

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique



Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Bioingéniering et Génie des Procédés (BIOGEP)

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

**Etude de la production de biosurfactants par
une souche de *Pseudomonas aeruginosa* dans un
bioréacteur**

Roumaïssa LAIEB

Sous la direction de : Mme. Nadia ABDI Professeur (ENP)

Mr. Djaber TAZDAIT MCB (UMMTO)

Présenté et soutenu publiquement le : 02/07/2018

Composition du jury :

Président :	GRIB Hocine	Professeur	ENP
Examineur :	MAMERI Nabil	Professeur	ENP
Directeur :	ABDI Nadia	Professeur	ENP
Co-Directeur :	TAZDAIT Djaber	MCB	UMMTO

ENP 2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique



Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Bioingéniering et Génie des Procédés (BIOGEP)

Mémoire de Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

**Etude de la production de biosurfactants par
une souche de *Pseudomonas aeruginosa* dans un
bioréacteur**

Roumaïssa LAIEB

Sous la direction de : Mme. Nadia ABDI Professeur (ENP)

Mr. Djaber TAZDAIT MCB (UMMTO)

Présenté et soutenu publiquement le : 02/07/2018

Composition du jury :

Président :	GRIB Hocine	Professeur	ENP
Examineur :	MAMERI Nabil	Professeur	ENP
Directeur :	ABDI Nadia	Professeur	ENP
Co-Directeur :	TAZDAIT Djaber	MCB	UMMTO

ENP 2018

Dédicaces

À ma très chère mère.

À la mémoire de mon père.

À mes très chers frères et sœurs qui ne sont jamais venus à la vie.

À tous les membres de la famille LAIEB et LABBADI.

À tous ceux qui m'ont soutenu et qui me soutient encore.

Remerciement

*Tout d'abord, je tiens à remercier **ALLAH**, qui m'a donné la force, la patience et le courage d'accomplir ce modeste travail.*

*Les premières personnes que je tiens à remercier sont mes encadrants **Mme. ABDI Nadia** et **Ms. TAZDAIT Djaber**. Je les remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé tout au long de ce travail.*

*Je remercie vivement les membres de jury : **professeur GRIB Hocine** et **professeur MAMERI Nabil** de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour leur présence et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

J'adresse mes sincères remerciements à tous l'équipe pédagogique du département de génie de l'environnement, particulièrement les professeurs, qui m'ont fourni les outils nécessaires à la réussite de mes études universitaires soit par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils ou par leurs critiques.

*Je remercie aussi l'ensemble des personnes du laboratoire de bioingénierie et génie des procédés « BioGeP » **Ms. KHERRAT**, **Ms. OUADEH**, **Mme. CHEMLEL**, **Mlle. HASNAOUI**, et **Mlle. HAMADOU**, qui ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.*

Je voudrais également remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de département du génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger de m'avoir permis de réaliser le test de la tension superficielle.

Je n'oublie bien évidemment pas mes camarades de formation et les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.

*Un grand merci à ma mère « **Zineb** » et mon père « **Allaoua** », pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel à la fois moral et économique, qui m'a permis de réaliser les études que je voulais.*

*Je désire aussi remercier toute la famille **LAIEB**, mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines, mes amis et amies, qui n'ont cessé de m'encourager.*

A la fin je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

الملخص:

تبحث هذه الدراسة في إنتاج منشطات السطوح الحيوية بواسطة سلالة "بسودوموناس أيريجينوزا" المعزولة من موقع ملوث بالهيدروكربونات، من خلال اختبار تأثير أربعة مصادر كربون (الجلوكوز، مصل اللبن، زيت الزيتون ومزيج من زيت فول الصويا وزيت عباد الشمس) على النمو عن طريق قياس الكثافة البصرية عند 625 نانومتر، التوتر السطحي، مؤشر الاستحلاب. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بوضوح أن نمو السلالة مفضل بواسطة مصل اللبن وزيت الزيتون. يمكن لمحلول السطحي الحيوي المنتج في وسط زيت الزيتون أن يستحلب الكيروسين مع مؤشر الاستحلاب تبلغ قيمته 82% والتي يتم الحصول عليها بعد 8 أيام من الحضانة، ويعطي توترا سطحيا منخفضا قدره 30,2 ميلي نيوتن على متر مع انخفاض بنسبة 12,7% في حين تم الحصول على معدل التخفيض الأكثر أهمية (46.6%) مع وسط الجلوكوز حيث يصل التوتر السطحي إلى 32,15 ميلي نيوتن على متر. لذا فإن النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تظهر إمكانية إنتاج منشطات الطاقة البيولوجية باستخدام مصادر كربون مختلفة حيث يعتبر زيت الزيتون هو الركيزة الأكثر كفاءة من حيث إنتاج مواد السطح الحيوي.

الكلمات الدالة: الجلوكوز، بسودوموناس أيريجينوزا، زيت الزيتون، زيت عباد الشمس، مصل اللبن، مواد السطح الحيوي.

Abstrat :

This study investigates the production of biosurfactants by a strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hydrocarbon-contaminated site, by testing the influence of four carbon sources (glucose, whey, olive oil and a mixture of soybean oil and sunflower oil) on growth by measurement of OD at 625 nm, surface tension, emulsification index (E24). The results obtained clearly showed that the growth of the strain is favored by whey and olive oil. The biosurfactant produced in the olive oil-based medium is capable of emulsifying kerosene with an E24 value of 82% which is reached after 8 days of incubation, and gave a low surface tension of 30.2 mN.m⁻¹ with a lowering rate of 12.7% while the most important lowering rate (46.6%) was obtained with the glucose medium where the surface tension reaches up to 32.15 mN.m⁻¹. So, the results obtained in this study show the possibility of producing biosurfactants using different carbon sources where olive oil is the most efficient substrate in terms of production of biosurfactants.

Key words: Biosurfactants, glucose, lactose, olive oil, *Pseudomonas aeruginosa*, soybean, sunflower oil.

Résumé :

Cette étude porte sur la production de biosurfactants par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir d'un site contaminé par les hydrocarbures, en testant l'influence de quatre sources de carbone (glucose, lactosérum, l'huile d'olive et un mélange d'huile de soja et l'huile de tournesol) sur la croissance par la mesure de la DO à 625 nm, de la tension superficielle, de l'indice d'émulsification (E24). Les résultats obtenus ont clairement montré que la croissance de la souche est d'avantage favorisée par le lactosérum et l'huile d'olive. Le biosurfactant produit dans le milieu à base d'huile d'olive est capable d'émulsifier le kérosène avec une valeur de E24 de 82% qui est atteinte après 8 jours d'incubation, et a donné une faible tension superficielle de 30,2 mN.m⁻¹ avec un taux d'abaissement de 12,7% tandis que le taux d'abaissement le plus important (46,6%) a été obtenu avec le milieu glucosé où la tension superficielle arrive jusqu'à 32,15 mN.m⁻¹. Alors, les résultats obtenus dans la présente étude montrent la possibilité de produire des biosurfactants à l'aide de différentes sources de carbone où l'huile d'olive est le substrat le plus performant en termes de production de biosurfactants.

Mots clé : Biosurfactants, Huile de soja, Huile de tournesol, Huile d'olive, Glucose, Lactosérum, *Pseudomonas aeruginosa*.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale13

Chapitre 1 : synthèse bibliographique

1.1 Généralités sur les tensioactifs15

1.1.1 Historique15

1.1.2 Définition16

1.1.3 Structure chimique16

1.1.4 Classification17

1.1.4.1 Les tensioactifs anioniques18

1.1.4.2 Les tensioactifs non-ioniques18

1.1.4.3 Les tensioactifs cationiques19

1.1.4.4 Les tensioactifs amphotères20

1.1.5 Action et rôle des tensioactifs20

1.1.6 Impact négatif des tensioactifs sur l'environnement22

1.1.7 Applications des tensioactifs les plus courants23

1.2 Les biosurfactants25

1.2.1 Définition25

1.2.2 Caractéristiques physico-chimiques26

1.2.2.1 Abaissement de la tension superficielle et interfaciale26

1.2.2.2 Stabilisation des émulsions26

1.2.2.3 Balance hydrophile-lipophile (HLB)26

1.2.2.4 Concentration micellaire critique27

1.2.2.5 Solubilisation des biosurfactants dans l'eau29

1.2.2.6 Solubilité des biosurfactants en fonction de la température.....29

1.2.2.7 Tolérance à la température et au pH29

1.2.3 Types de biosurfactants30

1.2.4 Nature chimique et classification.....31

1.2.4.1 Glycolipide31

1.2.4.2 Les lipopeptides36

TABLE DES MATIERES

1.2.4.3	Phospholipides	38
1.2.4.4	Acides gras	39
1.2.4.5	Lipopolysaccharides ou les biosurfactants polymériques.....	39
1.2.4.6	Biosurfactants en particules	40
1.2.5	Biosynthèse de biosurfactants.....	40
1.2.6	Avantages et inconvénients des biosurfactants.....	42
1.2.7	Applications des biosurfactants	43
1.3	La production de biosurfactants	46
1.3.1	Identification des biosurfactants	46
1.3.2	Les facteurs influençant la production de biosurfactants.....	46
1.3.2.1	Source de carbone	46
1.3.2.2	Source d'azote	46
1.3.2.3	pH et température	47
1.3.2.4	Aération et agitation.....	47
1.3.2.5	Concentration en sel	47
Chapitre 2 : matériel et méthodes		
2.1	Objectif du travail	49
2.2	Matériel	49
2.2.1	Appareillage.....	49
2.2.2	Verreries et matériel plastique.....	50
2.2.3	Matériel biologique	50
2.2.4	Produits chimiques et milieux de culture.....	50
2.2.4.1	Milieux de culture	50
2.2.4.2	Produits chimiques	51
2.3	Méthodologie	52
2.3.1	Activation de la souche	52
2.3.2	Préparation d'inoculum et mesure de la densité bactérienne	52
2.3.3	Pré-culture	52
2.3.4	Culture	52
2.3.5	Suivi de la fermentation	53
2.3.5.1	Mesure de la concentration en biomasse.....	53
2.3.5.2	Mesure de la tension superficielle.....	53
2.3.5.3	Test de l'indice d'émulsification E_{24}	54

TABLE DES MATIERES

2.3.5.4	Mesure du COT	55
Chapitre 3 : résultats et discussions		
3.1	Mesure de la concentration en biomasse	58
3.2	Mesure de la tension superficielle	60
3.3	Test de l'indice d'émulsification E₂₄	61
3.4	Mesure du COT	62
Conclusion générale et perspectives.....		64
Références bibliographiques.....		65

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Les types des tensioactifs (d'après le nombre et la disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes).

Tableau 1.2: Tableau récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications.

Tableau 1.3: Principaux biotensioactifs (BTA) obtenus à partir de différentes sources.

Tableau 3.1: Valeurs des Tensions superficielles mesurées après 8 jours de fermentation dans différents milieux de culture.

Liste des figures

- Figure 1.1 :** Structure chimique d'une molécule tensioactive.
- Figure 1.2 :** Exemples des tensioactifs anioniques.
- Figure 1.3 :** Exemples des tensioactifs non-ioniques.
- Figure 1.4 :** Exemples des tensioactifs cationiques.
- Figure 1.5 :** Exemples des tensioactifs amphotères.
- Figure 1.6 :** Mode d'action des tensioactifs sur les tâches de graisse déposées sur un tissu.
- Figure 1.7:** Echelle de la balance hydrophile-lipophile (HLB).
- Figure 1.8:** Représentation schématique d'une micelle de biosurfactants.
- Figure 1.9 :** Graphique pour la détermination de la CMC.
- Figure 1.10 :** Structures chimiques des rhamnolipides les plus connus produits par *Pseudomonas*.
- Figure 1.11:** Structure d'un représentant de tréhalolipides.
- Figure 1.12:** Structures des deux types de sophorolipides.
- Figure 1.13 :** Les composants possibles des lipides de mannosylérythritol: **Mel-A:** R'=R=acétyle, **Mel-B:** R'=acétyle et R=H, **Mel-C:** R'=H, R=acétyle, **Mel-D:** R'=R=H, n= 6-12.
- Figure 1.14:** Structure de surfactine produite par *B. subtilis*.
- Figure 1.15:** Structure de la phosphatidyléthanolamine, un biosurfactant puissant produit par *Acinetobacter sp.*
- Figure 1.16:** Structure d'un émulsan.
- Figure 1.17 :** les voies biosynthétiques de biosurfactants.
- Figure 1.18 :** voie de biosynthèse d'un rhamnolipide.
- Figure 2.1 :** Les erlenmeyers contenant les milieux de culture.
- Figure 2.2 :** Le tensiomètre (GIBERTINI) utilisé pour la mesure de la tension superficielle.
- Figure 2.3 :** Observation de la couche émulsifiante en présence du kérosène.
- Figure 2.4 :** Analyseur du carbone organique total.
- Figure 3.1 :** Profils de la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur les différents milieux de cultures testés.
- Figure 3.2 :** L'évolution de la tension superficielle en fonction du temps dans les différents milieux de culture étudiés.
- Figure 3.3 :** L'évolution de l'indice d'émulsification en fonction du temps dans les différents milieux de culture étudiés.

Figure 3.4 : Variation de quantité de COT exprimée en CONP avant et après la fermentation dans les milieux à base de glucose, lactose, d'huile d'olive et le mélange d'huile de soja et l'huile de tournesol.

Liste des abréviations

- ABS** : Alkyl-benzène-sulfonates de sodium.
- Asn** : Asparagine.
- Asp** : Acide Aspartique.
- CFU. ml⁻¹** : Unité formant colonie.
- CMC** : Concentration Micellaire Critique.
- COT** : Carbone organique total.
- DO** : Densité optique.
- dTDP** : Désoxy-thymidine di-phosphate.
- dyn. cm⁻¹** : Dynes par centimètre.
- E₂₄** : L'indice d'émulsification.
- FT-IR** : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.
- Glu** : Glutamine.
- HAA** : 3- (3-hydroxyalcanoyloxy) alcanolate.
- HAP** : Hydrocarbure aromatique polycyclique.
- HLB**: Balance hydrophile-lipophile.
- IR** : La spectrométrie infrarouge.
- LAS**: Alkyl-benzène-sulfonates linières.
- Leu** : Leucine.
- MC** : Unité Macfarland
- MEL** : Lipides de mannosylérythriol.
- mN. m⁻¹**: Milli-newton par mètre.
- MS**: La spectrométrie de masse
- N**: Azote.
- NiO** : Oxyde de nickel.
- NPOC** : Carbone organique non-purgeable.
- O**: Oxygène.
- P**: Phosphore.
- p / v** : Poids par volume.
- RhlA** : Rhamnosyltransférase A.
- RhlB** : Rhamnosyltransférase B.
- RhlC** : Rhamnosyltransférase C.

RMN: La résonance magnétique nucléaire

rpm : Tour par minute.

Rt-1 : Rhamnosyltransférase 1.

Rt-2 : rhamnosyltransférase

S: Soufre.

SLP : Sophorolipides.

Tyr : Tyrosine.

UV-Vis : La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible.

Val : Valine.

Une molécule tensioactive se définit comme une molécules amphiphile ayant des propriétés particulières issues de l'ambivalence de sa structure chimique, composée d'une partie hydrophile appelée également tête polaire et d'une partie hydrophobe constituée en général d'une longue chaîne hydrocarbonée, qui lui confère une double affinité pour l'eau et les corps gras [1], ses propriétés particulières (comme l'abaissement de la tension de surface) font élargir son domaine d'application: pharmaceutique, médicale, industriel, agricole, pétrolier, etc.

La plupart de ces composés amphiphiles sont issus de la pétrochimie. Les problèmes environnementaux associés à l'emploi des tensioactifs chimiquement synthétisés ont conduit à leur remplacement par des molécules produites à partir des matières premières naturelles renouvelables appelées biosurfactants [2,3].

Les biosurfactants sont une classe de molécules tensioactives, structurellement variées, et communément synthétisées par les microorganismes. Les molécules de surfactant se localisent préférentiellement à l'interface entre deux milieux fluides ayant différents degrés de polarité. Cette propriété rend les surfactants capables de former des émulsions entre le milieu huileux et le milieu aqueux et de réduire la tension superficielle et interfaciale [4].

L'intérêt de ces produits biosourcés est lié à leurs propriétés, comme la biodégradabilité, faible toxicité, la production à base de substrats renouvelables, diversité de la structure et des propriétés chimiques [5].

L'énorme diversité des biosurfactants est due à la variété des microorganismes qui les produisent (bactéries, champignons, levure) et de l'environnement nutritif (exp: sources de carbone). En raison de ces deux points, plusieurs études ont été menées non seulement pour voir l'influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant, mais aussi pour améliorer leurs performances (faible tension de surface, fort pouvoir émulsionnant).

L'objectif du présent travail est d'étudier l'influence de différentes sources de carbone et d'énergie que sont : le glucose, le lactosérum, l'huile d'olive et le mélange d'huile de soja et l'huile de tournesol sur le rendement de production de biosurfactants par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures.

Ce mémoire s'articule autour de trois grands chapitres :

Le premier chapitre résume une synthèse bibliographique sur les tensioactifs et leurs homologues biologiques, ainsi que la production de ces biotensioactifs par les microorganismes.

Le deuxième chapitre expose le matériel et les méthodes utilisés.

Le troisième chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus et leurs interprétations.



Chapitre 1 : synthèse bibliographique



1.1 Généralités sur les tensioactifs

1.1.1 Historique

Historiquement, le savon a été le premier tensioactif fabriqué, dont une recette de préparation a été retrouvée sur des tablettes sumériennes (une pâte savonneuse à base de graisse animale, telle que la graisse de porc, et de carbonate de potassium), est resté une longue période un produit de luxe, et leur emploi est bien documenté dans les civilisations égyptiennes, phénicienne, grecque et romaine [3,6].

Un millénaire avant notre ère, la ville d'Alep, au nord-ouest de la Syrie fabrique un savon, dit « savon d'Alep ». L'huile d'olive locale et la soude végétale ont été utilisées par les maîtres savonniers d'Alep mais ils ajoutent l'huile de baies de laurier comme un ingrédient supplémentaire dans leur composition. Pendant les croisades, la recette du savon d'Alep aurait atteint l'Europe. Il serait ainsi l'ancêtre de l'ensemble des savons durs au monde [7].

Ce n'est qu'en France, au XIII^e siècle qu'ils commencèrent à les manufacturer à partir de cendres de hêtres et de suif de chèvre, remplacé deux siècles plus tard par l'huile d'olive et non plus de graisse animale. De multiples fabriques se développèrent dans la région méditerranéenne et le célèbre « savon de Marseille » vit le jour [3]. Pendant des siècles, le savon servait d'onguent, de cosmétique, de remède. Il faut attendre le Moyen-âge pour que le savon soit utilisé pour laver le linge [8].

Les premiers détergents synthétiques apparurent pendant la première guerre mondiale en Allemagne en raison de la pénurie de corps gras. Dans l'entre-deux-guerres, furent développés des détergents synthétiques fabriqués à partir du benzène et d'hydrocarbures issus du kérosène, les alkyl-benzène-sulfonates de sodium (ABS) ou à partir d'alcools gras, les alcools gras sulfatés. Mais c'est depuis 1945 que la production de détergents synthétiques s'est considérablement développée au détriment des savons. Le besoin de nouveaux types de détergents pour les machines à laver accéléra notamment cette tendance [9].

En conclusion les tensioactifs, tels que nous les connaissons aujourd'hui, sont donc relativement modernes [3].

1.1.2 Définition

Un tensioactif ou agent de surface ou en anglais surfactant (abréviation de : **SUR**face **ACT**ive **Age**NT) : est une substance soluble immédiatement dans l'eau et dans huiles hydrocarbonées ou végétales qui fournit la propriété de diminuer l'énergie de surface entre deux phases (ex : eau / corps gras), il a pour rôle principal de lier deux phases, une aqueuse et l'autre huileuse, dans le but de former un mélange homogène et stabiliser l'émulsion [10,11].

