield equal to 25g.L⁻¹. We used the cultured biosurfactant (supernatant) in an environmental

application, the results show that the latter removed 98% of motor oil contaminating the sand compared to distilled water with 39% removal.

Keywords: biosurfactant, bacterial strain, production, environmental application.

Liste des abbreviations :

BS : biosurfactant

MM : Milieu Minimum

DDP : le diamètre de déplacement du pétrole

TS: la tension superficielle

E24 : l'indice d'émulsification

DO : degrés d'absorbance

CMC : Concentration micellaire critique

pH : Potentiel d'Hydrogène.

Dédicacés

Je dédie ce mémoire qui est fruit de tout un long chemin d'étude :

A mes très chers parents avec toutes mes reconnaissances

A la mémoire de ma très chère grand-mère, qui n'a jamais cessé de prier pour que ce jour arrive, à Manounou j'aurai aimé partager cette joie avec toi mais dommage tu ne sois plus là. Tu me manqueras toujours, et tu resteras vivante dans nos cœurs vie.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur ma vie et mon bonheur **Maman** que j'adore. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A mon cher **PAPA**, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma reconnaissance pour tous les sacrifices que tu as prodigué pour ma formation, ma réussite et mon bien-être.

A ma sœur que la vie m'a donnée, ma fidèle accompagnant dans les moments les plus délicates de ma vie IKRAM.

A mon point force dans la vie, mon cher frère SALEM.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien de ma famille, que je remercie tout particulièrement un grand merci à mes chers cousins (Ghofrane, Hiba ,Neumann, Rahma, Rania) et mes Chers cousins (Mohamed, Fatah, Souhaib, Abderrahmane, Abdou, Islam, Habibou) ainsi mes tentes (Ratiba et Amina)

A mon binôme de travail ma copine, une sœur à moi que dieu la garde Nawel.

A toute la famille : Braham et Benzaoui

Liste des figures

Figure I .1.1 : Structure d'une tensioactif.

Figure I.1.3.2 : Structure du trehalolipide.

Figure I.1.3.2 : Structure de Mono-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-bhydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate.

Figure I.1.3.2 : Structure de Di-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-bhydroxydecanoyl-b- hydroxydecanoate.

Figure I.1.3.2 : Structure d'une molécule de sophorolipides.

Figure I.1.3.2 : Structure d'une molécule de lipopeptide.

Figure I.1.9 : Les tensioactifs dans l'eau.

Figure I.1.9.2 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant.

Figure II.1 : milieu LB en cours de préparation.

Figure II.1 : Ajustement de ph de milieu MM.

Figure II.1.2.3 :Technique de mesure de la TS à l'aide de tensiomètre.

Figure II.1.2.3: Agitation par vortex dans te test d'émulsification.

Figure II.1.6.3 : Principe de l'extraction par solvants.

Figure II.1.7 : Protocol d'élimination d'huile contaminant le sable

Figure II.2.1: Déplacement de pétrole de la souche S12.

Figure II.2.1 : Résultat de test E24 de la souche S12.

Figure II.2.2.1 : Influence de la source de carbone sur la production de la souche S12.

Figure II.2.2.2 : Influence de la nature de la source d'azote sur la production de la souche S12.

Figure II.2.2.3: Influence de la salinité sur la production de la souche S12.

Figure II.2.3.1: Evaluation de l'absorbance en fonction de temps.

Figure II.2.4.1: Déplacement de pétrole de la souche S12 durant les 7jours.

Figure II.2.4.1: Evaluation de déplacement de pétrole.

Figure II.2.4.2 : Evaluation de tension de surface.

Figure II.2.4.3 : Indice d'émulsification (E24) obtenu par la souche bactérienne S12 durant les 7jours.

Figure II.2.4.3 : Résultats de test E24(%).

Figure II.2.5: production de biosurfactant par la souche bactérienne.

Figure II.2.6 : précipite de biosurfactant.

Figure II.2.6: Biosurfactant récupérer.

Liste des tableaux

Tableau I.1.6.1: Microorganismes producteur de biosurfactants.

Tableau I.1.8: Différents procédés d'extraction et de purification des biosurfactants.

Tableau I.1.9.4: Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques.

Tableau I.2.1: Différentes applications potentielles et le rôle des biosurfactants.

Tableau II.2.1 : TS, DDP, et E24 des souches bactériennes cultivée dans le MM après 3jours d'incubation.

Sommaire

Résumé.	
Abstract.	
Liste des figures.	
Liste des tableaux.	
Introduction.....	01
Synthèse bibliographique	
I.1 Les biosurfactants.....	03
I.1.1 Généralité sur les surfactants.....	03
I.1.2 Définition des biosurfactants.....	04
I.1.3 Classification des biosurfactants.....	04
I.1.3.1 Selon le poids moléculaire	04
I.1.3.2 Selon la structure chimique	05
I.1.4 Avantage des biosurfactants	08
I.1.5 Inconvénients des biosurfactants	09
I.1.6 Production des biosurfactants.....	09
I.1.6.1 Microorganismes producteur	10
I.1.6.2 Optimisation de la production des biosurfactants.....	11
I.1.6.3 Les facteurs influençant la production	12
I.1.7 Biosynthèse des biosurfactants.....	13
I.1.8 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance.....	14
I.1.9 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants	15
I.1.9.1 Tension superficielle	16
I.1.9.2 Concentration micellaire critique CMC.....	17
I.1.9.3 Solubilisation.....	18
I.1.9.4 Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants.....	18
I.1.9.5 Pouvoir émulsifiant.....	19
I.2 Applications des biosurfactants	21
I.2.1 Les Applications des biosurfactants	21
I.2.3 Applications Environnementaux des biosurfactants	23
I.2.3.1 Bioremédiation des sites contaminés.....	23
I.2.3.2 Décontamination des sols polluée par les hydrocarbures	23

I.2.3.3 Nettoyage de réservoirs de pétrole	24
I.2.3.4 Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants.....	24

Chapitre I :Partie expérimentale

II Matériel et méthodes	26
II.1.1 Isolement des souches productrices de biosurfactant	28
II.1.1.1 Biotope	28
II.1.1.2 Echantillonnage.....	28
II.1.1.3 Isolement	28
II.1.1.4 Purification	29
II.1.1.5 Conservation des isolats purifiés	29
II.1.2 Criblage des souches bactériennes	29
II.1.2.1 Repiquage des souches	29
II.1.2.2 Préculture.....	29
II.1.2.3 Culture de production.....	30
II.1.2.4 Evaluation de la production de biosurfactant.....	30
II.1.3 Optimisation de la production.....	32
II.1.3.1 Influence de la source de carbone.....	32
II.1.3.2 Influence de la source d'azote.....	32
II.1.3.3 Influence de la salinité.....	32
II.1.4 Cinétique de production de biosurfactant	32
II.1.5 Production de biosurfactant dans le milieu optimisé.....	33
II.1.6 Récupération de biosurfactant contenu dans le surnageant	33
II.1.6.1 Centrifugation.....	33
II.1.6.2 Acidification	33
II.1.6.3 Extraction de biosurfactant	33
II.1.7 Essai de l'application de biosurfactant dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable.....	34

Chapitre I :Partie expérimentale

II.2.1 Isolement et criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant.....	36
II.2.2 Optimisation de paramètres de production.....	38
II.2.2.1 Influence de la source de carbone.....	38
II.2.2.2 Influence de la source d'azote.....	39
II.2.2.3 Influence de la salinité.....	39
II.2.3 Cinétique de croissance.....	40

II.2.3.1 Croissance bactérienne	41
II.2.4 Suivi de la production de biosurfactant	41
II.2.4.1 Déplacement de pétrole (DDP).....	41
II.2.4.2 Tension superficielle (TS).....	43
II.2.4.3 Test d'émulsification (E ₂₄).....	43
II.2.5 Production de biosurfactant.....	46
II.2.6 Extraction de biosurfactant	46
II.2.6.1 Rendement d'extraction	48
II.2.7 Résultat de l'application de biosurfactant dans l'élimination de l'huile de moteur contaminant le sable.....	48
Conclusion.....	50
Références bibliographique	
Annexes.....	

Synthèse bibliographique

Introduction Générale

Depuis les années 80, les chercheurs, et grâce à l'essor de la biotechnologie, se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes (les bactéries, les champignons, les levures) appelés les tensioactifs biologiques ou les biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques mais ont l'avantage d'être non toxiques et biodégradables d'où leur utilisation dans les préparations alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et environnemental. Ces molécules en plus de leur biodégradabilité sont peu ou non nocives *vis-à-vis* de l'environnement (ecofriendly) et en plus ils sont plus stables et plus fonctionnels que leurs homologues chimiques [1].

Les biosurfactants sont principalement produits par des bactéries isolées à partir d'une grande diversité de biotopes, notamment le sol, l'eau de mer, les sédiments marins, les champs de pétrole, elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des expériences afin d'optimiser les conditions culturelles et environnementales de production [2].

Divers substrats sont utilisés pour leur production ce qui leur donnent des structures chimiques différentes. Les propriétés essentielles des biosurfactants sont l'adsorption aux interfaces, responsable de la dispersion et du mouillage, favorisés par la diminution de la tension superficielle et l'auto-agrégation ou formation des micelles qui gouvernent les propriétés de solubilisation et de microémulsification [3]

Les biosurfactants ont un large éventail d'application biotechnologiques dans diverses industries : pétrolière, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, détergence, textile, peinture, mines et en nanotechnologie [4].

Actuellement, le marché principal est l'industrie pétrolière, qu'applique les biosurfactants pour la récupération des résidus pétroliers des réservoirs de stockage, d'autre processus de récupération du pétrole, le nettoyage des déversements de pétrole et la biorestauration des eaux et des sols contaminés par les hydrocarbures produits à proximité des ressources agricoles [5]. L'utilisation des déchets renouvelables permettent non seulement une diminution significative de coût de production, mais aussi une réduction des quantités des déchets à traiter générés par diverses entreprises [6]. Ces agents ont le pouvoir de dispersion des huiles (hydrocarbures) dans le cas de pollution nécessite une élimination et une solubilisation de la nappe d'huile le plus efficacement et rapidement possible et permettant ainsi une biodégradation plus rapide et plus efficace des contaminants.

L'objectif principal de ce présent travail est de produire un tension actif biologique (biosurfactant) en utilisant une souche bactérienne à fort potentiel de production isolée localement afin de réaliser une application environnementale en remobilisant l'huile de moteur mélangée avec le sable à l'image du sable pollué par les hydrocarbures dans une perspective d'une application dans la bioremédiation des sols contaminés dans les zones pétrolières, cas des sols pollués de la région de Hassi Messaoud.

Ce mémoire s'articule sur deux parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique sur les biosurfactants et leurs applications dans différents domaines. La deuxième est réservée pour le matériel et méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus. Enfin une conclusion générale et des perspectives termineront le document.

Synthèse bibliographique

I.1.Les biosurfactants

I.1.1 Généralité sur les surfactants :

Les surfactants, tensioactifs, ou encore agents de surface, sont des composés chimiques d'origine naturelle ou synthétique, qui dissous ou dispersés dans un liquide. Ce sont des molécules amphipathiques avec des parties hydrophiles et hydrophobes qui se répartissent préférentiellement à l'interface d'une phase fluide, ayant des degrés différents de polarité et de liaisons hydrogènes, telles que les interfaces (huile/eau) ou (air/eau). Ces propriétés rendent les tensioactifs capables de réduire la tension superficielle et interfaciale. Ils forment des microémulsions dans lesquelles les hydrocarbures peuvent se solubiliser dans l'eau. Ce qui leur confère d'excellentes propriétés détergentes, émulsifiantes, moussantes et dispersantes.

Les surfactants constituent une classe importante de produits de l'industrie chimique utilisés couramment dans plusieurs secteurs de l'industrie moderne.

La production mondiale des surfactants chimique excède 10^6 tonnes par an [7]. La plupart des surfactants commercialement disponibles sont des dérivés du pétrole. Leur origine chimique présente un risque pour l'environnement, car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [8]. Cet aspect négatif a conduit beaucoup d'équipes de recherche-développement à s'intéresser aux surfactants d'origine biologique (les biosurfactants), en utilisant des déchets des industries agroalimentaires ou des sources de carbone peu coûteuses seules à même d'offrir des conditions d'exploitation à des coûts supportables [9].

Sur le plan structural, les composés tensioactifs se présentent comme des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire (**Figure 1**). Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés [10].

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants :

- Les cationiques qui possèdent une charge positive,
- Les anioniques, qui ont une charge négative,
- Les non ioniques, sans charge,

- Les amphotères (zwitterioniques),

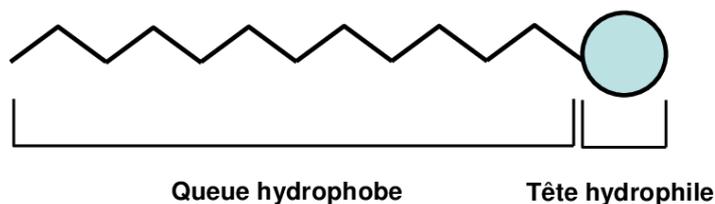


Figure I .1.1 : Structure d'une tension actif.

I.1.2 Définition des biosurfactants :

Les biosurfactants sont des composés produits par des plantes, des animaux mais essentiellement par des microorganismes (bactéries, levures et champignons filamenteux). Dans ce cas, il s'agit de molécules organiques (protéines, glucides et lipides) dont la combinaison de leurs propriétés permet la réduction de la tension superficielle. Dans le cas des biosurfactants d'origine microbienne, la plupart sont des agents extracellulaires ; Ils sont secrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse [11]. Par ailleurs, il a été signalé la présence des biosurfactants intracellulaires [12]. Dans d'autres cas, les biosurfactants peuvent rester adhérents à la membrane cellulaire suite à leur synthèse par la cellule, elle-même, peut jouer le rôle de biosurfactants [13].

I.1.3 Classification des biosurfactants :

Contrairement aux tensioactifs chimiques, qui sont classés selon leur structure dissociative dans l'eau (cationique, anionique, non ionique, amphotère), D'après Ron et Rosenberg (2002) [14], Banat et al. (2000) [7] ont classés les biosurfactants en deux classes.

I.1.3.1 Selon le poids moléculaire

- **Faible masse moléculaire :**

Les tensioactifs de faible masse comprennent des molécules qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et interfaciale, tels que les glycolipides dans lesquels les glucides sont liés à un acide aliphatique à longue chaîne.

- **Haut masse moléculaire :**

Les tensioactifs de masse élevée sont appelés collectivement des bio-émulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces. Ces derniers sont des polymères amphiphiles et polyphiles

qui sont généralement plus efficaces dans les émulsions stabilisantes l'huile dans l'eau, tels que les polysaccharides, lipopolysaccharides, des protéines ou lipoprotéines [15].

I.1.3.2 Selon la structure chimique :

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. On distingue cinq grandes classes de biosurfactants [8] :

- 1) Les glycolipides.
- 2) Les lipopeptides.
- 3) Les phospholipides.
- 4) Les liposaccharides.
- 5) Les lipides neutres.

