

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies Environnementales & de Génie
des Procédés (BIOGEP)

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème

Essai de production de biosurfactant

ZOUAOUI Malika

Sous la direction de : Mme R. CHEMLAL, Maitre de Conférence A
et
Mr. N. MAMERI, Professeur.

Présenté et soutenu publiquement le 21/06/2017 :

Composition du Jury :

Président de jury : Mr H. GRIB
Examineur : Mr M. DROUCHE
Promotrice : Mme R. CHEMLAL
Co-promoteur : Mr N. MAMERI

Professeur, ENP
Professeur, ENP
MCA, USTHB
Professeur, ENP

ENP 2017

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



ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département de Génie de l'Environnement

**Laboratoire des Biotechnologies Environnementales & de Génie
des Procédés (BIOGEP)**

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème

Essai de production de biosurfactant

ZOUAOUI Malika

**Sous la direction de : Mme R. CHEMLAL, Maitre de Conférence A
Et
Mr. N. MAMERI, Professeur.**

Présenté et soutenue publiquement le 21/06/2017 :

Composition du Jury :

**Président de jury : Mr H. GRIB
Examineur : Mr M. DROUCHE
Promotrice : Mme R. CHEMLAL
Co-promoteur : Mr N. MAMERI**

**Professeur, ENP
Professeur, ENP
MCA, USTHB
Professeur, ENP**

ENP 2017

ملخص:

في هذا العمل، تم إستعمال نوعين من البكتيريا *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas luteola* لدراسة قدرة إنتاج جزيئات السطح تحت ظروف مختلفة. تم تسليط الضوء على تأثير التهوية و مصدر الكربون على إنتاجية جزيئات السطح و ثباتها. تمت دراسة حركية النمو، مؤشر الإستحلاب، و التوتر السطحي تحت تركيز 2% من المازوط ثم تحت تراكيز مختلفة (0.5%، 1%، 2%، 3%، 4% و 8%) من مخلفات الزيتون. تم الحصول على تكيف أسرع، معدل نمو وزيادة إنتاج أكبر، في ظل تهوية وسط التخمر بوجود المازوط مع السلالتين البكتيريتين. *P.luteola* أظهرت أفضل إنتاج لجزيئات السطح بمعدل 84.48% في حالة إستعمال 0.5% من مخلفات الزيتون. زيادة تركيز مخلفات الزيتون يثبط عملية الإنتاج. النتائج تثبت إمكانية إستعمال *P. luteola* في مختلف طرق معالجة و تنقية البيئـة.

الكلمات المفتاحية: جزيئات السطح، إنتاج، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas luteola*، مخلفات الزيتون، المازوط.

Abstract:

In this work, two bacterial strains *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas luteola* were used for a biosurfactant production assay under different conditions. The influence of the culture medium aeration and the substrate used on the quantity and stability of the production of biosurfactant was demonstrated. Growth kinetics, emulsion index and surface tension were examined at 2% diesel concentration and then at different margin concentrations (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% and 8%). Faster adaptation, higher growth and production rates were obtained in case of forced aeration of the fermentation medium, in the presence of gas-oil with both bacterial strains. *P. luteola* showed better biosurfactant production with 0.5% margins (84.48%) and an increase in the concentration of these margins inhibits the production. This result indicates that *P. luteola* can potentially be used in environmental remediation and purification processes.

Key words: Biosurfactant, Production, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas luteola*, Margins, gas-oil.

Résumé :

Dans ce travail, deux souches bactériennes *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas luteola* ont été utilisées pour un essai de production de biosurfactant sous différentes conditions. L'influence de l'aération du milieu de culture ainsi que le substrat utilisé sur la quantité et la stabilité de la production de biosurfactant, a été mise en évidence. La cinétique de croissance, l'indice d'émulsion et la tension superficielle ont été examinés sous une concentration de 2% de gasoil puis sous différentes concentration (0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% et 8%) de margines. Une adaptation plus rapide, un taux de croissance et de production plus grands ont été obtenus en condition d'aération forcée du milieu de fermentation, en présence du gasoil avec les deux souches bactériennes. *P.luteola* a montré une meilleure production de biosurfactant avec 0.5% de margines (84.48%) et une augmentation de la concentration de ces margines inhibe la production. Ce résultat indique que *P. luteola* peut être utilisée potentiellement dans des procédés de remédiations et d'épurations environnementales.

Mots clés : Biosurfactant, Production, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas luteola*, Margines, gasoil.

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A ma chère maman qui n'a jamais cessé de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Ses sacrifices et privations ne l'ont pas empêché d'accomplir son devoir de mère soucieuse de l'avenir de ses enfants.

A mon cher papa qui a su se montrer compréhensif et encourageant, sa chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

A mes sœurs qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager :

Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.

A ma grande famille, du petit jusqu'au grand.

A mes très chères copines :

Merriem Zerrougui, Imane Fellahi, Dihia Chabni et Nor El Houda Bourkaibe.

A tous mes ami(e)s de la promotion.

Malika

Remerciement

Louange à Dieu

*Je remercie très chaleureusement **Mr. N. MAMERI**, professeur à l'Ecole National Polytechnique d'El Harrach, qui n'a ménagé aucun effort pour que ce mémoire puisse voir le jour. Je lui exprime ma gratitude de m'avoir dirigé, encouragé et surtout aidé afin de réaliser ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à ma promotrice **Mme. R. CHEMLAL**, maître de conférences A., à l'Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene qui s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer.*

*Je remercie les membres du jury, Monsieur **H. GRIB**, Professeur à l'ENP, Monsieur **M. DROUCHE**, Professeur à l'ENP, qui ont bien voulu examiner ce travail.*

Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont contribué à ma formation.

Mes vifs remerciements vont, également, aux doctorants du laboratoire « Hanane, Selma, Mohamed, Mustapha, Mustapha et Hariti » pour leurs aides et surtout pour leurs gentillesse.

Enfin, je tiens sincèrement à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ses quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Nomenclature	
Introduction générale.....	13
Chapitre I : Les biosurfactants.....	15
I.1. Introduction :	16
I.2. Généralités sur les bio-surfactants :.....	16
I.2.1. Définition des bio-surfactants :.....	16
I.2.2. Classification des bio-surfactants :	17
I.2.2.1. Glycolipides :	17
I.2.2.2. Lipopeptides et lipoprotéines :	19
I.2.2.3. Les acides gras, les phospholipides et les lipides neutres :	20
I.2.2.4. Bio-surfactants polymères :.....	21
I.2.2.5. Bio-surfactants en particules :.....	21
I.2.3. Méthodes de criblage de bio-surfactants :.....	22
I.2.4. Les propriétés physico-chimiques des bio-surfactants :	22
I.2.4.1. Abaissement de la tension superficielle :	22
I.2.4.2. Abaissement de la tension interfaciale :.....	22
I.2.4.3. Concentration Micellaire Critique (CMC) :	22
I.2.4.4. Solubilisation des bio-surfactants dans l'eau :	23
I.2.5. Production des bio-surfactants :.....	23
I.2.6. Les micro-organismes producteurs :.....	24
I.2.7. Paramètres influençant la production :.....	26
I.2.7.1. Influence de la source de carbone :	26
I.2.7.2. Influence de l'azote :.....	26
I.2.7.3. Influence du pH :.....	27
I.2.7.4. Influence de la température :.....	27
I.2.7.5. Influence des sels minéraux :	27
I.2.7.6. Influence de l'oxygène :	27
I.2.7.7. Influence de la vitesse d'agitation :.....	27
I.2.8. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance :	28
I.2.9. Identification des biosurfactants :	28

I.2.10.	Avantages et inconvénients des biosurfactants :.....	28
I.2.10.1.	Avantage :.....	28
I.2.10.2.	Inconvénients des biosurfactants :.....	30
I.2.11.	Propriétés et applications des biosurfactants :.....	30
I.2.11.1.	Biosurfactants dans l'industrie cosmétique :.....	30
I.2.11.2.	Biosurfactants dans l'industrie alimentaire :.....	30
I.2.11.3.	Bio-tensioactif dans l'industrie pharmaceutique :.....	31
I.2.11.4.	Biosurfactants dans le contrôle de la pollution :.....	32
Chapitre 2 : Matériel et méthodes		35
II.1.	Matériel :.....	36
II.1.1.	Matériel biologique :.....	36
II.1.2.	Matériel non biologique :.....	36
II.2.	Méthodes :.....	37
II.2.1.	Analyse physico-chimique des margines brutes :.....	37
II.2.1.1.	Mesure des paramètres globaux :.....	37
II.2.1.2.	Dosage des Chlorures par méthode de Mohr (AFNOR T90-014) :.....	38
II.2.1.3.	Dosage des Orthophosphates par méthode spectrophotométrie (Norme NF EN 1189) :	38
II.2.1.4.	Dosage des sucres totaux :.....	39
II.2.1.5.	Dosage des Protéines :.....	39
II.2.1.6.	Dosage des composés phénoliques :.....	39
II.2.1.7.	Dosage des paramètres globaux liés à la pollution organique :.....	40
II.2.1.8.	Dosage des paramètres liés à la pollution azotée :.....	40
II.2.2.	Production de biosurfactant :.....	41
II.2.2.1.	Production de biosurfactant en présence du gasoil :.....	41
II.2.2.2.	Production de biosurfactant en présence d'un rejet agroalimentaire « margine » :.....	42
Chapitre 3 : Résultats et discussions		44
III.1.	Production de biosurfactant :.....	45
III.1.1.	Production de biosurfactant en présence de gasoil :.....	45
III.1.1.1.	Production de biosurfactant en absence d'oxygène :.....	45
III.1.1.2.	Production de biosurfactant en présence d'oxygène :.....	48
III.1.2.	Valorisation d'un rejet agroalimentaire « Margines » :.....	52
III.1.2.2.	Production de biosurfactants en présence des margines :.....	53

III.1.2.3. Comparaison et conclusion :.....	63
III.2. Etude comparative :	64
Conclusion générale	66
Références bibliographiques	68
Annexes	74

Liste des figures

Figure 1 : Schéma illustrant les deux parties hydrophobe et hydrophile des molécules amphiphiles des biosurfactants (E. Jaspard, 2012)	15
Figure 2 : Structures des rhamnolipides R1, R2, R3, R4, RA et RB produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Lang et Wullbrandt, 1999).	17
Figure 3 : : Structure des tréhaloses-lipides produits par <i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 43215 et <i>Arthrobacter</i> sp. EK 1 (a) et par <i>R.erythropolis</i> SD-74 (b) (Wagner et Lang, 1996).....	18
Figure 4 : Structure des sophorolipides produits par <i>Candida bombicola</i> ATCC 22214 (Wagner et Lang, 1996).	18
Figure 5 : Structure de la surfactine produite par <i>Bacillus</i> sp (Elsevier, 2009).....	19
Figure 6 : Structure de la lichenysine produite par <i>Bacillus licheniformis</i>	20
Figure 7 : Structures majoritaires des acides gras : β -hydroxylée, iso, anteiso, cyclopropane (Zajic et Mahomedy, 1984).	20
Figure 8 : Représentations schématiques d'une micelle de surfactant (Pore, 1992).....	22
Figure 9 : Cinétique de croissance <i>P. putida</i> et <i>P. luteola</i> sur milieu M1 modifié.....	44
Figure 10 : Evolution du pH au cours de la fermentation.	45
Figure 11 : Représentation du taux d'émulsification (E24) des biosurfactants produits par <i>P.putida</i> et <i>P.luteola</i> sur milieu M1 modifié.	46
Figure 12 : Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation des deux souches <i>P.putida</i> (a) et <i>P.luteola</i> (b) sur milieu M1 modifié.....	47
Figure 13 : Cinétique de croissance des <i>P. putida</i> et <i>P. luteola</i> au cours de la fermentation en présence d'aération.....	48
Figure 14 : Evolution du pH au cours de la fermentation en présence d'aération des <i>P. putida</i> et <i>P. luteola</i>	48
Figure 15: Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par les deux souches <i>P.putida</i> et <i>P.luteola</i> sur milieu M1 modifié.	49
Figure 16 : Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation des deux souches <i>P.putida</i> et <i>P.luteola</i>	51
Figure 17 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> sur milieu M1 modifié additionné de 0.5% de margine.	54
Figure 18 : Evolution du pH du <i>P. luteola</i> lors de la fermentation sur milieu M1 modifié enrichi avec 0.5% de margine.....	54
Figure 19 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par la souche <i>P.luteola</i> sur milieu M1 modifié et enrichi avec 0.5% de margines.	55
Figure 20 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> sur milieu enrichi avec 1% de margine.	56
Figure 21: Evolution du pH lors de la fermentation sur milieu M1enrichi avec 1% de margine.	56
Figure 22 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par la souche <i>P.luteola</i> sur milieu M1 enrichi avec 1% de margine.	57
Figure 23 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> sur milieu enrichi avec 2% de margine.	58
Figure 24 : Evolution pH lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 2% de margine.	58
Figure 25 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par <i>P.luteola</i> sur milieu enrichi avec 2% de margines.....	58
Figure 26 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> sur milieu enrichi avec 3% de margine	60
Figure 27 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 3% de margine.	60
Figure 28 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par <i>P.luteola</i> sur milieu enrichi avec 3% de margines.	60

Figure 29 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 4% de margines.....	61
Figure 30 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 4% de margine.	62
Figure 31 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par <i>P.luteola</i> sur milieu enrichi avec 4% de margines.	62
Figure 32 : Cinétique de croissance de <i>P. luteola</i> lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 8% de margines.....	63
Figure 33 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 8% de margine.	63
Figure 34 : : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par <i>P.luteola</i> sur milieu enrichi avec 8% de margines.	64

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux types de biosurfactants et les microorganismes impliqués dans leur production.....	24
Tableau 2 Paramètres de croissance et de production pour <i>P.putida</i> et <i>P.luteola</i> au cours de la fermentation en présence d'oxygène.....	52
Tableau 3 : Résultats des analyses physico-chimiques des margines :.....	53
Tableau 4 : Concentration des polyphénols dans les milieux de culture enrichis avec différentes concentrations en margine t.....	63
Tableau 5 : paramètres de modélisation de la croissance et de la production pour <i>P. luteola</i>	64

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

DO : Densité Optique.

EOR : Enhanced Oil Recovery.

Ht : hauteur totale.

He : hauteur de l'émulsion.

MEOR : Microbial Enhanced Oil Recovery.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

TS : tension superficielle.

NOMENCLATURE

CMC : Concentration Micellaire Critique.....	(mg/l)
DCO : Demande Chimique en Oxygène.....	(g d'O2/l)
DBO5 : Demande Biochimique en Oxygène.	(g d'O2/l)
MES : Matières En Suspension.....	(mg/l)
MS : Matières Sèches	(mg/l)
MVS : Matières Volatile Sèches	(mg/l)
μ_{\max} : Taux de croissance maximale	(H ⁻¹)
E24 : Taux d'émulsion	(%)



Introduction générale



Les tensioactifs et les émulsifiants synthétisés chimiquement sont largement utilisés dans les industries pétrolières, pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires. Ces dernières décennies, de nouvelles biomolécules tensio-actives d'origines microbiennes ont été décrites dans la bibliographie.

En raison de leurs faibles toxicités, biodégradabilités et leurs propriétés physico-chimiques (activent dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité), les biosurfactants ont suscité un intérêt particulier des chercheurs par rapport aux agents tensioactifs malgré leurs coûts élevés dû à la production par les microorganismes (**Makkar et Cameotra, 1999; Beal et Betts, 2000; Cassidy et al., 2002; Moraes et al., 2002 ; Maneerat, 2005; Khalladi et al., 2009; Pornsunthorntawee et al., 2009; Long et al., 2013 ; Kaya et al., 2014**).

Les biosurfactants sont des molécules extracellulaires produites par divers microorganismes (bactéries, levures et champignons) et peuvent être synthétisés sur différents substrats comme sources de carbone telles que : les alcools, les oses, les huiles végétales et les hydrocarbures. Des rhamnolipides ont pu être synthétisés par *Pseudomonas* spp. sur des déchets agroalimentaires (**Cooper et al, 1981 ; Finnerty and Singer, 1983 ; Maneerat, 2005 ; Raza et al, 2005 ; DilsadOnbasli et al, 2009**).

Ces avantages et propriétés rendent les biosurfactants intéressants que ce soit sur le plan économique (valorisation des déchets) ou dans l'environnement (élimination de la pollution) (**Maier et Soberon-Chavez, 2000 ; Cazetta et al, 2005 ; Rashedi et al, 2005 ; Rashedi et al, 2006 ; Celik et al, 2008 ; Ozturk et al, 2012 ; Kaya et al, 2014**).

Un des défis à soulever par les chercheurs est la production maximale de biosurfactants sur des substrats à faibles coûts (**Cazetta et al, 2005 ; Rashedi et al, 2005**).

Pour cela, il est nécessaire d'en savoir plus sur la physiologie des microorganismes producteurs considérés comme un élément clef du Bioengineering (de l'isolement, screening jusqu'à la production des biosurfactants) (**Edwards et Hayashi, 1965 ; Department of Energy, 1979 ; Atanasković et al, 2016**).

Le but de ce travail est d'essayer de produire des biosurfactants par deux souches du genre *Pseudomonas* « *P.putida* et *P.luteola* » en utilisant deux substrats différents : le gasoil et un rejet agro-alimentaire « les margines ».



Chapitre I : Les biosurfactants



I.1. Introduction :

En 1971, une substance produite par *Pseudomonas aeruginosa* qui stimulait la croissance sur le n-hexadécane a été découverte. La substance avait des propriétés tensioactives et émulsionnantes et fut identifiée comme un rhamnolipide. Puis, des chercheurs ont trouvé qu'un mutant d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* ne pouvait plus croître sur la paraffine (alcanes) depuis qu'il avait perdu sa capacité de produire du biosurfactant, et que la croissance était restaurée par l'ajout de rhamnolipides provenant de la souche originale. Depuis, la littérature souligne le lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles et la production de biosurfactants (Comeau, 1999).

I.2. Généralités sur les bio-surfactants :

I.2.1. Définition des bio-surfactants :

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules tensioactives synthétisées par certains micro-organismes. On les trouve soit à la surface des cellules microbiennes soit sécrétés à l'extérieur des microorganismes.

Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire, généralement constituée d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), et d'une partie hydrophobe non polaire constituée d'acides gras saturés ou non saturés (voir **figure1**) (Desai et Banat, 1997).

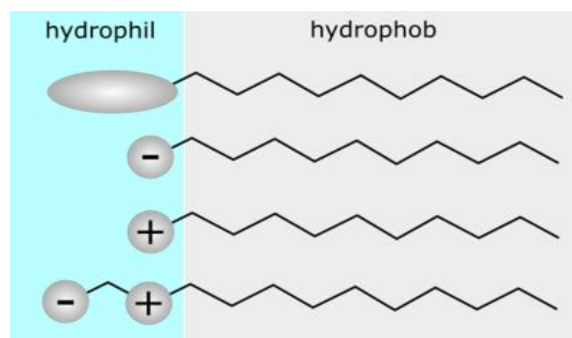


Figure1 : Schéma illustrant les deux parties hydrophobe et hydrophile des molécules amphiphiles des biosurfactants (E. Jaspard, 2012).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de groupements comme le montre la **figure1** :

- 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'espèces anioniques, cationiques ou neutres (West et Harwell, 1992).

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son groupement aromatique, son nombre de carbones ou son degré de ramification (**West et Harwell, 1992 ; Desai et Banat 1997**).

I.2.2. Classification des bio-surfactants :

Les biosurfactants sont généralement classés selon la composition chimique des fractions hydrophobes et hydrophiles et l'origine microbienne.

Rosenberg et al. (1999) ont suggéré deux types de biosurfactants selon le poids moléculaires :

- Les biosurfactants de faible masse moléculaire, qui réduisent efficacement la tension superficielle et interfaciale (les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides) ;
- les biosurfactants de masse moléculaire élevée, très efficaces en tant qu'agents stabilisants des émulsions (les hétéro-polysaccharides poly-anioniques renferment à la fois des polysaccharides et des protéines) (**ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.2.1. Glycolipides :

En général, les biosurfactants les plus connus sont les glycolipides. Ce sont des glucides qui se combinent avec des acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides gras hydroxylés reliés soit à un ester, soit à un éther. Parmi les glycolipides, les plus connus sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (**ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.2.1.1. Rhamnolipides :

Les rhamnolipides se composent de molécules de rhamnose qui sont liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxy-décanoïque. Un groupe OH de l'acide hydroxydécanoïque est impliqué dans une liaison glycosidique avec l'extrémité réductrice du disaccharide de rhamnose; Le groupe OH du deuxième hydroxydécanoïque est impliqué dans la formation d'ester (voir **figure2**) (**Karanth, et 1999 ; ErumShoeb et al, 2013**).

