الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

**Université de RELIZANE**
**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**
**Département des Sciences Biologiques**




**MEMOIRE**

**En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en :**

Microbiologie & contrôle de qualité

**Intitulé**

# Recherche de biosurfactants et bioémulsifiants produits par des bactéries halotolérantes isolées de la sebkha de la wilaya de Relizane

**Présenté par :**

Mlle : ELAMRANI Sabrina

Mlle : LARBI DAOUADJI Youssra

**Devant les membres de jury :**

| | | |
|---|---|---|
| **Président :** MrBENAISSA Miloud | Maître de conférence (B) | (U. Relizane) |
| **Encadreur :** Mme . MELIANI Meriem Fethia | Maître de conférence (B) | (U. Relizane) |
| **Examinateur :** Mme . OUCIF Hanene | Maître de conférence (B) | (U. Relizane) |

**Année universitaire : 2025/2026**



# REMERCIMENT

*Tout d'abord, nous tenons à remercier "Allah"*

*le tout puissant et*

*Miséricordieux, de nous avoir donné la santé, la force, la volonté et la patience d'accomplir toutes nos études.*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre*

*Encadrant **Mme MELIANI MERIEM**, pour nous avoir encadré et dirigé ce travail*

*Ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et pour son soutien et sa patience.*

*Nous tenons à gratifier aussi les membres de Jury : Dr Benaissa M. et Dr Oucif H. de l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer ce travail et de l'enrichir par leurs propositions et leurs conseils.*

*Nos remerciements s'adressent également aux : Enseignants du département SNV de l'université de Relizane pour leurs qualités scientifiques et pédagogiques.*

*A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation*



# Dédicace

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU** De m'avoir donné la force et le courage de mener*
*À bien ce modeste travail*
*Je dédie ce travail à moi-même*
*Fruit de plusieurs années d'efforts de sacrifices et persévérance*

*A mes parents :*
*Mon très chèrs père **MOHAMED***
*Ma tendre mère **WAHIBA***
*Qui ont été pour moi une lumière dans l'obscurité, un refuge dans les épreuves, et une source inépuisable de tendresse, de patience et de prières. Leur amour, leur soutien moral et leurs sacrifices silencieux ont été la clé de mon succès.*

*À mon frère **HABIB ,YOUCEF, DJMALEL** et **AYOUB**, pour leur encouragement constant, leur compréhension et leur fierté, qui m'ont porté et motivé à aller de l'avant.*
*À toute personne chère à mon cœur, qui ma soutenue, fait confiance et s'est réjouie avec moi.*
*À mon binôme : **YOUSSRA**.*
*À vous tous, je dédie humblement ce mémoire, en témoignage de mon infinie reconnaissance et de mon profond respect.*

***Sabrina***

# Résumé

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles d'origine microbienne, reconnues pour leurs propriétés tensioactives, leur biodégradabilité et leur faible toxicité. Ces composés suscitent un intérêt croissant pour des applications industrielles, environnementales, pharmaceutiques et alimentaires résume .

Dans ce contexte, le présent travail vise à évaluer la capacité de production de biosurfactants de 12 souches halotolérantes isolées dans l'écosystème hypersalin de la Sebkha de saline de Oued Djemâa. Les souches ont été cultivées dans un bouillon nutritif. Les surnageants de culture ont été soumis à plusieurs tests de criblage pour détecter la production de biosurfactants : effondrement de goutte (drop collapse), diffusion d'huile (oil spreading), distorsion optique en microplaque et indice (EA), d'émulsion (E24). L'hydrophobicité cellulaire a été estimée par le test BATH réalisé sur le culot bactérien.

Les tests drop collapse, oil spreading et microplaque ont révélé une activité tensioactive pour l'ensemble des souches. La majorité des isolats ont présenté des indices d'émulsion E24 et EA supérieurs à 50%, avec des valeurs particulièrement élevées pour SA23, S8 et S6. Le test BATH a indiqué une hydrophobicité cellulaire supérieure à 50%, traduisant une forte affinité des cellules pour les phases hydrophobes.

Ces observations suggèrent que les isolats issus d'un environnement non pollué et hypersalin peuvent produire des biosurfactants stables et actifs en conditions de salinité élevée, ce qui leur confère un fort potentiel pour des applications en biotechnologie environnementale, notamment en biorémédiation ou en récupération assistée du pétrole dans des milieux salins.



**Mots-clés :** biosurfactants, bactéries halotolérantes, Sebkha des salines de Oued Djemâa, potentiel biotechnologique.

# Abstract

Biosurfactants are amphiphilic molecules of microbial origin, recognised for their surfactant properties, biodegradability and low toxicity. These compounds are attracting growing interest for industrial, environmental, pharmaceutical and food applications. abstract

In this context, the present study aims to evaluate the biosurfactant production capacity of 12 halotolerant strains isolated from the hypersaline ecosystem of the Oued Djemâa salt flat. The strains were cultured in a nutrient broth. The culture supernatants were subjected to several screening tests to detect biosurfactant production: drop collapse, oil spreading, optical distortion in microplates and the emulsion index (E24). Cellular hydrophobicity was estimated using the BATH test performed on the bacterial pellet.

The drop collapse, oil spreading and microplate tests revealed surfactant activity for all strains. The majority of isolates exhibited E24 and EA emulsion indices greater than 50%, with particularly high values for SA23, S6 and S8. The BATH test indicated cellular hydrophobicy of over 50%, reflecting a strong affinity of the cells for hydrophobic phases.

These findings suggest that isolates from an unpolluted, hypersaline environment can produce biosurfactants that remain stable and active under conditions of high salinity, giving them great potential for applications in environmental biotechnology, particularly in bioremediation or enhanced oil recovery in saline environments.



**Keywords:** biosurfactants, halotolerant bacteria, Sebkha des saline de Oued Djemâa, biotechnological potential.

# ملخص

المواد السطحية الحيوية عبارة عن جزيئات ذات طبيعة مزدوجة المحبة للما ء والدهنية ذات أصل ميكروبي، معروفة بخصائصها الخافضة للتوتر السطحي ، وقابليتها للتحلل البيولوجي، وسميتها المنخفضة. تحظى هذه المركبات باهتمام متزايد في المجالات الصناعية والبيئية والصيدلانية والغذائية .

وفي هذا السياق، تهدف هذه الدراسة إلى دراسة قدرة 12 سلالة مقاومة للملوحة، تم عزلها من النظام البيئي شديد الملوحة في سبخة وادي جمعة، على إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية. وقد تمت زراعة هذه السلالات في مرق مغذي.

تم تطبيق عدة اختبارات لتقييم انتاج المواد السطحية الحيوية شملت : اختبار انهيار القطرة ، اختبار انتشار الزيت، اختبار الانحراف البصري في الاطباق الدقيقة بالإضافة الى مؤشر الاستحلاب وفي نفس الوقت تم اجراء اختبار ارتباط البكتيريا بالهيدروكربونات باستخدام الخلايا لتقدير الخاصية الكارهة للماء

كشفت نتائج انهيار القطرات وانتشار الزيت واللوحة الدقيقة عن نشاط خافض للتوتر السطحي لجميع السلالات. أظهرت غالبية العزلات مؤشرات استحلاب E24 و EAأعلى من 50٪، مع قيم مرتفعة بشكل خاص لـ .BATH أشار اختبار إلى أن كره الماء للخلايا يزيد عن 50٪، مما يعكس تقاربًا قويًا للخلايا مع المراحل الكارهة للماء.

تشير هذه الملاحظات إلى أن العزلات المستمدة من بيئة غير ملوثة وعالية الملوحة قادرة على إنتاج مواد خافضة للتوتر السطحي حيوية مستقرة وفعالة في ظروف الملوحة العالية، مما يمنحها إمكانات كبيرة للتطبيقات في مجال التكنولوجيا الحيوية البيئية، ولا سيما في المعالجة الحيوية أو الاستخراج المساعد للنفط في البيئات المالحة.



الكلمات المفتاحية: المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية، البكتيريا المقاومة للملوحة، سبخة ملح وادي جمعة، الإمكانات التكنولوجية الحيوية


.

# Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des deux parties (hydrophile et hydrophobe) composant le biosurfactant rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Maier, 2003 modifié). ..... 4
Figure 2 : Structures des trois lipopeptides cycliques ..... 6
Figure 3 : Structures des trois lipopeptides cycliques ..... 6
Figure 4 : Structures de monorhamnolipide et dirhamnolipide produits par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.(Marchant et Banat,2012) ..... 7
Figure 5 : Structure des sophorolipides (A) lactone et (B) acide ..... 7
Figure 6: Structure des tréhalolipides (Cooper et al ,1989) ..... 8
Figure 7: Structure des Phosphatidyléthanolamine ..... 9
Figure 8 : Schéma de la tension de surface, la tension interfaciale et la solubilisation une fonction de la concentration en tensioactif et représentation de la concentration micellaire critique (CMC) (Mulligan, 2005) ..... 11
Figure 9 : Propriété moussante et formation de bulles à l'interface liquide-air par une molécule biosurfactante ..... 40
Figure 10 : Propriété émulsifiante et la formation d'émulsions entre deux liquides immiscibles d'une molécule surfactante ..... 13
Figure 11 : les souches isolées à partir des Salines de Oued Djemaâ dans la wilaya de Relizane. 24
Figure 12: Schéma représentatif du test de dispersion du pétrole brut ..... 26
Figure 13 : Schéma représentatif de test E24 ..... 27
Figure 14 : Réalisation de test de la plaque d'agar CTAB ..... 28
Figure 15 : Illustration représentant le test de Drop collapsing ..... 29
Figure 16 : Test du drop collapse sur plaque ..... 30
Figure 17 : schéma représentatif de test essai d'émulsification ..... 31
Figure 18 : schéma représentatif de test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures ..... 32
Figure 19 : Les douze souches inoculées sur un milieu de sels minéraux ..... 33
Figure 20 : Répartition Les résultats de test d'emulsification (E24). A : pétrole brut avec le surnageant de souches halotolérantes B : témoin positif et négative . ..... 37
Figure 21 : Répartition Les résultats de test d'emulsification E24 ..... 37
Figure 22 : Répartition Les résultats de test de la plaque d'agar CTAB ..... 38
Figure 23 : Les résultats obtenus par le test drop collapse A : effondrement de la goutte B: microplaques (optical distortion grid essay) ..... 39

Figure 24 : Les résultats de test Essai d'émulsification (EA) . A : pétrole brut avec le surnageant de souches halotolérantes B : huile de tournesol avec le surnageant de souches halotolérantes C : témoin positif et négative. ..... 41
Figure 25 **:** Les résultats de test essai d'emulsification EA ..... 41
Figure 26 : pourcentage d'adhérence obtenus par les isolats ..... 43
Figure 27 : Les résultats de test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures (BATH) A : pétrole raffiné avec le surnageant de souches halotolérantes (S1, S2 , SA22,S5,S6, S8) B : pétrole raffiné avec le surnageant de souches halotolérantes (S11, S21, SA23,S51,S61, S81) c : témoin positif et négative ..... 43

# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Principaux types de biosurfactant selon leur composition biochimique ( Desai & Banat, 1997) ..... 10

**Tableau 2** : Les différents types des biosurfactants produits par les espèces bactériennes et fongiques ..... 17

**Tableau 3** : Répartition Les résultats de test de déplacement d'pétrole ..... 34

# Liste des abréviations

CMC : Concentration Micellaire Critique
DO : Densité Optique
E24 : Indice d'émulsification
EA : Activité émulsifiante
ES : Stabilité de l'émulsion
ISP : International streptomyces project
GN : Gélose nutritive
BN : Bouillon nutritif
AG : Acids Gras
C : Carbone
MSM : mineral salt medium
BM : Bleu de Méthylène
A : absorbance (U.A.)
Rf : Rapport frontal
NaCL : Chlorure de sodium
CTAB : Cétyltriméthylammonium
SDS : Dodécylsulfate de Sodium
HCl : Chlorure d'hydrogène
Ca2+ : calcium
K+ : potassium
H+ : hydrogène ou proton

**Unités :**

µL : Microlitres
µm : Micromètres
°C : Degrés Celcius
h : Heures
pH : Potentiel d'hydrogène
% : Pourcent
L : Litre
J : Jour
T : Température
L : Litre
mN : millinewton
M : mètre
g : gramme
rpm : Rotation par minute

min : Minute

ml : millilitre

Mg : milligramme

UE/mL : activité émulsifiante par millilitre

mN /m : Millinewton par métre

mg /L : Milligramme par Litre

µg / mL : microgrammes par millilitre

g /L : gramme par Litre

**Acides Aminés :**

Ala : Alanine

Asp : Asparagine

Glu : Acide glutamique

Leu : Leucine

Val : Valine

# Sommaire

**Résumé**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Introduction** ..... 1

**Étude Bibliographique** ..... 3

1. **Généralités sur les biosurfactants et bioémulsifiaants** ..... 3

1.1. **Définition des biosurfactants et des bioémulsifiants** ..... 3

1.2. **DEFINITION DES BIOEMULSIFIANTS** ..... 4

2. **Classification des biosurfactants et des bioémulsifiants** ..... 4

2.1. **CLASSIFICATION DES BIOSURFACTANTS SELON LEUR NATURE CHIMIQUE** ..... 4

3. **PROPRIETES FONCTIONNELLES DES BIOSURFACTANTS** ..... 10

3.1. **PROPRIETES TENSIOACTIVES ET MICELLAIRES** ..... 10

3.2. **PROPRIETE MOUSSANTE** ..... 11

3.3. **PROPRIETE EMULSIFIANTE** ..... 12

3.4. **TOLERANCE AUX CONDITIONS EXTREMES DE TEMPERATURE, PH ET SALINITE** ..... 13

3.5. **FAIBLE TOXICITE** ..... 13

3.6. **BIODEGRADABILITE** ..... 14

3.7. **BIODISPONIBILITE** ..... 14

3.8. **INTERACTION AVEC LES MEMBRANES DES PLANTES** ..... 14

3.9. **INTERACTION AVEC LES MEMBRANES MICROBIENNES** ..... 15

4. **LES GRANDES CLASSES DES BIOSURFACTANTS/EMULSIFIANTS CHEZ LES MICROORGANISMES** 15

4.1. **Émulsifiants glycolipidiques** ..... 15

4.2. **Complexes lipides-polysaccharides** ..... 16

4.3. Bioémulsifiants lipides-acides aminés ..... 16
4.4. Substances assimilées à des protéines ..... 16
5. Microorganismes producteurs et physiologie ..... 16
6. DOMAINES D'APPLICATION DES BIOSURFACTANTS/ BIOEMULSIFIANTS ..... 21
6.1. INDUSTRIE COSMETIQUE ..... 21
6.2. INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE ..... 21
6.3. DOMAINES PHARMACEUTIQUES ET THERAPEUTIQUES ..... 21
6.4. BIOREMEDIATION ..... 22
Matérièls et Méthodes ..... 2
1. Microorganismes utilisés ..... 24
2. Repiquage et purification des souches ..... 24
3. Criblage des souche productices de biosurfactants et bioémulsifiants ..... 25
3.1. Préparation de la preculture ..... 25
3.2. Preparation des surnageats de cultures ..... 25
4. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants ..... 25
4.5. Test de dispersion du pétrole ..... 25
4.2. Test d'émulsification (E24) ..... 26
4.3. Test de la plaque d' agar CTAB ..... 27
4.4. Le test de 'drop collapse' ..... 28
4.5. Essai d' émulsifiante (EA) ..... 30
4.6. Test d'adhesion bacterienne aux hydrocarburesBATH ..... 31
Réultats_et_discusion ..... 1
1. Etude de production des biosurfactants ..... 33
2.6. Production des tensioactives ..... 33
2. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants ..... 33
2.1. Test de dispersion du pétrole (Oil spreading) ..... 33
2.2. Test d'émulsification (E24) ..... 36
2.3. Test de la plaque d'agar CTAB ..... 38
2.4. Le test de 'Drop collapse' (effondrement de la goutte) et des microplaques ( optical distortion grid essay) ..... 39
2.5. Essai d'émulsification (EA) ..... 40

**2.6 Test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures (BATH) ..... 42**

**Conclusion ..... 1**

**Références bibliographiques ..... 1**

**Annexes ..... 46**

# Introduction

## AVANT PROPOS

Les biotechnologies microbiennes constituent aujourd'hui une voie prometteuse pour développer des produits durables et respectueux de l'environnement. Parmi les métabolites secondaires d'origine microbienne, les biosurfactants attirent un intérêt croissant. Ces tensioactifs réduisent la tension superficielle entre deux phases et présentent plusieurs avantages par rapport à leurs homologues synthétiques : biodégradabilité, moindre toxicité, efficacité à faibles concentrations, stabilité dans des conditions extrêmes de température, pH et salinité, et possibilité de production à partir de substrats renouvelables. Ils possèdent également des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques (Sohail & Jamil, 2023; Rizvi et al., 2024).

Ces caractéristiques rendent les biosurfactants particulièrement attractifs pour de nombreux secteurs industriels : dans l'industrie pétrolière, ils sont employés pour la récupération assistée du pétrole (MEOR) et la biorémédiation des sols contaminés grâce à leur capacité à réduire la tension interfaciale (Chandra et al., 2018) ; dans l'industrie des détergents, ils constituent des agents nettoyants biodégradables et faiblement toxiques, alternatives aux tensioactifs synthétiques (Singh et al., 2019) ; dans l'agroalimentaire, ils jouent le rôle d'émulsifiants, d'agents antimicrobiens et d'antioxydants, contribuant à améliorer la qualité et la conservation des produits (Christopher et al., 2019) ; en cosmétique, ils apportent des propriétés moussantes, émollientes et hydratantes tout en offrant une bonne compatibilité cutanée (Zargar et al., 2022) ; en pharmacie et en médecine, certains biosurfactants présentent des activités antimicrobiennes, antivirales, antitumorales et cicatrisantes (Sarubbo et al., 2022) ; enfin, en agriculture, ils sont utilisés comme agents antifongiques pour la protection des cultures (Chandra et al., 2018). De plus, leur mode de production durable et leur biodégradabilité en font des candidats de choix pour une chimie verte (Chandra et al., 2018; Christopher et al., 2019).

