

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene

**FACULTE DE GENIE MECANIQUE ET DE GENIE DES PROCÉDES**



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : GENIE DES PROCÉDES

Spécialité : Procédés Chimiques et Environnement

Par : **Mme YATAGHENE née OUALI AZIZA**

**THEME**

Production de Biosurfactants par *Pseudomonas sp.*  
Application à la Bioremédiation des milieux pollués par les Hydrocarbures

Soutenu le 28/ 01/2009 , devant le jury composé de :

Mr	M. BELKACEM	Professeur (USTHB)	Président
Mme	R. MAACHI	Professeur (USTHB)	Directeur de thèse
Mr	M. ABOUSEOUD	Maître de conférence (U.Médéa)	Examineur
Mme	Z. SADAoui	Maître de conférence (USTHB)	Examineur
Mme	N.YEDDOU	Maître de conférence (USTHB)	Examineur

*A mes très chers et regrettés parents,*

## *Remerciements*

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génie de la réaction de FGMGP sous la direction du Professeur R. MAACHI .

A Madame le Professeur R. MAACHI,  
je tiens à vous exprimer ici mes vifs remerciements pour vos encouragements , votre soutien ainsi que la confiance que vous avez toujours manifesté à mon égard .Aussi , je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour votre apport et votre contribution pour la réalisation de ce présent travail.

A Monsieur le Professeur M. BELKACEM,  
je vous exprime toute ma gratitude pour l'honneur que vous me faites en assurant la présidence de ce jury.

A Monsieur M. ABOUSEOUD, Maître de Conférence,  
je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour votre soutien , vos précieux conseils et de votre disponibilité qui , durant ces années , ont contribué au bon déroulement de ce travail.

A Monsieur A. AMRANE, Professeur à l'Université de RENNES 1,  
je vous remercie de m'avoir accueillie au niveau de votre équipe de recherche , de votre disponibilité et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens analytiques.

A Mesdames Z. SADAOUI et N. YEDDOU, Maîtres de Conférence  
je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail.

Je ne pourrais terminer mes remerciements sans y associer mon Mari et mes enfants : DORIA, SAMIR, KAHINA et LYDIA qui m'ont encouragée et m'ont apportée tout leur soutien dans les bons comme les mauvais moments, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon affection.

# SOMMAIRE

## Abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Introduction .....1

---

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### CHAPITRE I : PRODUCTION DES BIOSURFACTANTS

I.1 Définitions :	6
I.2 Classification :	6
I.3 La production des surfactants biologiques :	9
I.3.1 Les organismes producteurs.....	9
I.3.2 Quelques techniques d'identification des biosurfactants.....	11
I.3.3 Paramètres influençant la production.....	11
I.3.3.1 Influence de la source carbone.....	11
I.3.3.2 Influence de l'azote.....	12
I.3.3.3 Autres facteurs.....	12
I.4 Mécanismes de production des biosurfactants :	13
I.5- Séparation des biosurfactants :	14
I.6 Intérêts des biosurfactants :	16
I.7-Conclusion.....	16

### CHAPITRE II : CARACTERISATION DES BIOSURFACTANTS

II.1 Introduction.....	17
II.2 Propriétés des agents tensioactifs.....	17
II.2.1 Tension superficielle.....	17
II.2.2 Adsorption aux interfaces.....	18
II.2.3 Concentration Micellaire Critique (CMC).....	20
II.2.4 Le rapport hydrophile- lipophile (HLB).....	21
II.2.6 Toxicité et biodégradabilité.....	24
II.3 Caractérisation physicochimique des biosurfactants.....	25
II.3.1 Pouvoir émulsifiant.....	25
II.3.2 Pouvoir mouillant.....	26
II.3.3 Pouvoir moussant.....	27
II.3.4 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	27
II.4 Caractérisation structurale.....	27
II.5 Conclusion.....	28

## CHAPITRE III : APPLICATION DES BIOSURFACTANTS

III.1 Introduction .....	29
III.2 Utilisation des biosurfactants en fonction de leurs propriétés.....	29
III.3 Applications des biosurfactants dans l'industrie .....	31
III.3.1 Industrie pétrolière .....	31
III.3.2 Industrie alimentaire.....	31
III.3.3 Industrie cosmétique .....	32
III.3.4 Application thérapeutiques.....	32
III.3.5 Autres applications .....	32
III.4 Applications environnementales des biosurfactants .....	33
III.4.1 Remédiation des sols pollués par les hydrocarbures polyaromatiques .....	33
III.4.1.1 Introduction .....	33
III.4.1.2 La biodégradation.....	33
III.4.1.3 Mode d'action .....	34
III.4.2 Biorémédiation des sols contaminés par des métaux lourds.....	36
III.4.3 Biorémédiation marine.....	37
III.5 Conclusion.....	37

---

## PARTIE EXPERIMENTALE

---

## CHAPITRE IV : MATERIELS et METHODES

IV.1. Objectif.....	39
IV.2 Microorganismes.....	40
IV.3 Milieux de culture et de préculture .....	40
IV.4 Conditions de culture .....	40
a- Préparation de l'inoculum (préculture) .....	40
b- Préparation de la culture .....	41
IV.5 Méthodes analytiques.....	41
IV.5.1 Tension superficielle.....	41
IV.5.2 Indice d'émulsification (E 24) .....	42
IV.5.3 Biomasse .....	43
IV.5.4 pH.....	43
IV.6 Optimisation des paramètres opératoires .....	43
IV.7 Cinétique de la production du biosurfactant par des cellules libres.....	43
IV.7.1 Production du Biosurfactant.....	43
IV.7.2 Séparation du biosurfactant (Pruthi.V et Cameotra S.S, 1995): .....	44
IV.8 Caractérisation du biosurfactant.....	44
IV. 8 .1 Caractérisation structurale.....	44
IV. 8 .1.1 Test de Rhamnose : .....	44
IV. 8 .1.2 Test de Bradford : .....	44
IV. 8 .1.3 Spectroscopie à Infrarouge : .....	44
IV. 8 .1.4 Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	44
IV. 8 .1.5 Microscopie électronique à balayage (MEB).....	45
IV .8.2 Caractérisation physico-chimique.....	45
a – Tests de Stabilité.....	45
a-1 Stabilité thermique .....	45
a-2 Stabilité chimique.....	45

b -Détermination de la Concentration Micellaire Critique ( CMC ) .....	45
IV. 8.3 Caractérisation fonctionnelle .....	46
a -Mesure de la tension interfaciale.....	46
b -Pouvoir émulsifiant.....	46
c -Pouvoir moussant .....	46
d -Pouvoir mouillant.....	46
IV. 8.4 Application.....	46
<b>CHAPITRE V : RESULTATS &amp; DISCUSSION</b>	
V.1 Optimisation des paramètres opératoires .....	48
V.2 Cinétique de production du biosurfactant .....	53
V.2.1 Production du Biosurfactant.....	53
V.2.2 Séparation du biosurfactant (Pruthi.V et Cameotra S.S, 1995):.....	54
V.3 Caractérisation du biosurfactant.....	55
a -Test de Rhamnose .....	55
b -Test de Bradford .....	55
c - Spectroscopie à Infrarouge.....	55
d -Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	56
e -Microscopie électronique à balayage (MEB).....	57
V.4 Caractérisation fonctionnelle.....	59
V.4.1 Pouvoir moussant .....	59
V.5 Caractérisation physico-chimique .....	64
V.5.1 Tests de Stabilité .....	64
V.5.1.1 Stabilité thermique .....	64
V.5.1.2 Stabilité chimique.....	64
a- Effet de la salinité.....	64
b- Effet du pH.....	65
V.5.2 Détermination de la concentration micellaire critique .....	66
V.6 Application.....	67
V.6.1 Effet du pH sur la solubilité du naphtalène en présence de BS.....	67
V.6.2 Effet de la salinité sur la solubilité du naphtalène en présence du BS .....	69
V.7 Conclusion.....	70
<b>Conclusion générale</b> .....	68

## Référence bibliographique

## Annexes



## ABBREVIATIONS

BS : Biosurfactant  
C : Carbone  
HPA : Hydrocarbures Polyaromatiques  
MEB : Microscopie électronique à balayage  
N : Azote  
Nb : Nombre  
PS : Polystyrène  
RMN : Résonance magnétique nucléaire

CMC : Concentration micellaire critique.....  $\text{mgL}^{-1}$   
E<sub>24</sub> : Indice d'émulsification ..... %  
Q : Débit.....  $\text{ml min}^{-1}$   
TS : Tension superficielle.....  $\text{mNm}^{-1}$   
V<sub>p</sub> : Vitesse de pore  $\text{cm h}^{-1}$

### Acides aminés

ASP : Aspartate  
GLU : Glutamate  
LEU : Leucine  
VAL : Valine

## Liste des figures

Figure I.1	: Structure de la surfactine .....	4
Figure I.2	: Structures de deux rhamnolipides différents.....	5
Figure I.3	: Structures des sophorolipides.....	5
Figure II.1	: Schéma descriptif de la méthode de l'anneau.....	16
Figure II.2	: Evolution de la force en fonction de la distance anneau/surface .....	16
Figure II.3	: Représentation schématique d'une micelle de Surfactant.....	18
Figure II.4	: Classification des tensioactifs selon leur HLB .....	19
Figure II.5	: Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température (Shinoda et Fontell, 1995).....	20
Figure II.6	: Variation de la solubilité, des tensions interfaciale et superficielle en fonction de la concentration du surfactant (Mulligan C.N,2005).....	21
Figure III.1	: Représentation schématique de l'adsorption de surfactant sur un sol (West et Harwell, 1992).....	31
Figure III.2	: Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant (Edward et al ,1994).....	32
Figure IV.1	: Tensiomètre ( K 6 ) .....	39
Figure V.1	: Concentration en Biomasse dans les différents milieux de culture.....	46
Figure V.2	: Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E24 ) en présence de NH <sub>4</sub> Cl et les différentes sources de Carbone.....	47
Figure V.3	: Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E24 ) en présence de KNO <sub>3</sub> et les différentes sources de Carbone.....	47
Figure V.4	: Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E24 ) en présence de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> et les différentes sources de Carbone.....	48
Figure V.5	: Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E24 ) en présence d'urée et les différentes sources de Carbone.....	48
Figure V.6	: Variation de la Tension superficielle et de la Biomasse au cours de la production du Biosurfactant dans les conditions optimales.....	50
Figure V.7	: Test de Rhamnose.....	52
Figure V.8	: Spectre du biosurfactant obtenu par FTIR.....	53
Figure V.9	: Spectre du biosurfactant obtenu par RMN.....	54
Figure V.10	: Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant (x 1000 ) .....	55
Figure V.11	: Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant (x 3000).....	55
Figure V.12	: Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant (x 10 000).....	56
Figure V.13	: Pouvoir moussant du Biosurfactant .....	56
Figure V.14	: Influence de la concentration de BS sur le pouvoir moussant.....	57
Figure V.15	: Vue microscopique (agrandissement *760) de l'émulsion de solution de BS avec L'huile de tournesol.....	59
Figure V.16	: Effet du traitement thermique sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant (1gL <sup>-1</sup> ).....	61
Figure V.17	: Effet de la salinité sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant.....	62
Figure V.18	: Effet sur pH sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant.....	63
Figure V.19	: Concentration micellaire critique du Biosurfactant.....	63
Figure V.20	: Influence du pH sur la solubilité du naphtalène dans l'eau en présence de BS.....	65
Figure V.21	: Effet de la salinité sur la solubilité du naphtalène en de BS.....	66

## Liste des tableaux

Tableau I.1 : Principaux types de surfactants biologiques (Desai et Banat, 1997 et Banat et al, 2000) .....	7
Tableau I.2 : Méthodes de séparation des biosurfactants (Soumen Mukherjee et al, 2006).....	12
Tableau II-1 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (Christofi et Ivshina, 2002).....	22
Tableau III-1 : Utilisations potentielles des biosurfactants (Banat et al, 2000).....	27
Tableau III.2 : Quelques résultats de comparaison de l'efficacité des biosurfactants par rapport aux surfactants chimiques.....	33
Tableau V.1 : Croissance cellulaire dans les différents milieux de culture.....	45
Tableau V.2 : pH final obtenu dans les différents milieux de culture.....	46
Tableau V.3 : Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification (E <sub>24</sub> ) obtenus pour différents milieux de culture.....	46
Tableau V.4 : Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification du milieu de culture Glucose et Urée en fonction de C / N.....	49
Tableau V.5 : Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification du milieu de culture Huile d'olive et NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> en fonction de C / N.....	49
Tableau V.6 : Variation du pH et E <sub>24</sub> au cours de production de Biosurfactant dans les conditions optimales.....	51
Tableau V.7 : Tensions interfaciales d'une solution de BS et de différents liquides.....	58
Tableau V.8 : Indices d'émulsification de la solution de BS avec les différents liquides.....	58
Tableau V.9 : Angles de contact mesurés sur les surfaces de Polystyrène et Polystyrène recouvert d'une couche de Biosurfactant.....	59
Tableau V.10 : Valeurs des différentes composantes de liquides de référence.....	60
Tableau V.11 : Energies de surfaces du polystyrène et du biosurfactant.....	60
Tableau V.12 : Tensions de surface et Concentrations micellaires critiques de divers rhamnolipides (Lang et Walbrandt, 1999).....	64

De nos jours, les agents de surface ou tensioactifs sont utilisés dans la majorité des industries modernes pour maîtriser les phénomènes d'émulsion, de dispersion, d'adhérence ou de viscosité

La plupart des tensioactifs disponibles sont d'origine chimique et sont des dérivés du pétrole. Ils sont toxiques et extrêmement persistants dans les milieux naturels, car ils sont non biodégradables. En outre, leur efficacité diminue dans les conditions physiques extrêmes de température, pH ou salinité. Ces tensioactifs chimiques, actuellement utilisés risquent de poser autant de problèmes environnementaux qu'ils n'en résolvent.

C'est pour cela, depuis les années 80, les chercheurs, et grâce à l'essor de la biotechnologie, se sont intéressés à des surfactants produits par des micro-organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques mais ont l'avantage d'être non toxiques et biodégradables d'où leur utilisation dans les préparations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Les biosurfactants sont produits par des bactéries issues, en général, de sols contaminés par des molécules hydrophobes. Divers substrats sont utilisés pour leur production ce qui leur donnent des structures chimiques différentes.

Les propriétés essentielles des biosurfactants sont l'adsorption aux interfaces, responsable de la dispersion et du mouillage, favorisée par la diminution de la tension superficielle et l'auto-aggrégation ou micellisation qui gouverne les propriétés de solubilisation et de microémulsification .

Ils sont utilisés, dans l'industrie pétrolière, pour l'extraction du pétrole adsorbé sur les roches Ces agents ont le pouvoir de dispersion des huiles (hydrocarbures) dans le cas de pollution dans la mer qui nécessite une élimination et une solubilisation de la nappe d'huile le plus efficacement et rapidement possible et permettant ainsi une biodégradation plus rapide et plus efficace des contaminants .Ils sont par ailleurs , utilisés dans la biorémediation des sols contaminés par les hydrocarbures

Ce manuscrit est composé de deux parties :

La première partie consiste en une recherche bibliographique où sont donnés les différents groupes de biosurfactants, leurs mécanismes de production, leurs propriétés, leur caractérisation et leur application dans les différentes industries ainsi que leurs applications environnementales.

La seconde partie regroupe les méthodes et la stratégie expérimentale utilisée pour:

- Etudier les effets de certains paramètres pouvant affecter la production du biosurfactant par des cellules libres de *Pseudomonas fluorescens*, tels que la source de carbone et d'azote.
- Etablir le mécanisme de production en étudiant la relation entre la cinétique de production du biosurfactant et celle de la croissance bactérienne.
- La séparation et la caractérisation du produit obtenu du point de vue structural, par des techniques biochimiques et spectroscopiques, et fonctionnel, en testant le pouvoir moussant et émulsifiant du biosurfactant.

- Démontrer les limites et l'intérêt du biosurfactant utilisé du point de vue stabilité thermique et chimique du biosurfactant.
- Enfin, comme application environnementale, l'effet de la présence du biosurfactant en milieu aqueux sur la solubilité du naphthalène (hydrocarbure polyaromatique peu soluble dans l'eau) sera étudié.

Les résultats expérimentaux seront présentés et discutés et contribueront à une meilleure connaissance de la structure et des propriétés du Biosurfactant produit.

---

## **CHAPITRE : I**

### **PRODUCTION DES BIOSURFACTANTS .**

---

#### **I.1 Définitions :**

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire.

Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat ,1997).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques (Parra et al ,1989 ; West et Harwell, 1992).

- 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 et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre.

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (West et Harwell, 1992).

#### **I.2 Classification :**

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. La revue bibliographique révèle que la majorité des biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique (Cameotra et Makkar,1998 ; Bognolo,1999).

Il existe peu de structures cationiques ( Mulligan et al,2001) , cependant dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule , ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation par exemple.

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy et al, 1996).



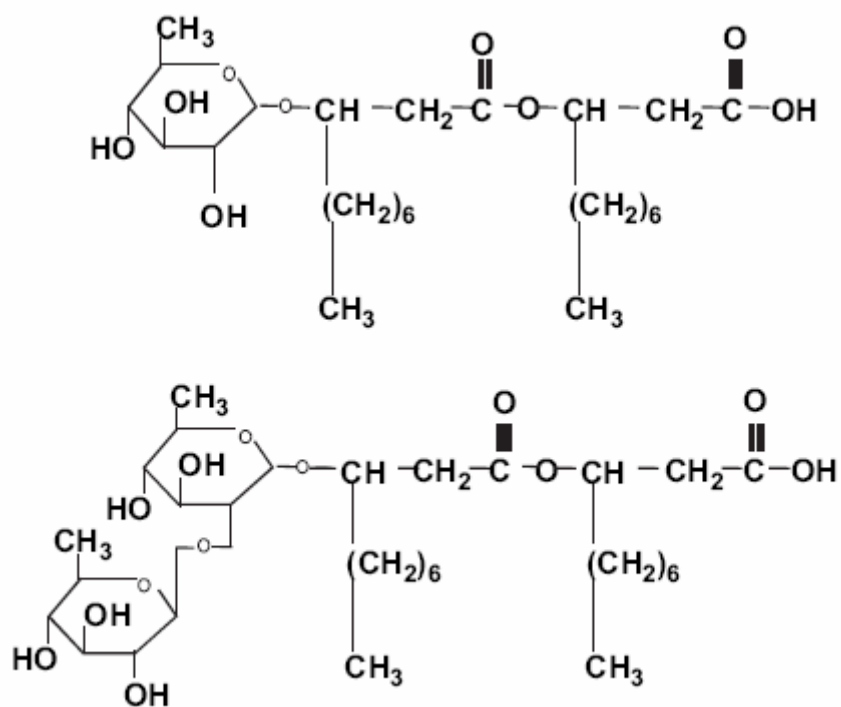


Figure I.2 : Structures de deux rhamnolipides différents

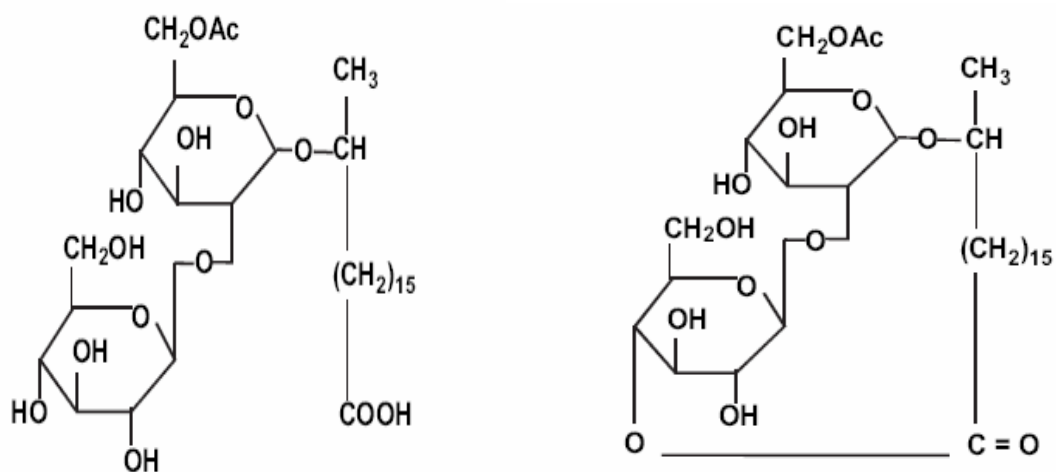


Figure I.3 : Structures des sophorolipides

### **I.3 La production des surfactants biologiques :**

Le principal frein à l'utilisation des biosurfactants est leur coût. En effet, Bognolo (1999) indique que les prix varient de 8 € .mg<sup>-1</sup> pour la Surfactine purifiée à 98% (utilisations biomédicales) à 1 à 3 € .kg<sup>-1</sup> pour des formulations d'Emulsan utilisées dans les années 80 pour le nettoyage des cuves.

Lang et Wullbrandt (1999) indiquent que pour la production de rhamnolipides en grande quantité dans des fermenteurs de 20 à 100 m<sup>3</sup>, les coûts diminuent de 16 à 4 € .kg<sup>-1</sup>. Par comparaison, les coûts de surfactants chimiques sont de l'ordre de 0.5 à 2 € .kg<sup>-1</sup>

Ainsi, le succès de l'utilisation et la production des biotensioactifs passe par une diminution des coûts de production ; Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût.

Par exemple, Makkar et Cameotra (2002) indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...).

Une étude réalisée par Mercadé et Manresa (1994) reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.L<sup>-1</sup> pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

#### **I.3.1 Les organismes producteurs :**

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie ( Mulligan et al,2001) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (Bognolo,1999 ; Mulligan et al ,2001). Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Principaux types de surfactants biologiques (Desai et Banat,1997 et Banat et al,2000)

Groupe	Biosurfactant	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipide Trehalolipides Sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida antartica</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	Surfactine Viscosine	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Phospholipides	Phospholipide	<i>Corynebacterium insidiosum</i>
Acides gras	Acide gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipides neutres	Lipides neutres	<i>Clostridium pasteurianum</i>
Lipopolysaccharides ou polymériques	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux micro-organismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (Fiechter,1992 ; Mata-Sandoval et al,2000).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas du biosurfactant produit par une souche de

*Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux, voire quatre rhamnolipides (Van Dyke et al, 1993).

Bien que de nombreuses espèces produisent des biotensioactifs, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat et al, 2000).

La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifiques : il y a intervention de donneur rhamnosyl, les TPD transférases. Deux transférases différentes permettent la formation de quatre rhamnolipides différents (Koch et al, 1991). Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (Thangamani et Shreve, 1994).