Jarvis et Johnson (1949) ont décrit pour la première fois la production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa*. En raison de leur excellente activité de surface, les propriétés physicochimiques des rhamnolipides ont suscité un intérêt considérable (**Abalos et al, 2001, Cohen et Exerowa 2007 ; Hansen et al, 2008 ; Abdel-Mawgoud et al, 2009 ; Pornsunthorntawee et al, 2009 ; ErumShoeb et al, 2013**).

L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydécanoyl- β -hydroxydécanoate et L-rhamnosyl- β -hydroxydécanoyl- β -hydroxydécanoate ; désignés respectivement di- et mono-Rhamnolipides ; sont les principaux glycolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (**Édouard et Hayashi 1965**).

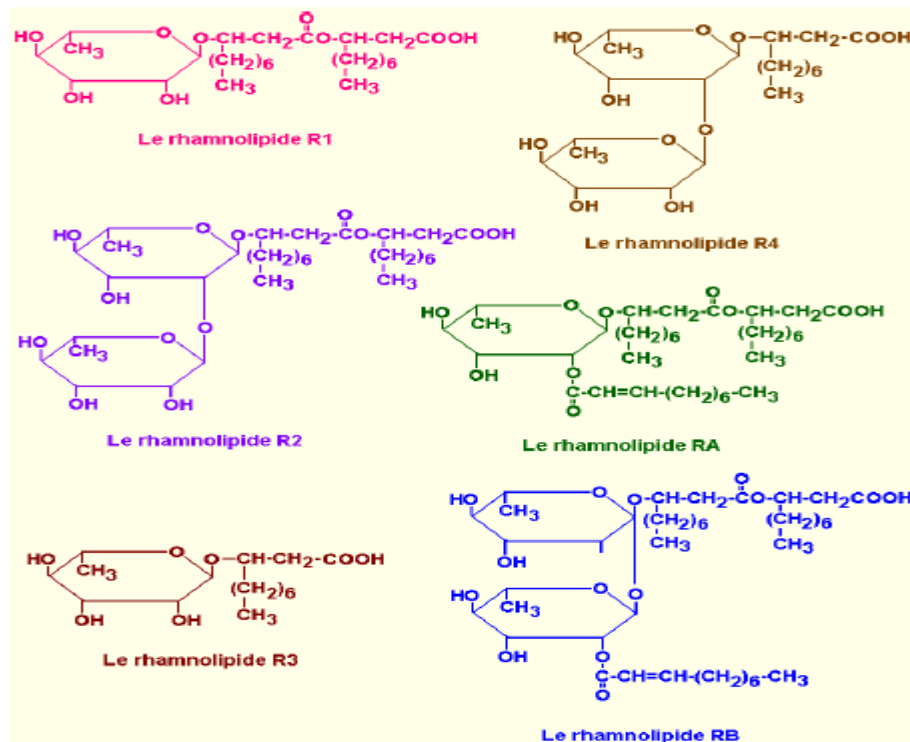


Figure2 : Structures des rhamnolipides R1, R2, R3, R4, RA et RB produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Lang et Wullbrandt, 1999).

I.2.2.1.2. Tréhalolipides :

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur dans lequel les deux unités de glucose sont liées dans une liaison α, α -1,1-glycosidique (voir figure3). C'est la composante basique des glycolipides de la paroi cellulaire dans *Mycobacteria* et *Corynebacteria*. On trouve plusieurs structures de lipides de tréhalose (Lang et al, 1987 ; Li et al, 1994 ; ErumShoeb et al, 2013).

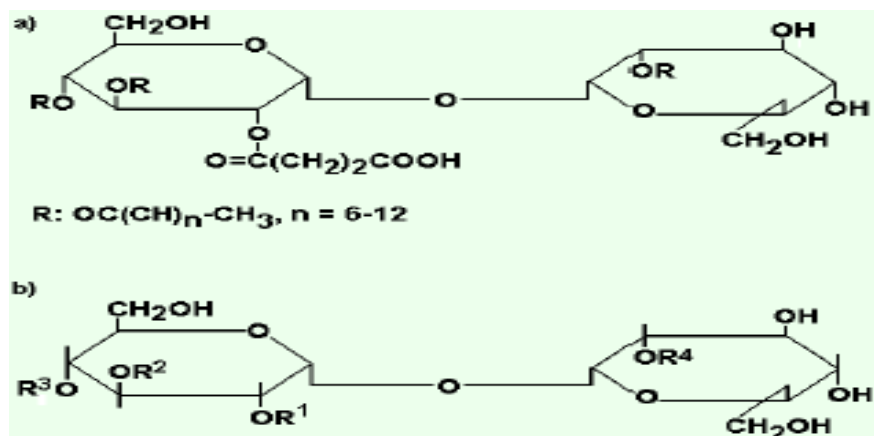


Figure3 : Structure des tréhaloses-lipides produits par *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 et *Arthrobacter* sp. EK 1 (a) et par *R.erythropolis* SD-74 (b) (Wagner et Lang, 1996)

I.2.2.1.3. Sophorolipides :

Les sophorolipides sont des carbohydrates dimériques sophorose, liés à un acide hydroxy-acide à longue chaîne (voir **figure 4**). Ces biosurfactants sont un mélange de six à neuf sophorosides hydrophobes différents (**Hommel et al, 1987**). Bien que les sophorolipides puissent abaisser la tension superficielle et interfaciale mais ils ne sont pas considérés comme des agents émulsifiants efficaces (**Cooper et Paddock, 1984 ; ErumShoeb et al, 2013**).

Généralement, les sophorolipides se présentent sous la forme d'un mélange de 6 macro-lactones et d'une forme d'acide libre. Il a été démontré que la forme lactone du sophorolipide est nécessaire, ou du moins préférable, pour de nombreuses applications (**Hu et Ju, 2001**).

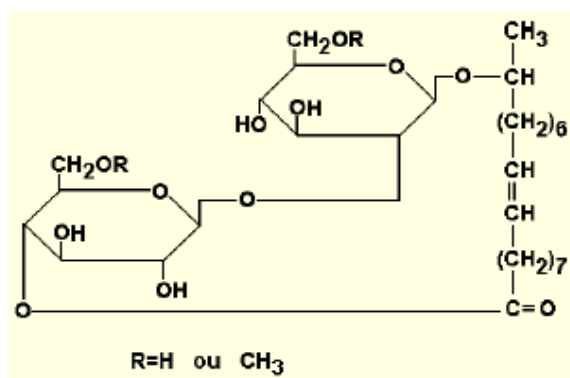


Figure4 : Structure des sophorolipides produits par *Candida bombicola* ATCC 22214 (Wagner et Lang, 1996).

I.2.2.2. Lipopeptides et lipoprotéines :

Un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris des antibiotiques décapeptidiques (gramicidines) et des antibiotiques lipopeptidiques (polymyxines) sont produits. Il s'agit d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Deux d'entre eux sont décrits ci-dessous :

I.2.2.2.1. Surfactine :

La surfactine est un biosurfactant important avec une activité superficielle supérieure et appartient à un groupe de lipoheptapeptides cycliques contenant des acides gras β -hydroxyliques et des résidus D- / L-aminoacide (**Haddad et al, 2008**).

La surfactine lipopeptidique cyclique est produite par *Bacillus sp.* Il est composé d'une structure cyclique à sept acides aminés couplée à une chaîne d'acides gras par liaison lactone (voir **figure5**) (**Arima et al, 1968**).

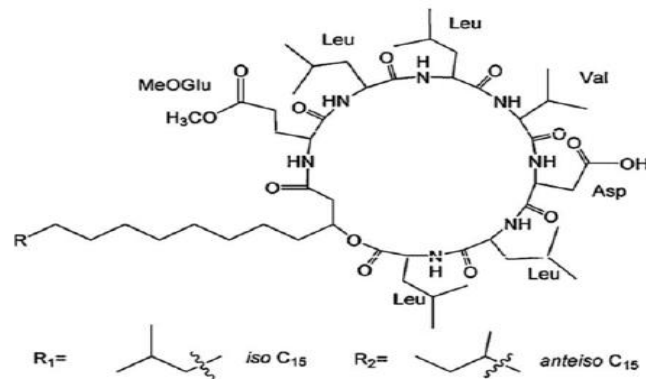


Figure 5 : Structure de la surfactine produite par *Bacillus sp* (Elsevier, 2009).

I.2.2.2. Lichenysine :

Elle est similaire par ses propriétés structurales et physico-chimiques à celle de la surfactine (Mc Inerney et al, 1990). Les tensioactifs produits par *Bacillus licheniformis* sont capables d'abaisser la tension superficielle de l'eau à 27mN / m et la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane jusqu'à 0,36 mN / m (voir figure6).

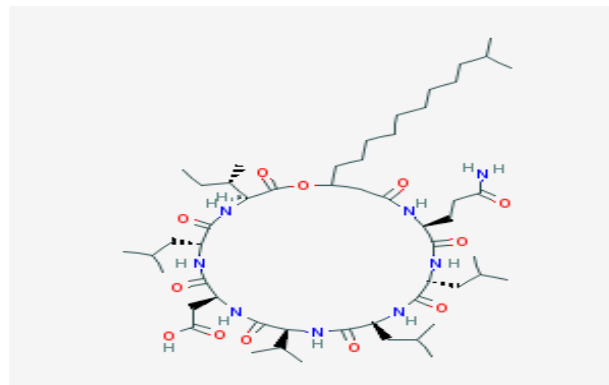


Figure 6 : Structure de la lichenysine produite par *Bacillus licheniformis*.

I.2.2.3. Les acides gras, les phospholipides et les lipides neutres :

Une grande quantité d'agents tensioactifs d'acides gras et de phospholipides est produite par plusieurs bactéries et levures pendant la croissance sur les n-alcane (voir figure7) (Asselineau et al, 1978 ; Cirigliano 1985 ; Cooper et al, 1978 ; Robert et al, 1989 ; ErumShoeb et al, 2013). Lorsque *R. erythropolis* est cultivé sur n-alcane, il produit une substance connue sous le nom de Phosphatidyléthanolamine qui diminue la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1 mN / m et une concentration critique de micelle (CMC) de 30 mg / litre (Kretschmer et al, 1982 ; ErumShoeb et al, 2013).

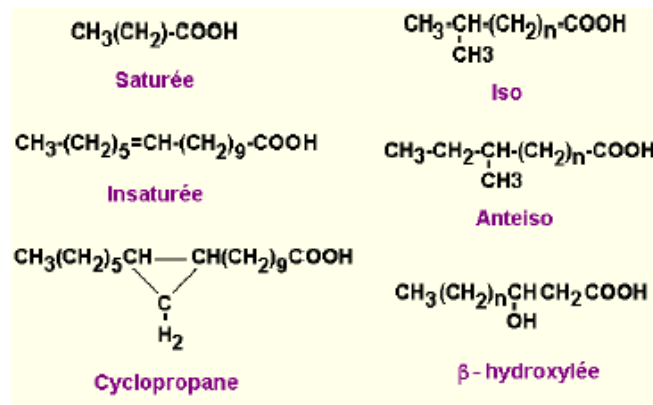


Figure7 : Structures majoritaires des acides gras : β -hydroxylée, iso, anteiso, cyclopropane (Zajic et Mahomedy, 1984).

I.2.2.4. Bio-surfactants polymères :

Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont l'émulsan, le liposane, le manopopère et d'autres complexes polysaccharides-protéines. L'émulsan synthétisé par *Acinetobacter calcoaceticus*, se compose d'un squelette hétéropolysaccharide auquel les acides gras sont liés de manière covalente (Rosenberg et al, 1988 ; ErumShoeb et al, 2013).

Un autre exemple, le liposan, un émulsifiant extracellulaire hydrosoluble synthétisé par la levure *Yarrowia lipolytica* (Cirigliano et al, 1984 ; ErumShoeb et al, 2013), qui est composé de 83% de glucides et de 17% de protéines.

I.2.2.5. Bio-surfactants en particules :

Les bio-surfactants en particules sont de deux types, les vésicules extracellulaires et les cellules microbiennes entières. Les vésicules de membrane extracellulaire partitionnent les hydrocarbures pour former des microémulsions, qui jouent un rôle important dans l'absorption des hydrocarbures par les cellules microbiennes. Parfois, la cellule bactérienne elle-même peut fonctionner comme tensioactif.

I.2.2.5.1. Vésicules :

Acinetobacter sp cultivé sur l'hexadécane a accumulé des vésicules extracellulaires de 20 à 50 nm de diamètre avec une densité de flottabilité de 1,158 g/cm³. Ces vésicules semblent jouer un rôle dans l'absorption des alcanes, ils sont constituées de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides (Kappeli et Finnerty 1979).

I.2.2.5.2. Cellules microbiennes entières :

La plupart des microorganismes dégradant les hydrocarbures, les composés non-hydrocarbonés, certaines espèces de cyanobactéries et certains agents pathogènes ont une forte affinité pour les interfaces eau-hydrocarbures et air-eau. Dans de tels cas, la cellule microbienne elle-même est un tensioactif (Karanth et al., 1999).

I.2.3. Méthodes de criblage de bio-surfactants :

Malgré la diversité des biosurfactants, il existe une méthode commune utilisée pour leur classification, basée sur l'activité superficielle, ainsi que les interactions avec les membranes hydrophobes.

Des méthodes particulières ont été développées, pour certain famille de biosurfactants, par exemple le test colorimétrique et le test de gélose CTAB. Ces méthodes donnent des résultats satisfaisants aussi bien quantitatifs ou qualitatifs.

Parmi les méthodes de criblage de biosurfactant on citera :

- Surface / Activité interfaciale ;
- Méthode Du-nouy-ring ;
- Activité d'émulsification ;
- Méthode d'épandage d'hydrocarbures ;
- Mesures de tension superficielle ;
- Essai de déplacement du pétrole ;
- Test d'effondrement de chute « Drop collapse test ».

I.2.4. Les propriétés physico-chimiques des bio-surfactants :

I.2.4.1. Abaissement de la tension superficielle :

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface (**Holmberg et al, 2001 ; Khemili, 2008**). Les biosurfactants sont capables de réduire la tension superficielle d'eau jusqu'à 29,0 mN / m, contrairement aux surfactants synthétiques où on atteint une valeur de 42.8 mN / m pour le Pluronic F-68 (**Pornsunthorntaweea et al., 2008**).

I.2.4.2. Abaissement de la tension interfaciale :

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (**Neindre, 1993**). La tension interfaciale de l'eau contre un alcane (n-octane) est de 50.81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m (**Holmberg et al., 2002 ; Khemili, 2008**).

I.2.4.3. Concentration Micellaire Critique (CMC) :

La CMC se définit comme étant la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (PORE, 1992). En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure8**).

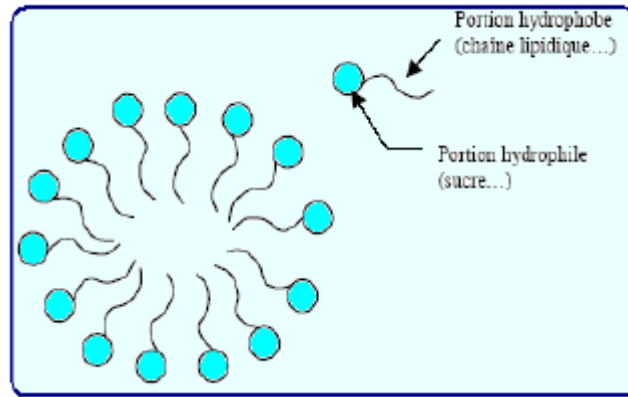


Figure 8 : Représentations schématiques d'une micelle de surfactant (Pore, 1992).

Pour de nombreux biosurfactants, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (Edwards et al, 1991 ; Khemili, 2008).

Les effets des électrolytes sur la CMC sont plus prononcés pour les biosurfactants ioniques. La variation de la taille de la partie hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (Haigh, 1996 ; Khemili, 2008).

I.2.4.4. Solubilisation des bio-surfactants dans l'eau :

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. Si la longueur de la chaîne de la partie lipophile est inférieure à 12 liaisons C-C, le biosurfactant est soluble dans l'eau (Mimouni, 1995 ; Khemili, 2008).

Selon Larpent (2000), la solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures est en fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobe et hydrophile (plus précisément de leur « balance lipophile-hydrophile (HLB) » (Khemili, 2008).

I.2.5. Production des bio-surfactants :

Le succès de l'utilisation et de la production des biosurfactants passe par une diminution du coût de la production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation des déchets. Makkar et Cameotra (2002) indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles comme substrat à faible coût lors de la production et d'une part pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...). Une étude réalisée par Mercade et Manresa (1994) ont montré des taux de productions de rhamnolipides de 1,4 g.L⁻¹ par *Pseudomonas* spp. cultivées sur des déchets.

I.2.6. Les micro-organismes producteurs :

Plusieurs microorganismes ont été identifiés comme producteurs de biosurfactant, le **tableau1** résume les différents groupes de biosurfactants et leurs applications au cours des dernières années.

Tableau1 : Principaux types de biosurfactants et les microorganismes impliqués dans leur production (Saikia et Deka, 2015).

Biosurfactants		Microorganismes	Références
Groupe	Classe		
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Burkholderia glumae</i> , <i>Burkholderia plantarii</i> , <i>Burkholderia thailandensis</i>	Herman et al. 1995 ; Maier et al. 2000 ; Sifour et al. 2007 ; Whang et al. 2008 ; Dubeau et al. 2009 ; Hörmann et al. 2010
	Lipides tréhaloses	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Arthobacter</i> sp.	Franzetti et al. 2010
	Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>	Whang et al. 2008
	Lipide de mannosylérythritol	<i>Candida antartica</i>	Wakamatsu et al. 2001
	Cellobiolipides	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>Ustilago maydis</i>	Desai and Banat 1997
	Surfactine / iturine / fengycine	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Tanaka et al. 1997 ; Awashiti et al. 1999 ; Ahimou et al. 2001

Lipopeptides et lipoprotéines	Viscosine	<i>Pseudomonas libanensis</i>	Saini et al. 2008
	Lichenysine	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sen 2008
	<i>Gramicidine</i>	<i>Brevibacterium brevis</i>	Elad et Stewart 2007
	<i>Antibiotique TA</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	Xiao et al. 2012
Acides gras / lipides neutres / phospholipides	<i>Acide Corynomycolique</i>	<i>Corynebacterium lepus</i>	Gerson et al.1978
	<i>Acide Spiculisporique</i>	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Ishigami et al. 2000
	<i>Phosphatidyléthanol amine</i>	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycococcus</i> sp.	Appanna et al. 1995
Biosurfactant polymérique	<i>Lipo-polysaccharide</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Zosim et al, 1982
	<i>Biodispersant</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Rosenberg et al. 1981
	<i>Complexe de protéine polysaccharide</i>	<i>Acinebacter calcoaceticus</i>	Kaplan et al. 1987
	<i>Liposan</i>	<i>Candida lipolytica</i>	Cirigliano et Carman, 1985;
	<i>Mannoprotéine</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cameron et al. 1988
	<i>Protéine PA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Karanth et al. 1999
Biosurfactants en particules	<i>Vésicule</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Karanth et al. 1999;
	<i>Cellule microbienne entière</i>	<i>Cyanobacteria</i>	

I.2.7. Paramètres influençant la production :

La synthèse des biosurfactants comme est influencée par un certain nombre de facteurs environnementaux qui augmentent sa productivité ou l'inhibent (Rahman et Gakpe 2008). Parmi les facteurs on a :

I.2.7.1. Influence de la source de carbone :

La source de carbone est un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. La revue bibliographique a montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides ; cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles (hydrocarbures, les huiles végétales. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur les substrats hydrophobes (**Desai et Banat, 1997 ; Cameotra et Makkar, 1998 ; Khemili, 2008**).

Mata-Sandoval et al, (2000) reportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le changement de substrat carboné altère la structure des molécules produites. En effet, **Fiecher (1992)** indique que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production.

Calvo et al. (2004) ont étudié la relation entre la présence des hydrocarbures et le type de l'exopolysaccharide produits par *Halomonas eurihalina*. La composition chimique des exopolysaccharides produits varie selon les conditions de culture. Les exopolysaccharides produits dans un milieu à base des hydrocarbures contiennent moins de carbohydrates et de protéines que dans un milieu à base de glucose. Néanmoins, le pourcentage des acides uroniques, acétyls et sulfates sont toujours plus élevé que dans un milieu contenant du glucose.

I.2.7.2. Influence de l'azote :

Plusieurs recherches ont montré l'augmentation de la production par l'addition d'un substrat azoté, tandis que d'autre ont montré que la limitation de l'azote a provoqué l'augmentation de cette production « *Pseudomonas aeruginosa* (**Ramana et Karanth, 1989**), *Candida tropicalis* (**Singh et al, 1990**) ».

De plus, **Syldatk et al. (1985)** a montré que la limitation de l'azote non seulement provoquait une surproduction de biosurfactant mais également une modification de la composition du biosurfactant produit.

Pour avoir des rendements optimums de la production, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour améliorer la production de biosurfactant (**Gabet, 2004 ; Djerbaoui, 2011**).