Les écosystèmes salins et hypersalins abritent une grande diversité de microorganismes halophiles et halotolérants, source potentielle de métabolites originaux (Edbeib et al., 2016). Ces microorganismes présentent un avantage écologique et biotechnologique : la formation d'endospores résistantes qui favorise leur adaptation aux conditions extrêmes, y compris la salinité (Horikoshi, 2008). Plusieurs espèces ont un large potentiel biotechnologique — production d'enzymes actives en conditions extrêmes (Nabti et al., 2013), de composés antimicrobiens et anticancéreux, et de biosurfactants (Mondol et al., 2013; Kumar et al., 2020).

Parmi les métabolites produits, les lipopeptides (surfactine, iturine, fengycine) et certains glycolipides se distinguent par leurs propriétés tensioactives et leurs activités antimicrobiennes et antifongiques, utiles en biorestauration, agroalimentaire et pharmacologie (Torres et al ., 2018; Zhao et al., 2017, 2018).

**Objectif du mémoire**

L'objectif principal de ce mémoire est d'étudier la production de biosurfactants par des isolats bactériens collectés dans la Sebkha des salines de Oued Djemaa dans la wilaya de Relizane. Ces isolats, collectés par Dr. MELIANI Meriem, sont conservés au sein du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Relizane.

**Démarche expérimentale :**

La stratégie expérimentale suivie comprend les étapes suivantes :

- Revivification et vérification de la pureté des souches.

- Screening de la production de biosurfactants par des tests qualitatifs (Drop collapse, oil spreading, microplaque) et quantitatifs (indice d'émulsion E24, EA et BATH).

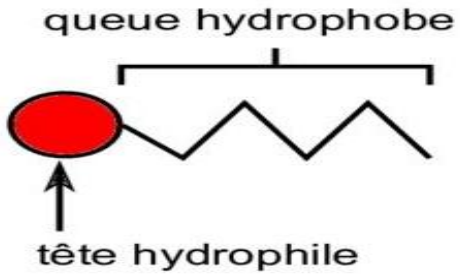
# Étude Bibliographique

# 1. Généralités sur les biosurfactants et bioémulsifiaants

## 1.1. Définition des biosurfactants et des bioémulsifiants

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules tensioactives synthétisées principalement par divers microorganismes, notamment les bactéries, les levures et les champignons (Fiechter, 1992 ; Irorere et al., 2017). Ces composés sont généralement sécrétés de manière extracellulaire ou associés à la membrane cellulaire (Mata-Sandoval et al., 1999), et leur production est particulièrement induite lors de la croissance sur des substrats non miscibles à l'eau (Desai et Banat, 1997). La majorité des microorganismes producteurs de biosurfactants sont isolés de milieux contaminés par les hydrocarbures, notamment les effluents industriels issus de l'industrie pétrolière. Sur le plan structural, les biosurfactants sont des molécules de nature amphiphile, comportant une partie hydrophobe constituée d'une chaîne d'acide gras ou d'acide gras hydroxylé de longueur variable, et une tête hydrophile pouvant être un acide aminé, un carbohydrate, un peptide, un alcool, un acide carboxylique ou un groupement phosphate (Marchant et Banat, 2012) (Figure 1). Cette dualité structurale leur confère la capacité de s'accumuler aux interfaces entre deux phases immiscibles, réduisant ainsi la tension de surface (interface liquide/air) ou la tension interfaciale (interface liquide/liquide), et favorisant la miscibilité et la solubilisation des substrats peu solubles dans l'eau (Navon-Venezia et al., 1995). Ils facilitent également l'adhésion des cellules microbiennes aux hydrocarbures, permettant leur assimilation comme source de carbone.

L'intérêt croissant pour ces molécules s'explique par leur diversité structurale, leur adaptabilité aux procédés industriels, ainsi que leur profil environnemental favorable, caractérisé par une faible toxicité et une biodégradabilité élevée, comparativement aux surfactants d'origine chimique (Santos et al., 2016)



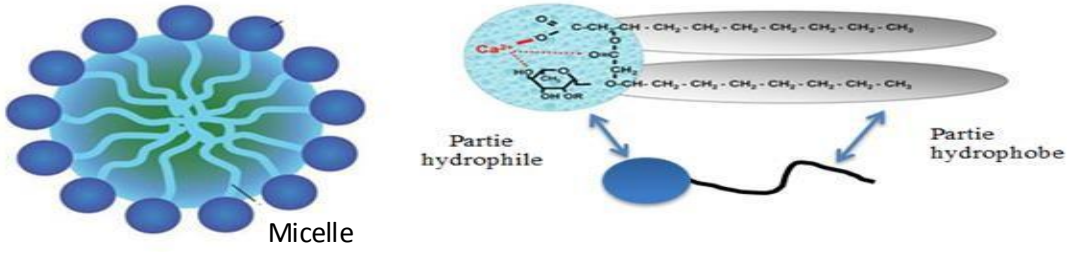



**Figure 1** : Représentation schématique des deux parties (hydrophile et hydrophobe) composant le biosurfactant rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Maier, 2003 modifié).

### 1.2. DEFINITION DES BIOEMULSIFIANTS

Les bioémulsifiants sont des agents tensioactifs de haut poids moléculaire élaborés par certaines espèces microbiennes. À la différence des biosurfactants, ils n'induisent pas de réduction significative des tensions de surface et interfaciale, mais assurent la formation et la stabilisation d'émulsions durables. Leur rôle physiologique naturel est multiple : ils participent à la formation de biofilms, améliorent la biodisponibilité des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau, et interviennent dans la régulation de l'adhésion et du détachement des microorganismes aux surfaces. Par ailleurs, certains bioémulsifiants ont démontré une activité antimicrobienne notable (Cameron et al., 1988).

## 2. Classification des biosurfactants et des bioémulsifiants

### 2.1. CLASSIFICATION DES BIOSURFACTANTS SELON LEUR NATURE CHIMIQUE

La classification des biosurfactants repose sur la diversité de leurs structures moléculaires, laquelle est étroitement liée à la nature du microorganisme producteur. On distingue deux groupes principaux : les molécules de faible poids moléculaire, subdivisées en six classes (lipopeptides, glycolipides, phospholipides, tréhalolipides, acides gras et biosurfactants particuliers), et les molécules de haut poids moléculaire, représentées essentiellement par les polymères microbiens.

#### a) LES LIPOPEPTIDES

Les lipopeptides sont des biosurfactants formés par l'association d'une chaîne d'acide gras liée à une séquence peptidique. Ils sont produits principalement par des bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, ainsi que par certains champignons et actinomycètes tels que *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Serratia* et *Actinoplanes* (Liu et al., 2015). Selon leur architecture moléculaire, ils

peuvent être cycliques, avec formation d'une liaison entre l'extrémité C-terminale du peptide et un groupement amine ou hydroxyle de l'acide gras, ou linéaires, avec une chaîne peptidique connectée à un acide gras via le groupement α-amine (Liu et al., 2005). Parmi les principaux lipopeptides microbiens, on distingue la surfactine, l'iturine, la fengycine et la lichénysine (Vandana et Singh, 2018) (Figure 2).

- **SURFACTINE**

La surfactine doit son nom à ses remarquables propriétés tensioactives. Elle est capable d'abaisser la tension superficielle de 72 à 27,9 mN/m, avec une concentration micellaire critique de 0,017 g/L. Il s'agit d'un lipopeptide cyclique constitué d'un heptapeptide (L-Glu$^{1}$-L-Leu$^{2}$-D-Leu$^{3}$-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7) formant un cycle lactonique lié à un acide gras β-hydroxylé linéaire ou ramifié de 13 à 15 atomes de carbone (Yakimov et al., 1998). Des travaux récents ont mis en évidence ses propriétés antivirales, antitumorales et anticoagulantes. Ses variants structuraux, la lichénysine et la pumilacidine, sont produits respectivement par *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus* (Cochrane et Vederas, 2016 ; Vandana et Singh, 2018 ; Bouassida et al., 2018).

- **LICHENYSINE**

Produite par *Bacillus licheniformis*, la lichénysine présente une structure et des propriétés physicochimiques proches de celles de la surfactine. La lichénysine A, issue de la souche *B. licheniformis* BAS50, est caractérisée par une longue chaîne d'acide gras β-hydroxylé. Elle se distingue par sa stabilité sur une large gamme de pH, de températures et de concentrations en NaCl (Cochrane et Vederas, 2016).

- **ITURINE**

L'iturine A est le premier membre identifié de la famille des iturines, isolé d'une souche de *Bacillus subtilis* prélevée dans un sol de la province de l'Ituri (République démocratique du Congo). Ces lipoheptapeptides cycliques, contenant un acide gras β-aminé, sont reconnus pour leur puissante activité antifongique et leur potentiel en tant que biopesticides pour la protection des cultures végétales (Vandana et Singh, 2018).

- **FENGYCINE**

La fengycine est un lipodécapeptide portant un acide gras β-hydroxylé en C15 à C17, avec un dimorphisme Ala/Val caractéristique en position 6 du peptide. Bien que moins hémolytique que les surfactines et les iturines, elle présente une forte activité antifongique, notamment vis-à-vis des champignons filamenteux (Cochrane et Vederas, 2016).

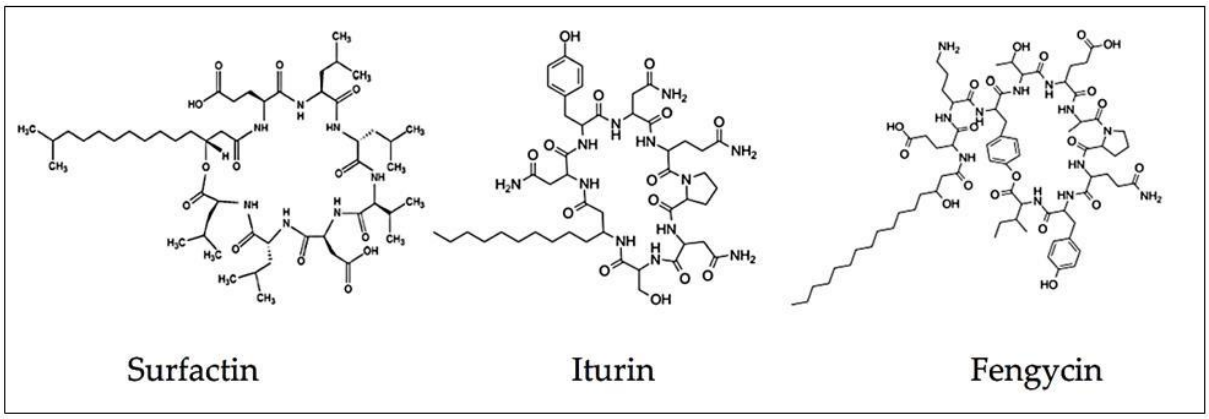



**Figure 2 :** Structures des trois lipopeptides cycliques

**b) Les glycolipides**

Les glycolipides représentent la classe de biosurfactants la plus largement décrite. Leur structure associe une fraction lipidique à un carbohydrate par une liaison ester ou éther. Les principaux représentants sont les rhamnolipides, les sophorolipides et les tréhalolipides (Figure 3).

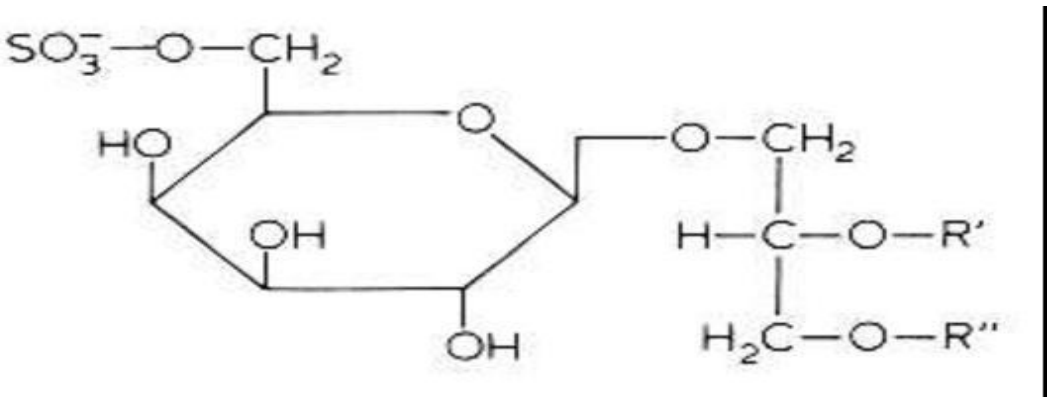


**Figure 3** : Structures des trois lipopeptides cycliques

- Les **rhamnolipides** sont produits principalement par *Pseudomonas aeruginosa*. Ils sont constitués d'un ou deux résidus de rhamnose liés à des molécules d'acide β-hydroxydécanoïque par des liaisons O-glycosidique et ester (Karanth et al., 1999 ; Shaw, 1975), et sont reconnus pour leur efficacité dans la dégradation des hydrocarbures en sols contaminés (Rahman et al., 2007) (Figure 4).

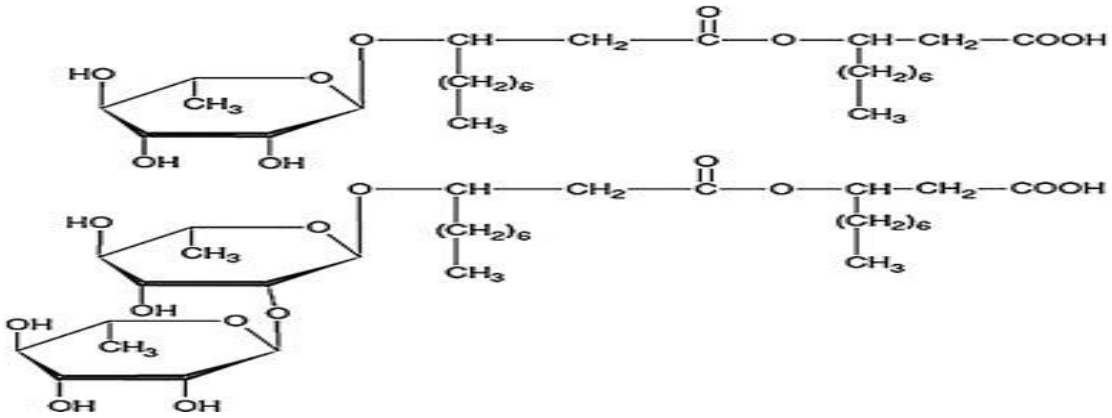


**Figure 4** : Structures de monorhamnolipide et dirhamnolipide produits par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.(Marchant et Banat,2012)

- Les **sophorolipides**, produits par *Torulopsis* sp., sont formés d'un disaccharide de sophorose lié à un acide gras hydroxylé. Ils existent sous deux formes : acide (groupement carboxylique libre) et lactonique (anneau macrocyclique), et sont principalement utilisés en cosmétique comme agents bactériostatiques (Asmer et al., 1988 ; Hu et Ju, 2001) ( Figure 5).

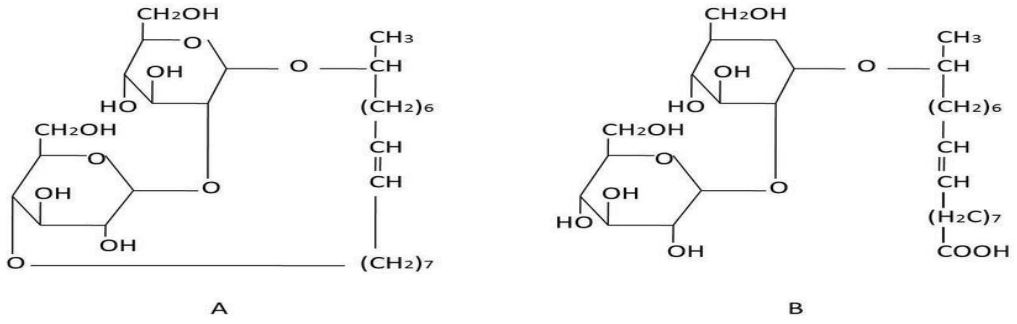


**Figure 5** : Structure des sophorolipides (A) lactone et (B) acide

- Les **tréhalolipides**, synthétisés par *Mycobacterium* et *Rhodococcus*, associent un disaccharide de tréhalose à des acides mycoliques β-hydroxylés. Ils se distinguent par leurs propriétés biologiques remarquables, notamment leur capacité à induire la différenciation de lignées leucémiques et à inhiber la protéine kinase C (Sudo et al., 2000 ; Isoda et al., 1997) (Figure 6).

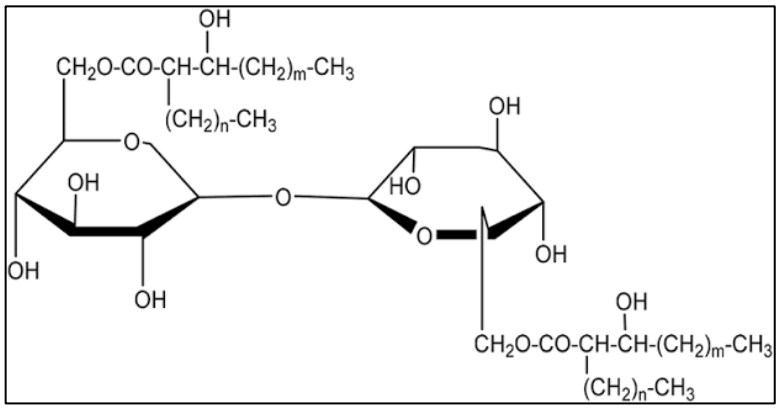



**Figure 6**: Structure des tréhalolipides (Cooper et al ,1989)

### c) LES PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides sont des constituants majeurs des membranes cellulaires microbiennes et animales. Leur structure repose sur un glycérol lié à deux chaînes d'acides gras et à un groupement phosphate. La queue lipophile apolaire assure l'ancrage hydrophobe, tandis que la tête phosphatée confère le caractère hydrophile (Erikson, 2008), faisant de ces molécules des agents tensioactifs naturels impliqués dans le transport et la protection des constituants cellulaires (Figure 7).