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciales, ainsi que des polymères de masses molaires élevées, qui se lient fortement aux surfaces (Ron et Rosenberg, 2002). Les biosurfactants de faibles masses molaires sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masses molaires élevées sont constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoprotéines. Ces derniers sont moins efficaces pour réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence.

### **I.3.2 Quelques techniques d'identification des biosurfactants :**

Une des techniques utilisées pour suivre la production de biosurfactant est l'ADSA-P ("Axysymmetric Drop Shape Analysis by Profile") qui détermine simultanément l'angle de contact et la tension de surface du liquide grâce au profil d'une goutte restant sur une surface de solide. Les gouttes contenant les organismes producteurs sont placées sur une surface en fluoroéthylène-propylène et le profil de la goutte est déterminé.

D'autres méthodes ont été décrites comme l'hémolyse du sang, qui est une caractéristique connue de certains biosurfactants et un index d'émulsification ( $E_{24}$ ) obtenu sur kérosène (Banat, 1995). Le test du "drop-collapsing" est utilisé pour voir les colonies bactériennes produisant les biosurfactants : des gouttes contenant des cellules en suspension sont placées sur une surface recouverte d'huile ; si la goutte reste stable, cela démontre l'absence de tensioactif (Jain et al, 1991).

### **I.3.3 Paramètres influençant la production :**

Le type et la quantité de biotensioactifs produits varient avec la composition du milieu (sources de carbone, d'azote ou autres nutriments) et les conditions de culture (température, agitation, pH, etc.).

#### **I.3.3.1 Influence de la source carbone :**

La source de carbone est un des paramètres influençant le plus la production des biotensioactifs, 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 (Desai et Banat, 1997 ; Cameotra et Makkar, 1998), comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive.

En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a produit des tensioactifs sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène (Déziel et al, 1996), la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène.

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* (Mata-Sandoval et al ,2000). Le changement du substrat carboné altère la structure des molécules produites.

En effet, Fiechter (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. Un ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de D-glucose pendant la phase de croissance stationnaire provoque une augmentation de rendement (Desai et Banat ,1997).

### I.3.3.2 Influence de l'azote :

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitante (Desai et Banat,1997 ; Cameotra et Makkar,1998 ; Lang et Wullbrandt,1999).

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices : par exemple, la production de tensioactif par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates. Par contre, Robert *et al.* (1989) indiquent que la production de surfactant à partir de *Pseudomonas* 44T1 cultivées sur de l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium.

Hommel *et al.*(1994) indiquent que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium. Des résultats semblables ont été obtenus par Manresa *et al.* (1991) à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant pour favoriser la production de biotensioactif. Par exemple, Guerra-Santos *et al.* (1986) ont obtenu une production maximale pour un rapport C/N variant de 16/1 à 18/1, alors qu'ils n'ont pas observé de production pour des rapports inférieurs à 11/1, où l'azote n'est pas limitant.

### I.3.3.3 Autres facteurs :

- **pH**

Arino *et al.* (1996) et Desai et Banat (1997) indiquent que 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 tensioactif chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia corynebacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0.

Ishigami *et al.* (1987) ont montré que suivant la valeur du pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5.5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées.

- **Concentration de certains ions**

Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (Guerra-Santos et al, 1986).

- **Agitation**

La disponibilité de l'oxygène peut avoir une influence sur la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance.

Les milieux de culture sont agités lors de la production de tensioactifs. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (Desai et Banat, 1997).

## I.4 Mécanismes de production des biosurfactants :

Quatre mécanismes de production peuvent être envisagés, et qui sont :

### ***a)-Production associée à la croissance :***

La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel de glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifiques. Le biodispersant produit par *Bacillus LAF-343* , par exemple, suit ce type de cinétique (Makkar RS et Cameotra S.S, 2003).

### ***b)-Production dans des conditions de croissance limitées :***

Ce mécanisme est caractérisé par une surproduction en raison de la limitation d'un ou de plusieurs composants du milieu de culture tel que l'azote pour les rhamnolipides (Rosero et al, 2003).

Guerra-Santos et al indiquaient qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium, sodium ou éléments traces induise une augmentation de production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa DSM2659*.

### ***c)-Production avec l'addition de précurseurs :***

Des recherches (Mata-Sandoval et al, 2000) ont montré que l'addition des précurseurs au milieu de culture conduit à des changements qualitatifs et quantitatifs du biosurfactant produit ; par exemple, l'addition des trisaccharides dans le milieu contenant l'espèce *Nocardia corynebacter* a augmenté la production avec un rendement de 120 à 150 g/l, de

même pour les espèces : *Nocardia sp*, *Brévibacter* et *Arthrobacter paraffineus DSM2567* avec l'ajout de mono-, di-, ou trisaccharides au milieu de croissance.

**d)- Production par des cellules immobilisées :**

L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes fixées sur un support poreux dans un système de fermentation et d'obtenir ainsi de hautes densités de biomasse.

Cette technique comporte plusieurs avantages, parmi lesquels une productivité élevée de la fermentation et une rétention des cellules , même à de hauts taux de dilution.

De plus, une réutilisation est possible des cellules ainsi qu'une protection contre les forces de cisaillement et une stabilité biologique élevée lors de la fermentation en continu. Plusieurs techniques d'immobilisation ont été développées par Willaert et Barron. Toutes ces techniques imitent ce qui se passe dans la nature, où les cellules des microorganismes croissent presque toujours dans un biofilm associées entre elles et avec des surfaces. Afin d'immobiliser des cellules, on peut utiliser de différents supports, les inclure dans des matrices poreuses tels que l'alginate de calcium et le carraguenan.

## **I.5- Séparation des biosurfactants :**

Pour extraire le BS du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer la biomasse de ce milieu, par exemple par centrifugation.

La récupération des BS dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou liés aux cellules) (Makkar et Cameotra, 2002).

Les méthodes utilisées pour la récupération des BS sont regroupées dans le Tableau I.2

Tableau I.2 : Méthodes de séparation des biosurfactants (Soumen Mukherjee et al, 2006)

Procédures	Propriétés des biosurfactants	Appareils/ Installations	Avantages	Réf
Précipitation acide	Les biosurfactants insolubles à faible pH	/	Faible coût, biosurfactants à l'état brut	Sen, R. (1997), Sen, R. and Swaminathan, T. (2004)
Précipitation avec l'acétone	Les biosurfactants insolubles dans l'acétone	/	Biosurfactants à l'état brut	
Précipitation des sulfates d'ammonium	Polymères ou protéines riches en biosurfactant	/	Efficace dans l'isolement de certains types de polymères biosurfactant	Shabtai, Y. and Gutnick, D.L. (1986)
Extraction avec solvant ou mélange de solvant	Les biosurfactants sont solubles dans le solvant, cela est dû à la présence d'une partie hydrophobe	/	Biosurfactants récupérés à l'état brut et partiellement purifiés	Reiling, H.E. et al. (1986), Dubey, K.V. et al. (2005)
Extraction par Méthyl tertbutyl ether	Les biosurfactants sont solubles dans le solvant, cela est dû à la présence d'une partie hydrophobe	/	Méthyl tertbutyl ether moins toxique que les solvants et réutilisé, pas cher	Kuyukina, M.S. et al. (2001), Philp, J.C. et al. (2002)
Centrifugation	Biosurfactants insolubles	Centrifugeuse	Réutilisable et efficace dans la récupération des biosurfactants bruts	Nitschke, M. and Pastore, G. (2006)
Fractionnement de la mousse	Biosurfactants répartis dans la mousse	Bioréacteurs conçus spécialement pour faciliter la récupération de mousse au cours de la fermentation	Biosurfactants de grande pureté	Noah, K.S. et al. (2002), Davis, D.A. et al. (2001)
ultrafiltration membranaire	Les biosurfactants sous forme de micelles (au dessus de leur CMC), qui sont piégés par des membranes polymères	Unité d'ultrafiltration avec membrane polymère poreuse	Etape de récupération rapide, grande pureté	Ramnani, P. et al. (2005), Sen, R. and Swaminathan, T. (2005)
Adsorption dans la résine de polystyrène	Les biosurfactants sont adsorbés dans les polymères résines ensuite désorbés avec les solvants organiques	Des colonnes en verre contenant de la résine de polystyrène	Etape de récupération rapide, grande pureté	Reiling, H.E. et al. (1986)
Adsorption sur du charbon activé (bois)	Les biosurfactants sont adsorbés dans du charbon activé et peuvent être désorbés en utilisant des solvants organiques	Pouvant être ajouté au bouillon de culture, ou mis dans des colonnes en verre	Biosurfactants très purs, moins chers. Réutilisation du charbon	Dubey, K.V. et al. (2005)
Chromatographie échange d'ions	Les biosurfactants chargés sont joints à des résines échangeuses d'ions et peut être élué avec un tampon	les résines échangeuses d'ions emballés dans les colonnes	haute pureté, réutilisable, une récupération rapide	Reiling, H.E. et al. (1986)

Les BS très purs exigés dans les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire nécessiteront les dernières méthodes de séparation citées précédemment et ils sont non toxiques (solvants organiques non utilisés).

## I.6 Intérêts des biosurfactants :

Les tensioactifs sont utilisés dans de différentes formulations ; la production mondiale de surfactants chimiques se chiffre à plus de 3 millions de tonnes par année et la demande pour les surfactants continue à croître de 35% par an (Soon Han Kim et al, 2000).

La plupart des surfactants sont d'origine chimique et des dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables.

C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés aux biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont des propriétés uniques qui sont :

- **Biodégradabilité élevée** : les biosurfactants sont biodégradables à pas moins de 99.96% et ne génèrent aucun résidu nocif, alors que les tensioactifs laissent toujours 4 à 5% de résidus nocifs dans l'eau et le sol.

- **Toxicité basse** : les biosurfactants se sont avérés 10 fois moins toxiques pour les puces d'eau et les algues que les tensioactifs chimiquement synthétisés.

En plus, ils possèdent une stabilité élevée dans le cas des micro-organismes extrémophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes (Ron E.Z et al, 2002). Ils peuvent être produits sur des substrats renouvelables. Cependant, le coût de production des biosurfactants demeure encore assez élevé et fait limiter leur utilisation.

Les substrats de croissance pour les micro-organismes producteurs sont peu coûteux, mais les rendements de production sont faibles et les coûts de séparation et de purification sont parfois élevés.

## I.7-Conclusion

Les bactéries produisent des molécules qui sont capables de diminuer les tensions interfaciales. Elles peuvent être des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des liposaccharides ou des acides gras. La production de ces molécules dépend de plusieurs facteurs qui sont les sources de nutrition, la température, le pH, le taux d'oxygène et l'agitation.

---

## **CHAPITRE : II**

# **CARACTERISATION DES BIOSURFACTANTS.**

---

### **II.1 Introduction**

Les biosurfactants sont des agents de surface, ils ont tendance à migrer vers les interfaces, en particulier l'interface air-liquide et en conséquence d'abaisser la tension superficielle de l'eau et en général la tension interfaciale entre les interfaces huile/eau, solide/liquide. Cette diminution de tension de surface facilite de nombreux procédés technologiques tels que l'émulsification, la formation de mousse et le mouillage des surfaces.

La diminution de la tension de surface favorise l'affinité de deux phases non miscibles et la dispersion de l'une dans l'autre. Au fur et à mesure que les molécules tensioactives migrent vers la surface, elles forment un film monomoléculaire dont les caractéristiques (résistance à la compression, élasticité) sont notamment corrélées à la stabilité des dispersions.

Des agrégats ou micelles se forment spontanément à partir de la concentration micellaire critique du tensioactif biologique.

Les biosurfactants sont caractérisés par des méthodes physico-chimiques et analytiques.

### **II.2 Propriétés des agents tensioactifs**

Les propriétés essentielles des composés tensioactifs qui permettent de comprendre les phénomènes observés et qui déterminent leurs domaines d'applications sont :

- l'adsorption aux interfaces qui provoque une diminution des tensions interfaciales. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification.
- l'auto association ou auto-aggrégation (ex. micellisation) qui gouverne les propriétés de solubilisation et de microémulsification.

#### **II.2.1 Tension superficielle**

L'origine de la tension superficielle réside dans la distribution anisotrope des forces d'attraction subies par les molécules d'un liquide à sa surface de contact avec l'air. Au sein du

liquide (pur), toute molécule est soumise de la part des autres à des forces attractives dont la résultante est nulle.

En revanche, une molécule à la surface subit une force d'attraction nette dirigée vers l'intérieur du liquide puisque les forces d'attraction de la part des molécules d'air sont négligeables. La surface de contact entre l'air et l'eau est donc réduite à son minimum. A l'inverse, augmenter l'air de la surface de contact (interface) nécessite l'application d'une force et la réalisation d'un travail proportionnel à l'accroissement de surface visé. De ce fait, la tension superficielle se traduit par l'augmentation de l'énergie du système lorsqu'une molécule est déplacée du volume vers la surface et voit son nombre de premier voisin diminuer (Stocks et Evans, 1997).

Si des molécules tensioactives sont introduites dans une solution aqueuse, elles vont s'adsorber à l'interface air-liquide pour réduire le contact entre leur partie hydrophobe et l'eau tout en conservant leur partie hydrophile en solution. En conséquence, certaines molécules d'eau à l'interface vont être remplacées par des molécules de tensioactif ce qui va conduire à une réduction de la tension superficielle. Cette diminution de tension superficielle facilite de nombreux phénomènes tels que la formation de mousse, d'émulsion, le mouillage d'une surface, etc. Plus généralement, la diminution de la tension superficielle favorise l'affinité des deux phases non miscibles et la dispersion de l'une dans l'autre.

## II.2.2 Adsorption aux interfaces

Les molécules de tensioactifs comportent une partie hydrophile et une partie lipophile et ont tendance à se concentrer aux interfaces et à s'orienter de façon à augmenter les interactions attractives (partie hydrophile /eau et partie lipophile /phase lipophile).

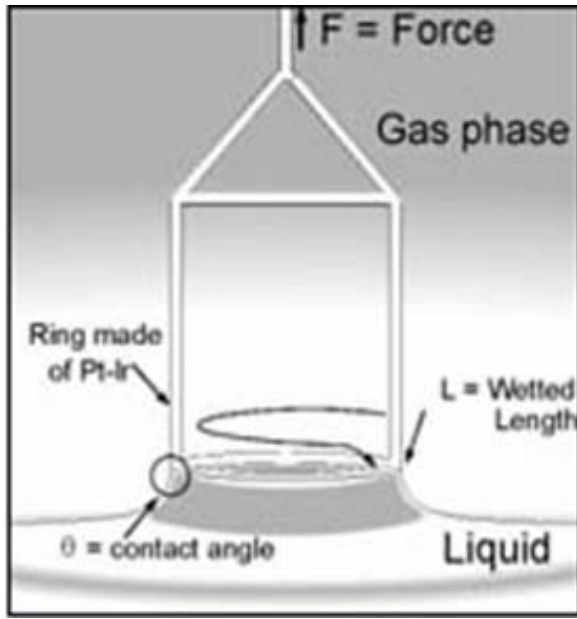
Ce phénomène d'adsorption (concentration plus importante à la surface qu'à l'intérieur de la phase liquide) apparaît aussi bien aux interfaces liquide-liquide (eau-hydrocarbure ou huile), liquide-solide(eau-surface apolaire, huile-surface polaire) qu'aux interfaces liquide-gaz (eau-air).

Cette adsorption du tensioactif provoque une diminution de la tension interfaciale entre les deux phases considérées selon la loi de Gibbs, la diminution de la tension interfaciale est fonction de la concentration en tensioactif à l'interface (excès superficiel) et donc de l'aire occupée par le tensioactif à l'interface. Lorsque l'interface est saturée, la tension interfaciale est minimale et constante.

L'adsorption des tensioactifs aux interfaces et la diminution consécutive de la tension interfaciale sont responsables des deux phénomènes : la dispersion et le mouillage.

Les tensions interfaciale et superficielle sont mesurées, généralement, à l'aide d'un tensiomètre à anneau.

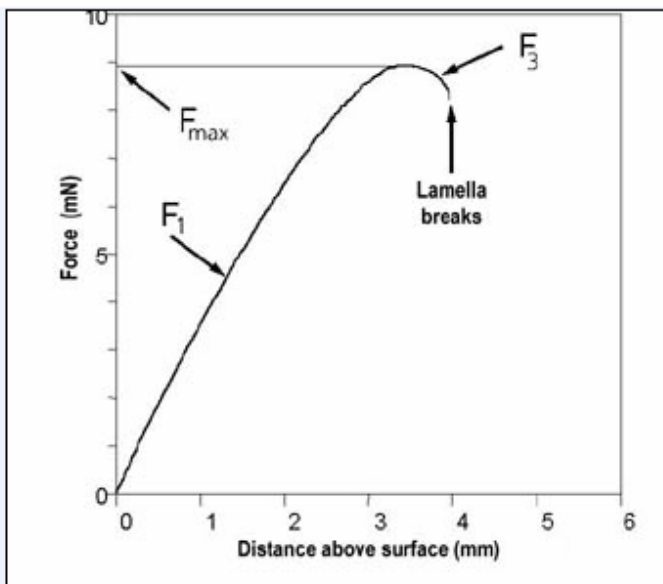
Dans la méthode de l'anneau, le liquide est amené vers la sonde jusqu'à la détection de contact avec la surface. L'échantillon est alors de nouveau déplacé, dans la direction opposée cette fois, conduisant à l'étirement d'un film au dessous de l'anneau comme décrit dans la figure II.1.



Gas phase : phase gazeuse  
 Liquid : liquide  
 Contact angle : angle de contact  
 Wetted length : partie mouillée  
 Ring made of Pt-Ir : anneau en Pt-Ir

Figure II.1 : Schéma descriptif de la méthode de l'anneau

Au cours de l'étirement du film du liquide, la force exercée sur la sonde est enregistrée par la balance, et le système passe par un seuil où la force est maximale. En ce point précis, le vecteur force est exactement parallèle à l'axe de déplacement vertical et l'angle de contact est égal à  $0^\circ$ . Le graphe de la figure II.2 montre l'évolution de la force en fonction de l'augmentation de la distance entre l'anneau et le liquide.



Lamella breaks : rupture du film de l'anneau  
 Distance above surface : distance anneau-surface

Figure II.2 : Evolution de la force en fonction de la distance anneau/surface

En pratique, la distance est d'abord augmentée jusqu'à dépasser la position où la force est maximale. Puis le cristalliseur avec le liquide échantillon est de nouveau rapproché de l'anneau, croisant une seconde fois la position du maximum. C'est lors de ce retour que le maximum de la force exercée est déterminé avec précision et utilisé pour le calcul de tension. Le calcul est effectué suivant l'équation :

$$\sigma = \frac{F_{\max} - F_V}{L \cdot \cos \theta} \quad (\text{II.1})$$

- $\theta$  : angle de contact
- $\sigma$  : tension de surface ou interfaciale
- $L$  : périmètre de mouillage
- $F_{\max}$  : force maximale
- $F_V$  : poids du volume de liquide soulevé

L'angle de contact décroît au fur et à mesure que l'étirement augmente et atteint la valeur de 0° au point où la force est maximale, ce qui implique que le cosinus de l'angle est égal à 1. La rupture du film montré sur la figure II.2 est généralement évitée au cours de la mesure de la tension. Néanmoins, le point de rupture du film peut aussi être mesuré en utilisant la méthode de la rupture du film de l'anneau.

### **II.2.3 Concentration Micellaire Critique (CMC)**

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (Poré, 1992). Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles (Haigh, 1996). En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (Figure II-3)

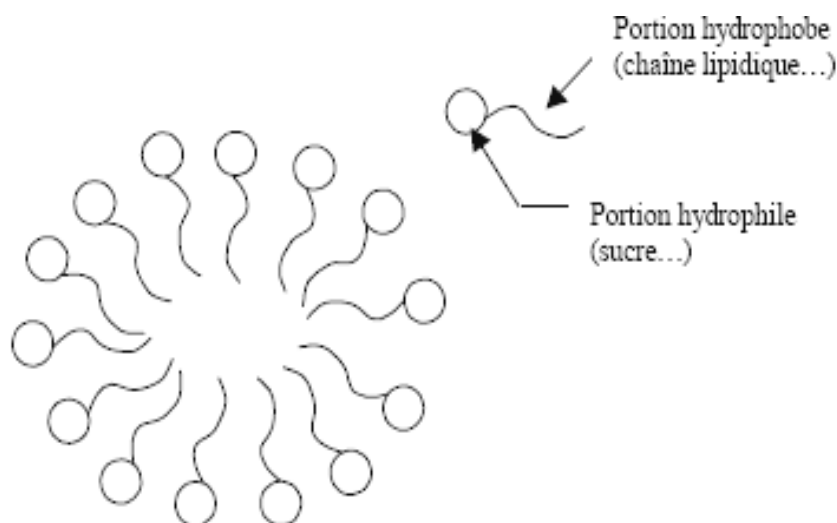


Figure II-3 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale. Pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure. La plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieurs aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure (Mata-Sandoval et al., 2000). Les CMC obtenues pour beaucoup de biosurfactants varient de 1 à 200 mg.L<sup>-1</sup> (Zhang et Miller, 1992 ; Abalos et al., 2001).

La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (Edwards et al., 1991). Les effets des électrolytes sur la CMC sont plus prononcés pour les surfactants ioniques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (Haigh, 1996).

Haba *et al.* (2003) indiquent que le rapport et la composition des homologues de surfactant, la présence de liaisons insaturées, la ramification et la longueur de la chaîne alkyle ou la taille de la tête hydrophile affectent la valeur de la CMC. La CMC des composés insaturés est supérieure à leurs homologues saturés. Ceci peut être attribué à des facteurs stériques pendant la formation des micelles.

#### II.2.4 Le rapport hydrophile- lipophile (HLB)

Le HLB, selon Griffin, compris entre 1 et 50 permet de décrire la polarité des différentes molécules de tensioactifs. Sa valeur est une fonction directe de l'importance de la partie hydrophile dans la molécule : elle est élevée lorsque la fraction hydrophile est importante et faible si la molécule est majoritairement lipophile (figure II.4). Par conséquent une valeur de HLB proche de 1 caractérise un produit très peu soluble alors qu'une valeur supérieure à 20 indique que le produit est très soluble. Les composés dont le HLB se situe entre 15 et 18 sont

les plus efficaces en détergence puisqu'ils sont relativement solubles dans l'eau tout en possédant un caractère lipophile important, favorable à l'émulsification. Il est nécessaire de préciser que le HLB est déterminé à une température donnée et qu'il peut varier de façon considérable lorsque les conditions changent.