I.2.7.3. Influence du pH :

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement.

D'autres souches comme *Nocardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 (Arino et al, 1996 ; Djerbaoui, 2011).

De plus, la tension superficielle et les concentrations critiques en micelles d'un produit tensioactif restent stables sur une large gamme de valeurs de pH tandis que l'émulsification avait une plage de pH plus étroite (Abu-Rawaida et al, 1991 ; Al-Araji et al, 2007).

I.2.7.4. Influence de la température :

L'influence de la température est directement liée au type microbien utilisé, par exemple, certains études montrent que les températures de 27°C et 30°C semblent être les plus indiquées pour la production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa*, (Deshpande et Daniels, 1995 ; Siegmund et Wagner, 1991 ; Rocha et al, 1992). Alors qu'un complexe thermophile *Bacillus sp.* a produit du biosurfactant à une température supérieure à 40°C (Al-Araji et al, 2007).

Le traitement thermique de certains agents tensioactifs biologiques n'a pas entraîné de modification notable des propriétés des biosurfactants, comme l'abaissement de la tension superficielle, de la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification, qui sont restés stables après autoclavage à 120 ° C pendant 15 minutes (Abu Rawaida et al., 1991 ; Al-Araji et al., 2007).

I.2.7.5. Influence des sels minéraux :

Il semblerait qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (Guerra et al, 1986 ; Djerbaoui, 2011).

I.2.7.6. Influence de l'oxygène :

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (Gabet, 2004 ; Djerbaoui, 2011).

I.2.7.7. Influence de la vitesse d'agitation :

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de

cisaillement et donc un rendement faible. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (**Desai et Banat, 1997 ; Djerbaoui, 2011**).

I.2.8. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance :

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). Leur récupération dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules).

Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices (**Desai et Banat, 1997 ; Khemili, 2008**).

I.2.9. Identification des biosurfactants :

Une fois les produits sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquentes (**Khemili, 2008**) :

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore (**Spoeckner et al, 1999**) ;
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine les groupements fonctionnels (**Peypoux et al, 1999**).
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute température, fournit l'analyse élémentaire de la molécule (**Daniels et al, 1999**).
- La résonance magnétique nucléaire à haut champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser (**Daniels et al, 1999**).

I.2.10. Avantages et inconvénients des biosurfactants :

I.2.10.1. Avantage :

Par rapport aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants présentent plusieurs avantages, discutés ci-dessous :

I.2.10.1.1. Biodégradabilité :

Les bio-surfactants sont biodégradables par nature. Les bactéries, les champignons ou d'autres organismes simples pouvant être décomposés en composants plus élémentaires en raison de processus naturels, ils ne créent pas beaucoup de problèmes pour l'environnement et sont particulièrement adaptés aux applications environnementales.

I.2.10.1.2. Faible toxicité :

Les bio-surfactants ne causent pas de graves dommages à l'écosystème biotique, car leur toxicité est faible. Ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non toxiques et donc, approprié pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

Il existe peu de publications strictement consacrées à la toxicité des bio-tensioactifs. Les tests de toxicité font plutôt partie d'une recherche plus large sur les fonctions d'application.

Les biosurfactants par rapport aux tensioactifs synthétiques présentent des activités hémolytiques des érythrocytes humains inférieurs. En outre, leur toxicité aiguë et chronique est beaucoup plus faible que celle du Triton X-100 synthétique (**Klosowska-Chomiczewska et al, 2011**).

I.2.10.1.3. Biocompatibilité :

Les biotensioactifs sont biocompatibles et bien tolérés par les organismes vivants (**Rosenberg et al, 1999**). Ces interactions avec les organismes vivants ne modifient pas la bioactivité des organismes (**Danyelle et al, 2016**).

I.2.10.1.4. Economie de production acceptable :

Selon l'application, les biosurfactants peuvent également être produits à partir de déchets industriels. Ceci présente un intérêt particulier pour la production en vrac d'un biosurfactant qui est économiquement acceptable (par exemple pour une utilisation dans des technologies apparentées au pétrole).

I.2.10.1.5. Utilisation dans le contrôle de l'environnement :

Les biotensioactifs ont montré un potentiel très important dans la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. Ils peuvent être utilisés efficacement dans la manipulation des émulsions industrielles, le contrôle des déversements d'hydrocarbures, la biodégradation et la détoxification des effluents industriels.

I.2.10.1.6. Spécificité :

Les biosurfactants sont des molécules complexes avec des groupes fonctionnels spécifiques et une action spécifique. Cela présente un intérêt particulier pour l'élimination des polluants dans l'environnement, ainsi que leurs applications dans différents secteurs (agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques) (**Danyelle et al, 2016**).

I.2.10.2. Inconvénients des biosurfactants :

En ce qui concerne les inconvénients, l'un des problèmes est lié à la production à grande échelle et bon marché de bio-surfactants. De grandes quantités sont particulièrement nécessaires dans les applications pétrolières et environnementales, qui, en raison de l'utilisation en vrac, peuvent être coûteuses. Pour remédier à ce problème, les procédés doivent être couplés à l'utilisation de substrats de déchets en combattant en même temps leur effet polluant, ce qui équilibre les coûts globaux. Un autre problème peut être rencontré dans l'obtention de substances pures qui revêt une importance particulière dans les applications pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques.

I.2.11. Propriétés et applications des biosurfactants :

Les bio-tensioactifs sont des tensioactifs prometteurs et sont utiles dans les domaines de la cosmétique, de la transformation des aliments, des produits pharmaceutiques et de la bio-assainissement environnemental, en particulier dans la récupération accrue du pétrole (EOR) et le nettoyage des déversements d'hydrocarbures.

I.2.11.1. Biosurfactants dans l'industrie cosmétique :

Les biosurfactants multifonctionnels ont plusieurs applications cosmétiques (**Kleckner et Kosaric., 1993**) en raison de leurs propriétés superficielles exceptionnelles telles que les effets de détergence, de mouillage, d'émulsification, de solubilisation, de dispersion et de moussage (**Rieger, 1997**). Les biosurfactants sont connus pour avoir des avantages par rapport aux tensioactifs synthétiques tels que la faible irritation ou les effets anti-irritants, les meilleures propriétés hydratantes et la compatibilité avec la peau, donc très exigeants.

Les biosurfactants glycolipidiques les plus utilisés dans les cosmétiques sont les sophorolipides, les rhamnolipides et les lipides de mannosylérythritol. Les sophorolipides ont une bonne compatibilité cutanée et d'excellentes propriétés hydratantes, les rhamnolipides sont des tensioactifs naturels et des émulsifiants qui peuvent remplacer les tensioactifs à base de pétrochimie utilisés dans la plupart des produits cosmétiques. Ils ont également été utilisés dans des pansements d'acné anti-pelliculaires, anti-rides et anti-âge, déodorants, produits de soin des ongles et dentifrices avec plusieurs formulations différentes (**Piljac et al, 1999**). Les lipides de Mannosylerythritol sont généralement utilisés dans les formulations de soins de la peau comme ingrédient actif pour prévenir la rugosité de la peau (**Masaru et al, 2007 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.2. Biosurfactants dans l'industrie alimentaire :

Les bio-tensioactifs comme composés biocompatibles, biodégradables et / ou non toxiques ont la combinaison de caractéristiques particulières qui présentent une variété de propriétés utiles pour l'industrie alimentaire, en particulier comme émulsifiants, moussants,

mouillants, solubilisants (**Banat et al, 2000 ; ErumShoeb et al, 2013**) et des agents antiadhésifs et antimicrobiens (**Singh et Cameotra, 2004 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.2.1. Emulsifiant alimentaire :

Les biosurfactants montrent plusieurs propriétés d'émulsification qui ont d'excellentes applications dans de nombreux domaines de l'industrie alimentaire. L'ajout d'émulsifiants est d'une valeur spéciale pour les produits à faible teneur en matière grasse (Rosenberg et Ron, 1999).

I.2.11.2.2. Stabilisateur de nourriture :

Les biosurfactants assurent la cohérence dans les formulations des produits de boulangerie et de crème glacée. Ils sont également utilisés comme stabilisateur de graisse et agent anti-éclaboussures pendant la cuisson d'huile et de graisses (**Kosaric, 2001 ; ErumShoeb et al, 2013**). Dans le traitement des aliments, l'addition des rhamnolipides améliore la texture et la durée de conservation des produits contenant de l'amidon, modifie les propriétés rhéologiques et la stabilité de la pâte de blé (**Van et al, 2004 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.2.3. Activité antiadhésive :

L'activité antiadhésive du biosurfactant est utilisée comme un nouvel outil pour inhiber et perturber les biofilms formés dans les surfaces de contact alimentaire par différents groupes de bactéries. Les biofilms bactériens (groupe de bactéries qui ont colonisé une surface) présents dans les surfaces de l'industrie alimentaire sont des sources potentielles de contamination, ce qui peut entraîner une détérioration des aliments et une transmission de la maladie, ainsi un contrôle de l'adhérence des microorganismes aux surfaces de contact avec les aliments est une étape essentielle pour fournir des produits sûrs et de qualité aux consommateurs (**Hood et Zottola, 1995 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.3. Bio-tensioactif dans l'industrie pharmaceutique :

Les biosurfactants pouvaient avoir une large gamme d'applications dans l'industrie pharmaceutique (**Kakugawa et al, 2002 ; Mukherjee et al, 2006**).

I.2.11.3.1. Manipulation génétique :

Selon Gharaei-Fathabad (2011), l'établissement d'une méthode efficace et sûre pour introduire des nucléotides exogènes dans des cellules de mammifères est essentiel pour les sciences fondamentales et les applications cliniques telles que la thérapie génique. La lipofection utilisant des liposomes cationiques est considérée comme un moyen de sauvegarde pour délivrer un gène étranger aux cellules cibles sans effets secondaires (**Zang et al, 2010 ; Fujita et al, 2009 ; Liu et al, 2010 ; ErumShoeb et al, 2013**).

En 2002, la littérature rapportée par **Kitamoto et al**, que le liposome à base de biosurfactants, montre une efficacité croissante de la transfection des gènes par rapport au liposome cationique disponible dans le commerce.

I.2.11.3.2. Action modulateur immunitaire :

Les lipopeptides bactériens constituent un adjuvant immunologique non toxique et non pyrogène puissant lorsqu'il est mélangé avec des antigènes classiques (**Gharaei-Fathabad, 2011 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.3.3. Activité toxique contre les microorganismes :

Plusieurs biosurfactants ont une forte activité antimicrobienne, antifongique et antivirale, cette performance polyvalente est conférée grâce aux diverses structures des biosurfactants (**Zhoa et al, 2010 ; ErumShoeb et al, 2013**). La structure du biosurfactant est censée exercer sa toxicité sur la perméabilité de la membrane cellulaire comme effet détergent. Les lipopeptides présentent un large spectre d'activité antimicrobienne contre les microorganismes présentant un profil résistant aux médicaments multiples (**Fernandes et al, 2007 ; ErumShoeb et al, 2013**). **Rodrigues et al. (2006)** ont mentionné de nombreux bio-tensioactifs produits par *Candida antartica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis* et *B. licheniformis* ont montré des activités toxiques contre les microorganismes (**ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.3.4. Agents anti-adhésifs :

L'adhésion des biosurfactants aux surfaces solides pourrait constituer un moyen nouveau et efficace de lutter contre la colonisation par des micro-organismes pathogènes (**Rivardo et al, 2009 ; ErumShoeb et al, 2013**). On a constaté que les biosurfactants inhibent l'adhérence d'organismes pathogènes au site d'infection (**Das et al, 2009 ; ErumShoeb et al, 2013**). Ces agents tensioactifs peuvent jouer un rôle important d'agents anti-adhésifs, ce qui les rend utiles pour traiter de nombreuses maladies ainsi que leur utilisation comme agent thérapeutique et probiotique.

I.2.11.4. Biosurfactants dans le contrôle de la pollution :

Selon la littérature, les biosurfactants ont une grande capacité à émulsionner les mélanges d'hydrocarbures et d'eau (**Francy et al, 1991 ; Zhang et Miller, 1992 ; ErumShoeb et al, 2013**). À l'heure actuelle, les accidents de la pollution par les hydrocarbures sont devenus nombreux et ont causé des catastrophes sociales et écologiques (**Burger, 1993 ; Shaw, 1992 ; Burns et al, 1993 ; ErumShoeb et al, 2013**). La propriété d'émulsification des biosurfactants est utile pour la lutte contre la pollution des hydrocarbures en améliorant la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement (**Atlas, 1993 ; Bertrand et al, 1994 ; ErumShoeb et al, 2013**).

I.2.11.4.1. Rôle des bio-tensioactifs dans le processus de bioremédiation :

La bioremédiation de certains sites contaminés est limitée en raison de la faible solubilité dans l'eau de nombreux hydrocarbures, ce qui réduit leur disponibilité aux micro-organismes. On a supposé que les tensioactifs peuvent être utilisés pour améliorer la biodisponibilité des composés hydrophobes (Atlas et Cerniglia, 1995 ; ErumShoeb et al., 2013). Étant donné que la bioremédiation est basée sur l'atténuation naturelle et sont généralement plus économiques que les méthodes traditionnelles.

I.2.11.4.2. Biosurfactants comme nettoyant dans le réservoir de stockage d'huile :

Banat et al. (1991) reporte un test sur terrain dans lequel des biosurfactants produits à partir d'une souche bactérienne exclusive ont été utilisés pour tester leur capacité à nettoyer les réservoirs de stockage d'huile et à récupérer les hydrocarbures provenant des boues émulsionnées. Le test a confirmé que ces biosurfactants ont permis la récupération de plus de 90% de l'hydrocarbure piégé dans la boue (ErumShoeb et al, 2013).

I.2.11.4.3. Récupération du pétrole améliorée par organismes microbiens :

La récupération du pétrole améliorée par organismes microbiens (MEOR) est une technologie importante pour la récupération de l'huile résiduelle en utilisant des microorganismes et leurs produits métaboliques finaux. Il est généralement admis qu'environ 30% de l'huile présente dans un réservoir peut être récupérée en utilisant la technologie actuelle de récupération de pétrole améliorée (EOR) (Singer et Finnerty, 1984 ; ErumShoeb et al, 2013).

Dans les puits de production d'hydrocarbures existants, une faible récupération peut être due à la faible perméabilité de certains réservoirs ou à la viscosité élevée de l'huile, ce qui entraîne une mobilité médiocre. L'intérêt a évolué dans les techniques de récupération tertiaire car, en suivant les techniques de récupération primaire et secondaire, la majeure partie de l'huile reste dans le réservoir (Morkes, 1993). Les différents effets de récupération sur l'environnement du réservoir dépendent de la présence de différents types de microorganismes ayant des propriétés de croissance variables et la production de métabolites. Il existe plusieurs stratégies impliquant l'utilisation de biosurfactants dans MEOR (Shennan et Levi, 1987), telles que :

- l'injection de microorganismes producteurs de bio-tensioactifs dans un réservoir à travers les puits, avec une propagation ultérieure in situ à travers la roche du réservoir (Bubela, 1985) ;
- Ou l'injection de nutriments sélectionnés dans un réservoir, stimulant ainsi la croissance des microorganismes producteurs de biosurfactants indigènes ;
- Tandis que l'autre mécanisme implique la production de biosurfactants dans les bioréacteurs ex situ et l'injection ultérieure dans le réservoir.

De nombreux types de tensioactifs sont déjà utilisés dans l'industrie, mais il est important de développer encore plus de nouveaux composés pour élargir le spectre de propriétés et d'applications spécifiques (**Cameotra et Makkar, 2004**).



Chapitre 2 : Matériel et méthodes



Ce travail rentre dans le cadre de la préparation du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement. Il a été réalisé au niveau du laboratoire « BIOGEP » à l'école nationale polytechnique d'El Harrach et dont l'objectif est d'essayer de produire des biosurfactants sur un déchet agroalimentaire (les margines).

II.1. Matériel :

Appareil	Marque
Etuve	BUVE
Autoclave	/
Four-Pasteur	J.P.SELECTA,s.a.
Incubateur agitateur	WiseShake (SHO-2D)
Centrifugeuse à froid	/
spectrophotomètre	SHIMADZU UVmini-1240
pH-mètre	HANNA instrument
Tensiomètre	Gibertini TSD Digital Tensiometer
Vortex	TechnoKARTELL (TK3S)
Bec Bunsen	/
Conductimètre	HANNA instrument
Oxymètre	OxyTop IS 6 WTW

II.1.1. Produit biologique :

Les souches qui ont fait l'objet de cette étude, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas luteola*, ont été isolées à partir des sols pollués et mise à ma disposition par Docteur Radia Chemlal.

II.1.2. Produit non biologique :

a. Les margines :

Les margines utilisés dans ce travail proviennent d'une huilerie traditionnelle de la région d'Ath arezine wilaya de Béjaia. Ils sont stockés dans des récipients en plastique à température ambiante. Avant toute utilisation, ils sont bien homogénéisés.

b. Milieux de culture :

- **Milieux solides** : Gélose nutritive.
 - **Milieux liquides** : Milieu M1 est un milieu semi-synthétique proposé par **Zajic et al. (1997)**.
- L'appareillage utilisé dans cette étude est cité en annexe (**annexe I**).

II.2. Méthodes :

II.2.1. Analyse physico-chimique des margines brutes :

La caractérisation physico-chimique est basée sur l'étude des paramètres suivants : acidité (pH), conductivité, matières en suspension (MES), matières sèches (MS), matière volatile sèche (MVS), cendres, demande chimique en oxygène (DCO), demande biologique en oxygène (DBO), nitrates, nitrites, azote ammoniacal, chlorures, orthophosphates, phénols, polyphénols, sucres totaux et les protéines.

II.2.1.1. Mesure des paramètres globaux :

II.2.1.1.1. L'acidité et La conductivité :

Le pH des échantillons a été mesuré sous agitation magnétique à l'aide d'un pH mètre de marque HANNA, modèle pH 211, calibré avec deux solutions tampon de pH 4 et 7 selon la norme **NF T90-008 (AFNOR, 2001)**. La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de marque HANNA, modèle H18733. Une mesure intégrée de la température permet une compensation automatique de la valeur de la conductivité en fonction de la température de la solution (température de référence : 25°C).

II.2.1.1.2. Les matières en suspension (MES) à 105 °C, méthode par centrifugation (norme NFT 90 – 105 02 1997) :

Les MES sont déterminées par centrifugation. Le culot obtenu est mis dans une capsule préalablement pesée puis séchée à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. La différence entre le poids de l'échantillon séché et celui de la capsule détermine le taux de MES. Il est exprimé en g/l.

II.2.1.1.3. Les matières sèches (MS) (norme NFT 90 – 029 06 1970) :

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques en solution ou en suspension, contenues dans les margines. La MS est déterminée par évaporation d'un échantillon mis dans une capsule, préalablement séchée et tarée, à 105°C pendant une nuit. La teneur en matière sèche, exprimée en g/l, est donnée par la formule suivante :

$$MS = \frac{m_1 - m_0}{V} 1000$$

MS : matière sèche en g/l.

m₁ : masse de la capsule avec margines séchées à 105°C en g.

m₀ : masse de la capsule vide en g.

V : volume de la prise d'essai en ml.

II.2.1.1.4. Taux de cendres (norme NFT 90 – 029 06 1970) :

La matière sèche obtenue est calcinée à 550°C dans un four à moufle pendant 24 heures. La teneur en cendres est exprimée en g/l est donnée par la formule suivante :

$$C = \frac{m_2 - m_0}{V} 1000$$

C : teneur en cendres en g/l.

M₂ : masse de la matière sèche calcinée en g.

m₀ : masse de la capsule vide en g.

V : volume de la prise d'essai en ml.

II.2.1.1.5. Les matières volatiles sèches (MVS) :

La matière volatile est déterminée en faisant la différence entre la matière sèche obtenue par évaporation à 105°C et les résidus de cendres issues de la calcination à 550°C pendant 2 heures. Elle est exprimée en g/l.

II.2.1.2. Dosage des Chlorures par méthode de Mohr (AFNOR T90-014) :

Les chlorures sont dosés selon la norme (NF T 90-014). Les chlorures sont dosés par les nitrates d'argent en présence de chromate de potassium comme indicateur.

La teneur en chlorure est déterminée en milligramme d'ion Cl⁻ suivant la formule suivante :

$$[(v-b)*1000] / (V*k)$$

v : volume de la solution de nitrate d'argent utilisé (ml).

b : volume de la solution de nitrate d'argent consommée par l'essai à blanc (ml).

V : volume de la prise d'essai (10ml).

k : facteur dépendant de la dilution.

II.2.1.3. Dosage des Orthophosphates par méthode spectrophotométrie (Norme NF EN 1189) :

Les ions orthophosphates en solution acide (H₂SO₄) et en présence d'ions molybdate et d'antimoine forment un complexe d'antimonyl-phosphomolybdate qui, après réduction par l'acide ascorbique, donne un complexe de molybdène fortement coloré en bleu. Le développement de la coloration est accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double de potassium et d'antimoine.