1.1.3 Structure chimique

Il est composé de deux entités d'affinité opposée liées de façon covalente, défini comme suit (figure 1.1) :

Une lipophobe (hydrophile : affinité pour l'eau) : groupe *polaire* qui contient des hétéroatomes comme O, S, P, ou N, qui se trouvent dans des groupes alcools, thiols, acides, sulfates, sulfonates, phosphates, amines, amides etc. [12].

L'autre hydrophobe (lipophile : affinité pour les graisses) : un groupe apolaire ou peu polaire qui est en général un groupe hydrocarboné de type alkyle ou alkyl-benzène, et qui peut comprendre éventuellement des atomes d'halogène et même des atomes d'oxygène [12].



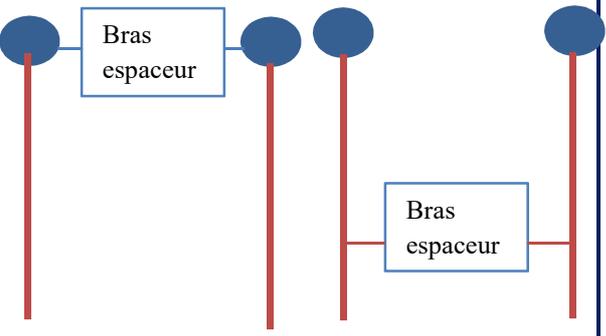
Figure 1.1 : Structure chimique d'une molécule tensioactive [10].

L'assemblage d'une tête polaire hydrophile et d'une queue hydrocarboné hydrophobe donne la molécule amphiphile qui est la particularité que présente un tensioactif.

En fonction de la structure de ces tensioactifs (nombre et disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes au sein de la molécule) on peut les diviser en plusieurs catégories (tableau 1.1) [13] :

- ↪ Tensioactif monocaténaire : dont la structure la plus fréquente, contient une tête hydrophile et une queue hydrophobe ;
- ↪ Tensioactif bicaténaire et tricaténaire : possède plus qu'une chaîne hydrophobe greffée sur la même chaîne hydrophile ;
- ↪ Tensioactif bolaforme ou géminé : comporte plusieurs têtes hydrophiles associées à une ou plusieurs chaînes hydrophobes.

Tableau 1.1 : Les types des tensioactifs (d'après le nombre et la disposition des pôles hydrophiles et hydrophobes) [11].

Structure du tensioactif	Nom
	<p>Monocaténaire</p> <p>Bicaténaire</p> <p>Tricaténaire</p>
	<p>Bolaforme simple</p> <p>Bolaforme double chaîne</p>
	<p>Géminés</p>

1.1.4 Classification

On retrouve divers classements possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés selon :

- La nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère) [8] ;
- La longueur de la partie lipophile qui permet de les classer en agents mouillants ($C_8 - C_{10}$), détergents ($C_{12} - C_{16}$), émulsifiants ou adoucissants ($C_{18} - C_{22}$) [14] ;
- De leur origine (naturelle ou synthétique) [8].

1.1.4.1 Les tensioactifs anioniques

Ces composés présentent un ou plusieurs groupes fonctionnels se décomposent en des anions amphiphiles [15]. Ils possèdent un bon pouvoir détergent et moussant [16]. Ces constituants peuvent être ramifiés en trois grands groupes [17] :

- ↳ Les savons dont la partie hydrophile est un sel de sodium ou de potassium ou un acide carboxylique ;
- ↳ Les composés sulfonés de formule générale $\text{RSO}_3^- \text{Na}^+$ qui constituent la première matière tensioactive la plus employée dans les formulations détergentes ;
- ↳ Les composés sulfatés résultent de la sulfatation d'un alcool. Ils ont une activité moussante très importante mis à profit dans la fabrication des shampoings et des bains moussants. Les alcools gras sulfatés ont pour formule générale $\text{ROSO}_3^- \text{Na}^+$.

La génération annuelle dans le monde des surfactifs anioniques représente environ 55% [12].

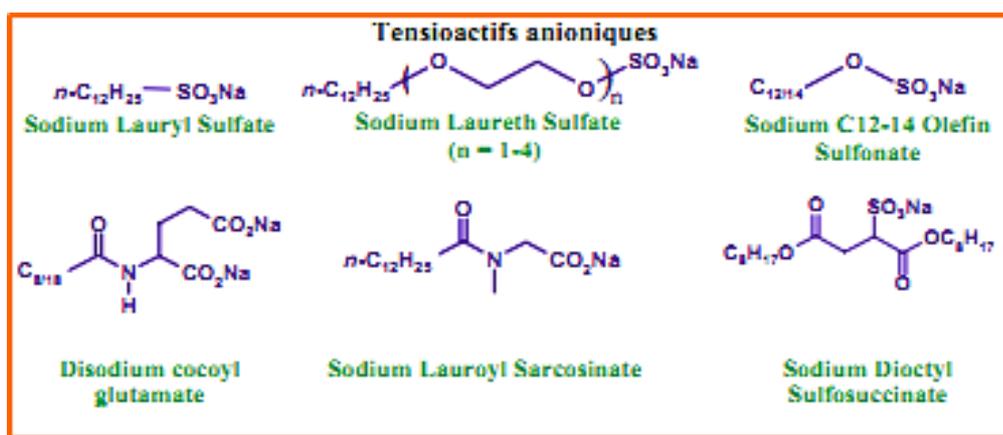


Figure 1.2 : Exemples des tensioactifs anioniques [10].

1.1.4.2 Les tensioactifs non-ioniques

Par ordre d'importance industrielle, ils occupent la deuxième position avec un taux de 40 % du total. Ils ne s'ionisent pas en solution aqueuse, parce qu'ils ont un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou même amide. Une grande quantité de ces surfactifs sont rendus relativement hydrophiles au moyen d'une chaîne polyéther de type poly-oxyde d'éthylène présente dans leurs squelettes. En ce qui concerne le groupe hydrophobe, la plupart du temps se présente comme un radical alkyle ou alkyl-benzène, et parfois une structure d'origine naturelle comme un acide gras quand une faible toxicité est indispensable [12].

Une réaction de polycondensation de molécules d'oxyde d'éthylène sur un composé à hydrogène mobile engendre une proportion de 90% de ce type de tensioactifs [2].

Ils possèdent avec les anioniques une bonne synergie aussi des fortes capacités dispersante, dégraissante, ils sont rarement moussants et empêchent la redéposition [16].

Les autres produits tensioactifs non ioniques sont principalement [2] :

- ↪ Des esters de polyols : esters de sorbitanne, de glycérol, de polyglycérol, de sucre ;
- ↪ Des éthers de polyols : éthers de glucose ;
- ↪ Des alcanolamines ;
- ↪ Des alkylpolyglucosides (APG).

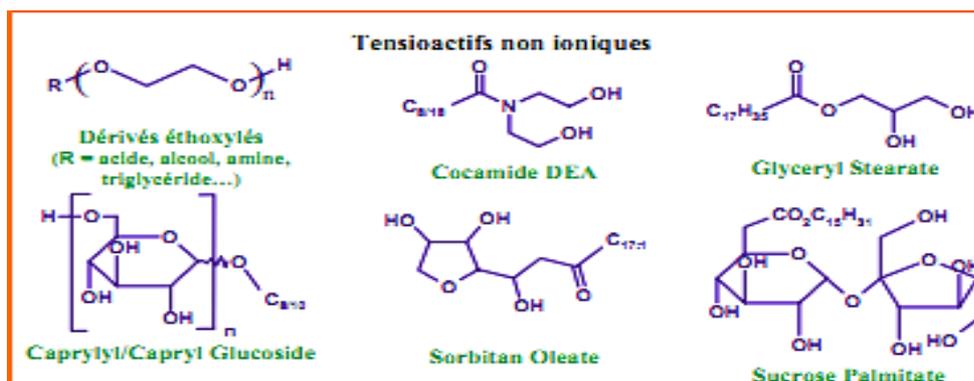


Figure 1.3 : Exemples des tensioactifs non-ioniques [10].

1.1.4.3 Les tensioactifs cationiques

Ils s'ionisent en solution aqueuse en un cation organique. Ils montrent une action désinfectante et sont pas très mouillants. Des produits azotés de type sel d'amine grasse ou d'ammonium quaternaire présentent la majorité de ces tensioactifs [12,16].

Ces surfactifs, sont relativement couteux et c'est la raison pour laquelle on les utilise seulement dans des usages particuliers qui sollicite leur caractère bactéricide, ou à leur pouvoir de s'adsorber facilement sur des substrats biologiques ou inertes [8].

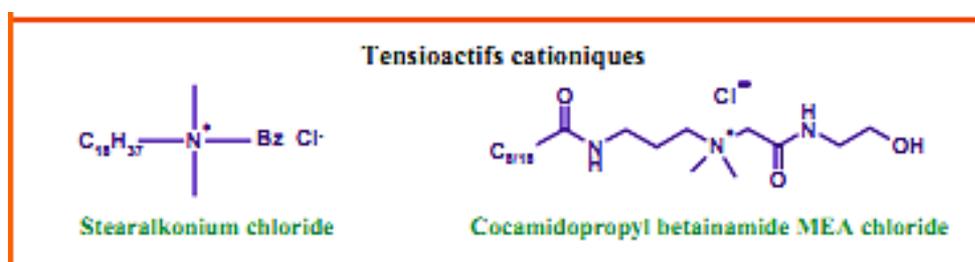


Figure 1.4 : Exemples des tensioactifs cationiques [10].

1.1.4.4 Les tensioactifs amphotères

La recherche des composés naissants a conduit les chimistes à associer les charges positives et négatives dans un même type chimique appelé « zwitterionique ». Suivant le pH, ils peuvent relâcher un anion ou un cation. Ces surfactifs amphotères ont une balance hydrophile-lipophile (HLB) remarquable. Ils sont utilisés donc comme agent détergent. Ils sont moins agressifs que les tensioactifs anioniques et sont recommandés pour les peaux fragiles [2].

Ils sont aussi couteux que les cationiques, et donc leur utilisation est limitée à des applications particulières. Les tensioactifs zwitterioniques les plus répandus sont les dérivés de la bétaine et les phospholipides [2,12].

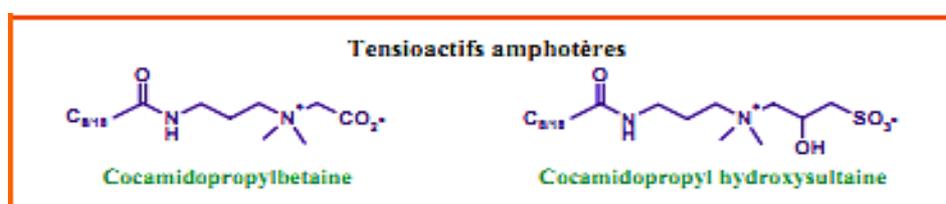


Figure 1.5 : Exemples des tensioactifs amphotères [10].

1.1.5 Action et rôle des tensioactifs

Les molécules de tensioactif sont investies toujours dans la réduction de la tension superficielle entre deux phases de nature différente (aqueuse /huileuse) et stabiliser l'émulsion.

Un tensioactif peut être exploité comme un détergent et agir devant les salissures par les actions suivantes (figure 1.6) [18] :

- ↳ La réduction de la tension superficielle de l'eau lorsque les agents tensioactifs sont mélangés à l'eau, et se trouve elle-même fractionné en une multitude de molécules d'eau où la surface d'étalement est fortement grandie ;
- ↳ Pénétration des queues hydrophobes des tensioactifs dans les salissures et ainsi formation des micelles (molécules plus petites) ;
- ↳ Fragmentation des taches grâce aux surfactifs en des molécules qui restent en suspension dans l'eau ;
- ↳ Les tensioactifs englobent des molécules de graisses morcelées. Les pôles hydrophobes se repoussent et maintiennent les graisses en suspension dans l'eau. Ainsi, les souillures ne se redéposent pas.

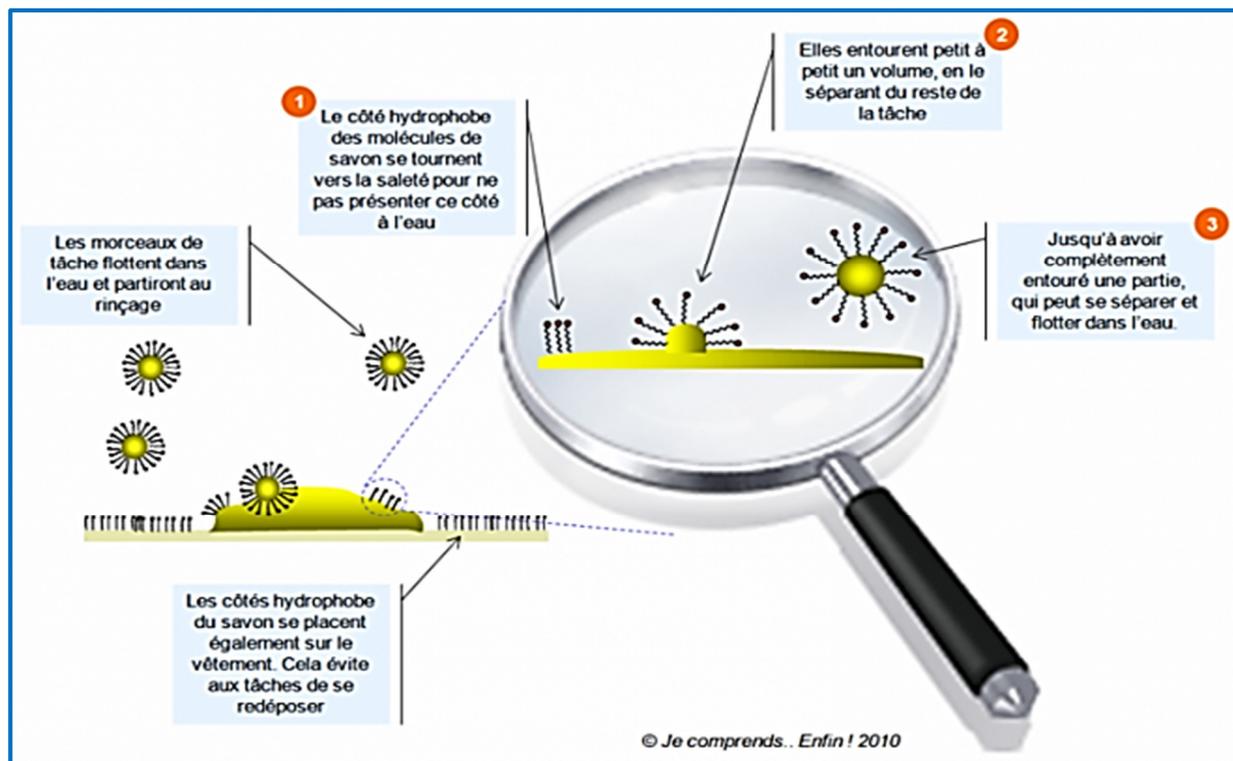


Figure 1.6 : Mode d'action des tensioactifs sur les tâches de graisse déposées sur un tissu [19].

Donc on peut conclure qu'un tensioactif est efficace lorsqu'il possède les pouvoirs suivants [20] :

- Pouvoir mouillant : le pouvoir mouillant est la capacité d'un liquide à s'étaler sur un solide ou la capacité d'un solide à absorber un liquide ;
- Pouvoir émulsionnant : une émulsion est une dispersion d'un liquide non-miscible dans un autre sous forme de petites gouttelettes ;
- Pouvoir anti-redéposant ou dispersant : Les molécules tensioactives ont un pouvoir anti-redéposition, comme son nom l'indique, il bloque les particules en suspension dans l'eau et les empêche à redéposer ;
- Pouvoir moussant : Lorsque n'importe quel volume de gaz se diffuse dans un faible volume de liquide, il y a formation de mousse. Les bulles d'air formant la mousse attrapent et piègent les salissures.

1.1.6 Impact négatif des tensioactifs sur l'environnement

Les surfactants se retrouvent dans l'environnement par déversement des effluents d'eaux usées dans les eaux de surface, par l'épandage des boues d'épuration sur les terres ou l'utilisation de ces boues comme engrais pour les plantes sur les terres agricoles. Ils affectent l'écosystème à cause de leur toxicité sur les organismes présents dans l'environnement [21] et de leur nature récalcitrante et persistante [22].

- ↳ Dans le traitement des eaux usées des usines d'épuration, au moment où la concentration en surfactant dépasse un certain seuil, elle affectera l'aération, la sédimentation, la nitrification des boues rendant ainsi l'épuration difficile [23] ;
- ↳ Lorsque la concentration du surfactant arrive à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$, des mousses persistantes apparaissent dans l'eau sous forme de couche isolante qui diminue l'intensité d'échange entre l'eau et l'atmosphère gazeuse, provoquant la réduction de la quantité d'oxygène dissous et conduisant à une hypoxie pour un nombre assez important de microorganismes suivi par la mort de ces derniers [24] ;
- ↳ Il a été constaté que l'effet toxique présente des différences importantes selon le type de tensioactifs et l'espèce étudiée [25]. Une étude a montré que l'énorme enrichissement de la biomasse du phytoplancton, de la densité et de la productivité primaire dans les mers contaminées a été favorisé par la dose élevée de détergents anioniques et d'autres composés organiques [26]. Les mélanges de tensioactifs anioniques et non ioniques utilisés comme dispersants dans l'huile ont montré une toxicité marquée pour les stades précoces de l'éperlan (*Atherinopsaffinis*) et du varech (*Macrocystispyrifera*) [27]. En outre, les eaux usées contenant des LAS destinées à l'irrigation des plantes créent des problèmes de croissance aux plantes comme la laitue et entraînent des maladies aux cultures telles que la chlorose [28]. D'autres études récentes sur la germination de graines de komatsuna sous l'action des LAS ont montré que ces derniers inhibaient la biomasse et la croissance de la plante à 200 mg.l^{-1} , tout comme le Soja à 600 mg.l^{-1} [29] ;
- ↳ A travers l'alimentation, les surfactants peuvent pénétrer dans les branchies, le sang, les reins, le pancréas, la vésicule biliaire et le foie, et induire une toxicité aquatique [30]. Les tensioactifs sont faciles à capter par les poissons, à travers la surface du corps et les branchies et la circulation sanguine, ils se dispersent dans les tissus et les organes du corps. Les transaminases sériques et l'activité phosphatase alcaline continuent à augmenter tant que les tensioactifs sont présents dans les tissus et les organes du corps et cela mène à des effets indésirables produits par les poissons [31] ;

- ↳ Les eaux usées contiennent de grandes quantités de phosphore issues des polyphosphates présents dans la majorité des détergents, ce qui pourrait facilement aboutir à l'eutrophisation [23].

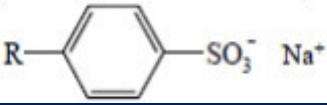
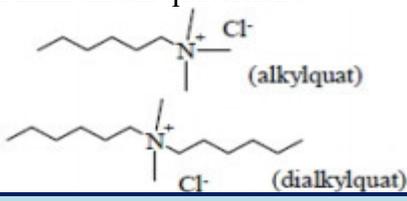
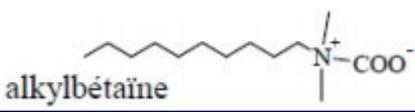
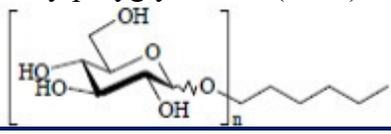
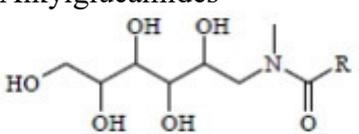
A partir de la structure chimique, la relation entre la structure chimique des tensioactifs et la toxicité de l'eau pour les organismes aquatiques peut être résumée comme suit [24] :

- ↳ Plus l'hydrophobicité des surfactants est grande, plus la toxicité aquatique est grande ;
- ↳ Plus la concentration des groupes éthoxylates est élevée, plus la toxicité des organismes aquatiques est faible ;
- ↳ La toxicité des tensioactifs anioniques est faible par rapport aux non-ioniques.