1) **Les glycolipides** : En général, les biosurfactants les plus connus sont de nature glycolipidique. Il s'agit d'hydrates de carbone qui combinés avec des acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides gras hydroxylés qui sont liés à un groupe ester ou éther. Parmi les glycolipides, les plus connus sont les tréhalolipides, les rhamnolipides et les sophorolipides .

- **Les tréhalolipides** : Le tréhalose est un disaccharide non réducteur dans lequel les deux unités de glucose sont liées par une liaison α (1-1).

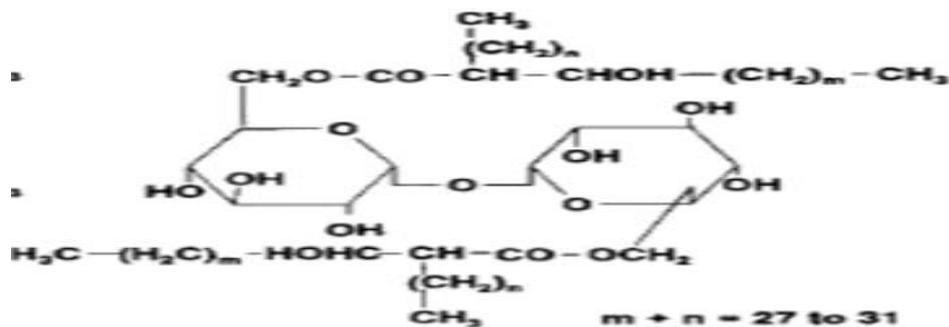


Figure I .1.3.2 : Structure du trehalolipide

C'est le composant de base des glycolipides de la paroi cellulaire des Mycobactéries et des Corynébactéries.

- **Les rhamnolipids** : Sont des biosurfactants dans lesquels une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque, ce sont les biosurfactants les plus étudiés, la production des rhamnosés liés à des lipides chez

Pseudomonas aeruginosa qui sont étudiés pour la première fois par Jarvis et Johnson (1994) [16].

L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate et L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate, sont référées comme des rhamnolipides R1 (Mono-rhamnolipide) et R2 (Di-rhamnolipide) respectivement, sont les principales rhamnolipides produites par *Pseudomonas aeruginosa* [10].

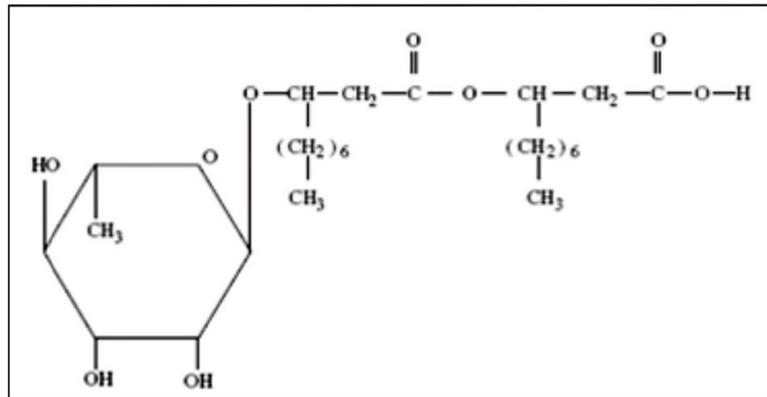


Figure I.1.3.2 : Structure de Mono-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate.

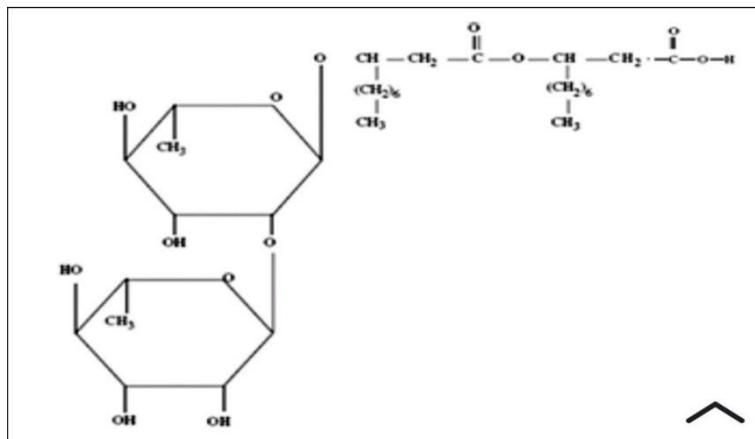


Figure I.1.3.2: Structure de Di-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate

- **Les sophorolipides :** Qui sont produites principalement par les levures comme *Torulopsis bombicola*, *T.petrophilum* et *T. apicola*, elles consistent une liaison de deux molécules de sophorose à une longue chaîne d'acide gras [17].

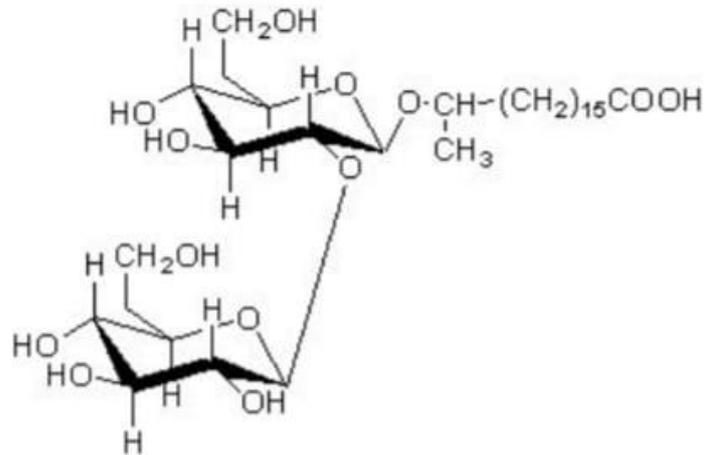


Figure I .1.3.2 : Structure d'une molécule de sophorolipides

2) Les lipopeptides et les lipoprotéines

Un grand nombre des lipopeptides cycliques comprenant des antibiotiques decapeptide (gramicidines) et des antibiotiques lipopeptide (polymyxines), produits par *Bacillus brevis* et le *B. polymyxa* respectivement, possèdent des propriétés tensio-actives remarquables [18].

Le surfactant lipopeptide cyclique, produit par *B. subtilis* ATTC 21332, est l'un des biosurfactants les plus puissants. Il abaisse la tension superficielle de 72 à 27.9 mN/m à des concentrations aussi basses que 0.005% [10].

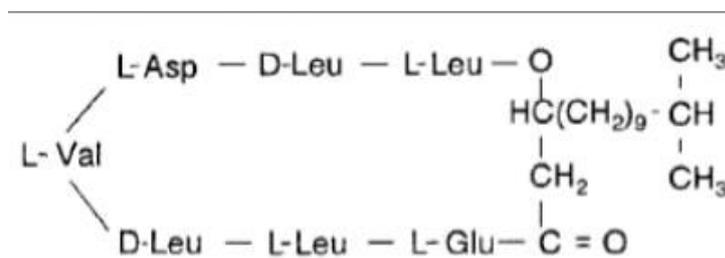


Figure I .1.3.2 : Structure d'une molécule de lipopeptide

3) Les phospholipides et les lipides neutres :

Des grandes quantités de tensioactifs d'acides gras et de phospholipides sont produits par plusieurs bactéries et levures pendant leur croissance sur les n-alcanes, quand la bactérie *R. erythropolis* se développe sur n-alcane elle produit une substance connue sous le nom de

phosphatidyl éthanol amine qui diminue la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1 mN/m et une concentration critique de micelles (CMC) de 30 mg/litre [19].

I.1.4 Avantage des biosurfactants :

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages. Ils sont respectueux de l'environnement, moins toxique et biodégradable. Ils sont doués des activités antimicrobienne, antivirale, antitumorale, antiadhésive, antibiofilm, etc. Certains peuvent être actifs à des pH, des températures et des salinités extrêmes [4]. Les principaux avantages des surfactants dérivés des microorganismes sont discutés ci-dessous :

- **Faible toxicité :** bien que peu de recherches soient disponibles dans le sujet de la toxicité des biosurfactants, ces biomolécules sont généralement considérées comme des produits non ou faiblement toxiques et sont appropriées pour les utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [20].
- **Disponibilité des matières premières :** les biosurfactants peuvent être produits à partir de déchets renouvelables et des sous-produits utilisés comme sources de carbone. Cette caractéristique rend la production de biosurfactants économique et permet l'utilisation des déchets en les valorisant et en réduisant leur effet polluant en même temps permettant une diminution significative du coût de la production [8].
- **Tolérance à la température, au pH et à la salinité :** la plupart des biotensioactifs sont résistants aux facteurs environnementaux extrêmes tels que la température, la salinité et le pH [8].
- **Activité de surface et d'interface :** le tensioactif aide à réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Des biosurfactants sont plus efficaces que les tensioactifs chimiques en raison de leur faible concentration micellaire critique (CMC) [10].
- **Biodégradabilité :** Ils sont facilement dégradés par les bactéries et autres organismes microscopiques ; par conséquent, ils ne posent pas beaucoup de menace pour l'environnement [21].
- **Autres avantages :** Les biosurfactants sont caractérisés par leur biocompatibilité et leur digestibilité, ce qui permet leur application dans des produits pharmaceutiques, alimentaires et des produits cosmétiques [4].

I.1.5. Inconvénients des biosurfactants :

Selon HEALY *et al* (1996), Le principal facteur limitant l'usage des biosurfactants demeure l'aspect économique d'une production à grande échelle, dont les principaux obstacles sont :

- ✓ Faibles rendements de production par rapport au substrat(s) ;
- ✓ Importants investissements de capitaux ;
- ✓ Faibles rendement volumiques ;
- ✓ Problèmes de contrôle de procédé comme la formation de mousse ;
- ✓ Problèmes de récupération et de purification de produit ;
- ✓ Problèmes de caractérisation des produits finis en raison de leur complexité chimique.

I.1.6 Production des biosurfactants :

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indique une production efficiente [22]. La présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscible [23].

L'utilisation des déchets et des produits agricoles comme substrats de la production des biosurfactants est largement étudié et appliqué pour baisser les coûts de production et réduire les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...) [9].

I.1.6.1 Les microorganismes producteurs :

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des bactéries des champignons et des levures. Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible aux cellules [24].

Les microorganismes producteurs de biosurfactants ont été isolés à partir d'une grande diversité de milieux, notamment le sol, l'eau de mer, les sédiments marins, les champs de pétrole [2] et même des environnements extrêmes [25]. Nombreux microorganismes extrêmophiles se retrouvent dans plusieurs milieux marins extrêmes, tels que les événements hydrothermaux, des sources chaudes, des lacs salés et les planchers en haute mer. La capacité de ces microorganismes pour tolérer des températures extrêmes, la salinité et la pression, démontre leur grand potentiel pour des procédés biotechnologiques.

Les genres bactériens connus pour la production des biosurfactants comprennent : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, et *Halomonas* [26].

Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont les bactéries les plus étudiées [8].

Le tableau 1 rassemble quelques biosurfactants et leurs microorganismes producteurs.

Tableau 1 : Microorganismes producteur de biosurfactants

Biosurfactants	Micro-organismes
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas sp.</i>
Tréhalolipides	<i>Rhodococcuserythropolis</i>
Tréhalolipides	<i>Rhodococcus sp.</i>
Sophorolipides	<i>Torulopsisbombicola</i> <i>Candida bombicola</i>
Lipopeptides, lipoprotéines	
Peptides-lipides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Cyclopeptides	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetine	<i>Serratiamarcescens</i>
Serrawetine W2	<i>Serratialiquefaciens</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Acides gras, lipides neutres et phospholipides	
Acides gras	<i>Corynebacteriumlepus</i> <i>Candida tropicalis (mutant)</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Lipides neutres	<i>Nocardiaerythropolis</i>
Phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopolysaccharides (Surfactants polymériques)	
Emulsan	<i>Acinetobacter</i> <i>Calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter</i> <i>Calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

I.1.6.2. Optimisation de la production des biosurfactants :

Cette partie sélectionnée après l'étape de criblage des souches bactériennes productrice de biosurfactants. L'optimisation des facteurs consiste à varier les concentrations d'un facteur en gardant les autres fixes. Après avoir déterminé la valeur optimale du premier facteur, nous passons successivement à l'optimisation de la concentration des autres facteurs.

I.1.6.3 Les facteurs influençant la production :

Mulligan et ces collaborateurs [27], ont précisé que certain nombre d'étude sont indiqués que le type et le rendement du biosurfactant est influencé par le type de milieu (source de carbone et autres nutriments) et les conditions de croissance (température, agitation, pH, etc.), donc l'optimisation de la production des biosurfactants affectant par déverse facteurs nutritionnels et facteurs environnementaux comme suivant :

➤ Facteurs nutritionnels

○ Source de carbone :

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol). Cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive [9]. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes [25].

○ Source d'azote :

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante [28]. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices, par exemple, la production de tensioactif par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates.

○ Influence de rapport C/N :

Pour avoir des rendements de production optimum, il est nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biotensioactif. Guerra-Santos et al. (1986)[29] 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.

➤ Facteurs environnementaux

○ Influence du pH :

Ishigami et al. (1987) [30] et Champion et al. (1995) [31] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment.

Par exemple, à un pH de 5.5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées.

- **Influence de L'oxygène :**

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production de biosurfactant à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance, l'étude des effets synergiques sur *Lactobacillus pentosus* a reflété l'interdépendance de ces facteurs. Dans le cas de *B. subtilis* C9, un rendement trois fois plus élevé en lipopeptides a été observé dans des conditions limitées en oxygène par rapport à des conditions suffisantes en oxygène [32].

- **Influence des sels minéraux :**

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [29].

- **Influence de la vitesse d'agitation :**

Pour les souches bactérienne, l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. Par contre chez les levures l'effet inverse est observé [33].

- **Influence de La température :**

L'activité d'émulsification et la tension superficielle du biosurfactant qui produit par les souches thermophiles tout au long de la plage de température supérieures à 40°C est restées constantes après autoclavage à 120°C pendant 20 min [34].

I.1.7 Biosynthèse des biosurfactants :

Les biosurfactants ont été synthétisés en utilisant une variété de substrats. Ils peuvent être produits spontanément ou induits par la présence de composés lipophiles, de variations du pH, l'humidité, la température, La vitesse d'agitation, les contraintes et les faibles concentrations d'azote. Les premiers biosurfactants signalés étaient des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*, le lipopeptide (surfactine) produit par *Bacillus subtilis*, le lipide mannosyl ethitritol (MEL) dérivé de *Candida* La biosynthèse des biosurfactants implique généralement des voies séparées pour former des parties hydrophiles et hydrophobes, qui sont ensuite combinées. Principales voies métaboliques impliquées dans la synthèse des précurseurs des biosurfactants dépendent de la source de carbone. Les sources de carbone sont les hydrates de carbone et les lipides ou les

hydrocarbures. Lorsque les hydrates de carbone sont utilisés comme seule source de carbone dans le milieu de culture pour la production de biosurfactants, ils peuvent être utilisés comme source d'énergie. Le flux de carbone est dirigé à la fois vers les voies lipogénique (formation de lipides) et glycolytique (formation de la partie hydrophile). En revanche, lorsqu'une source d'hydrocarbures est utilisée, biosynthèse est dirigée vers les voies, lipolytique et gluconéogène [35].