La mesure de l'absorbance de ce complexe se fait à 880nm et permet de déterminer la concentration en orthophosphates de l'échantillon par rapport à une gamme étalon.

II.2.1.4. Dosage des sucres totaux :

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de **Dubois et al., (1956)** dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque, à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthylfurfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

II.2.1.5. Dosage des Protéines :

Bradford et al (1976) ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. C'est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines) et très rapide. Elle est assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes.

La mesure de l'absorbance de ce complexe se fait à 595nm et permet de déterminer la concentration en protéine de l'échantillon par rapport à une gamme étalon.

II.2.1.6. Dosage des composés phénoliques :

II.2.1.6.1. Dosage des phénols :

Il s'agit de la condensation en milieu basique de l'ion phénate sur le 4-amino antipyrine en présence d'un oxydant, l'hexacyanoferrate(III) de potassium (ferricyanure de potassium) pour former un complexe coloré. L'absorbance est mesurée à 505 nm et comparée à une courbe d'étalonnage obtenue avec le phénol (C₆H₅OH) (**Iboukhloufa-Bekada, 2014 ; Aggoun-Arhab, 2016**).

II.2.1.6.2. Dosage des polyphénols :

La teneur en composés phénoliques des margines brutes a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon Singleton et Rossi (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'adsorption à 760nm (**Iboukhloufa-Bekada, 2014 ; Aggoun-Arhab, 2016**).

II.2.1.7. Dosage des paramètres globaux liés à la pollution organique :**II.2.1.7.1. La demande chimique en oxygène (DCO) (MA. 315-DCO 1.0) :**

La demande chimique en oxygène (DCO) est la mesure de la quantité d'oxygène requise pour oxyder la matière organique et inorganique oxydable contenue dans un échantillon. La matière oxydable contenue dans un échantillon est oxydée par chauffage à reflux en milieu fortement acide avec une quantité connue de bichromate de potassium dans une éprouvette fermée. La consommation d'oxygène par l'échantillon provoque un changement de couleur dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit et se mesure en équivalent d'oxygène (C.E.A.E.Q, 2006).

II.2.1.7.2. La demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

La DBO₅ correspond à la masse d'oxygène moléculaire (exprimée en mg) utilisé par les microorganismes pour dégrader en cinq jours à 20°C et à l'obscurité les matières oxydables contenues dans un litre d'échantillon.

La mesure de la DBO₅ avec OxiTop® repose sur une mesure de la pression dans un système clos. C'est un système électronique à manomètre intégré qui se visse directement sur le flacon à DBO. Une lecture numérique remplace la lecture sur le manomètre à mercure. Les postes (flacons + tête) sont associés à un agitateur à induction, le tout devant être placé dans une enceinte à 20°C.

Les micro-organismes qui se trouvent dans l'échantillon consomment l'oxygène en formant du CO₂. Celui-ci est absorbé avec NaOH. Il s'ensuit une dépression dont la mesure peut être lue directement dans la DBO en mg/l.

II.2.1.8. Dosage des paramètres liés à la pollution azotée :**II.2.1.8.1. Dosage des nitrites (NO₂⁻) :**

Le dosage des nitrites est suivie par complexométrie et selon la norme (NF T90-013), elle se base sur la réaction de diazotation de la sulfanilamide par les nitrites, en présence de dichlorure N-(1-naphtyl)-éthylène-diamine, en vue de la formation d'un complexe coloré rose dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde voisine de 537 nm.

II.2.1.8.2. Dosage des nitrates (NO₃⁻) :

La Norme NF T 90 012 a servi comme méthode de dosage des nitrates. Elle se base sur la réaction des nitrates avec l'acide sulfosalicylique (formé par addition à l'échantillon, de salicylate de sodium et d'acide sulfurique), le dérivé obtenu donne, en présence d'ammoniaque,

une coloration jaune stable qui peut être suivie spectrophotométrique à une longueur d'onde voisine de 415nm.

II.2.1.8.3. Dosage de l'azote ammoniacal (NH_4^+) (méthode spectrophotométrie au réactif de Nessler) :

Cette méthode est applicable pour des teneurs en azote ammoniacal supérieures à 0.1mg.L⁻¹. En présence d'hydroxyde de potassium ou de sodium, il se produit une réaction entre les ions NH_4^+ et le réactif de Nessler, avec formation d'un composé de coloration variant du rouge au brun. L'ajout de tartrate double de sodium et de potassium a pour rôle principal d'éviter la formation d'un trouble dû à l'interférence du calcium et du magnésium éventuellement présents dans l'eau. Les échantillons ont été dilués par un facteur de 100 ou 1000 pour porter les concentrations analytiques dans la marge du spectrophotomètre. Les mesures spectrophotométriques ont été faites à une longueur d'onde de 420 nm.

II.2.2. Production de biosurfactant :

Notre étude se divise en deux parties, la première partie porte sur la production de biosurfactant en présence du gasoil. Tandis que la deuxième partie porte sur la valorisation d'un rejet agroalimentaire comme substrat pour la production de biosurfactant.

II.2.2.1. Production de biosurfactant en présence du gasoil :

Pour cette partie, les deux souches bactériennes, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas luteola*, ont été cultivées en présence et en absence d'oxygène.

- **Conduite de la culture :**

- a. Préparation de l'inoculum :**

Les deux souches bactériennes, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas luteola*, ont été cultivées séparément sur le milieu de fermentation M1 modifié. 28 ml de ce milieu est inoculé par une culture bactérienne âgée de 24 heures, préalablement cultivée sur gélose nutritive solide, dans un erlenmeyer de 100 ml. Le gasoil (préalablement stérilisé par des filtres millipores 0.45 μm de diamètre) est additionné au milieu à raison de 2%. L'erlenmeyer inoculé est incubé pendant 24 heures à 30°C, sous agitation à 110 rpm. L'aération est assurée par agitation magnétique.

- b. Fermentation en erlenmeyers :**

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 700 ml de milieu de culture additionné de 2% du gasoil stérile et des précultures précédentes. L'incubation est réalisée à 30°C pendant six jours à 110 rpm. Les fermentations sont réalisées en duplicata avec et sans aération.

Les prélèvements sont effectués toutes les 2 heures afin d'évaluer la croissance et le métabolisme bactérien.

II.2.2.2. Production de biosurfactant en présence d'un rejet agroalimentaire « margine » :

Dans cette partie, nous allons procéder à une optimisation de la concentration optimale en margine afin d'aboutir à une production maximale de biosurfactant. Pour la suite de notre étude, nous avons opté pour la souche *Pseudomonas luteola*.

- **Conduite de la culture :**

- a. Préparation des margines :**

Avant chaque fermentation, les margines sont stérilisés par la tyndallisation et le pH est ajusté.

- b. Préparation de l'inoculum :**

Pseudomonas luteola a été cultivée sur le milieu enrichi en margine, 28 ml de ce milieu est inoculé par une culture bactérienne âgée de 24 heures, préalablement cultivée sur gélose nutritive solide, dans un erlenmeyer de 100 ml.

Les margines stériles sont additionnés aux milieux à différentes concentrations « 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% et 8% » pour étudier l'effet de la concentration des margines sur la production de biosurfactant. Le milieu ainsi inoculé est incubé pendant 24 heures à 30°C, sous agitation à 110 rpm.

- c. Fermentation en erlenmeyers :**

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 1000 ml contenant 700 ml de milieu de culture enrichi avec différentes concentrations en margines stériles et de préculture. L'incubation est réalisée à 30°C pendant six jours à 110 rpm. L'aération est assurée par les pompes aquariums.

- **Suivi de la fermentation :**

- a. Mesure de la croissance :**

L'étude de la croissance des souches bactériennes a été réalisée dans le but d'évaluer la production de biosurfactant au cours de la phase de croissance. Dans notre étude, la croissance a été suivie par turbidimétrie en mesurant la densité optique de la culture bactérienne (DO) à 600 nm par spectrophotomètre.

- b. Test d'indice d'émulsion (E24) :**

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brute) dans une phase hydrophile (le mout de fermentation). Le test consiste à ajouter 2 ml de gasoil à 2 ml de mout de fermentation. Le tout est agité à la vitesse maximale du vortex pendant 2 minutes. Les mesures sont prises 24 heures après agitation (**Cooper et al., 1987**). L'indice d'émulsion représente la hauteur de l'émulsion formé (**He**) sur la hauteur totale du liquide dans le tube (**Ht**) multiplié par 100.

$$E24 = \frac{He}{Ht} 100$$

Ce test a été réalisé au cours de la fermentation pour mettre en évidence la production de biosurfactant. Il a été mesuré pour chaque prélèvement.

c. La mesure de la tension superficielle :

Elle a été déterminée à l'aide d'un tensiomètre (Gibertini TSD Digital Tensiometer) et exprimée en Dyne/cm. La méthode consiste à prélever un échantillon de 20 ml de culture toutes les 2 heures. Après centrifugation de prélèvement à 10000 tours/min pendant 30 minutes à 4°C et filtration sur filtre, on mesure la tension superficielle du surnageant.

d. Détermination du pH :

Le pH du milieu de culture au cours de la croissance a été mesuré sur une partie aliquote prélevée à l'aide d'un pH-mètre (HANNA pH211).

e. Paramètre de la croissance :

Les paramètres de la croissance sont calculés selon la méthodes utilisée par **Liwarska-Bizukoje et al., (2001)**. Le taux de croissance des microorganismes est calculé à partir de la relation suivante :

$$X = X_0 e^{\mu t}$$



Chapitre 3 : Résultats et discussions



III.1. Production de biosurfactant :

Les biomolécules produites dans cette étude, ce sont des biosurfactants, ils ont été produits par *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas luteola* cultivées sur deux substrats différents. Un des substrats est un rejet agroalimentaire utilisé comme un inducteur de production de biosurfactant autre que le gasoil.

III.1.1. Production de biosurfactant en présence de gasoil :

D'après la bibliographie, la présence d'hydrocarbure stimule la production des biosurfactants. C'est pour cette raison que nous avons utilisé le milieu de culture préconisé par **Zajic et al (1997)** pour les deux souches *P. putida* et *P. luteola*. Dans un premier temps, nous allons étudier l'effet de l'aération sur la production de biosurfactant.

III.1.1.1. Production de biosurfactant en absence d'oxygène :

III.1.1.1.1. Cinétique de la croissance bactérienne :

La croissance bactérienne a été déterminée en suivant la densité optique (DO) à 600 nm. Les résultats sont représentés par la figure 9.

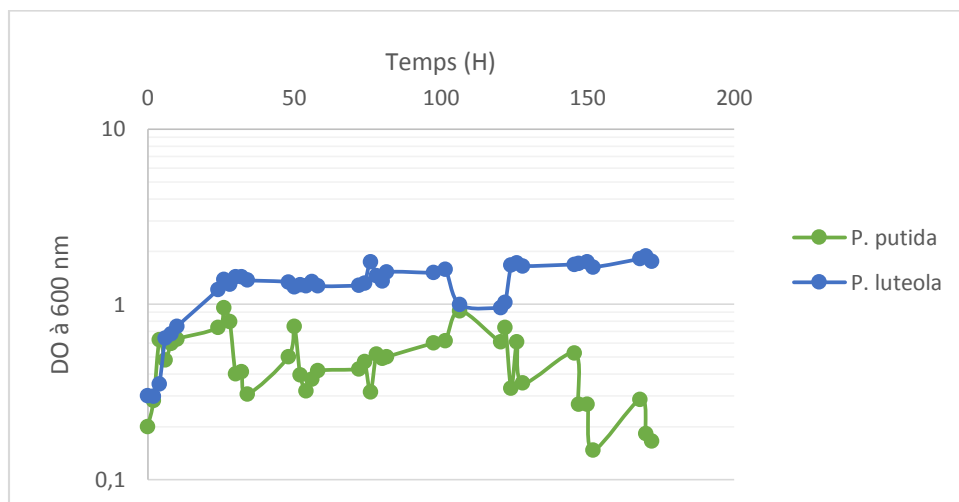


Figure 9 : Cinétique de croissance *P. putida* et *P. luteola* sur milieu M1 modifié.

D'après l'allure des courbes, on constate que selon la souche étudiée on a deux types de cinétiques de croissance.

P. luteola cultivée sur milieu M1 modifié à base de jus de dattes et du gasoil présente une courbe de croissance biphasique. Après une première phase de croissance exponentielle suivie par une longue phase stationnaire, une phase de déclin a été enregistrée. La croissance s'arrête puis redémarre à nouveau de façon exponentielle ceci après avoir épuisé les sucres du jus de dattes, le gasoil peut être utilisé comme une seconde source de carbone d'où l'apparition d'une seconde phase d'adaptation (phase de latence). Le phénomène de cométabolisme se confirme.

En revanche, pour *P.putida* on observe plusieurs phases de croissance avec une allure irrégulière et mal définie. Cette allure peut être expliquée soit par le fait que *P.putida* est une bactérie aérobique stricte (cultivée en absence d'oxygène) soit par la présence de plusieurs sources de carbone.

D'après cela, on peut dire que les *Pseudomonas* étudiés dans notre cas peuvent dégrader le gasoil et l'utiliser comme source de carbone. Ce pouvoir d'utilisation du gasoil peut être expliqué par la présence de substances comme les biosurfactants qui facilitent l'assimilation des hydrocarbures (gasoil dans notre cas).

Tahzibi et al., (2004) ont montré que l'espèce *Pseudomonas* est bien connue pour sa capacité à produire des biosurfactants rhamnolipidiques avec des propriétés potentiellement actives en surface lorsqu'elles sont cultivées sur différents substrats de carbone.

Rashedi et al., (2006) trouvent que les rhamnolipides ont été produits lorsque les hydrocarbures, le glycérol, le glucose et la peptone ont été utilisés comme substrat par les *Pseudomonas*. Les meilleurs taux de productions ont été obtenus avec les hydrocarbures ou le glycérol.

Au cours de la croissance des *Pseudomonas*, nous avons constaté une acidification du milieu de culture. Cette baisse de pH (**voir figure 10**) peut être attribué soit à la fermentation des sucres du jus de dattes en absence d'oxygène soit à la présence des acides gras métabolites intermédiaire de la biodégradation du gasoil.

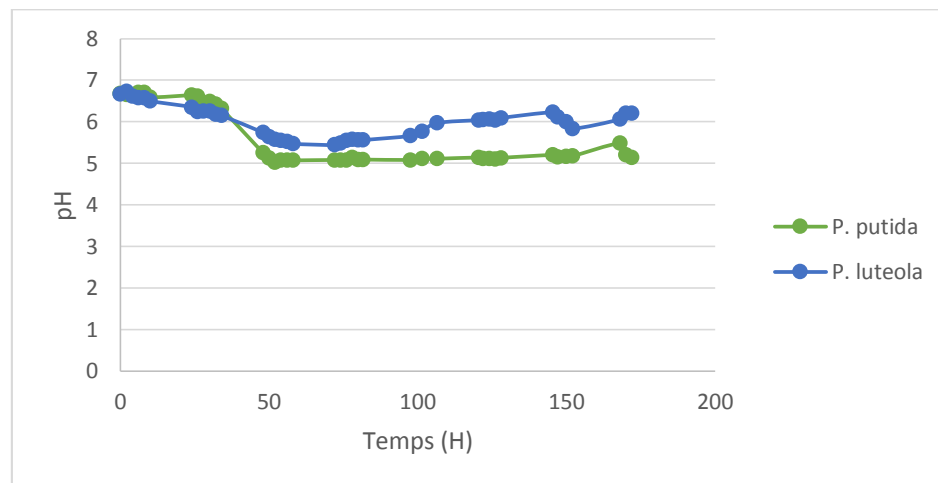


Figure 10 : Evolution du pH au cours de la fermentation.

III.1.1.1.2. Indice d'émulsification :

Afin de confirmer et d'estimer la production des biosurfactants par les souches *P.putida* et *P.luteola*, nous avons réalisé le test d'émulsification E24. Les résultats obtenus sont représentés par la **figure11**, d'après les histogrammes, la production des biosurfactants n'est décelée qu'à la fin de la fermentation, ce qui correspond à la phase stationnaire pour *P.luteola* et à la phase de déclin pour *P. putida*.

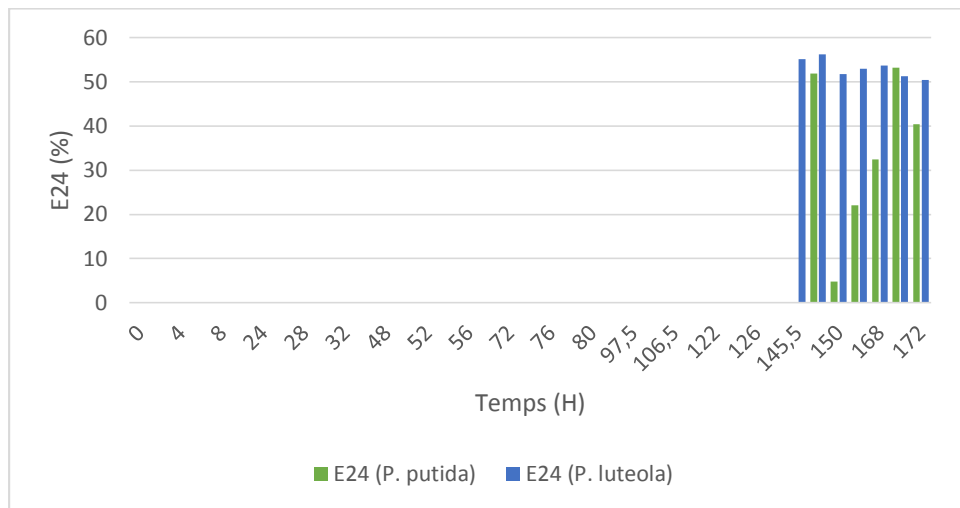


Figure 11 : Représentation du taux d'émulsification (E24) des biosurfactants produits par *P.putida* et *P.luteola* sur milieu M1 modifié.

Sheppard et Cooper (1990) ont conclu que le transfert d'oxygène était l'un des principaux paramètres pour l'optimisation de la production de surfactine par *Bacillus subtilis*.

Adamczak et Bednarski (2000) ont observé que la meilleure valeur de production du biosurfactant (45,5 g / l) a été obtenue lorsque le débit d'air était de 1vvm et que la concentration en oxygène dissous était maintenue à 50% de saturation.

III.1.1.1.3. Suivi de la tension superficielle :

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles. Les résultats de la tension superficielle sont illustrés dans la **figure 12**.

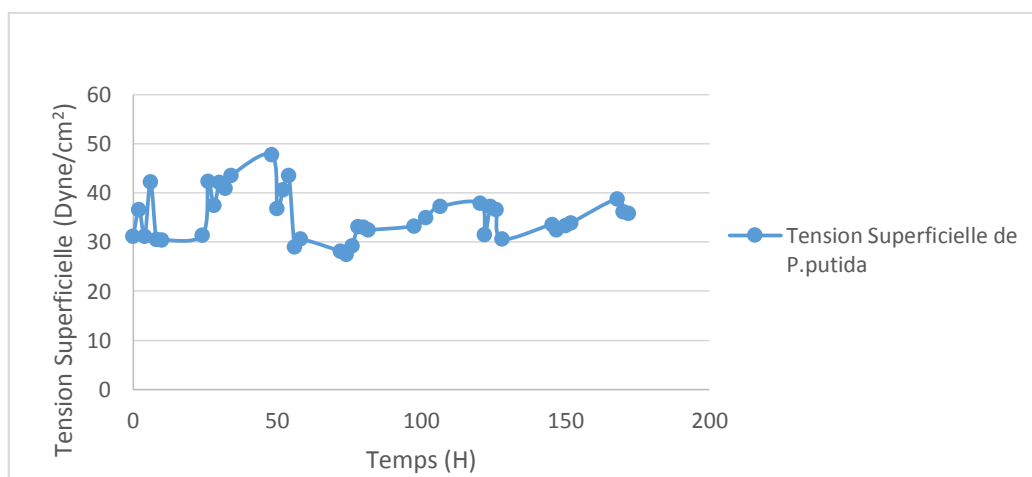


Figure 12 a : Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation des deux souches *P.putida*.