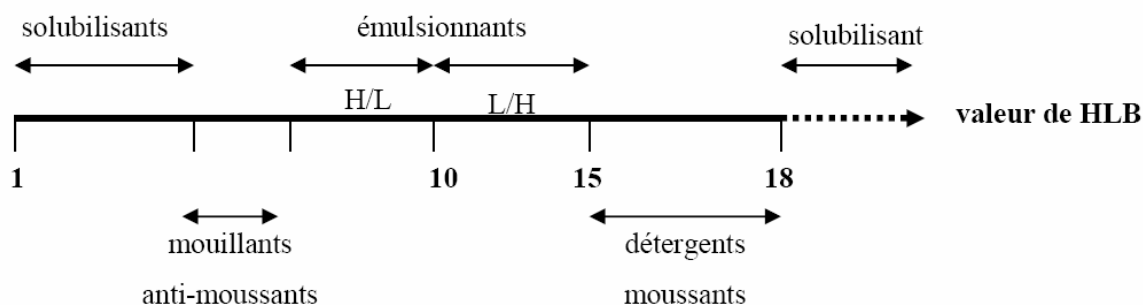


Figure.II.4 : Classification des tensioactifs selon leur HLB

H : hydrophile

L : lipophile (hydrophobe)

### II.2.5 Solubilité des tensioactifs en fonction de la température :

Pour les tensioactifs ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température (**Figure II-5**) fait apparaître un comportement irrégulier : à partir d'une certaine température  $T_k$  dite température de Krafft, la solubilité augmente brusquement. Sur ce même graphe, la courbe représentant la CMC en fonction de la température a été ajoutée. La température de Krafft correspond à l'intersection de la courbe de solubilité et celle de la CMC.

En dessous du point de Krafft, la solubilité est faible ; elle est uniquement due aux monomères présents en solution. Lorsque ces derniers atteignent la saturation (à la CMC), le tensioactif précipite sous forme de solide hydraté. Au dessus de  $T_k$ , la solubilité croît rapidement avec la température : ceci est liée à la formation de micelles puisque l'activité des micelles reste constante (Shimoda et Fontell, 1995). Ce sont les micelles qui font croître la solubilité. Le tensioactif se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères.

La température de Krafft des tensioactifs anioniques varie en fonction de la nature du groupement hydrophobe, mais également des ions présents en solution.

Les tensioactifs non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble.

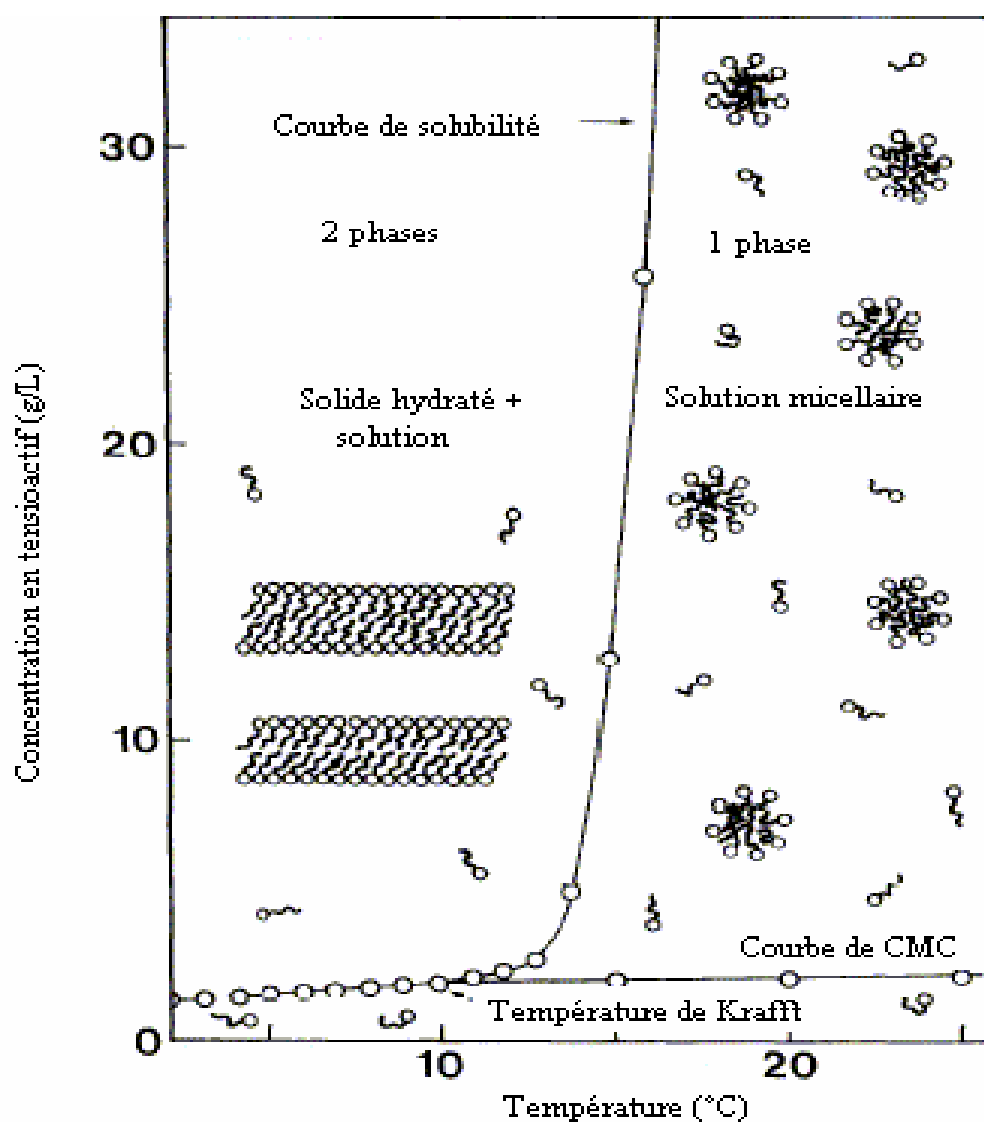


Figure II-5 : Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température (Shinoda et Fontell, 1995).

La figure II-6 nous montre les variations des tensions superficielle et interfaciale ainsi que la solubilité au-delà de la concentration micellaire critique ( c'est-à-dire de la concentration du biosurfactant.

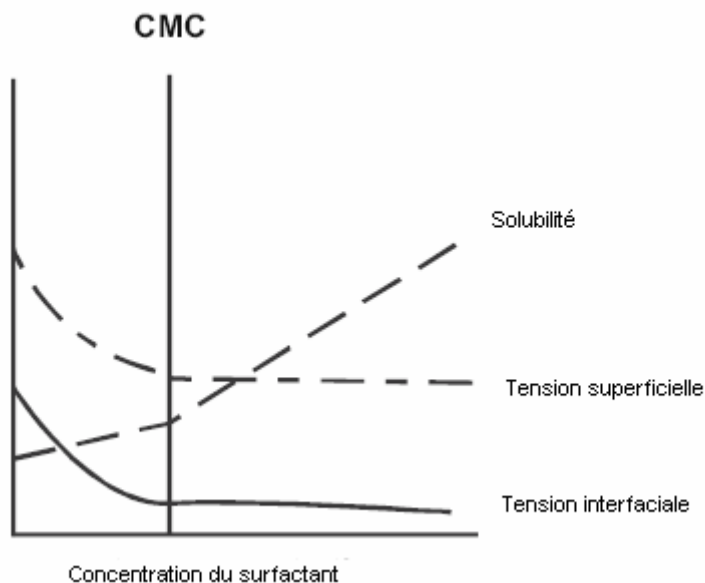


Figure II.6 Variation de la solubilité, des tensions interfaciale et superficielle en fonction de la concentration du surfactant (Mulligan C.N,2005).

### II.2.6 Toxicité et biodégradabilité :

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. Edwards *et al.* (2003) ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menidia Beryllina*). Ces auteurs concluent que les biosurfactants ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques. Par exemple, l'Emulsan qui est le biosurfactant le moins toxique de l'étude, présente une  $CL_{50}$  (concentration létale) supérieure à 200 mg.L<sup>-1</sup>.

A titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, a une  $CL_{50}$  de 2,5 à 6 mg.L<sup>-1</sup>. Le **Tableau II-1** regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques.

Des tests de toxicité (oculaires et dermiques) réalisés par Haba *et al.* (2003) ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

Tableau II-1 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (Christofi et Ivshina, 2002).

Surfactant	Origine	CE <sub>50</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
<i>Rhodococcus ruber</i> AC 235 glycolipide complexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>		49
Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>		286
Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50
Stéarate de sucrose (DK 50)		67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP 22		0.004

CE<sub>50</sub> : concentration effective à 50 %, c'est à dire affectant 50 % de la population testée

## II.3 Caractérisation physicochimique des biosurfactants

### II.3.1 Pouvoir émulsifiant

La préparation et la stabilisation d'émulsions, dispersions d'un liquide (eau ou huile) dans un liquide non miscible (huile ou eau), requiert la présence d'un ou de plusieurs composés tensioactifs dont le rôle est de diminuer la tension interfaciale eau/huile afin de permettre la dispersion (augmentation de l'air de l'interface).

Par conséquent, la capacité du tensioactif à diminuer la tension interfaciale entre les deux phases à émulsionner constitue un critère de choix du tensioactif.

D'autres critères plus facilement accessibles peuvent être utilisés. En règle générale, le tensioactif doit présenter une bonne affinité pour la phase continue : l'obtention de type huile dans l'eau (H/E) nécessite un tensioactif à caractère plutôt hydrophile et inversement une émulsion de type eau dans l'huile (E/H) fera appel à un tensioactif à caractère lipophile.

Les bioémulsifiants sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes. Les émulsifiants s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface (Fiechter, 1992).

Le rôle physiologique des bioémulsifiants est de permettre aux microorganismes qui les produisent de se développer sur des substrats non miscibles à l'eau.

En effet, les bioémulsifiants permettent l'émulsification de la source de carbone et ainsi l'augmentation de la surface des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau. Ils augmentent aussi la biodisponibilité de ces substrats en augmentant leur solubilité apparente ou en les désorbant des surfaces. Ils régulent l'adhésion et le détachement des cellules aux surfaces.

Certains ont la capacité de se lier aux métaux lourds, d'autres sont associés à la synthèse de produits pathogènes par les microorganismes et enfin, nombre de bioémulsifiants ont des propriétés antibiotiques qui jouent un rôle lors de la sporulation (Ron et al, 2001 ; Larpant, 1993).

### II.3.2 Pouvoir mouillant

En raison de la complexité des phénomènes d'adsorption et de mouillage (influence des paramètres des tensions interfaciales, influence de la nature du solide), il est difficile d'établir des relations générales entre la structure d'un composé tensioactif et ses propriétés d'agent mouillant.

Un certain nombre de critères de choix des agents mouillants doit cependant être souligné (Larpant, 1993). On cite en particulier, la balance hydrophile lipophile (HLB) (voir Fig. II.4 : Classification des tensioactifs selon leur HLB).

Les propriétés optimales sont généralement obtenues pour des groupements hydrophobes de 12 à 14 atomes de carbone.

Dans le cas de tensioactifs comportant plusieurs groupements polaires, les atomes de carbone situés entre deux fonctions polaires contribuent pour moitié au pouvoir mouillant par rapport à un atome de carbone d'une chaîne linéaire .

Dans le cas des tensioactifs anioniques, la présence d'un second groupement polaire (amide, ester, éthoxyl) provoque en général une diminution du pouvoir mouillant.

Dans le cas des tensioactifs non ioniques polyéthoxylés, les propriétés mouillantes sont fonction du nombre  $n$  des motifs éthoxy.

Les propriétés d'agent mouillant d'un tensioactif sont influencées par des facteurs externes tels que la température , le pH, la présence d'électrolytes ou l'addition de composés organiques polaires , l'accroissement de température diminue en général les propriétés de la plupart des tensioactifs ioniques (Larpant, 1993) .

Pour un type de tensioactif ionique donné, la longueur de chaîne optimale croît avec la température d'utilisation.

Les électrolytes qui provoquent une diminution de tension de surface des solutions de tensioactifs améliorent le mouillage. Le pH influence sur les propriétés d'agent mouillant des tensioactifs comportant des groupements polaires faiblement acides ou basiques.

L'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité est déterminée par la mesure de l'angle de contact (Annexe 3)

### II.3.3 Pouvoir moussant

La formation de mousse, dispersions d'un gaz (air) dans un liquide (eau), requiert la présence d'agents tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau-air. Le choix du tensioactif et des additifs est primordial pour contrôler le niveau de mousse et sa stabilité (Puisieux et al 1983).

Les paramètres responsables de la stabilisation des mousses sont :

- Une viscosité importante de la phase liquide (rôle des additifs polymériques).
- Une grande viscosité de surface (rôle du tensioactif).
- L'élasticité du film.
- Les répulsions électrostatiques et stériques entre les interfaces adjacentes (rôle des tensioactifs ioniques et non ioniques ou macromoléculaires).

Tous ces critères peuvent être retenus pour choisir les tensioactifs et la concentration requise.

### II.3.4 Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les biosurfactants montrent un pouvoir antimicrobien qui peut être dû aux interactions avec les membranes lipidiques des cellules.

L'activité antimicrobienne d'un biosurfactant sur une souche bactérienne peut être évaluée par une donnée mesurable que l'on appelle « Concentration Minimale Inhibitrice » (CMI) qui représente la concentration minimale en biosurfactant suffisante à inhiber la croissance de l'espèce microbienne, dans des conditions expérimentales bien précises (Vollenbroich et al, 1997).

## II.4 Caractérisation structurale :

La structure des biosurfactants peut être déterminée par de différentes méthodes d'analyse :

- **Spectroscopie infrarouge** : est basée sur l'adsorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Suite à la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, elle nous indique les fonctions chimiques présentes.
- **Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse**
- **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**  
Ces deux dernières méthodes nous donnent beaucoup d'informations sur la structure du biosurfactant : la masse molaire, les fonctions présentes et la structure de la molécule.
- **Caractérisation biochimique**  
Elle nous indique la présence de groupements sucres, lipides...

## **II.5 Conclusion :**

La caractérisation physico chimique d'un biosurfactant consiste à déterminer les différentes propriétés superficielles (mesure de la tension superficielle) et interfaciales (mesure de la tension interfaciale) : détergence, mouillage et émulsification ainsi que la CMC.

Les méthodes spectrométriques IR , SM couplé à la CG ainsi que la RMN nous permettent de déterminer sa structure chimique.

Des tests biochimiques et microbiologiques spécifiques sont aussi utilisés comme compléments analytiques.

---

## **CHAPITRE : III**

### **APPLICATIONS DES BIOSURFACTANTS.**

---

#### **III.1 Introduction :**

Actuellement, il existe de nombreux agents tensioactifs chimiques issus principalement du pétrole et largement utilisés presque dans tous les secteurs de l'industrie moderne. Ils sont généralement toxiques et non biodégradables et peuvent nuire à l'environnement. Pour pallier à ces inconvénients majeurs, ces tensioactifs doivent être remplacés par des biosurfactants. C'est la nouvelle industrie réorientée vers la technologie naissante qui est la biotechnologie.

Les biosurfactants ont gagné un intérêt considérable à cause de leurs propriétés physico-chimiques, ce qui leur confère une large gamme d'applications dans plusieurs industries, en particulier dans l'industrie pétrolière. Ces composés sont utilisés dans l'industrie pétrochimique. Ils ont un usage capital dans le nettoyage des réservoirs de stockage. Ils servent encore à la mobilisation du pétrole brut lourd et son transport dans les pipelines en diminuant sa viscosité. Le caractère de stabilité des biosurfactants dans des conditions extrêmes de température, pH et salinité leur confère le pouvoir d'intervenir dans les procédés d'extraction dans les champs de pétrole.

#### **III.2 Utilisation des biosurfactants en fonction de leurs propriétés:**

Les biosurfactants sont reconnus pour être non ou peu toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (Desai et Banat ,1997 ; Banat et al, 2000).

C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines (**Tableau III-1**). Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique et dans la bioremédiation (Desai et Banat, 1997 ; Christofi et Ivshina, 2002).

Tableau III-1 : Utilisations potentielles des biosurfactants (Banat et al, 2000).

<b>Fonction</b>	<b>Champ d'application</b>
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures
Solubilisant et microémulsions	Pharmaceutique, articles de toilette
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textile, peinture
Détergent	Nettoyant ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie
Agent moussant	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais
Agent épaississant	Peintures
Agent séquestrant des métaux	Minerais
Aide à la croissance bactérienne	Traitement d'huiles usagées pour boues, fermentation
Dé-émulsifiant	Traitement de déchet
Agent réducteur de viscosité	Transport par pipeline
Dispersant	Séparation des mélanges goudron /pétrole ou goudron/eau
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole Métaux lourds

Une étude réalisée par Deschênes et al (1996) reporte que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations (500 µg de tensioactif.g<sup>-1</sup> de sol). Ces auteurs indiquent de plus que le surfactant était biodégradable. De même, Vipulanandan et Ren (2000) ont prouvé que la biodégradation du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphthalène.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Page et al (1999) qui expliquent le phénomène par le fait que les biotensioactifs sont des sous-produits ou des constituants membranaires

des micro-organismes. Il faut cependant noter que la biodégradation des tensioactifs biologiques pose un problème économique : en effet, pour éviter toute perte d'efficacité de dépollution, il est nécessaire d'augmenter les taux de tensioactifs appliqués, ce qui induit un surcoût.

### III.3 Applications des biosurfactants dans l'industrie :

#### III.3.1 Industrie pétrolière :

Le secteur important pour l'application des biosurfactants est l'extraction du pétrole adsorbé sur la roche (MEOR : Microbial Enhanced Oil Recovery : Récupération du pétrole assistée par l'activité microbienne) des forages du pétrole brut.

Cette extraction se fait après les récupérations primaire et secondaire du pétrole, et elle est appelée récupération tertiaire. Elle utilise des micro-organismes et/ou leurs métabolites pour la récupération du pétrole résiduel (Banat ,1995).

Pour que la MEOR soit utile, les bactéries doivent pouvoir se développer dans les réservoirs d'huile dans des conditions extrêmes de haute température, de pression et de salinité .

L'efficacité de la MEOR a été rapportée sur des études sur le terrain effectuées dans plusieurs pays.

Banat et al ont testé à l'échelle pilote la capacité des biosurfactants à nettoyer un réservoir et à récupérer les hydrocarbures dans la boue émulsifiée .Ils ont utilisés deux tonnes de culture de *Pseudomonas* contenant des Rhamnolipides ,pour traiter 850m<sup>3</sup> de boue .Ils ont récupéré environ 91% (774m<sup>3</sup> ) de pétrole brut valorisable ,le reste, soit 76m<sup>3</sup> de matériaux divers ne contenant pas d'hydrocarbures.

La récupération du pétrole assistée par l'activité microbienne permettant de diminuer ou d'éliminer l'utilisation de produits chimiques puissants, elle représente une méthode de récupération tertiaire du pétrole compatible avec la protection de l'environnement.

#### III.3.2 Industrie alimentaire :

L'évaluation de la capacité d'émulsification des biosurfactants est en général mesurée en utilisant du kérosène parce que leur application potentielle est l'environnement.

Quelques tentatives de mesures d'évaluation des émulsions formées par des BS en utilisant des huiles et des graisses ont été réalisées pour être utilisés dans l'industrie alimentaire.

Par exemple,un lipopeptide obtenu à partir de *Bacillus substilis* était capable de former des émulsions stables avec l'huile de graine de soja et la graisse de noix de coco (Nitschiki et Pastore,2006) qui peut être suggéré comme agent émulsifiant dans des produits alimentaires.

Aussi, le liposan émulsionne les huiles comestibles (Cirigliano and Carman, 1989).

Les BS interviennent dans les formulations comme agent anti-adhésif.

Mis à part leur rôle évident comme agent qui réduit les tensions de surface et interfaciale, donc dans la formation et la stabilisation des émulsions, ils peuvent avoir plusieurs autres fonctions dans les produits alimentaires, par exemple :

- contrôler l'agglomération des graisses.
- améliorer la texture des produits.
- modifier les propriétés rhéologiques des pâtes à base de blé et améliorer la consistance.
- utiliser comme stabilisateur.

L'addition des rhamnolipides améliore la stabilité, le volume, la conservation et la texture des produits en boulangerie (Van Hesendouck et Vanzeveren, 2004).

La lécithine et ses dérivés sont actuellement utilisés comme émulsifiant dans l'industrie alimentaire.

### **III.3.3 Industrie cosmétique :**

Les produits de beauté et de soins corporels contiennent des agents tensioactifs qui sont utilisés comme agents solubilisant, mouillant, moussant, décapant et émulsifiant.

Les BS trouvent leur place dans cette industrie en raison de leur basse toxicité et des bonnes propriétés hydratantes et une compatibilité avec la peau.

Les sophorolipides sont utilisés comme agents mouillants dans certains produits cosmétiques.

### **III. 3.4 Application thérapeutiques :**

Plusieurs BS ont des propriétés thérapeutiques et biomédicales, ils sont antibactériens, fongicides et antiviraux (Banat et Desai, 1997 ; Rodrigues, 2006).

La surfactine, un des BS connus est utilisée, dans des applications pharmacologiques pour éviter la formation des caillots de sang et l'hémolyse (Bernheimer et Avigard, 1970).

Certains BS permettent aux médicaments d'être plus émulsionnés pour faciliter le transport de ces médicaments à l'endroit où s'est déclaré l'infection.

Ils peuvent être utilisés comme adjuvants pour des vaccins (Taylor et al, 1985 ; Kosaric, 1996).

### **III.3.5 Autres applications :**

Les BS ont d'autres applications potentielles comme dans les industries du papier, des textiles, des céramiques, le traitement des minerais d'uranium ainsi que dans l'agriculture pour diluer et disperser les engrais et les pesticides (Kosaric et al, 1987).

Le biodispersan, un BS obtenu à partir de l'*Acinetobacter calcoaceticus* A<sub>2</sub> est utilisé dans l'industrie de peinture, il donne un meilleur aspect à la peinture et améliore ses propriétés lors des mélanges (Rosenberg et Ron, 1998).

### III.4 Applications environnementales des biosurfactants :

#### III.4.1 Remédiation des sols pollués par les hydrocarbures polyaromatiques :

##### III.4.1.1 Introduction :

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

Des études ont été réalisées sur la dégradation des hydrocarbures par des bactéries présentes dans le sol contaminé. Les BS augmentent la solubilité des contaminants hydrophobes.

Des micro-organismes peuvent être ajoutés au sol souillé avec l'addition des facteurs de croissance ce qui engendrera une production de BS (Lang S et Wullbrandt D, 1999).