I.1.8 Extraction des biosurfactants du milieu de croissance :

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. Ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices [10].

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) comme l'ont fait Parra et al. (1989) [36]. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

D'autres techniques de récupération existent ; Reiling et al. (1986) [37] ont réalisé une adsorption sur de l'Amberlite XAD-2 suivie d'une purification et lyophilisation, donnant des rendements variant de 60 à 90 % en pureté.

Tableau2 : Différents procédés d'extraction et de purification des biosurfactants
(Desai et Bant 1997) [10].

Procédés	Exemples d'application
Précipitation acide	Surfactine
Extraction par solvant	Tréhalolipides
Cristallisation	Glycolipides
Centrifugation	Glycolipides
Adsorption	Rhamnolipides
Fractionnement de mousse	Surfactine
Technique membranaire et précipitation	Mélange de biosurfactants Glycolipides
Ultrafiltration	Glycolipides
Chromatographie d'échange d'ions	Rhamnolipide

I.1.9 Propriétés physico-chimiques des biosurfactants :

Les biosurfactants, sont des molécules qui possèdent un enchaînement hydrophobe lié à un site hydrophile ; cette structure particulière leur confère des propriétés bien spécifiques : mis en solution dans l'eau, ils se rassemblent aux interfaces en s'orientant de manière à ce que la partie hydrophile de leur molécule soit dans l'eau et la partie hydrophobe à l'extérieur. Lorsque cette interface est la surface libre de la solution en contact avec l'air, il se forme un film superficiel de molécules orientées qui en modifie les propriétés de surface en diminuant la tension superficielle, d'où le nom donné à ces produits : « agents de surface » ou tensioactif (**Figure 8**) Lorsque l'interface est la surface de contact entre deux liquides, de l'huile et de l'eau par exemple, les molécules d'agents de surface se rassemblent à cette interface : La partie hydrophile dans l'eau, la partie hydrophobe dans l'huile, créant ainsi une liaison entre

les deux liquides, ce qui diminue la tension interfaciale entre les deux phases considérées et facilite la formation d'émulsion [38].

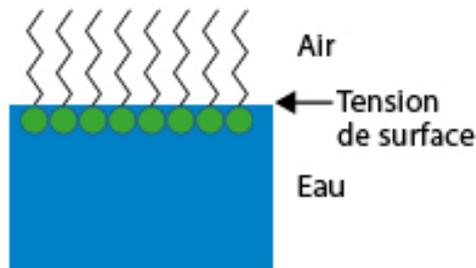


Figure I .1.9 : les tensioactifs dans l'eau.

I.1.9.1 Tension superficielle :

La tension superficielle est une propriété caractéristique des interfaces, que les agents de surface ont la capacité de l'abaisser [39]. L'origine de cette tension réside dans la distribution anisotrope des forces d'attraction subies par les molécules d'un liquide à la surface de contact avec l'air. Au sein du liquide, toute molécule est soumise de la part des autres à des forces attractives dont la résultante est nulle. Par contre, une molécule à la surface subit une force d'attraction nette dirigée vers l'intérieur du liquide puisque les forces d'attraction des molécules d'air sont négligeables. La surface de contact entre l'air et l'eau est donc réduite au maximum. A l'inverse, augmenter l'air de la surface de contact (interface) nécessite l'application d'une force et la réalisation d'un travail proportionnel à l'accroissement de surface visée. De ce fait, la tension superficielle se traduit par l'augmentation de l'énergie du système lorsqu'une molécule est déplacée du volume vers la surface et voit son nombre de premiers voisins diminuer [40].

La tension superficielle est la mesure de l'énergie de cohésion présente à une interface. Les molécules d'un liquide s'attirent l'une l'autre et interagissent entre elles. Ces interactions entre molécules du liquide s'équilibrent avec des forces attractives dirigées dans toutes les directions. Ainsi, à l'interface liquide/air, il y a un déficit de force qui entraîne la présence d'une énergie libre de surface, quantifiée par la mesure du rapport énergie/air. Elle est définie comme étant une force par unité de longueur qui résulte de l'énergie libre superficielle, énergie qui se manifeste dans le travail à fournir pour augmenter d'une unité d'aire la surface d'un liquide de façon isotherme et réversible [41].

On la note γ , tel que :

$$\gamma = - \left(\frac{\delta G}{\delta A} \right)_{n,T,P}$$

Avec :

δG : variation de l'énergie libre du système

δA : variation de l'aire de l'interface

γ est exprimée en Newton par mètre (N/m) ou (Joule/m²) en (S.I).

I.1.9.2 Concentration micellaire critique CMC :

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles [42]. Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles [43]. En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau [44].

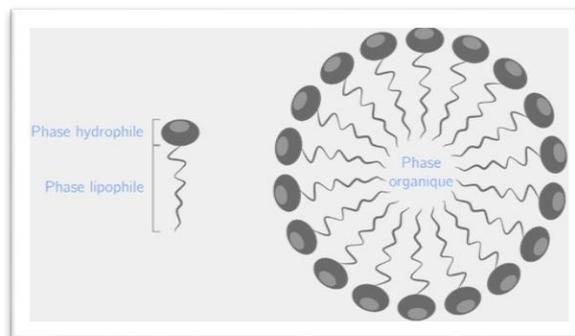


Figure I .1.9.2 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant.

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale. Pour de nombreux tensioactifs, celle-ci varie en fonction de leurs structures, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organique. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures à celles des surfactants chimiques, leur efficacité est donc meilleure [45].

I.1.9.3 Solubilisation :

La solubilisation peut être définie comme une dissolution spontanée d'une substance (solide, liquide ou gaz), par une interaction réversible avec les micelles d'un tensioactif présentes dans le solvant pour former une solution isotrope thermodynamiquement stable avec une activité thermodynamique réduite de la substance solubilisée [46]. Du point de vue pratique, l'importance de ce phénomène est qu'il permet la dissolution de substances dans des solvants dans lesquels elles sont normalement insolubles. L'amélioration de la solubilité d'un produit par addition d'un composé tensioactif est une méthode employée depuis très longtemps [8]. En effet, l'une des plus importantes propriétés des agents de surface, qui est liée à la formation des micelles, est la solubilisation.

I.1.9.4 Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants :

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. Edwards et al [33] ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menidia Beryllina*). Ces auteurs concluent que les biotensioactifs ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques

Par exemple, l'Emulsan qui est le biosurfactant le moins toxique de l'étude, présente une CL50 (concentration létale) supérieure à 200 mg/l. à titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, a une CL50 de 2,5 à 6 mg/l.

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

Tableau 3 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques
(Christofi et Ivshina, 2002) [47].

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

Ce Tableau regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques.

Des tests de toxicité (oculaires et dermiques) réalisés par Haba et al. [45] ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

De nombreux auteurs indiquent que les biosurfactants sont biodégradables (Parra et al. 1989 [36]; Banat et al. 2000 [7] ; Vipulanandan et Ren, 2000 [48]).

De même, (Vipulanandan et Ren (2000) [48] ont prouvé que la biodégradation du biosurfactants produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphthalène. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Page et al. (1999) [49] qui expliquent le phénomène par le fait que les biosurfactants sont des sous-produits ou des constituants membranaires des micro-organismes.

I.1.9.5 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 mm. La phase dispersée est aussi appelée phase interne ou discontinue, et la

phase dispersante peut être appelée phase externe ou continue. Donc, il y a généralement deux types d'émulsions : huile dans-eau ou eau-dans-huile, ces systèmes possèdent une stabilité minimale pouvant être accrue par des additifs tels que les agents actifs. Ainsi, des émulsions stables peuvent être produites durant des mois et même des années [50]. Les biosurfactants peuvent stabiliser (émulsifiants) ou déstabiliser de l'émulsion (démulsifiants). Les biosurfactants à haut poids moléculaire sont en général mieux 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 [51]. Par contre, le liposane a montré une mauvaise réduction de la tension de surface, mais il est utilisé avec succès pour émulsionner les huiles comestibles.

Applications de biosurfactants

I.2 Applications de biosurfactants :

I.2.1 Les application de biosurfactants :

Les biosurfactants présentent en effet l'avantage d'être biodégradable et non toxique. De plus, certains d'entre eux, sécrétés par des organismes extrêmophiles, restent fonctionnels malgré des conditions drastiques de température, de salinité ou de pH [7], c'est pour quoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines.

Le tableau ci-dessous résume les applications et les rôles des biosurfactants dans différents domaines :

Tableau4 : Différentes applications potentielles et les rôles des biosurfactants. (SANTOS *e tal.*2016)[4].

Industrie	Application	Rôle des biosurfactants
Environnement	Bioremédiation; Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures; Assainissement des sols et rinçage.	Emulsification des huiles, abaissement de la tension interfaciale, dispersion des huiles, solubilisation des huiles, mouillage, étalement, détergence, moussage, inhibition de la corrosion dans les huiles combustibles et les équipements, rinçage du sol.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole De l'émulsification	Emulsification des huiles, abaissement de latension interfaciale, des émulsification des émulsions d'huile, solubilisation des huiles, réduction de la viscosité, dispersion des huiles, mouillage des surfaces solides, étalement, détergence, moussage, inhibition de la corrosion dans les fuel-oils et les équipements.
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds; Assainissement des sols; Flottation	Mouillage et moussage, collecteurs et mousses, enlèvement de métalions de solutions aqueuses, sols et sédiments, métaux lourds séquestrant, étalement, inhibition de la corrosion dans les huiles.

Aliments	Émulsification et désémulsification; Ingrédient fonctionnel	Solubilisation des huiles aromatisées, contrôle de la consistance, émulsification, agent mouillant, étalement, détergence, moussage, épaississant.
Médicament	Microbiologique; Pharmaceutique et thérapeutique	Agents anti-adhésifs, antifongiques, antibactériens, antiviraux, vaccins, thérapie génique, molécules immunomodulatrices.
Agriculture	Biocontrôle; Lese engrais	Mouillage, dispersion, suspension de pesticides en poudre et engrais, émulsification de solutions de pesticides, facilitation de
Produits de beauté	Produits des antéet de beauté	Emulsification, agents moussants, solubilisation, agents mouillants, agents nettoyants, agents antimicrobiens, médiateurs de l'action enzymatique.
Nettoyage	Détergents à lessive	Détergents et désinfectants pour la lessive, le mouillage, la diffusion, inhibition de la corrosion.
Textiles	Préparation des fibres; Teinture et impression; Finition de textiles	Mouillage, pénétration, solubilisation, émulsification, détergence et dispersion, mouillage et émulsification en finition formulations, ramollissement.
Nanotechnologie	Synthèse de nanoparticules	Emulsification, stabilisation.

I.2.3 Applications environnementaux des biosurfactants :

Dans le domaine environnemental, les biosurfactants sont capables de solubiliser les composés xénobiotiques tels que les hydrocarbures, améliorant ainsi leur biodégradabilité et de chélater les métaux lourds (le zinc, le plomb, le cadmium et le cuivre) permettant ainsi leur élimination des sites contaminés [52].

Les principales utilisations sont :

- Bioremédiation des sites contaminés,
- Décontamination des sols pollués par les hydrocarbures,
- Nettoyage des réservoirs de pétrole,
- Élimination des métaux lourds,
- Remobilisation des HAP.

I.2.3.1 Bioremédiation des sites contaminés :

La bioremédiation concerne la capacité des organismes vivants à transformer ou à minéraliser les contaminants organiques pour la génération de substances moins nocives pouvant être intégrées dans le cycle biogéochimique naturel. Cependant, la biodégradabilité de ces contaminants est influencée par des facteurs tels que :

- ✓ L'oxygène,
- ✓ Le pH,
- ✓ La présence de macronutriments et de micronutriments,
- ✓ Les caractéristiques physicochimiques de l'historique de pollution du contaminant.
- ✓ Les particules sur lesquelles les organismes et les contaminants peuvent être adsorbés [53].

II.2.3.2 Décontamination des sols pollués par les hydrocarbures :

L'application de biosurfactants pour l'élimination des contaminants des sols est moins connue que l'application avancée de ces composés dans la bioremédiation, car l'efficacité de l'élimination dépend principalement des propriétés physicochimiques du biosurfactant et non de ses effets sur l'activité métabolique ou des changements dans la propriété de la surface cellulaire. Cependant, les mécanismes qui affectent la mobilisation et la solubilisation des

hydrocarbures dans les sols sont similaires à ceux impliqués dans l'amélioration de la biodisponibilité pour la bioremédiation.

II.2.3.3 Nettoyage des réservoirs de pétrole :

L'élimination des résidus d'huile lourde nécessite un lavage avec des solvants ou même un lavage manuel, qui sont tous deux des processus dangereux, lents et coûteux, car les huiles lourdes qui se déposent au fond des réservoirs de stockage sont très visqueuses et ne peuvent pas être éliminées avec un pompage conventionnel. L'utilisation de biosurfactants dans ce processus de nettoyage réduit la viscosité du produit et favorise la formation d'émulsions huile/eau pour faciliter le pompage du résidu et la récupération du pétrole brut suite à la dégradation de l'émulsion. L'utilisation de biosurfactants plutôt que de surfactants conventionnels dans le nettoyage des réservoirs permettrait le nettoyage et la récupération de 90 % des hydrocarbures dans les résidus [54].

II.2.3.4 Remobilisation des HAP par utilisation des biosurfactants :

Bien qu'ils aient été utilisés dans de nombreux domaines, les tensioactifs d'origine biologique voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sols.

La remédiation assistée par les biosurfactants présente de nombreux avantages. West et Harwell (1992) indiquent que les tensioactifs cationiques se sorbent fortement aux sols. Or, les molécules d'origine biologique ont le plus souvent un caractère non ionique ou anionique qui les rend moins sensibles à la sorption sur les sols. De plus, ils ont des CMC moindres que leur homologue chimique, ce qui les rend efficaces à de plus faibles concentrations. Enfin le caractère peu toxique et biodégradable des biotensioactifs facilite leur utilisation [56].

➤ Modes d'action de biosurfactants dans les applications environnementale :

Les tensioactifs agissent de façons différentes : par mobilisation et par solubilisation.

- **Mobilisation :**

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants à diminuer les tensions interfaciales entre les NAPL (non aqueous phase liquids) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface du NAPL [57].

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions [58].

- **Solubilisation :**

La solubilisation est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes [59].

Généralement, en delà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effets sur la plupart des hydrocarbures [60]. Au-dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des hydrocarbures dans les micelles apparaît, permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente.

Ainsi, pour que les micelles se forment, il faut ajouter suffisamment de biosurfactant pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC réelle. La sorption dépend donc de la concentration de biosurfactant en solution [61].BAI et al. (1998) [62] indiquent qu'à de fortes concentrations, la solubilisation est le mécanisme principal.



Partie expérimentale

II.1. Matériel et méthodes

Conditions de travail :

Toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans le travail microbiologique, en utilisant un matériel stérilisé à proximité de la flamme d'un bec benzène, en passant à la flamme les orifices des tubes et des flacons ; et une stérilisation de tous ce qu'est liquide par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

➤ Milieux de cultures utilisées :

Dans ce travail nous avons utilisé deux milieux de culture, l'un pour la croissance des bactéries productrices et l'autre pour la production de biosurfactant.