1.1.7 Applications des tensioactifs les plus courants

Le terme tensioactif se réfère à une propriété physicochimique du composé. Toutefois, suivant leurs applications, on retrouve ces molécules sous les qualificatifs de savon, détergent, humectant, dispersant, émulsifiant, moussant, bactéricide, antistatique, inhibiteur de corrosion (tableau 1.2) [32].

Tableau 1. 2 : Tableau des différents types de tensioactifs et leurs applications [11].

Famille de tensioactifs	Principaux caractères	Utilisation
ANIONIQUE		
Savons R-COO ⁻ Na ⁺	Les plus courants Peu onéreux N'irritent pas la peau Bonne biodégradabilité	Détergent
Alkylsulfate R-O-SO ⁻ Na ⁺		Agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)
Alkyl-benzène-sulfonates linéaire (LAS) 		Agent émulsifiant, dispersant et détergent
CATIONIQUE		
Ammonium quaternaire 	Cl charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	Agent antistatique et adoucissant (produits de rinçage linge et cheveux) Bactéricide (désinfectants chirurgicaux, antiseptiques)
AMPHOTERE		
Alkylsulfobetaine Dérivés d'acides aminés 	Peu agressifs pour les tissus vivants Compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs	Adoucissant pour textile et cheveux Additif inhibiteur de corrosion
NON IONIQUE		
Alcools éthoxylés R-(O-CH ₂ -CH ₂) _n -OH Alkylphénolséthoxylés	Peu biodégradable	Détergent Dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge)
Alkylpolyglycosides (APG) 	Très bas niveau de toxicité Pas sensibles au pH Non irritant Bonne synergie avec les autres tensioactifs	C8-C10 : agent moussant dans l'agrochimie C12-C16 : co-tensioactif en détergence soins corporels
Alkylglucamides 		Formulation pour shampooing et gel douche
Esters de glycérol Esters d'hexitols		Agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

1.2 Les biosurfactants

1.2.1 Définition

Une variété de microorganismes produit des molécules tensioactives extracellulaires ou associées à une membrane qui sont les biosurfactants [33]. Ces biosurfactants sont des métabolites secondaires synthétisés par un grand nombre de microorganismes [34] (des bactéries, des levures ou des champignons) cultivés de différents substrats (sucres, huiles, alcanes) [5]. Ils ont des propriétés tensioactives dues à leur structure amphipathique [34]. Ils abaissent la tension de surface et d'interface entre deux milieux fluides possédant différents degrés de polarité en utilisant les mêmes mécanismes que les tensioactifs chimiques [35].

En général, des acides aminés, des peptides ou des polysaccharides sont les principaux composants du pôle hydrophile ; le pôle hydrophobe se compose d'acides gras saturés ou non saturés [36]. La fraction hydrophile sert à caractériser quatre types chimiques de biosurfactants (anioniques, cationiques, amphotères ou non-ioniques) et responsable de leur degré de solubilité dans l'eau. En ce qui concerne la fraction hydrophobe, elle influe avec son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification sur la chimie du biosurfactant et, est responsable de l'activité capillaire [36,37].

Ces molécules biologiques ont des masses variant entre 500 et 2500 $g \cdot mol^{-1}$ et peuvent être chargées ou non. Leur CMC (Concentration Micellaire Critique) est comprise entre 1 à 200 $mg \cdot l^{-1}$ [38], valeur considérée comme faible par rapport aux tensioactifs synthétiques, ce qui les rend très attractifs. Leur activité tensioactive est comparable à celle de leurs homologues synthétiques, en atteignant des tensions de surface allant jusqu'à 30 $mN \cdot m^{-1}$ [39].

Par rapport aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants s'avèrent plus spécifiques, biodégradables et peuvent être produits de façon peu coûteuse sur des substrats renouvelables. Enfin le contexte réglementaire de plus en plus drastique concernant l'environnement pourrait fortement favoriser ces molécules « naturelles » par rapport à leurs homologues synthétiques [40].

1.2.2 Caractéristiques physico-chimiques

1.2.2.1 Abaissement de la tension superficielle et interfaciale

Une surface et une interface sont définies respectivement comme la limite entre un liquide et l'air entouré, et la limite entre deux liquides. La tension entre les phases air-eau est appelée tension de surface et entre huile-eau est une tension interfaciale [41].

La tension de surface est la propriété la plus intéressante des agents tensioactifs et établit la force d'attraction entre les molécules dans les liquides [42]. La tension superficielle est quantitativement évaluée à l'aide d'un tensiomètre et l'existence d'un biosurfactant dans un milieu est identifiée par des mesures basées sur l'évaluation de cette tension superficielle. La tension superficielle air-eau pour l'eau distillée est d'environ $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (ou $\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-1}$) et la tension interfaciale pour l'eau distillée et le n-hexadécane est d'environ $40 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, les biosurfactants réduisent ces valeurs respectivement à $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ jusqu'à $27 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ [43].

1.2.2.2 Stabilisation des émulsions

Une émulsion est la formation des gouttelettes microscopiques dues à la dispersion d'une phase liquide non-miscible à une autre. Les agents biosurfactants agissent comme des émulsifiants ou des dés-émulsifiants. La réduction de la tension superficielle favorise la stabilité d'émulsion qui dépend de la taille des gouttelettes dispersées [43].

Les agents biosurfactants agissent comme émulsifiants ou désémulsifiants où ils stabilisent ou déstabilisent respectivement l'émulsion. La capacité d'émulsification est analysée par la capacité d'un tensioactif à provoquer une turbidité due à la suspension d'hydrocarbures, tels que le n-hexadécane, dans un système aqueux [43,44].

1.2.2.3 Balance hydrophile-lipophile (HLB)

La balance hydrophile-lipophile (HLB) est un paramètre souvent utilisé pour indiquer si un surfactant favorisera des émulsions eau dans huile ou huile dans eau [37].

La HLB sert à décrire la polarité de nombreuses molécules tensioactives. Sa valeur dépend de l'importance de la partie hydrophile dans la molécule : elle est élevée dans le cas où la portion hydrophile est intéressante et, est faible lorsque la molécule est majoritairement lipophile [45].

Le calcul de la valeur HLB utilise la formule suivante [46] :

$$HLB = 7 + m \times Hh - n \times HI$$

m : le nombre des groupes hydrophiles de la molécule.

Hh : la valeur des groupes hydrophiles.

n : le nombre des groupes lipophiles de la molécule.

HI : la valeur des groupes lipophiles.

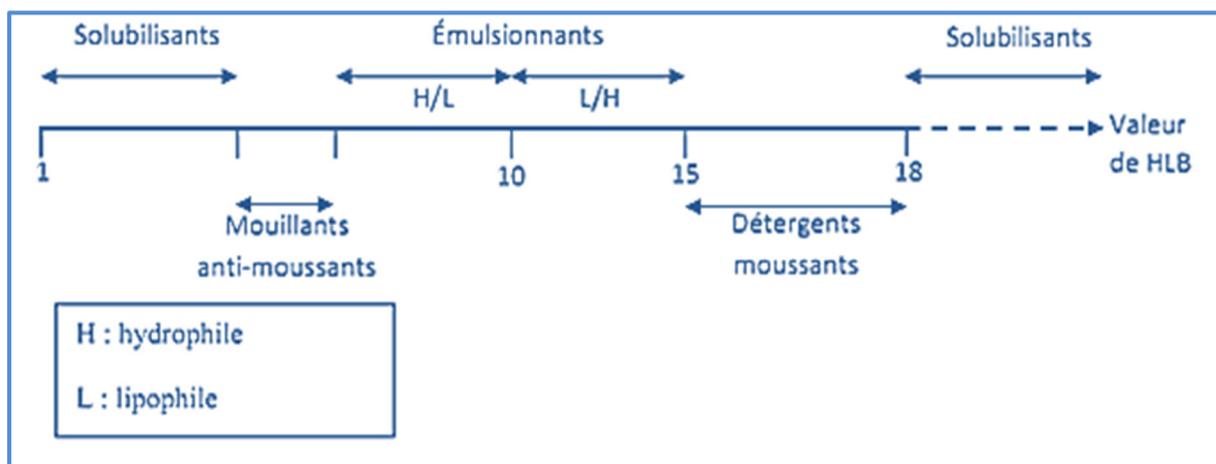


Figure 1.7 : Echelle de la balance hydrophile-lipophile (HLB) [11].

L'échelle HLB peut être estimée en attribuant une valeur de 1 à l'acide oléique et une valeur de 20 à l'oléate de sodium, le mélangeage de ces deux composés à des proportions variables permet d'obtenir les valeurs intermédiaires. En général, les surfactants qui sont solubles dans la phase huileuse et favorise l'émulsion eau (hydrophile) dans huile (lipophile) auraient des valeurs de HLB inférieures à 10 et les tensioactifs avec des valeurs de HLB entre 10 et 18 auraient l'effet inverse et favoriseraient l'émulsification de l'huile dans l'eau (figure 1.7) [37].

1.2.2.4 Concentration micellaire critique

A faible concentration, les molécules tensioactives sont dispersées à l'état de monomères dans l'eau, où elles préfèrent l'adsorption à l'interface air-eau du liquide. Une saturation régulière de l'interface se crée lors de l'augmentation de la concentration en tensioactifs et lorsque cette interface est saturée, les monomères libres en solution s'associent en agrégats appelés micelles (figure 1.8) [47-49] où les chaînes hydrophobes constituent le cœur de la micelle et les têtes polaires sont au contact de l'eau [50]. La concentration (C) à laquelle ce phénomène survient est définie comme étant la Concentration Micellaire Critique [47-49].

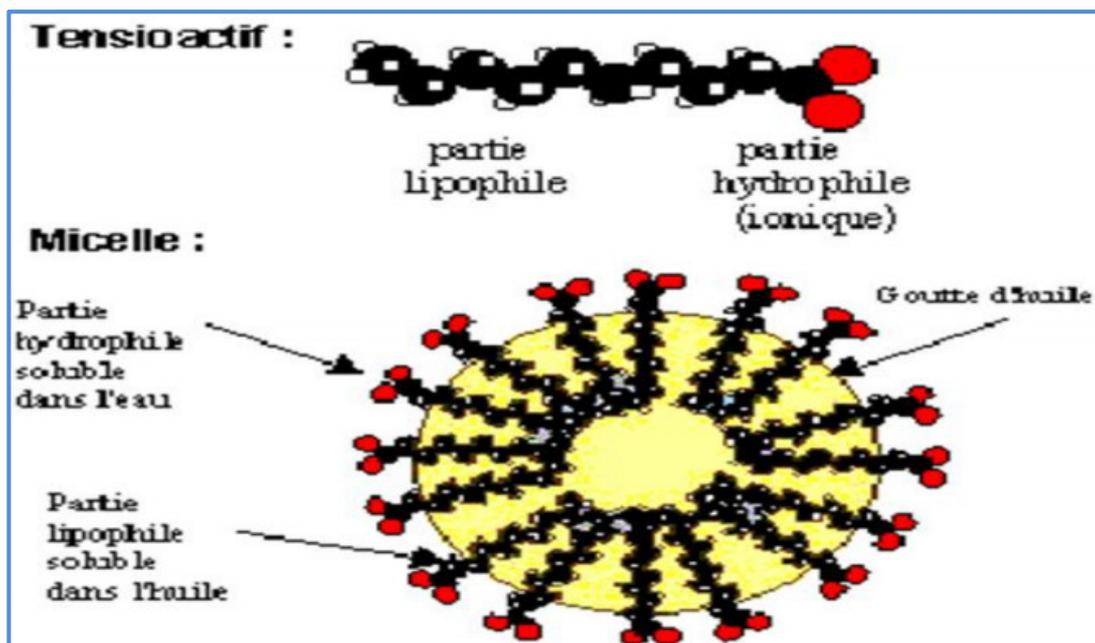


Figure 1. 8 : Représentation schématique d'une micelle de biosurfactants [51].

La valeur de la CMC est une caractéristique de tensioactif, elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne hydrophobe, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température [50].

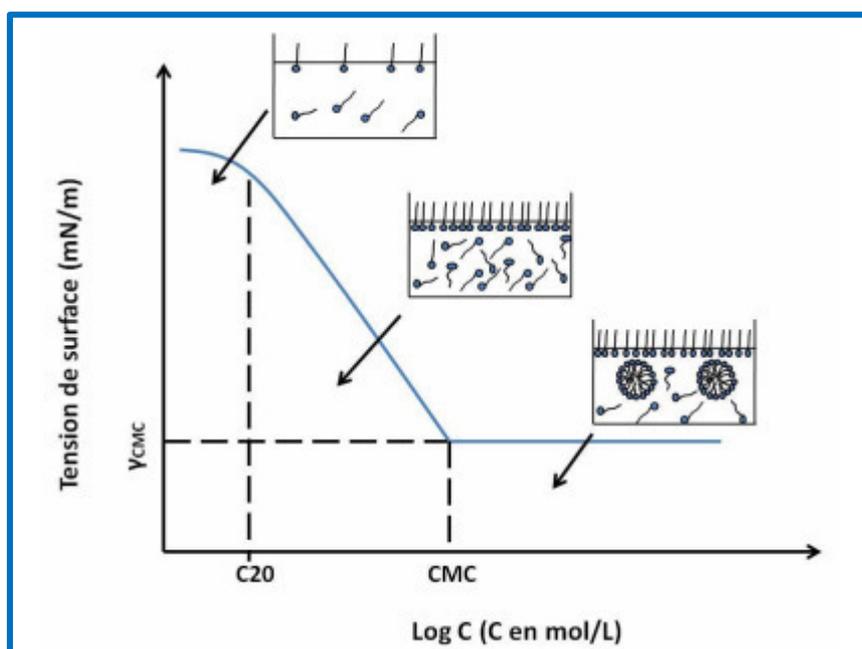


Figure 1. 9 : Graphique pour la détermination de la CMC [52].

1.2.2.5 Solubilisation des biosurfactants dans l'eau

La solubilisation est un phénomène prouvé lorsque au-dessus de la CMC, la solubilité des constituants insolubles et peu solubles augmente considérablement [53].

La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures dépend du nombre de liaisons C-C présentes dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant [54]:

- ↳ Si la longueur de la chaîne de la partie lipophile est inférieure à 12 liaisons C-C, le biosurfactant est soluble dans l'eau ;
- ↳ Si la partie non polaire (lipophile) a plus de 16 liaisons C-C, le surfactant est non soluble dans l'eau.

La valeur de HLB aussi sert à déterminer le degré de solubilité du composé. Une valeur proche de 1 caractérise un produit très peu soluble alors qu'une valeur proche de 20 indique que le produit est très soluble [55].

1.2.2.6 Solubilité des biosurfactants en fonction de la température

La température plus particulière celle au point Krafft affecte la solubilité des biosurfactants dans l'eau [56]. On constate que la solubilité des biosurfactants ioniques a tendance à augmenter lorsque la température augmente, Cette augmentation est assez lente. Alors qu'à partir d'une certaine température, appelée température de Krafft, on observe que la solubilité augmente très rapidement [57].

1.2.2.7 Tolérance à la température et au pH

De nombreux biosurfactants peuvent être utilisés à des températures supérieures et des valeurs de pH allant de 2 à 12 [58]. La lichénysine de *Bacillus licheniformis*, par exemple, résiste à des températures atteignant les 50°C, et des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 9 [59]. Un autre biosurfactant produit par *Arthrobacter protophormiae* s'est avéré être à la fois thermostable (30-100°C) et stable au pH (2-12) [60].

1.2.3 Types de biosurfactants

Les biosurfactants sont regroupés en fonction de leur structure chimique, de leur fonction et leur origine microbienne [61].

Ces agents biosourcés sont classés en deux classes [62,63] :

- ↳ Les biosurfactants à faible poids moléculaire qui sont efficaces dans l'affaiblissement de la tension superficielle et interfaciale, incluant les glycolipides, les lipopeptides, les peptides, les acides gras et les lipides neutres ;
- ↳ Les biosurfactants à poids moléculaire élevé qui sont très efficaces pour stabiliser les émulsions, constitués de polysaccharides, protéines, lipopolysaccharides ou complexes des mélanges de ces biopolymères.

Et comme les tensioactifs synthétisés chimiquement, La portion hydrophile du biotensioactifs permet de distinguer quatre types de tensioactifs biologiques [64, 65] :

- ↳ Les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- ↳ Les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- ↳ Les non ioniques, sans charge ;
- ↳ Les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre.

Différents types de biosurfactant peuvent être produits à base d'une même source de carbone (tableau 1.3).

Tableau 1. 3 : Principaux biotensioactifs obtenus à partir de différentes sources de carbone [66].

Source	Biotensioactifs nonioniques	Biotensioactifs anioniques	Biotensioactifs cationiques et amphotères
Alcools gras	Alkylpolyglucosides Alcools gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Alkyléthersulfates Alkylsulfates Sulfosuccinates	
Acides gras	Esters de sorbitan Esters de (poly)glycérol Acides gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Savons Condensats acides gras acide/ aminé/ peptide Alkyl iséthionates	Imidazolines
Amines grasses	Oxydes d'amines Amines éthoxylées		Sels d'amines Sels d'ammonium quaternaire
Esters méthyliques	Sucroesters Alcanolamides	Méthyléthersulfonates	
Huile	Alcanolamides Huiles éthoxylées		

1.2.4 Nature chimique et classification

Compte tenu de la nature biochimique et des origines microbiennes, le groupe principal de biosurfactants comprend les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, l'acide gras, les surfactants polymériques ou lipopolysaccharides et les surfactants en particules.

1.2.4.1 Glycolipide

La structure conventionnelle de ce type de biosurfactant est un groupe de tête polaire saccharidique en combinaison avec une queue hydrocarbonée (une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide gras hydroxylés), ce lien est au moyen d'éther ou d'un groupe ester. Le saccharide peut être mono-, di-, tri- ou tétra-saccharides et comprend le glucose, le mannose, le galactose, le rhamnose, le sulfate de galactose et l'acide glucuronique [67-69].

Beaucoup de bactéries telles que *Pseudomonas*, *Streptococcus* produisent des Glycolipides [70]. Les glycolipides les plus célèbres sont les rhamnolipides, les tréhalolipides, les sophorolipides et les lipides de mannosylérythriol.

➤ Les Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires combinent le L-rhamnose et l'acide β -hydroxyalcanoïque, produits par *Pseudomonas sp.* [71] tels que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida* [72]. Les rhamnolipides sont synthétisés lorsqu'une ou deux molécules de sucre rhamnose fusionnent avec un ou deux acides β -hydroxydécanoïque [73]. Une fonction OH de l'acide β -hydroxydécanoïque est impliquée dans une liaison glycosidique avec l'extrémité réductrice du disaccharide de rhamnose, le groupe OH du deuxième acide est impliqué dans la formation d'ester [74,75].

Environ 60 types différents de rhamnolipides existent mais quatre représentants sont les plus communs des rhamnolipides, Rh1 à Rh4 [76]. Ces quatre types de rhamnolipides sont présentés comme suit (figure 10) [77] :

- ↳ Les mono-rhamnolipides (Rh1) qui contiennent un sucre rhamnose attaché à deux molécules d'acide β hydroxydécanoïque ;
- ↳ Les di-rhamnolipides (Rh2), qui contiennent deux sucres de rhamnose attachés à deux molécules d'acide β –hydroxydécanoïque ;
- ↳ Les tri-rhamnolipides (Rh3), qui contiennent un sucre rhamnose attaché à une molécule d'acide β –hydroxydécanoïque ;
- ↳ Les tétramnolipides (Rh4), qui contiennent deux sucres de rhamnose attachés à une molécule d'acide β –hydroxydécanoïque.

Les rhamnolipides sont caractérisés comme potentiellement toxiques pour la végétation naturelle, mais les chercheurs ont également constaté qu'ils réduisaient la toxicité de composés spécifiques en augmentant la solubilisation des hydrocarbures, facilitant ainsi la biodégradation [78].