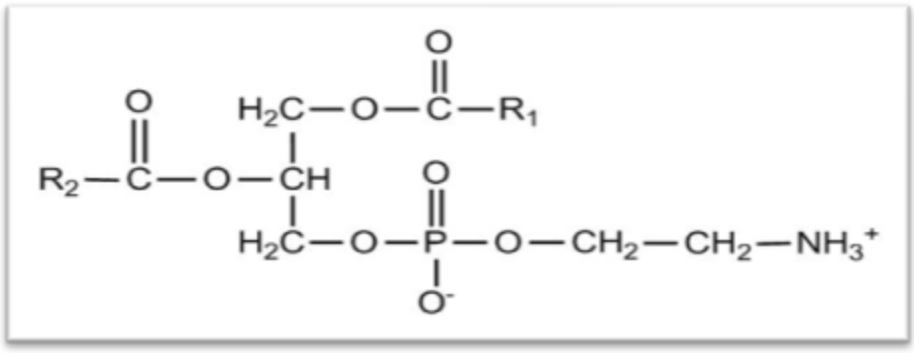


**Figure 7:** Structure des Phosphatidyléthanolamine

**D) LES ACIDES GRAS**

Certains microorganismes produisent des acides gras libres par oxydation des n-alcanes. Les acides gras à chaînes comprises entre C12 et C14 présentent les meilleures propriétés tensioactives. Certains d'entre eux, comme l'acide corynomycolique, portant des groupements hydroxyles ou des résidus alkyles, ont été identifiés comme de puissants surfactants (Desai et Banat, 1997 ; Fujii et al., 1999).

**E) LES POLYMERES MICROBIENS**

Les biosurfactants polymériques sont des macromolécules de haut poids moléculaire composées de polysaccharides, protéines, lipopolysaccharides ou lipoprotéines, ou de mélanges de ces composés. Ils se distinguent par une haute viscosité, une force élastique élevée et une résistance au cisaillement. Les principaux représentants sont l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus*, le liposan de *Candida lipolytica* et le lipomannan de *Candida tropicalis* (Karanth et al., 1999).

Par ailleurs, les biosurfactants peuvent être classés selon la charge ionique de leur tête polaire en anioniques, cationiques ou zwitterioniques (Van Ginkel, 1989), ou selon leur équilibre hydrophile-lipophile (HLB), qui détermine leur aptitude à favoriser les émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau (Tiehm, 1994).

**F) LES BIOSURFACTANTS PARTICULIERS**

Certains microorganismes sécrètent des vésicules membranaires extracellulaires, considérées comme des biosurfactants particuliers, jouant un rôle dans l'adsorption des n-alcanes par les cellules microbiennes (Mnif et Ghribi, 2015). À titre d'exemple, les vésicules d'Acinetobacter sp. HO1-N, d'un diamètre de 20 à 50 nm, sont composées de protéines, phospholipides et lipopolysaccharides impliqués dans l'adhésion cellulaire aux hydrocarbures (Vijayakumar et Saravanan, 2015). Dans

certains cas, des cellules bactériennes entières peuvent elles-mêmes jouer le rôle d'agents tensioactifs.

**Tableau 1** : Principaux types de biosurfactant selon leur composition biochimique ( Desai & Banat, 1997)

| Biosurfactants | Microorganismes producteurs | Biosurfactants | Microorganismes producteurs |
|---|---|---|---|
| **Glycolipides**<br>-Rhamnolipides<br><br>-Tréhalolipides<br><br>-Sophorolipides | *Pseudomonas aeruginosa*<br><br>*Pseudomonas sp.*<br><br>*Rhodococcus erythropolis*<br>*Mycobacterium sp*<br>*Nocardia erythropolis*<br><br>*Torulopsis bombicola*<br>*Candida apicola*<br>*Candida petrophilum*<br>*Ustilago zeae, Ustilago maydis* | **Lipopeptides et lipoprotéines**<br><br>- Lipopeptides<br>-Serrawettine<br>-Viscosine<br>-Surfactine<br>-Subtilisine<br>-Gramicidines<br>-Polymyxines | *Bacillus licheniformis*<br>*Serratia marcescens*<br>*Pseudomonas flurescens*<br>*Bacillus subtilis*<br>*Bacillus subtilis*<br>*Bacillus brevis*<br>*Bacillus polymyxa* |
| **Acides gras, phospholipides et lipides neutres**<br><br>-Acides gras<br>-Lipides neutres<br>-Phospholipides<br><br>**Biosurfactants particuliers**<br>-Vésicules<br><br>-Cellules entières | *Candida lepus*<br>*Nocardia erythropolis*<br>*Thiobacillus thiooxidans*<br><br>*Acinetobacter calcoaceticus*<br><br>Variété des bactéries | **Biosurfactants polymériques**<br>-Emulsane<br><br>-Biodispersane<br>-Mannane-lipide-protéine<br>-Liposane<br><br>-Hydrates de carbone<br>-Protéine-lipide | *Acinetobacter calcoaceticus*<br><br>*Candida tropicalis*<br>*Candida lipolytica*<br><br>*Pseudomonas fluorescens*<br>*Debaryomyces polymorphis* |

## 3. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES BIOSURFACTANTS

Grâce à leur structure amphiphile, les biosurfactants modifient les propriétés des interfaces liquide/liquide et liquide/air, ce qui leur confère des activités émulsifiante, moussante et dispersante remarquables.

### 3.1. PROPRIETES TENSIOACTIVES ET MICELLAIRES

L'efficacité d'un biosurfactant est évaluée par deux paramètres clés : la concentration micellaire critique (CMC) et la réduction de la tension de surface. L'eau présente naturellement une tension de surface de 72 mN/m ; un bon biosurfactant est capable de l'abaisser à environ 30–35 mN/m, et de réduire la tension interfaciale huile/eau jusqu'à 1 mN/m (Santos et al., 2016). La CMC correspond à la concentration minimale à partir de laquelle les molécules de biosurfactant s'agrègent pour former des micelles, entraînant des modifications brusques des propriétés physicochimiques du milieu (conductivité, viscosité, turbidité). La CMC des biosurfactants, comprise entre 1 et 2000 mg/L, est généralement 10 à 40 fois inférieure à celle des surfactants chimiques, ce qui témoigne de leur meilleure efficacité à faible concentration (Desai et Banat, 1997) (Figure 8).

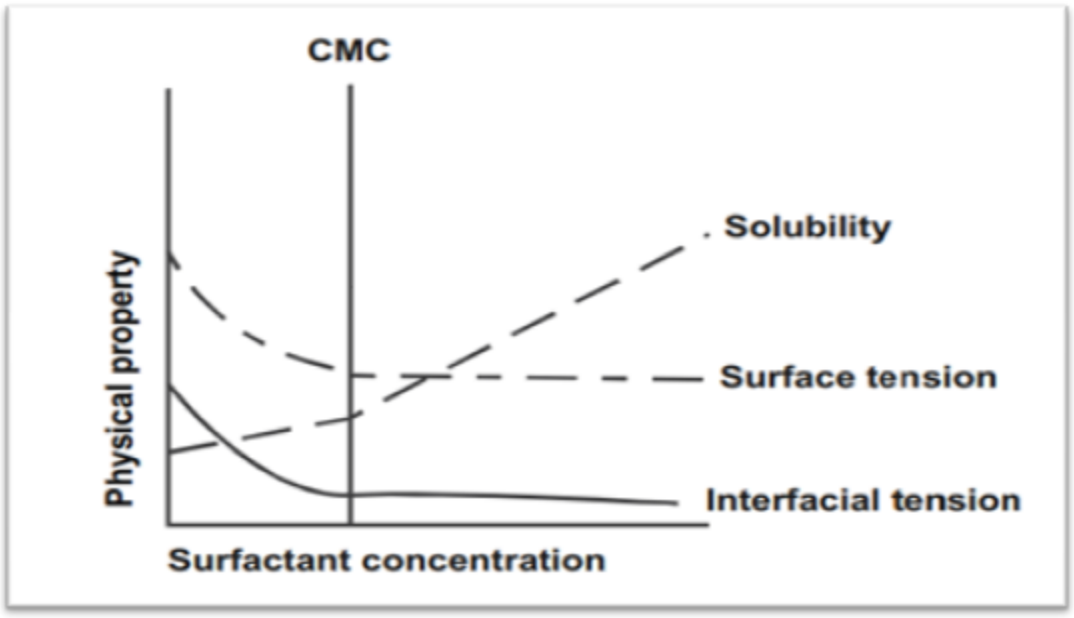



**Figure 8** : Schéma de la tension de surface, la tension interfaciale et la solubilisation une fonction de la concentration en tensioactif et représentation de la concentration micellaire critique (CMC) (Mulligan, 2005)

### 3.2. PROPRIETE MOUSSANTE

Les biosurfactants s'adsorbent à l'interface liquide/air, stabilisant les bulles de gaz formées par agitation et réduisant la tension de surface. La stabilité de la mousse est favorisée par la présence de groupements ioniques sur la molécule, qui génèrent des répulsions électrostatiques entre les bulles (Larpent et Chasseray, 1992). Certains biosurfactants, comme la surfactine, présentent des propriétés moussantes supérieures à celles de surfactants chimiques de référence tels que le SDS (Dubey et al., 2005) (Figure 9).

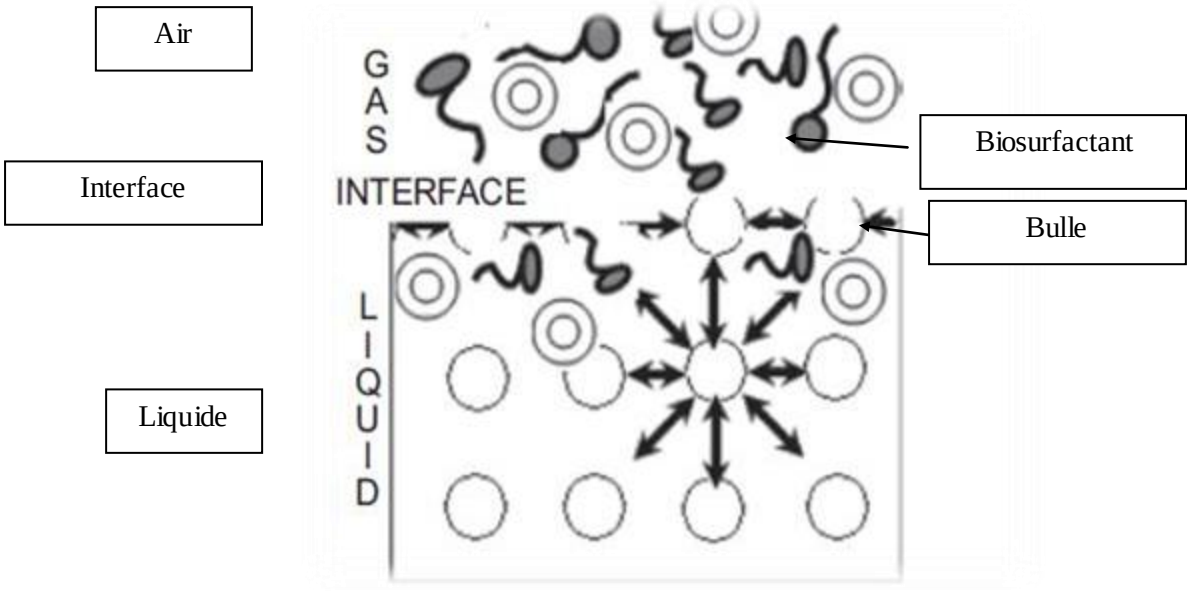



**Figure 9** : Propriété moussante et formation de bulles à l'interface liquide-air par une molécule biosurfactante

### 3.3. PROPRIETE EMULSIFIANTE

L'émulsification correspond à la dispersion stable d'un liquide sous forme de fines gouttelettes dans une phase liquide immiscible. L'activité émulsifiante (EA) est proportionnelle à la finesse des gouttelettes formées, tandis que la stabilité de l'émulsion (ES) caractérise sa persistance dans le temps. Les émulsions peuvent se déstabiliser par floculation, coalescence, crémage ou mûrissement d'Ostwald. Les biosurfactants améliorent la stabilité des émulsions en réduisant la tension interfaciale entre les deux phases, augmentant ainsi l'aire interfaciale disponible et retardant la coalescence des gouttelettes (Magdassi et al., 1996) (Figure 10).

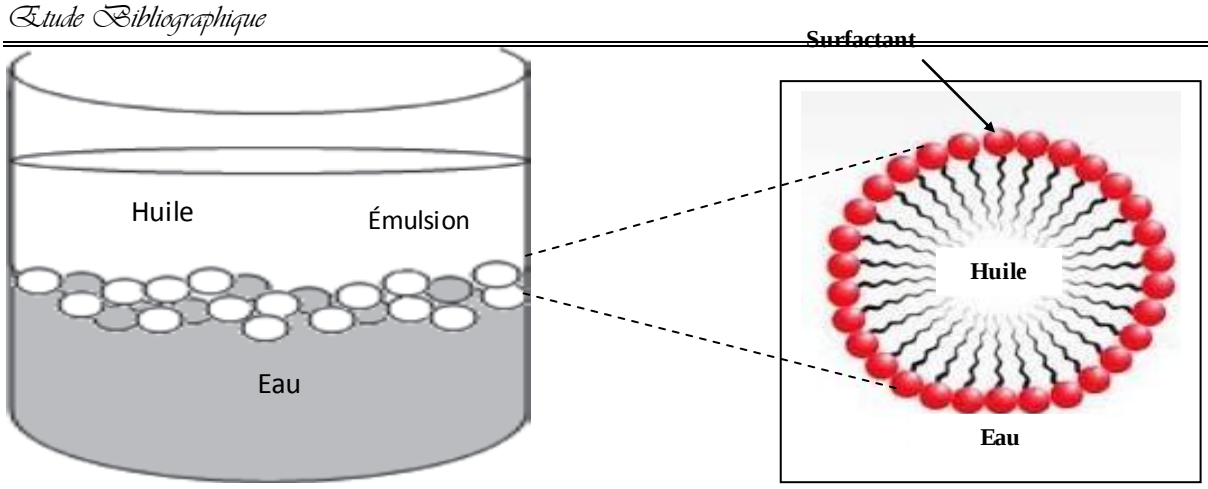



**Figure 10** : Propriété émulsifiante et la formation d'émulsions entre deux liquides immiscibles d'une molécule surfactante

### 3.4. TOLERANCE AUX CONDITIONS EXTREMES DE TEMPERATURE, PH ET SALINITE

De nombreux biosurfactants conservent leurs propriétés malgré des variations importantes des conditions environnementales, notamment la température, le pH et la salinité. Plusieurs d'entre eux restent actifs à des températures élevées et sur une large plage de pH (de 2 à 12). Ils tolèrent également des concentrations de NaCl élevées : Kebbouche Gana et al. (2009) rapportent une stabilité jusqu'à 30% de NaCl, alors que seulement 2% de NaCl suffisent pour inactiver certains tensioactifs synthétiques (Santos et al., 2016). De même, Luna et al. (2013) montrent que le biosurfactant produit par Candida sphaerica demeure stable entre 5 et 120 °C, pour des pH de 2 à 12, et en présence de NaCl jusqu'à 10%.

### 3.5. FAIBLE TOXICITE

Les données sur la toxicité des biosurfactants restent limitées, mais ils sont généralement considérés comme faiblement toxiques voire non toxiques, ce qui les rend adaptés aux industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Par exemple, un tensioactif anionique synthétique (Corexit) affichait une CL50 contre la bactérie *Photobacterium phosphoreum* dix fois plus faible que celle des rhamnolipides (Vijayakumar et Saravanan, 2015). Les tests de Luna et al. (2013) n'ont révélé aucune toxicité du biosurfactant de *Candida sphaerica* vis à vis *d'Artemia salina* et de plusieurs végétaux (*Solanum gilo, Lactuca sativa L., Brassica oleracea L.*). Hentati et al. (2016) ont obtenu des résultats similaires pour des biosurfactants de *Bacillus stratosphericus*, qui n'ont pas affecté des cellules rénales humaines jusqu'à 1000 µg/ml. Toutefois, des effets toxiques existent

selon les composés : Wang et al. (2008) ont montré que des rhamnolipides de Pseudomonas aeruginosa ont un effet algicide sur *Heterosigma akashiwo* à des concentrations supérieures à 0,4 mg/L.

### 3.6. BIODEGRADABILITE

Étant d'origine biologique, les biosurfactants sont généralement plus facilement biodégradables que les tensioactifs synthétiques. Ils sont rapidement décomposés par les microorganismes présents dans l'eau et le sol (Mohan et al., 2006 ; Mulligan, 2009).

### 3.7. BIODISPONIBILITE

Les biosurfactants facilitent l'accès aux nutriments pour les souches en augmentant la mouillabilité des surfaces, la solubilisation des substrats et leur diffusion, et en émulsifiant les composés insolubles dans l'eau (Lindow et Brandl, 2003; Ron et Rosenberg, 2001), en particulier les hydrocarbures par leur dispersion dans une phase aqueuse. Les biosurfactants peuvent aussi changer les propriétés de surface des cellules bactériennes pour faciliter la consommation des substrats ayant une nature hydrophobe par les bactéries. Des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* augmentent l'hydrophobicité de la surface cellulaire bactérienne causant ainsi la libération de polyliposaccharides de la membrane extracellulaire ce qui augmente par conséquent le contact entre les cellules bactériennes et le substrat hydrophobe. Les biosurfactants protègent également les souches qui les produisent contre les métaux lourds qui peuvent éventuellement avoir un effet négatif sur les bactéries, en les encapsulant à l'intérieur des micelles (D'aes et al., 2010).

En outre, les biosurfactants agissent aussi sur les métabolites endogènes secrétés par les bactéries en augmentant leur solubilité et par la suite leur bioactivité dans leur milieu environnant, ce qui est le cas des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 qui augmente l'efficacité de l'activité antimicrobienne des phénazines en augmentant leur solubilité (Perneel et al., 2008).

### 3.8. INTERACTION AVEC LES MEMBRANES DES PLANTES

Certains biosurfactants lipopeptidiques contribuent à la phytopathogénicité en s'insérant dans les membranes plasmiques des cellules végétales et en y formant des pores. Cette insertion provoque des flux transmembranaires d'ions (Ca2+, K+, H+), entraîne l'effondrement du gradient de pH à travers la membrane plasmique et aboutit à la nécrose cellulaire. Les lipopeptides produits par *Pseudomonas syringae pv. syringae* illustrent bien ce mécanisme.

