REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et l'Environnement

Mémoire de fin d''études de Master

Filière: Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés des Matériaux

Thème:

Contribution à la stabilité de nanofluide par tensioactif biologique

Présenté par:

- **Mme. KHELIL Hiba**
- **Mme. KHALI Houria**

Proposé et dirigé par:

- **Dr. ALOUAOUI Redha**
- **Dr. FERHAT Samira**

Année universitaire: Juin 2022

Dédicace

Je dédie fruits de ce modeste travail à :

*Primo à mes parents : **ma Mère**, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie.*

Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour mes consoler quand il fallait.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

Puisse dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur afin que je puisse te combler à mon tour.

*Et **mon beau Père**, En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Que dieu ait pitié de vous.*

*MES TRES CHERS FRERES : **AYOUB** et sa moitié **DOUAA – DHEA EDDINE**, Je vous exprime à travers ce travaille mes sentiments de fraternité et d'amour.*

Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.

***MA SŒUR**, comme on ne peut trouver nulle part ailleurs, puisse Allah te protégé, garder et renforces notre fraternité. Je te souhaite tout le bonheur du monde avec tes enfants.*

- ***Je dédie spécialement ce travail A ma belle-famille**:*

*MON CHER **AMOUR MOHAMED** pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail.*

Et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitudes pour t'avoir compte énormément pour moi.

*Mes cinq chers enfants que dieu les préserve pour moi **RASSIL**, **BAILASSAN**, **DORRA** et **MED MOUMEN**, **SAAED AMINE**.*

*MA CHERE BINOME **KHALI HOURIA** qui était toujours à mes côtés et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager.*

*À ma belle-famille "**BETTAHAR**" Mon Beau père **seddik** et Ma Belle-mère **bachira**.*

À tous ceux qui, ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

*Mes amies : **Ihssen**, **Nessrine**, ainsi que mes collègues de travail: **Karima**, **Mourad**, et **Mosaab**.*



*… **Khelil hiba***

Dédicace

Remercier dieu pour sa bénédiction

Je dédie mon diplôme et ma réussite à mon premier soutien dans la vie, mon cher Père ***Mahmoud****, que dieu ait pitié de lui, il m'a appris à persévérer et à essayer sans abandonner jusqu'à ce que j'atteigne mon objectif.*

Je le dédie à ma chère Mère ***Aicha Kahla****, car ses prières ont été une lumière pour moi, elle ma toujours soutenu et encouragé tout au long de ma vie.*

A mes chères sœurs ***Sabrina****,* ***Manel****, mon cher frère* ***Djamel*** *et sa femme* ***Amel*** *et leurs chers* ***enfants****, je n'oublierai jamais votre présence à mes cotés et m'encouragent à la réalisation de ce modeste travail.*

Je le dédie à ma seconde moitié, mon cher mari ***Lyes*** *et ma chère fille* ***Lamia,*** *Vous êtes ma source de bonheur, de joie et de l'amour. Sans votre soutien et votre présence à mes cotés, je n'aurais pas réalisé mon rêve aujourd'hui.*

A ma belle-famille qui m'a soutenu, mon cher beau père ***Redha Boukhatem****, ma chère belle mère* ***Assia Otmani****, mes chères belles sœurs* ***Radia*** *et* ***Yousra****, mes chers beaux frères* ***Ahmed****,* ***Chemssedine****, sa femme* ***Nadia*** *et leurs* ***enfants****, qui se réjouissent de ma réussite et m'a toujours encouragent.*

Et à toute ma famille, ***Khali*** *et* ***Kahla****, mes oncles et mes tantes, mes cousins et mes cousines, sans oublier mon oncle* ***Abderrahmane Kahla*** *pour ses conseils utiles.*

A ma chère binôme ***Khelil Hiba****, qui était toujours à mes cotés et n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Jamais des simples mots ne me permettront de t'exprimer mes remerciements ma très chère amie.*

Et enfin à tous mes chères collègues avec qui j'ai vécu les plus beaux moments de la période d'études, ***Nesrin****,* ***Ihssane*** *et surtout mon amie d'enfance* ***Yasmine****.*

Merci à tous m'a soutien, je n'aurais pas atteint mon objectif et réalisé mon rêve.

Louange à Allah, Seigneur de l'univers



Khali Houria…

Remerciements

Au nom d'Allah, le tout miséricordieux, le très Miséricordieux

Tout d'abord nous voudrions remercier notre promoteur le professeur Dr. ***Alouaoui Redha*** *qui nous accordé le privilège d'encadré nos Travaux en apportant des suggestions et des critiques, nous Permettant de développer nos recherches.*

Nos vifs remerciements à notre Co-promotrice Professeur ***Ferhat Samira****, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour le temps Consacré, les précieux conseils, la patience manifestée à notre égard Durant la réalisation de ce mémoire et pour les nombreux Encouragements prodigués. Nous vous exprimons notre Reconnaissance.*

Nous remercions le directeur de ***Hall Technologie*** *et la société* ***SAÏDAL*** *de MEDEA pour leur soutien en fournissant les outils Nécessaires qui ont contribué au succès de notre recherche. Également un grand merci aux doctorants :* ***N. Mihoubi****,* ***A. Ibrir*** *et L'ingénieur de laboratoire* ***R. Belfarah*** *pour leur collaboration et leur Réactivité.*

Nous tenons à présenter nos remerciements munis d'expression de Reconnaissance et de considération à tous les professeurs et au cadre Administratif de la faculté de Technologie, en particulier le Département de Génie Des Procédés et de l'Environnement.

Enfin, on tient à témoigner toute nos gratitudes à notre ***Jury*** *pour L'honneur que vous nous faites en acceptant d'évaluer ce travail, Veuillez croire, à nos respectueux remerciements.*

الملخص :

يعد تثبيت الجسيمات النانوية ضروريًا لتحسين استقرار التشتت في تصنيع الهياكل النانوية. لهذا ، استخدم الباحثون العديد من المواد الخافضة للتوتر السطحي والمثبتات لتعديل سطح الجسيمات النانوية أثناء عملية التوليف.

كان الهدف الرئيسي من هذه الرسالة هو المساهمة في استقرار الجسيمات النانوية بواسطة الفاعل بالسطح البيولوجي (خافض للتوتر السطحي).

بدأت هذه الدراسة في البداية بتطوير عامل خافض للتوتر السطحي بواسطة بكتيريا سلالة بكتيرية ***marinobacter SDK644*** ، و مصدر للكربون والنيتروجين .حيث تم تمييز الجزيء الحيوي الذي تم الحصول عليه من خلال تقنيات القياس المستخدمة لتقدير الإنتاج (اختبار DDP ، TS)، تحليلات الخصائص الهيكلية (فحص البروتين ، FTIR، HPLC) والخصائص الفيزيائية والكيميائية (CMC ، مضاد للميكروبات) التي تؤكد إنتاج BS السطحي البيولوجي.

ثم تم تحقيق تخليق الجسيمات النانوية بطريقة الترسيب لتطوير الجسيمات النانوية من المغنتيت (Fe_3O_4)، والتي تمت دراستها كثيرًا بسبب عدم سميتها ، والخصائص المتعلقة بحجمها النانوي ، واستقرار تشتت تمت دراسة الموائع النانوية المحضرة في عاملي التثبيت المختلفين المستخدمين (القاعدة العضوية TMAH وBS) من خلال التقنيات المستخدمة أيضًا في التوصيف المورفولوجي للجزيئات العضوية ، وبشكل خاص الجسيمات النانوية المغنتيت ، مثل مجهر القوة الذرية (AFM)، المجهر البصري والخصائص المغناطيسية. أظهرت النتائج أنه مع وجود عامل TMAH أو الفاعل بالسطح الحيوي ، يتحسن استقرار السائل النانوي لأكسيد الحديد الأسود ، وهذا يؤكد إمكانية استقرار الجسيمات النانوية بواسطة الفاعل بالسطح البيولوجي.

الكلمات المفتاحية : الموائع النانوية ، الجسيمات النانوية المغنتيت ، طريقة الترسيب ، المثبت ، الخافض للتوتر الحيوي ، السلالة البكتيرية ، الفاعل بالسطح البيولوجي.

Abstract:

The stabilization of Nanoparticles is necessary to improve their dispersion stability in the fabrication of nanostructures. For this, the researchers used various surfactants and stabilizers for the surface modification of Nanoparticules during the synthesis process.

The main objective of this thesis work was to contribute to the stability of nanoparticles by biological surfactants (a biosurfactant).

This study was first started with the development of a biosurfactant by the bacterial strain ***marinobacter SDK644***, a source of carbon and nitrogen. The Biomolecules obtained was characterized by the measurement techniques used to estimate the production (DDP test, TS), structural characterization analyzes (protein assay, FTIR, HPLC) and physicochemical properties (CMC, antimicrobial) which confirm the production of a biological surfactant BS.

Then the realization of the synthesis of the nanoparticles by the method of precipitation to elaborate nanoparticles of magnetite (**Fe_3O_4**), which are much studied because of their non-toxicity, and the properties related to their nanometric size, The stability of the dispersion of the nanofluide prepared in the two different stabilizing agents used (an organic base TMAH and BS) was studied by techniques are also used for the morphological characterization of organic particles, and more particularly magnetite nanoparticles, such as atomic force microscopy (AFM) , the optical microscope and the magnetic properties. The results show that with the presence of the TMAH agent or the biosurfactant, the stability of the black iron oxide nanofluide is improved. This confirmed the possibility of the stability of the nanoparticles by a biological surfactant.

Keywords: nanofluide, magnetite nanoparticles, precipitation method, stabilizer, biosurfactant, bacterial strain, biological surfactant.

Résumé :

La stabilisation des Nanoparticules est nécessaire pour améliorer leur stabilité de dispersion dans la fabrication des nanostructures. Pour cela, les chercheurs ont utilisé divers tensioactifs et stabilisants pour la modification de surface de Nanoparticules au cours du processus de synthèse.

L'objectif principal de ces travaux de thèse était de contribué à la stabilité des nanoparticules par les tensioactifs biologique (un biosurfactant).
Cette étude a été d'abord commencée par l'élaboration d'un biosurfactant par la souche bactérienne ***marinobacter SDK644***, une source de carbone et d'azote.ou le biomolécule obtenue était caractérisé par les Techniques de mesure employées pour estimer la production(Le teste DDP, TS), les analyses de Caractérisation structurale (dosage de protéine, Le FTIR, Le HPLC) et les propriétés physicochimiques (La CMC, L'antimicrobienne) qui confirment la production d'un tensioactif biologique BS.
Ensuite la réalisation de la synthèse des nanoparticules par la méthode de précipitation pour élaborer des nanoparticules de magnétite (**Fe_3O_4**), qui sont beaucoup étudiées en raison de leur non-toxicité, et des propriétés liées à leur taille nanométrique, La stabilité de la dispersion des nanofluides préparés dans les deux différentes agents stabilisants utilisées(une base organique TMAH et le BS) était étudiée par les techniques sont également utilisées pour la caractérisation morphologique de particules organiques, et plus particulièrement des nanoparticules magnétite, telles la microscopie à force atomique (AFM), le microscope optique et les propriétés magnétique. Les résultats montrent qu'avec la présence de l'agent de TMAH ou le biosurfactant, la stabilité du nanofluide noir d'oxyde de fer est améliorée. Ceci a confirmé la possibilité de la stabilité des nanoparticules par un tensioactif biologique.

Mots-clés : nanofluide, nanoparticule de magnétite, méthode de précipitation, agent stabilisant, biosurfactant, souche bactérienne, tensioactif biologique.