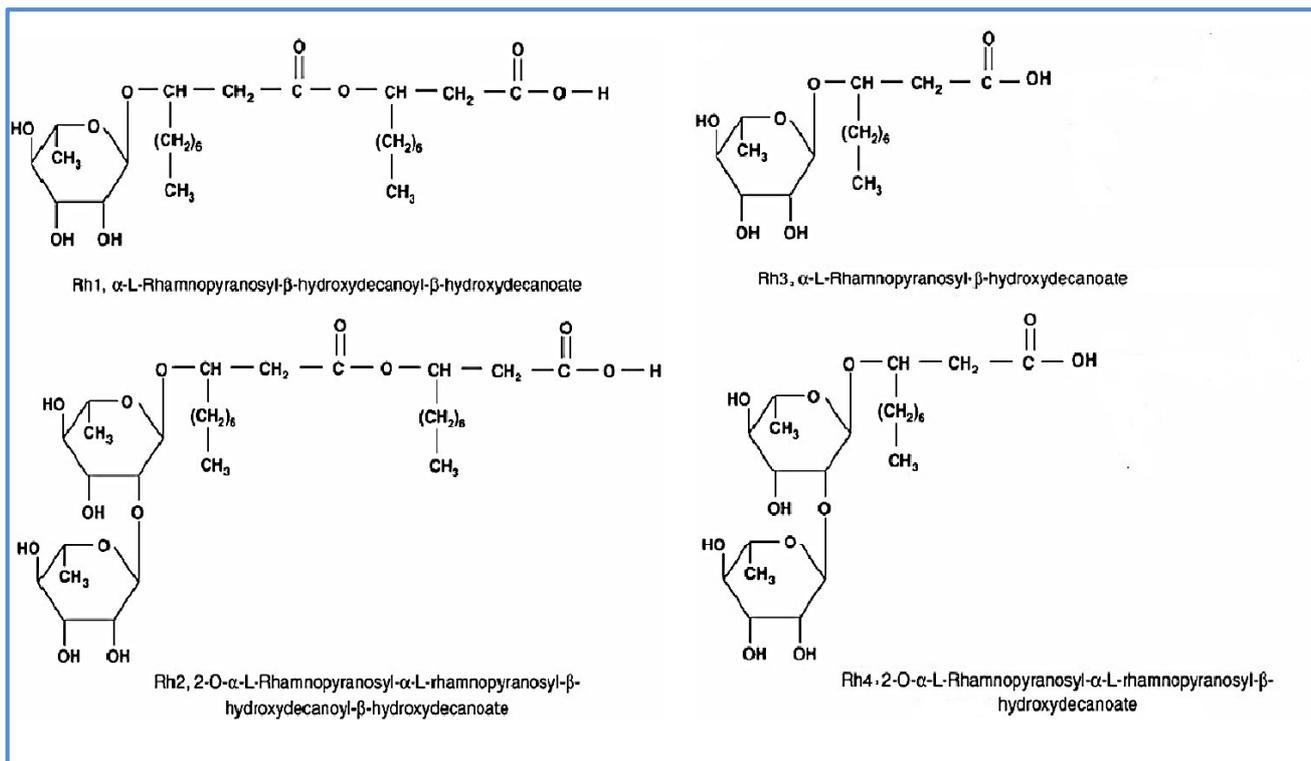


Figure 1. 10 : Structures chimiques des rhamnolipides les plus connus produits par *Pseudomonas* [79].

➤ Les tréhalolipides

Il s'agit des composants de base d'un certain nombre de glycolipides de la paroi cellulaire [80]. Les tréhalolipides constituent d'un disaccharide non-réducteur α -D-thréalose lié en C6 et C6 aux acides mycoliques qui sont des acides gras β -hydroxylés ramifiés à chaîne longue [36,81]. Les tréhalolipides produits par divers organismes diffèrent par la taille et la structure de l'acide mycolique, par le nombre d'atomes de carbone et par le degré d'insaturation. Des exemples de producteurs connus sont des bactéries Gram positives et des actinomycètes telles que *Mycobacterium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Nocardia sp.* et *Rhodococcus sp.* mais la production par *Rhodococcuserythropolis* a été mieux caractérisée [36].

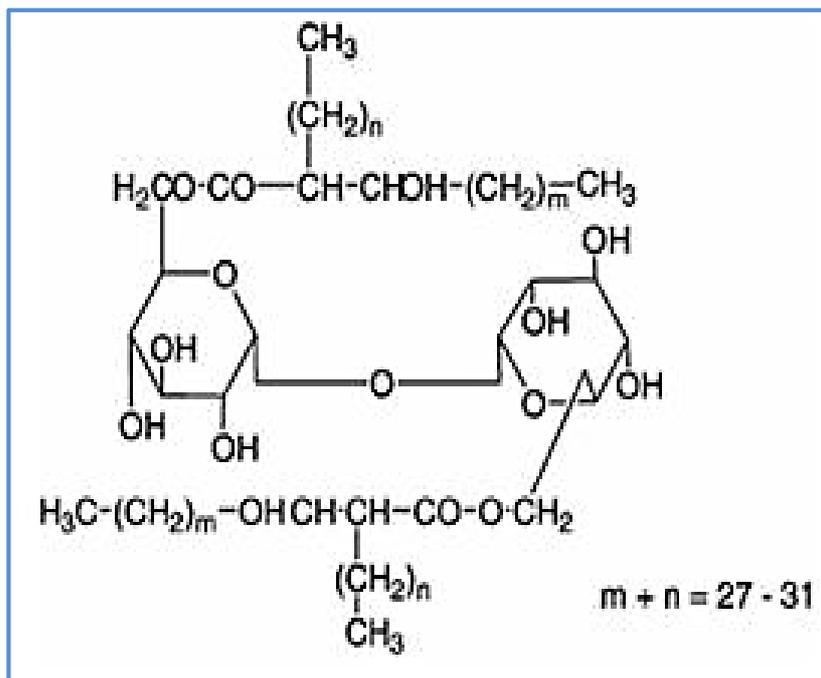


Figure 1. 11 : Structure d'un représentant de tréhalolipides [70].

➤ Les sophorolipides

Les sophorolipides sont des glycolipides extracellulaires [80] principalement synthétisés par des souches de levure telles que *Candida Magnoliae* [81], *Candida Bombicola* [82], *Candida Apicola* [83], *Candida Petrophilum* [84] et *Candida Bogoriensis* [85]. Les *Wickerhamielladomercqiae* synthétisent aussi des sophorolipides [86].

Les sophorolipides (SLP) sont composées de sucre dimérique (sophorose disaccharide) (2'-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glycopyranose) lié glycosidiquement (liaison β -glycosidique) au groupe hydroxyle d'un acide gras de longue chaîne généralement de 16 à 18 atomes de carbone avec une ou plusieurs insaturations [87].

Les SLP sont subdivisés en 2 types, à savoir les SLP acides (non-lactoniques) et les SLP lactoniques (figure 12) [88] :

- ↳ SLP Acides « non-lactoniques » : Le groupement acide gras hydroxyle acide présente une fonction acide carboxylique libre ;
- ↳ SLP lactoniques : la fonction d'acide carboxylique d'acide gras hydroxyle forme un cycle lactone macrocyclique avec le groupe 4''-hydroxyle du sophorose par estérification intramoléculaire.

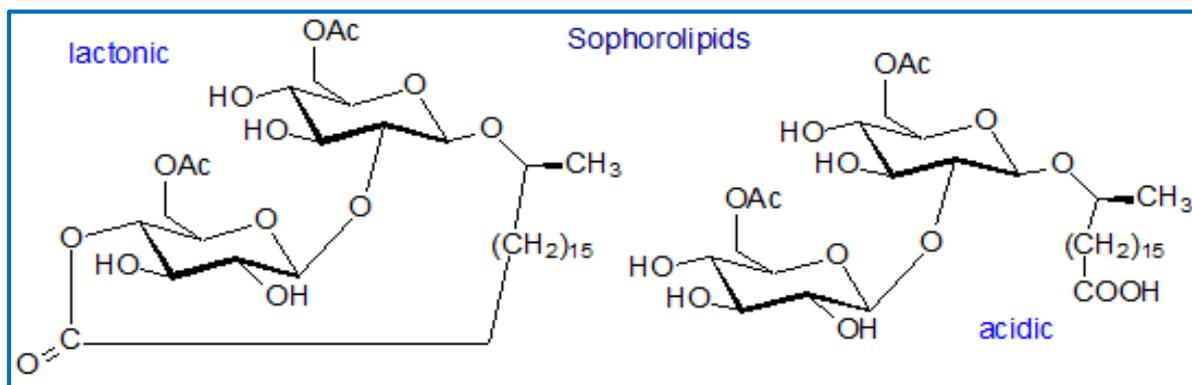


Figure 1. 12 : Structures des deux types de sophorolipides [80].

➤ Les lipides de mannosylérythriol (MEL)

Les MEL sont une catégorie de glycolipides développés par une variété de levures et de souches fongiques [89], ils sont produits par *Pseudozyma sp.*, comme un composant majeur pendant que *Ustilago sp.* les produit comme composant mineur [90]. Ces biosurfactants sont constitués d'acides gras attachés au 4-O-β-D-mannopyranosyl-erythritol ou au 1-O-β-D-mannopyranosyl-erythritol comme un groupe de tête hydrophile [80]. Les résidus acyles sont des acides gras en C8, C10, C12 et C14 [91].

Ils ont été classés par composition structurale en quatre types : MEL-A, MEL-B, MEL-C et MEL-D (figure 13) [92] :

- ↪ MEL-A, MEL-B : composants principaux.
- ↪ MEL-C et MEL-D : sous-produits mineurs.

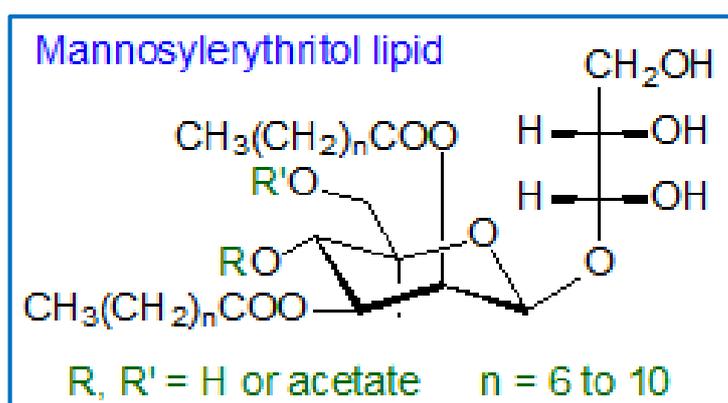


Figure 1. 13 : Les composants possibles des lipides de mannosylérythritol: **Mel-A:** R'=R=acétyle, **Mel-B:** R'=acétyle et R=H, **Mel-C:** R'=H, R=acétyle, **Mel-D:** R'=R=H, n= 6-12 [80].

1.2.4.2 Les lipopeptides

Les lipopeptides microbiens sont des peptides cycliques qui sont acylés avec un acide gras. Ils sont sécrétés dans le milieu de croissance par divers micro-organismes, y compris des espèces Gram-positives, telles que *Bacillus*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*, et des espèces Gram-négatives, telles que *Pseudomonas* et *Serratia* [93]. Quelques lipopeptides sont expliqués comme suit :

➤ Surfactine

La surfactine, est un lipopeptide cyclique [93], et l'un des biosurfactants les plus performants, qui a été décrit pour la première fois dans *B. subtilis ATCC-21332*, avec une capacité d'affaiblir la tension de surface de 72 à 27,9 mN.m⁻¹ et d'avoir une concentration micellaire critique de 0,017 g.l⁻¹ [84,94]. La molécule de surfactine est constituée de sept acides aminés et d'acides gras 3-hydroxyliques bien distingués. Le composant principal est l'acide 3-hydroxyl-13-méthyl-myristine [93], formant un cycle lactonique avec le heptapeptide de séquence Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu avec la configuration LLDLLDL (figure15) [95], elle est synthétisée par un peptide synthétase linéaire, non ribosomale, la surfactine synthétase [96].

Les acides aminés L-Glu et L-Asp renforcent le caractère amphiphile responsables des propriétés tensioactives [95].

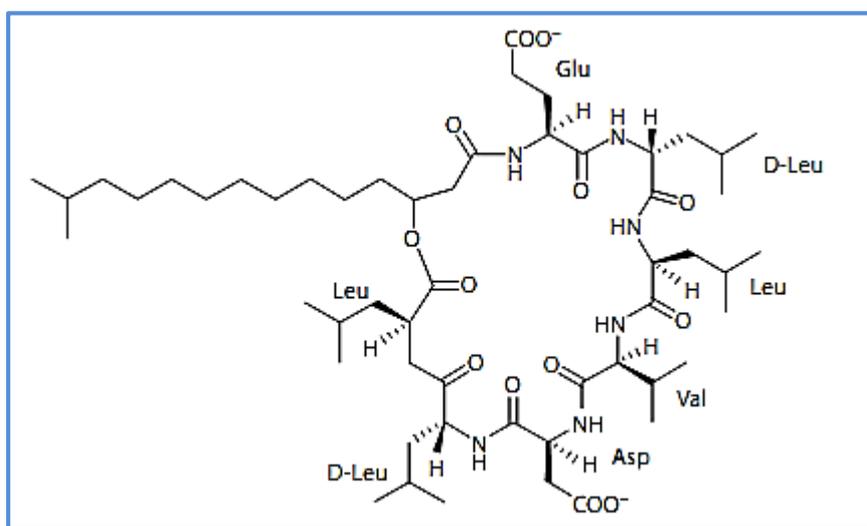


Figure 1. 14 : Structure de surfactine produite par *B. subtilis* [97].

➤ Iturine

L'iturine est également un groupe de lipopeptides mais moins puissant que la surfactine. La mycosubtiline était le premier membre découvert de la famille des iturins de *Bacillus subtilis* mentionné dans la littérature [98]. Un deuxième composé similaire nommé iturin a été décrit par Delcambe [99]. Son nom est lié à l'Ituri, une région du Congo où le composé a été isolé à partir d'un échantillon de sol. L'iturine A est le principal lipopeptide étudié de cette famille [100]. Six autres membres de la famille iturin ont ensuite été décrits : l'iturine C, la bacillomycine D, F, L et Lc et la mycosubtiline [101].

Le groupe de composés ituriniques sont des lipopeptides cycliques qui composent d'un acide gras β -aminé dans sa chaîne latérale. Les iturines sont des agents antifongiques puissants [102-104]. Toutes les iturines ont la même séquence chirale LDDLLDL avec une partie commune du cycle peptidique, β -acide aminé L-Asx-D-Tyr-D-Asn, à l'exception de l'iturine C dans laquelle le premier acide aminé de la chaîne peptidique est L-Asn conformément aux travaux récents [105].

➤ Fengycine et plipastine

Les plipastines et les fengycines sont des lipodécapetide combinés avec un acide gras β -hydroxy dont 8 peptides sont organisés en une structure cyclique [106,107]. Les fengycines ont été isolées de *Bacillus subtilis* [106], et les plipastatines ont été isolées de *Bacillus cereus* [108]. La différence structurale entre ces deux composés est montrée dans la position du D-tyr qui prend la troisième position chez les fengycines et la neuvième position chez les plipastines [109].

➤ Lichenysine

La lichénysine, développée par *Bacillus licheniformis*, présente une structure et des propriétés physicochimiques similaires à celles de la surfactine [59]. Lichenysine A produite par la souche *B. licheniformis* BAS50 est caractérisée comme contenant une molécule d'acide gras β -hydroxy à longue chaîne [110]. Ces agents tensioactifs administrés par *B. licheniformis* peuvent réduire la tension superficielle de l'eau à 27 mN.m^{-1} et la tension interfaciale entre l'eau et le n-hexadécane à $0,36 \text{ mN.m}^{-1}$ [111]. La lichénysine a été rapporté comme un chélateur des cations plus efficace que la surfactine [112].

➤ Arthrofactine

L'arthrofactine est un lipopeptide produit par la souche MIS38 de l'espèce *Arthrobacter* a été purifié et chimiquement définie en tant que 3-hydroxydécanoyl-D-leucyl-D-asparagyl-D-thréonyl-D-leucyl-D-leucyl-D-séryl-L-leucyl-D-séryl-L-isoleucyl-L-isoleucyl-L-comme paragyl lactone. L'activité de surface de l'arthrofactine a été examinée, avec de la surfactine comme témoin. Les valeurs critiques de concentration en micelles de l'arthrofactine et de la surfactine atteignent des valeurs d'environ $1 * 10^{-5}M$ et de $7 * 10^{-5} M$ à $25^{\circ}C$, respectivement. L'arthrofactine s'est révélée cinq à sept fois plus efficace que la surfactine. La valeur minimale de la tension superficielle de l'arthrofactine était de $24 mN.m^{-1}$ à une concentration supérieure à la concentration micelles [113].

Polymyxines, viscosines et Serrawrttines sont aussi des lipopeptides cycliques produits respectivement par *Bacillus polymyxa* [114], *Pseudomonas sp.* (*P. fluorescens*, *P. libanensis*, *P. viscosa*) [115,116] et *Serratia marcescens* [117].

1.2.4.3 Phospholipides

La production quantitative de phospholipides a également été décelée chez *Aspehergillus sp.* [118] et *Thiobacillus thiooxidans* [119]. Par exemple, des vésicules riches en phospholipides (phosphatidyléthanolamine) ont été créées par *Acinetobacter sp.* cultivé sur hexadécane [120]. Phosphatidyléthanolamine a été également produite par *Rhodococcus erythropolos* cultivé sur n-alcane [121].

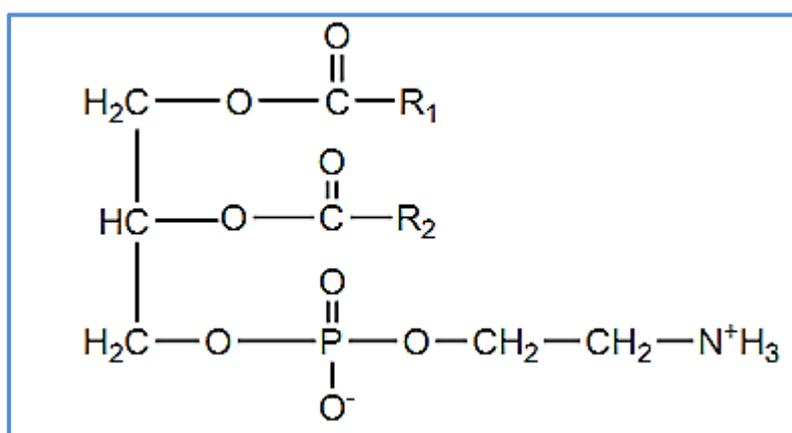


Figure 1. 15 : Structure de la phosphatidyléthanolamine, un biosurfactant puissant produit par *Acinetobacter sp* [36].

1.2.4.4 Acides gras

Des acides gras libres extracellulaires sont produits grâce à la dégradation des hydrocarbures par des microbes lorsqu'ils sont cultivés sur des alcanes, et présentent une bonne activité tensioactive. Les biosurfactants d'acides gras sont des acides gras saturés dans la gamme C12 à C14 et des acides gras complexes contenant des groupes hydroxyles et des ramifications alkyles [122,123]. Il a été montré que la souche *Arthobacter AK-19* [124] et *P. aeruginosa 44T1* [125], accumulaient 40-80% de ces lipides lorsqu'ils sont cultivés respectivement à l'hexadécane et à l'huile d'olive.

1.2.4.5 Lipopolysaccharides ou les biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymères sont des biopolymères ayant une masse moléculaire élevée [126]. Alsan, liposan, émulsan de lipomanan et quelques autres complexes polysaccharidiques protéiques sont les biosurfactants les mieux étudiés [111].

➤ Emulsan

C'est un lipopolysaccharide, engendré par *Acinetobacter calcoaceticus* et le moins toxique *A. venetianus*, dispose d'un squelette trisaccharidique de D-galactosamine, d'acide D-galactosaminouronique et de désoxyaminohexose (figure 17), auxquels des groupes d'acides gras, dont la longueur de chaîne varie de C10 à C22, sont liés par des liaisons ester et amide [80].