Les lipopeptides peuvent aussi déclencher des réponses de défense chez la plante, notamment la réponse systémique induite (RSI). La RSI est une réponse de protection déclenchée par la

colonisation racinaire par des microorganismes non pathogènes. Par exemple, le massetolide A, produit par *Pseudomonas fluorescens* SS101, induit une résistance des tomates aux infections de *Phytophthora* (Tran et al., 2007).

### 3.9. INTERACTION AVEC LES MEMBRANES MICROBIENNES

Le potentiel antimicrobien des biosurfactants est bien documenté. Leur mode d'action en biocontrôle repose souvent sur l'altération des membranes microbiennes : la formation de canaux ou la perturbation de la surface cellulaire fragilise l'agent pathogène. Les lipopeptides cycliques sont parmi les biosurfactants les plus étudiés pour leur rôle en biocontrôle (Raaijmakers et al., 2006). Par exemple, les lipopeptides cycliques de *Pseudomonas fluorescens* CMR12a protègent les plantes contre *Pythium* et *Phytophthora*, tandis que les rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 agissent en synergie avec les phénazines pour lutter contre *Pythium spp*. (Perneel et al., 2008).

Plusieurs études montrent que les biosurfactants de certaines souches de *Pseudomonas fluorescens* ont une activité antifongique marquée. Ils inhibent des champignons phytopathogènes tels que *Phytophthora cryptogea* (pourriture des fruits et des fleurs), *Fusarium oxysporum* (flétrissement), et *Pythium ultimum* (maladies racinaires) (Hultberg et al., 2008). Ils contribuent également à freiner la croissance in vitro de champignons comme *Rhizoctonia solani*, responsable de la pourriture des racines du soja (D'aes et al., 2011).

## 4. LES GRANDES CLASSES DES BIOSURFACTANTS/EMULSIFIANTS CHEZ LES MICROORGANISMES

Les bioémulsifiants microbiens sont répartis en quatre classes selon leur nature chimique.

### 4.1. Émulsifiants glycolipidiques

Les glycolipides constituent la classe de bioémulsifiants la plus étudiée. Les rhamnolipides, principalement produits par *Pseudomonas aeruginosa*, sont des glycolipides composés de résidus rhamnose liés à des acides gras hydroxylés ; ils présentent une bonne biodégradabilité, une faible toxicité et des propriétés physicochimiques comparables à celles des surfactants synthétiques. Les sophorolipides, produits par *Starmerella bombicola* (anciennement *Candida bombicola*), présentent une cytotoxicité plus faible et une marge de sécurité plus large que les rhamnolipides, ce qui leur confère un avantage certain pour les applications cosmétiques et antimicrobiennes. D'autres espèces

comme *Candida* et *Schizanella* synthétisent des lipides mannosyl-érythritol, et *Ustilago zeae* des lipides cellobiose (Fiechter, 1992).

### 4.2. Complexes lipides-polysaccharides

L'émulsane, produit par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, est un lipopolysaccharide polyanionique extracellulaire constitué d'un hétéropolysaccharide lié à des acides gras par des liaisons O-ester et N-acyle, stabilisant les émulsions huile/eau par formation d'un film polymère à l'interface hydrophobe. Une revue récente publiée en 2024 souligne les avancées dans la production, la purification et les applications de l'émulsane, confirmant son potentiel biotechnologique unique (D'Almeida et al., 2024).

### 4.3. Bioémulsifiants lipides-acides aminés

La surfactine, produite par *Bacillus subtilis*, est l'un des lipopeptides les plus performants. Une revue de 2023 sur la production durable des bioémulsifiants confirme que la surfactine et ses variants structuraux restent parmi les bioémulsifiants les plus étudiés, en raison de leurs propriétés de surface remarquables et de leur large spectre d'activités biologiques (Rubio-Ribeaux et al., 2023). La lichénysine A, produite par *Bacillus licheniformis*, partage une structure proche de la surfactine avec un pouvoir surfactant supérieur et une CMC très basse (Grangemard et al., 2001).

### 4.4. Substances assimilées à des protéines

Les bioémulsifiants de haut poids moléculaire, tels que le liposan produit par *Yarrowia lipolytica* en présence d'alcanes ou de pétrole brut, sont des amphiphiles polysaccharidiques capables de stabiliser durablement des émulsions huile-dans-eau ; leur classification repose sur l'équilibre hydrophile-lipophile (HLB), les bioémulsifiants à HLB élevé étant utilisés pour les émulsions huile-dans-eau et ceux à HLB faible pour les émulsions eau-dans-huile.

## 5. Microorganismes producteurs et physiologie

Les biosurfactants sont principalement synthétisés par des microorganismes aérobies cultivés en milieu aqueux en présence de diverses sources de carbone, notamment les glucides, les huiles, les hydrocarbures et les déchets industriels (Fukuoka et al., 2007 ; Mulligan, 2009). Leur production est particulièrement induite lors de la croissance sur des substrats peu hydrosolubles, notamment les alcanes linéaires (Hommel et al., 1994). Ces composés peuvent être associés à la surface cellulaire ou sécrétés dans le milieu extracellulaire (Saharan et al., 2011 ; Banat et al., 2014).

Les microorganismes producteurs appartiennent principalement aux bactéries, levures et moisissures, et sont retrouvés dans des environnements très diversifiés : milieux aquatiques, sols, sédiments, tissus végétaux, mais aussi environnements extrêmes tels que les sites hypersalins (Santos et al., 2016). Ils sont néanmoins plus fréquemment isolés de milieux contaminés par les hydrocarbures, comme les réservoirs pétroliers et les sols pollués (Banat et al., 2010).

La diversité taxonomique des producteurs est à l'image de la diversité structurale des biosurfactants. Les genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* sont reconnus pour la production de lipopeptides ; *Pseudomonas*, *Candida*, *Mycobacterium* et *Arthrobacter* pour les glycolipides ; tandis que *Thiobacillus*, *Aspergillus*, *Corynebacterium* et *Acinetobacter* sont associés à la production de phospholipides et d'acides gras (Liu et al., 2015).

Les différents types des biosurfactants produits par les levures et les moisissures sont récapitulés dans le **Tableau 2.**

**Tableau 2** : Les différents types des biosurfactants produits par les espèces bactériennes et fongiques

| Biosurfactant | Microbial source | References |
|---|---|---|
| Rhamnolipids | *Pseudomonas aeruginosa* | [18] |
| | *Pseudomonas chlororaphis* | |
| | *Serratia rubidea* | |
| Sophorolipids | *Candida bombicola* | [5] |
| | *Candida batistae* | [20] |
| | *Trichosporon ashii* | [6] |
| Saphorose Lipid | *Torulopsis bombicola* | [21] |
| Trehalose lipids | *Rhodococcus erythropolis* | [22] |
| | *Arthrobacter Sp.* | |
| | *Nocardia erythropolis* | |
| | *Corneybacterium sp.* | |
| | *Mycobacterium sp* | |
| Ornithine lipids | *Pseudomonas sp* | [11] |
| | *Thiobacillus thiooxidans* | |
| | *Agrobacterium sp* | |
| Viscosin | *Pseudomonas fluoresens* | [3] |
| | *Leuconostoc mesenteroids* | |
| Carbohydrate lipid | *Pseudomonas fluoresens* | [25] |
| | *Debaryomyces polmorphus* | |

| Bacterial Strains | Biosurfactants | Properties | Reference |
|---|---|---|---|
| *Pontibacter korlensis* | Pontifactin | Surface-active, antimicrobial, antibiofilm activities | Balan *et al.*, 2016 |
| *Bacillus licheniformis* | Lipopeptides | Heat resistance capacity to emulsify oils used in cosmetics | Coronel *et al.*, 2015 |
| *Paracoccus sp.* | | Enhance solubility of hydrophobic compounds | Xu *et al.*, 2020 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Rhamnolipids | High emulsifying activities against different oils, capacity to remove hydrophobic contaminants, | Silva *et al* 2010 |
| | | Capacity to use as carbon sources | Santa *et al.*, 2002 |
| *Pseudomonas desmolyticum* | | Degradation of textile dye | Jadhav *et al.*, 2011 |
| *Serratia marcescens* | Serrawettins | Produces lipopeptide surfactants having the capability to reduce surface tension | Wei *et al.*, 2004 |
| *Bacillus subtilis* | Cyclic lipopeptides | A significant reduction in the activities of acetylcholinesterase, a-carboxylesterase, and acid phosphatases | Revathi *et al.*, 2013 |
| | Pumilacidin | Antiviral activity against Herpes simplex virus 1 (HSV-1) | Naruse *et al.*, 1990 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Glycolipid | Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons | Sun *et al.*, 2019 |
| *Pseudomonas protegens* | Orfamide A | Insecticidal against Myzus persicae | Jang *et al.*, 2013 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Rhamnolipid | Antifungal agents against F. sacchari in pokkah boeng Disease | Goswami *et al.*, 2014 |
| *Pseudomonas fluorescens* | Pseudofactin II | Antiadhesive activity disinfectant | Janek *et al.*, 2012 |
| *Bacillus sp.* | Lipopeptide | Anticancer activity antiviral properties | Donio *et al.*, 2013 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | Rhamnolipid | Enhanced oil recovery | Zhao *et al.*, 2015 |
| *Bacillus subtilis* | Lipopeptide | Removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals | Singh *et al.*, 2014 |
| *Rhodotorula bogoriensis* | Sophorolipid | Antimicrobial property against *Propionibacterium acnes* | Solaiman *et al.*, 2013 |

| Biosurfactant | Microorganisme producteur | Référence |
|---|---|---|
| **Glycolipides** | *Torulopsis bombicola*<br>*Candida bombicola*<br>*Sympodiomycopsis paphiopedili*<br>*Candida bogoriensis*<br>*Pseudozyma rugulosa*<br>*Candida sp.SY 16*<br>*Pseudozyma aphidis*<br>*Ustilago maydis*<br>*Fusarium sacchari*<br>*Cryptococcus sp. VITGBN2*<br>*Rhodotorula babjevae YS3*<br>*Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. | **Kim et *al*., 1997**<br>**Kitamoto et *al*., 2001**<br>**Solaiman et *al*., 2004**<br>**Thanomsub et *al*., 2004**<br>**Rau et *al*., 2005 Cortes-Sánchez et *al*., 2011**<br>**Basak and Das , 2014**<br>**Sen et *al*., 2017 Souza et *al*., 2017** |
| **Mannanoproteines** | *Kluyveromyces marxianus* | **Lukondeh et *al*., 2003** |
| **Acides gras** | *Candida ingens* | **Amezcua-Vega et *al*., 2007** |
| **Complexes glycolproteiques.** | *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682.<br>*Candida lipolytica*<br>*Aspergillus ustus*<br>*Cunninghamella echinulata* | **Amaral et *al*., 2006 Sarubbo et *al*., 2007 Kiran et *al*., 2009 Andrade et *al*., 2018** |
| **Lipopeptides** | *Fusarium sp.* BS-8 | **Qazi et *al*., 2014** |

## 6. DOMAINES D'APPLICATION DES BIOSURFACTANTS/ BIOEMULSIFIANTS :

Les biosurfactants constituent des alternatives prometteuses aux tensioactifs synthétiques pour de nombreux procédés industriels. Leurs propriétés d'émulsification, d'assouplissement, de moussage, de stabilisation des dispersions et de fixation des colorants les rendent utiles dans l'agroalimentaire, la pétrochimie, la pharmacie et la biorémédiation des polluants organiques et inorganiques.

### 6.1. INDUSTRIE COSMETIQUE

En cosmétique, les biosurfactants sont appréciés pour leurs propriétés de surface (détergence, mouillabilité, émulsification, solubilisation, dispersion, formation de mousse) (Rieger & Rhein, 1997). Ils présentent souvent une meilleure tolérance cutanée que les tensioactifs chimiques, avec des effets anti-irritants et hydratants. Les sophorolipides et les rhamnolipides sont parmi les plus utilisés : les formes lactones de sophorolipides stimulent le métabolisme des fibroblastes dermiques et favorisent la néosynthèse du collagène, tandis que certains rhamnolipides servent d'agents antipelliculaires, anti-rides ou anti-acnéiques (Piljac & Piljac, 1999).

### 6.2. INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

De par leur faible toxicité et leur biocompatibilité, certains biosurfactants conviennent aux applications alimentaires (Banat et al., 2000). Ils sont employés comme émulsifiants, solubilisants et agents moussants, améliorant notamment la texture des produits gras tels que les crèmes laitières (Ron & Rosenberg, 2001). Les biosurfactants de haut poids moléculaire stabilisent les gouttelettes d'huile et donnent des émulsions très stables. Ils servent aussi à contrôler la consistance des crèmes glacées et des produits céréaliers, et à stabiliser les acides gras en évitant leur agglomération (Kachholz et al., 1987). Par ailleurs, leur activité anti-adhésive est exploitée pour limiter la formation de biofilms sur les surfaces alimentaires et réduire ainsi le risque de contamination (Nitschke & Costa, 2007).

### 6.3. DOMAINES PHARMACEUTIQUES ET THERAPEUTIQUES

Les biosurfactants offrent de nombreuses applications pharmaceutiques. Certains lipopeptides sont de puissants adjuvants immunologiques, non toxiques et non pyrogènes, améliorant la réponse immunitaire lorsqu'ils sont associés à des antigènes (Gharaei-Fathabad, 2011). Des essais in vivo montrent qu'un couplage de poly-L-lysine avec des lipopeptides (iturine-AL, herbicoline-A) renforce la réponse immune (Rodrigues et al., 2006). Beaucoup de biosurfactants possèdent des

activités antibactériennes et antifongiques liées à leur action sur la perméabilité membranaire microbienne. Certains, comme la surfactine, présentent une activité antivirale contre des virus enveloppés (Vollenbroich et al., 1997). Des rhamnolipides associés à des alginates ont montré une activité antivirale significative contre les herpèsvirus I et II (Remichkova et al., 2008), avec une efficacité dépendant de la dose et souvent maximale en dessous de la concentration micellaire critique (CMC) (Banat et al., 2010).

Les sophorolipides présentent également des propriétés immunomodulatrices : des essais sur rats atteints de sepsis ont montré une réduction de la mortalité via la modulation de la production d'oxyde nitrique et de cytokines, ainsi qu'une diminution des titres d'IgE, suggérant un potentiel anti-inflammatoire (Hagler et al., 2006; Cameotra & Makkar, 2004).

Par ailleurs, plusieurs glycolipides (mannosylerythritol lipides-A/B, sophoroses, succinoyl trehalose lipides) ont démontré des activités anticancéreuses in vitro, notamment en induisant la différenciation des cellules de la lignée HL60 plutôt que leur prolifération (Sudo et al., 2000).

### 6.4. BIOREMEDIATION

Les hydrocarbures, fortement hydrophobes et faiblement solubles, s'accumulent dans les sols et sédiments, limitant leur biodisponibilité pour les microorganismes et les agents chimiques de dépollution. Les biosurfactants améliorent les processus de biorémédiation en augmentant la biodisponibilité des polluants par deux mécanismes principaux : (1) réduction de la tension de surface et interfaciale, favorisant la mobilisation des hydrocarbures (effet important en dessous de la CMC), et (2) solubilisation par formation de micelles au dessus de la CMC, qui incorpore les molécules hydrophobes et accroît leur solubilité (Urum & Pekdemir, 2004; Nguyen et al., 2008). Les biosurfactants de haut poids moléculaire agissent comme agents émulsifiants, stabilisant les gouttelettes et facilitant leur élimination (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

Trois types d'interactions microbe-hydrocarbure ont été décrits : accès aux hydrocarbures solubles, contact direct avec de grandes gouttes d'huile, et contact avec des gouttelettes pseudo-solubilisées ou émulsifiées (Franzetti et al., 2010). Les biosurfactants produits par *Pseudomonas* (viscosines, amphisines, rhamnolipides) sont largement impliqués dans ces mécanismes : ils améliorent la minéralisation d'alcanes (Bak et al., 2014), augmentent la biodisponibilité et la biodégradabilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bezza & Chirwa, 2017) et mobilisent les hydrocarbures fortement adsorbés aux sédiments (Groboillot et al., 2011). Les bactéries produisent de nombreux lipopeptides synthétisés par des voies non ribosomiques. Cette diversité structurale et fonctionnelle

confère à ces biosurfactants un large spectre d'applications, notamment en biorémédiation et en biocontrôle, justifiant l'intérêt de focaliser l'étude sur ce groupe.

# Matériels et Méthodes

## 1. Microorganismes utilisés

Notre travail est focalisé sur la production des biosurfactants en utilisant des souches bactériennes issues d'une recherche antérieure réalisée dans le cadre d'un mémoire de Master. Les microorganismes ont été isolées à partir de la Saline de Oued Djemaâ, localisée dans la wilaya de Relizane, au nord-ouest de l'Algérie. Les bactéries isolées sont testées pour leur capacité à synthétiser des biosurfactants et des bioémulsifiants à travers une multitude des testes qualitatifs et quantitatifs **(figure 11).**

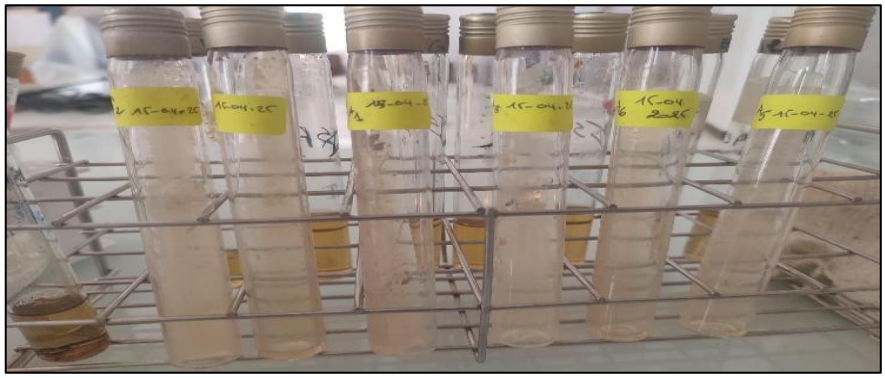


**Figure 11** : les souches isolées à partir des Salines de Oued Djemaâ dans la wilaya de Relizane.

## 2. Repiquage et purification des souches

Les souches utilisées dans le cadre de ce travail ont été obtenues à partir de travaux antérieurs réalisés lors d'un mémoire de Master 2. Ces souches, préalablement isolées, ont fait l'objet d'un repiquage et d'une purification afin de garantir leur viabilité et leur pureté avant toute expérimentation. repiquage et purification Des souches

Le repiquage a été effectué dans des conditions aseptiques sur deux types de milieux à savoir la Gélose Nutritive (GN) pour les souches bactériennes, et le milieu **ISP2** préconisé pour la souche d'actinomycète. À l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie isolée de chaque souche a été prélevée puis ensemencée par stries sur le milieu approprié. Les boîtes ont ensuite été incubées à des températures de 37°C pendant 24 à 48 heures pour les souches bactériennes ensemencées sur le milieu GN, et 30°C pendant 5 à 7 jours pour la souche d'actinomycète sur milieu ISP2.