○ Milieu LB (Luria Bertani) :

- 10 g peptone,
- 5 g extrait de levure,
- 30 g NaCl,
- 1L d'eau distillée.

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

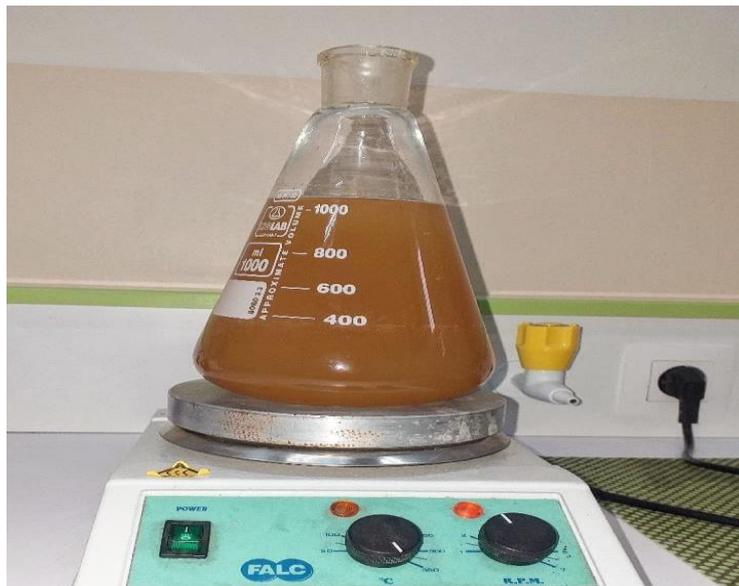


Figure II.1: Milieu LB en cours de préparation

○ **Milieu Minimum (MM) :** figure 11

- 0.4g NH_4NO_3 ,
- 0.3g K_2HPO_4 ,
- 0.3g KH_2PO_4 ,
- 30g NaCl ,
- 0.33g MgCl_2 ,
- 0.05g CaCl_2 ,
- 0.1g Extrait de levure,
- 1L d'eau distillée.
- 1 mL de solution d'oligoéléments préparée en 1L d'eau distillée (0.64g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.11g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.79g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 0.15g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Le pH du milieu est ajusté à $8,0 \pm 0,2$ avec une solution de la soude caustique NaOH (1 mol/L) selon Eddouaouda et al. [63].

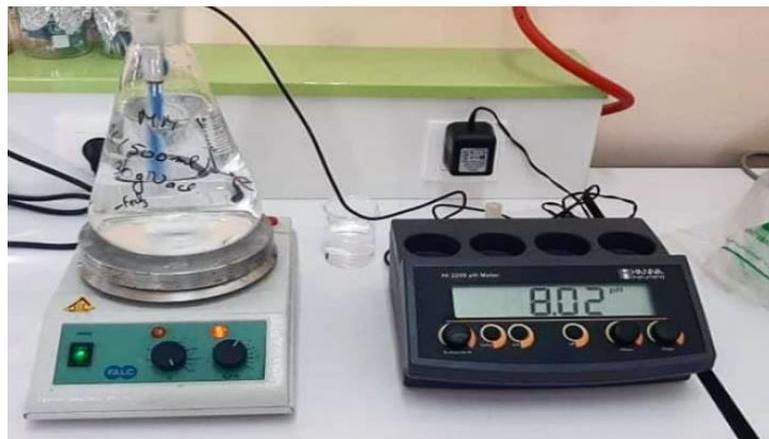


Figure II.1 : Ajustement de pH de milieu MM.

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

➤ **Sources de carbone pour le criblage :**

Nous avons utilisé trois sources de carbone hydrophobes pour la production de biosurfactant : huile d'olive, pétrole brute et gasoil. Elles sont ajoutées au milieu à raison de 2% après son stérilisation sur des filtres à seringue de $0,45\mu\text{m}$ stérile.

II.1.1 Isolement des souches productrices de biosurfactant :

II.1.1.1 Biotope :

Le site retenu pour l'isolement des souches bactériennes aptes à croître dans des conditions de salinité proches à celles de l'eau de mer est le port de pêche de Khemisti (wilaya de Tipaza). Le choix de ce site est justifié par la forte contamination en produits pétroliers, essentiellement des huiles de vidange et de carburants, ce qui augmente la probabilité d'existence de ce type de microorganismes. Sachant que les microorganismes à fort potentiel de production de biosurfactants sont d'origine marine [64].

II.1.1.2 Echantillonnage :

Le prélèvement a été réalisé sur la couche superficielle du sédiment, le sédiment a été prélevé dans des récipients en polypropylène stériles. Le transport des échantillons jusqu'au laboratoire a été effectué dans une enceinte thermostatée à +4 °C. Cette partie du travail a été réalisée par l'équipe de biomolécules du laboratoire de recherche de chimie des substances naturelles et de biomolécules (université Blida 1)

II.1.1.3 Isolement :

Afin de sélectionner les populations bactériennes, nous avons utilisé la méthode d'enrichissement, qui consiste à inoculer le consortium microbien du sédiment dans le milieu minimum, dont le pétrole brut est la seule source de carbone et d'énergie. Des repiquages successifs ont été réalisés périodiquement.

Le protocole est détaillé comme suit :

Une quantité de 10 g de sédiment, prélevée à l'aide d'une spatule stérile, est ajoutée dans un volume de 100 mL de milieu minimum. Le contenu est agité au vortex pendant 2 min pour libérer le consortium bactérien du sédiment. Le pétrole brut est additionné au milieu à raison de 1% (v/v). Le milieu de culture est incubé à 30 °C sous une agitation de 150 tr/min.

Un témoin contenant de milieu MM et de pétrole est ainsi préparé. A la fin de cette étape, des dilutions décimales sont préparées à partir de 1 mL d'inoculum de la suspension bactérienne. Un volume de 0,2 mL de chaque dilution est étalé sur la surface du milieu LB. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant deux jours.

II.1.1.4 Purification :

Les colonies obtenues font l'objet de purification par repiques successives sur milieux LB solides, jusqu'à l'obtention des isolats purs.

II.1.1.5 Conservation des isolats purifiés

- **Conservation à court terme :**

A l'aide d'une anse stérile, les tubes à vis contenant le milieu LB solide incliné sont ensemencés en stries par fragment de colonies des isolats purifiés. Les tubes sont incubés à 30 °C jusqu'au développement des colonies bactériennes (48 h), puis conservés à +4 °C.

- **Conservation à long terme :**

Une suspension bactérienne en phase exponentielle est mélangé au glycérol stérile à raison de 30% afin d'empêcher la rupture des membranes cellulaires. Le mélange (glycérol/suspensions bactériennes) est homogénéisé au vortex. Ensuite, il est conservé à une température de -40 °C [65].

II.1.2 Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant

II.1.2.1 Repiquage des souches

La technique d'ensemencement complète vise à favoriser la multiplication des bactéries sur un milieu nutritif. La bactérie est prélevée à l'aide d'un écouvillon stérile est mis dans des boîtes de Pétri. Ces boîtes sont aussitôt étiquetées. Elles sont déposées dans l'incubateur à 30 °C pendant 24h et puis conservé à 4 °C.

II.1.2.2 Préculture :

La préculture est effectuée dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu LB. Après avoir stérilisé le milieu LB par autoclavage, on prélève un échantillon de la souche bactérienne à l'aide d'une anse en platine stérile, et on le met dans le milieu LB (erlenmeyer fermé hermétiquement), ensuite L'erlenmeyer est mis dans un incubateur (shaker) à 30 °C sous agitation (200 rpm) pendant 24h.

II.1.2.3 Culture de production :

Les isolats bactériens purifiés passant par une étape de criblage de leur capacité à utiliser l'huile d'olive comme seule source de carbone et d'énergie [66]. Chaque isolat est donc, cultivé dans le MM ajoutée d'huile d'olive.

Dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de MM, une préculture bactérienne est inoculée à raison de 2% (v/v). Ensuite, un volume de 1 mL d'huile d'olive est ajouté. Les erlenmeyers sont incubés à 30 °C sous une agitation de 200 tr/min pendant 3 jours.

II.1.2.4 Evaluation de la production de biosurfactant :

La production du biosurfactant a été détectée par la mesure de trois grandeurs qui sont le déplacement de pétrole DDP, la tension superficielle (TS) et l'indice d'émulsification (E_{24}). Pratiquement, un volume bien déterminé de la culture bactérienne a été centrifugé à 4500 tr/min pendant 30 mn à 4°C, le surnageant récupéré est utilisé pour les techniques de mesure ci-dessous.

✓ Déplacement de pétrole DDP :

Dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, on dépose 40 mL d'eau distillée, puis on rajoute une quantité de 100 μ L de pétrole à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau on dépose 20 μ L de surnageant de culture au centre délicatement. Après 30 secondes, on mesure le diamètre de déplacement de pétrole halo (zones claires). Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante.

✓ Tension superficielle (TS) :

La TS du surnageant de culture est mesurée à l'aide d'un tensiomètre (modèle GIBERTINI TSD 132389) (cf. figure 12).



Figure II.1.2.3: technique de mesure de la TS à l'aide de tensiomètre.

✓ **Test d'émulsification (E₂₄) :**

Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe (huile d'olive) dans une phase hydrophile (le milieu de culture). Le protocole consiste à mélanger 4 mL de surnageant avec 4 mL d'huile d'olive dans des tubes. Les tubes sont agités au vortex pendant 2 min puis laissés se reposer pendant 24 h à l'obscurité, les comparer au témoin qui est constitué du 4 mL d'huile d'olive incorporés dans 4 mL de l'eau distillé. Nous avons calculé l'indice d'émulsion (E₂₄) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante.

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

E₂₄ : Activité d'émulsification après 24h.

He : Hauteur de l'émulsion formée.

Ht : Hauteur totale du mélange.

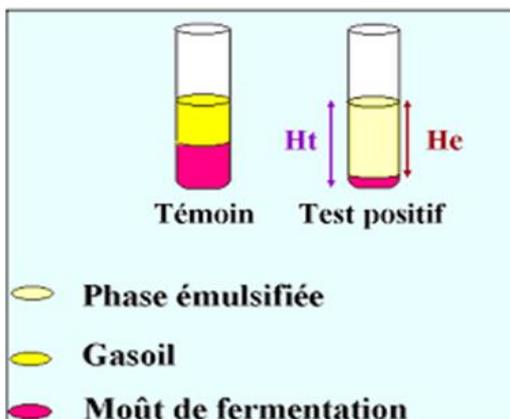


Figure II.1.2.3 : Agitation par vortex dans le test d'émulsification

Après cette étape de criblage, la meilleure souche bactérienne ayant une croissance maximale sur l'huile d'olive traduite par un trouble blanc savonneux, DDP, TS et E₂₄ est retenue pour la suite du travail.

II.1.3 Optimisation des facteurs la production

II.1.3.1 Influence de la source de carbone

Trois sources de carbone de concentration 1% (v/v) ont été utilisées : huile d'olive, pétrole brut et gasoil. Les substrats ont été stérilisés sur un filtre 0,22 µm.

II.1.3.2 Influence de la source d'azote :

Trois sources d'azote de concentration de 0,4 g/L ont été évaluées avec la meilleure source de carbone. Il s'agit de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), de nitrate de potassium (KNO₃), et de nitrate d'ammonium (NH₄NO₃). Ces composés ont été stérilisés séparément sur filtre seringue (0,22 µm).

II.1.3.3 Influence de la salinité :

L'effet de la salinité a également été étudié. En effet, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au MM (avec les paramètres optimisés) à différentes concentrations : 0 ; 10 ; 30 g/L NaCl.

II.1.4 Cinétique de production de biosurfactant :

II.1.4.1 Evaluation de paramètres de suivi :

➤ Evaluation de la croissance bactérienne :

Nous avons mesuré la densité optique (DO) chaque jour à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Rayleigh UV 2601) pour vérifier la croissance bactérienne à 600 nm.

➤ Evaluation de production de biosurfactant :

Nous avons évalué la cinétique de production de biosurfactant par les mêmes paramètres cités dans la section II.1.2.4 durant 7 jours en mesurant la TS, DDP et E₂₄.

II.1.5 Production de biosurfactant dans le milieu optimisé

Le milieu minimum MM est le milieu utilisé pour la production de biosurfactant, la production est effectuée dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de MM, à l'aide d'une micropipette on ajoute 1 mL de source de carbone (huile d'olive) et 2 mL de la préculture au milieu, ensuite l'erlenmeyer est mis dans un incubateur à 30 °C sous agitation (150 rpm) pendant 48h.

II.1.6 Récupération de biosurfactant contenu dans le surnageant :

II.1.6.1 Centrifugation

Après avoir une production maximale de biosurfactant en 48h, nous repositionnons le contenu de l'erlenmeyer dans des flacons spéciaux et mettons dans la centrifugeuse à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C afin de récupérer le surnageant et éliminer la biomasse par filtration sur un papier filtre (0,45µm).

II.1.6.2 Acidification :

Nous avons abaissé le pH de surnageant à 2, en ajoutant une solution de HCl (6M), puis on les laisse au réfrigérateur pendant 24 h. On centrifuge en deuxième fois le surnageant à 4500 tr/min pendant 30 min à 4 °C pour confirmer l'existence de biosurfactant (soit dans le culot ou dans le surnageant). Après avoir testé les deux parties (culot + surnageant) nous avons confirmé que le biosurfactant existe dans le surnageant.

II.1.6.3 Extraction de biosurfactant :

Le surnageant récupéré qui contient le biosurfactant est extrait par mélange avec l'acétate d'éthyle (v/v). Le mélange est soumis à une agitation vigoureuse dans une ampoule à décanter puis laisse au repos quelques min (**Figure 13**).

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

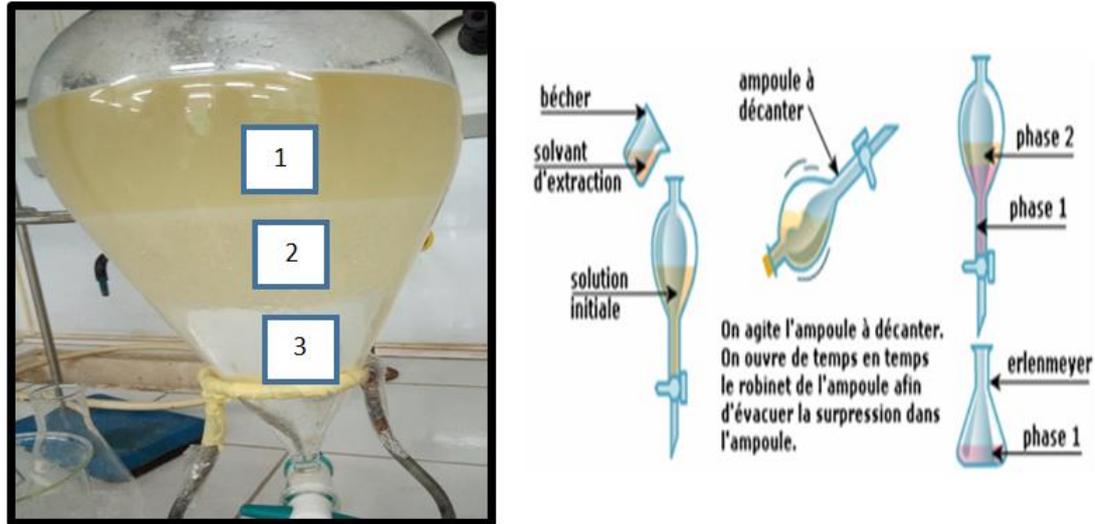


Figure II.1.6.3 : Principe de l'extraction par solvants.