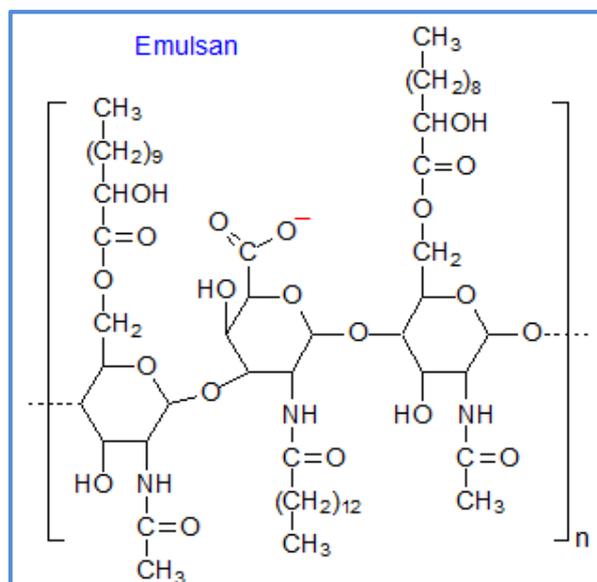


Figure 1. 16 : Structure d'un émulsan [50].

➤ **Alasan**

Alasan est un complexe d'alanine composant d'un hétéropolysaccharide et un polymère protéique qui stabilise les émulsions huile dans eau, dans les n-alcane de longueur de chaîne 10 ou plus et dans les aromatiques [127].

➤ **Liposan**

Candida lipolytica produit un émulsifiant hydrosoluble extracellulaire appelé Liposan qui est composé de 83% (p / v) de glucides et de 17% (p / v) de protéines, la portion glucidique est un hétéropolysaccharide constitué de glucose, de galactose, de galactosamine et d'acide galacturonique [128].

1.2.4.6 Biosurfactants en particules

➤ **Les vésicules**

Les vésicules membranaires extracellulaires séparent les hydrocarbures pour former une microémulsion et joue un rôle important dans l'absorption des alcanes par les cellules microbiennes [40, 129]. Les vésicules d'*Acinetobacter sp. HO1-N* présentent un diamètre de 20 à 50 nm sont composées de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides [63].

➤ **Les cellules microbiennes entières**

La plupart des microorganismes dégradent les hydrocarbures et les composés non-hydrocarbonés. Des espèces comme *cyanobactéries* et espèces pathogènes ont une forte affinité pour les interfaces eau-hydrocarbure et air-eau. Dans de tels cas, la cellule microbienne elle-même est un tensioactif [74].

1.2.5 Biosynthèse de biosurfactants

Les substrats hydrophiles sont principalement utilisés par les microorganismes pour le métabolisme cellulaire et la synthèse de la fraction polaire d'un biosurfactant, tandis que les substrats hydrophobes sont utilisés exclusivement pour la production de la partie hydrocarbures du biosurfactant [36, 130]. Il existe plusieurs voies métaboliques de synthèse de ces deux groupes de précurseurs (figure 1.17) qui utilisent des enzymes spécifiques [131]. Ces voies principales de la biosynthèse sont arrangées dans quatre groupes possibles [132] :

- ↳ Les fragments hydrophiles et hydrophobes sont synthétisés par synthèse de novo par deux voies différentes ;
- ↳ Le groupement hydrophile est synthétisé par synthèse de novo et le groupement hydrophobe est induit par le substrat ;

- ↳ Le groupement hydrophobe est synthétisé par une synthèse de novo et le groupement hydrophile dépend du substrat ;
- ↳ La synthèse des deux fragments dépend du substrat.

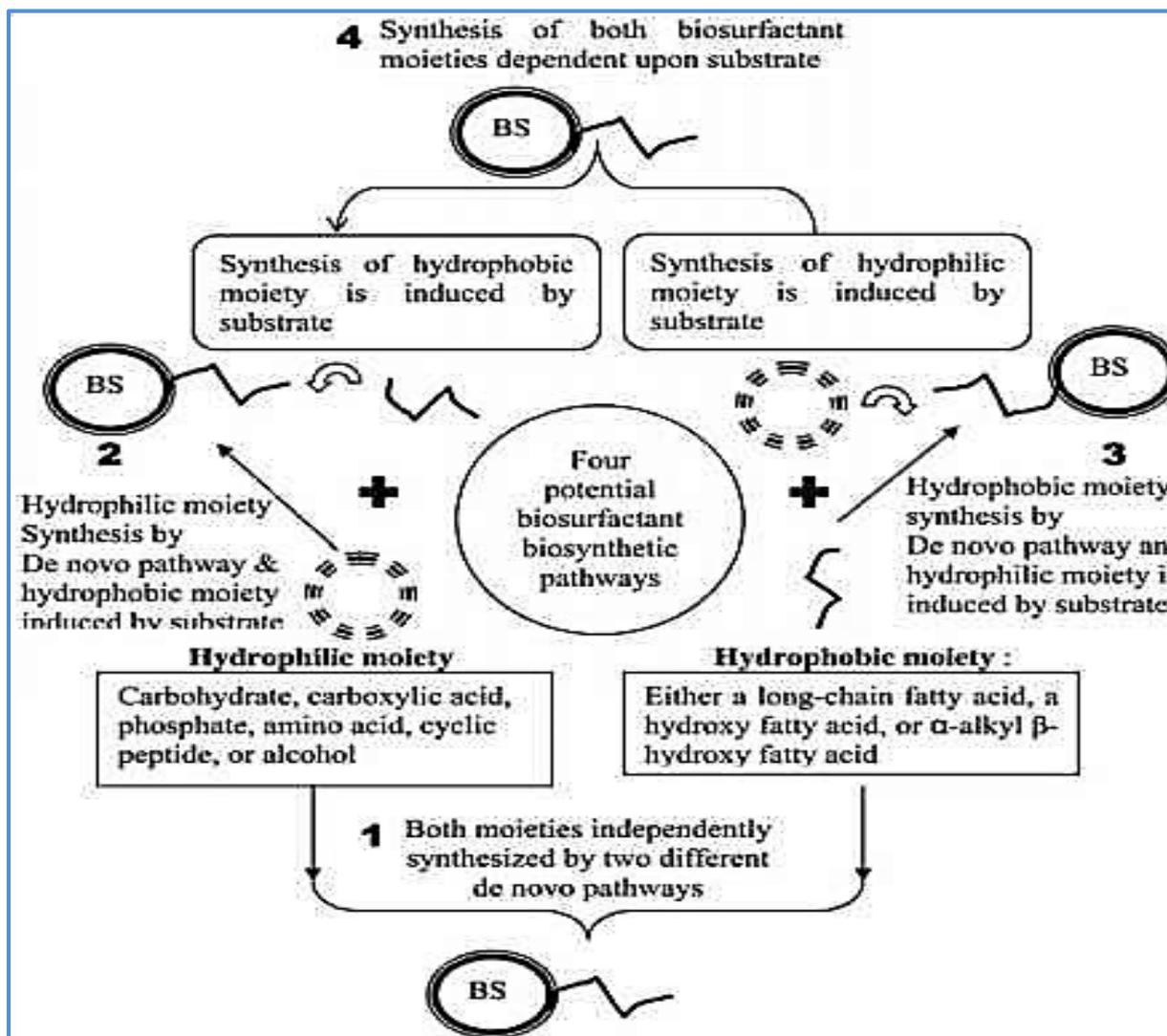


Figure 1. 17 : Les voies biosynthétiques de biosurfactants [132].

L'exemple de biosynthèse du rhamnolipide

Les rhamnolipides sont synthétisés à partir de deux précurseurs pour les fragments rhamnolyse et lipidiques qui sont respectivement désoxy-thymidine di-phospho-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose), produit à partir de D-glucose et le 3- (3-hydroxyalcanoyloxy) alcanolate (HAA) [133], par l'action de trois enzymes : RhIA, RhIB et RhIC d'où la biosynthèse se fait par 2 réactions séquentielles La première réaction implique la dimérisation de deux chaînes d'acide b-hydroxydécanoïque catalysées par RhIA. Le dimère subit ensuite deux réactions séquentielles de rhamnosylation avec deux rhamnosyltransférases différentes : la rhamnosyltransférase 1 (Rt-

1) et la rhamnosyltransférase 2 (Rt-2). Les Rhamnosyltransférases RhIB et RhIC catalysent le transfert du dTDP-L-rhamnose soit à l'HAA, soit à un mono-rhamnolipide précédemment généré, respectivement. La rhamnosyltransférase II (RhIC) ajoute une autre fraction de rhamnose au monorhamnolipide, ce qui donne un di-rhamnolipide (figure 1. 18) [134, 135, 136].

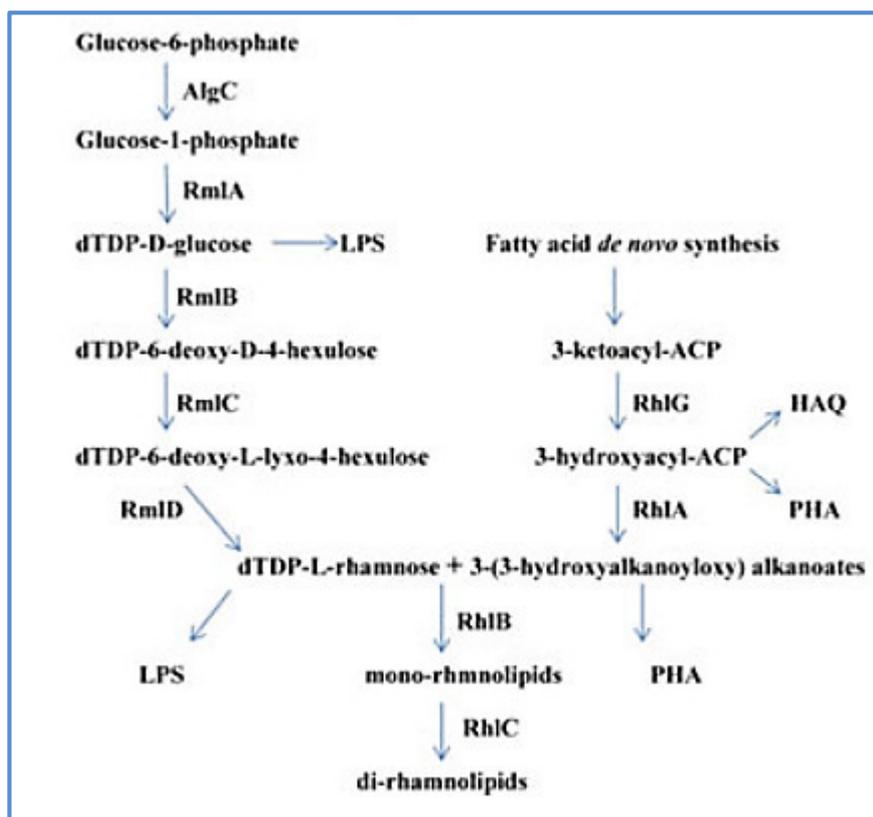


Figure 1. 18 : Voie de biosynthèse d'un rhamnolipide [133].

1.2.6 Avantages et inconvénients des biosurfactants

Les propriétés physicochimiques des biosurfactants, telles qu'une réduction dans la tension superficielle, la stabilisation des émulsions, la faible CMC, la solubilité et la tolérance à la température et au pH, sont très importants dans l'évaluation de la performance d'un biosurfactant avec les avantages suivants :

- ↳ Biodégradabilité : les microorganismes dégradent facilement les agents de surface biosourcés dans l'eau et le sol, ce qui rend leur utilisation adéquate pour le traitement des déchets [137] ;
- ↳ Faible toxicité : les biotensioactifs sont très utilisés dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires car ce sont des produits non toxiques [138] ;

- ↪ Disponibilité de la matière première : Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières bon marché comme l'huile de colza, les effluents de traitement de la pomme de terre.... [69] ;
- ↪ Spécificité : les biosurfactants en tant que molécules organiques complexes avec des groupes fonctionnels spécifiques, sont souvent spécifiques dans leur action [137] ;
- ↪ Biocompatibilité et digestibilité : on dit qu'un biosurfactant est biocompatible lorsqu'il est bien toléré par les organismes vivants. Et en interagissant avec ces organismes, ces derniers ne changent pas leurs bioactivités. Cette propriété permet leur application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et comme additifs alimentaires fonctionnels [58] ;
- ↪ Économie de production : la production en masse de biosurfactant peut être économiquement acceptable car ces derniers peuvent être produits à partir des déchets industriels.

Malgré les avantages, les points défavorables doivent également être mentionnés [121] :

- ↪ La production de biosurfactants devient coûteuse à grande échelle mais, ce problème peut être franchi avec la combinaison de substrats à faible coût ;
- ↪ La difficulté d'acquérir de produits très pure en raison du besoin d'étapes de purification consécutives pour le bouillon métabolique ;
- ↪ On ne peut pas atteindre des rendements élevés en tensioactifs, car les espèces super-productrices sont rares et nécessitent un milieu de culture complexe ;
- ↪ La régulation de la synthèse des biosurfactants n'est pas totalement comprise, car ces biomolécules peuvent être produites en tant que métabolites secondaires ou en association avec la croissance microbienne ;
- ↪ La formation de la mousse entrave souvent l'augmentation de la productivité.

1.2.7 Applications des biosurfactants

Les biosurfactants ont une large gamme d'applications biotechnologiques dans le pétrole, les aliments, les boissons, les cosmétiques, les détergents, les textiles, les peintures, les mines, la cellulose, les produits pharmaceutiques et les nanotechnologies [139].

➤ Dans l'agriculture [140,141]

- ↪ Ils sont utilisés en tant qu'agents mobilisateurs pour améliorer la solubilité des composés chimiques biologiquement dangereux (comme HAP), on peut dire que les

biosurfactants aident les microbes à s'adsorber sur les particules de sol occupée par les polluants ;

- ↪ Ils sont utilisés aussi pour l'hydrophilisation des sols lourds pour préserver leur capacité nutritive ;
- ↪ Certains biotensioactifs sont utilisés pour la lutte biologique contre les maladies des plantes, grâce à leurs activités antifongiques.

➤ **En médecine**

Une large gamme d'applications de biosurfactants existe dans ce domaine :

- ↪ Activité antimicrobienne [142] ;
- ↪ Activité anti-cancéreuse [69] ;
- ↪ Agents antiadhésifs [69] ;
- ↪ Adjuvant immunologique [142] ;
- ↪ Activité antivirale [69] ;
- ↪ Livraison des gènes [142].

➤ **Dans l'industrie alimentaire**

Ils ont été utilisés en tant qu'ingrédients de formulation alimentaire et agents antiadhésifs pour contrôler l'agglomération des globules gras, améliorer la texture et la durée de conservation des produits [69].

➤ **Dans l'industrie cosmétique**

Leur utilisation dans ce domaine est vaste. On les retrouve comme émulsifiants, agents moussants, solubilisants, agents mouillants, nettoyants, agents antimicrobiens, médiateurs de l'action enzymatique, insectifuges, antiacides, produits de bain, tampons contre l'acné, produits antipelliculaires, solutions pour les lentilles, produits pour bébés, mascara, rouge à lèvres, dentifrices... [142].

➤ **Dans la nanotechnologie**

Ils ont été utilisés dans la nanotechnologie et la synthèse des nanoparticules [143]. Les nanotiges d'oxyde de nickel (NiO) peuvent être produites par des microémulsions eau dans l'huile [134].

➤ **Dans l'industrie pétrolière**

• **La biorémédiation des hydrocarbures**

Deux mécanismes sont utilisés dans la biorémédiation des sols contaminés par les hydrocarbures, le premier implique l'augmentation de la disponibilité du substrat hydrophobe vis-à-vis des microorganismes, par conséquent la tension superficielle du milieu autour de la bactérie et la tension interfaciale entre la paroi cellulaire et les molécules hydrocarbonées sont réduites. Le deuxième mécanisme implique l'interaction entre le biosurfactants et la surface cellulaire, provoquant des modifications dans la membrane sans l'endommagement ce qui aide les hydrocarbures à adhérer [145,147].

• **Biosurfactants comme nettoyage dans le réservoir de stockage de pétrole**

Un essai a été rapporté sur le terrain au cours duquel des biosurfactants produits à partir d'une souche bactérienne ont été employés pour tester leur capacité à nettoyer les réservoirs de stockage d'hydrocarbures et récupérer les hydrocarbures des boues émulsionnées. Il est possible de récupérer plus de 90% des hydrocarbures piégés dans la boue [147].

1.3 La production de biosurfactants

1.3.1 Identification des biosurfactants

Après avoir récupéré et extrait le biosurfactant du milieu de culture, il faut l'identifier et déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses quantitatives on peut utiliser les suivantes :

- ↳ La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore [148] ;
- ↳ La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels [149] ;
- ↳ La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule [70] ;
- ↳ La résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser [70].

SK Sawhney and R. Singh utilisent d'autres analyses biochimiques suivi par FT-IR, pour identifier les biosurfactants. Lorsque le biosurfactant brut recueilli des isolats bactériens a été soumis à une série de tests : le test de ninhydrine pour l'acide aminé, le test d'iode pour les hydrates de carbone, le test de solubilité et de saponification pour les lipides et le test d'acroléine pour le glycérol. En outre, le produit a été confirmé par spectromètre infrarouge à transformée de Fourier [150].

1.3.2 Les facteurs influençant la production de biosurfactants

1.3.2.1 Source de carbone

La source de carbone est importante pour la croissance et la production de biosurfactants. Elle varie d'une espèce à l'autre et influence la quantité et la qualité du biosurfactant produit [121]. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose et le glycérol ont été rapportés comme une bonne source de carbone pour la production de biosurfactants [36].

1.3.2.2 Source d'azote

L'azote est un complément pour la production de biosurfactants lors du processus de fermentation, le rapport C/N (faible quantité d'azote) affecte l'accumulation du métabolite. Des rapports C/N élevés limitent la croissance bactérienne, favorisant le métabolisme cellulaire vers la production de métabolites. Par contre, l'excès d'azote conduit à la synthèse du matériel cellulaire et limite l'accumulation de produits [125].

1.3.2.3 pH et température

Les valeurs pH et la température ne peuvent pas être fixées et prendre des valeurs fixes pour la majorité des microorganismes, ils dépendent de l'espèce cultivé. La plupart des productions de biosurfactants sont effectuées dans une plage de température de 25 à 30 ° C [36].

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, une meilleure production est établie à pH entre 6 et 6,5. En dehors de cet intervalle la production chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardiacorynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6 à 8 [151].

1.3.2.4 Aération et agitation

L'aération et l'agitation du milieu de culture sont nécessaires, car elles facilitent le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse.

Pour les bactéries, une grande vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement faible de production. Cependant pour les levures une grande vitesse d'agitation, le rendement est bon [36].

1.3.2.5 Concentration en sel

La concentration en sel affecte les activités cellulaires des microorganismes. En revanche, quoique des concentrations jusqu'à 10% ont permis de détecter de légères réductions de la CMC, c'est ce qui a été observé pour certains biosurfactants contrairement à ce qui a été attendu [36].



Chapitre 2 : Matériel et méthodes



2.1 Objectif du travail

Ce travail a pour objectif l'étude de la production de biosurfactants par une souche bactérienne, isolée à partir d'un site contaminé par des hydrocarbures, en testant l'influence de différentes sources de carbone sur son rendement de production.

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire de Bioingénierie et Génie des Procédés du Département de Génie de l'Environnement à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.

2.2 Matériel

2.2.1 Appareillage

Appareil	Marque
Autoclave	NUVE
Incubateur-agitateur	NUVE – WISESHAKE WISD
Four Pasteur	SELECTA
Etuve	FISHER BIOBLOCK SCIENTIFIC
Centrifugeuse à froid	TOMOS
Spectrophotomètre UV-Visible	PRIM SECOMAM
Tensiomètre	GIBERTINI
Vortex	TECHNOKARTELL
Réfrigérateur	ARTHUR MARTIN ELECROLUX
pH-mètre	HANNA
Bec bunsen	/
Balance analytique	OHAUS
Hotte microbiologique	TELSTAR MINI-U/PCR
Analyseur du carbone organique total	ANALYTICJENA

2.2.2 Verreries et matériel plastique

La stérilité du matériel et de la zone de travail dans un laboratoire de microbiologie est obligatoire.