La biodégradation d'hydrocarbures des sols contaminés avec et sans ajout de BS a été considérée. Le système étudié contient 10% de sol et 1.35% de mélange d'hydrocarbures dans une solution minérale. En absence de surfactant, 81% de mélange d'hydrocarbures sont dégradés en 114 heures, tandis qu'en présence de BS (Sophorolipides) plus de 90% du mélange d'hydrocarbures sont dégradés en 79 heures.

Herman et al ont travaillé sur l'effet de rhamnolipide dégradant les hydrocarbures enfermés dans des matrices poreuses avec une concentration de ce BS au dessus de la concentration micellaire (CMC). En dessous de cette concentration, ils ont constaté une augmentation de minéralisation d'hydrocarbures enfermés.

##### III.4.1.2 La biodégradation

La dépollution du sol se fait par des biosurfactants. Ces derniers dégradent les polluants organiques qui seront utilisés comme source de carbone. La décontamination se fait in situ en introduisant dans le sol les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien ex situ.

De différents micro-organismes sont utilisés pour la dégradation des hydrocarbures tels que *Artrobacter*, *Novocadia* ou *Pseudomonas*.

L'adsorption du BS sur le sol résulte d'interactions énergétiquement favorables entre l'adsorbat qui est le sol et le soluté. Le tensioactif s'adsorbe en trois étapes comme décrit dans la figure III.1.

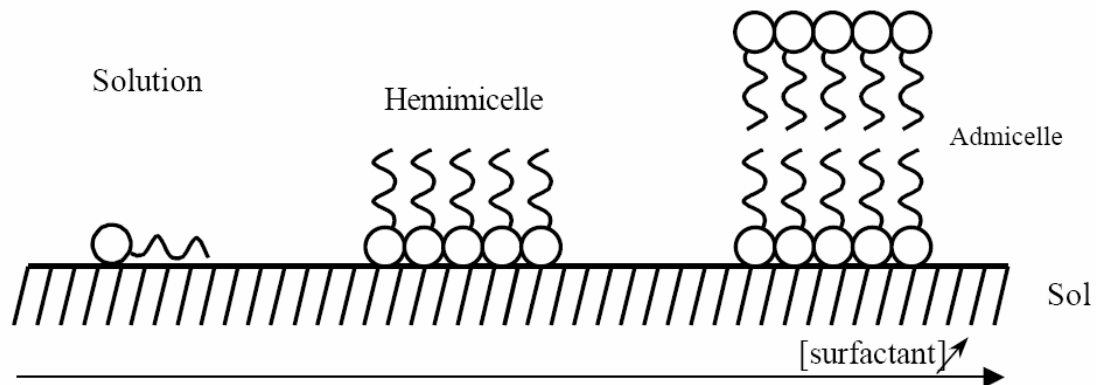


Figure III.1 Représentation schématique de l'adsorption de surfactant sur un sol (West et Harwell, 1992)

#### III.4.1.3 Mode d'action :

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

Enfin le caractère peu toxique et biodégradable des biotensioactifs facilite leur utilisation.

De nombreux auteurs expliquent que les tensioactifs agissent par mobilisation et par solubilisation.

##### **-La mobilisation :**

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des surfactants à diminuer les tensions interfaciales entre la phase liquide non aqueuse (NAPL) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface de NAPL (McCray et al, 2001).

La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales (Abdul et Gibson, 1991 ; Bai et al, 1997). La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions.

##### **-La solubilisation :**

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

La Figure III.2 schématise le mode d'action des tensioactifs .Le rôle principal du tensioactif est de solubiliser les molécules hydrophobes en les piégeant dans la pseudo phase hydrophobe formée par les micelles qui permettra d'augmenter la solubilité apparente des polluants (HAP) décrit par un coefficient de partage  $K_d$ , cmc.

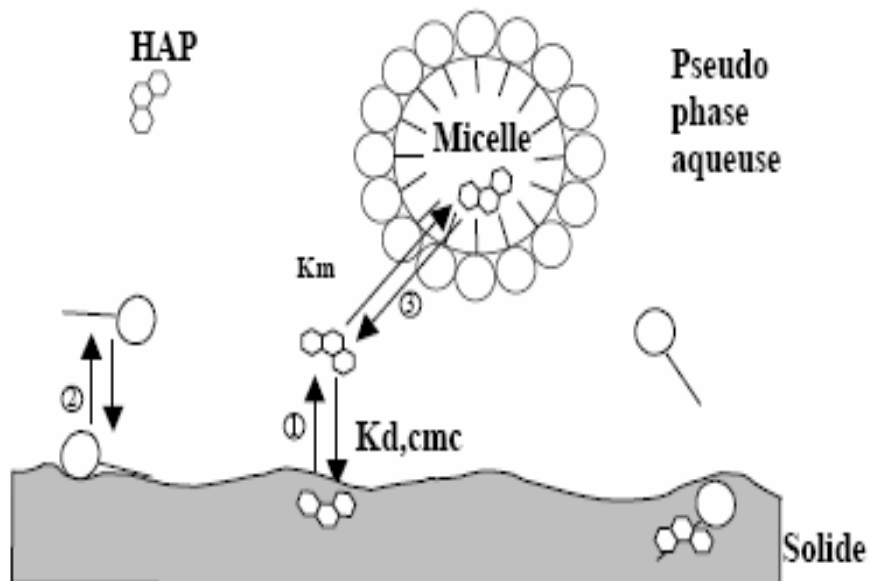


Figure III.2 : Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant (Edward et al ,1994).

Les résultats de l'efficacité des BS par rapport aux surfactants chimiques donnés dans le Tableau III.2 sont difficilement comparables du fait d'une grande diversité de conditions opératoires utilisées (types de sols et de polluants, conditions d'extraction, nature du surfactant, etc.). Néanmoins, les études de laboratoire semblent montrer les bonnes prédispositions des biosurfactants pour la dépollution. En effet ces derniers possèdent des efficacités comparables voire supérieures à leurs homologues chimiques.

Ceci, associé à leurs propriétés non agressives envers l'environnement laisse entrevoir un fort potentiel d'utilisation de ces tensioactifs pour la remédiation de sols contaminés.

Tableau III.2 : Quelques résultats de comparaison de l'efficacité des biosurfactants par rapport aux surfactants chimiques.

Tensioactif et concentration	Polluant	Débit (Q en ml.min <sup>-1</sup> ) ou Vitesse de pore (V en cm.h <sup>-1</sup> )	Remobilisation				Références
			Nb V <sub>p</sub> pour 50 % d'élimination		Nb V <sub>p</sub> pour 90 % d'élimination		
Biosurfactant UG2 (500 mg.L <sup>-1</sup> )	Phénanthrène	Sol 1, Q= 2 Sol 2, Q= 0,4 Sol 3, Q= 0,6 Sol 4, Q= 2	EUP	BS	EUP	BS	Noordman <i>et al.</i> (2000 a)
			88	17	337	135	
			5,3	3,1	22	9,6	
			9,8	3,6	53	51	
			91	19	585	166	
Biosurfactant 57SJ (g.L <sup>-1</sup> ) 2,5 1,75 1,0 0,6	Pyrène (50 µg.g <sup>-1</sup> de sol)	Q= 0,4	% remobilisé après 26 V <sub>p</sub>			Bordas et Lafrance (2001)	
		75					
		50					
		20					
			10				
(500 mg.L <sup>-1</sup> ) Biosurfactant ATCC 9027 Dodecyl Sulfate Sodium	Hexadécane	V = 15	Sable 20/30 mesh 84 /	Sable 40/50 mesh 22 6,1		Bai <i>et al.</i> (1997)	
Witconol SN70 (g.L <sup>-1</sup> ) 5 10 20	BPC : Arochlor (1728 µg.g <sup>-1</sup> )	Q= 1	% remobilisé après 20 V <sub>p</sub>			Abdul et Gibson (1991)	
			66				
			86				
			56				
Biosurfactant UG2 (g.L <sup>-1</sup> ) 2,5 / 5 DSS 2,5 / 5	Pyrène (50 µg.g <sup>-1</sup> de sol)	V = 15	% remobilisé après 8 V <sub>p</sub>			Lafrance et Lapointe (1998)	
			18 / 42				
			4 / 32				
DSS (17 g.L <sup>-1</sup> )	Anthracène 188 µg.g <sup>-1</sup> 19 µg.g <sup>-1</sup>	Q=300	13 % éliminés après 2,5 V <sub>p</sub> 90 % éliminés après 4 V <sub>p</sub>			Roy <i>et al.</i> (1994)	

### III.4.2 Biorémédiation des sols contaminés par des métaux lourds :

Il est bien connu que les cellules microbiennes peuvent provoquer une chélation des métaux dans la solution. Dans beaucoup de travaux, les exopolysaccharides ont été utilisés pour chélation. Kaplan et al (1987), Miller (1995) ont rapporté que l'addition des BS favorisaient la désorption des métaux lourds des sols de deux façons :

- la première par complexation de la forme libre du métal qui diminuera par la suite l'activité du métal en favorisant sa désorption,
- la seconde manière, le BS s'accumule à l'interface solide-solution lorsque la tension interfaciale est réduite, provoquant sa désorption du sol.

L'avantage de l'utilisation des BS lors de la biorémédiation est que plus les exopolymères ont un petit poids moléculaire, plus les agents de chélation chimiques sont biodégradables.

Tan et al ont étudié le pouvoir des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* AT CC 9027 à éliminer les métaux des sols contaminés avec le Cadmium.

L'utilisation d'une solution de concentration de 5mM de rhamnolipide a engendré la complexation de 92% de  $Cd^{+2}$  d'une solution de 0.5 mM de  $Cd(NO_3)_2$ .

### III.4.3 Biorémédiation marine

La biorémédiation, en général, vise à fournir des traitements de réduction de la concentration d'un ou d'un mélange de contaminants de l'environnement.

La production mondiale de pétrole atteignant les océans, par des accidents multiples, a été estimée à 0.08 – 0.4% .

Plusieurs déversements d'hydrocarbures ont eu lieu ces dernières années et ont engendré la contamination des océans et aux environs des rivages comme par exemple, en 1978, sur les côtes de Bretagne , en 1997 dans le Golf de Venezuela .Pendant la guerre du Golf ,en 1991 ,  $10^5$  tonnes d'huile ont été déversées dans les eaux du Golf , menaçant la désalination des plantes et tout l'écosystème côtier (Peace 1993).

De tels incidents ont conduit au développement de différents produits chimiques pour combattre cette pollution de la mer et aux bords des rivages.

Des BS ont été appliqués sur la plaque huileuse déversée par l'Exxon Valdez en 1989 (Harvey et al ,1990). La capacité des BS d'émulsifier les mélanges hydrocarbure – eau améliore la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement.

Les micro-organismes capables de dégrader les hydrocarbures, ont été isolés des milieux aquatiques (Brown and Braddock,1990) . D'après Chakrabarty , un émulsifiant produit par des *pseudomonas* SB30 était capable de dégrader l'huile en l'encapsulant dans des gouttelettes.

Harvey et al ont prouvé qu'un BS produit par *Pseudomonas aeruginosa* S8 était capable d'éliminer l'huile du gravier contaminé de l'Alaska dans de différentes conditions comme :

- différentes concentrations de BS,
- le temps de contact
- et la température de lavage.

### III.5 Conclusion :

Grâce à leur stabilité à haute salinité et aux différents pH ainsi qu'à leur faible toxicité et leur biodégradabilité, les BS sont de plus en plus utilisés dans de différents domaines agroalimentaire, médical et de différentes industries.

Ils sont utilisés dans la récupération tertiaire du pétrole et dans la bioremédiation des différents milieux pollués par les hydrocarbures, le pétrole et les métaux.

Ces diverses utilisations sont dues aux différentes propriétés des tensioactifs qui sont la solubilisation, le mouillage, le moussage et autres.

Le seul inconvénient est le coût du BS qui est surtout dû au prix de la réparation et la purification.

---

## CHAPITRE IV

### MATERIELS ET METHODES

---

#### IV.1. Objectif :

L'objectif principal de ce travail est la production et la caractérisation d'un biosurfactant, agent produit et utilisé comme émulsifiant, mouillant ou dispersant, par des cellules de micro-organismes appartenant à l'espèce *Pseudomonas fluorescens*.

La stratégie expérimentale est composée des étapes suivantes :

- Des cultures en batch sont effectuées en utilisant des cellules *Pseudomonas fluorescens* sous forme libre, dans le but d'étudier la capacité de la souche bactérienne choisie à produire un biosurfactant, en utilisant un milieu de culture contenant principalement une source de Carbone et une source d'Azote à des proportions données sous des conditions de température, pH initial et aération (agitation) fixées.

L'optimisation du milieu de culture pour la production du biosurfactant sera réalisée en utilisant différentes sources de Carbone et d'Azote qui sont utilisées comme substrats d'énergie et de croissance ou de nutrition, avec comme objectif de maximiser la production en biosurfactant, en choisissant comme réponses deux mesures physico-chimiques : la valeur de la tension superficielle qui doit être minimale et la valeur de l'indice d'émulsification (pouvoir émulsifiant) qui doit être maximale.

La production de biomasse ainsi que l'évolution du pH seront aussi suivies.

- Le produit obtenu sera séparé et caractérisé du point de vue structural et fonctionnel par des méthodes analytiques, physico-chimiques ainsi que des tests biochimiques spécifiques.
- La cinétique de production du biosurfactant sera suivie au cours du temps en mesurant la tension superficielle et l'indice d'émulsification dans les conditions optimales obtenues afin d'évaluer sa dépendance avec la croissance bactérienne et ses paramètres cinétiques

- La stabilité du biosurfactant, dans de différentes conditions de température, de pH et de salinité sera testée.
- L'étape finale consiste à une application environnementale du biosurfactant pour évaluer son pouvoir solubilisant vis-à-vis d'une molécule modèle appartenant à la famille des hydrocarbures polyaromatiques (HPA) qui sont très peu solubles dans les milieux aqueux..

## IV.2 Microorganismes :

Cette étude a été réalisée avec une souche commerciale de *Pseudomonas fluorescens* Migula 1895<sup>AL</sup> (DSMZ, Braunschweig, Allemagne).

Cette bactérie est Gram-négatif, aérobie strict (Annexe 1).

Les bactéries sont conservées à -18°C dans des tubes à essai ou à 4°C dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive.

Les souches sont périodiquement repiquées sur un milieu gélifié adapté et mis dans l'incubateur à 30°C pendant 48 heures avant d'être à nouveau conservées au congélateur ou au réfrigérateur. Ce milieu contient 25g l<sup>-1</sup> de Nutrient Agar.

## IV.3 Milieux de culture et de préculture :

Les compositions des milieux de culture et de préculture utilisés sont données en Annexe 2.

Le milieu de culture contient des oligo-éléments, pour cela nous avons utilisé une solution dont la composition est dérivée de celle de Trinci (voir Annexe 2).

Les oligo-éléments sont nécessaires à de très faibles teneurs au développement bactérien.

La source d'azote est ajoutée au milieu de culture lors de sa préparation.

D'une manière générale, une ou plusieurs sources de carbone peuvent être utilisées. Dans cette étude, à chaque fois une seule source de carbone (soit du glucose, soit de l'huile d'olive ou de l'hexadécane) est ajoutée au milieu de base.

## IV.4 Conditions de culture :

### a- Préparation de l'inoculum (préculture) :

50ml de milieu de préculture sont mis dans un erlenmeyer de 250ml auxquels nous avons ajouté les *Pseudomonas fluorescens* d'une manière aseptique à partir d'une suspension diluée (10%) (ou à partir d'un fragment de colonie prélevé d'une boîte de pétri) ; ensuite, l'erlenmeyer est mis dans l'incubateur à 30°C sous agitation (250 tours mn<sup>-1</sup>) pendant 18 heures pour la croissance des bactéries.

### **b- Préparation de la culture :**

Nous versons 50ml du milieu de culture minéral dans un erlenmeyer de 250ml, juste avant l'ensemencement nous ajoutons la source de Carbone ; ensuite, le milieu est inoculé avec le milieu de préculture.

Il est incubé sous agitation à 30°C (Incubateur utilisé est de marque MEMMERT)

Le pH initial de tous les milieux est de  $6.8 \pm 0.2$  ( Abu-Ruwaida et al,1991).

Tous les erlenmeyers sont munis de bouchon en cellulose (des steristoppers).  
Tous les milieux de culture et de préculture sont stérilisés dans l'autoclave à 120° et sous 1 bar pendant 20 minutes avant l'ensemencement.

Tous les ajouts et les prélèvements se font d'une manière aseptique car les milieux sont stérilisés.

## **IV.5 Méthodes analytiques :**

La production du biosurfactant a été détectée par la mesure de deux grandeurs qui sont la tension superficielle (TS) et l'indice d'émulsification ( $E_{24}$ ). Les variations de la biomasse et du pH ont, aussi, été mesurées.

Les prélèvements sont effectués toutes les douze heures pour l'estimation des paramètres suivants : la tension superficielle, l'indice d'émulsification, la biomasse et le pH

### **IV.5.1 Tension superficielle :**

La mesure de la tension superficielle a été réalisée par la méthode de l'arrachement de l'anneau en platine à l'aide d'un tensiomètre (K6 .KRÜSS).



Figure IV.1 Tensiomètre ( K6 )

Le bouillon de fermentation est centrifugé à 8000 tr/mn pendant 20 minutes, afin de séparer la biomasse. Nous mesurons ensuite la tension superficielle du supernatant.

#### IV.5.2 Indice d'émulsification (E 24) :

L'émulsification est basée sur la tension interfaciale .Elle est estimée pratiquement par l'indice d'émulsification.

Nous versons des volumes égaux (2ml) de supernatant et de gasoil dans un tube à essai et nous mélangeons, à l'aide d'un vortex à une vitesse maximale, pendant 2 minutes.

L'indice d'émulsification (E24) est calculé, après 24 heures, en divisant la hauteur de la couche émulsionnée par la hauteur totale du mélange et en multipliant par 100 (Abu-Ruwaida et al, 1991).

Le calcul de l'indice d'émulsification est donné par la relation suivante :

$$E_{24} = ( H' / H ) * 100$$

**H** : hauteur totale du mélange

**H'** : hauteur de la couche émulsionnée

### IV.5.3 Biomasse :

La croissance bactérienne a été estimée par la mesure de la biomasse sèche obtenue après centrifugation du bouillon de fermentation à  $8000 \text{ trmn}^{-1}$  pendant 20 minutes. Le précipité est lavé avec de l'eau distillée et centrifugé à nouveau ; ensuite il est séché dans une étuve à  $105^\circ$ . Il est périodiquement pesé jusqu'à obtention d'un poids constant. (Abu-Ruwaida et al, 1991).

### IV.5.4 pH :

Les pH de différents milieux et des supernatants ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre (HANNA 213).

## IV.6 Optimisation des paramètres opératoires :

Cette partie de notre travail consiste à optimiser les paramètres opératoires ; pour la production d'un biosurfactant à partir des cellules libres de *Pseudomonas fluorescens* ; en faisant varier , par de différentes combinaisons, la source de Carbone (C) , la source d' Azote (N) et le rapport des concentrations Carbone / Azote (C/N)

### - Sources de Carbone utilisées

- \*Carbohydate : glucose
- \*Huile végétale : huile d'olive
- \*Hydrocarbure : hexadécane

### - Sources d'Azote utilisées

- \* organique : Urée
- \* non organique :  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ,  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

### - Rapport C / N

La concentration de la source d'azote est fixée à  $1 \text{ g l}^{-1}$  et nous faisons varier les concentrations de la source de Carbone afin d'obtenir les rapports C / N de 10, 20,30 et 50.

## IV.7 Cinétique de la production du biosurfactant par des cellules libres

### IV.7.1 Production du Biosurfactant

Une culture a été réalisée, dans les conditions optimales de production déterminées, en suivant les variations de la tension superficielle, l'indice d'émulsification, la biomasse et le pH au cours du temps.

### **IV.7.2 Séparation du biosurfactant (Pruthi.V et Cameotra S.S, 1995):**

Le milieu de culture est centrifugé pour séparer la biomasse du supernatant.

Le biosurfactant est séparé par précipitation à l'acétone à 4°C dans les proportions suivantes : un volume de supernatant pour trois volumes d'acétone froid sous agitation à 200 tours  $\text{mn}^{-1}$  dans un bain glacé. Le BS précipité est séparé par centrifugation, ensuite il est lavé avec de l'acétone.

Le BS séparé est ensuite séché et pesé.

## **IV.8 Caractérisation du biosurfactant :**

### **IV. 8 .1 Caractérisation structurale :**

#### **IV. 8 .1.1 Test de Rhamnose :**

Ce test a pour objectif la détection de l'existence d'une fonction ou d'un groupement glucidique (rhamnose) dans la molécule de biosurfactant.

On introduit, dans un tube à essai, 1ml de supernatant et 2ml de phénol à 5%, puis on ajoute 5ml d'acide sulfurique pur à l'aide d'une burette. On mélange puis on incube le tube pendant une heure à 65° (Tyrkovskaya et al, 2001), ensuite nous observons s'il y a un changement de la couleur du mélange.

#### **IV. 8 .1 .2 Test de Bradford :**

Ce test est appelé aussi Test au bleu de Coomassie, a pour but la mise en évidence de liaisons peptidiques (protéine) dans la molécule de biosurfactant.

5ml de solution diluée de réactif de Bradford sont ajoutés à une solution diluée de BS dans un tampon ; après agitation, le mélange est laissé au repos dans l'obscurité pendant une heure, ensuite nous observons la couleur du mélange.

#### **IV. 8 .1.3 Spectroscopie à Infrarouge :**

Cette étude a été essentiellement entreprise dans le but de compléter les résultats de l'analyse structurale.

Le spectrophotomètre infrarouge à Transformée de Fourier est de marque SHIMADZU. Le spectre infrarouge (IRTF) a été obtenu en utilisant des pastilles de mélange de KBr avec du BS.

#### **IV. 8 .1.4 Résonance magnétique nucléaire (RMN) :**

La Résonance Magnétique Nucléaire en milieu liquide ou RMN liquide est une technique utilisée principalement à la détermination structurale des composés organiques.

Le biosurfactant a été solubilisé dans de l'eau deutérée

Le spectre proton a été effectué dans de l'eau deutérée ( $\text{D}_2\text{O}$ ) à 99,6%.

#### **IV. 8 .1.5 Microscopie électronique à balayage (MEB) :**

LA MEB permet l'observation de la forme et des dimensions des phases solides, des vides laissés par ces phases (porosité).

L'analyse par MEB a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type JSM- 6301 Scanning .La tension d'accélération est de 7KV.