La purification a été assurée par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de colonies morphologiquement identiques. La pureté des isolats a été vérifiée par observation microscopique directe après chaque repiquage et coloration de Gram.

## 3. Criblage des souche productices de biosurfactants et bioémulsifiants

Dans le but de sélectionner des souches bactériennes productrices de biosurfactant et bioémulsifiants, un criblage a été réalisé en combinant plusieurs méthodes de détection complémentaires, notamment le test d'émulsification (E24), le test de Drop Collapse et le test de déplacement d'huile (Oil Spreading), test de la plaque d'agar CTAB, essaie d'émulsification, test de BATH.

### 3.1. Préparation de la pré-culture

Préalablement à ces tests, une pré-culture de chaque souche sélectionnée a été réalisée dans un bouillon nutritif stérile. Un volume de 5 mL de cette pré-culture a ensuite été inoculé aseptiquement dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu minéral salin (MSM) (composition en annexe), supplémenté en hydrocarbures à raison de 1% (v/v) comme unique source de carbone. Le pétrole brut utilisé a été préalablement stérilisé par filtration sur membrane de 0,45 µm avant d'être incorporé au milieu. Les Erlenmeyers ont été obturés avec du coton cardé recouvert de papier aluminium, puis placés dans un incubateur à agitation de type bain-marie agitant (FWS, FAITHFUL) à 180 rpm et 30°C pendant 5 jours. L'agitation continue assure une homogénéisation optimale du milieu ainsi qu'une aération suffisante, qui sont des conditions favorables à la croissance bactérienne et à la production de biosurfactants.

### 3.2. Preparation des surnageats de cultures

En fin d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 10 000 g pendant 10 minutes afin de séparer la biomasse cellulaire du surnageant. Les surnageants ainsi préparés ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation ultérieure pour les différents tests de criblage.

## 4. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants :

### 4.5. Test de dispersion du pétrole :

Ce test repose sur la capacité des biosurfactants à déplacer un film huileux à la surface d'une solution aqueuse. Un volume de 10 µL de pétrole brut a été déposé délicatement à la surface de 40 mL d'eau distillée contenue dans une boîte de Pétri de 150 mm de diamètre, afin de former une fine membrane huileuse homogène. Par la suite, 10 µL du surnageant a été déposé avec précaution au centre de cette membrane. La formation d'une zone claire résultant du déplacement du film huileux témoigne de la présence d'une activité biosurfactante. Le diamètre de cette zone de déplacement est

directement proportionnel à la concentration en biosurfactants présents dans le surnageant (Morikawa et al., 2000) (figure 12).

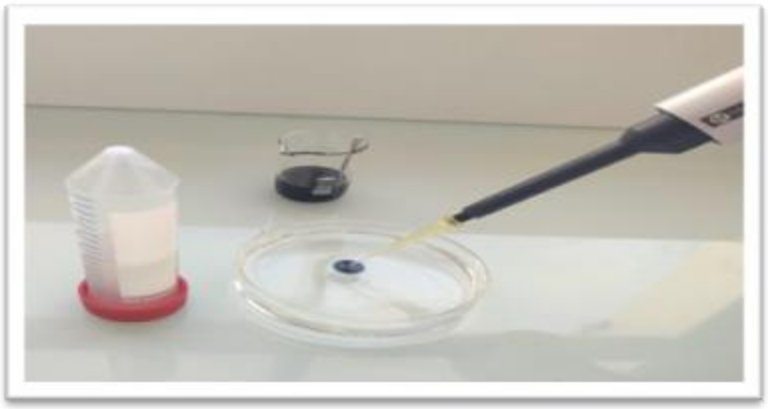


**Figure 12:** Schéma représentatif du test de dispersion du pétrole brut

### 4.2. Test d'émulsification (E24)

Le test d'émulsification ou l'indice d'émulsification E24 a été déterminé selon la méthode décrite par Cooper et Goldenberg (1987) qui consiste à évaluer la capacité des souches microbiennes à émulsionner une phase hydrophobe, telle que le pétrole brut, le gasoil, le benzène ou le kérosène, l'huile de tournesol, dans une phase hydrophile représentée par le milieu de culture. Un volume de 3 mL de surnageant de culture a été mélangé à 3 mL de pétrole brut dans un tube à essai, puis soumis à une agitation au vortex pendant 2 minutes. Le mélange a ensuite été laissé au repos pendant 24 heures à température ambiante. Le milieu minéral salin stérile (MSM) et une solution de SDS (voir annexe) ont été utilisés respectivement comme témoins négatif et positif (Sidkey et al., 2016 ; COOPER et Goldenberg, 1986).

L'activité émulsifiante est déterminée par la mesure de la hauteur de la couche d'émulsion formée (He) par rapport à la hauteur totale du mélange (Ht) et est calculé en utilisant l'équation suivante :

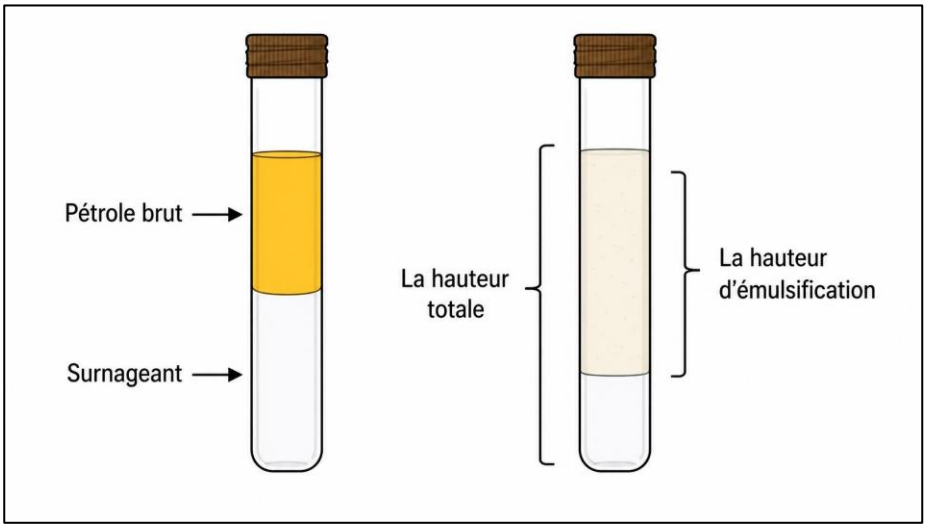
$$\mathbf{E24} = \frac{\boldsymbol{He}}{\boldsymbol{Ht}} \times \mathbf{100}$$

**E24 :** Activité d'émulsification après 24h.

**He :** Hauteur de l'émulsion formée (cm).

**Ht :** Hauteur totale du mélange (cm)

Une valeur élevée de l'indice E24 reflète une capacité importante de la souche microbienne à produire des biosurfactants aptes à stabiliser les émulsions hydrocarbonées. Toutefois, cette méthode demeure qualitative et ne fournit qu'une indication sur la présence de composés biosurfactants, sans permettre leur quantification précise (Uzoigwe et al., 2015) (figure 13).




.

**Figure 13** : Schéma représentatif de test E24

### 4.3. Test de la plaque d' agar CTAB

La méthode de la plaque d'agar CTAB–bleu de méthylène est un essai semi-quantitatif développé par Siegmund et Wagner (1991)**,** permettant la détection des glycolipides extracellulaires et des biosurfactants anioniques. Elle repose sur la propriété des tensioactifs anioniques à former des paires d'ions insolubles avec des substances cationiques, telles que le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) et le bleu de méthylène (BM), rendant ainsi la détection plus sensible et plus spécifique. Le milieu de détection a été préparé en incorporant au milieu minéral salin (MSM) du CTAB (0,2 g/L)**,** du bleu de méthylène (0,005 g/L)**,** de l'agar (1,5 **%)** et du glucose comme source de carbone. Après homogénéisation et ébullition, le milieu a été coulé en boîtes de Pétri. Une fois solidifié, trois puits ont été creusés dans chaque plaque, dans lesquels 30 µL de milieu inoculé ou de surnageant de culture ont été déposés. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures**.**

La lecture des résultats repose sur l'observation de la coloration des plaques. Sur le fond bleu clair du milieu, les souches productrices de biosurfactants anioniques ou de rhamnolipides

extracellulaires se distinguent par la formation de halos bleu foncé résultant de la précipitation des paires d'ions insolubles avec le CTAB et le bleu de méthylène (figure 14).

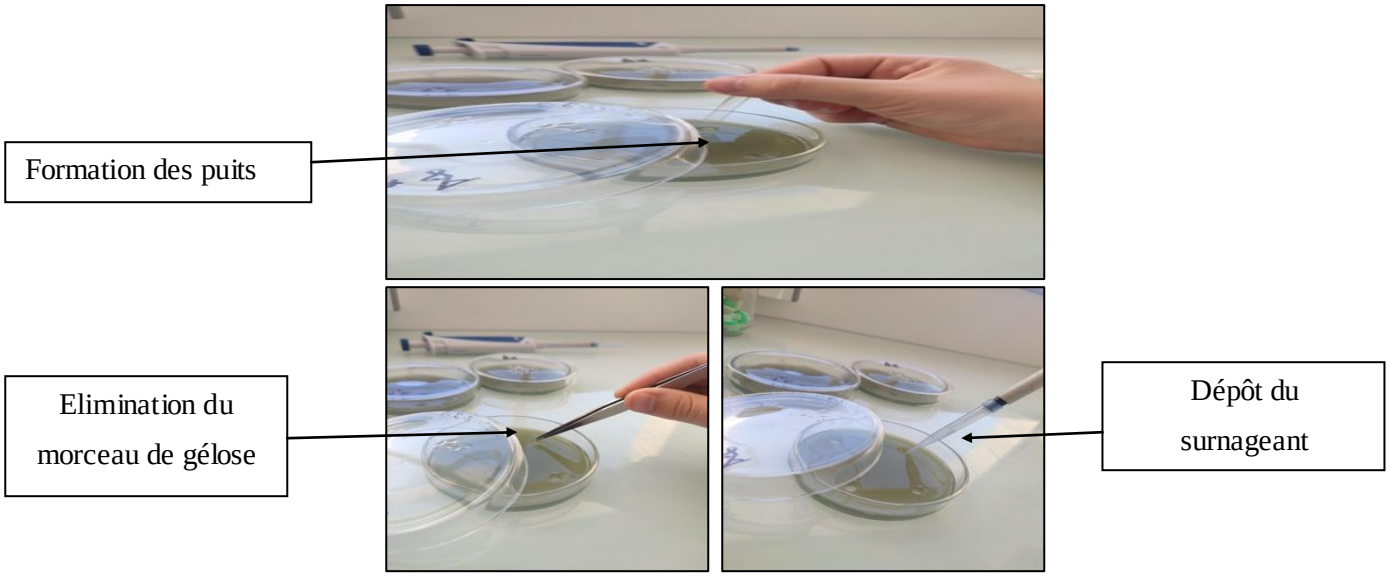



**Figure 14 :** Réalisation de test de la plaque d'agar CTAB

### 4.4. Le test de 'drop collapse'

Afin de confirmer les résultats obtenus, deux expériences complémentaires ont été réalisées.

- **Méthode 1 : Drop Collapse sur lame**

Le test de Drop Collapse est une méthode rapide et simple de détection des biosurfactants. Il repose sur le dépôt d'une goutte de surnageant de culture sur une surface solide recouverte d'une fine couche de pétrole brut. En absence de tensioactifs, les gouttes demeurent stables et intactes sur la surface hydrophobe. En revanche, la présence de biosurfactants se traduit par l'étalement ou l'effondrement des gouttes, résultant de la réduction de la tension interfaciale. La rapidité de cet étalement est directement corrélée à l'intensité de l'activité biosurfactante *(Sidkey et al., 2016)*. Notons toutefois que ce test présente une sensibilité relativement limitée, une concentration minimale en tensioactifs étant requise pour induire une réponse observable *(Walter et al., 2010)*. La stabilité des gouttes dépend de la concentration des tensioactif et une durée minime de la réaction indique une activité élevée du surfactant (figure 15).

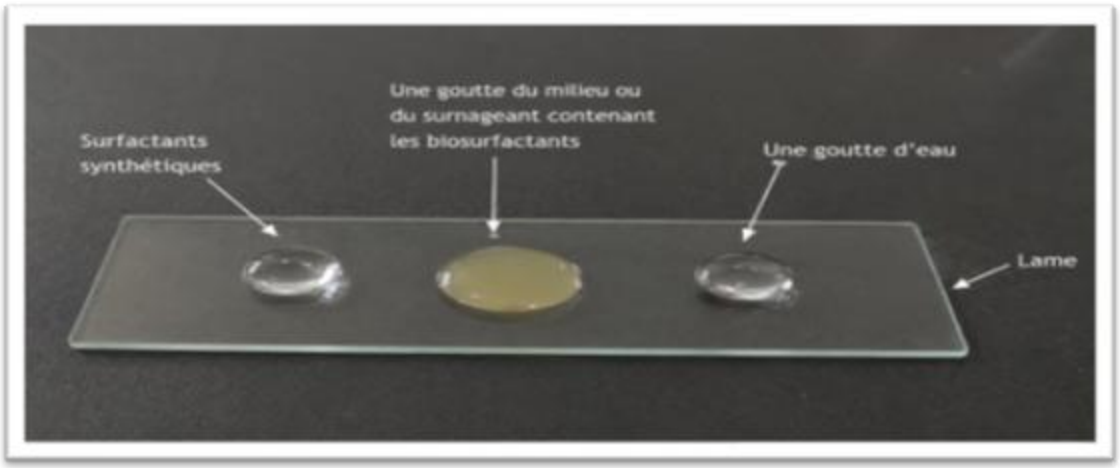



**Figure 15** : Illustration représentant le test de Drop collapsing

- **Méthode 2 : Drop Collapse sur microplaque**

Cette technique qualitative de détection des biosurfactants est réalisée sur microplaque de 96 puits circulaires (12,7 × 8,5 cm, diamètre des puits : 8 mm). Préalablement à toute utilisation, la plaque est soumise à trois rinçages successifs à l'eau chaude, à l'éthanol puis à l'eau distillée, avant d'être séchée à température ambiante (Bodour et Maier, 1998).

Chaque puits est ensuite rempli de 2 µL de pétrole brut et laissé à température ambiante pendant 1 heure afin de permettre la formation d'un film huileux stable. Par la suite, 5 µL de surnageant de culture sont déposés délicatement à la surface de l'huile. Des puits témoins sont préparés en parallèle : un témoin négatif contenant du pétrole brut additionné de milieu de culture stérile, et un témoin positif contenant du pétrole brut additionné d'une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) (Figure 16). La lecture des résultats est effectuée visuellement après 1 minute. Le maintien d'une goutte perlée et intacte indique un résultat négatif, tandis que l'étalement de la goutte sur la surface huileuse témoigne d'un résultat positif, révélant ainsi la présence de biosurfactants.

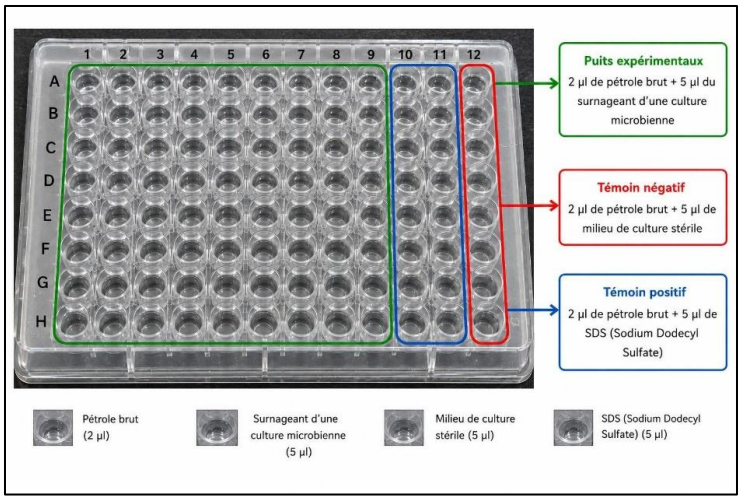



**Figure 16** : Test du drop collapse sur microplaque

### 4.5. Essai d' émulsifiante (EA)

Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 72 heures en milieu MSM. À la fin de l'incubation, le surnageant a été obtenu par centrifugation à 10 000 tr/min pendant 10 minutes à température ambiante. Un volume de 6 mL de surnageant a été mélangé à 1 mL d'huile de tournesol ou de pétrole brut, puis agité vigoureusement au vortex pendant 2 minutes. Après 1 heure de repos, l'absorbance de la phase aqueuse a été mesurée à 400 nm (figure 17). Le blanc a été préparé en remplaçant le surnageant par du milieu MSM stérile. Un contrôle positif (SDS à 1%, w/v) et un contrôle négatif (MSM stérile seul) ont été inclus afin de valider l'essai.

L'activité émulsifiante a été exprimée en unités d'émulsification par millilitre (UE/mL) et calculée selon la formule suivante :

$$\mathbf{EA\ (UE\ /\ mL)} = \frac{\boldsymbol{Absorbance\ mesurée}}{\mathbf{0{,}010}} \times \boldsymbol{facteur\ de\ dilution}$$

Une absorbance de 0,010 unité à 400 nm, multipliée par le facteur de dilution (le cas échéant), a été considérée comme correspondant à une unité d'activité émulsifiante par millilitre (UE/ml) (Maniyar et al., 2011 ; Dharmadevi et al., 2022).