Verrerie	Matériel plastique
Pipettes graduées	Boîtes de Pétri
Pipettes Pasteur / Râteaux	Micropipettes 250 µl
Erlenmeyers 100 ml, 500ml	Tubes eppendorf 1,5 ml
Fioles 250 ml, 500 ml	Seringues 5 ml, 10 ml
Béchers 50 ml, 100 ml, 500 ml	
Tubes à essai	

2.2.3 Matériel biologique

La souche bactérienne : Tout au long de ce travail, nous avons utilisés une souche pure de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures dans le cadre d'un travail antérieur. Cette souche a été conservée à froid dans un tube à essai contenant du bouillon nutritif.

2.2.4 Produits chimiques et milieux de culture

2.2.4.1 Milieux de culture

- Milieu de culture solide :** la gélose nutritive a été préparée en introduisant 23 g de la gélose nutritive en poudre dans un litre d'eau distillée. Après autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, le milieu est réparti dans des boîtes de pétrie (hauteur du milieu : de 3 à 4 mm) ensuite laissé refroidir pour obtenir sa solidification.
 Ces boîtes peuvent être utilisées tout de suite ou stockées dans des sacs en plastique dans le réfrigérateur.
- Milieux de culture liquides :** quatre milieux de culture de compositions différentes ont été employés. Leurs compositions diffèrent uniquement par la nature de la source de carbone. Ils sont constitués, en sus de la source de carbone, de :

- 1,6 g.l⁻¹ de K₂HPO₄.
- 0,4 g.l⁻¹ de KH₂PO₄.
- 0,2 g.l⁻¹ de MgSO₄.7H₂O.
- 15 g.l⁻¹ de NaCl.
- 3 g.l⁻¹ de NH₄NO₃.
- 0,02 g.l⁻¹ de CaCl₂.
- 0,01 g.l⁻¹ de ZnSO₄.
- 0,05 g.l⁻¹ de FeSO₄.7H₂O.
- 0,008 g.l⁻¹ de MnSO₄.H₂O.
- 0,004 g.l⁻¹ de CuSO₄.5H₂O.
- 0,0026 g.l⁻¹ de Co(NO₃).

Les sources de carbone employées sont :

- **Le milieu M1:** contient 3 g.l⁻¹ de glucose.
- **Le milieu M2:** contient 50 ml.l⁻¹ (5% du volume du milieu) du lactosérum récupéré de boîte de yaourt nature « soummam ».
- **Le milieu M3:** contient 50 ml.l⁻¹ (5% du volume du milieu) de l'huile d'olive.
- **Le milieu M4:** contient un mélange de 50 ml.l⁻¹ (5% du volume du milieu) d'huile de soja et d'huile de tournesol.

Le pH de ces milieux de culture a été ajusté vers la neutralité (entre 7 et 7,2). Les milieux ont ensuite été stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min et stockés au réfrigérateur.

2.2.4.2 Produits chimiques

- HCl.
- NaOH.
- Kérosène.
- Eau physiologique.

2.3 Méthodologie

2.3.1 Activation de la souche

A l'aide d'une micropipette, un petit volume de la souche en suspension qui a été conservée dans le tube à essai est prélevé et déposé dans les boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé solide, puis étalé sur toute la surface du milieu au moyen d'un râteau. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 à 48 h.

2.3.2 Préparation d'inoculum et mesure de la densité bactérienne

Quelques colonies sont mises en suspension dans 20 ml d'eau physiologique. Après homogénéisation à l'aide du vortex, la densité optique est évaluée par un spectrophotomètre UV-VISIBLE à une longueur d'onde de 625 nm, la valeur de cette densité comprise entre 0,091 et 0,094 correspondant à 0,5 MC qui présente $1,5 * 10^8 CFU.ml^{-1}$.

2.3.3 Pré-culture

Des pré-cultures de la souche de Pseudomonas ont été réalisées sur les quatre milieux de culture M1, M2, M3 et M4. Dans 4 erlenmeyers stériles de 100 ml, des volumes de 50 ml de chaque milieu préalablement autoclavé sontensemencés séparément avec 1 ml de la suspension préparée précédemment. L'incubation est réalisée sous agitation à 50 rpm à 37°C pendant 48 heures.

2.3.4 Culture

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 500 ml stériles contenant 250 ml de milieu de culture (M1, M2, M3 ou M4)ensemencé avec 50 ml de pré-culture adéquate. Les erlenmeyers sont incubés pendant 8 jours à 37°C sous agitation à 100 rpm.



Figure 2.1 : Les erlenmeyers contenant les milieux de culture.

2.3.5 Suivi de la fermentation

Chaque jour, 2 prélèvements sont effectués, pour réaliser les analyses suivantes :

- La mesure de la concentration bactérienne.
- La mesure de la tension superficielle.
- Le test de l'indice d'émulsification.
- La mesure du COT.

2.3.5.1 Mesure de la concentration en biomasse

La mesure de la concentration en bactéries, se fait par un test quantitatif où la turbidité ou la densité optique d'une culture microbienne est mesurée. C'est une méthode indirecte pour le suivi de la production de biosurfactants. Dans la présente étude, ce suivi a été réalisé en utilisant un spectrophotomètre UV-VISIBLE à une longueur d'onde de 625 nm.

2.3.5.2 Mesure de la tension superficielle

L'échantillon prélevé est centrifugé à 8500 rpm pendant 15 min à 4°C afin de séparer la souche (le culot) du milieu de culture (le surnageant).

Au moyen d'un tensiomètre numérique, la tension superficielle du surnageant a été mesurée et exprimée en mN. m^{-1} ou en dyn. cm^{-1} .

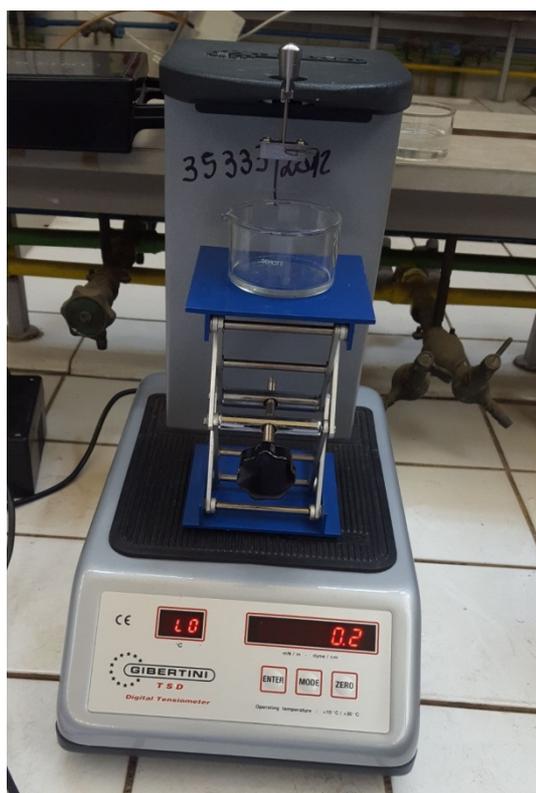


Figure 2.2 : Le tensiomètre (GIBERTINI) utilisé pour la mesure de la tension superficielle

2.3.5.3 Test de l'indice d'émulsification E_{24}

L'indice d'émulsification sert à vérifier le pouvoir des souches à émulsionner une phase hydrophobe (kérosène) dans une phase hydrophile (le surnagent récupéré après centrifugation). Dans un tube à essai stérile contenant 2 ml du surnagent récupéré après centrifugation, 2 ml de kérosène sont rajoutés. Par la suite, le tube est vortexé à 40 hertz pendant 2 min. 24 heures après, l'indice d'émulsification est calculé d'après l'expression suivante :

$$E_{24}(\%) = \frac{h_e}{h_t} \times 100$$

h_e : La hauteur de l'émulsion.

h_t : La hauteur totale du mélange.

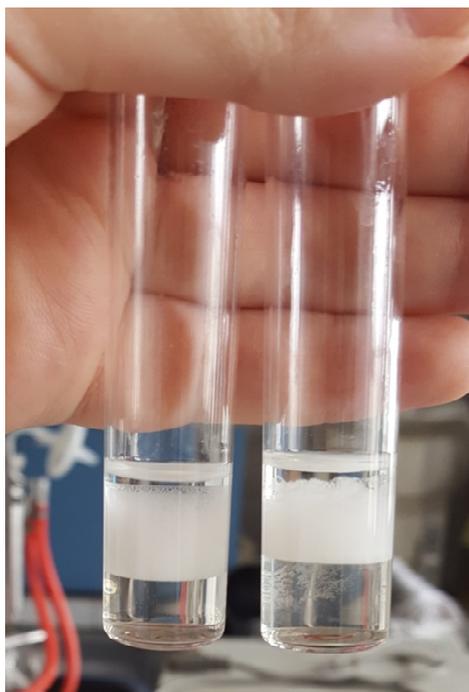


Figure 2.3 : Observation de la couche émulsifiante en présence du kérosène.

2.3.5.4 Mesure du COT

La mesure du COT permet de connaître la quantité totale de carbone organique présente dans un échantillon. Dans notre expérience, on cherche à mesurer la concentration du COT en considérant que la quantité du carbone organique volatile est négligeable. L'analyseur du COT permet de mesurer le NPOC (carbone organique non purgeable) qui est équivalent au COT qu'on cherche à mesurer.

On mesure la concentration de COT dans les milieux frais (stériles et avant l'ensemencement) et dans les échantillons de surnagent récupérés après la centrifugation de chaque milieu afin de comparer la quantité de COT avant et après la fermentation et avoir une idée sur la croissance de la souche et la production de biosurfactant.

En raison du petit volume des échantillons, on réalise des dilutions avec l'eau ultra-pure dans le but d'atteindre le volume nécessaire pour réaliser la mesure, les valeurs finales du COT sont obtenues par multiplication des valeurs obtenues expérimentalement par l'inverse du facteur de dilution.



Figure 2.4 : Analyseur du carbone organique total.



Chapitre 3 : Résultats et discussions



3.1 Mesure de la concentration en biomasse

Afin de pouvoir comparer l'évolution de la concentration en biomasse en fonction du temps dans les différents milieux de culture, une étude a été effectuée dans ce cadre permettant la mesure de la densité optique reflétant la variation de la croissance bactérienne.

La Figure 3.1 montre le profil de la croissance de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* mise en culture dans différents milieux servant de source de carbone, et ce, pendant 8 jours.

On remarque que la croissance de la souche dans les trois milieux suivants : lactosérum, l'huile d'olive et le mélange de soja et l'huile de tournesol ne présente pas de phase de latence, elle débute directement par une phase d'accélération ou exponentielle observée au bout de 3 jours pour le lactosérum, le mélange soja et l'huile de tournesol et 4 jours pour l'huile d'olive. Ceci serait probablement dû à la pré-culture durant laquelle il y a adaptation de la souche à son nouvel environnement constitué de sources de carbone plus ou moins complexes par la synthèse ou la réactivation des enzymes nécessaires au catabolisme de ces substrats, atteignant ainsi des taux de croissance maximaux. Cette phase est suivie directement par une phase de déclin pour les milieux riches en lactosérum, l'huile d'olive et le mélange de soja et l'huile de tournesol, où les sources nutritives ont été épuisées. Par contre, en ce qui concerne le milieu contenant du glucose, l'allure du graphe illustre bien que la croissance de la souche possède une phase de latence suivie d'une phase d'accélération se terminant par une phase stationnaire.

D'après ces résultats, on constate que la croissance dans les milieux riches en lactosérum et en l'huile d'olive est plus remarquable comparée à la croissance dans les deux autres milieux de glucose et du mélange de soja et l'huile de tournesol, on peut donc dire dans ce cas-là que le pouvoir de cette souche à dégrader le lactosérum et l'utiliser comme source de carbone pour les besoins de sa croissance est très important et ceci est dû à la composition variée du lactosérum (eau, lactose, protéines solubles dans l'eau, sels minéraux et la matière grasse). En ce qui concerne le pouvoir de dégradation de l'huile d'olive il est moins intéressant que celui du lactosérum, mais ils restent plus importants que celui des deux autres milieux à savoir le milieu glucosé et le milieu contenant du mélange de soja et l'huile de tournesol.

La souche testée dans la présente étude a vraisemblablement utilisé les protéines ainsi que la matière grasse présentes dans le lactosérum et non pas le lactose. En effet, d'après la littérature l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est considérée comme une bactérie lactose négatif donc incapable de métaboliser le lactosérum, et ce, en raison de sa déficience en enzymes impliquées dans la dégradation du lactose.

Les résultats obtenus dans cette étude corroborent ceux rapportés par **Rashedi et al. (2005)** qui ont obtenu la production de 150 mg.l^{-1} de rhamnolipides avec le lactosérum, contre une production de 138 mg.l^{-1} en utilisant l'hexadecane comme source de carbone par la *Pseudomonas aeruginosa* [152].

Par ailleurs, **M. Robert et al. (1989)** ont confirmé que l'utilisation de l'huile d'olive comme source de carbone par *Pseudomonas aeruginosa* engendre une meilleure croissance (5 g.l^{-1} de biomasse) par rapport au glucose ($4,8 \text{ g.l}^{-1}$ de biomasse) [125].

Yu-Hong Wei, Chien-Liang Chou et Jo-Shu Chang (2005) [153] ont montré que les valeurs maximales de la production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* ont été atteintes en utilisant l'huile d'olive. Des valeurs similaires ont également été obtenues en utilisant le glucose et l'huile de tournesol. En outre, les huiles végétales sont efficaces pour la production de rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* en comparaison avec glucose.

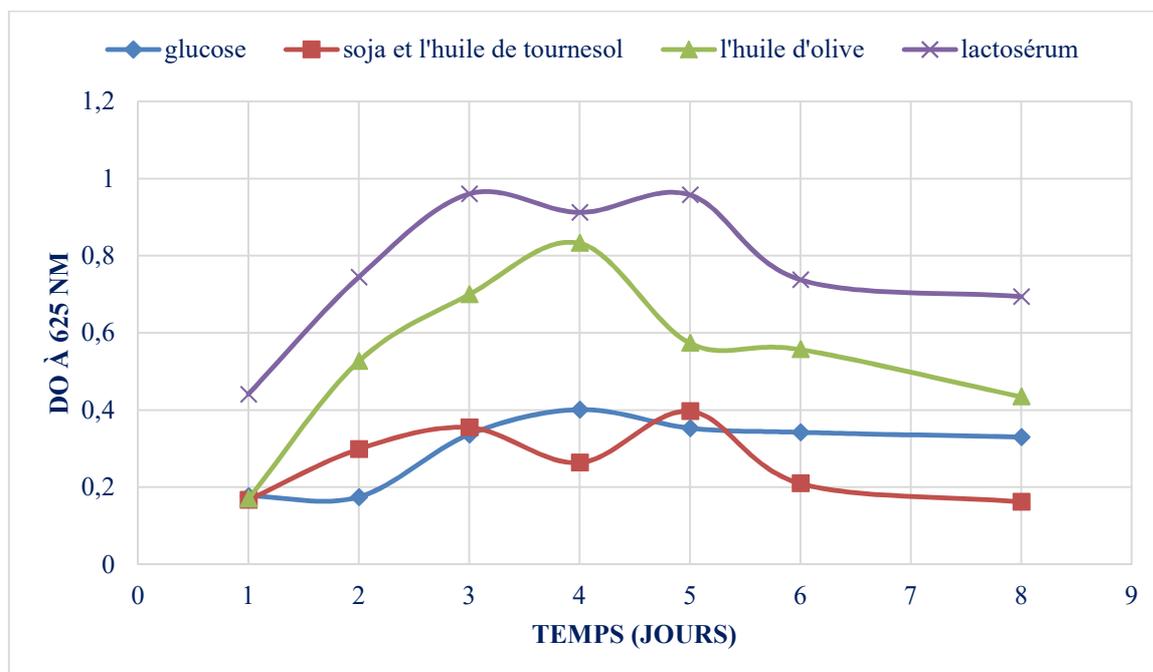


Figure 3.1: Profils de la croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* sur les différents milieux de cultures testés.

3.2 Mesure de la tension superficielle

La tension superficielle est l'une des propriétés liées aux biosurfactants, sa mesure nous permet de vérifier l'existence ou l'absence de ces molécules tensioactives.

D'après les résultats illustrés sur la Figure 3.2, nous observons une diminution régulière mais différente de la tension de surface dans tous les milieux de culture testés, ce qui indique la présence de molécules tensioactives dans chaque milieu.

Pendant les 8 jours d'incubation, la tension superficielle du milieu riche en glucose baisse fortement puis stagne à une valeur de 32,15 mN.m⁻¹ avec un taux de variation de 46,6%. Pour ce qui est des autres milieux, la tension de surface de chaque milieu a atteint progressivement son plus bas niveau : 34,2 mN.m⁻¹, 30,2 mN.m⁻¹ et 34,7 mN.m⁻¹ respectivement dans les milieux contenant le mélange soja et l'huile de tournesol, l'huile d'olive et lactosérum, atteignant ainsi des taux de variation de 14,8%, 12,7% et 8,8% respectivement. Ces résultats sont récapitulés dans le Tableau 3.1

Tableau 3.1 : Valeurs des tensions superficielles mesurées après 8 jours de fermentation dans différents milieux de culture.

Source de carbone	Tension superficielle initiale mN. m ⁻¹	Tension superficielle finale mN. m ⁻¹	Taux de variation (%)
Glucose	60,25	32,15	46,6
Soja et l'huile de tournesol	40,15	34,2	14,8
L'huile d'olive	34,6	30,2	12,7
Lactosérum	38,05	34,7	8,8

D'après ces résultats, on peut affirmer que le biosurfactant produit par la souche étudiée dans le milieu à base de glucose est le plus performant en termes d'abaissement de tension superficielle (de 60,25 à 32,15 mN.m⁻¹).

D'après les travaux de **Rashedi (2005)** [152], les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* sur un milieu à base de lactosérum ont permis de réduire la tension superficielle de près de 28%. D'après **M. Robert (1989)** [125], en présence de l'huile d'olive, les biosurfactants produits entraînent la diminution de la tension de surface à 28,4 mN.m⁻¹, alors que les

rhamnolipides secrétés dans le milieu glucosé réduisent cette force à 28,6. Selon **Yu-Hong Wei, Chien-Liang Chou et Jo-Shu Chang (2005) [153]**, La culture dans le milieu glucosé a également atteint une tension de surface faible ($30,6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$). Cependant **H.S. El-Sheshtawy et M.M. Doheim (2014) [154]** ont rapporté que la tension des produits synthétisés dans une solution glucosé est réduite jusqu'à $32 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ après 96 heures de culture.