II.1.7 Essai de l'application de biosurfactant dans la remobilisation d'huile de moteur contaminant le sable :

Nous avons choisi une colonne de verre de 40 cm de hauteur et 3 cm de diamètre, on remplit la colonne avec le mélange composé de 100 g de sable et 10% (10 mL) de l'huile de moteur (usée). Ensuite on immerge la surface avec 100 mL de biosurfactant brut sous l'action de la gravité. La colonne reste fermée pendant 2h afin de laisser le surnageant (BS) en contact avec l'huile dans le sable. Puis on suit la percolation de la solution de biosurfactant pendant 24h. Après le lavage de la colonne avec de l'hexane qui élimine l'huile restante (résiduelle) [67]. En dernière étape, on évapore le solvant par l'évaporateur à vide (rotavapeur) puis on détermine la quantité d'huile éliminée par gravimétrie avec la formule suivante :

$$\text{Huile récupérée} = (h_i - h_r) / h_i * 100$$

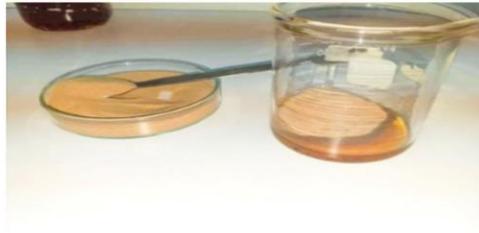
Avec :

h_i : est la masse d'huile initial dans le sable avant le lavage en g.

h_r : est la masse d'huile restant dans le sol après le lavage en g.

Nous avons utilisé l'eau distillée comme un témoin en suivant les mêmes étapes.

**Mélanger de sable avec l'huile de
moteur**



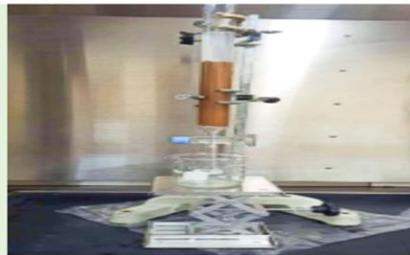
Ajoute le biosurfactant brut



Remplir la colonne avec le mélange



Suivi la percolation pendant 24h



Elimination d'huile



Figure 14: Protocol d'élimination d'huile contaminant le sable.



Chapitre II
Résultats et discussions

II.2.1 Isolement et criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactant

En effet, dix souches bactériennes aérobies ont été isolées à partir d'un sédiment contaminé par des hydrocarbures pétroliers. Le criblage est basé sur l'aptitude bactérienne à croître dans un milieu à base de l'huile d'olive comme unique source de carbone et d'énergie. Les résultats de criblage (TS, DPP et E₂₄) sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : TS, DDP et E₂₄ des souches bactériennes cultivées dans le MM après 3 jours d'incubation.

Souches bactérienne	TS (mN/m)	DDP (mm)	E ₂₄ (%)
S4	38,4	15	-
S7	28,36	26	
S8	39,2	19,5	++
S9	31,6	30	++
S11	29,06	31,5	++
S12	33,36	60	+++
S13	30,6	22	±
S14	35,63	17	++
S15	36,43	18	-
S16	31	35,5	++

- : Pas d'émulsion ; + : Présence d'émulsion ; ++ : émulsion moyenne ; +++ : émulsion importante

D'après les résultats obtenus, quatre souches (S7, S11, S12, S16) ont été choisies comme des souches productrices des biosurfactants. La souche bactérienne S12 s'est révélée la plus performante, en tenant compte de l'abaissement de la tension de surface jusqu'au 33,36 mN/m, un halo de diamètre de 60 mm et formation d'une émulsion importante. Cela indique que la souche S12 est une bonne productrice de biosurfactant avec un caractère de déplacement de pétrole le plus élevé qui pourrait être applicable dans le domaine environnemental. Les résultats de la souche S12 sont donnés dans les figures 15 et 16.



Figure 15 : Déplacement de pétrole de la souche S12.

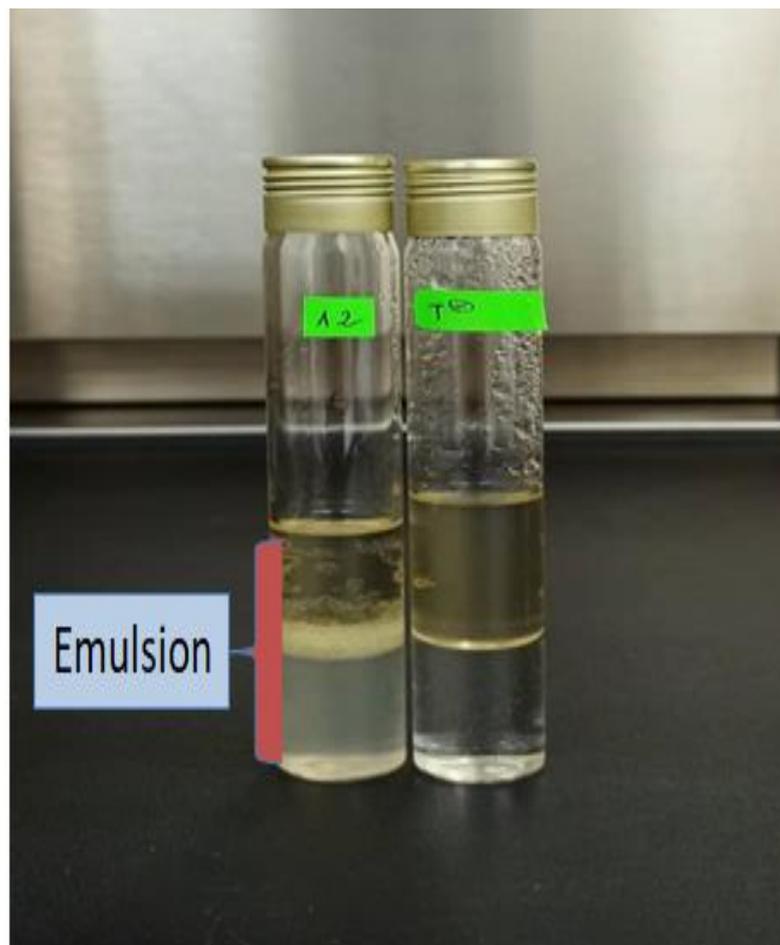


Figure 16: Résultat de test E₂₄ de la souche 12

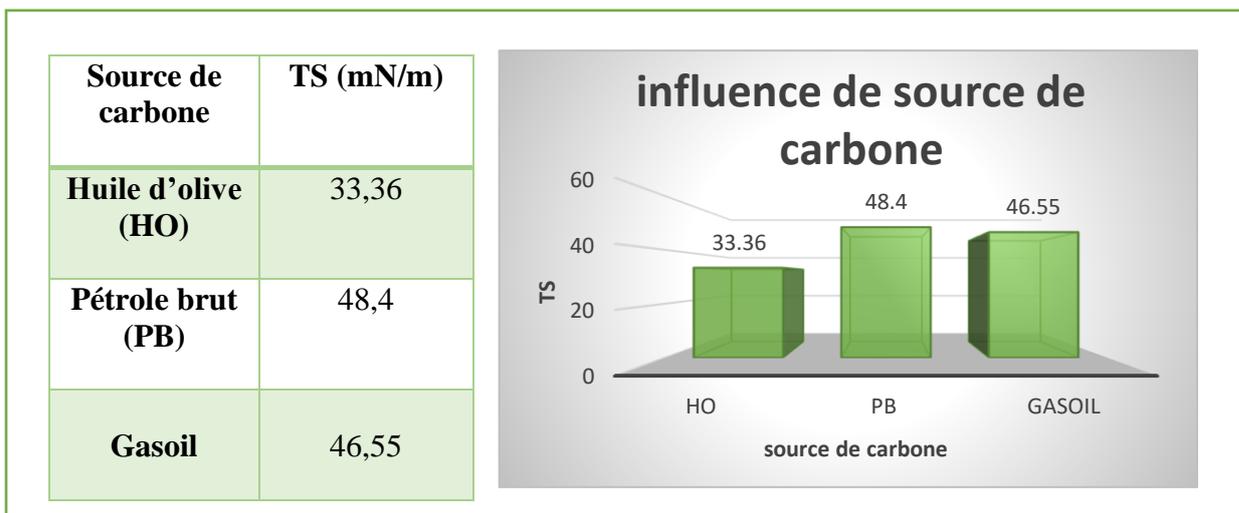


Figure 17: Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant de la souche S12.

II.2.2 Optimisation des paramètres de production

II.2.2.1 Influence de la source de carbone

Trois sources de carbone ont été testées pour la production de biosurfactant : l'huile d'olive, pétrole brut et gasoil. La source de carbone a été supplémentée dans le MM à raison de 1% (v/v). L'influence de la source de carbone sur la production est montrée dans la figure ci-dessous.

D'après les résultats obtenus on remarque que la réduction maximale de la TS est à 33,36 mN/m obtenue avec l'huile d'olive, donc elle est considérée comme une meilleure source de carbone pour la production de biosurfactants de la souche S12.

Eddouaouda et al. [68] ont trouvé que l'huile d'olive est la meilleure source de carbone suivie respectivement par l'huile végétale, l'hexadécane et le pétrole. De même, Abouseoud et al. [69] ont remarqué une réduction de la tension de surface similaire avec l'huile d'olive, le glucose et l'hexadécane, alors que l'activité émulsifiante demeure la plus élevée avec l'huile d'olive. Egalement, Khopade et al. [70] ont testé dix (10) substrats carbonés : huile d'olive, hexadécane, galactose, glucose, amidon, mannitol, saccharose, tréhalose, maltose et fructose. L'huile d'olive a conduit à une réduction de TS la plus importante (30 mN/m) et un indice d'émulsification le plus élevé (80%).

II.2.2.2 Influence de la source d'azote :

Trois sources d'azote ont été testées pour la production de biosurfactants, il s'agit du chlorure d'ammonium (NH_4Cl), du nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), et du nitrate de potassium (KNO_3) comme source d'azote organique. La source d'azote a été supplémentée dans le MM à raison de 0,4 g/L. L'influence de la nature de la source d'azote sur la production, est montrée dans la figure ci-dessous.

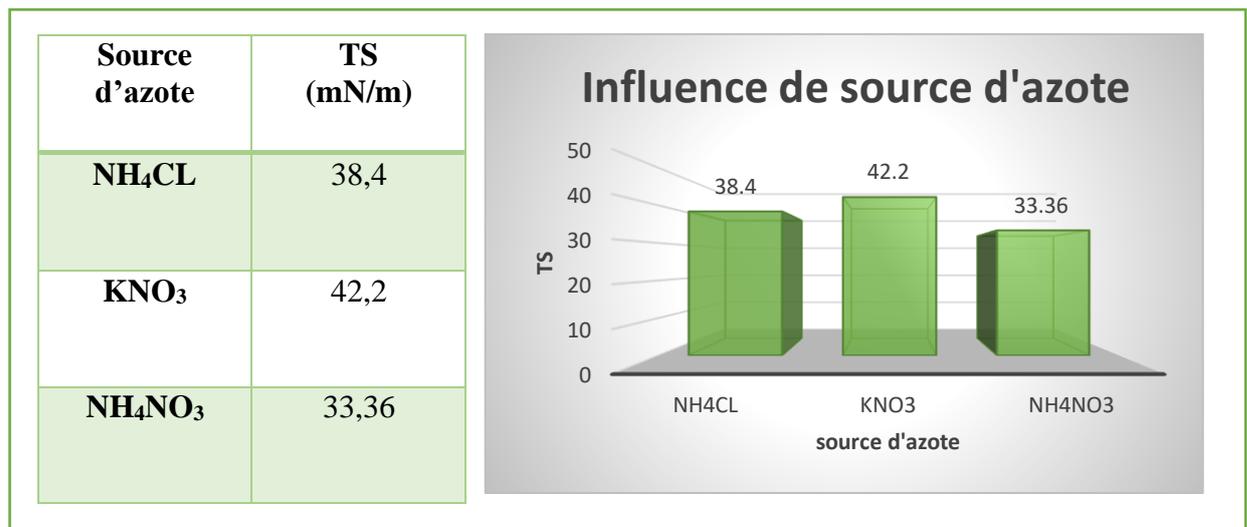


Figure 18 : Influence de la nature de la source d'azote sur la production de la souche S12.

D'après les résultats obtenus on remarque que la réduction maximale de la TS est de 33,36 mN/m obtenue avec le nitrate d'ammonium, donc la meilleure source d'azote en production de biosurfactants est le nitrate d'ammonium pour la souche S12.

Khopade et al. [70] ont constaté que le chlorure d'ammonium stimule bien l'anabolisme microbien sans être la meilleure source de la production de biosurfactants.

II.2.2.3 Influence de la salinité :

L'effet de la salinité du milieu a été étudié en faisant varier la concentration du chlorure de sodium (NaCl) comme suit : 0, 10, 30 g/L. L'influence de la salinité sur la production est montrée dans la figure ci-dessous.

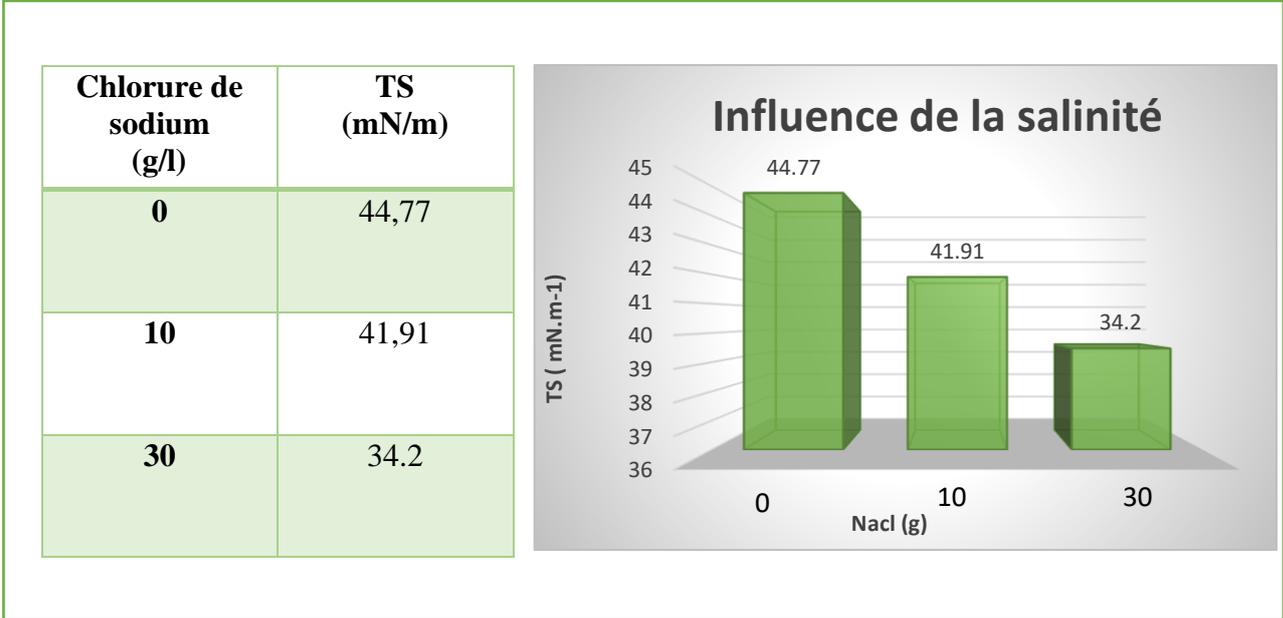


Figure 19 : Influence de la salinité sur la production de la souche N12

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'une salinité supérieure à 30 g/L réduit l'activité de surface du biosurfactant. Donc la meilleure production par la souche N12 était dans un milieu salin.