TABLE DES MATIERES

Remerciement

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviation

Introduction générale ……..01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Généralité sur les NANOFLUIDES

Introduction ……..……04

I.1. Définitions ……..……...04

I.2. Types de nanoparticules ……..…..…05

I.3. Les méthodes de synthèse des nanoparticules ……...…06

I.3.1. Les méthodes de synthèse des nanoparticules sont divisées en deux grandes approches …….....06

I.3.2. Méthodes chimiques de synthèse de nanoparticules en solution ……..…….....09

I.3.2.1. Transfert de phase liquide-liquide …….....09

I.3.2.2. Voie micellaire inverse …….…….....10

I.3.2.3. Décomposition organométallique ……...……....10

I.3.2.4.Thermolyse ……...……..11

I.3.2.5. Réduction de sels métalliques et métallo-organiques ……12

I.4. La stabilisation des nanoparticules ……...…….12

I.5. Caractérisation des nanoparticules ……14

I.5.1. Microscopie Electronique à Transmission MET ou Electronique à balayage ME25 …….……..14

I.5.2. Absorbance UV-Visible spectrophotométrie ……15

I.5.3. Le microscope à force atomique (AFM) ……16

I.6. Applications des nanoparticules ……17

I.7. Applications des nanotechnologies par secteurs d'activité ……22

Conclusion ……24

CHAPITRE II : Généralité sur les BIOSURFACTANTS

Introduction ……25

II.1. SURFACTANTS (TENSIOACTIFS) ……25

II.1.1. Définition ……25

II.1.2 .Classification des surfactants……26

II.1.3. Propriétés des surfactants ……27

II.2. Biosurfactants ……29

II.2.1. Définition d'un biosurfactants ……29

II.2.2. Classification de biosurfactants ……30

II.2.3. Microorganismes producteurs le biosurfactants ……32

II.2.4. Production d'un biosurfactant ……34

II.2.4.1. Facteurs influant sur la production de biosurfactants ……34

II.2.5. Caractérisation structurale de biosurfactant ……36

II.2.5.1. Dosage de protéine ……36

II.2.5.2. Analyse par FTIR ……36

II.2.5.3. Activité antimicrobienne ……37

II.2.5.4. Fraction bioactive purifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du biosurfactant ……37

II.2.6. Les avantage des biosurfactants ……38

II.2.7. Extraction de biosurfactants ……39

II.2.8. Application des biosurfactants ……40

II.2.9. Toxicité d'un biosurfactant ……41

Conclusion ……42

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : Matériels Et Méthodes

III.1. Matériels et méthodes pour la production de biosurfactant ……..…….43

Introduction …….……..…43

III.1.1. Matériels et méthodes ……..….43

III.1.1.1. Matériels ……...43

III.1.2. Repiquage et conservation de la souche …….45

III.1.2.1. Repiquage de la souche ……...……45

III.1.2.1.1. Repiquage dans un milieu liquide ……...……46

III.1.2.1.2. Repiquage sur milieu solide ……..….46

III.1.2.2. Conservation de la souche …….……...….47

III.1.2.3. Milieu de culture …….……47

III.1.2.3.1. Milieu LB (luria Bertani) ……...47

III.1.2.3.2. La préparation du milieu minéral MM …….....48

III.1.2.4. Milieu de production et conditions de culture ……...……..50

III.1.2.4.1. Préparation de l'inoculum ……..……...50

III.1.2.4.2. Préparation de milieu de production ……..……...51

III.1.2.5. Extraction de biosurfactant ……..52

III.1.2.5.1. Filtration et centrifugation ……52

III.1.2.5.2. Le premier protocole …….……...52

III.1.2.5.3. le deuxième protocole ……..……53

III.1.2.5.4. Séchage et récupération du biosurfactant ……..……...54

III.1.2.6. Techniques de mesures employées pour estimer la production de biosurfactant…….....55

III.1.2.6.1. Test de déplacement de pétrole (DDP) …….....55

III.1.2.6.2. Tension de surface (TS) ……..…….....56

III.1.2.6.3. Indice d'émulsion (E24)…….…….…56

III.1.2.7. Caractérisation structurale de biosurfactant :……...…….....57

III.1.2.7.1. Dosage de protéine ……..…..57

III.1.2.7.2. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (FTIR).....58

III.1.2.7.3. Activité antimicrobienne …….....59

III.1.2.7.4. Fraction bioactive purifiée par chromatographie liquide à haute

Performance (HPLC) du biosurfactant …….……...60

III.1.2.7.5. Détermination de concentration micellaire critique …….…….……....61

III.2. Matériels Et Méthodes Pour La Synthèse Et La Caractérisation Des Nanoparticules.....62

Introduction …….....62

III.2.1.Matériels ……....62

III.2.2.Protocole et montage expérimentaux ……...…….…63

III.2.2.1.Définition de la réaction de Co-précipitation …….…….…...63

III.2.2.2. La stabilité des nanoparticules de magnétite …….…….……..….64

III.2.2.3. Réactifs utilisés …….…….…..64

III.2.2.4. Montage expérimental et protocole opératoire ……...….65

III.2.3. les caractérisations des nanoparticules ……..……..….69

III.2.3.1. Propriétés magnétiques ……..…….……...…69

III.2.3.2. la microscopie à force atomique …….…..69

III.2.3.3. Le microscope optique …….……...….70

CHAPITRE IV: Résultats ET Discussion

IV.1. La production de biosurfactant …….…….72

IV.1.1. Le test du déplacement de pétrole (DDP) …….…….…..72

IV.1.2. Extraction et purification de biosurfactant …….…….73

IV.1.3. Activité biologique ……74

IV.1.3.1. Caractérisations antimicrobiennes de biosurfactant …….……74

IV.1.3.2. la concentration micellaire critique (CMC) …….……..……..75

IV.1.4. Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant …….……..…77

IV.1.4.1. Taux de protéine (méthode de Biuret) ……..…….77

IV.1.4.2. Caractérisation structurale par FTIR (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) …….…….78

IV.1.4.3. Caractérisation structurale par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ……80

IV.2.1. La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer ……..…….82

IV.2.2. Les caractérisations des nanoparticules ……..……..85

IV.2.2.1. Propriétés magnétiques ……..……...…85

IV.2.2.2. la microscopie à force atomique …….…….86

IV.2.2.3. Le microscope optique …….…….87

Conclusion générale …….……....89

Références bibliographiques ……...91

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : Nanoparticules sphériques [4] ; Nanotubes de carbone [5] …….06

Figure I.2 : Représentation schématique des deux grandes approches de synthèse de nanomatériaux ……..07

Figure I.3 : Les types de stabilisation prédominant des nanoparticules, les propriétés les plus importantes et les forms pertinentes, les facteurs d'influence et les applications. ……...14

Figure I.4 : Schéma de principe (a) MEB ; (b) MET ……...……..15

Figure I.5 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique ……..……....17

Figure I.6 : Répartition en pourcentage de l'impact économique global anticipé des nanotechnologies en 2010 ……18

Figure I.7 : Domaine d'application et produits nanométriques de la vie quotidienne. ……..21

Figure II.1: Structure schématique d'un surfactant. ……26

Figure II.2: Structure d'un tensioactif ……..26

Figure II.3: Classification des surfactants selon la nature des groupements …….....27

Figure II.4 : Structure chimique de quelques biosurfactants communs …….....31

Figure II.5: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un Spectromètre FTIR 37

Figure II.6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un HPLC……38

Figure III.1 : La Souche bactérienne ***MarinobacterSDK644*** après Repiquage ..……...45

Figure III.2: Repiquage dans un milieu liquide …….……46

Figure III.3: Repiquage sur milieu solide ……..…….46

Figure III.4: Préparation de milieu LB ……..…….48

Figure III.5: Préparation de milieu MM ……..…...49

Figure III.6: Milieu LB après 24heures d'incubation ……50

Figure III.7: La production de biosurfactant après 3 jours d'incubation ……...51

Figure III.8: (A) Filtration pour éliminer la biomasse (B) Centrifugation ……..…52

Figure III.9: Extraction par acidification ……...…53

Figure III.10: Extraction par acétone ……...……..….54

Figure III.11: La poudre rècupèrer après le sèchage…..……...……..…54

Figure III.12: Technique de déplacement du pétrole (A) Couche huileuse d'huile ou de pétrole sur une surface d'eau distillée (B) le surnageant ….……...55

Figure III.13: Test d'muséification E_{24} ……..…...56

Figure III.14: (A) NACL (B) réactif de biuret(C) biosurfactant…….…....57

Figure III.15: la dilution d'une protéine de référence (gélatine) …….....58

Figure III.16: repiquage par la méthode des stries ……..…...60

Figure III.17: une série de dilution de surnageant ……...…...61

Figure III.18: Préparation des solutions de $FeSO_4$, de $FeCl_3$ et de BS …….……65

Figure III.19 : Préparation des solutions de HCl et NH_4OH …….…….....66

Figure III.20 : Solution marron de Fe^{2+} et Fe^{3+} …….…….....66

Figure III.21 : Production des nanoparticules d'oxyde de fer ……..……..67

Figure III.22 : Solution de Fe_3O_4 nanoparticules avant et après la précipitation …….……..68

Figure III.23 : La poudre de Fe_3O_4 nanoparticules par TMAH(1) ; La poudre de Fe_3O_4 nanoparticules par BS ……..68

Figure III.24 : L'appareil de microscopie à force atomique……...70

Figure III.25 : L'appareil de microscope optique……...71

Figure IV.1: Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche *SDK644*……76

Figure IV.2 : Graphe explicative de dosage de protéine avec projection …….…….78

Figure IV.3 : Spectres d'absorption FTIR de l'extrait organique de substances actives de surface de la souche *SDK644* ……...79
Figure IV.4 : HPLC de biosurfactant ……..……81

Figure IV.5 : Solution Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ; Solution de Fe_3O_4 NPs par BS (2)……..83

Figure IV.6 : Le précipite de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ; Le précipite de Fe_3O_4 NPs par BS (2) ……..……...84

Figure IV.7 : La poudre de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ; La poudre de Fe_3O_4 NPs par BS (2) ……..…….84

Figure IV.8 : Fe_3O_4 NPs placées à coté d'un aimant (a) ; Fe_3O_4 NPs placées à coté d'un barreau magnétique (b) …….....85

Figure IV.9 : La poudre de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ; La poudre de Fe_3O_4 NPs par BS (2) ……..…….86

Figure IV.10 Topographie AFM 3D de Fe_3O_4 NPs par TMAH …….……..87

Figure IV.11 Observation au microscope optique (10 µm) de l'échantillon de Fe_3O_4 NPs par le BS ……...….....87

Figure IV.12 Observation au microscope optique (10 µm) de l'échantillon de Fe_3O_4 NPs par le TMAH ……...…...88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Conductivité thermique de divers fluides de base et matériaux à 20°C ……05

Tableau I.2 : Quelques exemples d'applications de nanoparticules ……...……19

Tableau I.3 : Exemples de propriétés recherchées par l'utilisation de nanoparticules dans différents secteurs d'activité économique ……....22

Tableau II.1: Les propriétés de surfactants ……...…….28

Tableau II.2 : Principales classes de biosurfactants et micro-organismes producteurs respectifs ……..33

Tableau II.3 : Différents domaines d'application des biosurfactants ……...….41

Tableau III.1 : Photo/ appareil /type de matériel de laboratoire utilisé au cours de notre étude ……..43

Tableau III.2 : Les composants de milieu LB ……...47

Tableau III.3: Les composants de milieu MM …….....48

Tableau III.4: Les composants des oligo-éléments ……..….49

Tableau III.5 : Le matériel utilisé dans la synthèse des nanoparticules de magnetite ……...63

Tableau III.6 : Les matières premières et les concentrations initiales utilisées …….64

Tableau IV.1 : La production de biosurfactant par la souche *marinobacter SDK644* ……...72

Tableau IV.2 : Suivi de production en fonction du temps ……..73

Tableau IV.3 : Activité antimicrobienne de biosurfactant contre dix souches ….....75

Tableau IV.4 : DO en protéine (gélatine) correspondante et de biosurfactant et de surnageant ……...…77

Tableaux IV.5 : Les résultats obtenus dans l'analyse d'HPLC ……..…82

Abréviations

NPs: Nanoparticules

MI: Les micelles inverses

T: La température

° C: Degré Celsius

M: Molarité mol/l

PH: Potentiel hydrogène

Nm: Nanomètre

MET: Microscopie Electronique à Transmission

MEB: Microscopie Electronique à Balayage

BS: Le biosurfactant

Le milieu LB: Milieu Lauria Bertani

Le milieu MM: Milieu Mueller Hinton

DDP: Test de déplacement de pétrole

E24: Indice d'émulsion

TS: La tension superficielle ($mN.m^{-1}$)

CMC: La concentration micellaire critique

FTIR: La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

HPLC: La purification par chromatographie liquide à haute performance

ACN: L'acétonitrile

AFM: Le microscope à force atomique.

Introduction générale

Au cours des dix dernières années, les nanomatériaux ont suscité un grand intérêt. On entend par « nanomatériaux » tous les matériaux qui ont des structures inférieures à 100 nm. De nombreuses recherches se sont focalisées sur le contrôle de la composition, de la granulométrie, de la morphologie, des propriétés et des fonctions des matériaux nanométriques, qui trouvent des applications dans un large domaine. L'objectif de la recherche présentée dans cette thèse est de développer un procédé de précipitation pour élaborer des nanoparticules de magnétite (**Fe_3O_4**), qui sont beaucoup étudiées en raison de leur non-toxicité, et des propriétés liées à leur taille nanométrique. Comparées aux nanoparticules non magnétiques, ces propriétés magnétiques ouvrent de nouvelles applications dans les domaines des fluides magnétiques, des catalyseurs, du stockage de données, de la biomédecine et des nano-adsorbants pour le génie de l'environnement par exemple.

Parmi toutes les méthodes de synthèse des nanoparticules de magnétite (La décomposition thermique, la microémulsification, la synthèse sono-chimique, thermolyse, voie micellaire inverse, la réaction redox, la méthode sol-gel ou la précipitation), la précipitation attire beaucoup d'attentions en raison d'un bon contrôle de la qualité du produit (la morphologie, la taille des particules, la distribution de taille des particules) et aussi en raison d'un coût de production économique.