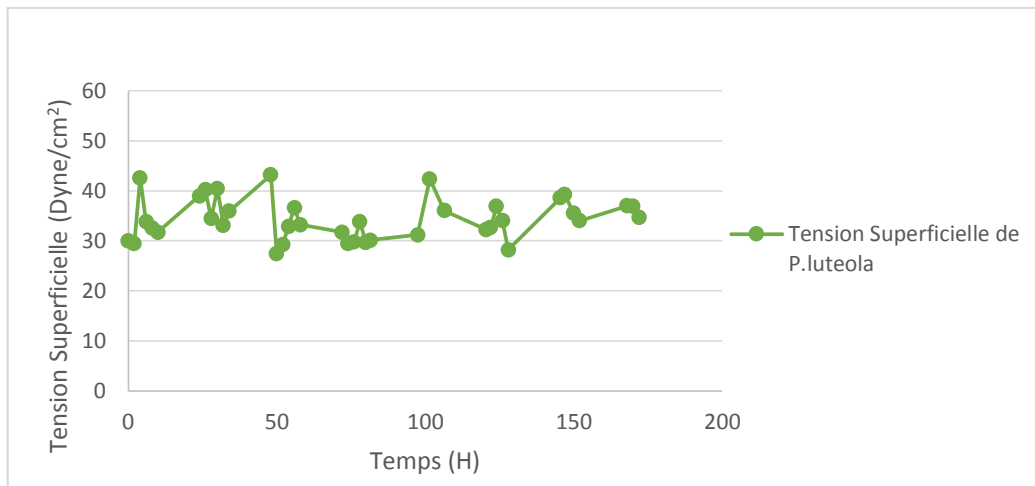


Figure 12 b : Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation des deux souches *P.luteola* sur milieu M1 modifié.

Selon la **figure12**, nous remarquons des fluctuations pour les valeurs mesurées mais elles restent plus au moins stable dans un intervalle qui varie entre 45 et 30 Dyne/cm. Cependant, nous tenons à signaler qu'une baisse de la tension superficielle a été enregistrée au cours de la fermentation atteignant des valeurs de 27.5 Dyne/cm pour *P.putida* et 27.4 Dyne/cm pour *P.luteola*. Ces résultats nous permettent de dire qu'il y a eu une production des biomolécules ayant des propriétés tensio-actives comme les biosurfactants (entraînant l'abaissement de la tension superficielle).

III.1.1.2. Production de biosurfactant en présence d'oxygène :

III.1.1.2.1. Cinétique de croissance bactérienne des souches *P. putida* et *P. luteola* :

La croissance bactérienne a été déterminée en suivant la densité optique (DO) à 600 nm. Les résultats de cette étude sont représentés dans la **figure13** et ils révèlent que l'allure des courbes correspond aux courbes de croissance bactérienne avec une seule phase exponentielle pour les deux souches.

Pour *P.luteola*, l'allure obtenue est différente de celle obtenue en absence d'oxygène puisque le phénomène de cométabolisme ne s'observe pas dans ce cas. Le pH révèle une augmentation à la fin de la fermentation (**figure14**), ce qui revient peut être à la présence de biomolécule modifiant ce paramètre.

Concernant *P. putida*, la courbe de croissance montre un phénomène de diauxie. Cette courbe est différente à celle obtenue en absence d'oxygène. Dans ce cas, nous constatons qu'il y a eu deux phases de croissance. Une acidification du milieu a été enregistrée lors de la fermentation.

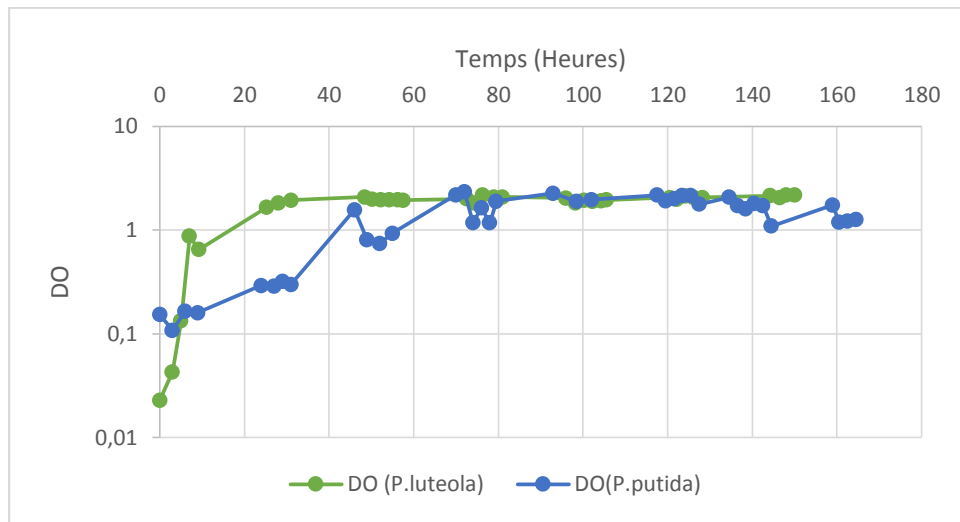


Figure 13 : Cinétique de croissance des *P. putida* et *P. luteola* au cours de la fermentation en présence d'aération.

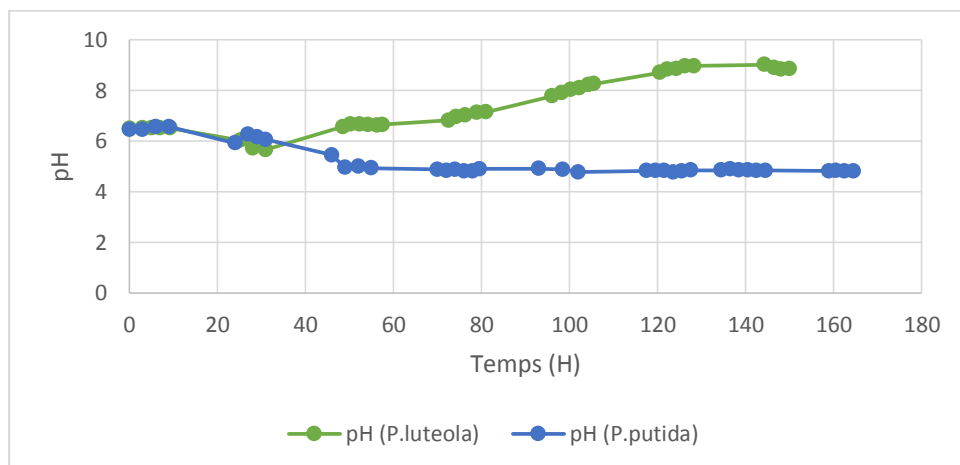


Figure 14 : Evolution du pH au cours de la fermentation en présence d'aération des *P. putida* et *P. luteola*.

III.1.1.2.2. Indice d'émulsification :

Les résultats du test d'émulsification sont représentés par la **figure15**.

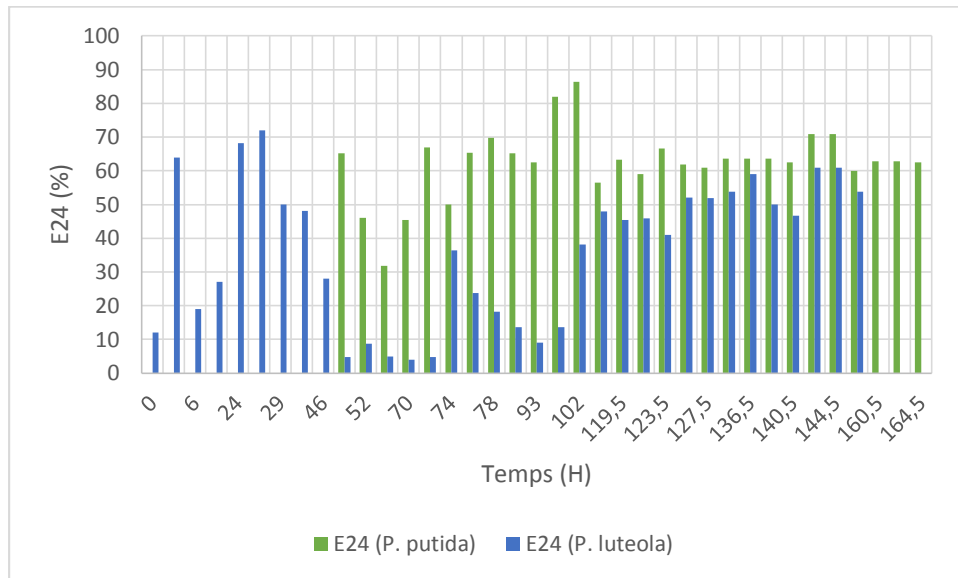


Figure 15 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par les deux souches *P.putida* et *P.luteola* sur milieu M1 modifié.

Le résultat obtenu révèle une très grande production de biosurfactants pour les deux espèces, en comparaison avec le 1^{er} essai.

On voit que la souche *P.luteola* a produit des biosurfactants au cours de la phase exponentielle avec un taux maximal de 72% au bout de 27 heures de fermentation. Une seconde phase de production de biosurfactant a été enregistrée et ceci après 102 heures de fermentation. Au cours de cette deuxième phase, on note que la production est très stable et constante avec un taux d'émulsification aux alentours de 60%.

Ce résultat concorde avec les résultats trouvés par **Atanasković et al, (2016)** quand *P.luteola* a été cultivée sur du pétrole brut léger et lourd, ils montrent que la production de biosurfactants a été la plus intense pendant la phase exponentielle et se poursuit jusqu'à la phase stationnaire. Les rhamnolipides ont également provoqué des changements dans la cinétique de croissance de *P. luteola*.

Tandis qu'avec *P.putida*, la production a commencé après 49 H de fermentation, au cours de la phase stationnaire avec un taux maximal de 86,36%.

Ce résultat concorde avec les travaux de **Tuleva et al, (2002)** où ils ont démontré que la production de glycolipides par *P. putida* est maximale durant la phase stationnaire, étant donné que le biosurfactant est un métabolite secondaire.

D'après ces résultats, on conclut que la présence d'oxygène est primordiale pour une production maximale de biosurfactant.

Ghribi et al, (2011) ont démontré, en utilisant un fermenteur automatisé de 2,6 L, que l'aération du milieu a fortement influencé la synthèse des biosurfactants *Bacillus subtilis*.

III.1.1.2.3. Suivi de la tension superficielle au cours de la fermentation :

Selon les courbes obtenues (voir **figure16**), on remarque, comme précédemment, des fluctuations dans les valeurs de la tension superficielle mesurées. Cependant, les plus basses valeurs obtenues pour les souches *P.putida* et *P.luteola* sont respectivement 32.6 Dyne/cm et 25 Dyne/cm. Ce résultat est tout à fait différent du précédent mais il nous permet de dire qu'il y a eu production des biomolécules ayant des propriétés tensio-actives comme les biosurfactants qui provoquent l'abaissement de la tension superficielle.

Plusieurs auteurs mentionnent que la tension superficielle est un facteur déterminant de la présence des biomolécules tensio-actifs et cela en signalons une diminution de ce paramètre durant la fermentation. Cependant, ce n'est pas le cas dans notre étude et c'est reproductible durant tout notre travail. Cela nous permet de dire que ce paramètre n'est pas vraiment concluant.

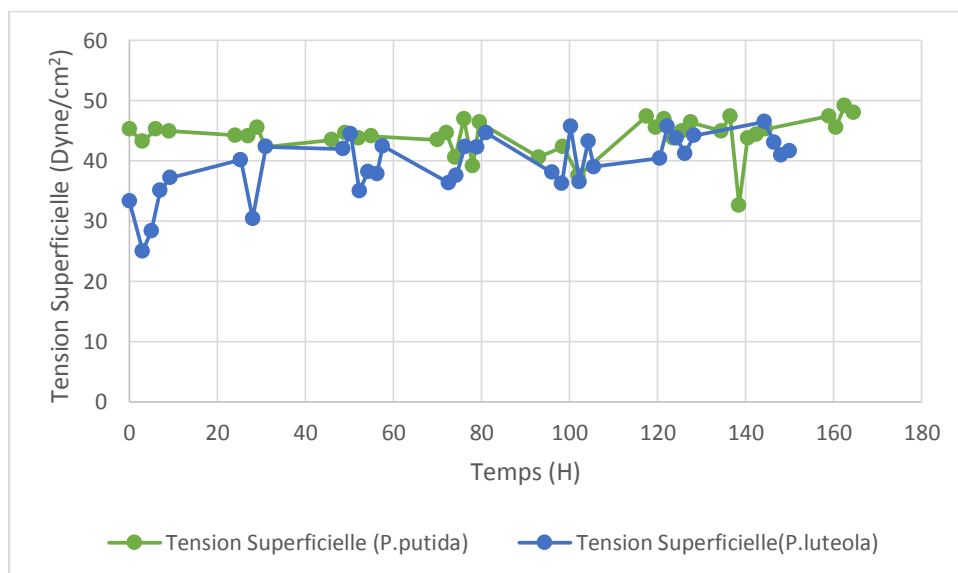


Figure 16 : Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation des deux souches *P.putida* et *P.luteola*.

En comparant les résultats trouvés pour les deux espèces, on peut dire, qu'en présence d'oxygène, *P.luteola* croît rapidement sur le milieu M1 modifié avec un taux de croissance $\mu_{\max} = 0.1061 \text{ heures}^{-1}$ par rapport au *P.putida*. Cependant, la production est beaucoup plus importante avec *P.putida* (voir **tableau2**).

Tableau2 : Paramètres de croissance et de production pour *P.putida* et *P.luteola* au cours de la fermentation en présence d'oxygène.

La souche bactérienne	E24 %	μ_{\max} (H ⁻¹)	Equation	R ²
<i>P. putida</i>	86.36	0,0573	$X = X_0 e^{0.0573t}$	0,9977
<i>P. luteola</i>	72	0,1061	$X = X_0 e^{0.1601t}$	0,9492

III.1.2. Valorisation d'un rejet agroalimentaire « Margines » :

III.1.2.1. Caractérisation chimique des margines :

Les résultats des analyse physico-chimiques des margines sont représentés dans le **tableau 3**.

La mesure du pH montre que les margines sont des effluents acides, en raison de la présence des acides organiques et cela concorde avec les résultats trouvés dans la littérature (**Hamdi et al, 1991**).

La teneur moyenne en matières organiques exprimée en DCO et DBO₅ est de l'ordre de 192.33 g d'O₂/l et 16.8 g d'O₂/l respectivement. Cette teneur est très élevée par rapport à la norme. Le rapport DCO/DBO₅ est de 0.088 ce qui montre le caractère non biodégradable de notre effluent.

Ces résultats montrent que notre effluent a une faible teneur en protéine et en sucres totaux. Par contre, il est très riche en composés azotés (nitrates, nitrites et azote ammoniacal), en orthophosphate et en chlorure.

Ce rejet est aussi caractérisé par la prédominance de substances toxiques, les composés phénoliques (6.52 mg/l du phénol et 8605.8 mg/l des polyphénols). Cette concentration pourrait limiter toute biodégradation naturelle et par conséquent pourrait entraîner une perturbation plus ou moins profonde de l'écosystème.

Tableau 3 : Résultats des analyses physico-chimiques des margines :

Paramètres	Valeurs
pH	4.45
conductivité	11.05 ms/cm
Densité	1.12
Nitrates	805.9 mg/l
Nitrites	72.2 mg/l
Azote ammoniacal	4482 mg/l
Chlorures	7.0 mg/l
Orthophosphates	459.9 mg/l
Phénols	6.52 mg/l
Polyphénols	8605.8mg/l
Protéines	280.9 mg/l
Sucres totaux	122.16 mg/l
DCO	192 333.33 mg/l
DBO ₅	16 829.17 mg/l
DBO ₅ /DCO	0.088
MES	2355.5 mg/l
MS	78435 mg/l
Cendres	287,6 mg/l
MVS	78147,4 mg/l

III.1.2.2. Production de biosurfactants en présence des margines :

L'objectif de ce travail est d'étudier l'efficacité de l'utilisation d'un déchet agroalimentaire de bon marché, à savoir les margines pour la production de bio-tensioactif par *P.luteola*.

Ainsi, nous avons optimisé la meilleure concentration de margines qui va induire le meilleur taux de production de biosurfactants. Pour ce faire, on a réalisé des fermentations additionnées de différentes concentrations de margines comme suit : 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% et 8%.

III.1.2.2.1. Production des biosurfactants pour une concentration de 0.5% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

Les résultats de cette étude sont représentés par la **figure17**.

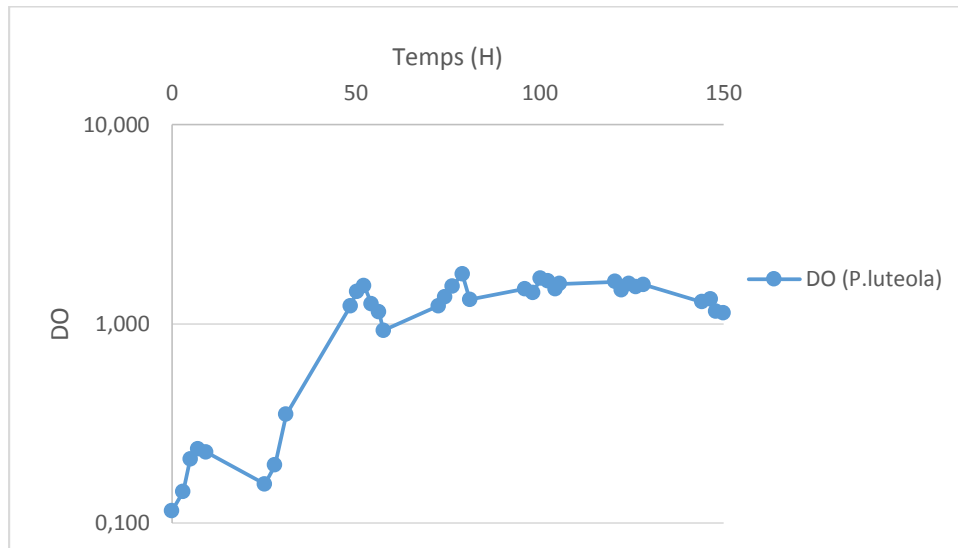


Figure 17 : Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu M1 modifié additionné de 0.5% de margine.

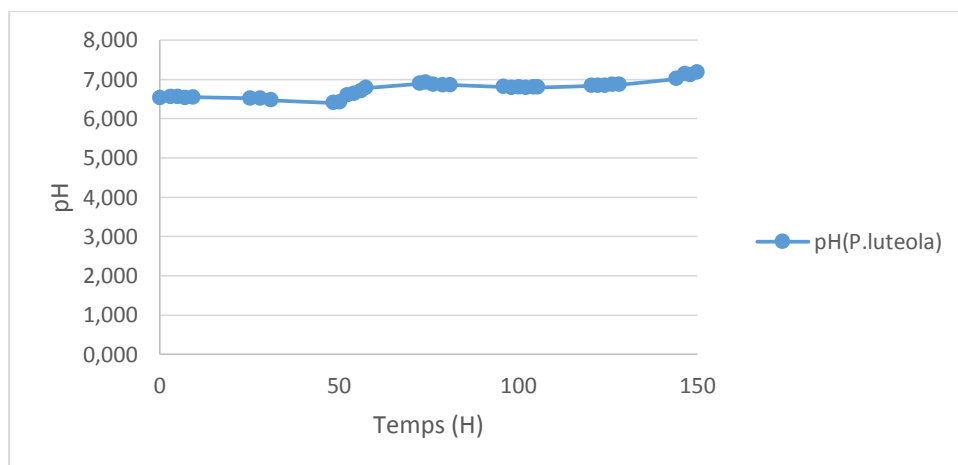


Figure 18 : Evolution du pH du *P. luteola* lors de la fermentation sur milieu M1 modifié enrichi avec 0.5% de margine.

L'allure de la courbe montre une courbe de croissance biphasique (**figure17**). Le phénomène de diauxie se confirme par la présence de deux phases exponentielles successive l'une après l'autre. La première est probablement due à l'utilisation des sucres contenu dans le jus de datte et la deuxième représente la dégradation des margines, le taux de croissance maximal dans cette phase est de $0,0842 \text{ H}^{-1}$. Le pH du milieu est légèrement acide et quasiment stable toute au long de la fermentation selon la **figure18**.

b. Indice d'émulsification :

Les taux d'émulsification au cours de la croissance de *P.luteola* sont mentionnés dans la **figure19**.

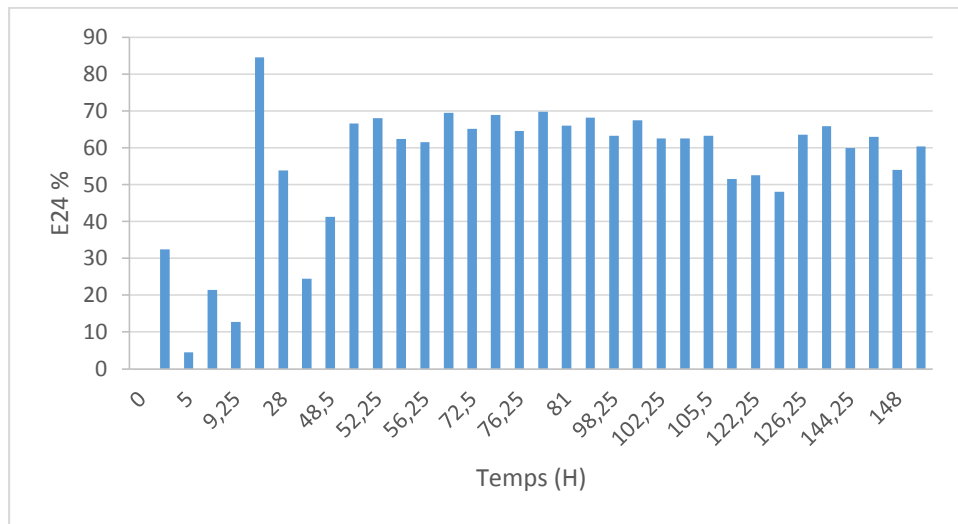


Figure 19 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par la souche *P.luteola* sur milieu M1 modifié et enrichi avec 0.5% de margines.