Gandhimathi et al. [71] ont étudié l'influence de la salinité sur la synthèse de biosurfactant par l'actinobactérie marine *Nocardiopsis alba* MSA10 dont la production était maximale à une salinité de 10 g/L de NaCl. Des salinités supérieures (jusqu'à 35 g/L NaCl) réduisent l'activité de surface du biosurfactant. Thavasi et al. [72] ont abouti à une production maximale de biosurfactant pour une salinité de 30 g/L de NaCl par *Bacillus megaterium* isolée à partir d'une eau de mer.

II.2.3 Cinétique de la production :

Cette partie du travail consiste à réaliser une production de biosurfactant et suivre les paramètres tels que la croissance bactérienne par la mesure de la densité optique DO à 600 nm, le déplacement de pétrole DDP, la tension de surface TS, et l'indice d'émulsification E24% en fonction du temps d'incubation. Les mesures ont été prises durant 7 jours, les tableaux et les courbes suivants résument le travail qui a été fait.

II.2.3.1 Croissance bactérienne

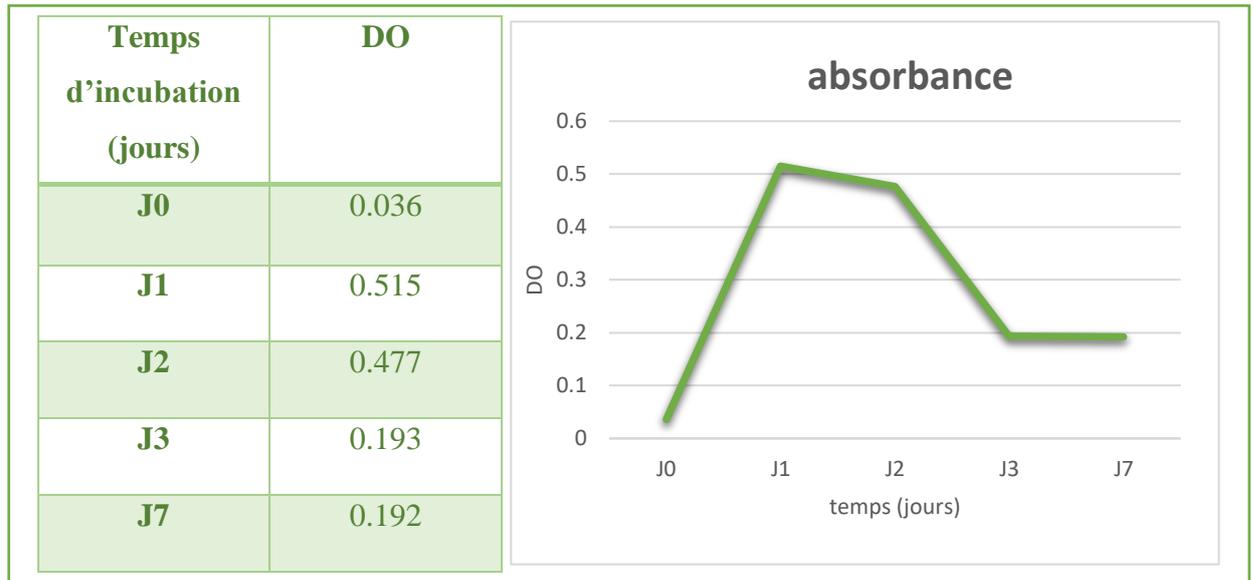


Figure 20 : Evaluation de l'absorbance en fonction de temps.

Les résultats obtenus montrent que la croissance de la souche S12 était maximale durant la phase d'accélération (J0_ J1), du premier jour au deuxième jour la phase exponentielle commence, suivie de la phase de décélération, à partir du troisième jour la phase stationnaire a été achevée.

II.2.4 Suivre de la production de biosurfactant

IV.2.4.1 Déplacement de pétrole :

Les résultats du test de déplacement de pétrole montrent que le surnageant de culture a provoqué une zone de déplacement de pétrole visible (**Figure 21**) ; ce qui suggère une activité de surface, ce qui est un indicateur de présence de biosurfactant.

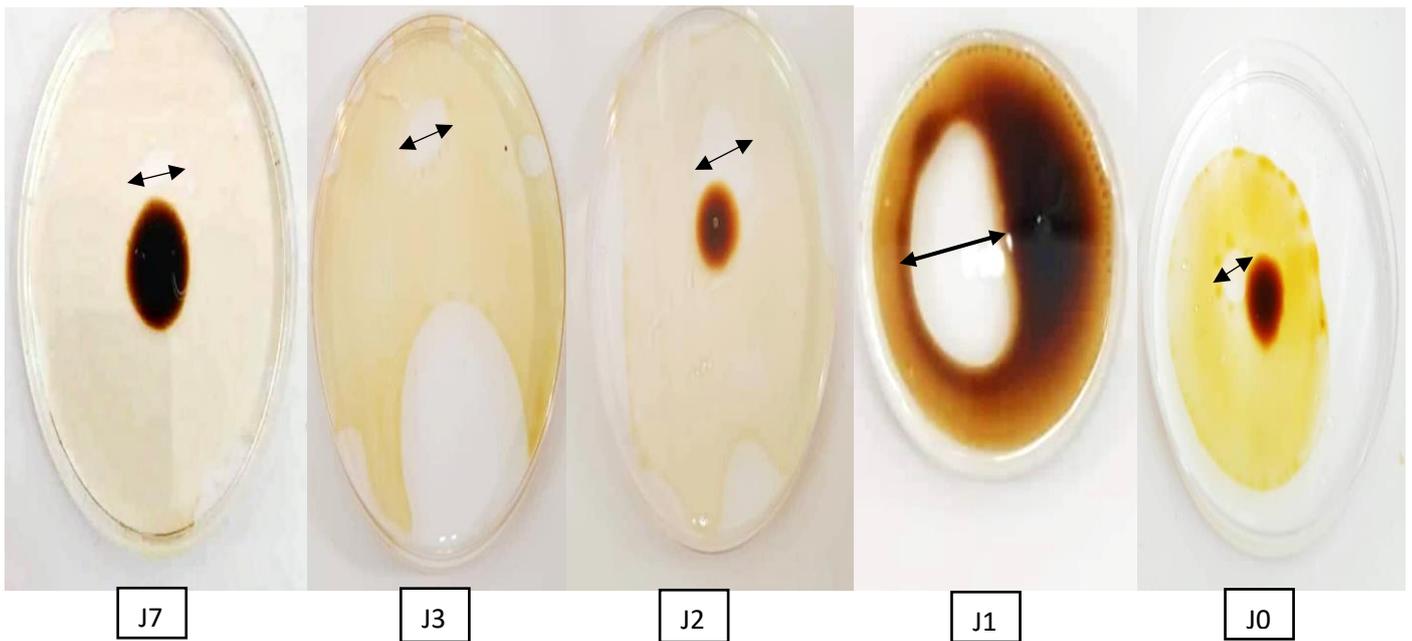


Figure 21: Déplacement de pétrole de la souche S12 durant 7 jours d'incubation.

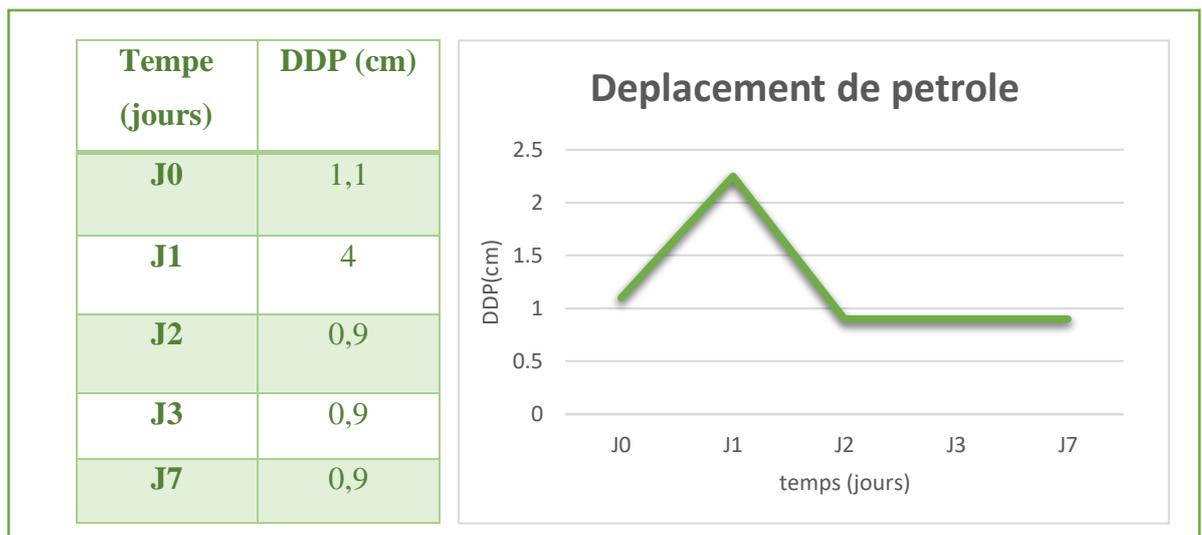


Figure 22 : Evaluation de déplacement de pétrole

Les résultats expérimentaux montrent clairement que la plus grande zone de déplacement obtenue après 24h d'incubation.

Noha et al. [73], ont rapporté que la technique de « Déplacement du pétrole » est une méthode fiable pour mise en évidence de la production de biosurfactants. Čipinytė, et al. [74], ont rapporté la présence d'une relation proportionnelle entre la concentration des biosurfactants et la surface de la zone claire de déplacement du pétrole.

II.2.4.2 Tension de surface TS :

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles ; Les résultats obtenus montrent que la TS du surnageant décroît avec le temps pour atteindre une valeur minimale de 31,4 mN.m⁻¹ au bout de 24h, puis elle augmente légèrement jusqu'au dernier jour.

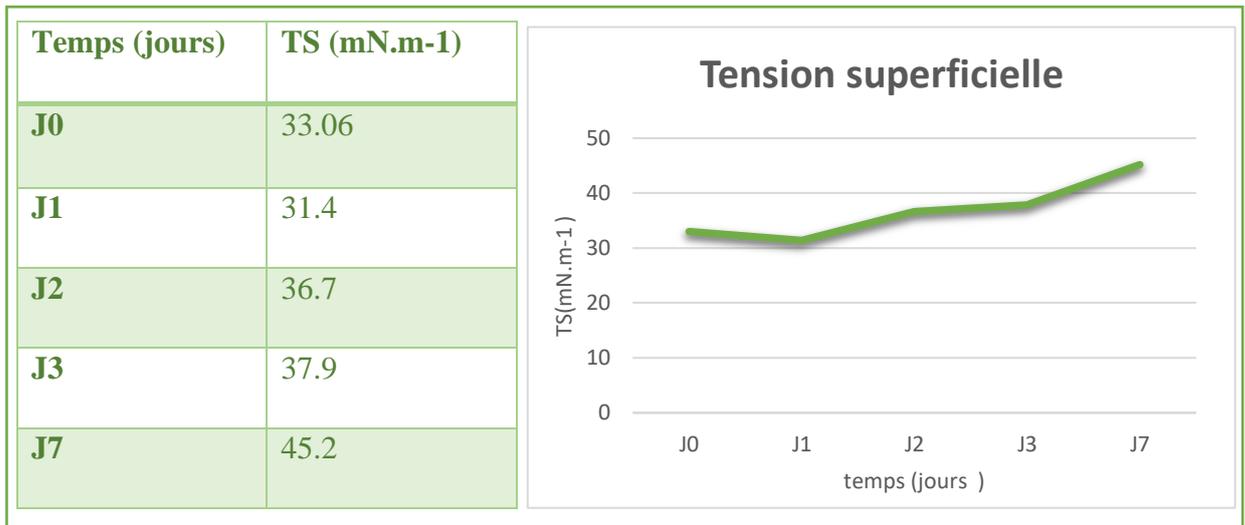


Figure 23: Evaluation de tension de surface en fonction du temps d'incubation

Mulligan et al. [25] ont indiqué qu'un bon biosurfactant peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72mN/cm à 35mN/cm, et la tension inter-faciale (entre un liquide polaire et apolaire) de l'eau contre le n-hexadécane de 40 mN/cm à 1 mN/cm. Banat et al. [75], ont isolé de nombreuses bactéries capables de réduire la tension superficielle du milieu de culture même à des valeurs inférieures à 40 mN/m et ont constaté que les rhamnolipides et les surfactines produites chez *P. aeruginosa* et *B. subtilis* ont manifesté une importante capacité de réduction de la tension superficielle de l'eau de 72 à 30 mN/m.

II.2.4.3 Test d'émulsification E₂₄ :

Dans le but de suivre la production des biosurfactants chez la souche isolée, le test d'émulsification (E₂₄) est mis en évidence. Ce dernier consiste à l'homogénéisation d'un volume de milieu de culture avec le même volume de l'huile d'olive durant 7 jours d'incubation.