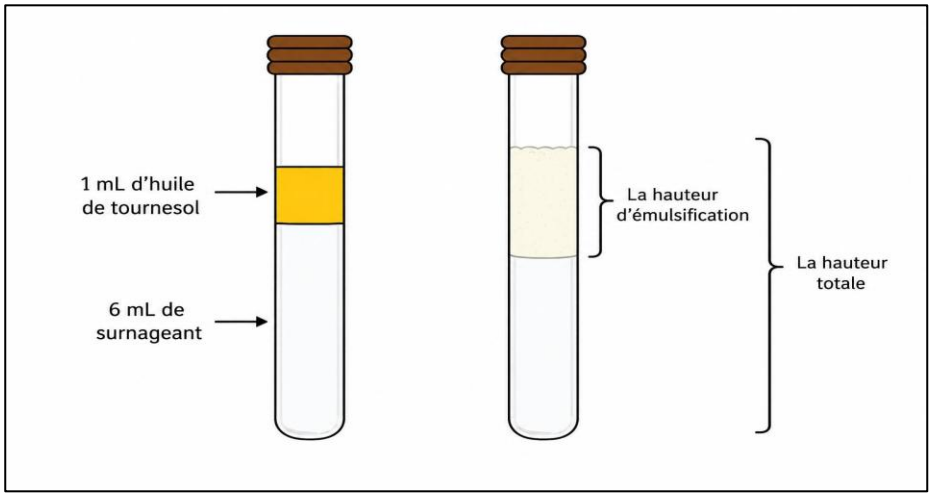



**Figure 17 :** schéma représentatif de test essai d'émulsification

### 4.6. Test d'adhesion bacterienne aux hydrocarbures BATH

Le test BATH *(Bacterial Adhesion To Hydrocarbons)* est une méthode photométrique permettant d'évaluer l'hydrophobicité de surface cellulaire (CSH) des bactéries (**Rosenberg et al., 1980)**.

Les souches ont été cultivées pendant 24 à 48 heures, puis centrifugées à 8 000–10 000 tr/min pendant 10 minutes. Le culot bactérien a été lavé deux fois avec une solution saline stérile (NaCl 0,85%), puis remis en suspension dans la même solution. La densité optique de la suspension a été ajustée à DO600 ≈ 0,5 (absorbance initiale A0). Un volume de 3 mL de suspension bactérienne a été mélangé à 0,5–1 mL de pétrole raffiné dans un tube en verre stérile, puis agité au vortex pendant 1 à 2 minutes et laissé au repos pendant 15 à 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de la phase aqueuse inférieure a ensuite été mesurée à 600 nm (figure 18). Le pourcentage d'hydrophobicité (H) a été calculé selon la formule :

$$\mathbf{H(\%) = 1 - \frac{A}{A0} \times 100}$$

Où : A0 représente l'absorbance initiale de la suspension bactérienne et A l'absorbance de la phase aqueuse après interaction avec l'hydrocarbure. Un contrôle positif (solution de SDS) et un contrôle négatif (NaCl 0,85%) ont été inclus et soumis au même protocole afin de permettre une comparaison fiable des résultats. Une valeur élevée de H reflète une forte hydrophobicité de surface et suggère une capacité importante de production de biosurfactants (Pruthi et Cameotra, 1997).

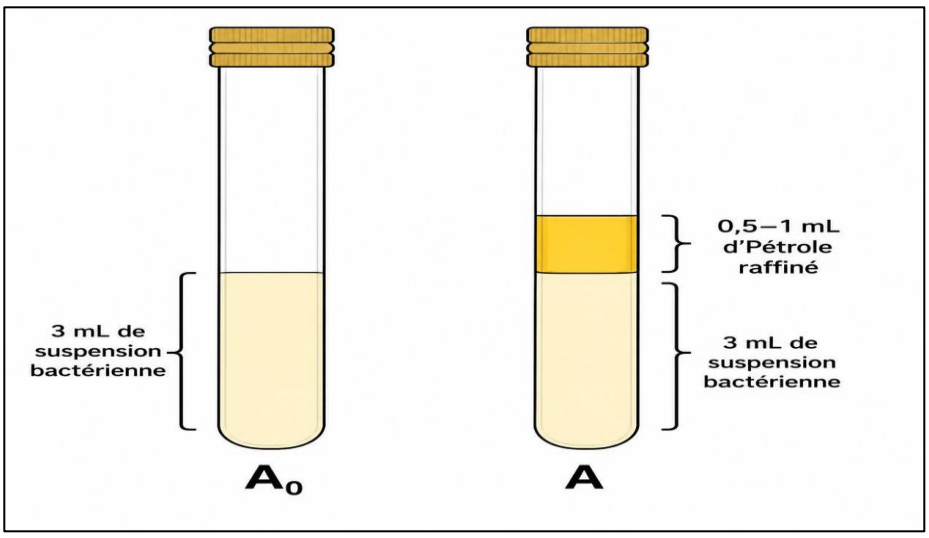



**Figure 18** : schéma représentatif de test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures

# Réultats_et_discusion

## 1. Etude de production des biosurfactants

### 2.6. Production des tensioactives

Douze souche bactériennes ont été sélectionnées pour l'étude de la production des biosurfactants. Les souches proviennent des prélèvements de la saline de Oued Djemaâ localisée dans la wilaya de Relizane, au nord-ouest de l'Algérien **(figure 19).**

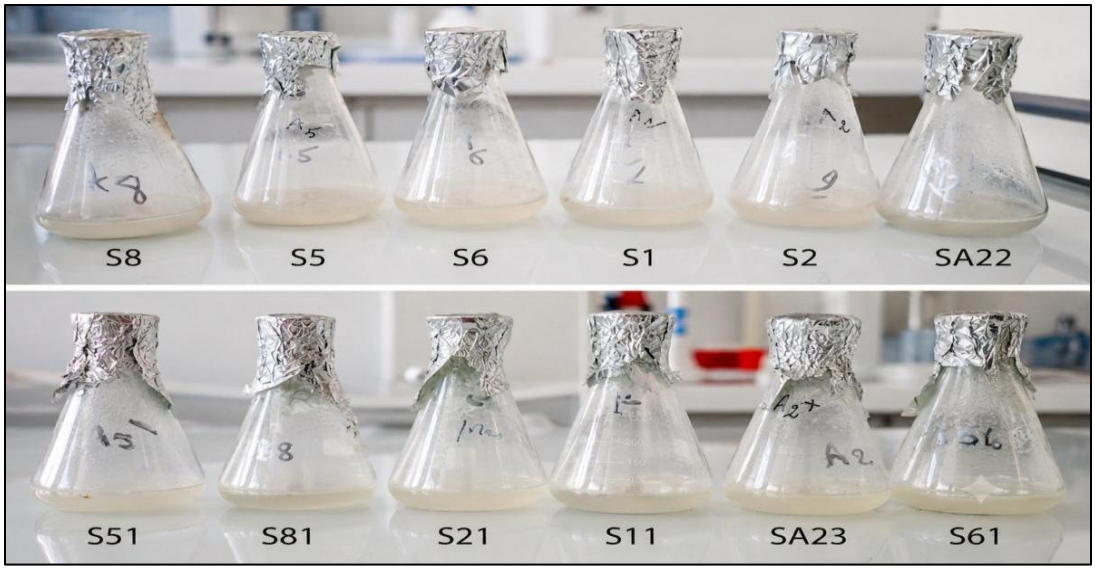


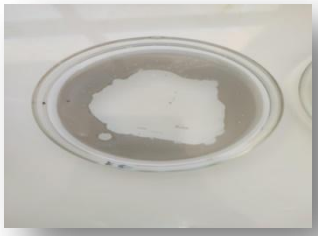
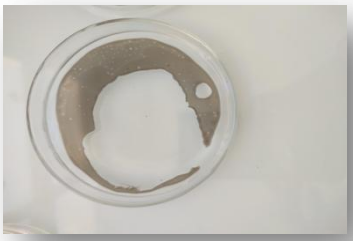
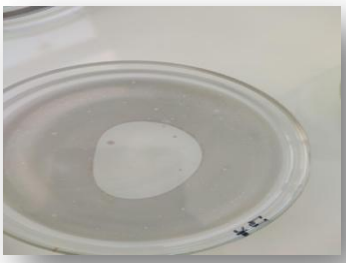

**Figure 19** : Les douze souches inoculées sur un milieu de sels minéraux

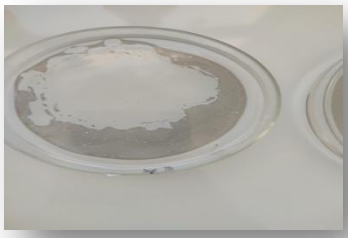
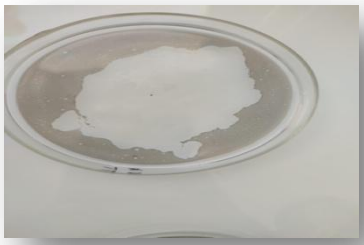
## 2. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants

### 2.1. Test de dispersion du pétrole (Oil spreading) :

Le test de déplacement du pétrole a permis d'évaluer qualitativement la production de biosurfactants par les souches bactériennes étudiées. La formation d'une zone claire à la surface du film de pétrole brut a été interprétée comme un résultat positif, témoignant de la présence de molécules tensioactives, tandis que son absence a été considérée comme un résultat négatif.

**Tableau 3** : Répartition Les résultats de test de déplacement d'pétrole

| **Souches** | **Test de dispersion du pétrole** | **Figure** |
|---|---|---|
| S1 | + |  |
| S2 | + |  |
| SA22 | + |  |

| | | |
|---|---|---|
| S5 | + |  |
| S6 | + |  |
| S8 | + |  |

Les résultats ont révélé que les souches halotolérantes S5, S6 et S8, isolées de la sebkha, ont présenté les zones claires les plus importantes, indiquant une activité tensioactive plus élevée comparativement aux souches S1, S2 et SA22**,** dont les zones de déplacement plus réduites suggèrent une production de biosurfactants plus limitée. En l'absence de mesure des diamètres, l'interprétation demeure qualitative et permet uniquement de classer les souches selon leur capacité apparente de dispersion du pétrole.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, plusieurs études ont montré que les bactéries halotolérantes isolées de milieux salins et hypersalés présentent une activité biosurfactante détectable par le test Oil Spreading *(Raouf et al., 2024 ; Neagu et Stancu, 2025 ; Mousa et al., 2025).* Par ailleurs, les isolats présentant les zones de dispersion les plus importantes ont été associés aux concentrations les plus élevées en biosurfactants et aux meilleures

performances d'émulsification et de biodégradation des hydrocarbures *(*Sidkey et al. , 2016); *Jiang et al., 2024 ; Gao et al., 2024)*. Les différences observées entre les souches seraient liées à leur variabilité génétique ainsi qu'aux quantités de biosurfactants produites *(Gaur et al., 2022)*

Ces observations suggèrent que les souches S5, S6 et S8 pourraient appartenir à des groupes bactériens reconnus pour leurs capacités biosurfactantes, et confirment le potentiel des environnements hypersalés comme source de microorganismes producteurs de molécules tensioactives d'intérêt.

### 2.2. Test d'émulsification (E24) :

Le test E24 est un criblage indirect de la production de biosurfactants basé sur la stabilité d'une émulsion surnageant/hydrocarbure ; un E24 > 50 % constitue le seuil habituel de sélection des souches productrices. L'observation visuelle des tubes après 24 h a révélé des profils variables selon les souches : certains isolats ont produit une couche émulsifiée importante en partie supérieure du tube, tandis que d'autres n'ont généré qu'une fine interface entre la phase pétrolière et le surnageant du milieu MSM (Figure 20).

Les isolats halotolérants de cette étude affichent des valeurs comprises entre 46,87 et 67 %, avec la souche SA23en tête (67 %), proche du témoin positif (70 %), suivie d'S11 (60 %), S8 (56,66 %), S6 (55,88 %), S5 et SA22 (≈ 53 %). Plus de 80 % des souches dépassent le seuil de 50 %, suggérant une production notable de biosurfactants, vraisemblablement de type glycolipide ou lipopeptide. Ces résultats sont dus à l'environnement hyeprsalin des isolats: dans les sebkhas, les variations osmotiques et thermiques sévères favorisent la synthèse de biosurfactants comme mécanisme d'adaptation (Corral et al., 2019). Ces performances sont comparables à celles rapportées pour *Halomonas elongata* BK-AG18 (E24 = 53,6 % ; Alvionita et al., 2019), *Bacillus licheniformis* Ali5 (E24 = 66,4 % ; Ali et al., 2019) et *Halomonas ventosae* BS10HD (E24 = 56 % ; Georgieva et al., 2025), confirmant le potentiel de ces isolats pour la bioremédiation des hydrocarbures.

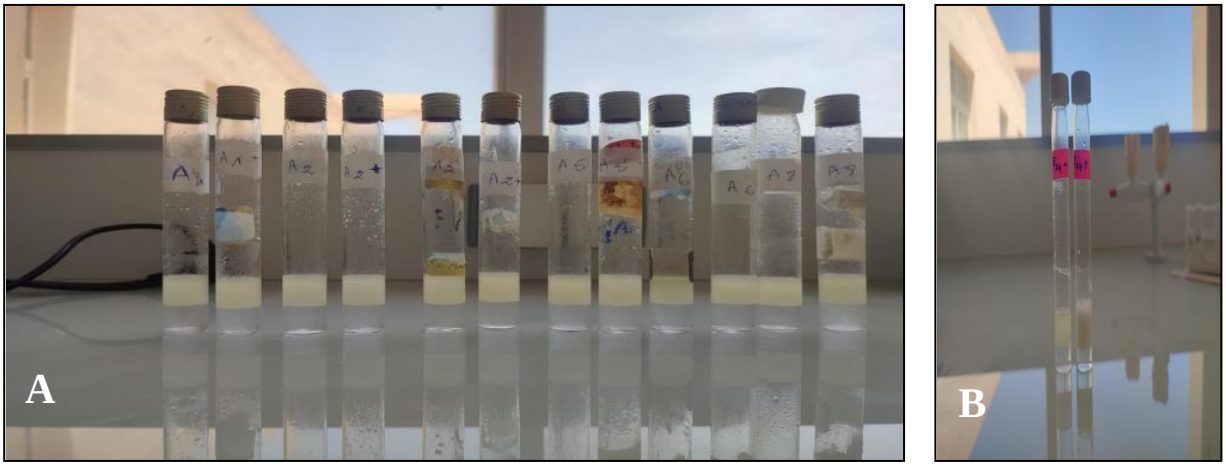



**Figure 20** : Répartition Les résultats de test d'emulsification (E24). **A** : pétrole brut avec le surnageant de souches halotolérantes **B** : témoin positif et négative **.**

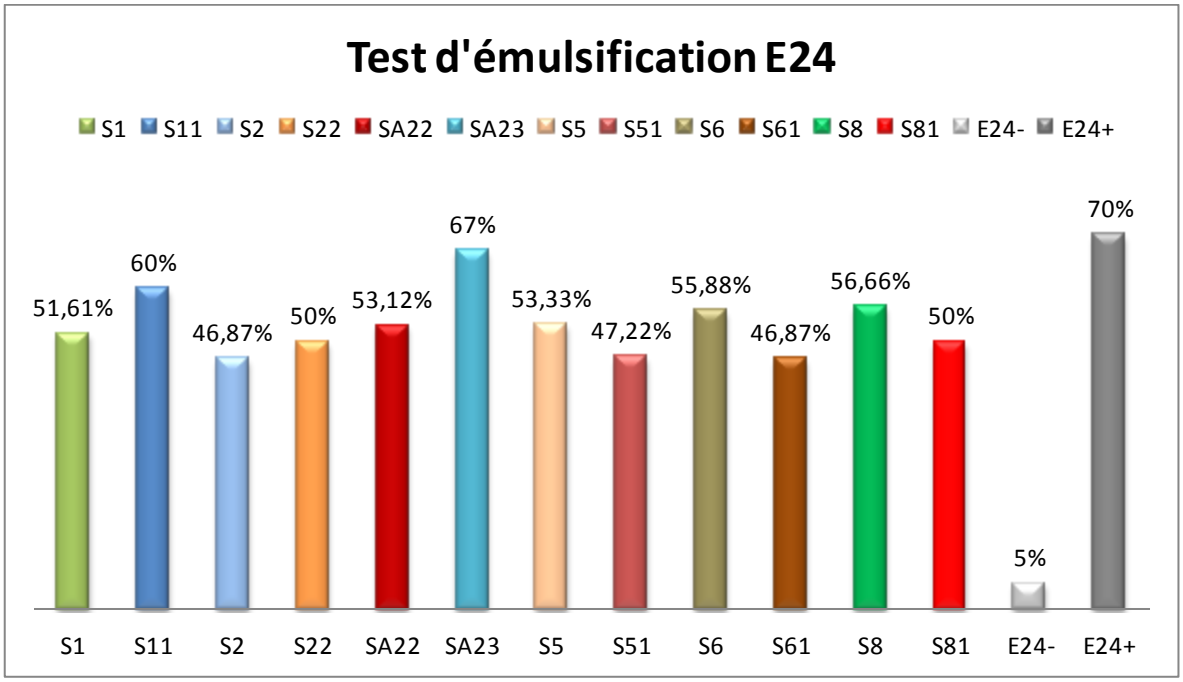



**Figure 21** : Répartition Les résultats de test d'emulsification E24

### 2.3. Test de la plaque d'agar CTAB :

Ce test constitue une méthode semi-quantitative de détection des biosurfactants anioniques, dans laquelle les colonies produisant des glycolipides extracellulaires forment un halo bleu foncé caractéristique (Saravanan et al., 2025).

Sur milieu CTAB-méthylène bleu, aucune des souches testées n'a développé de halo bleu foncé autour des puits, indiquant une réaction négative pour l'ensemble des isolats. L'absence de halo observée dans notre étude n'exclut pas pour autant une production de biosurfactants, dans la mesure où ce test ne détecte pas les lipopeptides, les bioémulsifiants polymériques ni les biosurfactants de charge neutre (figure 22).