La production de biosurfactant par la souche *P.luteola* est intense au cours de la phase stationnaire à la fin de la fermentation, avec un taux d'émulsification de 70% pour une concentration de 0.5% de margine. Ce résultat confirme que le biosurfactant est un métabolite secondaire. Toutefois, il faut signaler que le taux maximal de production a été atteint au cours de la phase de latence de la deuxième phase exponentielle et qui est de 84,48 %.

III.1.2.2.2. Production des biosurfactants pour une concentration de 1% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

D'après la **figure 20**, on observe une seule phase exponentielle avec un taux de croissance maximal de $0,0507 \text{ H}^{-1}$ suivie par une longue phase stationnaire. Contrairement, à la fermentation réalisée sur un milieu enrichi avec 0.5% de margine où une courbe de croissance biphasique a été constatée. Pour le pH, une diminution a été enregistrée au début de la fermentation suivie par une augmentation du pH jusqu'à atteindre la neutralité (**figure21**).

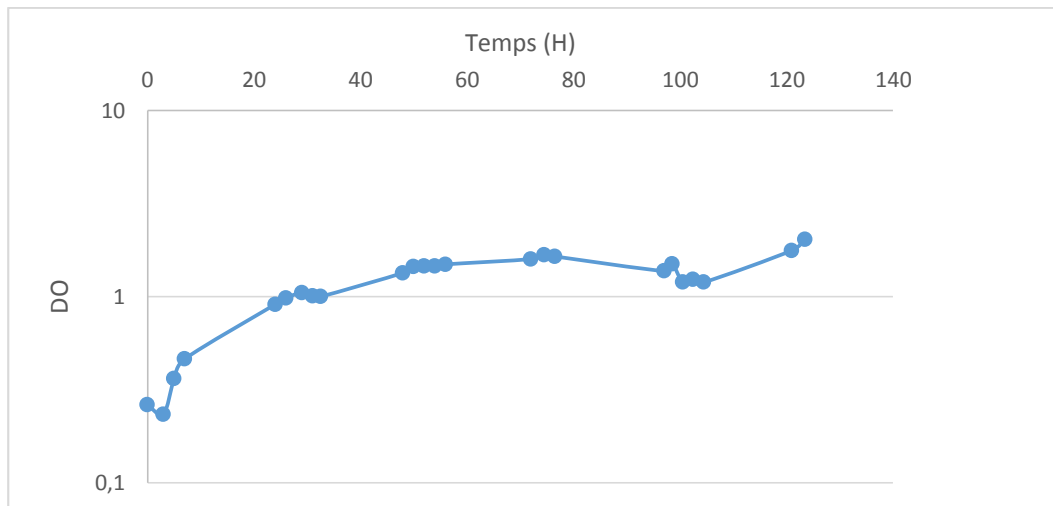


Figure20 : Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu enrichi avec 1% de margine.

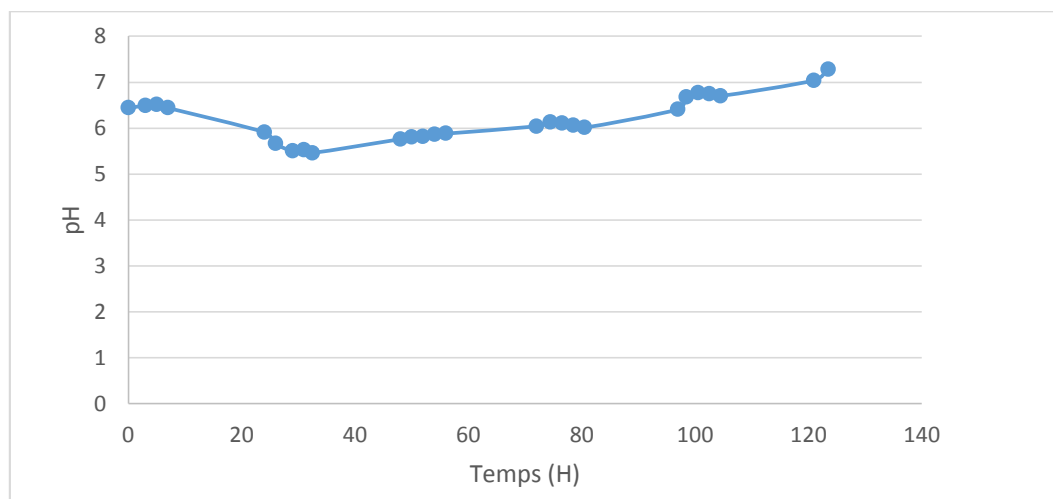


Figure21 : Evolution du pH lors de la fermentation sur milieu M1enrichi avec 1% de margine.

b. Indice d'émulsification :

Les résultats trouvés sont présentés dans la figure suivante :

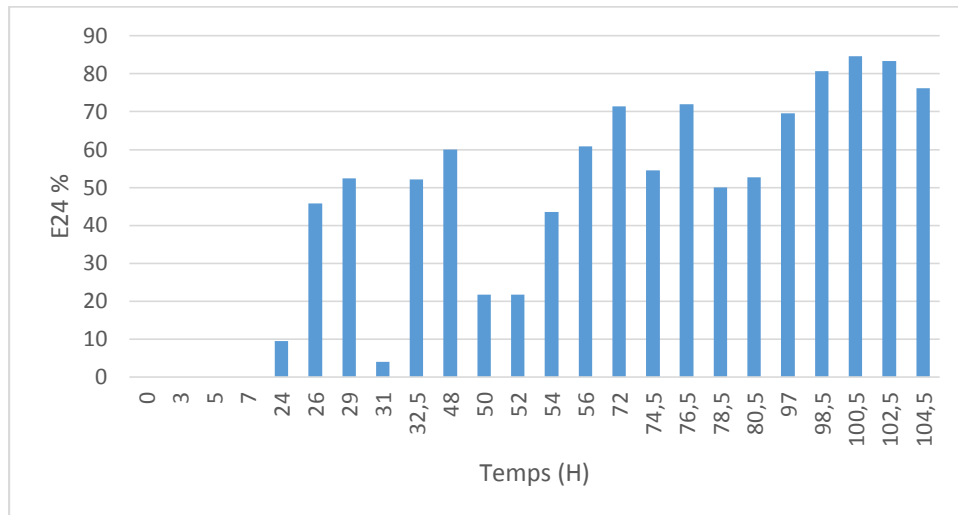


Figure 22 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par la souche *P.luteola* sur milieu M1 enrichi avec 1% de margine.

La production de biosurfactant par la souche *P.luteola* avec 1% de margine, se manifeste au cours de la phase stationnaire. Cela confirme encore une fois que cette biomolécule est un métabolite secondaire. Le taux maximal de production est de 84,61 % a été noté à la fin de la fermentation.

III.1.2.2.3. Production des biosurfactants pour une concentration de 2% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

La courbe de croissance observée lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 2% de margine est similaire à celle obtenu sur un milieu enrichi avec 1% de margine. Une seule phase exponentielle a été enregistrée (voir **figure 23**). La seule différence est que la vitesse de croissance est très faible par rapport à celle calculé au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 1% de margine. Elle est de l'ordre de **0,0421 H⁻¹**. Une acidification du milieu a été constatée après 30 heures de fermentation (**figure 24**).

a. Indice d'émulsification :

Avec 2% de margines, la production de biosurfactant par *P.luteola* est détecté au cours de la phase exponentielle. Elle est stable et constante durant la phase stationnaire avec un taux d'émulsification de 61,9 %. Encore une fois, le constat que le biosurfactant synthétisé est un métabolite secondaire se confirme.

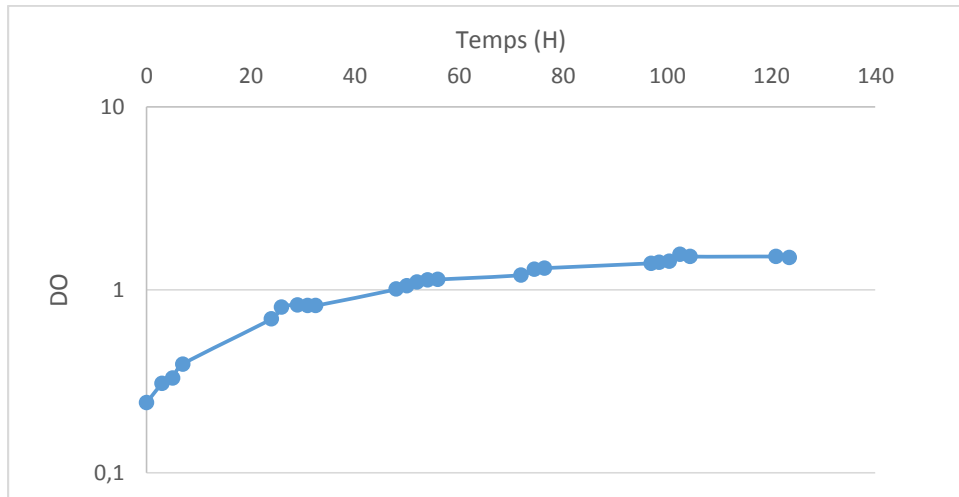


Figure 23 : Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu enrichi avec 2% de margine.

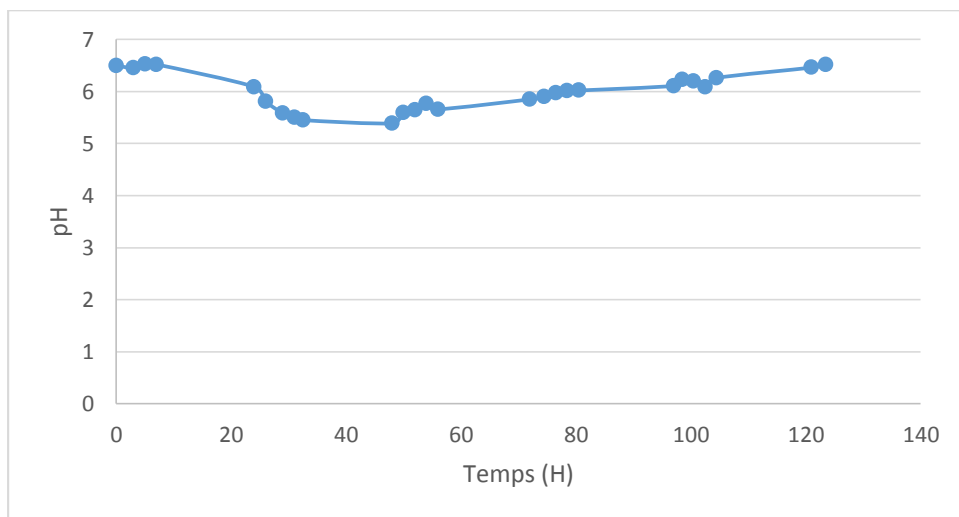


Figure 24 : Evolution du pH lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 2% de margine.

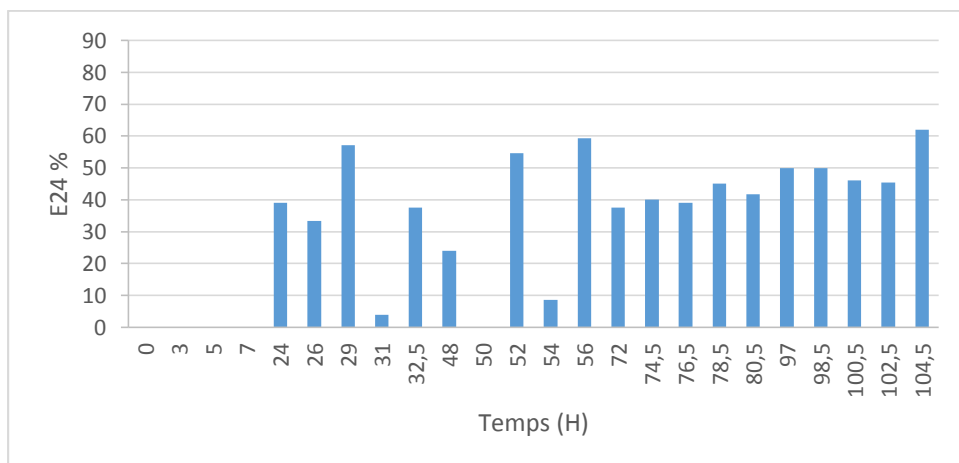


Figure 25 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par la souche *P.luteola* sur milieu M1enrichi avec 2% de margine.

III.1.2.2.4. Production des biosurfactants pour une concentration de 3% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

Les résultats de la croissance sur milieu M1 enrichi avec 3% de margine sont illustrés par la figure 28. Il ressort de cette courbe, que *P.luteola* croît d'une manière exponentielle avec un taux de croissance de 0.2705 H^{-1} . Au cours de la phase exponentielle une baisse de pH a été enregistrée atteignant une valeur minimale de 5.37 (figure 26).

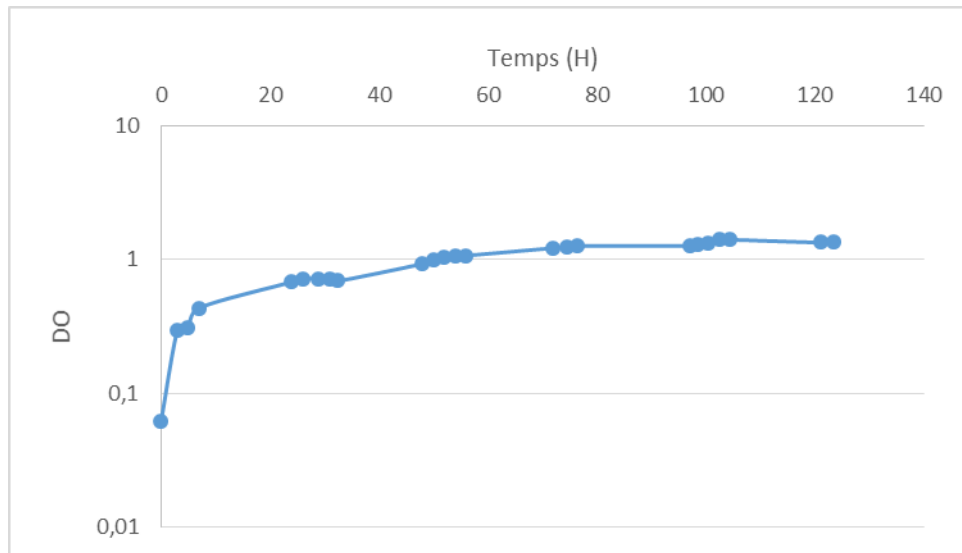


Figure26 : Cinétique de croissance de *P. luteola* lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 3% de margine.

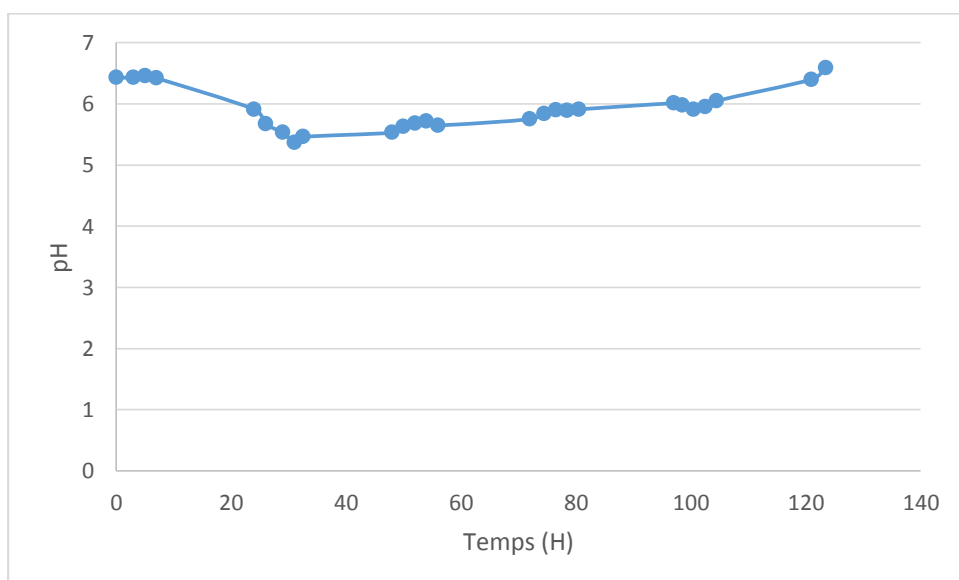


Figure27 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 3% de margine.

a. Indice d'émulsification :

L'enrichissement du milieu avec 3% de margines entraîne un ralentissement de la production de biosurfactant par *P.luteola*, avec un taux de production de 64%. Cela peut être expliqué par la présence de polyphénols dans le milieu de fermentation. D'après les résultats de la caractérisation chimique des margines, nous avons trouvé une concentration de 8605.8 mg/l en polyphénols. Ainsi l'augmentation de la concentration des margines implique une augmentation de la concentration des polyphénols dans le milieu de culture et cela peut inhiber le métabolisme bactérien. D'après **Del Rio et al, (2013)**, les composés phénoliques sont des métabolites secondaires d'origine végétale et y sont reconnus pour leurs pouvoirs antimicrobiens.

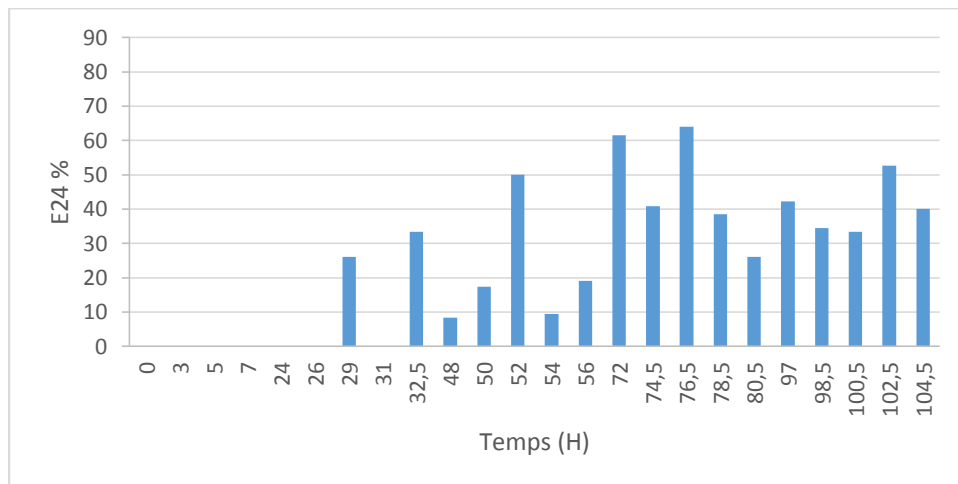


Figure 28 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par *P.luteola* sur milieu enrichi avec 3% de margines.

III.1.2.2.5. Production des biosurfactants pour une concentration de 4% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

A partir de 1% de margines, On obtient les mêmes allures pour les courbes de croissance avec une seule phase exponentielle enregistrée pour le milieu enrichi avec 4% de margines ($\mu_{max} = 0,1024H^{-1}$) (**figure 29**). Le pH du milieu diminue au début de la fermentation puis il tend vers la neutralité à la fin de la fermentation (**figure 30**).

b. Indice d'émulsification :

Avec 4% de margines, la production de biosurfactant par la souche *P.luteola* est freinée. Cela prouve ce qu'on a trouvé déjà avec une concentration de 3% en margine. Le taux de production à la fin de la fermentation est de 65,35 % (**figure31**).

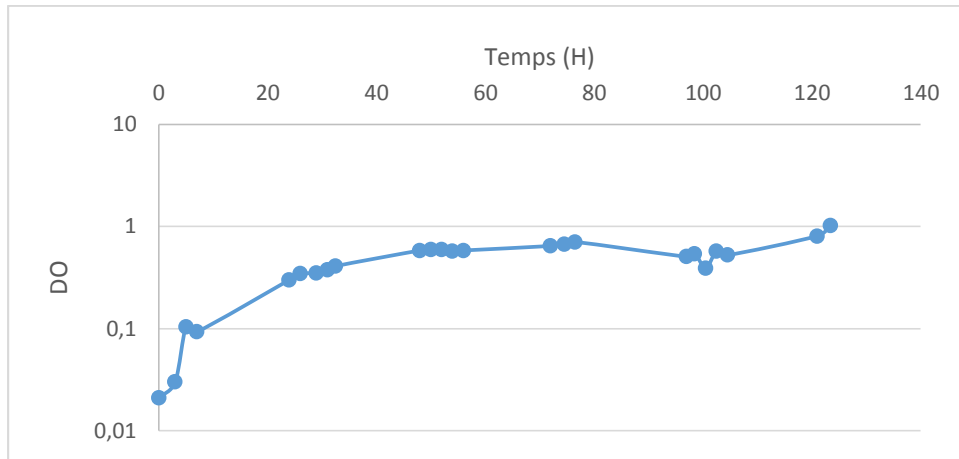


Figure 29 : Cinétique de croissance de *P. luteola* lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 4% de margines.