Même si de nombreuses recherches sont déjà effectuées ou en cours de réalisation sur la fabrication des nanoparticules de magnétite avec beaucoup de résultats exaltants, il manque toujours une pierre angulaire sur la voie de développement, d'un résultat de recherche à l'utilisation généralisée dans la vie – comme d'une part le « scale-up » de la réaction de précipitation et d'autre part le maintien de la qualité du produit. **[7]**

Les méthodes de préparation de nanoparticules de magnétite sont nombreuses. Toutefois, certaines applications demandent une stabilité de ces nanoparticules vis-à-vis de l'agglomération, ou encore des fonctions particulières qui nécessiteront éventuellement un enrobage de celles-ci.

Par conséquent, la stabilisation des NP de magnétite est nécessaire pour améliorer leur stabilité de dispersion dans les milieux réactionnels lors de l'enrobage procédé préalable à la fabrication des nanostructures cœur/coquille. Pour cela, les chercheurs ont utilisé divers

tensioactifs et stabilisants pour la modification de surface de NP magnétiques au cours du processus de synthèse. **[8, 9]**

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

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

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

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

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

Ils sont utilisés, dans l'industrie pétrolière, pour l'extraction du pétrole adsorbé sur les roches Ces agents ont le pouvoir de dispersion des huiles (hydrocarbures) dans le cas de pollution dans la mer qui nécessite une élimination et une solubilisation de la nappe d'huile le plus efficacement et rapidement possible et permettant ainsi une biodégradation plus rapide et plus efficace des contaminants .Ils sont par ailleurs , utilisés dans la biorémédiation des sols contaminés par les hydrocarbures. **[10]**

Le but de cette thèse de master c'est de synthétiser un nanofluides (les nanoparticules d'oxyde de fer) et le stabiliser biologiquement par un biosurfactant.

Ce manuscrit est composé de deux parties:

La première partie consiste en une recherche bibliographique sur les nanofluides et le biosurfactant où sont donnés les définitions, leurs mécanismes de production, leurs propriétés, leurs caractérisations et leurs applications dans les différentes industries ainsi que leurs applications environnementales.

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

- la production du biosurfactant par la souche bactérienne (***marinobacter SDK644***), en plus d'une source de carbone et d'azote.
- étudier les déférentes caractérisations biologique, biochimique et structurale de biosurfactant (le teste de déplacement de pétrole (**DDP**), l'indice d'émulsification (**E24**), la tension superficielle (**TS**), la concentration micellaire critique (**CMC**), l'activité antimicrobienne, le taux de protéine, le Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (**FTIR**), la purification par chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**)).
- la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer (**Fe_3O_4**) par la méthode de Co-précipitation, on utilisant deux agents stabilisants différent (hydroxyde de tétraméthylammonium **(TMAH)** et le biosurfactant produire (**BS**))
- étudier les caractéristiques pour les deux nanoparticules de fer obtenues (les propriétés magnétique, la microscopie à force atomique (**AFM**) et le microscope optique) pour comparer les influences des différents agents stabilisants utilisés.

CHAPITRE I

Généralité sur les NANOFLUIDES

Introduction

La technologie des nanosciences naît à la fin du 20e siècle. Son sens de base est dans la gamme de taille nanométrique lié à la compréhension et à la transformation de la nature, par des opérations et arrangements directs sur des atomes et des molécules pour créer de nouvelles substances.

Au cours des dix dernières années, il y a eu beaucoup d'intérêt pour les nanomatériaux, qui incluent des structures avec une dimension généralement entre 1 nm et 100nm. La capacité de contrôler la composition, la structure, les propriétés et la fonction des matériaux à l'échelle nanométrique peuvent donner une possibilité de produire des nanomatériaux qui peuvent être appliqués dans de nombreux domaines, par exemple, la chimie, la physique, l'électronique, la mécanique, et la biotechnologie. **[1]**

Avec le progrès en nanotechnologie, des particules de taille nanométriques peuvent être obtenues.une fois ces nanoparticules fabriquées, IL fallait réaliser convenablement les dispersions dans le liquide de base en vue d'améliorer ses propriétés thermophysique.une suspension de nanoparticules dans un fluide de base est appelée ***NANOFLUIDE***. **[2]**

I.1. Définitions:

Les Nanofluides sont des solutions colloïdales constituées de particules de taille nanométrique en suspension dans un liquide porteur. Ce type de solution suscite un grand intérêt depuis la découverte de leurs propriétés thermiques particulières. En effet, les fluides de base souvent utilisés dans les applications de refroidissement ou de chauffage ont des conductivités thermiques très faibles (Tableau I.1) qui limitent leur capacité de transfert de chaleur. L'idée est alors d'insérer au sein des liquides de base des nanoparticules de conductivité très élevée, afin d'augmenter la conductivité thermique effective du mélange et ainsi améliorer ces performances thermiques.

Les liquides de base généralement utilisés dans la préparation des nanofluides sont ceux d'usage commun dans les applications de transfert de chaleur tels que l'eau, l'éthylène glycol, l'huile de moteur etc.…; Les nanoparticules peuvent être à base de métaux, d'oxydes, de carbures, de nitrures ou de carbone. **[3]**

Tableau I.1. Conductivité thermique de divers fluides de base et matériaux à 20°C [3]

Éléments :	Conductivité thermique (W/m.K)
Eau	0,599
50% eau + 50% éthylène glycol	0,41
Ethylène glycol	0,25
huile de moteur	0,14
Nanotube de carbone	3000-6000
Diamant	1000-2600
Cuivre (métal pur)	401
Nickel (métal pur)	237
Silicone (non métallique)	148
Alumine (Al2O3)	40

I.2. Types de nanoparticules :

La production de nouveaux nanomatériaux (nanoparticules) constitue un champ de recherche en pleine expansion, aussi seules les nanoparticules les plus couramment utilisées dans les applications liées aux transferts thermiques sont ici brièvement mentionnées.

D'une manière générale, les nanoparticules peuvent être classées selon leur forme en deux grandes catégories (figure I.2): **[4, 5]**

- Les nanoparticules sphériques pour lesquelles plusieurs types de matériaux peuvent être utilisés pour leur fabrication. Ces nanoparticules sphériques peuvent ainsi être à base de métaux (cuivre Cu, fer Fe, or Au, argent Ag…) ou d'oxydes de cuivre (oxyde d'aluminium Al2O3, oxyde de cuivre CuO, oxyde de titane TiO2…).
- Les nanotubes (les nanotubes de carbone NTC, les nanotubes de titane TiO2, Nanotube de silicium…) **[3]**

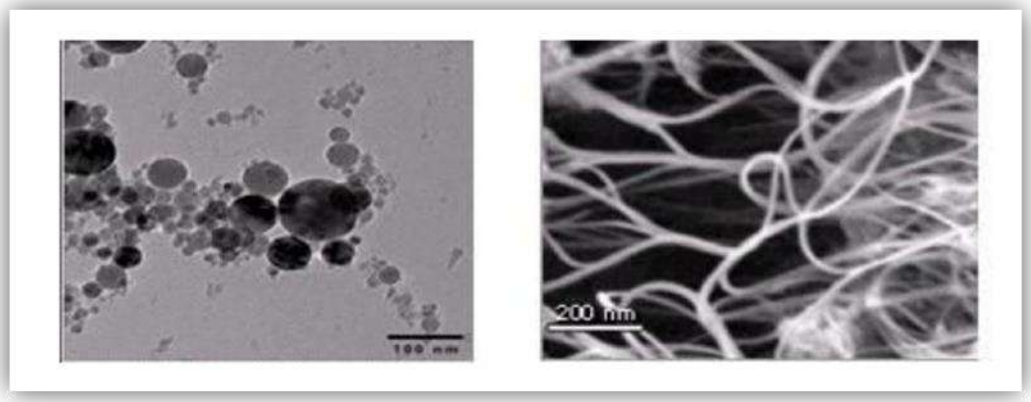


Figure I.1 Nanoparticules sphériques [4] ; Nanotubes de carbone [5]

I.3. Les méthodes de synthèse des nanoparticules

I.3.1. Les méthodes de synthèse des nanoparticules sont divisées en deux grandes approches (Figure. *I.2*) [6]

1- L'approche descendante, ou top-down :

Regroupant essentiellement des méthodes physiques, consiste en la diminution graduelle de la taille des systèmes actuels jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques et ce en optimisant les procédés technologiques. Le broyage à haute énergie est l'une des multiples techniques permettant d'obtenir des structures nanocristallines. Dans une enceinte étanche, sous l'effet d'une succession de chocs mécaniques, les grains de poudre sont alternativement déformés plastiquement, fracturés et recollés les uns aux autres, conduisant à un mélange des différents constituants. Le rapport des fréquences de fracture et de collage fixe la taille finale des agrégats de poudre.

2- L'approche ascendante, ou bottom-up :

S'est quant à elle imposée pour organiser la matière en utilisant des atomes, des molécules ou des agrégats comme entités de départ. Ces méthodes essentiellement chimiques de synthèse de nanomatériaux font l'objet de nombreuses publications ne permettant pas une étude exhaustive. Elles concernent aussi bien les métaux (Au, Ag, Cu, Pt, Co...) que les alliages et les semi-conducteurs. Nous nous cantonnerons dans la suite de ce chapitre à une présentation succincte des principales méthodes de

synthèse de nanoparticules métalliques ou bimétalliques en solution et notamment l'argent.

Voici la figure montré ci-dessous qui représente les deux approches:

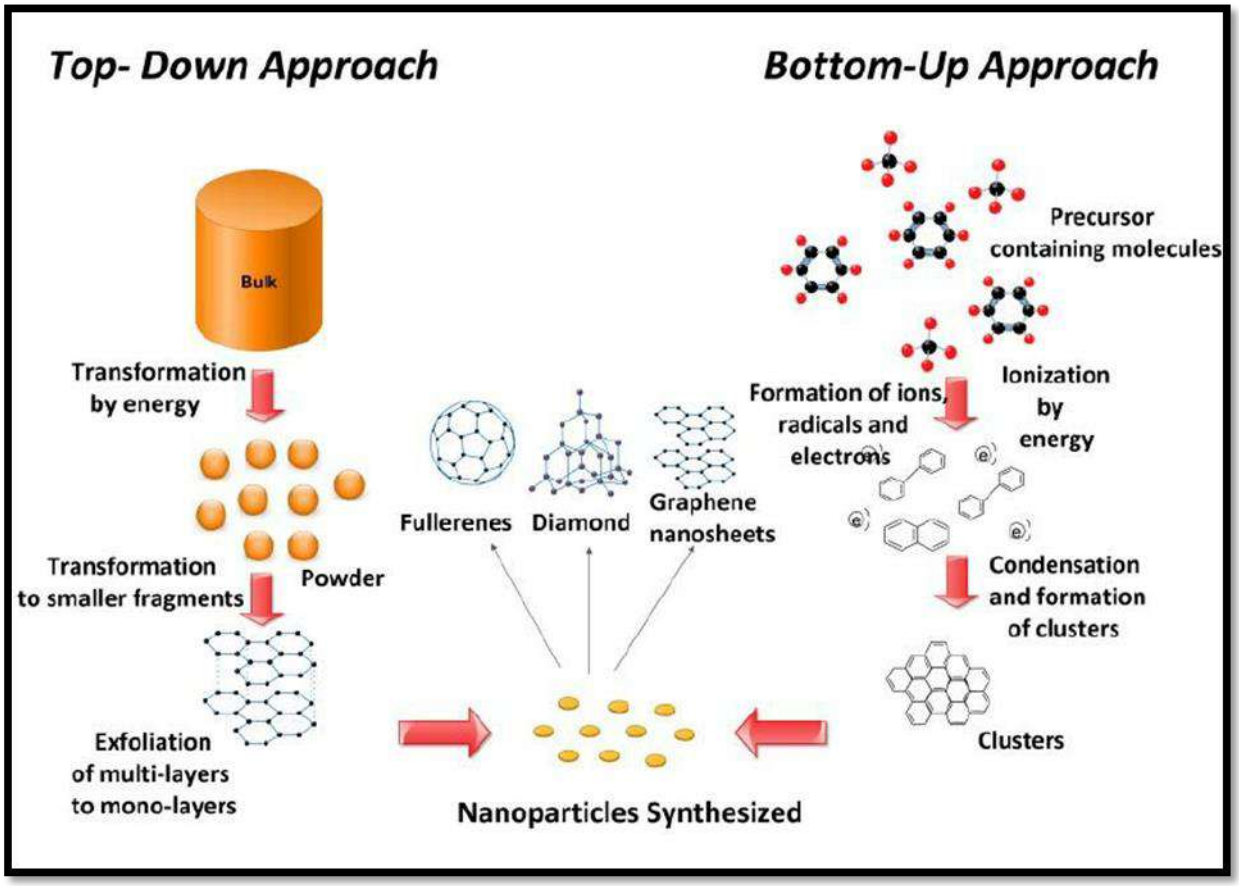


Figure I.2 : Représentation schématique des deux grandes approches de synthèse de nanomatériaux [6].

a- Principaux procédés chimiques:

- Les réactions en phase vapeur (carbures, nitrures, oxydes, alliages métalliques, etc.)
- Les réactions et les précipitations en milieu liquide (la plupart des métaux et oxydes).
- les réactions en milieu solide (la plupart des métaux et oxydes).
- Les techniques sol-gel (la plupart des oxydes).
- Les fluides supercritiques avec réaction chimique (la plupart des métaux, oxydes et quelques nitrures).
- Les réactions par coprécipitation chimique ou hydrolyse (métaux et oxydes métalliques).