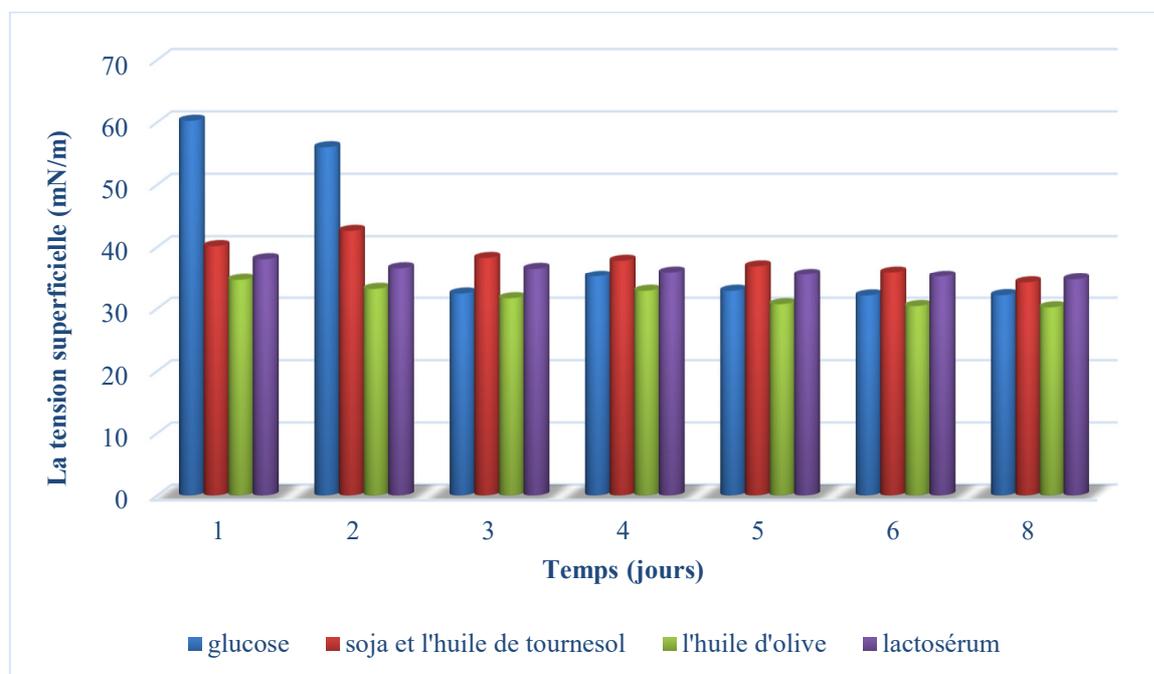


Figure 3.2 : L'évolution de la tension superficielle en fonction du temps dans les différents milieux de culture étudiés.

3.3 Test de l'indice d'émulsification E_{24}

L'indice d'émulsification est une caractéristique de la présence des biosurfactants dans le milieu de culture provoquant ainsi une émulsion.

L'analyse de la Figure 3.3 révèle une augmentation de l'indice d'émulsification en fonction du temps d'incubation.

En présence d'huile d'olive, on remarque dans les deux premiers jours une stabilisation des valeurs de l'indice d'émulsification, ensuite l'émulsification augmente fortement pour atteindre la valeur de 82% concomitamment à la phase de déclin de la croissance de la souche. Ce qui permet de dire que le biosurfactant produit dans ce milieu est un métabolite secondaire. Concernant le lactosérum, on remarque dès le premier jour une nette augmentation de l'indice d'émulsification atteignant 77,66 %. Pour le milieu glucosé, on remarque une légère progression de l'indice d'émulsification arrivant à un pourcentage de 48,69. Par ailleurs, la

valeur maximale (63,45%) de l'indice d'émulsification dans le milieu à base d'huile de soja et d'huile de tournesol est relativement élevée par rapport à celle du milieu glucosé.

Selon les résultats de la Figure 3.3 atteints à la fin de la fermentation, on conclut que le pouvoir émulsifiant du biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* à base de l'huile d'olive est le plus intéressant.

D'après **M. Robert (1989) [125]**, le rhamnolipide formé dans un milieu riche en huile d'olive a tendance à émulsifier les phases hydrophobes avec une capacité de 62,5%, alors que celle dans le milieu glucosé atteint 65%. **Yu-Hong Wei, Chien-Liang Chou et Jo-Shu Chang (2005) [153]**, rapportent que les surfactants produits dans le milieu à base de glucose par *Pseudomonas aeruginosa* émulsifient le kérosène et le diesel avec des indices d'émulsification respectivement de $79 \pm 5 \%$ et $80 \pm 3 \%$.

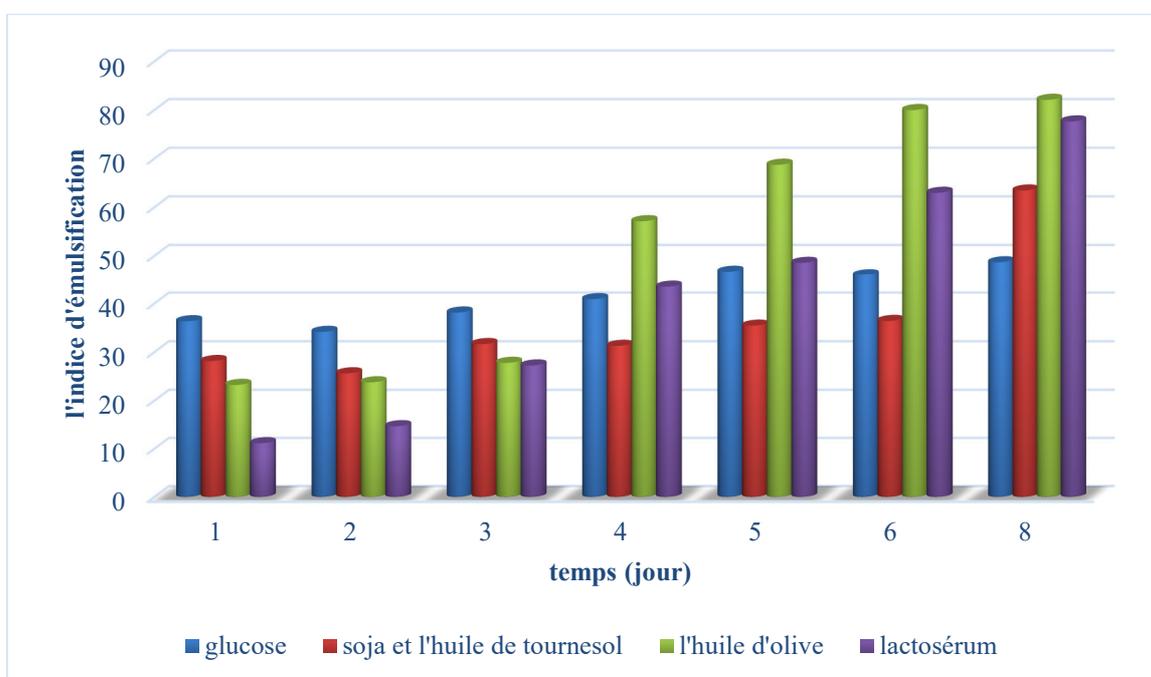


Figure 3.3 : L'évolution de l'indice d'émulsification en fonction du temps dans les différents milieux de culture étudiés.

3.4 Mesure du COT

Pour la vérification de la consommation du carbone organique servant de nutriment pour la souche *Pseudomonas aeruginosa* testée, on s'est proposé de mesurer le COT à l'issue de la période d'incubation.

L'histogramme (Figure 3.4) illustre la variation de la concentration totale du carbone organique (en considérant que le carbone organique volatile est négligeable) avant et après la fermentation

dans les quatre milieux. On observe une diminution de la quantité totale du carbone organique présente dans le milieu glucosé et celui contenant le mélange soja et l'huile de tournesol après la culture, cette observation est expliquée par la dégradation par la souche testée de ces substrats carbonés et de leur utilisation pour les besoins de sa croissance ainsi que la production de biosurfactants. Cependant, pour les deux autres milieux riches en lactosérum et l'huile d'olive, on remarque une augmentation de la quantité du carbone organique totale après la fermentation, ce qui peut être expliqué par la concentration relativement importante des biosurfactants produits dans ces deux milieux. Ceci est conforté par le fait que les valeurs de l'indice d'émulsification obtenues à l'issue de la fermentation pour ces deux milieux sont les plus élevées témoignant d'une production importante de biosurfactants, très probablement de nature rhamnolipidique.

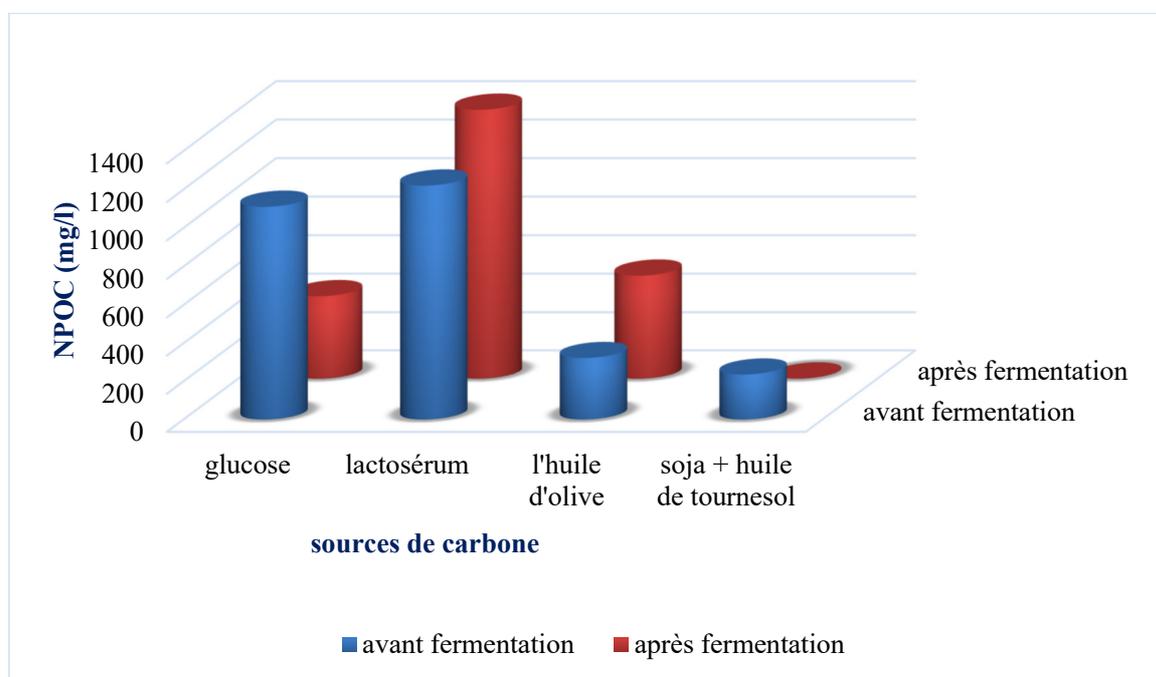


Figure 3.4: Variation de quantité de COT exprimée en NPOC avant et après la fermentation dans les milieux à base de glucose, lactosérum, d'huile d'olive et le mélange d'huile de soja et l'huile de tournesol.

Le travail présenté dans ce mémoire concerne la production de biosurfactants par une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

La souche cultivée a été utilisée pour produire les biosurfactants dans quatre milieux différents : mélange d'huile de soja et d'huile de tournesol, huile d'olive, glucose et lactosérum.

L'étude de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans les quatre milieux nous a montré que la souche étudiée est capable de métaboliser différentes sources de carbone testées et de produire des biosurfactants. La meilleure croissance bactérienne a été obtenue dans les deux milieux de culture riches en lactosérum et l'huile d'olive.

Les résultats obtenus lors de la fermentation et le suivi de la tension superficielle dans les différents milieux de culture montrent que la plus basse valeur de la tension superficielle qui est de 30,2 est atteinte dans le milieu contenant l'huile d'olive avec un taux d'abaissement de 12,7 % tandis que le meilleur taux de diminution est celui obtenu pour le milieu glucosé 46,6% où la tension superficielle diminue jusqu'à atteindre 32,15.

Le meilleur pouvoir émulsifiant (82%) est obtenu dans le milieu de culture à base d'huile d'olive.

En guise de perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

- La réduction du coût de production des biosurfactants en testant d'autres substrats à faibles valeurs marchandes telles que les huiles de friture, de vidange, etc.
- L'identification des biosurfactants produits par FTIR ou MS.
- L'étude de quelques activités biologiques potentiellement inhérentes aux biosurfactants produits telles que l'activité antimicrobienne et chélatrice.
- La production des biosurfactants dans des bioréacteurs afin d'améliorer les rendements de production.
- L'identification moléculaire de la souche testée par la méthode ARNr 16S.

- [1] : OTMANI H. Propriétés physico-chimiques d'un système micellaire mixte tensioactif non-ionique fluore/cationique. Thèse magister : Chimie option physico-chimie. Ecole Doctorale d'Oran. 2012. p89.
- [2] : RONDEL C. Synthèse et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives. Thèse doctorat : Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse. 2009. p242.
- [3] : HO TAN TAÏ L, NARDELLO-RATAJ V. Dérergents. Encyclopedia universalis. [Consulté le 15 février]. Disponible sur « <http://www.universalis.fr/encyclopedie/detergents/> ». p6.
- [4] : DUBERN J-F. Regulation of the biosynthesis of cyclic lipopeptides from *Pseudomonas putida* PCL1445. Thèse doctorat : microbiologie moléculaire. Université de Leiden. 2006. p170.
- [5] : A. SARUBBO L, M. DE LUNA J, D. RUFINO R, P. F. BRASILEIRO P. Production of a Low-cost Biosurfactant for Application in the Remediation of Sea water Contaminated with Petroleum Derivates. Chemical Engineering Transactions. Vol 49. 2016. pp 523-528.
- [6] : ONTIVEROS J. Classification des tensioactifs et huiles biocompatibles par mesure de la température d'inversion de phase (PIT) et comparaison des diagrammes de phases. Thèse doctorat : sciences de la matière-du rayonnement et de l'environnement. L'université des sciences et technologies de Lille. 2014. p232.
- [7] : THIBAUD, PAUL et SEBASTEIN. Le savon, travail personnel encadré. Lycée Évariste Galois, France. [Consulté le 15 février 2018]. Disponible sur « <http://savontpe.free.fr/> ». 2010-2011.
- [8] : MATHIS A. Surface-active products, Bulletin de l'Union des Physiciens. N° 749. 1992. pp1486-1487.
- [9] : Arcane Industries. Histoire des détergents synthétiques et du savon naturel. [Consulté le 16 février]. Disponible sur « <https://www.arcane-industries.fr/details-histoire+des+detergents+synthetiques+et+du+savon+naturel-465.html> ». ».
- [10] : KERVERDO S et BRANCQ B. Tensioactifs basés sur des sucres synthèses et exemples d'utilisation en cosmétique. L'actualité chimique. Le Journal de la société Chimique en France. N° 323-324. 2008. pp 35-41.
- [11] : HADJ MOHAMMED A. Etude des propriétés thermodynamiques d'un surfactif. Thèse de Master: Chimie option chimie macromoléculaire. Université abou-bakr belkaid. Tlemcen. 2013. p77.

- [12] : SALAGER J-L. surfactifs types & usages. Cahier FIRP N° F300-A. Universidad de LOS ANDES. facultad de ingeniera: escuela de ingenieraquimica. Mérida-Vénézuéla. 2002. p58.
- [13]: MAMERI Y. Photo-transformation de tensioactif anionique induite par un oxyhydroxyde de fer(III) (goethite) en solution aqueuse. Mémoire magister: Chimie analytique et physique. L'université Mantouri. Costantine. 2010. p163.
- [14] : NOIRET N, BENVENU T and PLUSQUELLEC D. Surfactants from renewable resources. Actualite Chimique. 2002. 11-12 :70.
- [15] : ROBERT P et JEAN-PIERRE S. Chimie industrielle. 2eme édition : préface de pierre fillet. 1997. pp 679-685.
- [16] : HEBERT E. Les tensioactifs dans les cosmétiques. MAMZELLE.COM. [consulté le 19 février]. Disponible sur « <http://www.mamzelleemie.com/les-tensio-actifs-dans-les-cosmetiques/> ». 2012.
- [17] : LARPENT C. Tensioactifs. In Techniques de l'ingénieur. Vol K 342. 1993. pp 1-15.
- [18] : BRARD L, MOURAUD L et SOULARD F. Quelles différences y a-t-il entre une lessive « classique » et une lessive écologiques?. [Consulté le 20 février 2018]. Disponibles sur « <https://tpe-lessives.webnode.fr/efficacite/> ». Pornic. 2010-2011.
- [19] : Agendaculturel. Le savon est-il indisponible?. [Consulté le 19 février 2018]. Disponible sur 'http://tpe-savon102.e-monsite.com/pages/la-base-du-savon-categorie/mode-d action.html'
- [20]: LOCHER M. Les détergents et les désinfectants. SIPI spécialistes infirmiers prévention de l'infection. La Marive. 14 février 2013.
- [21]: YING G-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Review article, Environment International. Vol32. Issue 3. 2006. pp 417-431.
- [22]: FAKRUDDIN Md. Biosurfactant: production and application. article de revue : Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology. Vol 3. Issue 4. 2012, p5.
- [23]: Yuan C.L, Xu Z.Z, Fan M.X, Liu Y.H. Xie Y.H and Zhu T. Study on characteristics and harm of surfactants. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. Vol 6. Issue 7. 2014. pp 2233-2237.
- [24]: CHEN R.Q. Explore the ecological problems of pre-treatment chemicals (I), (II). Shanghai Dye, Vol 6. 2001. pp 36 - 42.
- [25]: LEWIS M.A. Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to algae: a review and risk assessment. Ecotoxicol Environ Saf. 1990. Vol 20. Issue 2. pp 123 –140.

- [26]: TKALIN A.V, BELAN T.A, SHAPOVALOV E.N. The state of the marine environment near Vladivostok Russia. *Marine Pollution Bulletin*, Vol 26, 1993, pp 418 – 423.
- [27]: SINGER M.M, GEORGE S, LEE I, TJEERDEMA R.S, SOWNY R.S. Comparative effects of oil dispersants to the early life stages of topsmelt (*Atherinopsaffinis*) and kelp (*Macrocystispyrifera*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol 13. Issue 4. 1994. Pp 649 – 656.
- [28]: ITO K. Design of the slanted soil graywater treatment system for arid zones in developing countries. Master of Engineering thesis. Hokkaido University. Japan. 2010. p37.
- [29]: HIJIKATA N. & al. Feasibility of greywater reuse for irrigation: the impact of laundry detergent and its surfactant on plant growth and symbiotic bacteria, 2013, p 3.
- [30]: YUAN C.L, ZHOU W. et al. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*. Vol 34. Issue 4. 2013. pp 215-225.
- [31]: ZHANG XJ, JI W et al. *Petrochemical Technology and Application*. Vol 26. Issue 6. 2008. pp 581-586.
- [32]: NETO V. Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddition 1,3-dipolaire. Thèse de doctorat. L'université de LIMOGES. France. N° 43. 2007. p 235.
- [33]: THAVASI R, Subramanyam Nnmbaru VRM, Jayalakshmi S, Basasubramanian T, BANAT M.I. Biosurfactant production by *pseudomonasa eruginosa* from renewable resources. *Indain Journal of Microbiology*. Vol 51. Issue 1. 2011. pp 30 – 36.
- [34]: RICHARDSON A-P. Clonage-expression-purification et caractérisation fonctionnelle de Rhla chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse Doctorat : en Philosophe de biologie (Ph.D.). Université du Québec INRS-Institut Armand-Frappier. 2009. p 151.
- [35]: SINGH A, Van Hamme JD and Ward OP. Surfactants en microbiologie et biotechnologie : Partie 2. Aspects applicatifs, *Biotechnology Advances*. Vol 25. 2007. pp 99-121.
- [36]: DESAI J.D, BANAT M.I. Microbial Production of Surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular Biology Reviews*. Vol 61. N° 1. 1997. pp 47–64.
- [37]: SENERIZ F, HOMMEL R.K, KLEBER H-P. Production of biosurfactants. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Sample chapter. Vol V. p27.
- [38]: LANG S, WAGNER F. Structure and properties of biosurfactants. *Biosurfactants and Biotechnology*. ed. Marcel Dekker. New York. 1987. pp 21–45.