Les échantillons sont réduits en poudre homogène. Ils sont ensuite métallisés avec un alliage Or-Palladium (Au.Pd) pour que la surface soit conductrice.

#### **IV .8 .2 Caractérisation physico-chimique**

##### **a – Tests de Stabilité**

##### **a-1 Stabilité thermique**

Le supernatant subit un traitement thermique, par chauffage dans l'étuve ou dans l'autoclave sous différentes températures 20, 40, 60, 80 et 105°C pendant une durée 15 minutes .Après refroidissement, la tension superficielle et l'indice d'émulsification ont été mesurés afin d'apprécier la stabilité thermique du biosurfactant (Hee-Sik et al :2002).

##### **a-2 Stabilité chimique**

##### *\* Effet de la salinité*

Le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au supernatant à différentes concentrations : 5, 10, 20, 30, 40  $\text{g l}^{-1}$  à la température ambiante et laissé au repos pendant une heure. La tension superficielle et l'indice  $E_{24}$  ont été ensuite mesurés (Hee-Sik et al, 2002).

##### *\*\* Effet du pH*

Nous avons varié le pH du supernatant de 2; 6 ; 10 et 12 en utilisant respectivement HCl et NaOH, ensuite nous avons mesuré les mêmes paramètres que précédemment. (Hee-Sik et al : 2002).

##### **b -Détermination de la Concentration Micellaire Critique ( CMC )**

La concentration micellaire critique a été déterminée par la méthode de dilutions, en mesurant la tension superficielle de chaque solution de biosurfactant diluée à l'eau distillée à partir d'une solution mère préalablement préparée (Zajic and Seffens, 1984).

### IV. 8.3 Caractérisation fonctionnelle

#### a -Mesure de la tension interfaciale

Un volume de supernatant est mis dans le récipient de mesure auquel on rajoute délicatement le même volume d'un des liquides organiques suivants : toluène, hexadécane et huile de tournesol et ensuite nous mesurons la tension interfaciale entre les 2 phases liquides à l'aide du tensiomètre K6.

#### b -Pouvoir émulsifiant

Des volumes égaux de solution de biosurfactant et d'un des produits suivants : toluène, hexadécane et huile de tournesol sont mis dans un tube à essai .Les mélanges ont été agités à une vitesse maximale à l'aide d'un vortex pendant 2 minutes et laissés au repos pendant 24 heures pour tester le pouvoir émulsifiant du biosurfactant envers le toluène, l'hexadécane et l'huile de tournesol en mesurant l'indice d'émulsification.

#### c -Pouvoir moussant

Des solutions de différentes concentrations en BS (0 ; 0.2 ; 0.4 ; 1 ; 1.5 ; 2 et  $3\text{gl}^{-1}$ ) sont mises dans des tubes à essai et sont agités manuellement pendant 30 secondes et sont ensuite laissés au repos pendant 10 minutes.

#### d -Pouvoir mouillant

Des angles de contact ont été mesurés par rapport à une surface de polystyrène en utilisant des liquides de référence (eau, diiodométhane et formaldéhyde) .Ensuite, nous avons répété les mêmes mesures sur la surface de polystyrène recouvert d'un film de biosurfactant.

La surface de PS recouverte de BS est obtenue en versant une solution de BS sur une surface de PS et ensuite mis dans l'étuve à  $105^\circ$  pendant toute une nuit. La surface sèche est rincée avec de l'eau ultra pure. Les mesures ont été faites à l'aide d'un goniomètre (KRUSS) en déposant à l'aide d'une seringue une goutte de liquide sur la surface de l'échantillon à analyser.Un système motorisé permet de faire les mesures d'angle .

### IV. 8.4 Application

Les hydrocarbures polyaromatiques sont très peu solubles dans les milieux aqueux, ce qui nous mène à tester l'efficacité du biosurfactant obtenu sur la **Solubilisation du Naphtalène** dans l'eau.

Le mode opératoire utilisé est le suivant :

Deux grammes de naphtalène sont mis dans un litre d'eau auxquels le biosurfactant est ajouté à des concentrations différentes : 0.2 ; 0.4 ; 0.8 ; 1 ; 2 et  $4\text{gl}^{-1}$  et agités pendant 24 heures à la température ambiante.

A l'aide d'un spectrophotomètre UV visible, nous avons déterminé la concentration du naphthalène solubilisé dans l'eau en présence du biosurfactant.

Ensuite, nous avons considéré l'effet du pH et de la salinité sur la solubilisation du naphthalène en présence de BS.

Les expériences ont été effectuées à :

- des pH de 4, 7 et 10
- des concentrations en NaCl de 10 ; 20 et 40gL<sup>-1</sup>.

---

# CHAPITRE V

## RESULTATS & DISCUSSION

---

### V.1 Optimisation des paramètres opératoires :

Des cultures sont menées en utilisant les 3 sources de Carbone (Glucose, Huile d'olive et Hexadécane) séparément avec chacune des sources d'Azote (Urée,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) pendant 72 heures.

Les paramètres mesurés sont : la tension superficielle (**TS**), l'indice d'émulsification (**E<sub>24</sub>**), le poids de la biomasse sèche et le pH final après une durée de 72 heures.

La tension superficielle du milieu minéral utilisé avant ajout de la source de carbone et l'ensemencement est de **60mNm<sup>-1</sup>**.

Les valeurs des paramètres mesurés sont regroupées dans les tableaux V.1, V.2, et V.3.

Tableau V.1 : Croissance cellulaire dans les différents milieux de culture

	Biomasse ( gL <sup>-1</sup> )		
	Glucose	Huile d'Olive	Hexadécane
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	0.53	0.21	0.16
<b>KNO<sub>3</sub></b>	0.40	0.48	0.25
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	<b>0.91</b>	0.43	0.17
<b>Urée</b>	0.23	0.05	0.30

D'après le Tableau V.1, nous constatons que les bactéries *Pseudomonas fluorescens* croissent dans tous les milieux de cultures utilisés c'est-à-dire avec des sources de carbone et des sources d'azote différentes, ce qui confirme la nature non exigeante de ces micro-organismes

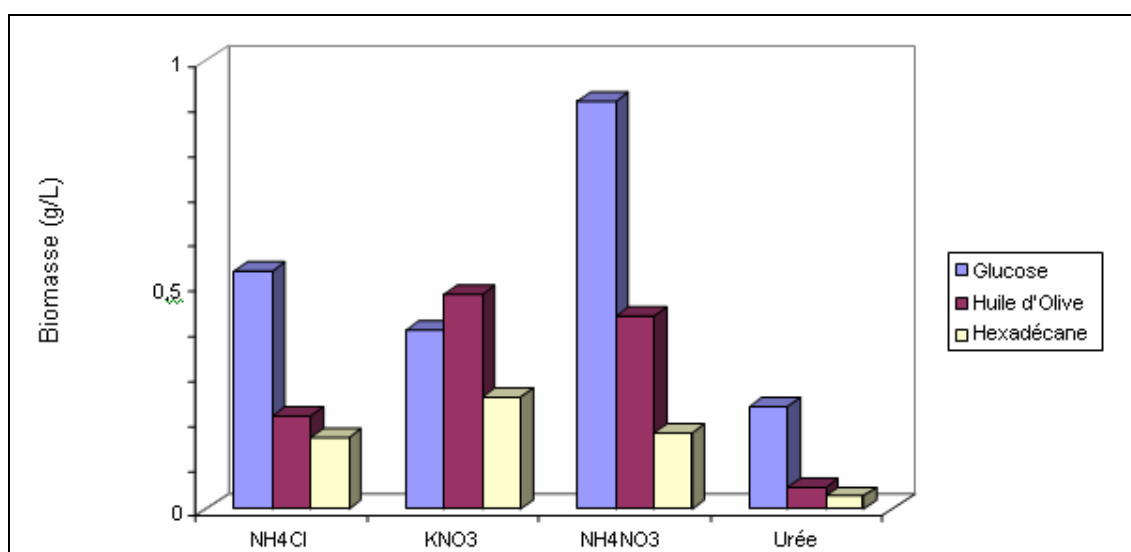


Figure V.1 Concentration en Biomasse dans les différents milieux de culture

Nous remarquons que pour la culture Glucose-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, nous avons une plus grande croissance (Fig. V.1)

Tableau V.2 : pH final obtenu dans les différents milieux de culture

	pH		
	Glucose	Huile d'Olive	Hexadécane
NH <sub>4</sub> Cl	4.5	7.5	7.4
KNO <sub>3</sub>	3.7	7.3	7.2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.5	6.3	7.3
Urée	7.9	7.5	7.6

Le pH initial du milieu avant de l'inoculer était de 6.8. Les pH des milieux de cultures contenant du glucose comme source de Carbone et les sources minérales d'Azote sont acides par contre avec l'urée est plutôt basique (Tableau V.2). Le changement de pH est un indicateur de la production de métabolites secondaires au cours de la croissance.

Tableau V.3 : Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification (E<sub>24</sub>) obtenus pour différents milieux de culture

	NH <sub>4</sub> Cl		KNO <sub>3</sub>		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		Urée	
	TS	E <sub>24</sub>	TS	E <sub>24</sub>	TS	E <sub>24</sub>	TS	E <sub>24</sub>
<b>Glucose</b>	50	0	45	10	48	5	45	<b>55</b>
<b>Huile d'Olive</b>	50	5	42	5	<b>40</b>	7	48	8
<b>Hexadécane</b>	52	15	43	5	50	2	50	8

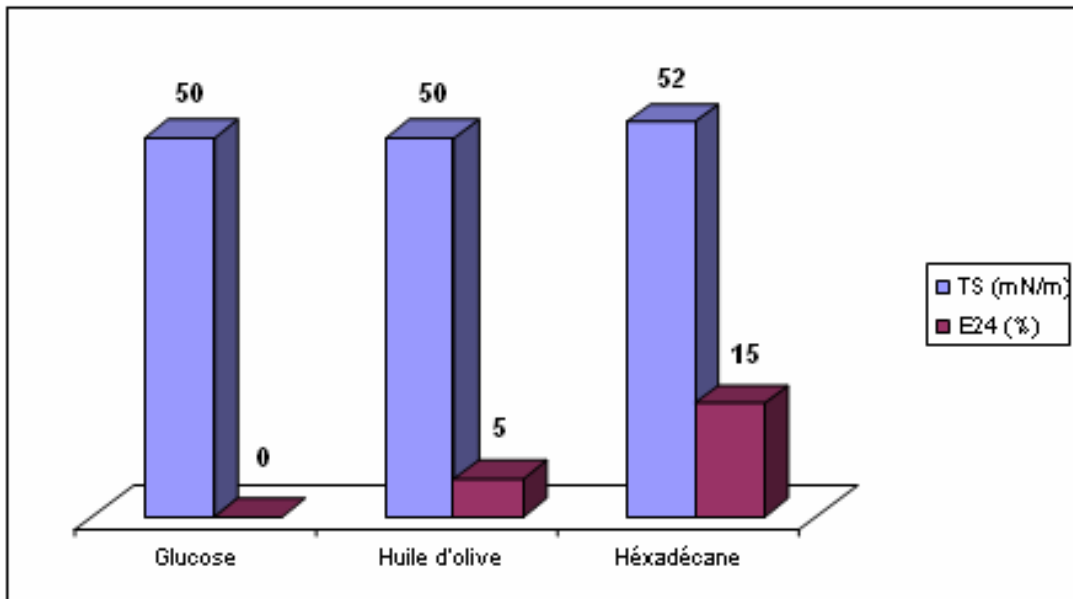


Figure V.2 Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E<sub>24</sub>) en présence de NH<sub>4</sub>Cl et les différentes sources de Carbone

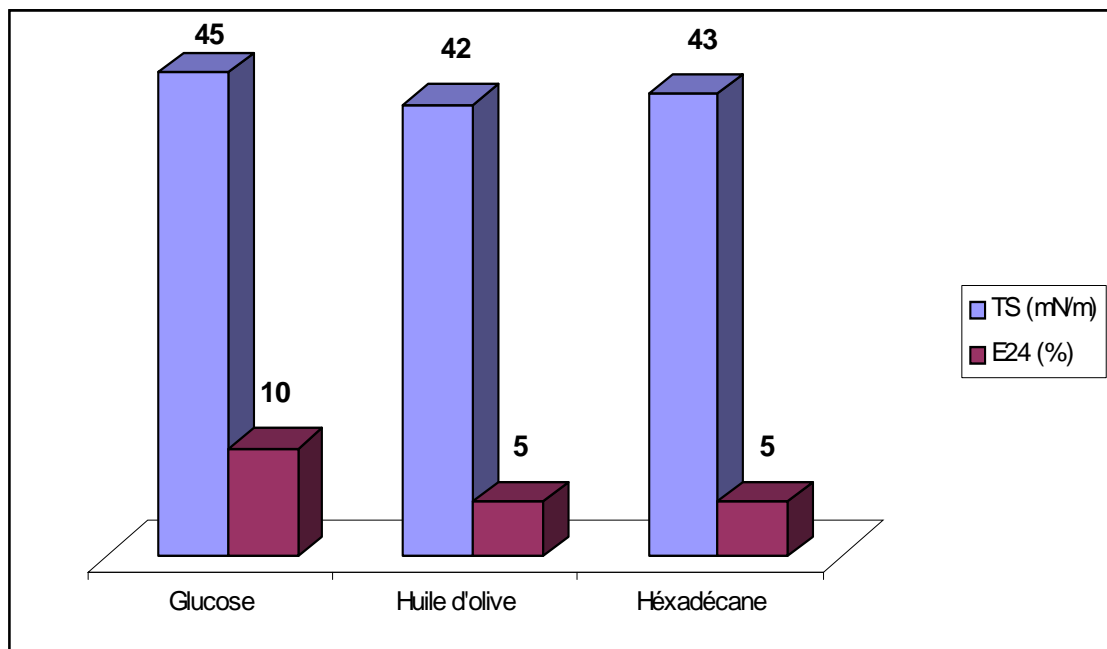


Figure V.3 Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification (E<sub>24</sub>) en présence de KNO<sub>3</sub> et les différentes sources de Carbone

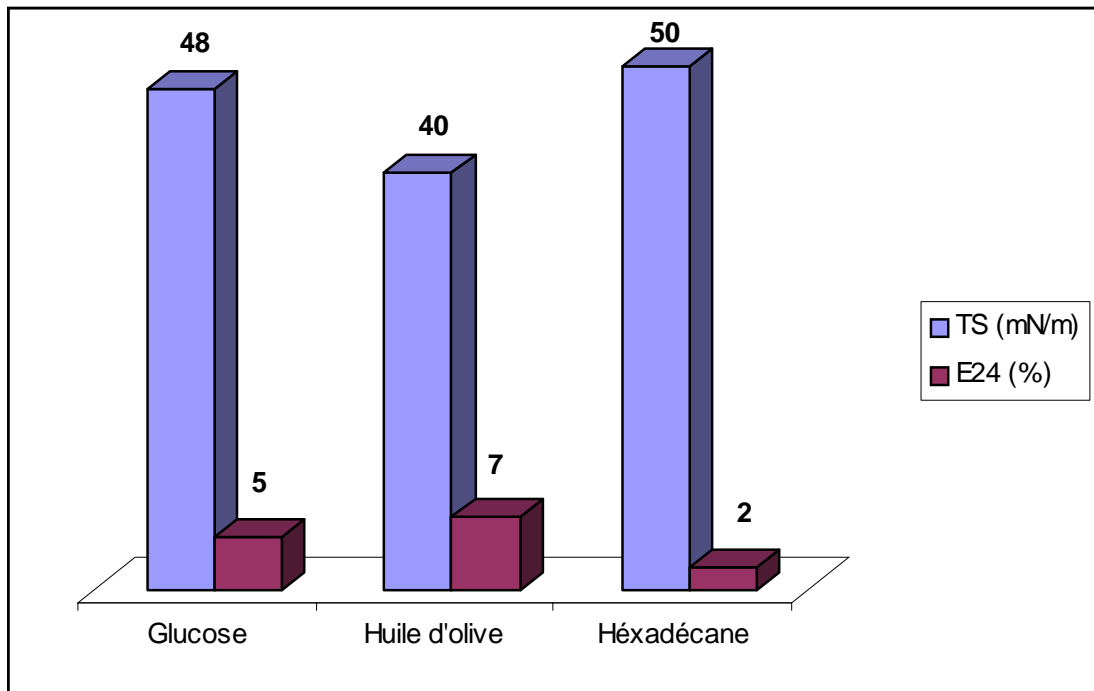


Figure V.4 Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification ( $E_{24}$ ) en présence de  $NH_4NO_3$  et les différentes sources de Carbone

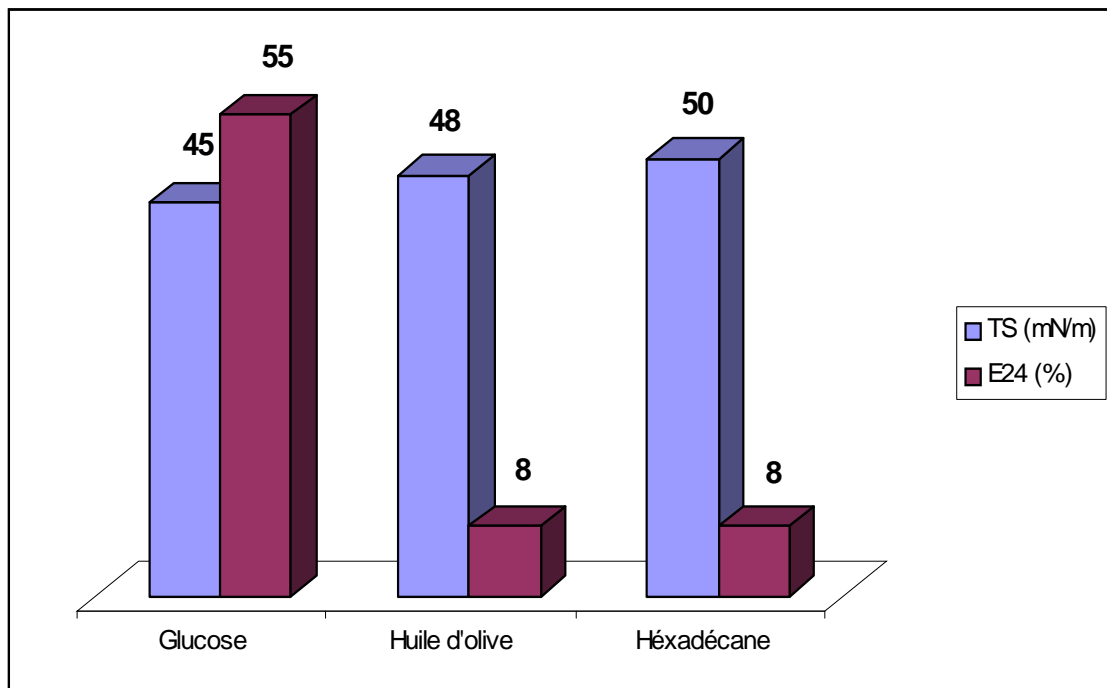


Figure V.5 Tension superficielle (TS) et Indice d'émulsification ( $E_{24}$ ) en présence d'urée et les différentes sources de Carbone

Pour les différents milieux de culture, nous avons un abaissement de la tension superficielle qui, initialement, était de  $60\text{mNm}^{-1}$ . Ce résultat montre que cette souche produit une substance qui a un pouvoir tensioactif.

La valeur de TS la plus basse a été obtenue avec l'huile d'olive et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{TS} = 40\text{mNm}^{-1}$

Des résultats analogues ont été obtenus avec des bactéries appartenant au même genre, *Pseudomonas aeruginosa* (Banat .1997).

L'indice d'émulsification le plus élevé a été obtenu avec le mélange Glucose et Urée (55%) tandis que pour l'Huile d'olive et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  est de 7%

Pour la détermination de  $E_{24}$  nous avons utilisé du gasoil, alors que dans beaucoup de travaux c'est le kérosène qui est utilisé.

La production d'un tensioactif se manifeste par une diminution de la tension superficielle et une augmentation de l'indice d'émulsification alors que dans notre travail, nous avons obtenu un abaissement de la TS pour un milieu (Huile d'olive +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et un  $E_{24}$  élevé pour un autre milieu (Glucose + Urée).

Le dernier paramètre d'optimisation qui nous permettra donc de choisir le milieu le plus approprié pour la production du biosurfactant sera le rapport Carbone / Azote (C / N)

Des cultures, en utilisant les deux milieux cités précédemment, sont réalisées en faisant varier les rapports C / N (Carbone / Azote).

Les rapports choisis de C / N sont 10, 20, 30, et 50.

Les paramètres mesurés sont le pH, la biomasse, la TS et  $E_{24}$  et les valeurs obtenues sont rassemblées dans les tableaux V.4 et V.5

Tableau V.4 Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification du milieu de culture Glucose et Urée en fonction de C / N

C / N	10	20	30	50
TS ( $\text{mNm}^{-1}$ )	48	45	43	52
$E_{24}$ (%)	0	10	42	0

D'après le tableau V.4, nous remarquons que la variation du rapport C / N sur le milieu de culture Glucose et Urée n'a aucun effet sur la tension superficielle.

Tableau V.5 Tensions superficielles (TS) et Indices d'émulsification du milieu de culture Huile d'olive et  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en fonction de C / N

C / N	10	20	30	50
TS ( $\text{mNm}^{-1}$ )	30,5	35	38	43,5
$E_{24}$ (%)	38	10	6	0

Pour le milieu de culture contenant de l'huile d'olive comme source de Carbone et le Nitrate d'ammonium comme source d'azote dans un rapport C / N = 10 nous donne une Tension superficielle de  $30,5 \text{ mNm}^{-1}$  et un indice d'émulsification de 38%. Nous constatons que la variation du rapport C/N a un effet sur les paramètres mesurés.

Pour la suite de notre travail, les conditions optimales de production de Biosurfactant sont les suivantes :

- Source de Carbone : Huile d'olive ( 2% v/v)
- Source d'Azote :  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $1\text{gL}^{-1}$ )
- Rapport C / N : 10

## V.2 Cinétique de production du biosurfactant

### V.2.1 Production du Biosurfactant

Une culture a été réalisée pendant 144 heures.

La figure V.6 nous montre l'évolution de la tension superficielle et de la biomasse pendant la production du biosurfactant. Nous remarquons que la tension superficielle du milieu diminue dès les premières heures de cultivation et que la phase de latence est très réduite qui pourrait être due à l'utilisation de la préculture pour l'ensemencement du milieu de culture.