- La polymérisation en chaîne par étape en phase liquide (polymères organiques tels les dendromètres et les dendrons).
- La polymérisation en phase gazeuse, greffage, électro filage (polymères organiques tels les dendromètres et les dendrons).

b- Principaux procédés physiques:

- L'évaporation / condensation sous pression partielle inerte ou réactive (Fe, Ni, Co, Cu, Al, Pd, Pt, oxydes).
- La pyrolyse au laser (Si, SiC, SiCN, SiCO, Si3N4, TiC, TiO2, fullerènes, suies carbonées, oxydes métalliques, etc.).
- La synthèse au plasma ou des méthodes à arc électrique (oxydes métalliques).
- La combustion à la flamme (oxydes métalliques).
- Le fluide supercritique sans réaction chimique (matériaux pour la vectorisation de principes actifs).
- Les micro-ondes (Ni, Ag).
- L'irradiation ionique ou électronique (production de nanopores dans un matériau de dimensions macroscopiques ou de nanostructures immobilisées dans une matrice).
- Le recuit à basse température (alliages métalliques et intermétalliques complexes avec trois à cinq éléments à base d'Al, de Zr et de Fe.);
- Le plasma thermique (des nanopoudres céramiques comme des carbures (TiC, TaC, SiC), des siliciures (MoSi2), des oxydes dopés (TiO2) ou complexes (HA, YIG, pérovskites).
- Le dépôt physique en phase vapeur (des dépôts de TiN, CrN, (Ti, Al) N, notamment).

c- Principaux procédés mécaniques:

- Les procédés de mécano synthèse et d'activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres (tous les types de matériaux (céramiques, métaux, oxydes métalliques, polymères, semi-conducteurs).
- La consolidation et la densification.
- La forte déformation par torsion, laminage ou friction (oxydes métalliques).

I.3.2. Méthodes chimiques de synthèse de nanoparticules en solution:

Les méthodes chimiques de synthèse de nanoparticules en solution offrent une grande variété de conditions expérimentales. Une caractéristique commune aux voies de synthèse que nous allons présenter est l'utilisation de trois composants indispensables: un précurseur, un agent réducteur et un agent stabilisant. Le contrôle précis de la taille, de la distribution de taille, de la forme et de la composition des nanoparticules passe par le contrôle et l'ajustement des divers paramètres de réaction. La température, la nature et la concentration des réactifs et des agents stabilisants sont autant de paramètres modulables. Les systèmes pouvant être obtenus sont donc très variés **[12]**.

I.3.2.1. Transfert de phase liquide-liquide:

Développée par Brust dans les années 1990 pour la synthèse de nanoparticules d'or **[13]** elle consiste à transférer un sel d'or ($AuCl_{4^-}$), solubilisé en phase aqueuse, dans une phase organique (toluène) par l'intermédiaire d'un agent de transfert, le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Après l'addition d'un agent stabilisant (décanethiol), le sel d'or est réduit par du borohydrure de sodium ($NaBH_4$). S'ensuivent, après 12 heures d'agitation, plusieurs lavages et une sélection en taille par précipitation.
Les nanoparticules d'or habillées de thiols finalement obtenues sont stables thermodynamiquement et de 2, 5 nm de diamètre. Cette méthode de synthèse a, par la suite, été adaptée à différents éléments: Cu **[14],** Pt **[15]**, CoPt **[16]**
Dans le cas de l'argent, le protocole de synthèse est le même que pour l'or, le sel utilisé pouvant être par exemple le nitrate d'argent ($AgNO_3$) ou le perchlorate d'argent ($AgClO_4$). Les nanoparticules d'argent sont habillées de thiols et de tailles comprises entre 5 et 7 nm de diamètre, avec une distribution de taille inférieure à 10 %. De multiples variantes ont également été développées, permet tant de contrôler la taille finale des nanoparticules ainsi que leur habillage par différents ligands tels que des amines, des phosphines ou encore des polymères **[17].**

I.3.2.2. Voie micellaire inverse:

Les micelles inverses (MI) sont des gouttelettes d'eau dans un solvant, stabilisées par un tensioactif. Ce dernier est une molécule amphiphile qui va se placer à l'interface eau-solvant, abaissant ainsi la tension interfaciale. Les MI sont utilisés comme microréacteur pour réaliser la synthèse de nanoparticules. Une première solution micellaire inverse contient le ou les sels métalliques. Nous pouvons ensuite distinguer deux modes opératoires pour la réduction: soit l'introduction directe d'agent réducteur en phase aqueuse dans le milieu micellaire, soit l'introduction d'une autre solution micellaire contenant l'agent réducteur. Sous l'effet du mouvement brownien, de multiples et incessantes collisions se produisent, les cœurs aqueux s'échangent et la réaction a alors lieu. Il y a ensuite séparation et reconstitution de nouvelles gouttelettes indépendantes, contenant en leur cœur les nanoparticules. Un agent stabilisant est ajouté à la solution et s'adsorbe à la surface des nanoparticules, assurant leur stabilité et permettant ainsi leur extraction du milieu de synthèse. Plusieurs lavages successifs permettent de retirer le tensioactif résiduel et une sélection en taille par précipitation affine la distribution de taille. La taille des micelles et, par conséquent, la taille des nanoparticules, peut être contrôlée par le rapport des concentrations en eau et tensioactif.
Des nanoparticules de nombreux matériaux ont pu être synthétisées par ce mode de synthèse tel le cobalt, le cuivre, l'or ou encore des nanoparticules bimétalliques (CoPt, AuAg, AuPd, PdPt…) **[18**, **19]**
Les premières nanoparticules d'argent synthétisées via ce système ont été réalisées au laboratoire. Les nanoparticules d'argent obtenues sont bien cristallisées **[20]** sphériques, de 4 à 6 nm de diamètre, avec une distribution de taille inférieure à 13% et habillées de chaines d'alcanethiols différentes longueurs (décanethiol ou dodécanethiol).

I.3.2.3. Décomposition organométallique:

Cette méthode de synthèse de nanoparticules a été développée par le groupe de B.Chaudret dans les années 1980, à partir de leurs travaux sur la synthèse de complexe dihydrogène. Elle consiste en la décomposition d'un précurseur organométallique, dans des conditions douces de température (T < 150° C) et de pression (1 à 3 bars), sous atmosphère réductrice, soit l'hydrogène, soit le monoxyde de carbone, en présence d'agents stabilisants. Le précurseur, dépouillé de ses ligands, libère des atomes métal laïques qui se condensent et forment des

nanoparticules. L'utilisation de gaz comme agent réducteur permet d'éviter l'emploi de réducteurs chimiques puissant qui engendrent souvent des impuretés s'adsorbant à la surface des particules et sont ensuite difficiles à éliminer **[21]**.

Les principaux ligands employés sont des polymères, des thiols, des amines ou encore des phosphines. Ils permettent le contrôle de l'étape de croissance et conduisent à des nanoparticules peu poly disperses, de taille contrôlée et de formes variées (sphères, cubes, fils…). Des nanoparticules métalliques (Co, Ni, Pt) et bimétalliques (CoPt, Ru_3Pt) ont pu être obtenues à partir de divers précurseurs tels Co ($\eta 3$-C_8H_{13}) ($\eta 4$-C_8H_{12}), Ni (COD) 2 ou Pt (dba) 2 **[22]**

Plus récemment, des nanoparticules d'argent habillées d'hexadécanethiol ont pu être synthétisées par la décomposition du complexe organométallique [$Ag(C_6F_5)$]. Un contrôle de taille (3, 7 à 5, 1 nm) est rendu possible via la température de réaction et le rapport argent/thiol **[23]**.

I.3.2.4.Thermolyse:

Un autre moyen de synthétiser des nanoparticules est de décomposer un précurseur à des températures élevées (entre 150 et 350° C). Cette décomposition a lieu en présence de ligands, dans un solvant à haut point d'ébullition, le plus souvent sous atmosphère inerte. L'ajout d'un solvant polaire dans le milieu réactionnel conduit ensuite à la précipitation des nanoparticules. Des nanoparticules de cobalt ont été synthétisées à partir de l'acétate de cobalt à 260° C en présence de divers surfactants (polyamine, acide oléique et trioctylphosphine) **[24]** Hambrock et al. ont réalisé la synthèse de nanoparticules de cuivre habillées d'hexadecylamine de 7,5 nm de diamètre avec une faible distribution de taille, à partir de [$Cu(OCH(Me)CH_2NMe_2)_2$] à 300° C **[25] .** Le complexe [$C_{14}H_{29}(CH_3)_3N$] [$Au(SC_{12}H_{25})_2$] est quant à lui un bon précurseur pour la synthèse à 180° C de nanoparticules d'or habillées de thiol, avec une distribution de taille relativement large (26 ± 20 nm) **[26]**

Navaladian et al. Ont réussi à synthétiser des nanoparticules d'argent sphériques de 10 nm de diamètre, via la décomposition de l'oxalate d'argent à 140° C, l'alcool polyvinylique étant choisi comme agent stabilisant **[27]**

I.3.2.5. Réduction de sels métalliques et métallo-organiques :

Les sols d'or de Faraday sont les premières nanoparticules sciemment synthétisées. Une solution colloïdale stable de nanoparticules d'or de 6 ± 2 nm de diamètre a en effet été obtenue par réduction d'un sel d'or ($NaAuC_{l4}$) avec une solution de phosphore, dans le disulfure de carbone .La réduction de $AuCl_{4-}$ ou $AgNO_3$ par le citrate de sodium a quant à elle permis d'obtenir respectivement des nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre et plus récemment d'argent beaucoup plus grande (60 à 200 nm de diamètre) avec une large distribution de taille **[28]**.
Concernant les sels métallo-organiques, nous pouvons citer les travaux du groupe Stucky. Ils concernent la réduction du précurseur d'or $AuClPPh_3$ (Ph=phényl) par le complexe tert-butylamine borane, en présence de thiols (agents stabilisants), dans le benzène **[29]** Cette synthèse modifiée est actuellement utilisée au laboratoire pour la synthèse de nanoparticules d'or de taille et de cristallinité contrôlée avec une faible distribution de taille (< 8%) **[30]** Tang et Ouyang ont travaillé sur la réduction des précurseurs $ClAg(PPh_3)_3$ et $NO_3Ag(PPh_3)_3$ dans l'ortho-di chlorobenzène (oDCB), l'oleylamine servant à la fois de réducteur et d'agent stabilisant **[31]** Là encore, des nanoparticules d'argent de taille (8 à 20 nm) et de cristallinité contrôlée avec une distribution de taille étroite (< 5%) sont obtenues. Comme nous le verrons au chapitre 2, ces trois publications serviront de base pour notre travail de synthèse de nanoparticules d'argent.

I.4. La stabilisation des nanoparticules :

Les biosurfactant (BS) émergent comme un tensioactif vert alternatif à leurs homologues synthétisés chimiquement pour la synthèse et la stabilisation de nanoparticules. Rhamnolipides (RL) BS produits par une souche bactérienne présentait une stabilisation des nanoparticules d'argent et d'oxyde de fer. Tel le comportement des BS est dû à la solubilisation ou à l'incorporation du réactif espèces et/ou particules synthétisées dans la phase micellaire et adsorption de nanoparticules à la surface des micelles de BS **[32]** Il est possible que la charge positive sur Ag^{+}/Fe^{+2} conduise à la formation de la paire d'ions avec la tête négative des micelles RL qui concentrer l'Ag^{+}/Fe^{2+} dans le petit volume à travers l'électrostatique interaction dans les sites de réaction Kiran et coll **[33]** ont suggéré que la présence de BS dans la solution colloïdale des nanoparticules agirait comme l'agent stabilisant

qui empêche la formation d'agrégats, et favorise la production et la stabilité des nanoparticules dans les conditions expérimentales.

L'excellente efficacité antibactérienne des nanoparticules adsorbées par un tensioactif pourraient être envisagées comme une interaction complexe des facteurs suivants :

1. Meilleure accessibilité et donc plus grande activité des fractions BS adsorbées en surface. L'immobilisation de molécules bioactives sur des nanomatériaux affiche une activité, une stabilité et une capacité de réutilisation accrues **[34, 35]**.

2. Les nanoplaques triangulaires sont beaucoup plus compétentes que leurs homologues sphériques. **[35]**

L'évolution de la structure hiérarchique avec plus de facettes ou de plans tendus dans la nanostructure d'oxyde de fer pourrait être attribuée à l'action antimicrobienne.