- [39]: VAN-HAMME JD, SINGH A, WARD OP. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1, Physiological aspects. *Biotechnology Advances*. Vol 24. 2006. pp 604–620.
- [40]: MUKHERJEE S, DAS P, SEN R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*. Vol 24. 2006. pp 509-515.
- [41] : BANAT I.M, FRANZETTI IA, GANDOLFI G, BESTETTI M.G, MARTINOTTI L, FRACCHIA T.J, SMYTH R. and MARCHANT. Microbial biosurfactants production and applications. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. Vol 87. 2010. pp 427-444.
- [42]: PACWA-PLOCINIZAK M, PLAZA G.A, PIOTROWSKA-SEGET Z and CAMEOTRA S.S. Environmental applications of biosurfactants. *Recent advances International Journal of Molecular Sciences*. Vol 13. 2011. pp 633-654.
- [43]: PARKINSON M. Biosurfactants, *Biotechnology Advances*. Vol 3. 1985. pp 65–83.
- [44]: HU Y, JU LK. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *Journal of Biotechnology*. Vol 87. 2001. pp 263-272.
- [45]: ANDO H, IHII M, KAYANO M and WATANABE S. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Vol 21. N° 19. 1995. pp 2227-2237.
- [46]: DAVIES JT. "A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent," *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface*. Proceedings of the International Congress of Surface Activity. London. England, 1957. pp 426-438.
- [47]: ORECCHIONI A, PUISIEUX F, SEILLER M, *Galénique 5 agents de surface et émulsions (les systèmes dispersés)*. Technique et Documentation Lavoisier. 1983. pp 153-194.
- [48]: GORIUS O. Synthèse, analyse et caractérisation de polyglycosides d'alkyle, Application au développement et à l'industrialisation de bases autoémulsifiantes d'origine végétale. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne Reims. 2000.
- [49]: LANDREAT C. Glycosidation des pentoses sans solvant, Application à la synthèse de tensioactifs glycosidiques à partir de coproduits agricoles. Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, 1996.
- [50]: HOLMOBERG K, JONSSON B, KRONBERG B, LINDMAN B. Introduction to surfactants. In: *Surfactants and polymers in aqueous solution*. John Wiley et Ltd SONS. 2003. p3.
- [51] : ABOUSEOUD M. les biosurfactants biomolécules à multi usages. Conférence sur les bioprocédés. Media. Le centre universitaire Dr. Yahia Fares Media. 12-13 octobre 2008.

- [52] : HULLING L. contribution à l'étude des relations structure-propriétés de molécules amphiphiles à tête sucre. Thèse doctorat : Génie des procédés industriels et développement durable. Université de Technologie Compiègne. 2016. p270.
- [53] : MARCOU L. Les applications des agents de surfaces, Phénomènes d'interfaces, Agents de surfaces : principe et mode d'action. 1989. pp 325-336.
- [54] : MIMONI N. Sélection des souches microbiennes productrices de biosurfactants à partir de sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport d'avancement N° 1. 1995. pp 1-20.
- [55] : BORDES R. Thèse de doctorat. L'université de TOULOUSE, France. 2007
- [56]: HAYASHI M, HASHIMOTO S. et NOYORI R. *Chemical Letters*. 1984. pp 1747-1750.
- [57] : SALAGER J-L. Surfactifs en solution aqueuse. cahier FIRP N° F201-A, Universidad de Los Andes. Facultad de Ingenieria. Escuela de Ingenieria quimica. Mérida-Vénézuéla. 1993. p27.
- [58]: F-SANTOS D-K, D-RUFINO R, M-LUNA J, A-SANTOS V and A-SARUBBO L. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol 17. Issue 3. 2016.
- [59]: MCTNERNEY MJ, JAVAHERI M and Jr-NAGLE DP. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*. 1990. Vol 5. pp 95-101.
- [60]: SINGH S et CAMEOTRA SS, Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*. Vol 22. 2004. pp 142-146.
- [61]: VIJAYAKUMAR S and SARAVANAN S. Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*. Vol 10. Issue 5. 2015. pp 181-192.
- [62]: SILVA R.C.F.S, ALMEIDA D.G, RUFINO R.D, LUNA J.M, SANTOS V.A and SARUBBO L.A. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol 15. Issue 7. 2014. pp 12523-12542.
- [63]: KAPPELI O. and FINNERTY W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*. Vol 140. 1979. pp 707-712.
- [64]: PARRA J.L., GUINEA J., MANRESA M.A., ROBERT M., MERCADÉ M.E., COMELLES F. et BOSCH M.P. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol 66. Issue 1. 1989. pp 141-145.

- [65]: WEST C.C. et HARWELL J.H. Surfactants and subsurface remediation. *Environmental Sciences and Technology*. Vol 36. Issue 12. 1992. pp 2324-2330.
- [66]: WERTZ J-L. Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants. Note de synthèse. *DocumenyValBiom –Gembloux Agro-Bio technology*. 2012. p 22.
- [67]: VEENANADIG NK, GOWTHAMAN MK and KARANTH NGK. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Vol 22. Issue 2. 2000. pp 95-99.
- [68]: CHEN SY, WEI YH and CHANG J. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. Vol 76. Issue 1. 2007. pp 67-74.
- [69] : MUTHUSAMY K, GOPALAKRISHNAN S et RAVI TK. Biosurfactants : properties, commercial production and application. *Current Science*. Vol 94. 2008. pp 736-774.
- [70] : KEDIDI A. Effets de la salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence du gasoil. Thèse MASTER. Université kasdi merbah Ouargla- faculté des sciences de la nature et de la vie département des sciences biologiques : spécialité microbiologie appliqués. 2014. p 68.
- [71]: JARVIS F, JOHNSON M. A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal American of Chemists' Society*. Vol 71. Issue 12. 1949. pp 4124–4126.
- [72]: CHA M, LEE N, KIM M and LEE S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresources Technology*. Vol 99. 2008. pp 2192-2199.
- [73]: BANAT IM, MAKKAR RS and CAMEOTRA S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. Vol 53. Issue 5. 2000. pp 495–508.
- [74]: KARANTH N.G.K, DEO PG and VEENANADIG NK, Microbial Production of Biosurfactants and Their Importance. *Current Science*. Vol 77. 1999. pp 116–123.
- [75]: SHOEB E, AKHLAQ F, BADAR U, AKHTER J, IMTIAZ S. Classification and industrial applications of Biosurfactants. *Natural and applied sciences*. Vol 4. N° 3. 2013.
- [76]: FESSL S. biosurfactants- effective fat solvents made by bacteria. *BIOPRO Baden-Wurttemberg GmbH*. 2015.
- [77]: SYLDATK C, LANG S, WAGNER F, et al. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* species. DSM 2874 grown on n-alkanes. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. Vol 40. Issue 1-2. 1985. pp 51-60.

- [78]: MARECIK M, WOJTERA-KWICZOR J, LAWNICZAK L, CYPLIK P, SZULC A, PIOTROWSKA-CYPLIK A et CHRZANOWSKI L. Rhamnolipids increase the phytotoxicity of diesel oil towards four common plant species in terrestrial environment. 2012.
- [79]: IRFAN-MAQSOOD M, SEDDIQ M. Rhamnolipids: Well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Industrial Biotechnology*. Vol 10. Issue 4. 2014. pp 1-7.
- [80]: W-CHRISTIE W. Rhamnolipids, Sophorolipids and Related Glycolipids. website: The LipidWeb. [Consulté le 20 avril 2018]. Disponible sur “<http://www.lipidhome.co.uk/lipids/simple/rhamno/index.htm>”.
- [81]: KURTZMAN CP, PRICE NP, RAY KJ and KUO TM. Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. *FEMS microbiology letters*. Vol 311. Issue2. 2010. pp 140-146.
- [82]: P-ARTHUR F, VISHAL S, JAMIE C, KANDULA J.R and RICHARD A. Gross. Sophorolipid biosynthesis by *Candida Bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 40. 2007. pp 316-323.
- [83]: TULLOCH P, HILL A and SPENCER JFT. A new type of macrocyclic lactone from *Torulopsis apicola*. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*. 1967. pp 584-586.
- [84]: COOPER DG and GOLDENBERG BG. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 53. 1987. pp 224-229.
- [85]: CUTLER AJ and LIGHT RJ. Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of glucose and yeast extract in the growth medium. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 254. 1979. pp 1944-1950.
- [86]: JING C, XIN S, HUI RJ and YINHO Q. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamielladomercqiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 39. 2006. pp 501-506.
- [87]: ROBERTO DE OLIVEIRA M, MAGRI A, BALDO C, CAMILIOS-NEOT D, MINUCELLI T et PEDRINE COLABONE CELLIGOI M-A. Sophorolipids a promising biosurfactant and its applications, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*. Vol 6. Issue 2. 2015. pp 161-174.
- [88]: HU Y and JU LK. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *Journal of Biotechnology*. Vol 87. Issue 3. 2001. pp 263-272.

- [89]: MORITA T, FUKUOKA T, IMURA T, KITAMOTO D. Mannosylerythritol lipids: production and applications. *Journal of Oleo Sciences*. Vol 64. Issue 2. 2015. pp 133-141.
- [90]: ARUTCHELVI JI, BHADURI S, UPPARA PV and DOBLE M. Mannosylerythritol lipids: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol 35. Issue 12. 2008. pp 1559-1570.
- [91]: KITAMOTO D et al. Glycosides of fatty acids with ester links. *Journal bioscience and Bioengineering*. Vol 94. 2009.
- [92]: Ghent university. BIOSURF. "Biotechnological Production Platform for new Tailor-made Glycolipid Biosurfactants". 2009-2012. Disponible sur "<http://www.biosurf.ugent.be/>."
- [93]: ARIMA K, KAKINUMA A et al. Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* Isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 31. N° 3. 1968. pp 488-494.
- [94]: BANAT IM. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus Sp.* *Biotechnology Letters*. Vol 15. Issue 5. 1993. pp 591-594.
- [95] : CHTIOUI O. Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants. Thèse doctorat de l'université Lille 1 sciences et technologie : ingénierie des fonctions biologiques. 2011. p196.
- [96]: HUE N, SERANI L and al. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid communications in Mass Spectrometry*. Vol 15. Issue 3. 2001. pp 203-209.
- [97]: HAUSMANN R et SYLDATK C. Types and classification of microbial surfactants. KOSARIC N et VARDAR-SUKAN F. *Biosurfactants : production and utilization processes. Technologies and Economics*. CRC Press Taylor and Francis group. *Surfactant science*. 2014. pp. 3-17.
- [98]: WALTON RB and WOODRUFF HB. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth 1. *Journal of Clinical Investigations*. Vol 28. 1949. pp 924-926.
- [99] : DELCAMBE L. Iturin, new antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*. Vol 144. 1950. pp 1431-1434.
- [100] : PEYPOUX F, BESSON F, MICHEL G et al. Structure de l'iturine C de *Bacillus subtilis*, *Tetrahedron*. Vol 38. 1978. pp 1147-1152.
- [101]: BONMATIN JM, LAPREVOTE O and PEYPOUX F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new

bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput screening*. Vol 6. 2003. pp 541-556.

[102]: VATER J, KABMITZ B, WILDE C et al. Matrix- assisted laser desorption ionization-time of light mass spectrometry of lipopeptid biosurfactants in whole cells and culture filtrates of bacillus subtilis C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68. 2002. pp 6210-6219.

[103]: ROMERO D, DEVICENTE A, OLMOS Js et al. Effect of lipopeptids of antagonistic strains of bacillus subtilis on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *podospaerafusca*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 103. 2007. pp 969-976.

[104]: MIZUMOTO S, HIRAI M, SHODA M. Enhanced iturin a production by bacillus subtilis and its effect on suppression of the plant pathogen *rhizoctoniasolani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 75. 2007. pp 1267-1274.

[105]: VOLPON L, TSAN p, MAJER Z, VASS E, HOLLOSI M, NOGUERA V, LANCEIN JM and BESSON F. NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Vol 67. 2007. pp 1374-1381.

[106]: VANITTANAKARN N, LOEFFLER W, KOACH U, JUNG G. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of the Antibiotics*. Vol 39. 1986. pp 888-901.

[107]: JACQUES P, HBID C, DESTAIN J, RAZAFINDRALAMBO H, PAQUOT M, DE PAUW E et al. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 77-79. 1999. pp 223-233.

[108]: NISHIKORI T, NAGANAWA H, MURAOKA Y, AOYAGI T and UMEZAWA H. Plipastins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-F67. III. Structural elucidation of plipastins. *Journal of Antibiotics*. Vol 39. 1986. pp 755-761.

[109]: WALAA H. Study on the regulation and biosynthesis of fengycin and plipastin produced by *Bacillus subtilis*. PhD Thesis: engineering of biological functions. University of Lille 1 (France) Science and technology. 2011. p 235.

[110]: YAKIMOV MM, FREDRICKSON HL, TIMMIS KN. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 23. 1996. pp 13-18.

- [111]: ARPITA R. Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*. Vol 8. Issue 1. 2017. pp 1-5.
- [112]: GRANGEMARD I, WALLACH J, MAGET-DANA R et al. Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Applied of Biochemistry and Biotechnology*. Vol 90. 2001. pp 199-210.
- [113]: MORIKAWA M, DAIDO H, TAKAO T, MURATA S, SHIMONISHI Y and IMANAKA T. A new lipopeptide biosurfactant produces by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *Journal of Bacteriology*. Vol 175. Issue 20. 1993. 6459-6466.
- [114]: LANDMAN D, GEORGESCU C, MARTIN DA and J Quale. Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol 21. 2008. pp 449–465.
- [115]: SAINI HS, BARRAGAN-HUETRA BE et al. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9–3 and its physicochemical and biological properties. *Journal of Natural Products*. Vol 71. Issue 6. 2008. pp 1011–1015.
- [116]: NEU T-R and PORALLA K. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 32. Issue 5. 1990. pp 521–525.
- [117]: LI H, TANIKAWA T et al. *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to non-ribosomal peptide synthetase family. *Microbiology and Immunology*. Vol 49. Issue 4. 2005. pp 303-310.
- [118]: KAPPELI O, WALTHER P, MUELLER M. et FIECHTER A. Structure of cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Archives of Microbiology*. Vol 138. 1984. pp 279-282.
- [119]: BEEBA JL and UMBRITT W-W. Extracellular lipids of *Thiobacillus thiooxidans*. *Journal Bacteriology*. Vol 108. Issue 1. 1971. pp 612-615.
- [120]: KAPPELI O and FINNERTY WR. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of Bacteriology*. Vol 140. Issue 2. 1979. pp 707-712.
- [121]: PK Rahman and E Gakpe. Production, characterization and applications of biosurfactants-review. *Journal of Biotechnology*. Vol 7. Issue 2. 2008. pp 360-370.
- [122]: MAC-DONALD CR, COOPER DG et ZAJIC JE. Surface-active lipids from *nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 41. 1981. pp 117-123.

- [123]: KRETSCMER A, BOCK H and WAGNER F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from rhodococcus erthropolis grown on n-alkane. Applied and Environmental Microbiology. Vol 44. 1982. pp 864-870.
- [124]: WAYMAN M, JENKINS AD and KORMADY AC. Biotechnology for oil and fat industry. Journal of the American Oil Chemists' Society. Vol 61. 1984. pp 129-131.
- [125]: ROBERT M, MERCADE ME, BOSCH MP, PARRA JL, ESPUNY MJ, MANRESA MA et GUINEA J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by pseudomonas aeruginosa 44T1. Biotechnology Letters. Vol 11. N°12. 1989. pp 871-874.
- [126]: MUKHERJEE Ashis and KISHORE Das. Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview, Biosurfactants edited by Ramkrishna Sen. Advances in Experimental Medicine and Biology, Lades Bioscience and Springer Science + Business Media. Vol 672. 2010. pp 54-64.
- [127]: KISHORE Das and K. MUKHERJEE Ashis. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by bacillus subtilis and pseudomonas aeruginosa strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability. Journal of Applied Microbiology. Vol 102. 2007. pp 195-203.
- [128]: CIRIGLIANO MC and CARAN GM. Isolation of a bioemulsifier from candida lipolytica. Applied and Environmental Microbiology. Vol 48. 1984. pp 747-750.
- [129]: MONTERIO SA and al. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa DAUPE 614. Chemistry and Physics of Lipids. Vol 147. 2007. pp 1-13.
- [130]: WEBER L, DOGE C, HAUFE G, HOMMEL R and KLEBER HP. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsisapicola*. Biocatalysis and biotransformation. Vol 5. 1992. pp 267–292.
- [131]: SOBRINHO B.S, JULIANA M.L, RAQUEL D.R, LUCIA F.P and LEONIE A.S. Biosurfactant: classification, Properties and Environmental Applications. Biotechnology. Vol 11. 2014. pp 1-22.
- [132]: SYLDATIK C and WAGNER F, In: KOSARIC N, CAIRNS WL and GRAY NCC. Biosurfactants and Biotechnology. ed. Marcel Dekker. New York. 1987. pp 89–120.
- [133]: ZHANG L, VERES- SCHALNAT TA, SOMOGYI A. Fatty acid cosubstrates provide b-oxidation precursors for rhamnolipid biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa as evidenced by isotope tracing and gene expression assays. Applied and Environmental Microbiology. Vol 78. 2012. pp 8611–8622.

- [134]: ABDEL-MAWGOUD AM, LEPINE F and DEZIEL E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 86. Issue 5. 2010. pp 1323–1336.
- [135]: DEZIEL E, LEPINE F, MILOT S, VILLEMUR R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*. Vol 149. 2003. pp 2005 –2013.
- [136]: REIS RS, PEREIRA AG, NEVES BC, FREIRA DMG. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas*: a review. *Bioresource Technology*. Vol 102. 2011. pp 6377 – 6384.
- [137]: NITSCHKE M. and COSTA S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science and Technology*. Vol 18. 2007. pp 252–259.
- [138]: POREMBA K, GUNKEL W et al. Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environmental Toxicology and Water Quality*. Vol 6. 1991. pp 157-163.
- [139] : RODRIGUES LR, BANAT IM, TEIXEIRA JA and OLIVEIRA R. Biosurfactants : Applications potentielles en médecine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Vol 57. 2006. pp 609-618.
- [140]: MAKKAR RS and ROCKNE AM. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon, *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol 22. Issue 10. 2003. pp 2280-2292.
- [141]: KACHOLZ T and SCHLINGMANN M. Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment In: KOSARIC N, CAIRNS WL and GREY NCC. *Biosurfactant and Biotechnology*. New York. Marcel Dekker Inc. Vol 25. 1987. pp 183-208.
- [142]: GHARAEI-FATHABAD E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A Mini – Review. *American Journal of Drug Discovering and Development*. Vol 1. 2011. pp 58-69.
- [143]: KIRAN GS, SABU A and SELVIN J. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *Journal of Biotechnology*. Vol 148. 2010. pp 221-225.
- [144]: PALANISAMY P. Biosurfactant mediated synthesis of NiO nanorods. *Materials Letters*. Vol 62. 2008. pp 743-746.

- [145]: APARNA A , SRINIKETHAN G et HEDGE S. Effet de l'addition d'un biosurfactant produit par *Pseudomonas* spp sur la biodégradation du pétrole brut. Procédures internationales de génie chimique, biologique et environnemental. Actes de la deuxième session internationale de chimie. Singapour. 26-28 février 2011. pp 71-75.
- [146] : FRANZETTI A, CAREDDA P, RUGGERI C, LA COLLA P, TAMBURINI E, PAPACCHINI M and BESTETTI G.Applications potentielles de composés tensioactifs par *Gordonia* sp. souche BS29 dans les technologies d'assainissement du sol. Chemosphère. Vol 75. 2009. pp 810-807.
- [147]: BANAT IM et al. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol 7. 1991. pp 80-88.
- [148]: POECKNER S, WRAY V, NIMTZ M et LANG S. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Applied of Microbiology and Biotechnology. Vol 51. 1999. pp 33-39.
- [149]: PEYPOUX F, BONMATIN JM et WALLACH J. Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review. Applied of Microbiology and Biotechnology. Vol 51. 1999. pp 553-563.
- [150]: SAWHNEY SK and SINGH R. Introductory Practical Biochemistry. Narosa Publishing House. 2000. pp 16-17.
- [151]: ARINO S, MARCHAL R et VANDECASTEELE J.P. Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 45. 1996. pp 162-168.
- [152] : RASHEDI H, JAMSHIDI E, MAZAHERI ASSADI M et BONAKDARPOR B. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. International Journal of Science and Technology. Vol 2. N° 2. 2005. pp 121-127.
- [153]: YU-HONG W, CHIEN-LIANG C et JO-SHU C. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochemical Engineering Journal. Vol 27. 2005. pp 146-154.
- [154] : EL-SHESHTAWY HS and DOHEIM MM. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. Egyptian Petroleum Research Institute(EPRI). Cairo-Egypt. 2014.