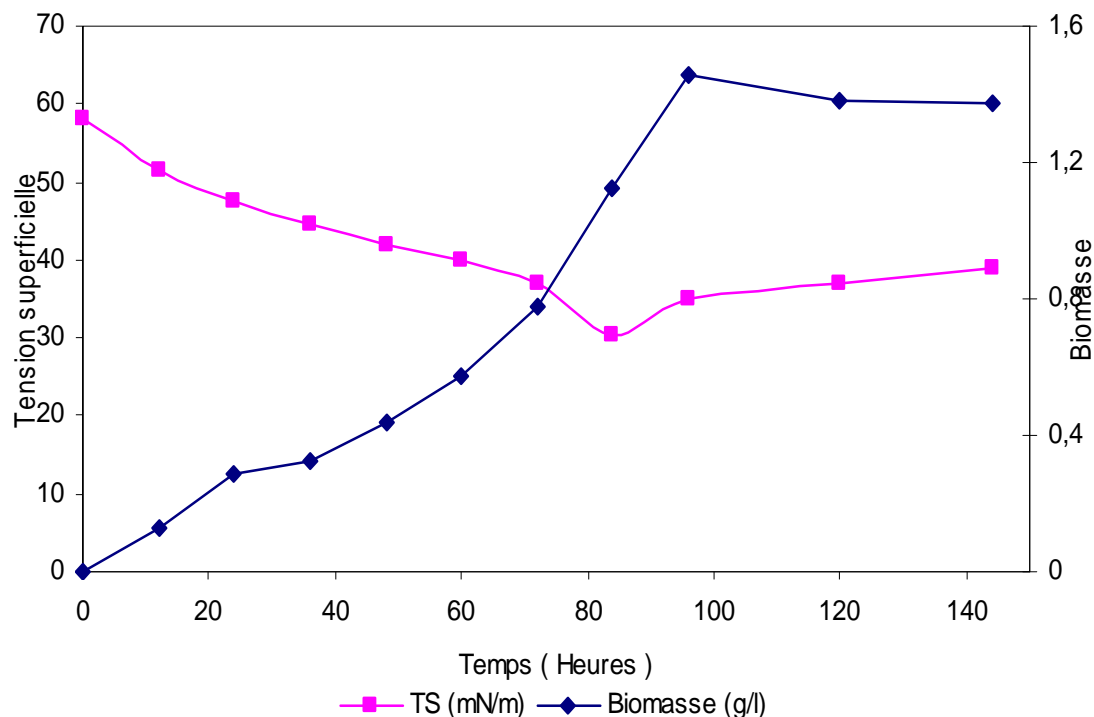


Figure V.6 Variation de la Tension superficielle et de la Biomasse au cours de la production du Biosurfactant dans les conditions optimales

La figure V.6 nous montre que le minimum de la tension superficielle ( $TS = 30.5 \text{ mNm}^{-1}$ ) est atteint au bout de 84 heures de cultivation qui correspond à la phase de croissance bactérienne.

Ensuite la TS augmente durant la phase de déclin et qui correspond peut-être à la diminution de production du Biosurfactant.

Les valeurs de pH et d'indice d'émulsification sont regroupées dans le tableau V.6

Tableau V.6 Variation du pH et  $E_{24}$  au cours de production de Biosurfactant dans les conditions optimales

Temps (Heures)	0	12	24	36	48	60	72	84	96	120	144
pH	6.82	6.49	6.25	6.31	6.38	6.39	6.40	6.45	6.50	6.55	6.60
$E_{24}$ (%)	0	0	0	0	0	4	17	<b>38</b>	15	5	5

Le pH varie légèrement au cours de la production du biosurfactant .L'indice d'émulsification atteint un maximum au bout de 84 heures de cultivation ensuite il diminue.

L'indice d'émulsification le plus élevé est obtenu au bout de 84 heures de production de Biosurfactant. (Tableau V.6). Les émulsions ne sont pas stables au cours de la production malgré une diminution de la tension superficielle qui pourrait être dues à la formation des métabolites secondaires.

### V.2.2 Séparation du biosurfactant (Pruthi.V et Cameotra S.S, 1995):

Le biosurfactant a été séparé du supernatant par précipitation à l'acétone .Après lavage et séchage, nous obtenons des cristaux de solide amorphe , de couleur blanche. La quantité de BS produite dans les conditions optimales est  $9\text{gL}^{-1}$ .

Le rendement moyen de production du Biosurfactant par rapport au substrat qui est l'huile d'olive  $Y$  est calculé approximativement

$$Y = [P] / [S]$$

[P] : concentration du biosurfactant

[S] : concentration initiale de l'huile d'olive

$$Y = 9\text{gL}^{-1} / 30 \text{gL}^{-1} = 0.3 \text{ g de Biosurfactant par gramme d'Huile d'olive}$$

La Productivité ou la Vitesse moyenne de production est calculée sur la base du temps mesuré pour que la tension superficielle minimale soit atteinte dans les conditions optimales :

$$dP / dt \approx \Delta P / \Delta t = 9\text{gL}^{-1} / 84 \text{ h} \approx 0.1 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$$

### V.3 Caractérisation du biosurfactant

#### V.3.1 Caractérisation structurale :

##### a -Test de Rhamnose :

Après incubation du mélange à 65° pendant une heure, la couleur du mélange devient rouge brique, c'est un indice de présence de sucre dans la molécule de BS ( Figure V.7)



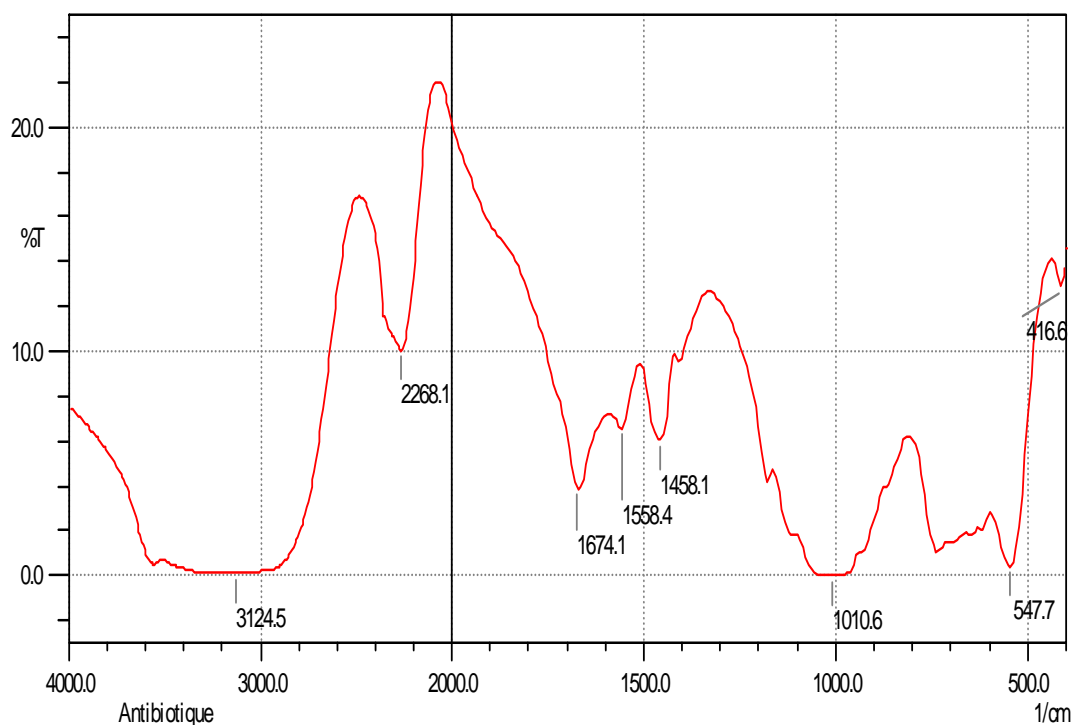
Figure V.7 Test de Rhamnose

##### b -Test de Bradford :

Le test de Bradford a été aussi positif. Après une heure dans l'obscurité, le mélange passe de la couleur rouge brun à la couleur bleue, c'est un indice de présence de liaisons peptidiques.

##### c - Spectroscopie à Infrarouge

La figure V.8 représente le spectre du Biosurfactant produit par des cellules libres et obtenu par spectroscopie à Infrarouge entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .



FigureV .8 Spectre du biosurfactant obtenu par FTIR

En examinant la figure V.8 , nous remarquons à  $1558\text{ cm}^{-1}$  un pic du groupement N-H .

Un pic à  $1458\text{ cm}^{-1}$  montre l'existence des groupements  $\text{CH}_3$  - ou  $-\text{CH}_2$  - des alcanes que tous les biosurfactants en contiennent. A  $1674\text{ cm}^{-1}$  , un pic de  $\text{C}=\text{O}$  d'ester ou d'acide confirmant ce que Banat (1997) et Rosenberg ( 2002) ont prouvé que presque tous les Biosurfactants ont un groupement acide carboxylique ou ester dans leur structure.

#### d -Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Le spectre proton obtenu est représenté sur la figure V.9 , il nous montre la présence de deux types de protons : lipidiques entre  $0.8\text{ ppm}$  et  $2.2\text{ ppm}$  et ceux de type  $\text{CH-OH}$  et  $\text{CH}_2\text{OH}$  compris entre  $3.4$  et  $5.4\text{ ppm}$ .

La présence d'un proton anomérique vers  $5.2\text{ ppm}$  détermine la présence d'un sucre mais dont on ne peut connaître la structure.

Les chaînes grasses possèdent une proportion de méthyle  $\text{CH}_3$  sur  $\text{CH}_2$  de  $15/143$  environ.

La proportion de protons de chaînes grasses par rapport aux protons sucre est d'environ de  $158/6$ .

L'analyse par RMN, nous confirme la présence de groupement sucre et de groupement lipidique dans la molécule de biosurfactant.

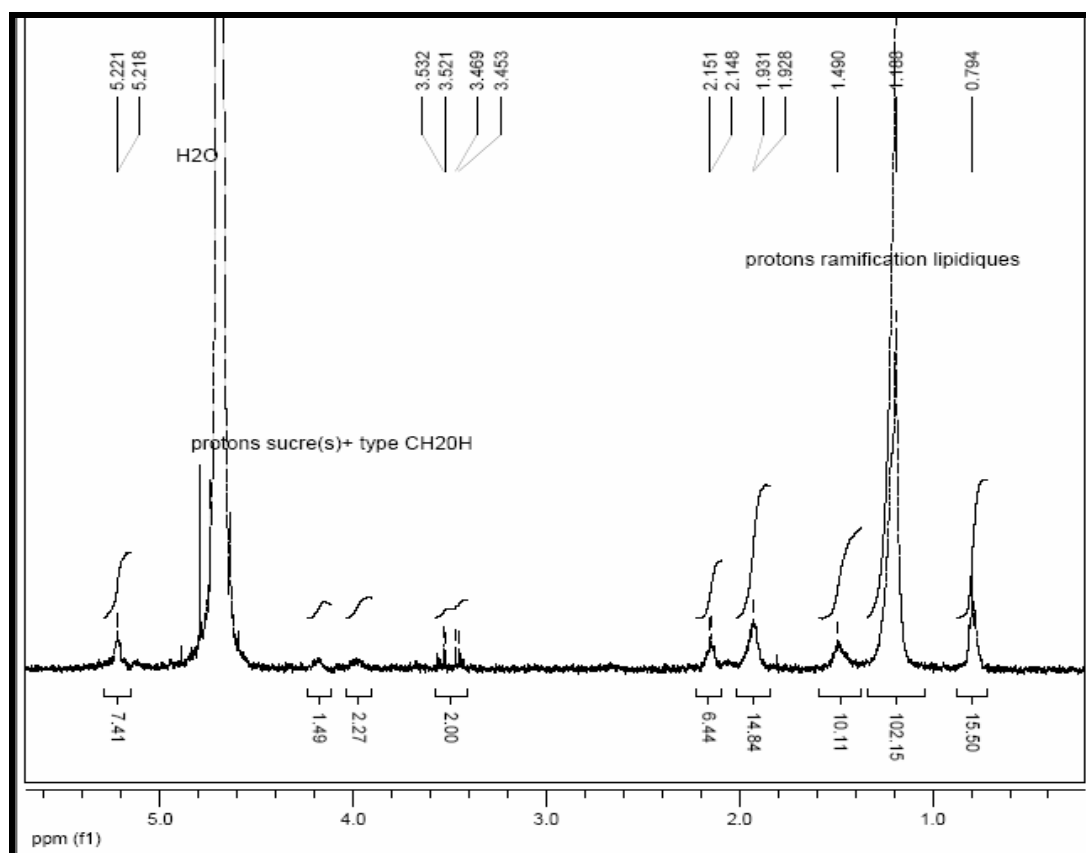


Figure V.10 Spectre du biosurfactant obtenu par RMN

En regroupant les résultats obtenus dans cette partie de caractérisation structurale (tests de Rhamnose et de Bradford positifs, les spectres d'IR et de RMN) nous montrent la présence de différents groupements (sucre, lipidique et peptidique) dans le biosurfactant produit et qui pourrait être un Glycolipopeptide.

#### e -Microscopie électronique à balayage (MEB) :

Les Micrographies obtenues en MEB sur de la poudre de biosurfactant synthétisé à partir des cellules libres, à des agrandissements différents sont représentées sur les figures V.10, V.11 et V.12

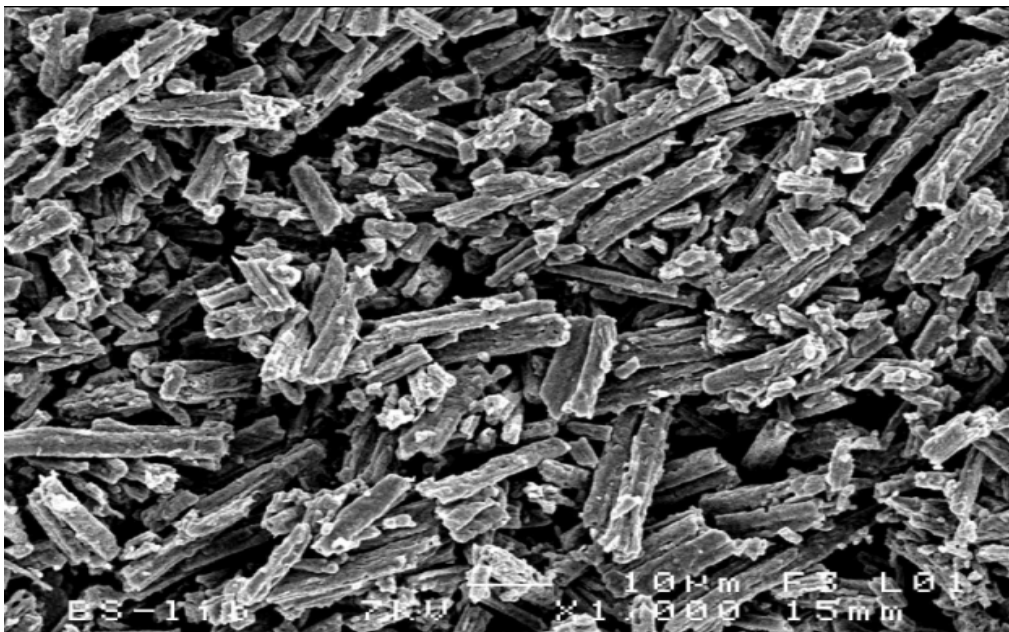


Figure V .10 Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant (x 1000)

La figure V.10 nous montre que le BS a une structure amorphe, il est sous forme de baguettes d'environ 10 – 20 micromètres

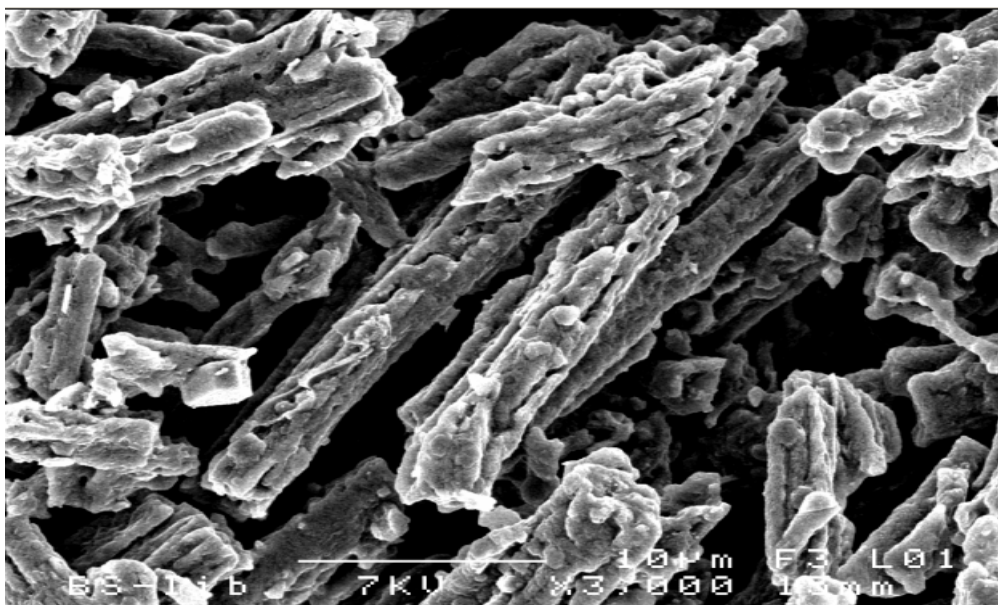


Figure V .11 Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant (x 3000)

D'après la figure V.11, la surface des baguettes est ondulée.



Figure V. 12 Micrographie obtenue en MEB du biosurfactant ( x 10 000 )

Avec un agrandissement de 10 000 fois, la micrographie (Fig V.12) nous montre que le biosurfactant produit à partir des cellules libres a une structure poreuse.

## V.4 Caractérisation fonctionnelle

### V.4.1 Pouvoir moussant

La mousse est une dispersion air-liquide constituée par un ensemble de bulles gazeuses séparées par des lames minces de liquide et, formées par la juxtaposition de bulles qui donne un gaz dispersé dans un liquide (Chitour, 1992).

En agitant manuellement une solution de BS dissous dans l'eau, il y a formation de mousse.



Figure V.13. Pouvoir moussant du Biosurfactant

Le pouvoir moussant est déterminé en divisant la hauteur de la mousse par la hauteur de la solution et en multipliant par cent.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure V. 14

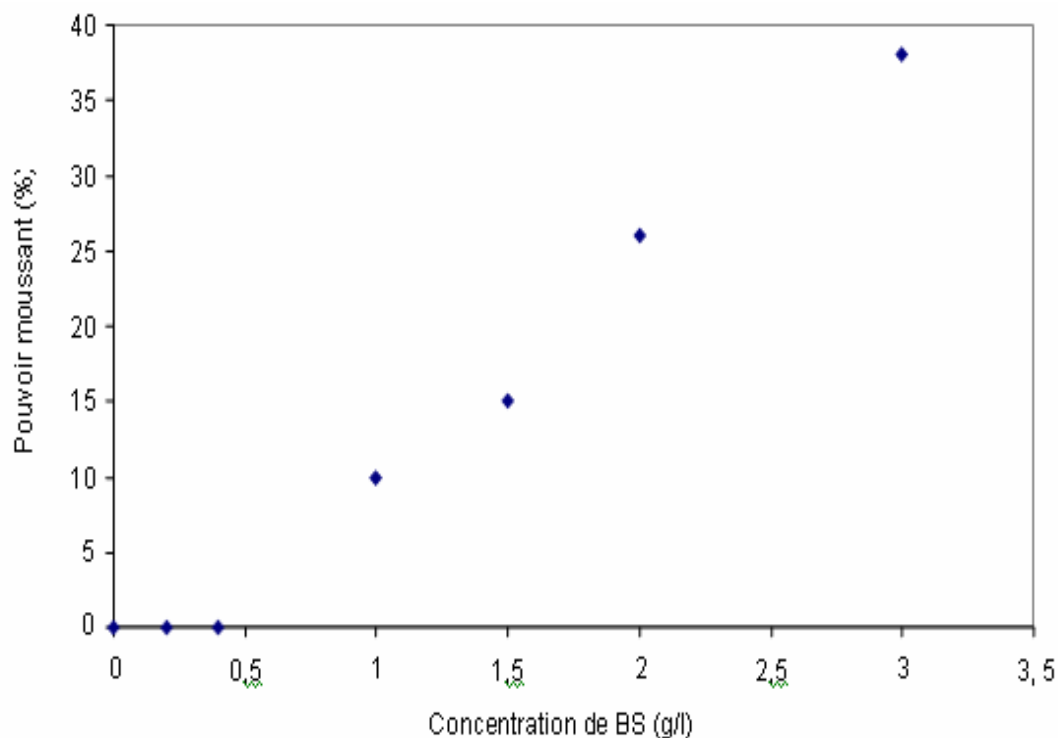


Figure V. 14 Influence de la concentration de BS sur le pouvoir moussant

En examinant la figure ci-dessus, nous constatons qu'il y a formation de la mousse à une concentration en BS supérieure à la concentration micellaire critique ( $CMC = 290 \text{ mg l}^{-1}$ ) (voir Fig V.19).

La stabilité de la mousse dépend de la concentration en BS et du temps.

#### V.4.2 Tension interfaciale :

Les valeurs des tensions interfaciales mesurées entre une solution de BS ( $1 \text{ g l}^{-1}$ ) avec différents liquides, sont regroupées dans le tableau V. 7

Tableau V.7 Tensions interfaciales d'une solution de BS et de différents liquides

	Toluène	Hexadécane	Huile de tournesol
Tension interfaciale (mNm <sup>-1</sup> )	17.5	12	2.5

Les énergies aux interfaces solution de biosurfactant et Toluène ou Hexadécane sont supérieures à celle obtenue avec l'Huile de Tournesol.

#### V.4.3 Pouvoir émulsifiant :

Les indices d'émulsification mesurés pour les différents mélanges sont regroupés dans le tableau suivant V.8

Tableau V.8 Indices d'Emulsification de la solution de BS avec les différents liquides

	Toluène	Hexadécane	Huile de tournesol
E <sub>24</sub> (%)	0	0	80

L'indice d'émulsification obtenu en utilisant le mélange de solution de BS ( 1 gL<sup>-1</sup>) et l'huile de tournesol est E<sub>24</sub>=**80%** . L'émulsion est stable pendant plusieurs jours.

Ce résultat est vérifié en le comparant à la valeur de la tension interfaciale entre les deux phases à émulsionner qui est basse.

Par contre, les émulsions obtenues avec la solution de BS et les hydrocarbures aliphatiques ou les aromatiques ne sont pas stables..