L'action différentielle contre les bactéries gram-positives et gram-négatives peut être attribuée à l'architecture variée de la paroi cellulaire et aux fractions de surface qui interagissent différemment avec les nanocomposites assistés par RL et BS d'oxyde de fer et de SNP. (Figure I.3)

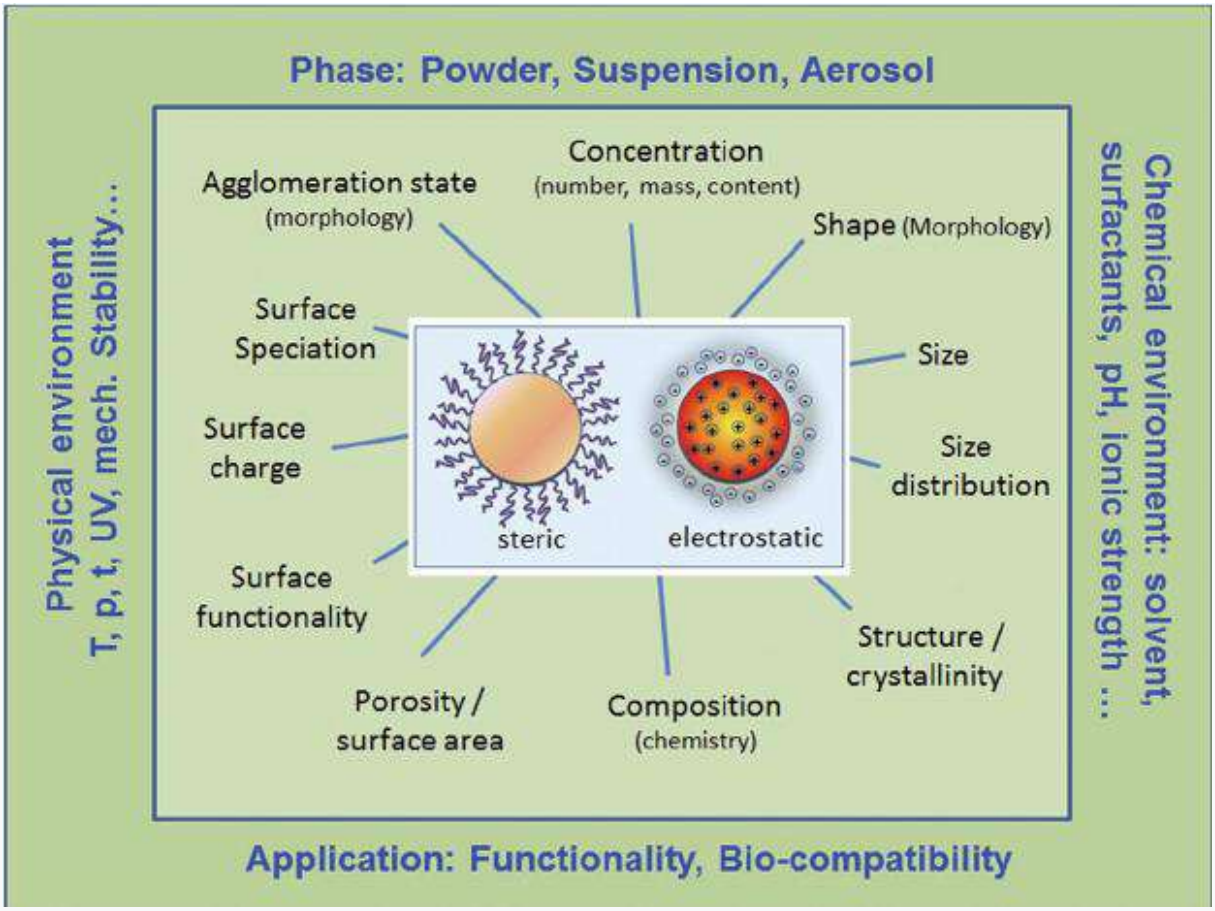


Figure I.3 Les types de stabilisation prédominants des nanoparticules, les propriétés les plus importantes et les formes pertinentes, les facteurs d'influence et les applications.

I.5. Caractérisation des nanoparticules:

I.5.1. Microscopie Electronique à Transmission MET ou Electronique à balayage MEB:

La microscopie Electronique à Transmission ou à Balayage permet d'observer des éléments à l'échelle atomique, plus particulièrement leurs tailles, leurs formes et leurs distributions. (**Figure I.4***)* illustrent le schéma de Principe de fonctionnement du MEB (a) et du MET (b). Ces procédés ne permettent pas de mesurer sous situation réelle des nanoparticules en suspension dans un liquide de base, car les mesures s'effectuent généralement sur des échantillons préalablement séchés. Néanmoins, ces techniques fournissent des informations Pertinentes sur la structure des nanoparticules et du réseau qu'elles peuvent former. Elles permettent de contrôler la formation et la taille des agrégats au sein du nanofluide **[36]**.

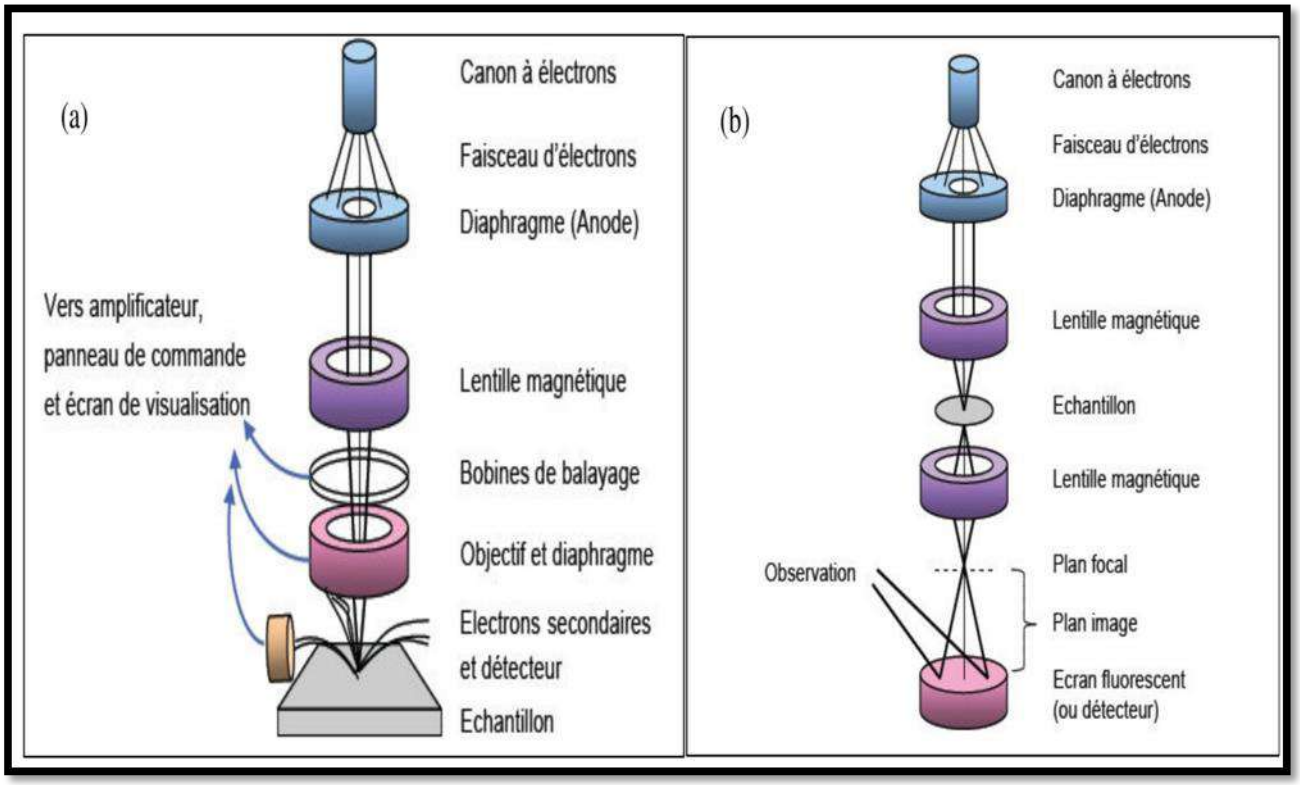


Figure I.4 Schéma de principe (a) MEB ; (b) MET **[37]**

I.5.2. Absorbance UV-Visible spectrophotométrie :

C'est une technique d'analyse quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance d'un milieu en fonction de la longueur d'onde et d'en étudier l'évolution au cours du temps. Plus la solution est concentrée, plus l'intensité du rayonnement absorbé est importante dans la limite de la proportionnalité entre la concentration et l'absorbance annoncée par la loi de Beer-Lambert. Dans le cas des nanoparticules en suspension dans un liquide de base, la spectrophotométrie UV-visible est particulièrement intéressante pour indiquer l'état de dispersion des particules ainsi que la présence ou non des agglomérats en se basant sur l'intensité du faisceau absorbé ou transmis. En effet, la variation de la concentration et la taille des particules surnageantes dans le temps est détectée par la mesure de l'absorbance des suspensions **[38]**.

I.5.3. Le microscope à force atomique (AFM):

C'est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon, ce type de microscopie repose essentiellement sur l'analyse d'un

objet point par point au moyen d'un balayage via une sonde locale, assimilable à une pointe effilée. Ce mode d'observation permet alors, de réaliser la cartographie locale des grandeurs physiques caractéristiques de l'objet sondé (force, capacité, intensité de rayonnement, courant...).

La technique AFM exploite l'interaction (attraction/répulsion) entre les atomes de l'apex nanométrique d'une pointe et les atomes surfaciques d'un échantillon. Elle permet d'analyser des zones allant de quelques nanomètres à quelques microns de côtés et de mesurer des forces de l'ordre du nanonewton.

Le microscope à force atomique permet donc de balayer la surface d'un échantillon grâce à une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible, pouvant se déplacer dans toutes les directions de l'espace, grâce à un tube piézoélectrique.

L'analyse des flexions du micro-levier permet de déterminer l'exact parcours de la pointe, ainsi que la mesure des forces d'interactions intervenant entre elle et l'échantillon. Capable de définir la topographie de surface, l'AFM est dans ce cas assimilable à un profil mètre.

La microscopie à force atomique se décline sous trois modes principaux qui sont :

- le mode contact ;
- le mode contact intermittent ou mode Tapping.
- le mode non contact.

Les différents types de forces mesurées dépendent de la variation de la distance entre la pointe et la surface analysée. C'est la raison pour laquelle, en fonction de ces trois modes découlent différents types de mesures et ainsi différentes applications **[39]**.

La figure suivante représente le Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

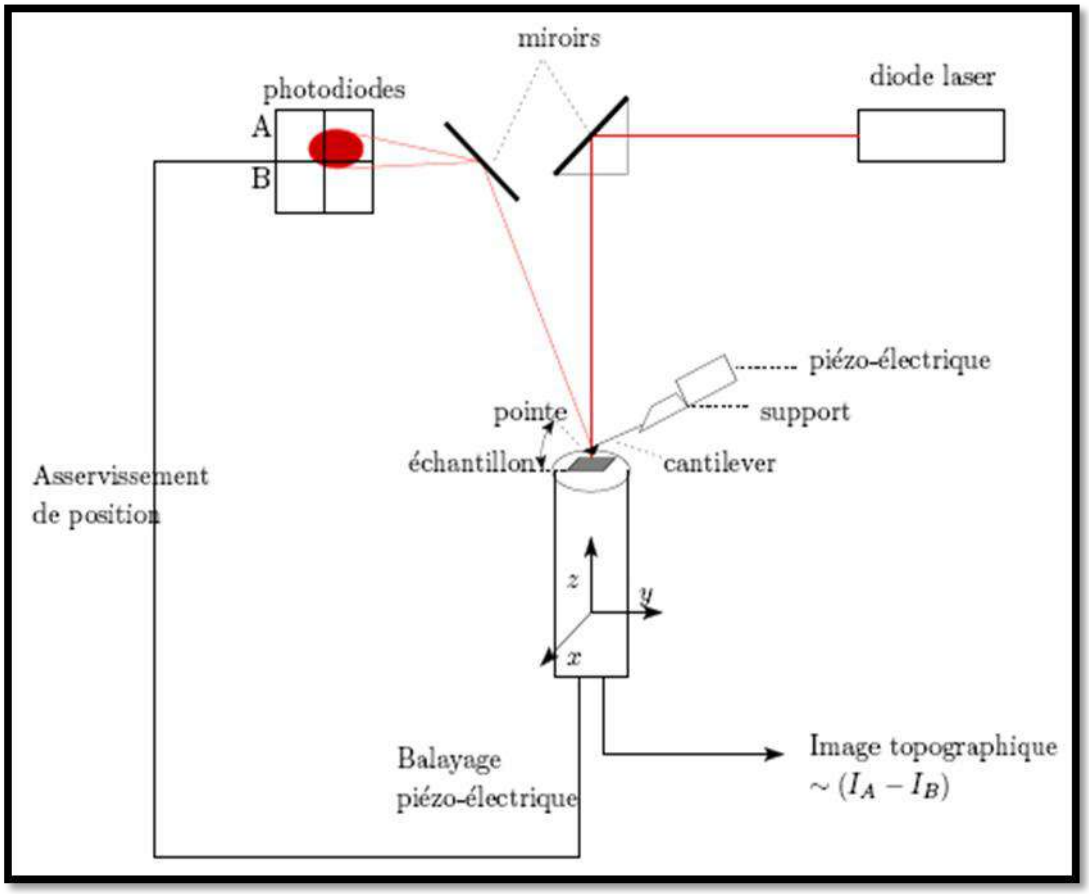


Figure I.5 Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique

I.6. Applications des nanoparticules :