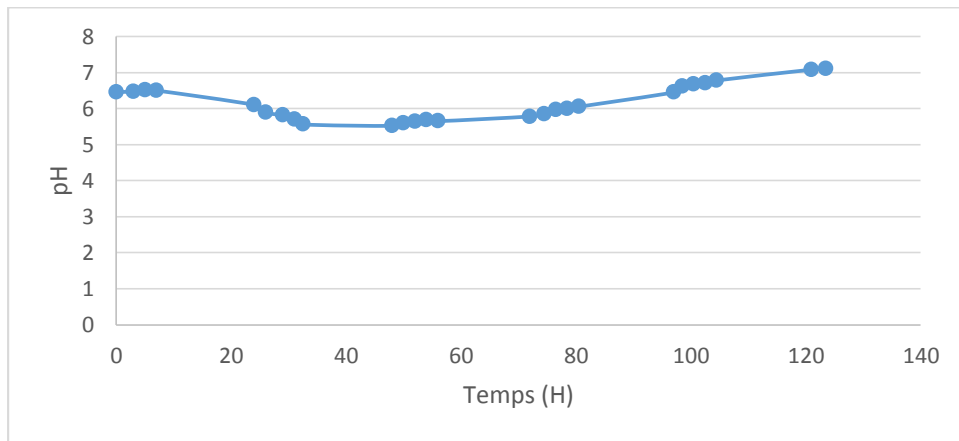


Figure 30 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 4% de margine.

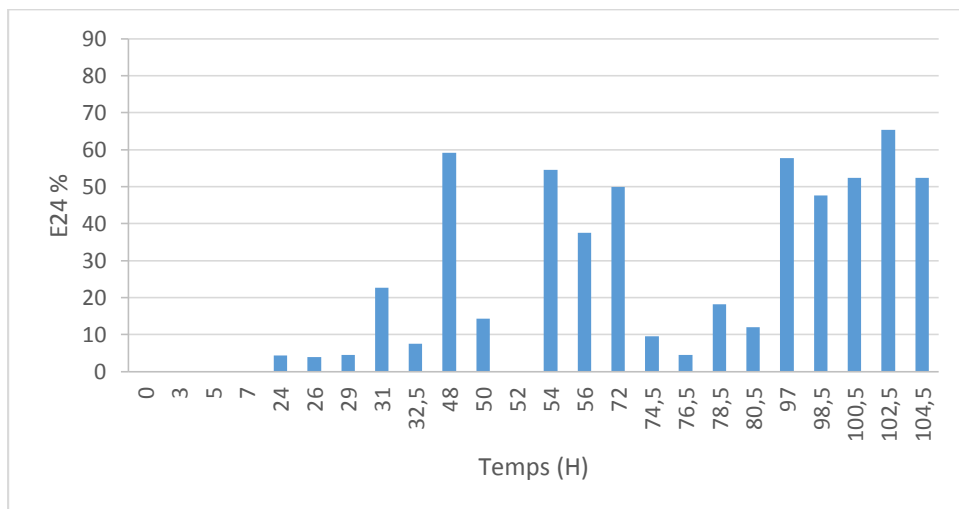


Figure 31 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par *P. luteola* sur milieu enrichi avec 4% de margines.

III.1.2.2.6. Production des biosurfactants pour une concentration de 8% de margines :

a. Cinétique de la croissance bactérienne de la souche *P. luteola* :

D'après la **figure 32**, l'allure de la courbe montre une augmentation de la croissance bactérienne avec un taux maximal de croissance de $0,0913H^{-1}$ au cours de la première phase exponentielle. Cette phase est suivie par une phase stationnaire après 50 heures de fermentation. Il faut signaler qu'une phase de latence est observée entre les deux phases exponentielles, la bactérie reprend sa croissance. Cette perturbation de la croissance peut être expliquée par la présence de polyphénols dans le milieu. On note toujours une acidification du milieu (**figure 33**).

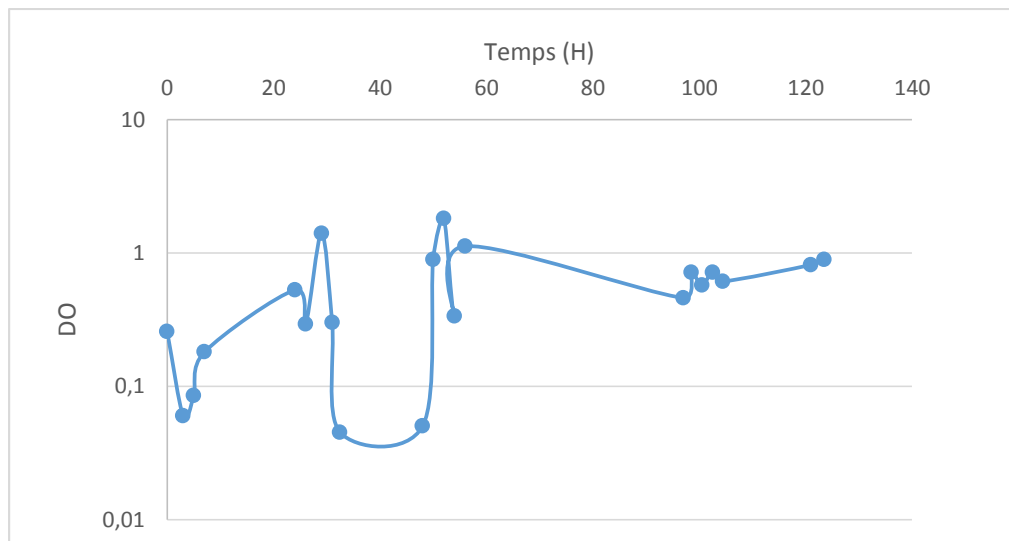


Figure 32 : Cinétique de croissance de *P. luteola* lors de la fermentation sur milieu enrichi avec 8% de margines.

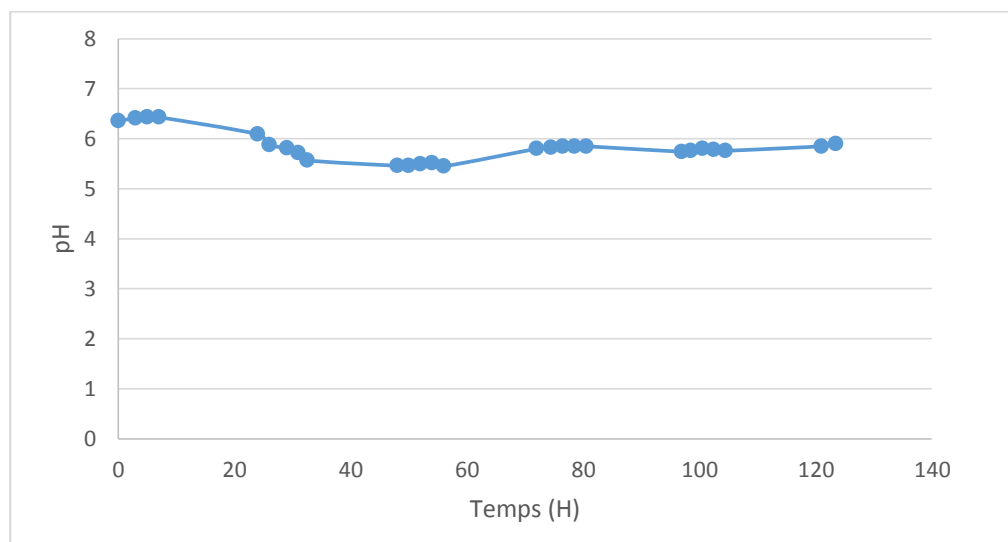


Figure 33 : Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu enrichi avec 8% de margine.

b. Indice d'émulsification :

Les résultats trouvés sont présentés par la **figure 34**. Avec 8% de margines, la production de biosurfactant par la souche *P.luteola* est très faible avec un taux maximal de 54.54%. Ceci est dû à la concentration en margines qui est très élevée et donc en polyphénols. Ces derniers ont entraîné une inhibition de la production de biosurfactant (**tableau 4**).

Tableau 4 : Concentration des polyphénols dans les milieux de culture enrichis avec différentes concentrations en margine.

Concentration	1%	2%	3%	4%	8%
[polyphénols] (mg/l) à t_0	14,4	14,7	18,2	15,3	27,2

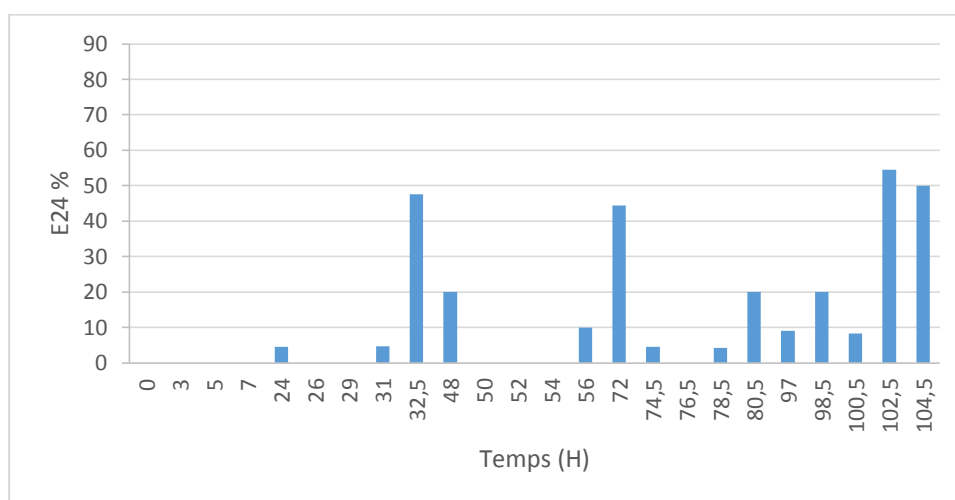


Figure 34 : Représentation du taux d'émulsion (E24) des biosurfactants produits par *P.luteola* sur milieu enrichi avec 8% de margines.

III.1.2.3. Comparaison et conclusion :

Notre étude confirme que l'utilisation de margines comme substrat pour la production de biosurfactant est efficace. Cependant, la concentration en margine joue un rôle très important dans la quantité de biosurfactant produite et la stabilité de cette production tout au long du processus de fermentation. Le **tableau 4** récapitule l'ensemble des résultats obtenus lors de la fermentation.

Tableau 5 : Paramètres de modélisation de la croissance et de la production pour *P. luteola*.

Concentration en margine (%)	E24 %	μ_{\max} (H ⁻¹)	Equation	R ²
0.5	84,48	0,0842	$X = X_0 e^{0,0842t}$	0,986
1	84,61	0,0507	$X = X_0 e^{0,0507t}$	0,9334
2	61,9	0,0421	$X = X_0 e^{0,0421t}$	0,9817
3	64	0,2705	$X = X_0 e^{0,2705t}$	0,8482
4	65,35	0,1024	$X = X_0 e^{0,1024t}$	0,9409
8	54.54	0,0913	$X = X_0 e^{0,0913t}$	0,8819

D'après le **tableau 5**, les meilleurs taux de production, par rapport au test d'émulsification, sont de 84,48 et 84,61% respectivement pour 0.5 % et 1% en margines. Pour des raisons économiques (faible coût) et en prenant le taux de Production maximal en considération, on opte pour la production de biosurfactant la concentration **0.5 %** en margines.

D'autre part, nous avons remarqué qu'une augmentation de la concentration en margines entraîne une diminution de la production de biomolécule, tandis que l'allure des histogrammes du taux d'émulsion montrent une légère augmentation de ce dernier durant la phase finale de fermentation. Cela est probablement dû soit à la lyse cellulaire qui entraîne la libération de leurs contenus en biomolécules dans le milieu, soit à la diminution de la concentration des polyphénols présents dans le milieu de fermentation.

III.2. Etude comparative :

L'objectif final de notre travail était d'étudier l'effet de l'utilisation de différents inducteurs pour la production de biosurfactant par la souche *P. luteola*.

D'après les histogrammes du taux d'émulsification E24, nous constatons que l'inducteur utilisé influe considérablement sur la production de biosurfactant.

Avec le gasoil, nous remarquons une production dès le début de la fermentation, suivie d'une diminution puis une ré-augmentation au cours de la phase stationnaire. Le taux maximal de la production était de 72%.

Cependant, avec les margines la production de biosurfactant suit une allure différente où elle s'est intensifiée au cours de la phase stationnaire de croissance avec un taux maximum de production de 84,48%.

La bibliographie rapporte que l'ajout de l'inducteur de biosurfactant au milieu conduit à des changements qualitatifs et quantitatifs du produit final (**Danyelle et al, 2016**).

Amezcu-Veja et al, (2006) reporte qu'une modification de la composition d'acide gras du biosurfactant final s'est produite lorsque la composition d'acide gras a été modifiée dans le milieu de fermentation.

Pour conclure, *Pseudomonas luteola* a montré, à travers notre étude, son aptitude à dégrader les hydrocarbures (gasoil) et les rejets agroalimentaires (margines) et les utiliser comme substrat pour produire des biosurfactants. Cela est très prometteur en termes de protection de l'environnement. Cette souche peut être utilisée par exemple dans la remédiation des sols contaminés par les hydrocarbures, l'épuration des eaux végétales issues du processus de production de l'huile d'olive et d'autres applications environnementales.



Conclusion générale



Conclusion générale

L'objectif fixé à notre travail est de contribuer à une meilleure connaissance de l'influence de quelques paramètres (aération et source de carbone) sur la production de biosurfactants par les souches *P.luteola* et *P.putida*.

Dans une première étape, nous avons étudié l'influence de l'aération sur la production de biosurfactants pour les deux souches bactériennes *Pseudomonas luteola* et *Pseudomonas putida*. Le test d'émulsification a montré un taux de production de biosurfactant très élevé en présence d'oxygène avec une grande stabilité de la production au cours de la fermentation. Les taux de production étaient de 72% et de 86.36 % pour *P.luteola* et *P.putida* respectivement.

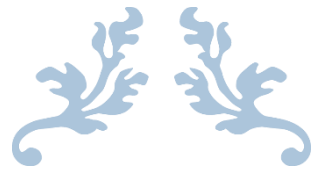
Dans une seconde étape, nous avons procédé à une valorisation d'un rejet agroalimentaire « les margines ». Nous avons remplacé le gasoil par les margines et une optimisation de la concentration des margines a été effectuée. L'utilisation des ce rejet, nous a permis d'obtenir un taux de production de 84.48% par *P.luteola* cultivée sur le milieu M1 modifié additionné de 0.5 % de margines.

Les mesures de la tension superficielle se sont avérées peu représentatives de la production des biosurfactants au vu de la faible variation de ce paramètre. Par contre, le test E24 paraît plus indiqué pour rendre compte de la production des biosurfactants.

A ce stade de l'étude, les résultats montrent l'aptitude des souches *P.luteola* et *P.putida* à produire des biosurfactants. De plus, ces résultats mettent en évidence la possibilité de l'utilisation de *P.luteola* dans des procédés de remédiation et d'épurations environnementales.

En perspective, il s'agit de compléter par une étude plus approfondie à savoir :

- Identification des biosurfactants produits.
- Développement d'une méthode plus appropriée pour la révélation de la présence de biomolécules tensio-actifs dans le milieu.



Références bibliographiques



Références bibliographiques

« A »

- A. Perfumo, T. J. P. Smyth, R. Marchant, I. M. Banat. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates
- Amezcua-Veja, C.; Poggi-Varaldo, H.M.; Esparza-Garcia, F.; Rodriguez-Vazquez, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. *Bioresour. Technol.* 2006, 98, 237–240. [CrossRef] [PubMed].
- Appanna V.D. and H. Finn. (1995). Microbial adaptation to iron: A possible role of phosphatidylethanolamine in iron mineral deposition. *Biometals.* 8 : 142-148
- Aylin Ugurlu, Aysegul Karahasan Yagci, Seyhan Ulusoy, Burak Aksu and Gulgun Bosgelmez-Tinaz, 2013. Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Awashti N, Kumar A, Makkar R, Cameotra S (1999). Enhanced biodegradation of endosulfan, a chlorinated pesticide in presence of a biosurfactant. *J Environ Sci Health B34*:793-803.

« C »

- Cameron, D.R., D.G. Cooper and R.J. Neufeld, 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied Environ. Microbiol.*, 54: 1420-1425.
- Cirigliano M. C. and Carman G. M. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 1985 Oct; 50(4): 846–850.

« D »

- Danyelle Khadydja F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos and Leonie A. Sarubbo, 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century.
- Desai, J. D., and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:47-64. [PMC free article] [PubMed]
- Dilsad Onbasli and Belma Aslim, 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp.
- DJERBAOUI Amina Nesrin, 2011. Thèse de Magister : Utilisation de souches bactériennes autochtones dans la production de Biosurfactant et la bioremediation des sols de hassi messaoud contaminés par les hydrocarbures.

Références bibliographiques

- D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J.P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 18 (14) (2013), pp. 1818-1892.
- Dilsad Onbasli and Belma Aslim : Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *J. Environ. Biol.* ISSN : 0254-8704 30(1), 161-163 (2009).
- Dhouha Ghribi and Semia Ellouze-Chaabouni : Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol Res Int.* 2011; 2011: 653654.
- Dubeau D., Déziel E, Woods DE, Lépine F. *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* 2009 Dec 17;9:263. doi: 10.1186/1471-2180-9-263.

« E »

- Elad Y, Stewart A (2007). Microbial Control of *Botrytis* sp. *Botrytis: Biology. Pathology and Control.* 223-241, DOI: 10.1007/978-1-4020-2626-3_13.
- Erum shoeb, faiza akhlaq, uzma badar, jameela akhter, samina imtiaz, 2013. Classification and industrial applications of Biosurfactants.

« F »

- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T.J.P. and Banat, I.M. (2010) Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Tech* 112, 617–627.

« G »

- Gerson OF, Zajic JE (1978). Surfactant production from hydrocarbons by *Corynebacterium lepus*, sp. nov. and *Pseudomonas asphaltenicus*, sp. nov. *Dev. Ind. Microbiol.* 19: 577–599.

« H »

- H. Rashedi, E. Jamshidi, M. Mazaheri Assadi and B. Bonakdarpour, 2005. Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil.
- Hamdi M., Bouhamed H., Elouz R. Optimisation of *Asprgillus niger* growth on olive mill wastewaters, *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, 36, 1991, 285-288.
- Hörmann B, Müller M, Sylдатk C, Hausmann R (2010) Rhamnolipid Production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *Eur J Lipid Sci Technol* 112(6):674–680

Références bibliographiques

« I »

- I.e. klosowska-chomiczewska, k. Medrzycka, e. Karpenko. Biosurfactants - biodegradability, toxicity, efficiency in Comparison with synthetic surfactants.
- Ishigami Y, Zhang Y, Ji F (2000). Spiculisporic acid. Functional development of biosurfactants. Chim. Oggi. 18: 32–34.
- Iva M. Atanasković, Jelena P. Jovičić Petrović, Marjan B. Biočanin, Vera M. Karličić, Vera B. Raičević, Blažo T. Lalević, 2016. Stimulation of diesel degradation and biosurfactant production by aminoglycosides in a novel oil-degrading bacterium *Pseudomonas luteola* PRO23.
- Iboukhoulef Hamida ep Bekda : Traitement des margines des huileries d'olive par procédé d'oxydation avancé basé sur le système Fenton-like (H₂O₂/Cu).

« J »

- Jianmeng Chen, Dongzhi Chen, Jiexu Ye, Limei Han, Yiming Sun : 2013. *Pseudomonas putida* strain as well as its microbial inoculum and application US 9404163 B2.

« K »

- Kaplan N, Zosim Z, Rosenberg E (1987). Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. Appl. Environ. Microbiol. 53(2): 440–446.
- Karanth, N. G. K., P. G. Deo, and N. K. Veenanadig. 1999. “Microbial Production of Biosurfactants and Their Importance.” Curr. Sci.77: 116–123.
- Khemili Souad, 2008. Thèse de Magister : Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites.

« L »

- Laith Al-Araji, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Mahiran Basri and Abu Baker Salleh, 2007. Microbial Surfactant.

Références bibliographiques

« M »

- Mercade, M.E.; Manresa, A.; Robert, M.; Espuny, M.J.; Deandres, C.; Guinea, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrat for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.* 1993, 43, 1–6. [CrossRef].
- Aggoun-Arhab Moufida. Thèse de Doctorat : Caractérisation de la composition en microconstituants des margines issues de la production oléicole et utilisabilité comme complément dans la ration chez la vache laitière.