Les émulsions sont des dispersions liquides thermodynamiquement instables, leur instabilité nécessite une minimisation de l'énergie libre de surface, créée lors de la fabrication par la dispersion mécanique de la phase dispersée huileuse ou aqueuse.

La diminution de la tension interfaciale et l'uniformité des bulles confirment le pouvoir émulsifiant du biosurfactant sur les huiles végétales ainsi que la stabilité des émulsions (Tension interfaciale huile de tournesol - solution de biosurfactant = 2.5 mN/m)

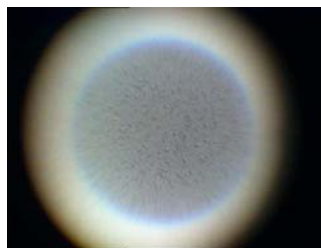


Figure V.15 Vue microscopique (agrandissement \*760) de l'émulsion de solution de BS avec L'huile de tournesol

#### V.4.4 Pouvoir mouillant :

Des angles de contact ont été mesurés sur deux surfaces : le polystyrène et le polystyrène recouvert de BS en utilisant trois liquides de références : l'eau, le diiodométhane et le formamide à l'aide d'un goniomètre.

Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau V.9

Tableau V.9 Angles de contact mesurés sur les surfaces de Polystyrène et Polystyrène recouvert d'une couche de Biosurfactant

	Angles de contact		
	Eau	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	Formamide
PS	98,7°	30,8°	74,8°
PS + BS	43°	58°	63,2°

Les valeurs des angles de contact mesurés par rapport à la surface de polystyrène (PS) en utilisant des liquides de référence confirment la nature hydrophobe de la surface de polystyrène.

La molécule d'eau est polaire et son angle de contact par rapport au PS est de 98.7°, supérieur à 90°, la goutte d'eau ne s'étale pas sur la surface car il n'y a pas d'interaction entre le liquide et la surface, donc on peut déduire le caractère hydrophobe de la surface.

L'angle mesuré en utilisant le diiodométhane est égal à 30.8° car la molécule de CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> est non polaire donc le liquide s'étale sur la surface hydrophobe.

Le formamide HCONH<sub>2</sub> est une molécule légèrement polarisée par l'effet mésomère dû à l'effet de délocalisation du carbonyle et le doublet libre de l'azote, une goutte de formamide forme un angle de 74.8° avec la surface hydrophobe de PS.

D'autres mesures d'angles de contact ont été effectuées sur la surface de PS recouverte d'un film de biosurfactant et en utilisant les mêmes liquides de référence.

L'eau forme avec la surface un angle de 43.2°, on peut déduire que la surface est hydrophile et que la partie hydrophobe de BS est en contact avec le PS.

Ce résultat est confirmé en utilisant les deux autres liquides de référence.

Les angles mesurés avec le diiodométhane et le formamide sont inférieurs à 90° et nous indiquent l'aptitude des liquides de s'étaler par mouillabilité.

Les énergies de surface et les composantes dispersives et non dispersives du polystyrène et du biosurfactant ont été calculées en utilisant le modèle de **Owens et Wendt** (Annexe : 3)

Le tableau V.10 donne les valeurs des différentes composantes de liquides utilisés dans la mesure de l'énergie de surface.

Tableau V.10 Valeurs des différentes composantes de liquides de référence

<b>Liquides</b>	$\gamma_L$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\gamma_L^d$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\gamma_L^{nd}$ (mJm <sup>-2</sup> )
<b>Eau</b>	72,8	21,8	51
<b>Formamide</b>	58	39	19
<b>Diiodométhane</b>	50,8	50,8	0

Les résultats des énergies de surface obtenus sont regroupés dans le tableau V.11

Tableau V.11 Energies de surfaces du polystyrène et du biosurfactant

	$\gamma_s$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\gamma_s^d$ (mJm <sup>-2</sup> )	$\gamma_s^{nd}$ (mJm <sup>-2</sup> )
<b>PS</b>	40.4	40.4	0
<b>PS + BS</b>	57.2	<b>27.5</b>	<b>29.7</b>

L'énergie de surface du PS est égale à la composante dispersive (ou non polaire) car la composante non dispersive est nulle ce qui confirme le caractère hydrophobe de cette surface.

Pour le BS, il y a des interactions entre le solide et le liquide impliquant des énergies de surface de la composante dispersive et de la composante non dispersive presque égales ( Tableau V.1)

Nous pouvons conclure que ce BS présente une partie hydrophile et un autre hydrophile.

## V.5 Caractérisation physico-chimique

### V.5.1 Tests de Stabilité

#### V.5.1.1 Stabilité thermique

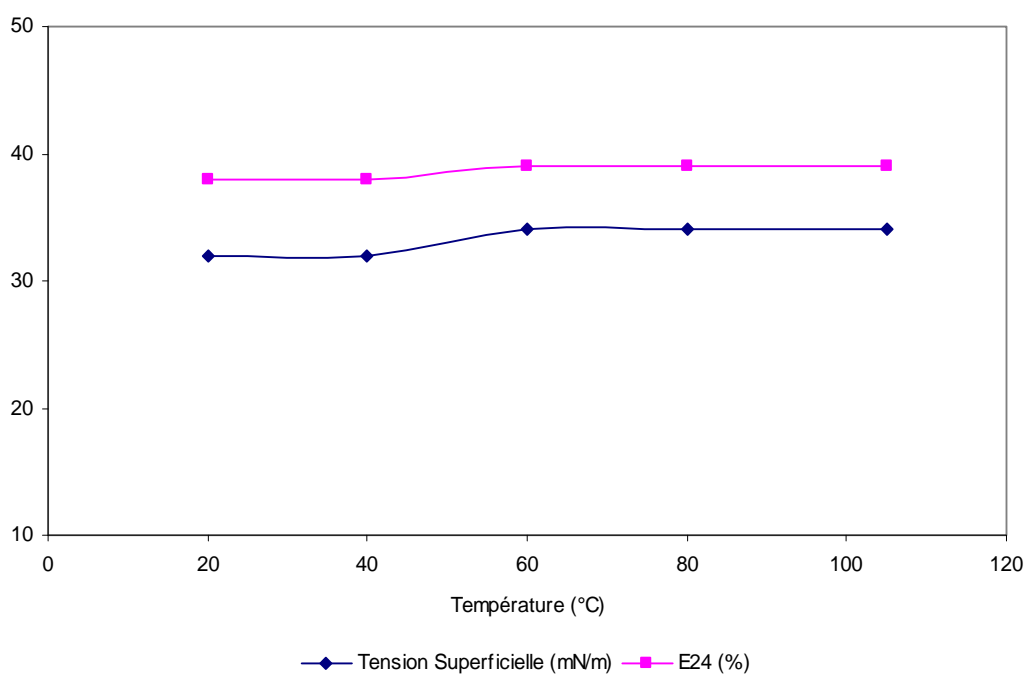


Figure V.16 Effet du traitement thermique sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant ( $1\text{gL}^{-1}$ )

La Figure V.16 montre qu'au-delà de  $60^{\circ}$  les propriétés tensioactives du BS sont stables.

Ce résultat concorde avec ceux réalisés par Makkar et Comeotra.(2002).

#### V.5.1.2 Stabilité chimique

##### a- Effet de la salinité

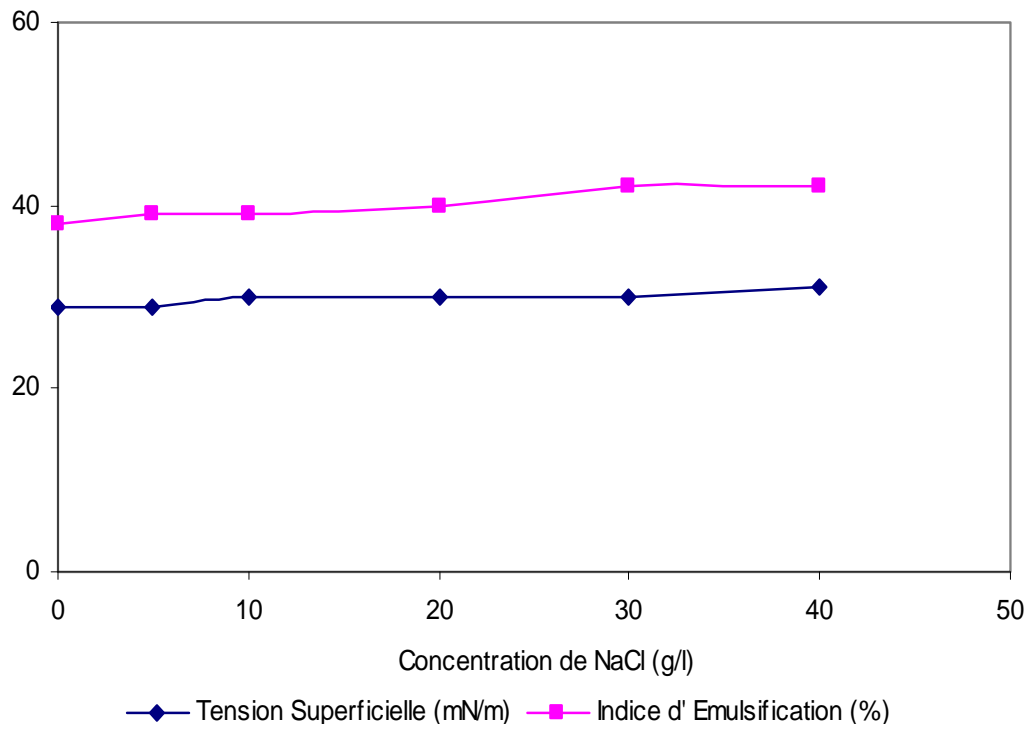


Figure V.17 Effet de la salinité sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant

La salinité n'affecte que légèrement le pouvoir tensioactif du biosurfactant. Cela peut être intéressant surtout pour la dispersion et la biodégradation de l'huile ou d'hydrocarbures polluant l'eau de mer.

#### b- Effet du pH

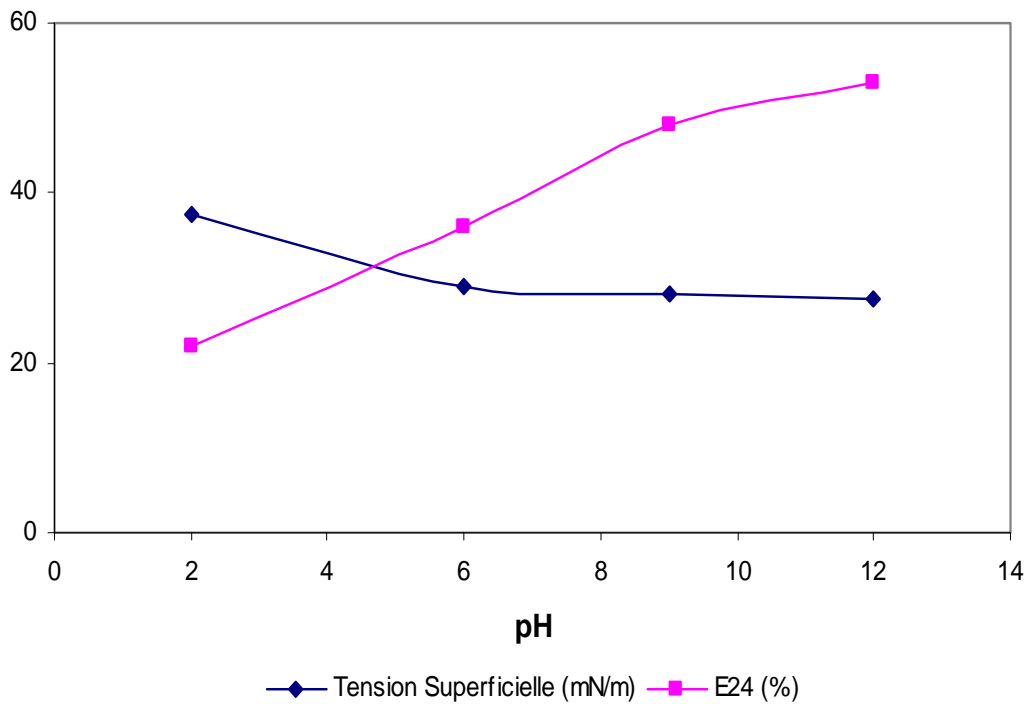


Figure V.18 Effet sur pH sur la tension superficielle et l'indice d'émulsification d'une solution de biosurfactant

L'augmentation de pH améliore les propriétés tensioactives de la solution de biosurfactant.

A partir du pH=7, il n'y a plus d'influence sur E<sub>24</sub>.

### V.5.2 Détermination de la concentration micellaire critique

La tension superficielle (TS) de l'eau pure a une valeur de l'ordre de  $70 \text{ mNm}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ .

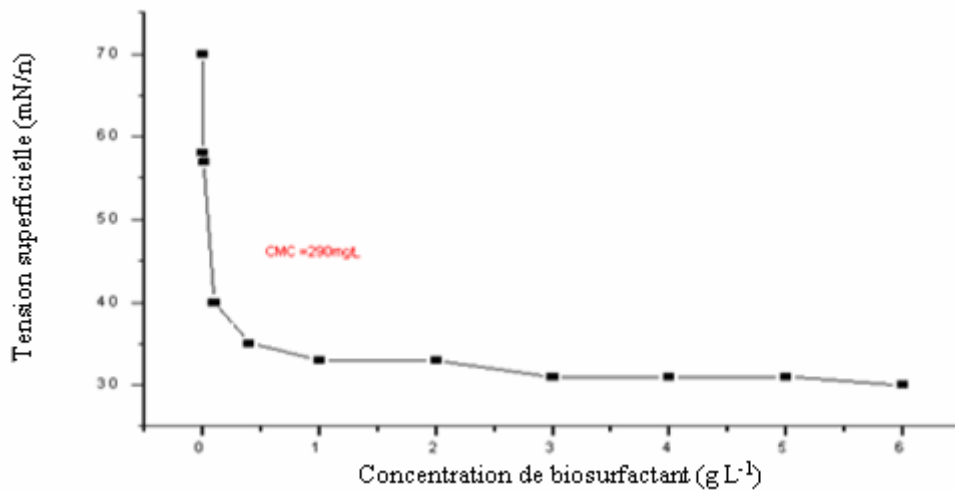


Figure V.20 Concentration micellaire critique du Biosurfactant

La figure V.20 représente la tension superficielle en fonction de la concentration en BS

Elle montre que la TS décroît de manière exponentielle jusqu'à atteindre un minimum de  $30\text{mNm}^{-1}$ .

La valeur obtenue pour la CMC est de  $0.290\text{ g l}^{-1}$ .

Cette valeur est élevée par rapport aux valeurs les plus faibles du tableau V.12 mais reste dans les ordres de grandeurs des données de la littérature.

Tableau V.12 Tensions de surface et Concentrations micellaires critiques de divers rhamnolipides (Lang et Walbrandt, 1999),

Souche	Tension de surface ( $\text{mN.m}^{-1}$ )	CMC ( $\text{g.L}^{-1}$ )
<i>P. aeruginosa</i> S <sub>7</sub> -B <sub>1</sub>	40	0,05
<i>P. sp</i> DSM 2874	26	0,02
<i>P. sp</i> DSM 2874	28	0,02
<i>P. sp</i> DSM 2874	27	0,01
<i>P. sp</i> DSM 2874	25	0,20
<i>P. sp</i> DSM 2874	30	0,20
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	25	0,01
<i>P. aeruginosa</i> 44 T1	25	0,01
<i>P. aeruginosa</i> BOP100	28	0,26
<i>P. aeruginosa</i> BOP100	31	0,40

## V.6 Application

La solubilité du naphthalène dans l'eau est de  $30\text{mgL}^{-1}$ .

### V.6.1 Effet du pH sur la solubilité du naphthalène en présence de BS

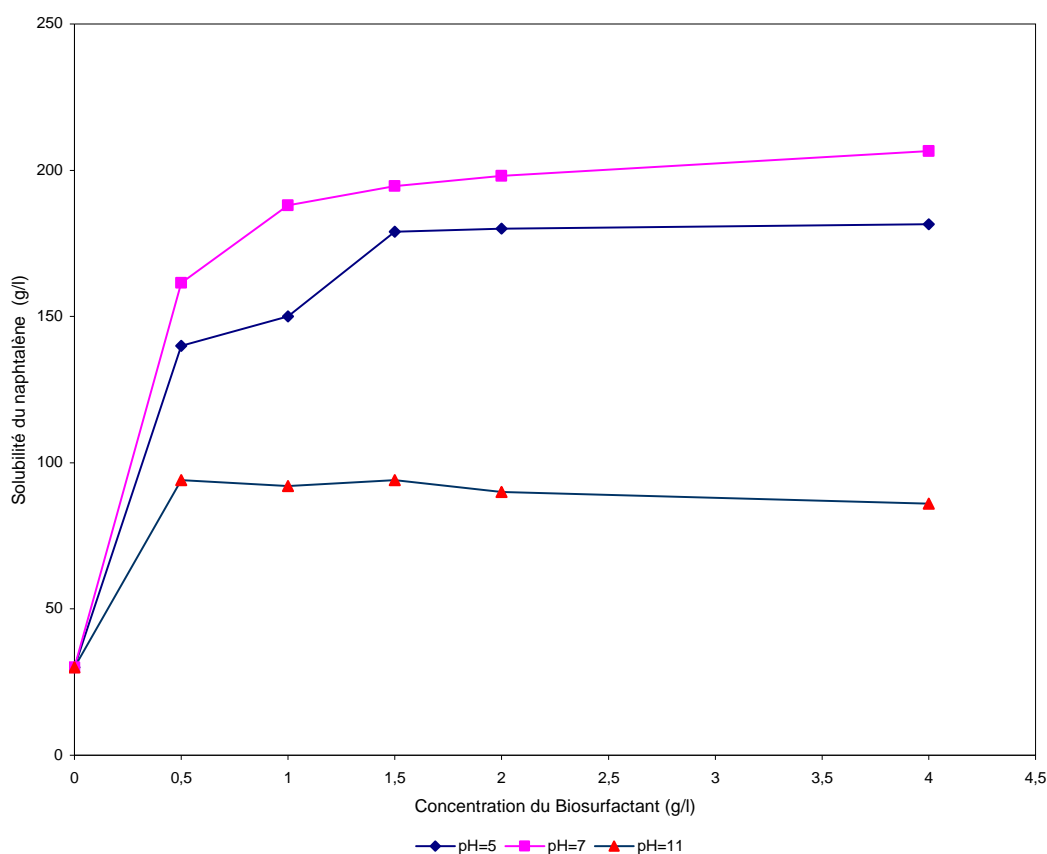


Figure V.20 Influence du pH sur la solubilité du naphthalène dans l'eau en présence de BS

Nous remarquons d'après la figure V.20, que pour toutes les valeurs de pH et à une concentration de BS de  $500 \text{ mgL}^{-1}$ , la solubilité du naphthalène augmente dans l'eau. Pour le  $\text{pH}=7$ , la solubilité du naphthalène est de  $160 \text{ mgL}^{-1}$  en présence de BS alors que sa solubilité dans l'eau sans le Biosurfactant est de  $30 \text{ mgL}^{-1}$ . Cette concentration de Biosurfactant est supérieure à la concentration micellaire qui est égale à  $290 \text{ mgL}^{-1}$ .

Au dessus de  $500 \text{ mg}$  de biosurfactant par litre, la solubilité de naphthalène augmente légèrement, elle est de  $210 \text{ mgL}^{-1}$  (7 fois plus grande que celle du naphthalène dans l'eau) pour une concentration en BS de  $1$  à  $4 \text{ gL}^{-1}$ .

Pour le  $\text{pH}=11$ , la solubilité du naphthalène augmente, mais cette augmentation est limitée.

Selon les travaux de Vipulanandan et Ren (2000), la solubilité du naphthalène, en présence de  $5 \text{ g}$  de Dodécylsulfate de sodium et à  $\text{pH} = 7$ , était de  $100 \text{ mgL}^{-1}$ . Cette solubilité est bien inférieure à celle obtenue avec le Biosurfactant produit par les *Pseudomonas fluorescens*.

### V.6.2 Effet de la salinité sur la solubilité du naphthalène en présence du BS

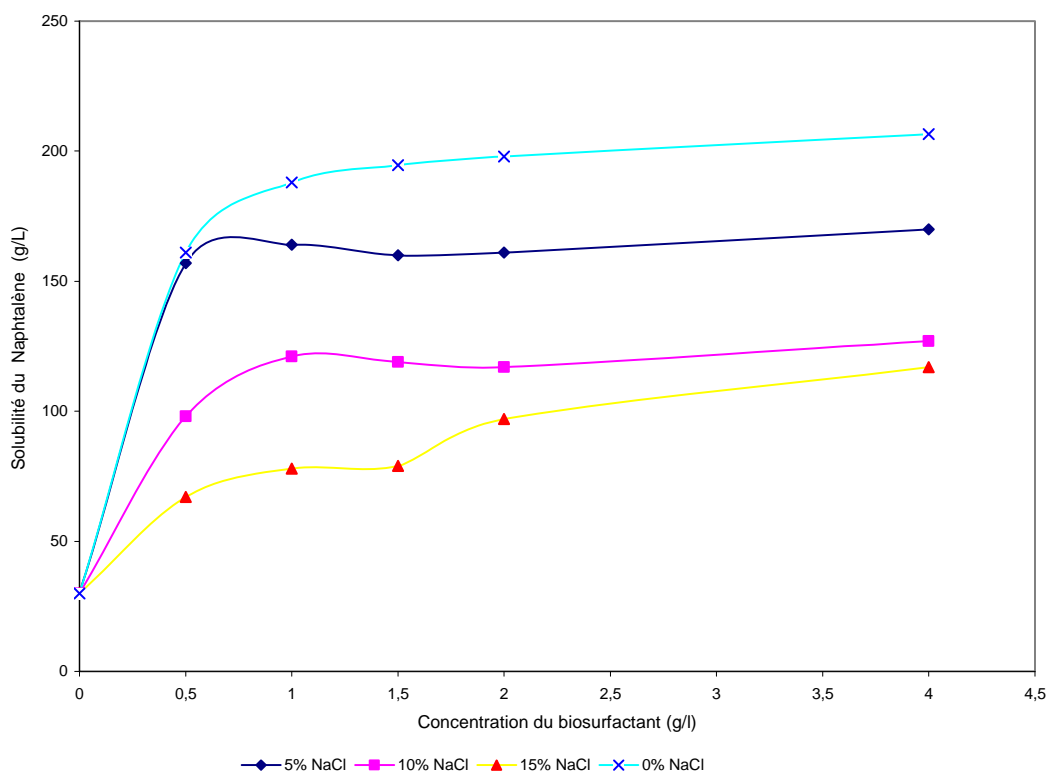


Figure V.21 Effet de la salinité sur la solubilité du naphthalène dans l'eau en présence de BS

D'après la figure V.21, nous constatons qu'à la concentration de BS égale à  $500\text{mgL}^{-1}$ , la solubilité du naphthalène augmente pour les différentes valeurs de salinité, elle est de  $156\text{mgL}^{-1}$  pour une concentration de NaCl égale à 5% (en masse). Pour les valeurs de salinité supérieures, la solubilité est inférieure à celle de 5% (NaCl)

Pour les concentrations en biosurfactant supérieures à  $500\text{mgL}^{-1}$ , la solubilité du naphthalène augmente légèrement avec l'augmentation de la salinité

Nous remarquons que nous avons une meilleure solubilité pour  $\text{pH}=7$  et pour 0% de salinité.