Les NPs représentent un des champs de recherche les plus dynamiques actuellement dans le monde et s'imposent comme une priorité stratégique dans plusieurs pays industrialisés. Une évaluation récente, par un groupe d'experts des pays nordiques **[40]** chiffrait le marché mondial potentiel à 2,6 billions2 de dollars américains en 2015 alors que Lux Research (2007) arrivait au même montant, mais pour 2014. Dans un rapport de 2006, l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET) prévoit également que le principal impact économique des Np se produira dans les secteurs des nanomatériaux, de l'électronique et de l'industrie pharmaceutique (**Figure I.6**). **[41]**

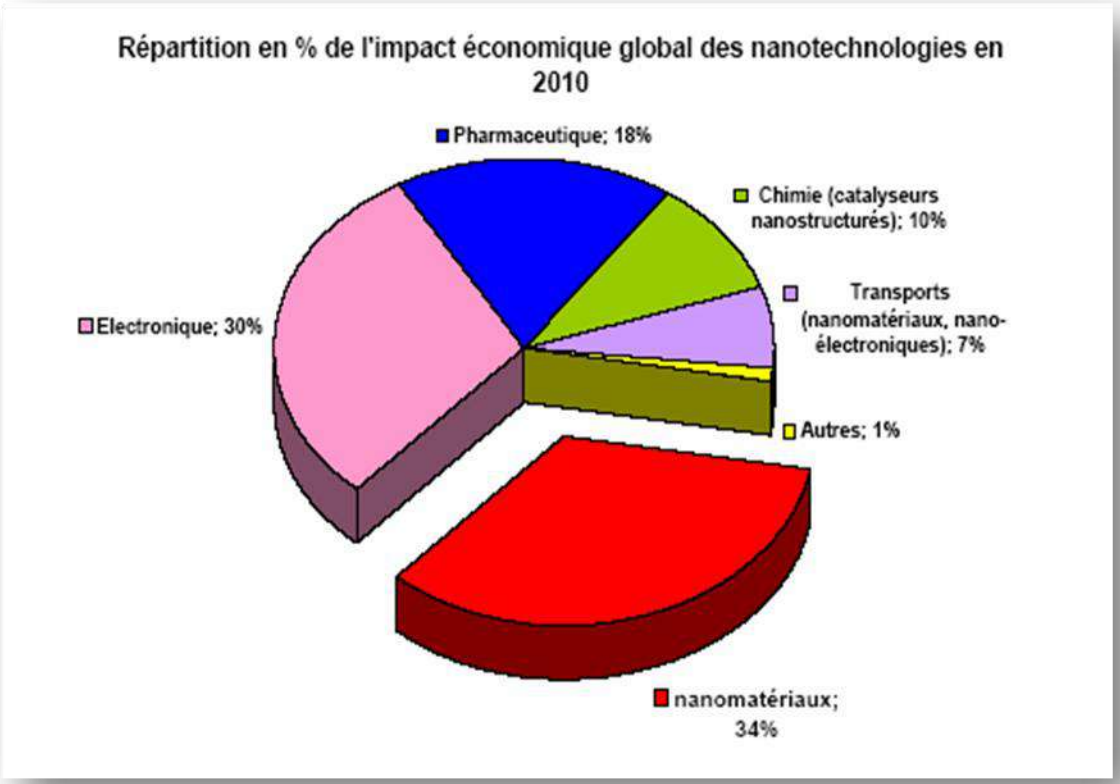


Figure I.6. Répartition en pourcentage de l'impact économique global anticipé des nanotechnologies en 2010

Le Tableau suivant représente les applications des nanofluides par type de nanoparticules et certaines propriétés spécifiques **[42]** .

Tableau I.2. Quelques exemples d'applications de nanoparticules

Type de nanoparticules	Nouvelles propriétés	Applications
C60	fullerènes Haute affinité électronique	Propriétés magnétiques améliorées, catalyseurs, pyrolyse, lubrifiants, cellules solaires, membranes électrolytiques, membranes échangeuses d'ions, entreposage oxygène et méthane, vecteurs de médicaments
TiO2	Propriétés optiques anti-UV et transparent au visible, effet photocatalytique	Cellules solaires, crèmes solaires anti-UV, peinture anti- UV, traitement environnemental, traitement transparent de surface de bois, matériel autonettoyant, agent antimicrobien
Points quantiques	Propriétés colorimétriques et électroniques peuvent être ajustées avec précision	Colorants, nanoélectronique et ordinateur quantique, imagerie médicale, thérapie médicale, cellules solaires, catalyseurs
NTC et nanotubes inorganiques (*Ex*. disulfure de molybdène)	Bon conducteur électrique Grande force mécanique	Nanoélectronique et ordinateur quantique, matériaux ultra forts, dissipateur d'électricité statique, emmagasinage de l'hydrogène, biosenseurs, senseurs chimiques, blindage électromagnétique, super capaciteurs, composites polymères renforcés, câbles super forts, textiles, pièces extrêmement légères pour véhicules terrestres, aériens et spatiaux, additifs
Polymères/verres/na-nocanaux	Miniaturisation des réactions chimiques	Laboratoire sur une puce

Liposomes	Composants biodégradables	Médicaments délivrés au site d'action, usage vétérinaire
Nano-capsules	Coquille creuse	Applications médicales, livraison ciblée de médicaments
Matériaux photoniques	Transmission de lumière de façon ajustable	Télécommunications, ordinateurs optiques
Matériaux nano-magnétiques	Propriétés magnétiques améliorées	Entreposage de données
Oxydes métalliques (Zn, Fe, Ce, Zr).	Surface importante, propriétés optiques	Céramiques, recouvrement anti-égratignures pour les lentilles, certains cosmétiques et écrans solaires.
Nano-argiles	Catalyse, force, dureté, résistance à la chaleur et résistance au feu	Raffinage du pétrole, modification des propriétés de composites et de matériaux, retardateur de flammes, renforcement mécanique, additif au caoutchouc
Noir de carbone	Surface importante	Industries du caoutchouc, de la peinture, des encres
Fumées de silice	Propriétés rhéologiques	Bétons spéciaux (durable, force élevée, auto-compactant, faible densité, faible perméabilité) et de qualité supérieure servant à la construction de ponts, routes, structures marines, stationnements, systèmes de purification et de distribution d'eau; industrie de la céramique, mortiers, additif au plastique et au caoutchouc
Dendrimères	Hydrophiles/hydrophobes	Applications médicales et biomédicales

Le nanofluide peut être utilisé pour diverses applications différentes. Ces utilisations n'affectant pas complètement le transfert d'énergie, elles peuvent réduire le besoin de base en carburant conventionnel, en énergie électrique ou en gaz. Lisons quelques applications importantes des nanofluides dans la figure suivante [**43]**:

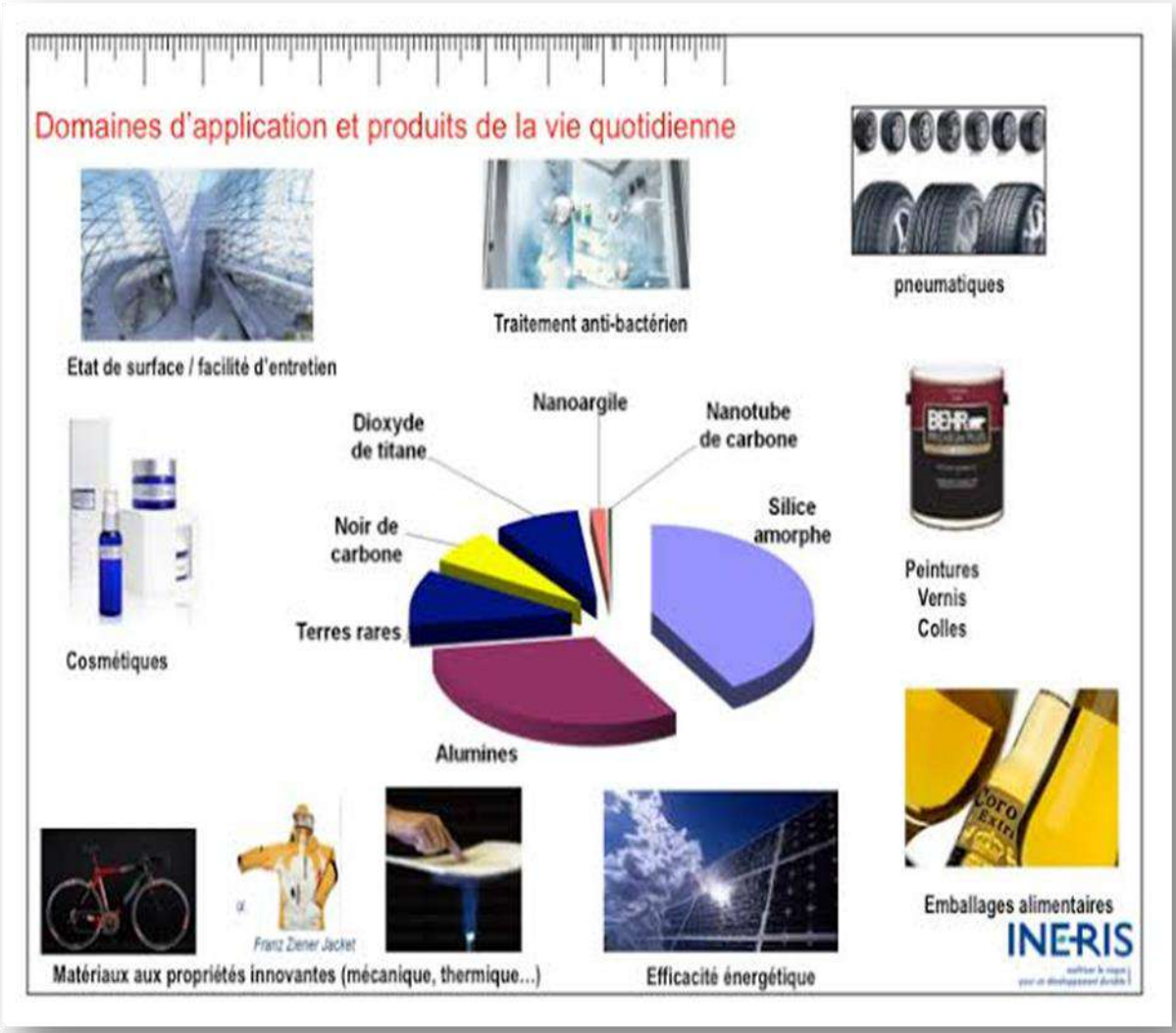


Figure I.7 Domaine d'application et produits nanométriques de la vie quotidienne

I.7. Applications des nanotechnologies par secteurs d'activité :

Le nombre de produits contenant des nanomatériaux augmente rapidement et déjà plus de 800 produits sont commercialement disponibles.

Les NP permettront d'accroître les performances des matériaux existants dans de nombreux secteurs d'activité économique **[41].** Le **Tableau I.3** présente pour différents secteurs d'activité économique, quelques exemples de performances recherchées par l'utilisation de NP.