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux portant sur des microorganismes d'environnements hypersalins. Alghamrawy et al. (2024) ont montré que des haloarchées de type *Natrialba* sp. isolées du lac El-Hamra (Égypte) produisaient des biosurfactants actifs (E24 = 66 %) non détectables par le CTAB, mais mis en évidence par l'indice d'émulsification et la mesure de la tension de surface. De même, des souches halotolérantes de *Bacillus amyloliquefaciens* isolées de salins ont synthétisé des lipopeptides non anioniques échappant à la détection par cette méthode (Drakontis & Amin, 2025). Par ailleurs, Purwasena et al. (2024) ont caractérisé un biosurfactant glycolipidique produit par *Pseudoxanthomonas taiwanensis*, dont l'activité a été mise en évidence par la réduction de la tension interfaciale et l'indice d'émulsification, soulignant l'intérêt de combiner plusieurs méthodes de criblage pour une caractérisation fiable des biosurfactants. Ces résultats confirment que le recours à des méthodes complémentaires reste indispensable pour une caractérisation fiable de l'activité biosurfactante.



**Figure 22** : Répartition Les résultats de test de la plaque d'agar CTAB

### 2.4. Le test de 'Drop collapse' (effondrement de la goutte) et des microplaques ( optical distortion grid essay)

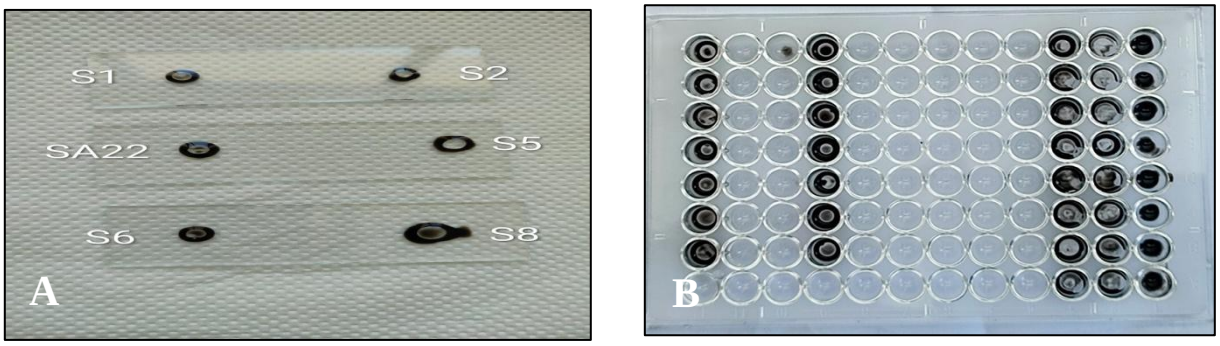



**Figure 23** : Les résultats obtenus par le test drop collapse A : effondrement de la goutte B: microplaques (optical distortion grid essay)

Les résultats obtenus par les méthodes de microplaque et de surface solide recouverte de pétrole brut ont montré que les souches halotolérantes isolées de la sebkha saline ( S1, S2, SA22, S5, S6, S8, S11,SA23, S21, S51, S61 et S81) ont présenté une réaction positive au test de Drop Collapse. L'étalement de la goutte observé sur la surface hydrophobe indique la présence de composés capables de réduire la tension superficielle du milieu. À l'inverse, le contrôle négatif (milieu MSM) n'a montré aucun étalement significatif, tandis que le contrôle positif (SDS) a présenté un étalement maximal, confirmant la validité du test **(figure 23).**

Le test de Drop Collapse et des microplaques sont largement utilisé comme méthodes rapides de criblage des microorganismes producteurs de biosurfactants et sont indicatifs de l'activité de mouillage de surface **(Sohail et Jamil, 2023 ; Rizvi et al., 2024)** Ces observations confirment que les surnageants présentent des caractéristiques typiques des biosurfactants, suggérant ainsi que les souches étudiées représentent de bonnes candidates pour la production de biosurfactants. En effet, cette propriété est particulièrement importante chez les bactéries halotolérantes vivant dans les environnements hypersalins, où les hydrocarbures sont peu biodisponibles en raison de leur hydrophobicité.

Des résultats comparables ont été rapportés par **Maldonado-Desena et al. (2022)** qui ont étudié des bactéries halotolérantes isolées de *cénotes karstiques* mexicains. Les souches appartenant aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Lysinibacillus* ont montré un étalement important de la goutte lors du test de Drop Collapse, accompagné d'indices élevés d'émulsification, indiquant une production efficace de biosurfactants.

### 2.5. Essai d'émulsification (EA)

Les résultats du test d'activité émulsifiante (EA) montrent que les souches halotolérantes isolées de la sebkha présentent une capacité variable de production de biosurfactants selon le substrat hydrophobe utilisé (pétrole et huile de tournesol). Les souches S5 (169,6 UE/mL), S8 (152,5 UE/mL), S2 (140,3 UE/mL) et S1 (123,5 UE/mL) ont présenté les meilleures activités émulsifiantes avec l'huile de tournesol. En revanche, avec le pétrole brut, les souches S6 (170,1 UE/mL), S8 (146,2 UE/mL) et S1 (142 UE/mL) ont montré les valeurs les plus élevées. La souche SA22 a présenté les plus faibles activités sur les deux substrats (37,1 UE/mL et 22,9 UE/mL), indiquant une faible production de composés tensioactifs. Le contrôle positif (220 UE/mL) confirme la validité du test, alors que le contrôle négatif (10,9 UE/mL) montre une absence quasi-totale d'activité émulsifiante (Figure 24, 25).

La forte activité émulsifiante observée chez certaines souches, particulièrement en présence de pétrole brut, est cohérente avec les données de la littérature portant sur des bactéries halotolérantes d'environnements similaires. Essghaier et al. (2024) ont caractérisé des lipopeptides produits par *Virgibacillus massiliensis* SM-23, isolée d'un milieu hypersalin, présentant une activité biosurfactante et antimicrobienne significative, avec une production maximale obtenue en milieu LB supplémenté en huile d'olive. La différence d'activité émulsifiante observée selon le substrat utilisé (pétrole brut vs huile de tournesol) traduit une spécificité moléculaire des biosurfactants produits vis-à-vis de la nature chimique des hydrocarbures, phénomène bien documenté chez les biosurfactants bactériens. Par ailleurs, les bactéries halophiles et halotolérantes issues d'environnements hypersalins sont reconnues pour leur capacité à produire des biomolécules extracellulaires d'intérêt biotechnologique, incluant des biosurfactants facilitant l'interaction avec les substrats hydrophobes et la dégradation des hydrocarbures (Stancu, 2025). L'ensemble de ces éléments confirme le potentiel des souches isolées de la sebkha pour des applications en bioremédiation et en récupération assistée du pétrole

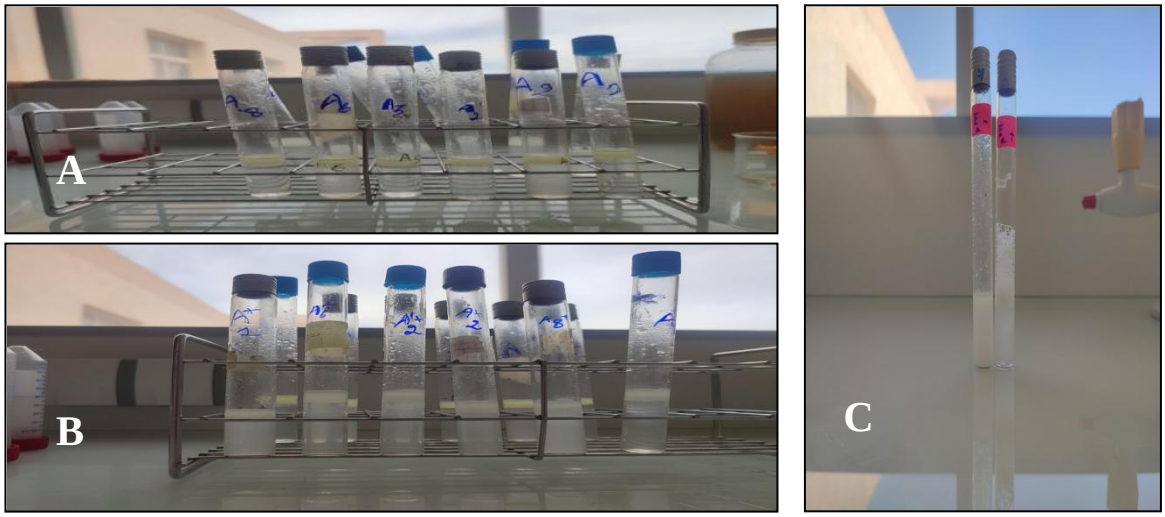
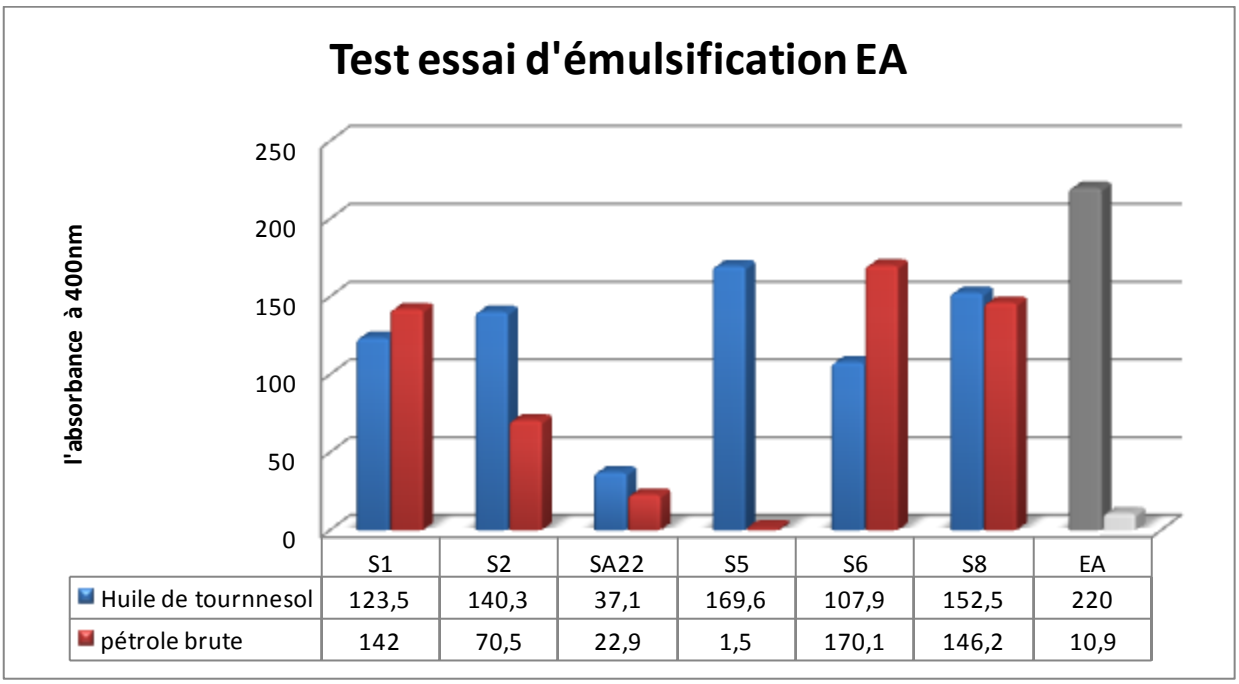



**Figure 25** : Les résultats de test Essai d'émulsification (EA). **A** : pétrole brut avec le surnageant de souches halotolérantes **B** : huile de tournesol avec le surnageant de souches halotolérantes **C** : témoin positif et négative.




| | S1 | S2 | SA22 | S5 | S6 | S8 | EA |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Huile de tournnesol | 123,5 | 140,3 | 37,1 | 169,6 | 107,9 | 152,5 | 220 |
| pétrole brute | 142 | 70,5 | 22,9 | 1,5 | 170,1 | 146,2 | 10,9 |

**Figure 26 :** Les résultats de test essai d'emulsification EA

### 2.6 Test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures (BATH)

Les résultats obtenus par le test BATH ont mis en évidence des pourcentages d'adhérence supérieurs à 50 % (Figure 26, 27), traduisant une forte hydrophobicité de surface des cellules bactériennes. Cela reflète une grande affinité de nos isolats au pétrole, suggérant ainsi une production potentielle de biosurfactants. Ce test est une méthode permettant d'évaluer l'hydrophobicité de surface des cellules bactériennes, laquelle constitue un indicateur indirect de la production potentielle de biosurfactants et de la capacité des cellules à interagir avec des phases hydrophobes (Rosenberg et al., 2023).

Les résultats du test BATH ont révélé une grande variabilité de l'hydrophobicité cellulaire chez les souches halotolérantes isolées de la sabkha, avec des pourcentages d'adhésion aux hydrocarbures allant de 5 % à 88 % ce qui est typique des communautés microbiennes des milieux hypersalins (Satpute et al., 2024). Le contrôle positif a présenté une adhésion de 93 %, tandis que le contrôle négatif a montré seulement 17 %, confirmant la fiabilité du test**.** Les souches S2 (88 %), S1 (83 %), S51 (80 %), S81 (80 %) et SA23 (74 %) ont présenté des valeurs proches du contrôle positif, indiquant une forte hydrophobicité de surface et une affinité élevée pour les hydrocarbures (figure 26, 27). Ce caractère est généralement corrèlé à une production active de biosurfactants, car ces composés modifient la nature de la paroi cellulaire en la rendant plus apte à interagir avec les phases organiques (Płaza et al., 2020 ; Sohail et Jamil, 2023). Des valeurs comparables ont été rapportées par Shokranian et al. (2025) chez *Acinetobacter junii* SHA et *Lysinibacillus boronitolerans* SWOC, isolées de sols contaminés au pétrole, avec des taux BATH de 75,94 % et 73,66 % respectivement, associés aux meilleures capacités de dégradation des hydrocarbures (84–85 % de pétrole dégradé en 7 jours). Dans certains cas, certaines souches bactériennes présentent des résultats positifs au test BATH, tandis que les tests de drop collapse et oil spreading donnent des résultats moins performants ou négatifs. Cette divergence peut s'expliquer par la capacité de ces cellules bactériennes fortement hydrophobes à agir elles-mêmes comme biosurfactants sans produire de biosurfactants extracellulaires (Sohail et Jamil, 2023).

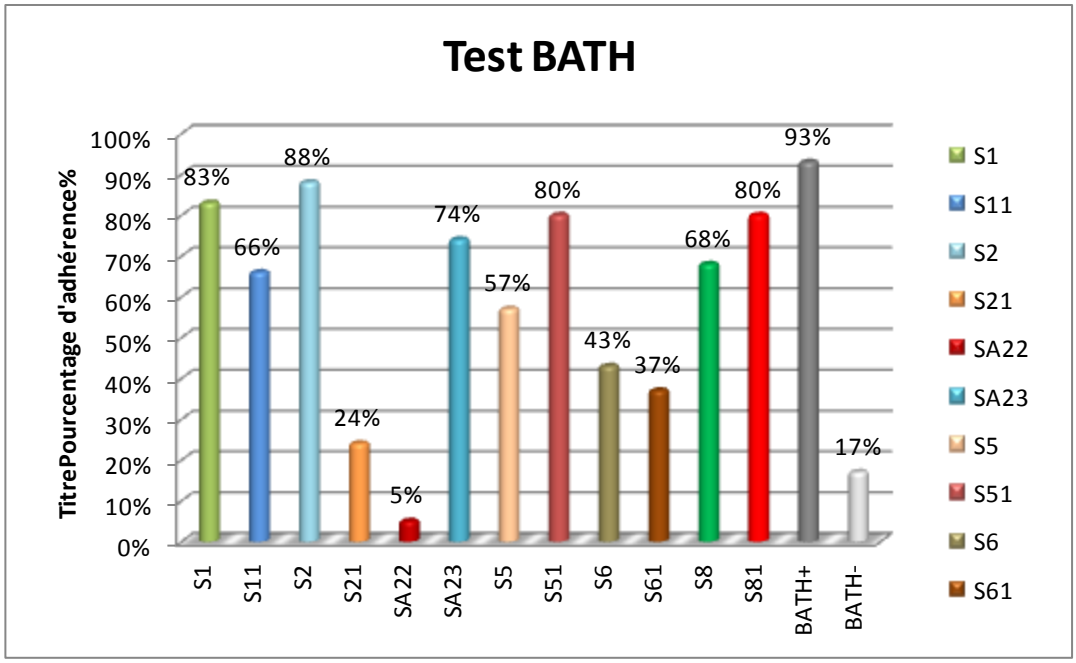



**Figure 27** : pourcentage d'adhérence obtenus par les isolats

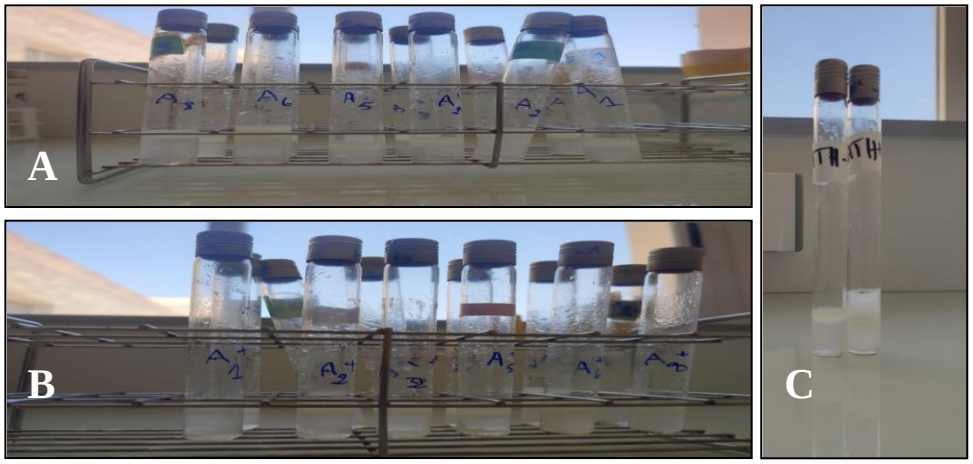



**Figure 28** : Les résultats de test d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures (BATH) **A** : pétrole raffiné avec le surnageant de souches halotolérantes (S1, S2 , SA22,S5,S6, S8) **B** : pétrole raffiné avec le surnageant de souches halotolérantes (S11, S21, SA23,S51,S61, S81) **c** : témoin positif et négative.