Une concentration en BS supérieure à  $500\text{mgL}^{-1}$  a peu d'effet sur la solubilité du naphthalène.

La concentration en BS égale à  $500\text{mg}$  correspond à la concentration micellaire critique apparente.

Pour une concentration de BS supérieure à la CMC apparente, il y a formation d'agrégats de molécules de BS, par la suite il y a une stabilité de la structure ce qui fait que la solution sera saturée en naphthalène, donc il n'y aura aucun effet sur la solubilité.

Le pH influe sur la stabilité des micelles .Pour un pH neutre nous avons une meilleure solubilité 5,3 fois la solubilité aqueuse ( $30\text{mgL}^{-1}$ ).

Les résultats obtenus concordent avec ceux de l'effet du pH et de l'effet de la salinité sur le biosurfactant produit.

## V.7 Conclusion

Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HPA) présentent un risque toxicologique important même à de faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes .Du fait de leur forte hydrophobicité liée à la présence des noyaux aromatiques, ces molécules s'adsorbent fortement aux matières particulaires rendant leur élimination et leur transformation par réaction chimique difficile.

De plus ces hydrocarbures sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement .Ainsi leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant.

L'utilisation du Biosurfactant peut augmenter la solubilité du naphthalène dans l'eau ce qui permettra

- une meilleure adhésion bactérienne c'est-à-dire entre le substrat (naphthalène) et la bactérie dans le cas de la biodégradation.
- un meilleur taux de récupération par désorption à partir d'un sol pollué par exemple en milieu marin ou sable de mer malgré la salinité élevée et dans les conditions extrêmes de pH.

L'objectif de travail était la production d'un tensioactif d'origine bactérienne, ensuite de le caractériser et de voir son efficacité sur la solubilité d'un hydrocarbure pour l'utiliser dans la biorémediation des milieux pollués par les hydrocarbures.

La première étape était de produire un biosurfactant à partir de la souche commerciale *Pseudomonas fluorescens Migula*, souche abondante, peu exigeante et non pathogène, sous forme de cellules libres. Les cultures ont été réalisées dans des flacons agités en batch.

La production de biosurfactant a été mise en évidence en utilisant de différentes méthodes physicochimiques telles que la mesure de la tension superficielle, l'indice d'émulsification, tout en suivant l'évolution de la biomasse et le pH.

Les résultats expérimentaux obtenus montrent que l'espèce *Pseudomonas fluorescens* possède la capacité à produire une substance à pouvoir tensioactif en utilisant diverses sources de carbone et d'azote sous des conditions de température, de pH et d'agitation données.

Néanmoins, la stratégie expérimentale adoptée a permis de choisir parmi les paramètres étudiés, ceux donnant la meilleure production ou le meilleur rendement en biosurfactant, reflété par une tension superficielle minimale et un indice d'émulsification maximal.

Les facteurs optimaux obtenus pour la production de BS sont donc: l'huile d'olive comme source de carbone et d'énergie (C), le nitrate d'ammonium comme source d'azote (N) avec un rapport de concentrations C / N = 10.

La cinétique de production maximale du biosurfactant a été obtenue après environ 90 heures de culture à 30°C avec une tension superficielle minimale de 30,5 mN/m et un indice d'émulsification de 38 %.

La deuxième étape a consisté à caractériser ce biosurfactant synthétisé. L'analyse structurale menée par des tests biochimique (Rhamnose, Bradford), ainsi que par spectroscopie infrarouge et enfin analyse RMN, nous montre qu'il pourrait appartenir à la famille des Glycolipopeptides.

La caractérisation de ce biosurfactant, par des méthodes physico-chimiques montre qu'il possède différents pouvoirs : moussant, émulsifiant et mouillant. Il présente aussi une stabilité thermique et chimique. La valeur de la concentration micellaire critique est du même ordre de grandeur que celui obtenu dans d'autres travaux. Toutes ces propriétés spécifiques lui confèrent un certain avantage en le comparant avec celles des surfactants synthétiques, surtout du point de vue d'applications dans les circonstances physico-chimiques extrêmes et compatibilité écologique.

En dernière étape, nous avons évalué l'efficacité du biosurfactant isolé à augmenter la solubilité du naphthalène dans l'eau avec pour objectif son utilisation dans la biorémediation des milieux pollués par les hydrocarbures. Les résultats ont montré une amélioration nette de la solubilité du naphthalène en milieu aqueux. Par ailleurs, cette solubilité est fortement liée au pH et à la salinité du milieu ( 30mgL<sup>-1</sup> à 160mgL<sup>-1</sup> à pH =7 et 0 % en NaCl ).

Ainsi, les propriétés tensioactives de cette molécule biologique sont encourageantes pour envisager d'autres applications dans les domaines de la chimie, l'environnement, l'agroalimentaire....

Cette étude est à approfondir et il serait intéressant d'évaluer d'autres facteurs tels que :

- l'optimisation des paramètres physico-chimiques tels que: le pH, la température, le taux d'oxygène (l'agitation).
- Une étude plus approfondie de la caractérisation structurale et de l'identification de la molécule du biosurfactant en utilisant des techniques couplées telle que la RMN et la spectrométrie de masse.
- Effectuer des essais de production à l'échelle du fermenteur qui nous permettra de mieux optimiser le milieu de culture.
- Comparer l'efficacité des cellules immobilisées par rapport aux cellules libres dans la production de Biosurfactant.
- Le principal frein de l'utilisation du biosurfactant est son coût élevé, il serait intéressant d'utiliser des substrats à moindre coût par exemple les eaux de rejet (laiterie ...) ou les déchets agricoles.

**A.Abalos, M. Benincasa, I. Oliveira, et A. Manresa**, « Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* I.BI from soapstock ». (2001)

**A. S. Abdul , T. L. Gibson , Carolina C. Ang , Julie C. Smith R. E. Sobczynski** . « In Situ Surfactant Washing of Polychlorinated Biphenyls and Oils from a Contaminated Site ». (1991)

**Abu-Ruwaida A.S., Batat I.M., Salem A., Haditirto S., Kadri M.**, « Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization, and evaluation ». *Acta. Biotechnologica* 11, vol 4, 315-324, (1991)

**Arino S, Marchal.R et Vandecasteele J.P.**, « Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 162-168, (1996)

**Y.Bai, T.R.Sosnick, S.W.Englander, L.Mayne**. « Hydrogen exchange: The modern legacy of Linderstrom-Lang ». (1997)

**Banat M., Makkar R.S et Cameotra S.S**, « Potential commercial applications of microbial surfactants ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508, (2008)

**Banat I.M**, « Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation ». *Rev, Bioresource Technology*, 51, 1-12, (1995)

**Bernheimer, A. W. et Avigad. L. S.**, « Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis* ». *J.Gen. Microbiol.*, 61, 361-9, (1970)

**Bognolo.G.**, « Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces A ». *Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2), 41-52, (1999)

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

**D.Chitour**. « *Physico-chimie des surfaces 2* ». (1992)

**Christofi N; Ivshina I.B.** « Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation ». *Journal of applied microbiology* ;93(6):915-29, (2002)

**Cirigliano M.C., et Carman G.M.** « Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica* ». *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 747-50, (1984)

**Davis L., Daniel F., Swannell R., Braddock J.**, « Biodegradability of chemically dispersed oil ». A report produced for the Minerals Management Service (MMS), Alaska Department of Environmental Conservation (ADEC) and United States Coast Guard (USCG). *AEAT / ENV / RO421 (1)*, 49 Ss, (2001)

**Davis.D.A. et al.** « The application of foaming for recovery of surfactin from B ». subtilis ATCC 21332. Enzyme Microb. Technol. 28, 346–354, (2001)

**Desai JD, Banat IM,** «Microbial production of surfactants and their commercial potential». Microbiology and Molecular Biology Reviews 61,(1), 47-64

**Deschênes L., Lafrance P., Villeneuve J.-P. et Samson R.,** «Adding sodium dodecyl sulfate and pseudomonas aeruginosa UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil». Appl. Microbiol. Biotechnol., 46, 639-646, (1996)

**Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F. et Bissallon J.G ,** « Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons », Appl. Environ. Microbiol., 62, (6), 1908-1912, 1996

**Dubey, K.V. et al.** « Adsorption–desorption process using woodbased activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater ». Biotechnol. Prog. 21, 860–867, (2005)

**Edwards D. A., Adeel Z. et luthy R.G.** «Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system». Environ. Sci. Technol., 28. (8), 1550-1560, (1994)

**Edwards J, Dunne M, Riley D, Taylor R, Willy O.** « Time-resolved measurement of x-ray heating in plastic foils irradiated by intense soft-x-ray pulses ». Phys. Rev. Lett. 67, 3780 – 3783. (1991)

**Fatalko D.M et Novak J.T,** « Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbon ». Water Environmental Research, 64, (2), 163-169, (1992)

**Fiechter A,** « Biosurfactants: moving towards industrial application ». Tibtech, 10, 3-12,(1992)

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

**Haba, E., Abalos, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Manresa. A.,**«Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of pseudomonas aeruginosa». Journal of surfactants and detergents 6, 155-161, (2003)

**Haigh S.D.A.,** «review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil». The science of the Total Environment, 185, 161-170, (1996)

**Harvey S., Elashvili I, Valdes JJ., Kamely D., et Chacarbart Am.,** «Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant». Bio/Technology 8 : 228-230, (1990)

**Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R,** « Microbial production of biosurfactants ». Resources, Conservation and Recycling, 18, 41-57, (1996)

**Hee-Sik, Jong-woon Jeon, Seong-Bin Kim, Mock Oh, Tae-Joeg Kwon et Byung-dae Yoon,** «Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *candida antarctica*». Biotechnology letters 24:1637-1641, (2002)

**Hommel R.K., Stegner.S., Weber L. et Kleber H.P,** «Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*». Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 192-197, (1994)

**Ishigami Y., Gama Y., Nagahora H., Yamaguchi M., Nakahara H.,et Kamata T.,**«The Ph-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant». Chemistry Letters, 763-766, (1987)

**Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H. et Trevors J.T.A,** « Dropcollapsing test for screening surfactant-producing microorganisms ». Journal of Microbiological Methods, 13, 271-279, (1991)

**Kaplan T, Gray L.J et LIU S.H.** « Self-affine fractal model for a metal-electrolyte interface ». Phys. Rev. B 35, 5379 - 5381 (1987)

**Koch A.K., Kappeli.O, Fiechter.A et Reiser.J** « Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production In *Pseudomonas aeruginosa* mutants ». Journal of Bacteriology, 173, (13), 4212-4219, (1991)

**Kosaric N., Gray N.C.C., et Cairns W.L.,** «Introduction: biotechnology and the surfactant industry». In biosurfactants and biotechnology, ed. N. Kosaric, W.L. Cairns et N.C.C. Gray. Marcel Dekker, New York, NY, pp. 1-20, (1987)

**NKosaric N.** « Biosurfactants: Production, Properties, Applications », (1996)

**Kuyukina, M.S. et al.** « Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. » J. Microbiol. Meth. 46,149–156, (2001)

**Lang S et Wullbrandt D,** « Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential ». Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 22-32, (1999)

**Larpant C.,** «Tensioactif», Ed. Techniques de l'ingénieur, Traité constantes physico-chimiques, Volume K2, (1993)

**Makkar R.S et Cameotra S.S,** « An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application potential ». Appl. Microbiol. Biotechnol., 58, 428-434, (2002)

**Makkar, R. S. et Cameotra, S. S.** «Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent, J. Am. Oil Chem. Soc. 74, 887–889. (1997)

**Manresa M.A., Bastida J., Mercade M.E, Robert M., De Andres C., Espuny M.J., et Guinea J.**, «Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 ». *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 133-136, (1991)

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

**McCray J.E., Bai G., Maier R.M., et Brusseau M.L.**, « Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures ». *J.Contam.Hydrol.*, 48, 45-68. Enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60, 371-380, (2001)

**Mercadé M.E et Manresa M.A.**, «The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production ». *J.A.O.C.S.*, 71, (1), 61-64, (1994)

**Miller RM**,«Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils». *Environ Health Perspect*, 103: 59-62, (1995)

**Mulligan C.N.**, « Environmental application for biosurfactants ». *Environ. Pollut.* 133 (2), 183-198, (2005)

**Mulligan C.N., Young R.N. et Gibbs B.F.** «Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review». *Engineering Geology*, 60, 371-380, (2001)

**Nitschke, M. and Pastore, G.** « Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater ». *Bioresource Technol.* 97, 336–341, (2006)

**Noah, K.S. et al.** « Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor ». *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98–100, 803–813, (2002)

**Page C.A, Bonner J.S, Kanga S.A, Mills M.A ET Auteurieth R.L.** «Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons». *Environmental Engineering Science*, 16, (6), 456-474, (1999)

**Parra J.L., Guinea J., Manresa M.A., Robert M., Mercadé M.E., Comelle F. et Bosch M.P.**, « Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants ». *J.A.O.C.S.*, 66, (1), 141-145, (1989).

**Pearce F.** «What turns oil spill into a disaster? ». *New Sci* 1858: 11-13, (1993)

**Philp, J.C. et al.** « Alkanotropic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 318–324, (2002)

**Pruthi.V et Cameotra S.S.**»Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation ». *Biotechnol.Lett.*, 9 (4) 271-276 (1995)

**Puisieux F, Seiller M.**, « Les systèmes dispersés : Agents de surface et émulsions ». *Technique et documentation Lavoisier*, (1983)

**Ramnani, P. et al.** « Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: bioformulation as detergent additive ». *Process Biochem.* 40, 3352–3359, (2005)

**Reiling H.E., Than Ei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Kappeli O., et Fiechter A.**, «Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*». *Applied and Environmental Microbiology*, 51, (5), 985-989, (1986)

**Robert M., Mercadé M., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. et Guinea J.** « Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 ». *Biotechnology letters*, 11, (12), 871-874, (1989)

**Rodrigues, L. et al.**, «Biosurfactants : potential applications in medicine». *J. Anticob Chemother.* 57,609-618, (2006)

**Ron E., Rosenberg E.**, «Natural roles of biosurfatants». *Eniron. Microbiol.* 3, 229-236. 28, (2001)

**Ron E.Z et Rosenberg E.** « Biosurfactants and oil remediation ». *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 249-252, (2002)

**Rosenberg et Ron**,«High-and-low-molecular-mass microbial surfactants». *Applied Microbiology and Biotechnology.* 52, 154-162, (1999)

**Rosero.N.G ;Pimiento.A.L, Dugarte.f, Carvajal.F.G.**«parameters examination of a biosurfactant production at laboratory scale» *Gnecia, tecnologia y futuro*, vol2, pp35-41, (2003)

**Sen R.** Response surface optimization of the critical media components for production of surfactin. *J. Chem. Tech. Biotechnol* (1997)

**Sen. R. et Swaminathan.T.** Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age &size on surfactin production. *Biochem. Eng. J.* 21, 141–148, (2004)

**Sen, R. and Swaminathan, T.** « Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin ». *Process Biochem* 40, 2953 –2958, (2005)

**Shabtai, Y. and Gutnick, D.L.** « Enhanced emulsan production in mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide ». *Appl. Environ. Microbiol.* 52,146–151, (1986)

**Shinoda K., et Fontell K.**, « Ionic surfactant capable of being used in hard water ». *Advances in Colloid and Interface Science*, 54, 55-75, (1995)

**Soon Han Kim, Sang Ok Lee, Dong Lee et Tae Ho Lee.** «purification and charcterization of biosurfactants form nocardia sp.L-171». *Biotechno.Appl.Biochem.*31, pp 249-253 (2000)

**Soumen Mukherjee, Palashpriya Das and Ramkrishna Sen**, « Towards commercial production of microbial surfactants », (2006)

**Stocks et Evans**. « Fundamentals of interfacial engineering », (1997)

**Taylor RT, Damn RT, Miller J, Sparrt K, Schilling J, Howgood S, Benson B, Cordell B**, « Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene ». *Nature* 317:361-365, (1985)

**Thangamani S et Shreve G.S**, « Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems ». *Environ. Sci. Technol.*, 28, (12), 1993-2000, (1994).

**Tyrcovskaya O.V. Dmitrieva and Yu. Muratora**, « A biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* strain ». *Applied Biochemistry*. Vol 37, N°1, pp 71-75, (2001)

**Van Dyke M.I., Couture.P., Brauer M., Lee H. et Trevors J.T**, « *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil ». *Can. J. Microbiol.*, 39, 1071-1078, (1993)

**Vipulanandan C et Ren X .**, « Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant ». *Journal of Environmental Engineering*, (2000)

**Vollenbroich D., Pauli G., Zel M., et Vateri J.**, « Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ». *Applied and Environmental microbiology*, pp 44-49 vol.63, N°1, (1997)

**West C.C. et Harwell J.H.**, « Surfactants and subsurface remediation ». *Environ. Sci. Technol.*, 36, (12), 2324-2330, (1992)

**Zajic J.E et Seffens W**, « Biosurfactant. *CRC Crit » Rev. Biotechnical* 1 :87-107, (1984)

**Zhang Y. et Miller R.M.**, « Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant) ». *Applied and Environmental Microbiology*, 58, (10), 3276-3282, (1992)

# ANNEXE : 1

## PSEUDOMONAS

Les *Pseudomonas* sont des bactéries gram-négatifs variés et communs , en forme de bâtonnets (0,5-1 \* 1,5-5 µm) droits ou incurvés , jamais hélicoïdaux , mobiles par flagelles polaires .

Leur métabolisme est exclusivement respiratoire , elles n'assimilent pas N<sub>2</sub>.

Elles utilisent l'oxygène comme accepteur et sont strictement aérobies , sauf quelques espèces qui sont aussi dénitrifiantes .

Ces bactéries peuvent se développer sur des composés organiques très variés agissant comme seule source de Carbone ou d'énergie .

Les *Pseudomonas fluorescens* appartiennent à la famille des « saprophytes communs » qui colonisent les couches du sol et de l'eau .Comme leur nom l'indique, elles produisent un pigment soluble , verdâtre , particulièrement en présence de fer .

Leurs besoins nutritifs sont assez simples , elles poussent bien sur de nombreuses sources de Carbone .

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont fréquemment citées comme étant capables de dégrader les Hydrocarbures, notamment dans le cas de pollution des sols.

En effet , leur capacité à utiliser des composés tels que toluène , benzène , naphtalène.....comme source de carbone et d'énergie .

Certains auteurs mettent en avant le rôle de la production de biosurfactant par la bactérie dans sa capacité de dégrader les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques.

## ANNEXE : 2

### 1- Composition du Milieu de Préculture :

	Concentration (gL <sup>-1</sup> )
Extrait de levure	3
Peptone	5

### 2 - Composition du Milieu de Culture :

	Concentration (gL <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
NaCl	0,05
CaCl <sub>2</sub>	0,02
Source d'Azote	1
Extrait de levure	0,02
Solution d'oligo-éléments	1ml/L

Le pH du milieu de culture est ajusté à 6,8.

### 3 – Composition de la solution d'oligo-éléments de TRINCI

	Concentration (gL <sup>-1</sup> )
EDTA di Na, 2H <sub>2</sub> O	15
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	5
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1,3
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,4
MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,4
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	2,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,073
NaOH (10M)	5ml/L

## ANNEXE 3

### Introduction

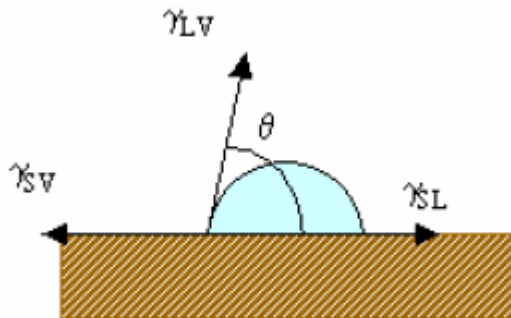
La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de mesurer **l'énergie de surface** du liquide ou du solide.

La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide.

On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface.

### Principe

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact ( $\theta$ )



La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

- Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.
- Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui de Owens Wendt.
- Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

### Calcul de l'énergie de surface

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres :

- La tension interfaciale solide-liquide  $\gamma_{sl}$
- La tension interfaciale solide-vapeur  $\gamma_{sv}$  ( $\gamma_s$ )
- La tension interfaciale liquide-vapeur  $\gamma_{lv}$  ( $\gamma_l$ )

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$-\gamma_{sv} + \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta = 0$$

Seules  $\gamma_{lv}$  et  $\theta$  sont mesurables, par conséquent il est nécessaire d'avoir des relations supplémentaires pour estimer les inconnues  $\gamma_{sl}$  et l'énergie de surface  $\gamma_{sv}$ . Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer ces inconnues.

#### **Modèle de Neumann :**

Dans ce modèle on ne distingue pas les différentes composantes de l'énergie de surface et on n'essaie pas non plus de les relier aux propriétés physico-chimiques du matériau. L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit :

$$\cos \theta \gamma_{sl} = \frac{(0.015\gamma_s - 2)\sqrt{\gamma_s\gamma_L} + \gamma_L}{\gamma_L(0.015\sqrt{\gamma_s\gamma_L} - 1)}$$

L'utilisation de cette équation doit être limitée à des systèmes qui ne sont pas trop polaires et aux valeurs obtenues avec un même liquide.

#### **Modèle de Owens et Wendt :**

Dans le modèle de Owens et Wendt, on considère que l'énergie de surface s'exprime sous la forme :  $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^{nd}$

dans laquelle :

$\gamma_s^d$  Composante dispersive

$\gamma_s^p$  Composante non dispersive

L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit alors :

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_s^d}\sqrt{\gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p}\sqrt{\gamma_L^p}$$

Dans ce modèle on a besoin de deux liquides différents pour obtenir l'énergie de surface. Toutefois une approximation est faite sur le terme non dispersif en considérant qu'il est la moyenne géométrique de  $\gamma_s^{nd}$  et de  $\gamma_l^{nd}$ .

Cette approximation ne permet pas de rendre compte du comportement des polymères polaires en milieu aqueux.