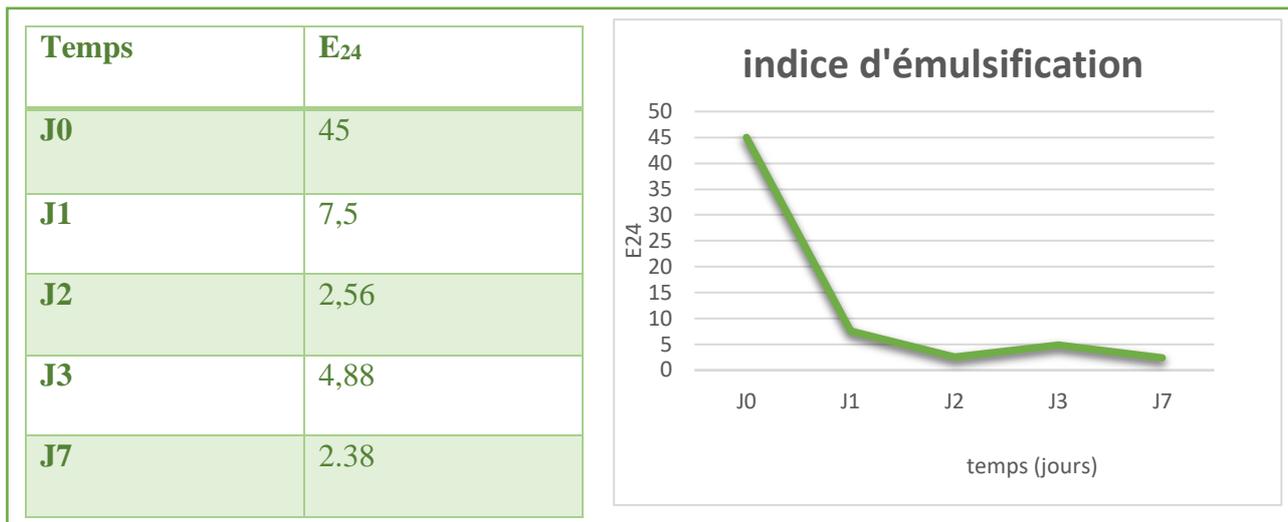


Figure 24 : Indice d'émulsification (E₂₄) obtenu par la souche bactérienne S12 durant les 7 jours.



Figure 25: Résultats de test E₂₄ (%).

Les résultats obtenus indiquent que souche S12 est productrice de biosurfactants avec un indice émulsifiant de 45% dès le premier jour d'incubation.

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

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

Pereira et al. [77] ont isolé une souche appartenant au genre de *B. subtilis* à partir d'un champ pétrolier au Brésil, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadécane de 52,7%. Des résultats proches ont été enregistrés chez la même espèce par Benincasa et Accorsini, [78] et Lovaglio et al. [79], avec un index d'émulsion de 50% et 58% respectivement. Patel et Desai, [80], et Wei et al. [81] ont rapporté que différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles, nous pouvons dire que dans ce cas le biosurfactant peut faire l'objet d'une application environnementale.

D'après les résultats obtenus nous pouvons remarquer que la production optimale est obtenue après 24h d'incubation ce qui veut dire une production durant la phase d'accélération de croissance bactérienne, donc on suggère que le biosurfactant produit par la souche S12 est un métabolite primaire.

De nombreux cas de production de biosurfactant comme métabolite primaire (indépendamment de la nature de la source de carbone inductrice) ont été listés dans la littérature. Khopade et al. [70] ont rapporté la production d'un biosurfactant comme métabolite primaire par la souche marine *Nocardiopsis sp.* B4 inoculée sur l'huile d'olive. De même pour la souche *Planococcus halotolerante* utilisée en présence de l'hexadécane et les souches *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 et *Pseudomonas taiwanensis* L1011 cultivées respectivement sur le glycérol et le D-mannitol. La souche *Pseudomonas fluorescens migula* 1895ensemencée sur l'huile d'olive produit un biosurfactant associé à la cinétique de croissance [56]. D'autres travaux ont aussi rapporté la synthèse de biosurfactant comme métabolite secondaire. Haba et al. [82] ont constaté qu'un rhamnolipide, issu de *Pseudomonas* 44T1 en présence de l'huile de friture, est produit en grande quantité durant la phase stationnaire de croissance. En 2017, Santos et al. [83] ont abouti à une production maximale de biosurfactant durant la phase stationnaire en cultivant la levure *Candida lipolytica* dans un milieu contenant les graisses animales et de la liqueur de maïs. Un rhamnolipide produit par la souche *Burkholderia thailandensis* E264 inoculée sur le glycérol, le biosurfactant est synthétisé en tant que métabolite secondaire [84].

II.2.5. Production de biosurfactant :

Après 24h d'incubation dans les conditions optimales, la production de biosurfactant par la souche bactérienne S12 a été étudiée sur le milieu MM, on a remarqué une formation de l'émulsion qui indique la production de biosurfactant (**figure 26**).



Figure 26 : Production de biosurfactant par la souche bactérienne S12.

II.2.6. Extraction de biosurfactant :

Après avoir effectuée l'extraction de biosurfactant, nous avons obtenu les résultats suivants :

La technique par précipitation a présenté un précipité au fond du flacon avec une couleur blanchâtre (**figure 27**).

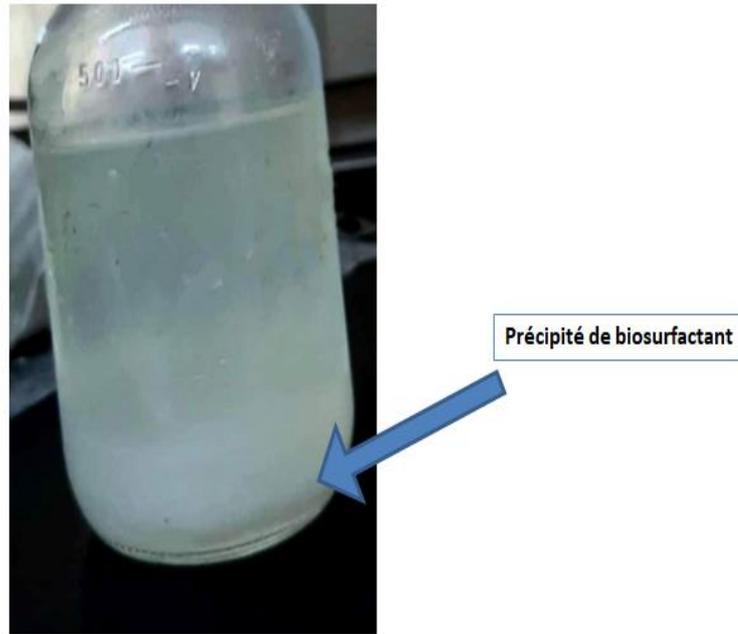


Figure 27 : Précipité de biosurfactant par acidification durant une nuit à pH 2

Après la récupération de précipité par neutralisation et testé par DDP, il a donné un résultat négative ce qui confirme que le biosurfactant est toujours resté dans le surnageant. C'est pour cela on a entamé la technique d'extraction par l'acétate d'éthyle, qu'a a donné après évaporation du solvant un extrait sous forme d'une poudre blanche soluble dans l'eau avec tous les caractères d'un biosurfactant (**figure 28**).

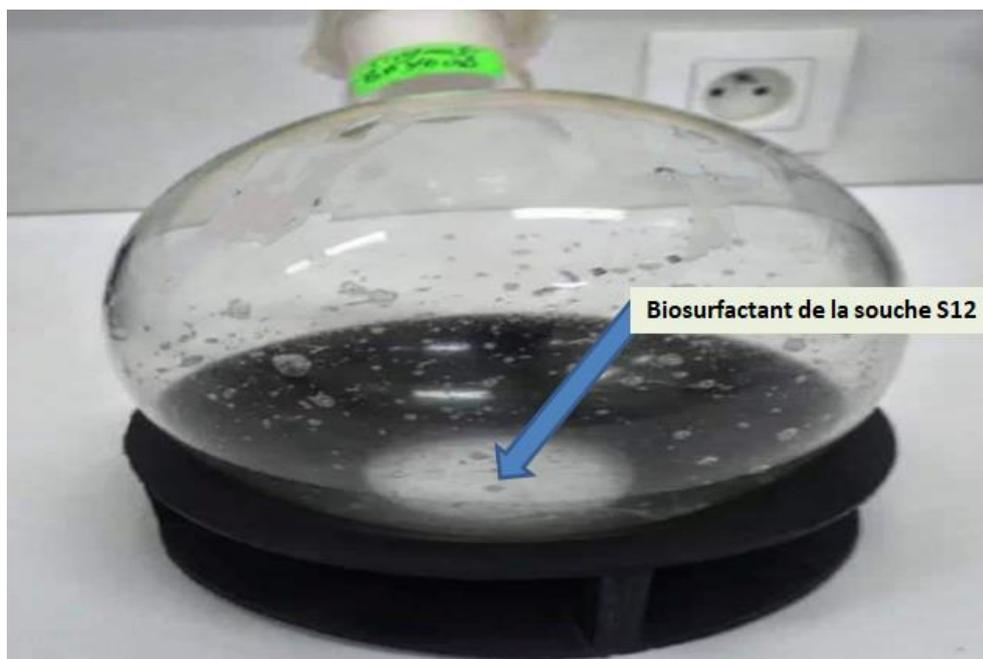


Figure 28 : Biosurfactant de la souche S12 après les étapes de l'extraction et évaporation

II.2.6.1 Rendement d'extraction:

$$R = (m_{\text{Biosurfactant récupéré}} / V_{\text{culture de production}}) \times 100$$

Avec :

$m_{\text{Biosurfactant récupéré}}$: masse de biosurfactant récupéré en grammes.

$V_{\text{culture de production}}$: volume de la culture de production en litre.

Le rendement d'extraction de biosurfactant brut est de l'ordre de 25 g.L⁻¹. Ce rendement de production obtenu avec la souche bactérienne S12 est fortement meilleur par rapport aux rendements obtenus cités dans la littérature. Abouseoud et al. [69], ont trouvé un rendement similaire (2 g/L) avec l'huile d'olive comme source de carbone. Ainsi, Edouaouda et al. [68], ont trouvé un rendement de 2.1 g/L de biosurfactant avec l'huile d'olive comme source de carbone. Wadekar et al. [85] ont obtenu un rendement de 2.8 g/L avec l'huile de friture à 5% (m/v) par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*. Ferhat et al. [86] ont trouvé un rendement de production de 2 g/L pour une souche de *Brevibacterium sp* et 2.5 g/L pour une souche de *Ochrobacterum sp* avec l'hexadecane à 2% (v/v) comme source de carbone.

De Gusmao et al (2010) [87] ont pu atteindre à un rendement de 7 g/L avec une souche de levure de *Candida glabrata* UCP1002 cultivée avec 5% (m/v) de graisses végétal. En 2020, Louiza et al. [88], ont obtenu un rendement de 13,15 g/L avec une souche *Penicillium sp. FS13* sur un milieu de culture à base de lactosérum et 8,05 avec une souche de *Cryptococcus ssp. YLF* sur un milieu de culture à base de jus de datte avec 2% de gasoil comme source de carbone .

II.2.7 Résultat de l'application de biosurfactants dans l'élimination de l'huile contaminant le sable :

$$\text{Huile éliminé (\%)} = (h_i - h_r) / h_i \times 100$$

Pour le surnageant :

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = (8.9306 - 0.1) / 8.9306 \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = 98\%$$

Pour l'eau distillée

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = (8.9306 - 5,04) / 8.9306 \times 100$$

$$\text{Pourcentage d'huile éliminé} = 39,17\%$$

La quantité d'huile éliminée avec le surnageant de culture était de 98%. Nos résultats ont été confirmés par le témoin (eau distillée) avec une élimination de 39,17 %. D'après ces résultats on peut dire que notre surnageant contenant le biosurfactant de la souche S12 est très efficace car presque la totalité d'huile de moteur a été éliminée par ce dernier.

De França *et al.* [89] ont étudié l'effet des différents surfactants (biosurfactant brut produit par une souche *Bacillus subtilis* ICA5 et le surnageant de culture, un surfactant anionique ; SDS, un surfactant non ionique ; Triton X-100) à une concentration de 250 mg.L⁻¹ et de l'eau distillée comme témoin, sur le lavage du pétrole brut et de l'huile de moteur à travers un sable. L'étude a montré que le biosurfactant est légèrement plus efficace dans l'élimination du pétrole brut et de l'huile de moteur par rapport au SDS et au Triton X-100 (76,89 ± 3,3 % contre 81,20 ± 0,6 et 76,10 ± 2,2 % et 88,60 ± 1,0 contre 79,20 ± 1,4 et 70,40 ± 0,5 % respectivement). L'eau distillée a conduit à une réduction seulement de 36 %. Le surnageant de culture a donné des meilleurs résultats par rapport au biosurfactant brut [90]. Jain *et al.* [91] ont étudié l'utilisation potentielle de deux biosurfactants pour éliminer l'huile dans des colonnes de verre par rapport aux surfactants synthétiques. Les résultats ont montré l'efficacité des biosurfactants produits par *B. subtilis* PT2 et *P. aeruginosa* SP4 dans l'élimination de l'huile de moteur, ils présentaient des valeurs de 68% et 57%, respectivement, par rapport aux tensioactifs synthétiques Tween 80 (52%), SDBS (51%) et Alfoterra 5PO-145 (55%). L'effet bénéfique des biosurfactants par rapport aux surfactants chimiques dans l'élimination des hydrocarbures dans le sol et l'amélioration de la biodégradation est ainsi reporté dans la littérature. Cameotra *et Singh* [92] ont prouvé que le traitement d'une boue huileuse par un biosurfactant brut (100 mL.kg⁻¹ de sol) induit mieux la biodégradation par rapport à une solution de nutriments (50 mL.kg⁻¹ de sol) dans un système inoculé avec un consortium bactérien. Le taux de biodégradation était de 95,3 ± 1,31% avec le biosurfactant brut comparé à 91,2 ± 1,65 % avec la solution de nutriments.

Conclusion générale

De nombreux problèmes environnementaux affectent notre monde entier, l'un de ces problèmes, est la pollution des sols, des eaux marines et douces par les hydrocarbures. L'Algérie est l'un des plus grands producteurs des hydrocarbures aux mondes, ce qui le rend vulnérable à la contamination.

L'objectif de notre travail est l'élimination des contaminants (hydrocarbures) à l'aide d'un biosurfactant produit par une souche bactérienne marine isolée localement.

La sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactant S12 a été fondée sur leur grand pouvoir émulsifiant, la valeur minimale de la tension superficielle et sur le grand diamètre de déplacement de pétrole dont nous avons utilisé l'huile d'olive comme unique source du carbone et d'énergie pour la production de biosurfactant de la souche S12. Cette dernière a montré une capacité productrice très acceptable avec un rendement très élevé de 25 g.L⁻¹ de biosurfactant brut.

De plus, le surnageant de culture était très efficace pour réussir une application environnementale en perspective de laver les sites contaminés par les hydrocarbures pétroliers. Le surnageant a donné des meilleurs résultats, il a éliminé 98% d'huile dans le sable, c'est un avantage en terme de coût, et en terme environnemental.

En dépit des nombreux succès obtenus en laboratoire dans la production de biosurfactants, la production de biosurfactants n'a pas encore été réalisée, elle reste un défi à l'échelle mondiale.

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

- ✓ Recherche approfondie pour optimiser les conditions de production et le processus d'extraction des biosurfactants.
- ✓ Etude approfondie sur la production de biosurfactants à partir de déchets agro industriels pour réduire les coûts de production et permettre la production à grande échelle de ces composés naturels.
- ✓ Elargissement de l'application de ce biosurfactant dans le domaine environnemental.