« P »

- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. and Wagner, F. 1991. Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z. Naturforsch.* 46c : 210- 216.

« R »

- Rajni Dhiman, Khem Raj Meena, Abhishek Sharma and Shamsheer S. Kanwar. 2016, *Biosurfactants and their Screening Methods*.
- Rashedi, H., M.M. Assadi, E. Jamshidi and B. Bonakdar. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on carbon sources. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 3, 297-303 (2006).
- Rosenberg M, Rosenberg E (1981). Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* 148: 51-57.

« S »

- Saini HS, et al. 2008. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *J. Nat. Prod.* 71: 1011–1015 [PubMed]
- Sen R. (2008). Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress Ener. Combust. Sci.* 34 714–724. 10.1016/j.peccs.2008.05.001 [Cross Ref]
- Sifour, M., Al-Jilawi, M. H. et Aziz, G.M. (2007). Emulsification properties of biosurfactant producer from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(8), 1331-1335.

« T »

- Tayfun Kaya, Belma Aslim, Ergin Kariptaş, 2014. Production of biosurfactant by *Pseudomonas* spp. Isolated from industrial waste in Turkey.

Références bibliographiques

- Tahzibi, A., F. Kamal and M.M. Assadi: Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iran. Biomed. J.*, 8, 25-31 (2004).
- Tanaka T, Takashi T, Kazuhik U et al. Method of production iturin A and antifungal agent for profound mycosis. *Biotechnol Adv* 1997; 15:234 – 235.

« W »

- Wakamatsu Y, Zhao X, Jin C, Day N, Shibahara M, Nomura N, Nakahara T, Murata T & Yokoyama KK (2001) Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK-related signal cascade. *Eur J Biochem* 268: 374–383.
- Whang L-M, Liu P-WG, Ma C-C, Cheng S-S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J Hazard Mater.* 2008;151:155–163. Doi : 10.1016/j.jhazmat.2007.05.063. [PubMed] [Cross Ref]

« X »

- Xiao Y, Gerth K, Müller R and Wall D. Myxobacterium-Produced Antibiotic TA (Myxovirescin) Inhibits Type II Signal Peptidase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr; 56(4): 2014–2021. doi: 10.1128/AAC.06148-11

« Z »

- Zosim Z, Guntick DL, Rosenberg E (1982). Properties of hydrocarbon in water emulsion stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 281-292.



Annexes



Annexe I : Matériel de laboratoire :

➤ Appareillage :

Appareil	Marque
Etuve	BUVE
Autoclave	
Four-Pasteur	J.P.SELECTA,s.a.
Agitateur-plaque chauffante	
Incubateur agitateur	WiseShake (SHO-2D)
Centrifugeuse à froid	
spectrophotomètre	SHIMADZU UVmini-1240
pH-mètre	HANNA instrument
Tensiomètre	Gibertini TSD Digital Tensiometer
Vortex	TechnoKARTELL (TK3S)
Balance analytique	OHAUS
Bec Bunsen	/
Réfrigérateur	/
Conductimètre	HANNA instrument
Oxymètre	OxyTop IS 6 WTW

➤ Verrerie et autre :

Verrerie	
Erlenmeyer	50 ml, 100 ml, 1000ml.
Fliale	10ml, 50ml, 100ml, 500ml, 2000ml
Bécher	50ml, 100ml, 500 ml
Pipette graduée	1ml, 2ml, 5ml, 10ml
Seringue	5ml, 10ml
Micropipette	/
Boîte de pétrie	/
Pipette pasteur	/
Cuve de spectrophotomètre	/
Lamelle	/
Pince	/

Annexe II :

Courbes d'étalonnage des différents paramètres dosés pour la caractérisation des margines :

1. Dosage des orthophosphates par méthode spectrophotométrie (Norme NF EN 1189) :

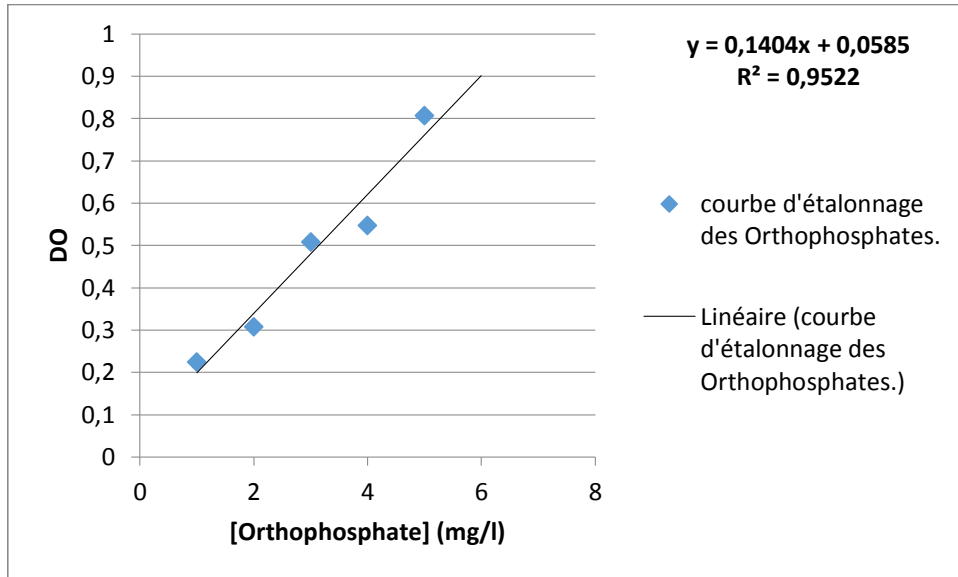


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des orthophosphates.

2. Dosage des sucres totaux selon la méthode de Dubois et al., (1956) :

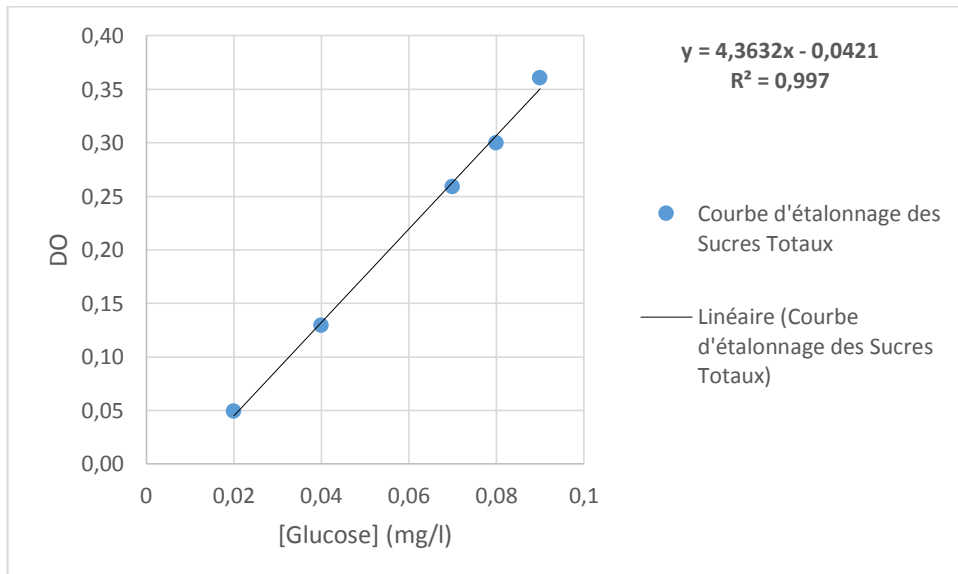


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des sucres totaux.

3. Dosage des Protéines par la méthode préconisée par Bradford et al (1976) :

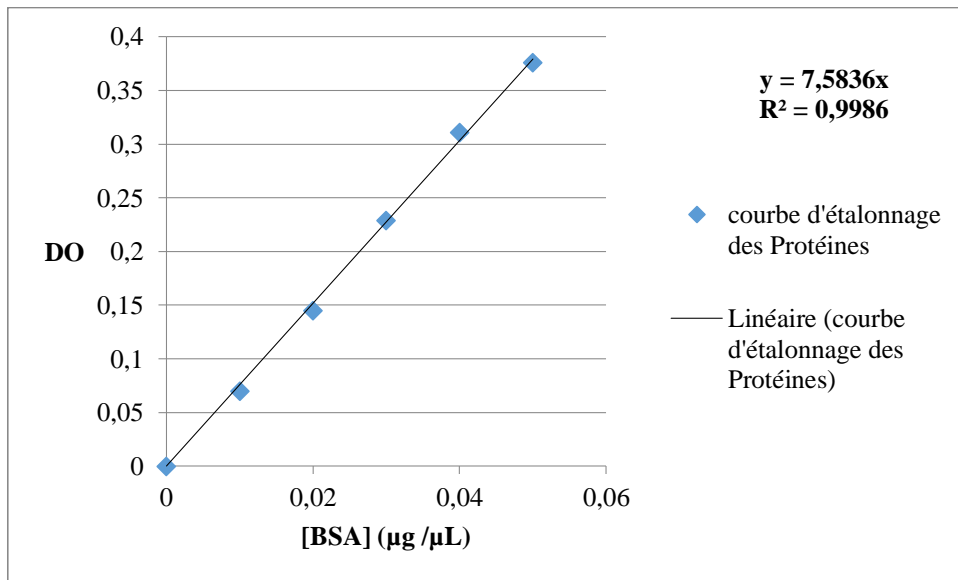


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des Protéines.

4. Dosage des polyphénols par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) :

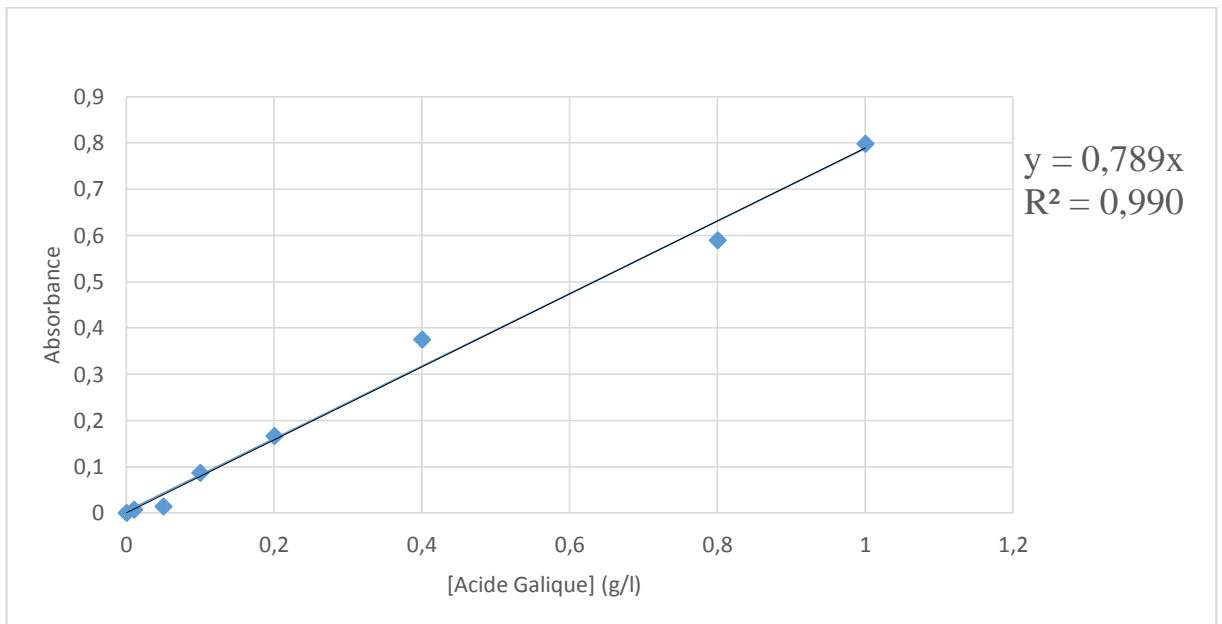


Figure 4 : Courbe d'étalonnage des polyphénols.

5. La demande chimique en oxygène (DCO) (MA. 315-DCO 1.0) :

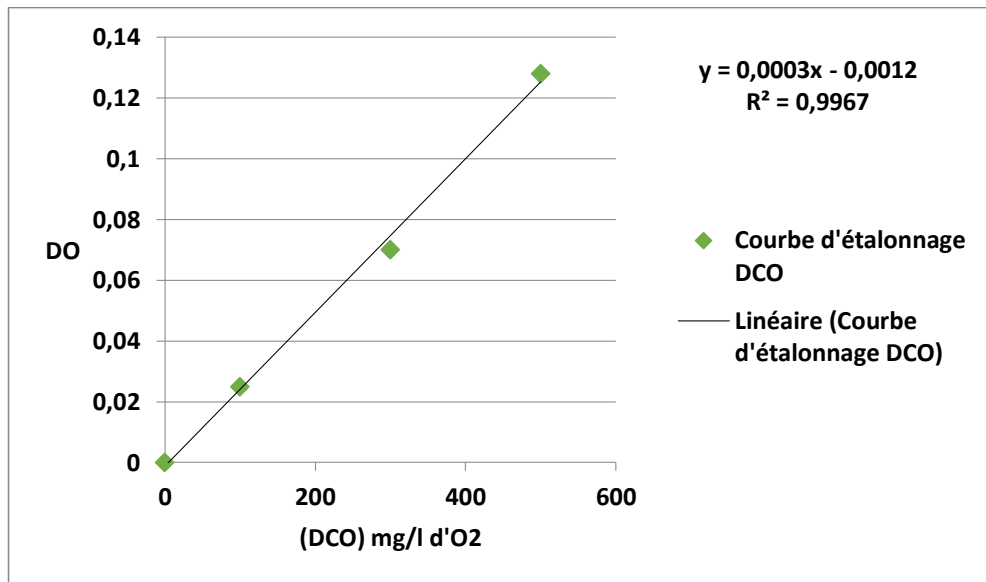


Figure 5 : Courbe d'étalonnage DCO.

6. Dosage des nitrites (NO_2^-) (NF EN ISO 13395) :

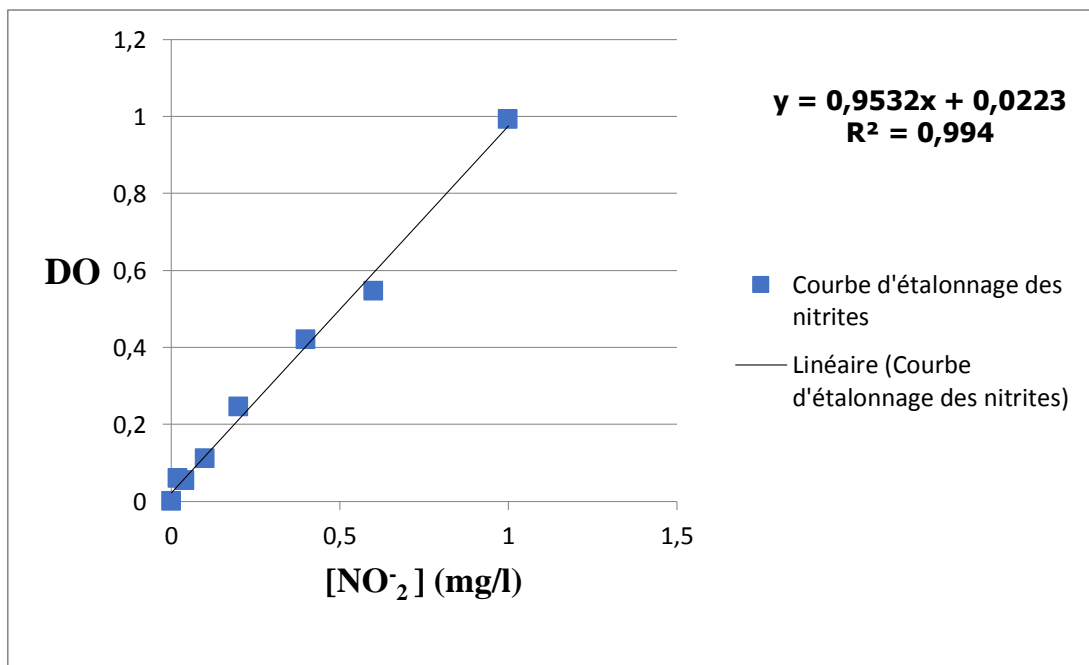


Figure 6 : Courbe d'étalonnage des Nitrites.

7. Dosage des nitrates (NO_3^-) : Méthode au salicylate de sodium, T90-012 :

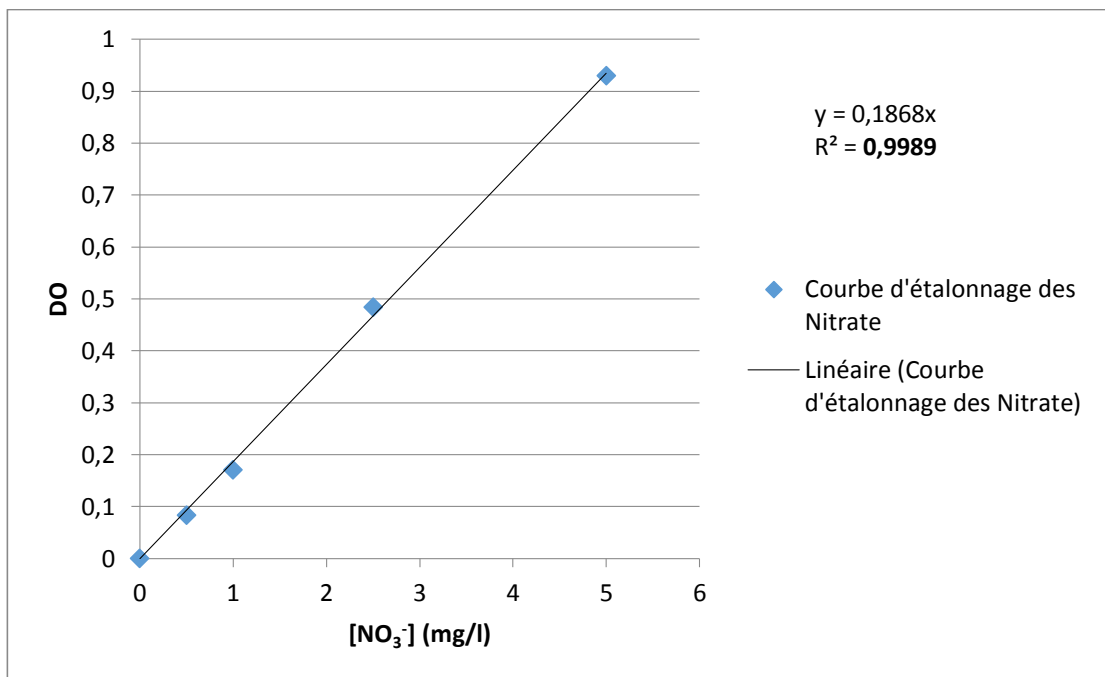


Figure 7 : Courbe d'étalonnage des Nitrates.

8. Dosage de l'azote ammoniacal (NH_4^+) (méthode spectrophotométrie au réactif de Nessler) :

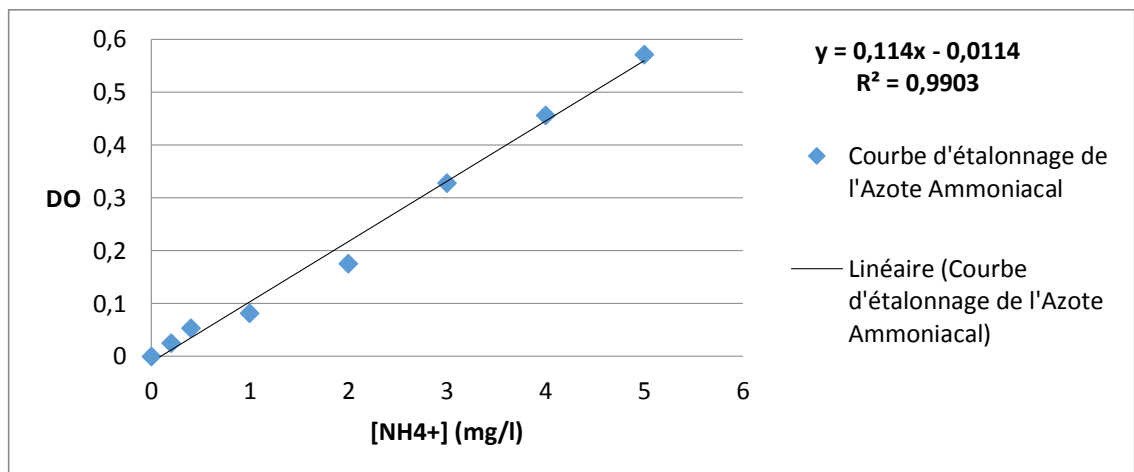


Figure 8 : Courbe d'étalonnage de l'Azote Ammoniacal.