Tableau I.3. Exemples de propriétés recherchées par l'utilisation de nanoparticules dans différents secteurs d'activité économique

Transport terrestre, aéronautique et spatial	Accroissement de : performance des moteurs, résistance mécanique et thermique des matériaux, efficacité énergétique, sécurité, confort, matériaux autonettoyants; réduction de : la corrosion et du poids des composantes, pollution, coûts, consommation de carburant; développement de détecteurs de glace et de fissures des structures
Électronique et communication	Développement de : mémoires à haute densité, processeurs miniaturisés, écrans plats à éclairement brillant et à très haute définition, polymères et composites nanostructures permet le développement de composants électroniques souples et de papier électronique
Industrie chimique et matériaux	Développement de : céramiques, pigments, poudres et catalyseurs multifonctionnels, fils plus légers et plus résistants, inhibiteurs de corrosion, couches fonctionnelles (isolation thermique, antiadhésif, antistatique), peintures, vitres et vêtements photoactifs et autonettoyants, membranes pour la séparation des matériaux (traitement d'eau, dialyse), catalyseurs structurés, recouvrements ultra résistants et outils de coupe extrêmement durs
Santé et industries pharmaceutique, biomédicale, biotechnologique et des cosmétiques	Nouvelles approches pour : diagnostic médical plus précis (marqueurs fluorescents, contraste accru en imagerie, meilleure caractérisation de certains paramètres) et traitement mieux ciblé et plus efficace, micro-laboratoires à biopuces et minisenseurs sensibles En cosmétique, amélioration de propriétés optiques (protection contre l'UV), de la tenue (crèmes solaires résistantes à l'eau), de la brillance et de la transparence des produits et développement de nouveaux produits antirides, antivieillissement et antibactériens
Agriculture	Développement des modes de solubilisation sur demande, meilleure absorption de pesticides, fertilisants et autres substances chimiques agricoles. Optimisation de la production animale par libération d'hormones de croissance et de vaccins sur demande, détection de pathogènes chez les animaux ou les

	plantes
Énergie	Amélioration des performances des systèmes de production et d'utilisation de l'énergie; stockage de l'hydrogène; nouvelle génération de cellules photovoltaïques; production de batteries et cellules de combustion; optimisation de l'efficacité de l'énergie éolienne, fenêtres intelligentes, de barrières thermiques, matériaux isolants plus efficaces
Secteur manufacturier	Conception d'équipements pour produire et incorporer les NP dans des produits à valeur ajoutée et assurer la caractérisation et la qualité; ingénierie de précision pour la production de nouvelles générations d'instruments de mesure; nouveaux processus et nouveaux outils pour manipuler la matière au niveau atomique et développement d'appareils divers
Environnement et écologie	Capteur pour détection de multi-substances en temps réel; réduction des émissions de polluants, dépollution de sites contaminés, traitement des effluents, protection des organismes sensibles et diminution des émissions de CO2; production d'eau ultrapure, récupération et recyclage des ressources existantes, amélioration de la décontamination et du recyclage des métaux, surveillance de l'environnement
Sécurité des procédés et produits	Senseurs agissant en temps réel et de contrôle de qualité à l'échelle atomique; la protection contre les copies, papiers sécurisés antifraude; procédés de marquage pour la traçabilité
Défense	Détecteurs d'agents chimiques et biologiques, explosifs plus puissants, systèmes furtifs, textiles légers et performants se réparant d'eux-mêmes, systèmes de surveillance miniaturisés et de systèmes de guidage plus précis
Caoutchouc et matières plastiques	Réduction du poids et augmentation de la performance des pneumatiques, durée de vie accrue et recyclage, réduction des émissions sonores. Élimination d'électricité statique
Métallurgie	Amélioration des propriétés des métaux, diminution du frottement et de l'utilisation de lubrifiants lors de la fabrication des pièces; outils de coupe plus durs et plus résistants à l'abrasion et à la corrosion, et amélioration des performances d'usinage

CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons donné une description générale des Nanofluides tels que les méthodes de synthèse, la stabilisation, synthèse bibliographique de leurs caractéristiques spécifiques ainsi que tous les domaines d'applications des nanofluides dans l'industrie et la vie quotidienne.

CHAPITRE II

Généralité sur les BIOSURFACTANTS

Introduction:

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures **[69].** La plupart des biosurfactants sont des agents extracellulaires. Ils sont excrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse **[69].** Par ailleurs, Il y'a des biosurfactants intracellulaires **[71, 59, 72, 73]**.

Ces composés d'origine microbienne sont classés selon leurs poids moléculaires, leurs propriétés, et leur mode d'action. Parmi les biosurfactants les plus connus on cite les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, etc. **[74]**

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [75] De ce fait, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, la production des tensioactifs produits par les microorganismes suscite un grand intérêt par les scientifiques. Ceci est dû principalement aux avantages présentés par ces biomolécules par rapport à leurs homologues chimiques, à savoir la biodégradabilité, la faible toxicité, l'efficacité dans des conditions extrêmes (pH, température et salinité) et la production en présence des ressources renouvelables **[44].**

Les biosurfactants ont un large éventail d'application biotechnologiques dans diverses industries: pétrolière, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, détergence, textile, peinture, mines et en nanotechnologie **[79, 64].**

II.1. SURFACTANTS (TENSIOACTIFS):

II.1.1. Définition:

Un agent de surface ou tensioactif ou surfactant est une substance capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux domaines de polarités différentes **[47]** : Figure II.1

- L'un hydrophile et polaire (affinité pour l'eau).
- Un autre hydrophobe et apolaire (affinité pour les lipides).

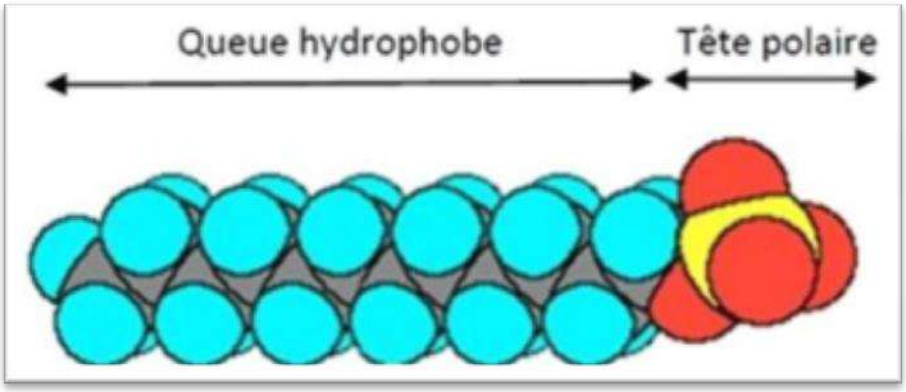


Figure II.1 : Structure schématique d'un surfactant.

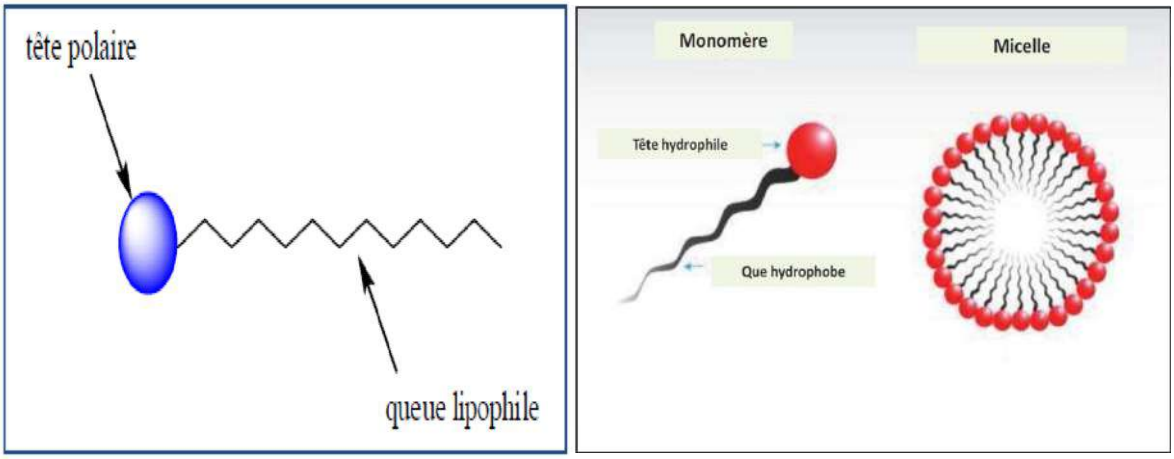


Figure II.2 : Structure d'un tensioactif **[45].**

Leur structure particulière permet aux agents de surface de se concentrer:

- ✓ Aux interfaces liquides-liquides à cause de l'amphiphile qui les caractérise. Chaque groupement se dirige vers le liquide pour lequel il a le plus d'affinité **[48]**.
- ✓ Aux interfaces liquide-gaz ET liquide-solide, le liquide repoussant vers l'extérieur des groupements qui ont une affinité opposée **[48]**.

II.1.2 .Classification des surfactants:

On peut classifier les surfactants selon différents critères, notamment en fonction de la nature de leurs têtes polaires (hydrophile), de leurs chaines hydrophobes ou bien encore en fonction de leurs structures générales **[49].**

Il existe quatre grandes classes de surfactant : les anioniques, les cationiques et les amphotères (zwitterioniques) et les non ioniques, comme le montre la **Figure II.3**

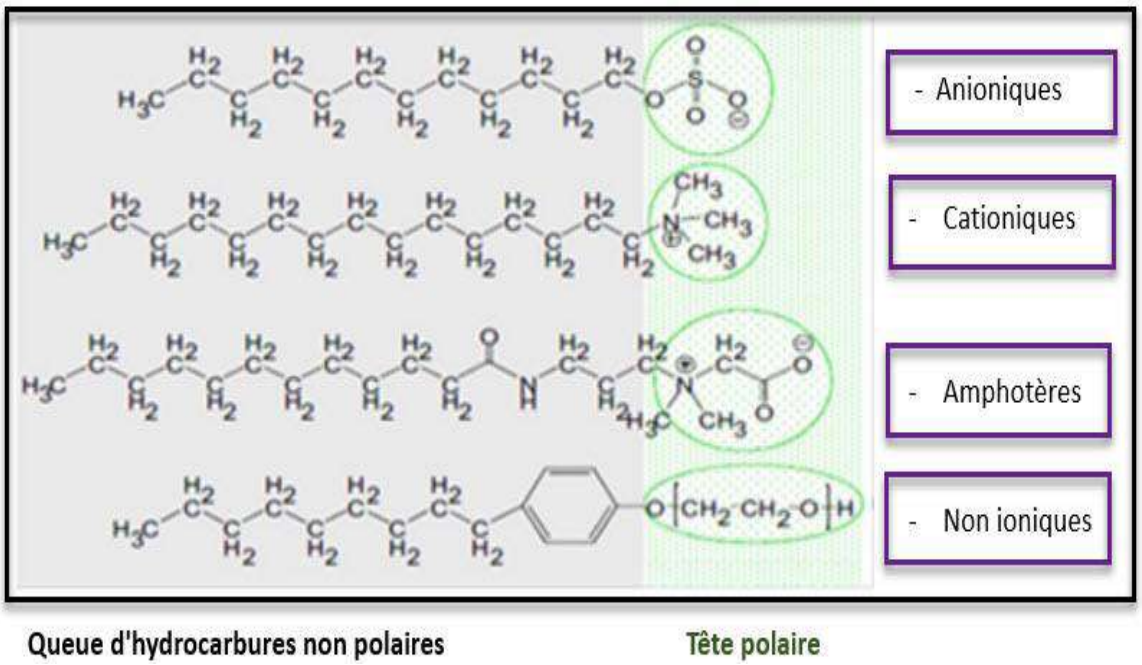


Figure II.3: Classification des surfactants selon la nature des Groupements

II.1.3. Propriétés des surfactants:

Deux propriétés essentielles des tensioactifs qui permettent de comprendre les phénomènes observés et qui déterminent leurs domaines d'application sont [50]:

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

D'autres propriétés des surfactants sont résumées dans le tableau II.1

Tableau II.1 : Les propriétés de surfactants.

Propriétés fondamentales	**Propriétés pratique**
Superficielles : présents à faible doses dans l'eau, les tensioactifs sont adsorbés positivement à l'interface eau/air et abaissent fortement la tension de surface **[51]**	Le mouillage : Il favorise l'étalement d'un liquide sur une surface lisse et augmente la vitesse de pénétration dans les substances poreuses **[52]**
Micellaires : la concentration minimale à partir de laquelle le surfactant s'auto-associé sous forme de micelles est appelée la concentration micellaire critique (CMC) .la valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif. Elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaine lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température **[51, 47]**	Le moussage : la mousse est un film dans lequel le tensioactif est adsorbé aux deux interfaces eau/air formant une double couche **[51]**
	La dispersion : il augmente la stabilité des suspensions de petites particules solides dans un liquide en évitant leur agrégation **[52]**
	L'émulsion : il permet de dispersé et de maintenir en suspension deux liquide non miscibles **[52]**
	La solubilisation : les solutions d'agents de surface, au de la de leur CMC, ont la propriété d'augmenter la solubilité apparente des composé pas ou peu solubles dans l'eau, soit en incluant dans la micelle des molécules de produits, soit en forme des micelles mixtes avec le produit à solubiliser **[52]**

a) Surfactants hydrophobes:

La partie hydrophobe d'un tensioactif est souvent constituée d'une chaîne hydrocarbonée, mais cette chaîne peut également être siliconée ou fluor carbonée **[52].**

b) surfactants naturelles:

Un surfactant naturel est issu de ressources naturelles (cette source peut être d'origine animale, végétale ou microbienne). Les surfactants naturelles doivent être obtenus par des procèdes de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution. Pour les surfactants naturels aucun procède de synthèse organique ne doit être réalisé. En réalité, il y a très peu de surfactants qui remplissent ces conditions.

Généralement les termes de surfactant naturel ou biosurfactant sont donc souvent utilisés dans un sens plus large. En effet, les surfactants synthétisés à partir de matière première naturel sont généralement qualifiés de naturels **[65]**.