Références bibliographique

Références bibliographiques

- [1] Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., & Gurunathan, S. (2011). Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 174-181.
- [2] Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. & Fredrickson (1995) Characterisation of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1706-1713
- [3] Mokdad, K., Mesbaiah, F. Z., Eddouaouda, K., & Badis, A. (2016). Utilisation of agro alimentary wastes for bio surfactants production by a thermophilic bacterial strain novelty isolated from an Algerian crude oil contaminated soil. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 2(1).
- [4] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (3), 401.
- [5] Silva, R.C.F.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Farias, C.B.B., Filho, H.J.B., Santos, V.A., Singh, P., Patil, Y., Rale, V. 2007. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 1, 12.
- [6] Geetha, S., Banat, I.M., Joshi S.J. 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- [7] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [8] Healy, M.G., Devine, C.M. & Murph, R. (1996), Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*[Parra, J.L., Guinea J., Manresa, M.A., Robert, M., Mercade M.E., Comelles, F. & Bosch, M.P. (1989) Chemical Characterization and Physicochemical behaviour of biosurfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66 (1), 141-145 , 18, 41-57].

- [9] Makkar, R.S. & Cameotra, S.S. (2002) an update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 58: 428-434.
- [10] Desai J.D et Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. Vol. 61, No. 1, p. 47–64
- [11] Salihu, A., Abdulkadir, I., Almustapha, M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4(5), 111-117.
- [12] Padmapriya, B., Suganthi, S., Anishya, R. 2013. Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 13(2), 227-233.
- [13] Maneerat, S., Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J Sci Technol*, 29(3), 781- 791.
- [14] Ron E.Z. et Rosenberg E. (2002). Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 249-252
- [15] Kappeli, O., Finnerty, W.R. 1979. Partition of alkane by an extracellular vesicle derive from hexadecane grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol*, 140, 707–712.
- [16] Jarvis, F.G. & Johson (1949) a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* J. *Am.Chem. Soc.* 71: 4124- 4126.
- [17] Cooper D.G. et Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactants from *Torulopsis bombicola*. *App. Environ. Microbiol.*, Vol.47, 173-176.
- [18] Marahiel, M. A., Danders W., Krause M. et Kleincauf H. (1979). Biological Role of Gramididine S in Spore Function. *Studies on Gramicidine-S negative Mutants of Bacillus brev ATCC9999is*. *European Journal of Biochemistry*. 99-1; (49).50.
- [19] Kretschmer, A., Bock, H. & Wagner, F. (1982) Chemical and physical characterisation of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Appl.Environ. Microbiol.* 44(4): 864-870.
- [20] Vijayakumar, S., Saravanan, V. 2015. *Biosurfactants-Types, Sources and Applications*.

Res. J. Microbiol, 10 (5), 181-192.

[21] Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E.K. 2006. Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2), 279-283.

[22] Pruthi, V., Cameotra, S.S. 1995. Rapid Method for Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained by Acetone Precipitation. *Biotechnol Techniq*, Vol. 9, p. 271-276.

[23] Krepsky, N., Da Silva, F. S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C. 2007. Alternative Methodology for Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria. *Braz. J. Biol.*, Vol. 67, N°. 1, p. 117-124.

[24] Mata-Sandoval J.C, Karns J. Et Torrents A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci. Technol.*, 34, (23), 4923-4930

[25] Cameotra S.S. et Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 520-529.

[26] Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3280-3287.

[27] Mulligan C.N., Sharma S.K et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants research trends and applications. International standard book number: 13:978-1-4665-1724-4-7.

[28] Lang, S. & Wullbrandt D. (1999) Rhamnose lipids biosynthesis- Microbial production and Applications potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 22-32

[29] Guerra-Santos L.H., Kappeli O. et Fiechter A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 443-448. Guerra-Santos L.H., Kappeli O. et Fiechter A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 443-448.

[30] Ishigami Y., Gama Y., Nagahora H., Yamaguchi M., Nakahara H. Et Kamata T. (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant, *Chemistry Letters*, 763-766.

- [31] Champion J.T., Gilkey J.C., Lamparski H., Retterer J. et Miller R.M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane, *J. Environ. Qual.*, 24, 19-28.
- [32] Kosaric, N., Sukan, F.V. 2000. Biosurfactants. *Encyclopedia Microbiol.* 2e éd. 1: 618–635.
- [33] Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu Z. 1991. Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micellar nonionic surfactant solution, *Environ.Sci. Technol.*, 25(1), 127-133.
- [34] Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105, 43–50. Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105, 43–50.
- [35] Gogoi, D., Bhagowati, P., Gogoi, P. et al. 2016. “Structural and physico-chemical Characterization of a dirhamnolipid biosurfactant purified from *Pseudomonas aeruginosa*: application of crude biosurfactant in enhanced oil recovery,” *RSC Advances*, vol. 6, no. 74, pp. 70669–70681, 2016.
- [36] Parra, J.L., Guinea J., Manresa, M.A., Robert, M., Mercade M.E., Comelles, F. & Bosch, M.P. (1989) Chemical Characterization and Physicochemical behaviour of biosurfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66 (1), 141-145
- [37] Reiling, H.E., Wyass, U.T., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Kappelli, O; Fiechter, A. (1986) Pilot plant Production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 985-989
- [38] LARPENT C., 1995 – Tensioactifs. *TECHNIQUE DE L'INGENIEUR*, K342, 14 p.
- [39] Kroschwitz, J.I. (1994) *Encyclopedia of Chemical Technology* 4th edition, John Wiley & Sons, New York.
- [40] Wilson, A.J. (1996) “Foams, Surfactant Sciences Series” Vol. 57, Ed. Marcel Dekker, New York
- [41] Schwartz, A.M. & Perry, J.W. (1977) *Surface active agents and detergents*. Krieger A.E. Publishing Company, New York.

- [42] Pore J. (1992). Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, Editions Technique et Industries des Corps Gras, 270 p.
- [43] Haigh S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, *The Science of the Total Environment*, 185, 161-170. Haigh S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, *The Science of the Total Environment*, 185, 161-170.
- [44] Holmberg, K., Johson, B., Kromberg, B., Lindmann B. (2003) "Surfactants and Polymers, I Aqueous Solution", 2nd ed., John Wiley & Sons, England.
- [45] Habu E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R. et Manresa A. (2003). Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81, (3), 316-322.
- [46] Vaution, (1983) C., *Labo. Pharma. Probl. Techn.* 31: 531
- [47] Christofi N, Ivshina I.B, (2002). A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of Applied Microbiology*, 93: 915-929
- [48] Vipulanandan C. et Ren X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, *Journal of Environmental Engineering*, 126, (7), 629-634.
- [49] Page C.A, Bonner J.S, Kanga S.A, Mills M.A Et Auteurieth R.L. (1999). Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons, *Environmental Engineering Science*, 16, (6), 465-474.
- [50] Velikonja J. and Kosaric N., "Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York: Marcel Dekkar. *Biosurfactant: Production, properties and applications*, (1993). 419 - 449.
- [51] Cooper D.G. and Paddock D.A., "Torulopsis petrophilum and surface Activity", *Applied and Environmental Microbiology*, 46, (1983), 1426 – 1429.
- [52] Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.
- [53] Margesin R and Schinner F, *Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Applied and Environmental Microbiology*, 2001. **67 (7)**: p. 3127-3133.

- [54] Mulligan, C.N. et Wang, S. (2004). Remédiation d'un sol contaminé par des métaux lourds par une mousse de rhamnolipique dans *Génie géoenvironnemental, Gestion intégrée des eaux souterraines et des terrains contaminés*, Londres : Thomas Telford ; pp. 544-551..
- [56] WEST C.C. et HARWELL J.H., (1992), *Surfactants and subsurface remediation*, Environ.Sci. Technol., 36 (12) : 2324-2330.
- [57] MCCRAY J. E., BAI G., MAIER R. M. et BRUSSEAU M. L., (2001). Biosurfactant enhanced solubilization of NAPL mixtures, *J. Contam. Hydrol.*, 48 : 45-68.
- [58] BAI G., BRUSSEAU M. L. et MILLER R. M., (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, *J. Contam. Hydrol.*, 25. 157-170.
- [59] GABET S., (2004). 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, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p. 177.
- [60] PENNELL K. D., ABRIOLA L. M. et WEBER W. J., (1993). Surfactant- enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1 – Experimental Investigation. *Environ.Sci. Technol.*, 27 (12): 2332-2340.
- [61] VAN DYKE M. I., COUTURE P., BRAUER M., LEE H. et TREVORS J. T., (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.*, 39: 1071-1078.
- [62] Bai G., Brusseau M. L. et Miller R. M. (1998). Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon biosurfactant, *J. Contam. Hydrol.*, 30, 265-279
- [63] Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Ben Younes, S., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, M., Chamkha, M., Sayadi, S., « Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation », *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 408-418, (2011).
- [64] Zenati, B, étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : application en traitement des eaux de mer contaminée par le pétrole 2018

- [65] Franzetti, A., et al., Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. *Bioresource Technology*, 2012. 108: p. 245-251.
- [66] Eddouaouda, K., Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de Hassi Massoude contaminée par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio-surfactant, in Département de Chimie industrielle 2012, Saad Dahleb-Blida. p. 194.
- [67] Chaprão, M. J., Ferreira, I. N., Correa, P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, E. J., & Sarubbo, L. A. (2015). Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 471-479.
- [68] Eddouaouda, K., et al., Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *J Basic Microbiol*, 2012. 52(4): p. 408-418.
- [69] Abouseoud, M., et al., Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 2008. 223(1-3): p. 143-151.
- [70] Khopade, A., et al., Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, 2012. 285: p. 198-204.
- [71] Gandhimathi, R., et al., Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis Alba* MSA10. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2009. 32(6): p. 825-835.
- [72] Thavasi, R., et al., Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008. 24(7): p. 917-925.
- [73] Noha H.Y., Kathleen E. D., David P. N., Kristen N. S., Roy M. K et Michael J. M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56, 339–347
- [74] Čipinytė V., Grigiškis S., Šapokaitė D et Baškys E. (2011). Production of biosurfactants by *arthrobacter* sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment. Technology. Resources*. ISBN 97 8-9984-44-070-5.

[75] Banat I. M., Samarah N., Murad M.R. Horne., et Benerjee S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7:80–84.

[76] Mukesh Kumar DJ, Kalaichelvan PT, Suresh Chander CR and Lohitnath T. “Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food biopreservative“. *Advances in applied science research*, 3(3), (2012), 1827-1831.

[77] Pereira J.F.B., Gudiña E. J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A. , Coutinho J.A.P et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259–268.

[78] Benincasa M, et Accorsini F. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *BioresourceTechnology*, 99: 3843–3849

[79]

[80] Patel R. M. et Desai A. J. (1997). Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.

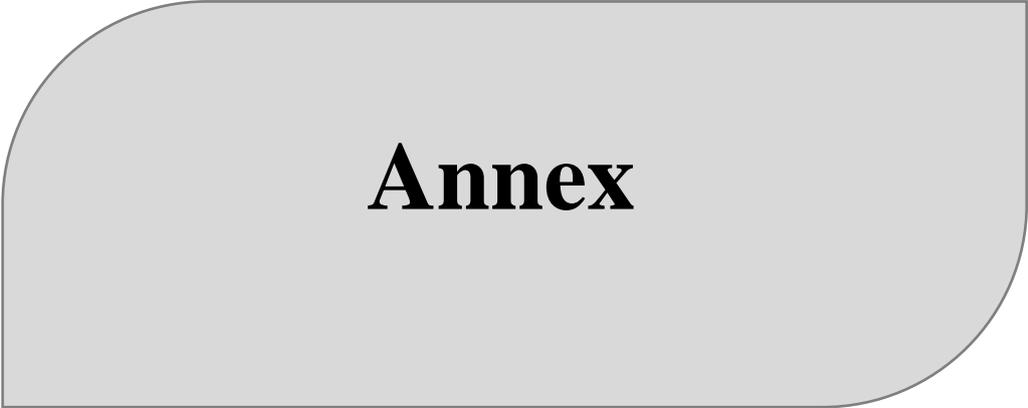
[81] Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27: 146–154 Lovaglio R. B., dos-santos F. J., Junior M. J., Contiero J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301– 305.

[82] Haba, E., et al., Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 2000. 88(3): p. 379-387.

[83] Santos, D.K.F., et al., Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochemistry*, 2017. 54: p. 20-27.

[84] Elshikh, M., et al., Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *New biotechnology*, 2017. 36: p. 26-36.

- [85] Wadekar S. D, et al., microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2012. **42**: p. 249-266.
- [86] S.Ferhat, et al., Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum sp.* 1C and *Brevibacterium sp.* 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011. **65**(8): p. 1182-1188.
- [87] De Gusmão C. A. B, Rufino R. D, and Sarubbo L. A, Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World J Microbiol Biotechnol* 2010. **26**: p. 1683-1692.
- [88] Derguine M, L, production et caractérisation des biosurfactants par des levures et des moisissures 2019
- [89] Ítalo Waldimiro Lima De França, *et al.*, Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 2015. **255**: p. 10-15.
- [90] Pacwa-Płociniczak M, et al., Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus strains* and production of biosurfactant. *Environ Prot Eng*, 2011. **37**: p. 63-71.
- [91] Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H. et Trevors J.T. (1991). A dropcollapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 13, 271-279.
- [92] Cameotra S.S and Singh P, Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008. **62**: p. 274- 280.



Annex

Verrerie et consommables utilisé:

Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml, 2l, 3l

Eprouvette graduées de, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml

Bécher de 80ml, 100m, 250m,

Boîtes de Pétri en plastique (D=80mm)

Pipettes Pasteur,

Anse de platine,

Tubes à essai de 20ml,

Seringue,

Micropipettes (200 μ L ,1000 μ)

Ampoule à décanter de 250ml

Ballon de 250ml, 1000ml

Barreau magnétique,

Coton cardé,

Papier Aluminium,

Papier Film,

Papier Filtre ordinaire,

Spatules,

Flacons en verre de 250ml, 500ml

Entonnoirs

Colonne

Equipement utilisé :

Autoclave (AESCULAP),

pH mètre

Étuve (memmert)

Agitateur Magnétique-plaque chauffante

Balance (ohaus carat series)

Bec Bunsen

Agitateur Shaker

Incubateur (memmert)

Centrifugeuse (SIGMA 3-16 kl)

Rotavapeur (heidolph)

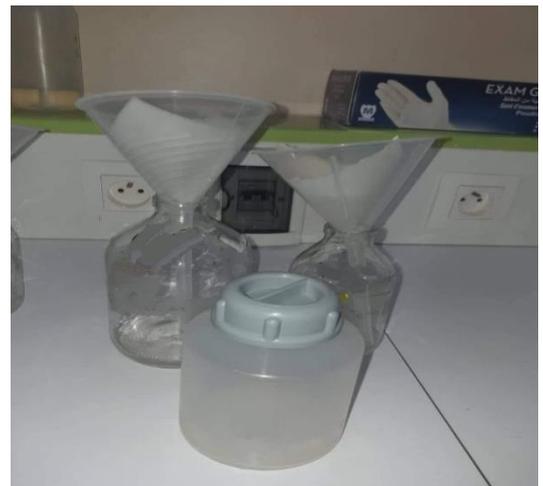
Réfrigérateur

vortex

Tension mètre (Gibertini)



Production de biosurfactant



Filtration de MM après la
production



Extraction de biosurfactant



Rotavape



Incubateur



autoclave



Étuve



La souche après 48h d'incubation