# Conclusion

**CONCLUSION :**

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence le potentiel de production de biosurfactants chez douze souches halotolérantes isolées à partir de l'écosystème hypersalin des salines de Oued Djamaa.

Les différents tests de criblage réalisés (Drop Collapse, CTAB-méthylène bleu, test d'émulsification EA et E24, Oil Spreading et BATH) ont révélé un potentiel biosurfactant notable chez la majorité des isolats testés, en particulier pour les souches SA23, S11, S8 et S6, qui ont présenté les meilleures performances dans l'ensemble des tests. Plus de 80 % des souches ont affiché un indice d'émulsification supérieur à 50 %, témoignant d'une capacité remarquable à former et stabiliser des émulsions en présence de pétrole brut. La négativité au test CTAB, associée à la positivité aux autres méthodes de criblage, suggère que les biosurfactants produits par ces souches sont de nature non anionique, vraisemblablement des lipopeptides ou des bioémulsifiants polymériques plutôt que des glycolipides classiques.

La singularité de cette étude réside dans l'origine des isolats, issus d'un environnement naturel hypersalin des salines de Oued Djemaa, dont les bactéries productrice de biosurfactants demeure peu explorées. La capacité de ces souches à maintenir une activité tensioactive significative en conditions extrêmes de salinité représente un atout considérable pour des applications futures en biotechnologie environnementale, notamment en bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures et en récupération assistée du pétrole.

Les résultats obtenus ouvrent ainsi la voie à plusieurs perspectives de recherche :

- Optimisation des conditions de production, afin d'améliorer les rendements de production, par l'optimisation des milieux de culture (carbone, azote, oligo-éléments), des paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité) et l'utilisation de substrats à faible coût (déchets agro-industriels).
- Extraction des biosurfactants produits et caractérisation de leur structure chimique complète par des techniques de chimie analytique tels que la HPLC, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GCMS), la spectroscopie infra- rouge à transmission de Fourier (FTIR), afin de déterminer leurs propriétés physico- chimiques et comprendre leurs mécanismes d'action.

- Tester les applications biotechnologiques de ces biosurfactants tels que la bioremédiation de sites pollués, la récupération du pétrole ou l'application comme agents stabilisateurs d'émulsions pour des produits alimentaires ou cosmétiques, vue leur propriétés tensioactives et émulsifiantes importantes.
- Tester d'autres activités biologiques de ces molécules activité antimicrobienne, antivirales, anticancéreuses.

# Références bibliographiques

# Références


- Alghamrawy, B. T., Hegazy, G. E., Sabry, S. A., et al. (2024). Production, characterization and biomedical potential of biosurfactants produced by haloalkaliphilic archaea from Wadi El-Natrun, Egypt. Microbial Cell Factories, 23, 84. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02351-y
- Ali, N., et al. (2019). Production and application of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Ali5 in enhanced oil recovery and motor oil removal from contaminated sand. Molecules, 24(24), 4448. https://doi.org/10.3390/molecules24244448
- Alvionita, D., et al. (2019). Bioconversion of glycerol to biosurfactant by halophilic bacteria *Halomonas elongata* BK-AG18. Indonesian Journal of Chemistry, 19(1). https://doi.org/10.22146/ijc.26737
- Amina, U. F. T., Mahzabin, M., & Elias, S. M. (2026). Exploring biosurfactant-producing bacteria from waste-contaminated sites near Dhaka City.
- Asmer, H. J., Lang, S., Wagner, F., & Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 65, 1460–1466. https://doi.org/10.1007/BF02898308
- Bak, F., Bonnichsen, L., Jørgensen, N. O. G., Nicolaisen, M. H., & Nybroe, O. (2014). The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 1475–1483. https://doi.org/10.1007/s00253-014-6054-3
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 495–508.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697
- Bartal, A., Huynh, T., Kecskeméti, A., et al. (2023). Identifications of surfactin-type biosurfactants produced by *Bacillus* species isolated from rhizosphere of vegetables. Molecules, 28(3), 1172. https://doi.org/10.3390/molecules28031172
- Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2017). Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. Journal of Hazardous Materials, 321, 218–227. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.035
- Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing

microorganisms. Journal of Microbiological Methods, 32, 273–280. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00031-1

- Bouassida, M., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2018). Improved biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SPB1 mutant obtained by random mutagenesis and its application in enhanced oil recovery in a sand system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 95–104.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004). Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. Current Opinion in Microbiology, 7(3), 262–266. https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006
- Cameron, D. R., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (1988). The mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1420–1425. https://doi.org/10.1128/AEM.54.6.1420-1425.1988
- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* : A gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*, 36(1), 4–31.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus species*. Applied and Environmental Microbiology, 53(2), 224–229.
- Corral, P., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2020). Halophiles and their biomolecules : Recent advances and future applications in biomedicine. Marine Drugs, 18(1), 33. https://doi.org/10.3390/md18010033
- D'aes, J., Hua, G. K. H., De Maeyer, K., Pannecoucque, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L. E. P., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V., & Höfte, M. (2011). Biological control of Rhizoctonia root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing Pseudomonas CMR12a. Phytopathology, 101(8), 996–1004. https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-10-0315
- D'Almeida, A. P., de Albuquerque, T. L., & Rocha, M. V. P. (2024). Recent advances in Emulsan production, purification, and application : Exploring bioemulsifiers unique potentials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278(Pt 1), 133672. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133672
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(1), 47–64.
- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2020). Biosurfactants : Formulations, properties, and applications. Current Opinion in Colloid & Interface Science. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013

- Drakontis, C. E., & Amin, S. (2022). Biosurfactants : Formulations, properties, and applications. Environmental Technology & Innovation, 25, 102132. https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102132
- Dubey, K. V., Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2005). Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. Biotechnology Progress, 21(3), 860–867. https://doi.org/10.1021/bp040012e
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants : Moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, 10(6), 208–217. https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90215-H
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants : Moving towards industrial application. Trends in Biotechnology, 10, 208–217. https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90215-H
- Fujii, T., Yuasa, R., & Kawase, T. (1999). Biodetergent IV : Monolayers of corynomycolic acids at the air-water interface. Colloid and Polymer Science, 277, 334–339. https://doi.org/10.1007/s003960050389
- Gaur, V. K., Sharma, P., Gupta, S., Varjani, S., Srivastava, J. K., Wong, J. W. C., & Ngo, H. H. (2022). Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation : Strategies and advancements.
- Georgieva, N., et al. (2025). Exploring biosurfactant production from halophilic bacteria isolated from Burgas salterns in Bulgaria. Marine Drugs, 24(1), 53. https://doi.org/10.3390/md24010053
- Gharaei-Fathabad, E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry : A mini-review. American Journal of Drug Discovery and Development, 1(1), 58–69. https://doi.org/10.3923/ajdd.2011.58.69
- Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., & Peypoux, F. (2001). Lichenysin : A more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(3), 199–210.
- Groboillot, A., Portet-Koltalo, F., Le Derf, F., Feuilloley, M. J. G., Orange, N., & Poc, C. D. (2011). Novel application of cyclolipopeptide amphisin : Feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments. International Journal of Molecular Sciences, 12(3), 1787–1806. https://doi.org/10.3390/ijms12031787
- Hentati, D., Chebbi, A., Loukil, S., Godon, J. J., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2016). Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 15088–15100.

- Hu, Y., & Ju, L. K. (2001). Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. Journal of Biotechnology, 87(3), 263–272. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00248-6
- Hultberg, M., Bergstrand, K. J., Khalil, S., & Alsanius, B. (2008). Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent pseudomonads in a soilless cultivation system. Antonie van Leeuwenhoek, 94(3), 329–334. https://doi.org/10.1007/s10482-008-9250-2
- Irorere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., & Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production : A critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 3941–3951.
- Isoda, H., Shinmoto, H., Kitamoto, D., Matsumura, M., & Nakahara, T. (1997). Differentiation of human promyelocytic leukemia cell line HL60 by microbial extracellular glycolipids. Lipids, 32(3), 263–271.
- Jiang, M., Wang, H., Liu, J., Hou, X., Zhang, Y., Liu, X., Wei, S., & Cui, Q. (2024). Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria for enhancing oil recovery. Processes, 12(11), 2575. https://doi.org/10.3390/pr12112575
- Kachholz, T., & Schlingmann, M. (1987). Possible food and agricultural applications of microbial surfactants : An assessment. In N. Kosaric (Ed.), *Biosurfactants and biotechnology* (pp. 183–210). Marcel Dekker.
- Karanth, N. G. K., Deo, P. G., & Veenanadig, N. K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science.
- Kebbouche-Gana, S., Gana, M. L., Khemili, S., Fazouane-Naimi, F., Bouanane, N. A., Penninckx, M., & Hacene, H. (2009). Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 727–738.
- Larpent, C., & Chasseray, X. (1992). Optically active surfactants—I—The first synthesis and properties of sodium bis[(S)-ethyl-2-hexyl] sulfosuccinates (“Aerosol OT”). Tetrahedron, 48(19), 3903–3914. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)88470-2
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883.
- Liu, J. F., Mbadinga, S. M., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. International Journal of Molecular Sciences, 16, 4814–4837. https://doi.org/10.3390/ijms16034814

- Liu, J., Liu, M., Wang, J., Yao, J. M., Pan, R. R., & Yu, Z. L. (2005). Enhancement of the Gibberella zeae growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. Appl. Microbiology and Biotechnology, 69, 223–228. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1981-7
- Liu, Y., Wang, H., Li, X., & Li, J. (2015). Heavy metal contamination of agricultural soils in Taiyuan. *China pedosphere*, 25, 901–909.
- Luna, J. M., Rufino, R., Sarubbo, L. A., & Campos-Takaki, G. B. (2013). Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids* and *Surfaces B* : *Biointerfaces*, 102, 202–209.
- Magdassi, S., Vinetsky, Y., & Relkin, P. (1996). Formation and structural heat-stability of β-lactoglobulin/surfactant complexes. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, 6, 353–362. https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01266-0
- Maier, R. M. (2003). Biosurfactants : Evolution and diversity in bacteria. *Advances* in Applied Microbiology, 52, 101–121.
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants : A sustainable replacement for chemical surfactants ? Biotechnology Letters, 34(9), 1597–1605. https://doi.org/10.1007/s10529-012-0956-x
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. Journal of Chromatography A, 864, 211–220. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00979-6
- Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2017). Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. Process Safety and Environmental Protection, 109, 72–81. https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.02.002
- Mohan, P. K., Nakhla, G., & Yanful, E. K. (2006). Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, 40, 533–540.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1488, 211–218. https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009

- Mulligan, C. N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14, 372–378.
- Mel Rosenberg, Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH, FEMS Microbiology Letters, Volume 262, Issue 2, September 2006, Pages 129–134, https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x
- Navon-Venezia, S., Zosim, Z., Gottlieb, A., Legmann, R., Carmeli, S., Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (1995). Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 3240–3244.
- Neagu, S., & Stancu, M. M. (2025). Novel halotolerant bacteria from saline environments : Isolation and biomolecule production. BioTech, 14(2), 49. https://doi.org/10.3390/biotech14020049
- Nitschke, M., & Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science & Technology. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants : Recent advances. International Journal of Molecular Sciences, 12, 633–654. https://doi.org/10.3390/ijms12010633
- Perneel, M., D'Hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., & Höfte, M. (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium spp*. Environmental Microbiology, 10, 778–788. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x
- Perneel, M., D'Hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., & Höfte, M. (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by Pythium spp. Environmental Microbiology, 10, 778–788. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x
- Piljac, T., & Piljac, G. (1999). *Use of rhamnolipids as cosmetics* (European Patent No. EP 1056462 B1). Paradigm Biomedical Inc., St. Petersburg, Florida.
- Płaza, G., & Achal, V. (2020). Biosurfactants : Eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. International Journal of Molecular Sciences, 21(6), 2152. https://doi.org/10.3390/ijms21062152
- Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (1997). Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. Biotechnology Techniques, 11, 671–674.
- Purwasena, I. A., Amaniyah, M., Astuti, D. I., et al. (2024). Production, characterization, and application of *Pseudoxanthomonas taiwanensis* biosurfactant : A green chemical for

microbial enhanced oil recovery (MEOR). Scientific Reports, 14, 10270. https://doi.org/10.1038/s41598-024-61096-1.

- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. D. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas spp.* : Diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19, 699–710. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0699
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Banat, I. M., Lord, R., & Street, G. (2007). Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant. In Environmental Bioremediation Technologies (pp. 391–408). https://doi.org/10.1007/978-3-540-34793-4_17
- Raouf, S., Ismail, Y., Gamaleldin, N., Aboelkhair, H., & Attia, A. (2024). Screening of sustainable biosurfactant produced by indigenous bacteria isolated from Egyptian oil fields for microbial enhanced oil recovery. Geoenergy Science and Engineering, 239, 212974. https://doi.org/10.1016/j.geoen.2024.212974
- Remichkova, M., Galabova, D., Roeva, I., Karpenko, E., Shulga, A., & Galabov, A. S. (2008). Anti-herpesvirus activities of Pseudomonas sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. Zeitschrift für Naturforschung C, 63, 75–81.
- Rieger, M. M., & Rhein, L. D. (1997). Surfactants in cosmetics. Surfactant Science Series.
- Rizvi, H., Singh, V., & Ashish. (2024). Screening and characterization of biosurfactant-producing strains in contaminated soil. Journal of Pure and Applied Microbiology, 18(2), 1074–1084. https://doi.org/10.22207/JPAM.18.2.24
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants : Potential applications in medicine. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. https://doi.org/10.1093/jac/dkl024
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4), 229–236.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. Environmental Microbiology, 3(4), 229–236. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x
- Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons : Twenty-five years of doing MATH. FEMS Microbiology Letters, 262(2), 129–134. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters, 9, 29–33. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x

- Saharan, B. S., Sahu, R. K., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants : Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 29, 1–39.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants : Multifunctional biomolecules of the 21st century. International Journal of Molecular Sciences, 17(3), 401. https://doi.org/10.3390/ijms17030401
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers : A review. Critical Reviews in Biotechnology, 30(2), 127–144. https://doi.org/10.3109/07388550903427280
- Shokranian, S., Yousefzadi, M., Biuki, N. A., et al. (2025). Isolation, characterization, and bioremediation potential of oil-degrading bacteria from contaminated soils in Shiraz and Bandar Abbas, Iran. Scientific Reports, 15, 42101. https://doi.org/10.1038/s41598-025-26242-3
- Sidkey, N. M., Mohamed, H. F., & Elkhouly, H. I. (2016). Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples.
- Sidkey, N. M., Mohamed, H. F., & Elkhouly, H. I. (2016). Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples grown on industrial olive oil processing waste.
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by Pseudomonas species during growth on mineral agar. Biotechnology Techniques, 5, 265–268. https://doi.org/10.1007/BF02438660
- Sohail, R., & Jamil, N. (2023). Microbial biosurfactant screening : Diversity in assessment methods. Advancements of Microbiology, 62, 145–155. https://doi.org/10.2478/am-2023-0013
- Stancu, M. M. (2025). Investigating the potential of native soil bacteria for diesel biodegradation. Microorganisms, 13(3), 564. https://doi.org/10.3390/microorganisms13030564
- Sudo, T., Zhao, X., Wakamatsu, Y., Shibahara, M., Nomura, N., Nakahara, T., Suzuki, A., Kobayashi, Y., Jin, C., Murata, T., & Yokoyama, K. K. (2000). Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. Cytotechnology, 33, 259–264. https://doi.org/10.1023/A:1008137817944
- Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Applied and Environmental Microbiology, 60, 258–263.

- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J. M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of Phytophthora infestans and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist*, 175(4), 731–742. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02138.x
- Urum, K., & Pekdemir, T. (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere, 57, 1139–1150. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.048
- Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. Frontiers in Microbiology, 6, 245. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245
- Vandana, P., & Singh, D. (2018). Review on biosurfactant production and its application. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 4228–4241.
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). Biosurfactants : Types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*, 10, 181–192.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Özel, M., & Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 63, 44–49.
- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In Biosurfactants (pp. 1–13). Springer, New York, NY.
- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. Advances in Experimental Medicine and Biology, 672, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- Wang, Q., Chen, S., Zhang, J., Sun, M., Liu, Z., & Yu, Z. (2008). Co-producing lipopeptides and poly-(γ-glutamic acid) by solid-state fermentation of Bacillus subtilis using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresource Technology*, 99, 3318–3323.

# Annexes

**Milieux de culture**

**Bouillon nutritif**

- ✓ Extrait de viande 1 g
  Extrait de levure 2g
  Tryptone 5 g
  Chlorure de sodium (NaCl) 5 g
  Eau distillée 1000 ml
  pH =07

**Gélose nutritive**

- ✓ Extrait de viande 1 g
- ✓ Extrait de levure 2g
- ✓ Tryptone 5 g
- ✓ Agar Agar 15 g
- ✓ Chlorure de sodium (NaCl) 5 g
- ✓ Eau distillée 1000 ml
- ✓ pH 07

**Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2)**

- ✓ Extrait de levure 04g
- ✓ Extrait de malt 10g
- ✓ Eau distillée 1000 ml
- ✓ Agar 20 g
- ✓ Glucose 04 g

**Milieu MSM (mineral salt medium)**

- ✓ Hydrogénophosphate de dipotassium (K2HPO4 ) 2,7g
- ✓ Dihydrogénophosphate de potassium (KH2PO4) 1,36g
- ✓ Sulfate d'ammonium ((NH4)2SO4) 1g
- ✓ Sulfate de magnésium heptahydraté ( MgSO4·7H2O ) 0,2g
- ✓ Chlorure de sodium (NaCl) 0,1g
- ✓ sulfate ferreux heptahydraté (FeSO4·7H2O) 0,01g
- ✓ Chlorure de calcium dihydraté (CaCl2·2H2O) 0,02g
- ✓ Eau distillée 1000 ml