Les surfactants d'origine chimique présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, les scientifiques se sont intéressés aux surfactants produits par des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelés biosurfactants **[66].**

II.2. Biosurfactants:

II.2.1. Définition d'un biosurfactants:

Biosurfactants sont des composés structurellement divers, principalement produits par un groupe diversifié de microorganismes tels que les bactéries, les champignons et les levures, extracellulaires ou faisant partie de la membrane cellulaire. Le biosurfactants peut être de diverses compositions chimiques telles que les glycolipides, les acides gras, les lipopeptides et les lipoprotéines, les phospholipides et les lipides neutres **[55].**

Les biosurfactants sont des métabolites primaires ou secondaires microbiens qui semblent jouer un rôle chaque fois qu'un microorganisme rencontre une interface. Les biosurfactants jouent un rôle important dans la motilité, les interactions entre cellules (formation de biofilm, maintien et maturation, détection du quorum, amensalisme et pouvoir pathogène) et la différenciation cellulaire, l'accès au substrat (par contact interracial direct et pseudo-solubilisation des substrats), ainsi que pour éviter les éléments toxiques dans le milieu environnant **[56].**

La plupart des biosurfactants sont anioniques ou non ioniques et le fragment hydrophobe est basé sur des acides gras à longue chaîne ou leurs dérivés, tandis que la partie hydrophile peut être un glucide, un acide aminé, un phosphate ou un peptide cyclique. Les bactéries constituent le groupe prédominant d'organismes produisant des tensioactifs **[56]**.

Un biosurfactant possède des caractéristiques souhaitables telles qu'une sélectivité élevée, une biodégradabilité, toxicité faible, acceptabilité écologique et activité précise aux températures extrêmes, salinité et pH **[55].**

II.2.2. Classification de biosurfactants:

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules structurellement variées.

Contrairement aux surfactants chimique, qui sont classés en fonction de la nature de leur groupement polaire, les biosurfactants sont classés principalement par leur composition chimique et leur masse moléculaire **[45]**.

a)- Selon Structure chimique des biosurfactants :

Les biosurfactants sont principalement classés en fonction de leur structure chimique et de leur origine microbienne. Les principales classes de biosurfactants sont les glycolipides, les phospholipides, les biosurfactants polymères et les lipopeptides (Surfactine). Les glycolipides les plus connus sont les Rhamnolipides, les Sophorolipide et les Trehalolipids (**figure II.4**) **[46]**.

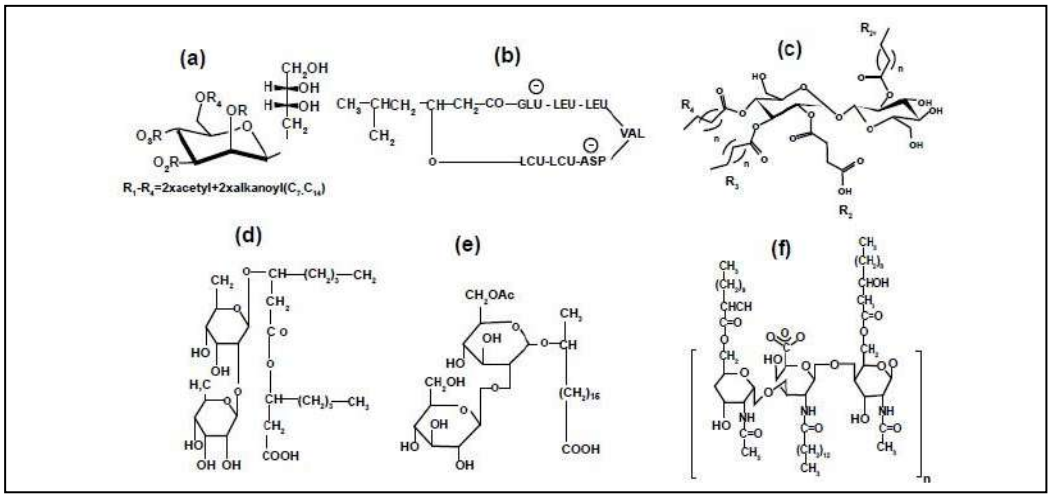


Figure II.4 : Structure chimique de quelques biosurfactants communs **[46].**

(a) Lipide mannosylerythritol
(b) Surfactine
(c) Lipide tréhalose
(d) Sophorolipide
(e) Rhamnolipides
(f) Emulsane

Les tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la charge sur la partie polaire

- Les tensioactifs anioniques sont chargés négativement.
- Les tensioactifs non ioniques.
- Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par un groupe qui est chargé positivement.
- Et les tensioactifs amphotères (zwitterioniques) ont des fragments chargés positivement et négativement dans La même molécule **[80].**

II.2.3. Microorganismes producteurs le biosurfactants:

La source de carbone et d'énergie sont indispensables pour la croissance des microorganismes. Pour faciliter la diffusion intracellulaire et la production des déférentes substances, les microorganismes combinent la source de carbone et les

substrats insolubles. Ils sont capables de produire des biosurfactants avec des structures moléculaires et des activités de surface déférentes **[67**].

La littérature décrit les bactéries de genre *Pseudomonas* et *Bacillus* comme étant les le genre les plus producteurs de biosurfactants. Elles sont isolées généralement des sols contaminés par les HC, de l'huile, ou des déversements accidentels**.** *Candida bombicola* et *Candida lipolytica* sont parmi les levures les plus étudiées pour la production de biosurfactants. L'utilisation de levures, telles que *Yarrowialipolytica, Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyceslactis*, présente un avantage essentiel réside dans leurs statistiques de type «généralement considéré comme sûr »
(GRAS: generally regarded as safe), qui permettent leur utilisation dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques **[67, 68]**.

Le tableau ci-dessous donne des exemples sur les microorganismes marines et les quelque types de biosurfactants **[64]**.

Tableau II.2 : Principales classes de biosurfactants et micro-organismes producteurs respectifs **[81, 82]**

Classes	**Type de biosurfactants**	**Microorganisms**
Les glycolipides	Rhamnolipides Les Sophorolipide Trehalolipids	*Pseudomonas aeruginosa.* *Torulopsis bombicola*, *T.apícola.* *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium* sp.
Lipopeptides et lipoprotéines	Peptide-lipide, Viscosine Serrawettine, Surfactine Subtilisine, Gramicidine Polymyxine	*Bacillus licheniformis.* *Pseudomonas fluorescens.* *Serratia marcenscens.* *Bacillus subtilis.* *Bacillus subtilis.* *Bacillus brevis.* *Bacillus polymyxia.*

Acides gras, lipides neutres et phospholipides	Acide gras Lipides neutres Phospholipides	*Corynebacterium lepus.* *Nocardia erythropolis.* *Thiobacillus thiooxidans.*
Biosurfactants polymères	Emulsan, Biodispersan, Liposane Carbohydrate-lipide-protéine Mannane-lipide-protéine	*Acinetobacter calcoaceticus.* *Acinetobacter calcoaceticus.* *Candida lipolytica.* *Pseudomonas fluorescens.* *Candida tropicalis.*
Biosurfactants particulaire	Vésicules	*Acinetobacter calcoaceticus.*

II.2.4. Production d'un biosurfactant:

Les biosurfactants sont, produits par une variété de microorganismes telle que les bactéries ; les champignons et les levures, extracellulaires ou faisant partie de la membrane cellulaire. En utilisant des déférentes sources de carbone, on citera notamment les hydrocarbures, les glucides, et les huiles végétales. Pour réduire les coûts de production, d'autres sources de carbone, telles que les effluents d'olives, le lactosérum de fromagerie, l'eau de farine de manioc, les huiles végétales usées, les mélasses, qui sont des déchets industriels, peuvent également être utilisées pour la production de biosurfactants **[65]**.

II.2.4.1. Facteurs influant sur la production de biosurfactants:

La composition et l'activité émulsifiante du biosurfactant ne dépend pas uniquement de la souche productrice mais aussi des conditions de culture, ainsi, la nature de la source de carbone, la source d'azote ainsi que la Ratio C:N, limitations nutritionnelles, paramètres chimiques et physiques tels que la température, l'aération, les cations divalents et l'influence du pH. Ces conditions et paramètres n'influent pas non seulement sur la quantité de biosurfactant produite mais aussi sur le type de polymère produit **[46]**.

a). Sources de carbone:

La qualité et la quantité de biosurfactant produit est affectée et influencée par la nature du substrat de carbone. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose, le glycérol ont été rapportés d'être une bonne source de substrat de carbone pour la production de biosurfactant. Un rendement très faible a été constaté lorsque seul le glucose ou de l'huile végétale était utilisé pour la production d'un biosurfactant par T. bombicola, mais que le rendement a été augmenté à 70 g/L en présence des deux sources de carbone **[46,66].**

b). Sources d'azote:

L'azote est un élément essentiel à la croissance microbienne. L'urée peptone, extrait de levure, sulfate d'ammonium, nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, extrait de viande et extraits de malt ont été utilisés comme source d'azote pour la production. Bien que l'extrait de la levure est la source d'azote la plus utilisée, son utilisation en ce qui concerne la concentration est dépendante de l'organisme et du milieu de culture. Les sels d'ammonium et l'urée sont les sources d'azote préférées pour la production de biosurfactants par Arthrobacter paraffineus alors que les nitrates favorisent la production maximale de tensioactifs chez P. aeruginosa **[46].**

c). Facteurs environnementaux:

Ils sont extrêmement importants dans le rendement et les caractéristiques du biosurfactant produit. Pour l'obtention de grandes quantités de biosurfactants, il est toujours nécessaire d'optimiser le bioprocédé car le produit peut être affecté par les changements de température, pH, vitesse d'aération ou d'agitation. La plupart des productions de biosurfactants sont aurait été effectuée dans une plage de température de 25 à 300 °C. L'effet du pH sur le biosurfactant produit (par quelle souche le nom de la souche n'est pas motionné (voire l'article biosurfactants: production and application ci-jointe)) a été étudié et donc une meilleure production s'est produite lorsque le pH est d'ordre de 7, 0 (le pH naturel de l'eau de mer) **[46].**

d). Aération et agitation:

L'aération et l'agitation jouent un rôle important dans la production de biosurfactants en facilitant le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Il peut aussi être lié à la fonction physiologique de l'émulsifiant microbien, il a été suggéré que la production d'age7nts bioémulsifiants peut améliorer la solubilisation de substrats insolubles dans l'eau et facilitent par conséquent le transport des nutriments vers les microorganismes **[46].**

e). Concentration en sel:

La concentration en sels influence la production de biosurfactants, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectent pas certains biosurfactants, bien qu'il soit observé une légère diminution sur les concentrations micellaires critiques **[66].**

II.2.5. Caractérisation structurale de biosurfactant :

II.2.5.1. Dosage de protéine :

Le dosage de protéine est basé sur la réaction de Biuret. La réaction du Biuret met en évidence les liaisons peptidiques. Il s'agit de mesurer l'absorbance du complexe coloré formé entre les ions Cu^{2+} du sulfate de cuivre du réactif de Biuret et la liaison peptidique de la protéine étudiée. Plus les liaisons sont nombreuses, plus l'absorbance est grande. C'est une méthode simple et moyennement rapide dont la sensibilité est faible c'est à dire un seuil de 100 µg **[75, 76].**

II.2.5.2. Analyse par FTIR:

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (**FTIR**) a été utilisée pour la détection et l'analyse des groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présentes dans la fraction biologiquement active du biosurfactant et ainsi de déterminer sa nature chimique **[83].**

Le principe général d'un spectromètre FTIR est proportionnellement simple. La lumière polychromatique provenant d'une source traverse un interféromètre où elle est convertie en un faisceau dont l'énergie est modulée en fonction du temps. Cette modulation est caractéristique du spectre de fréquences initial de la source. Après absorption par l'échantillon, le signal détecté se présente sous la forme d'un interférogramme correspondant à chaque coordonnée

de vibration. En dernière étape, cet interférogramme est converti numériquement en un spectre de fréquences par application de la transformée de Fourrier (**figure II.5**) **[85].**

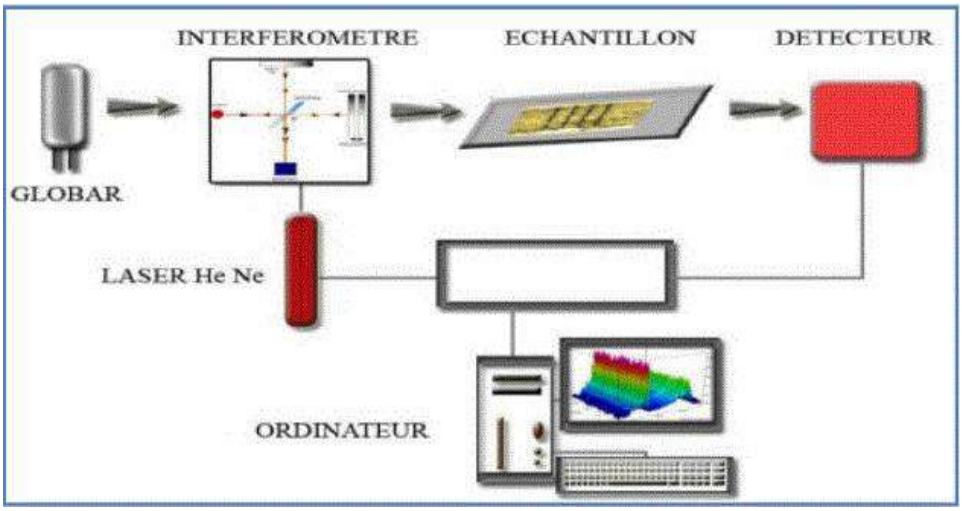


Figure II.5: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un Spectromètre FTIR [85]

II.2.5.3. Activité antimicrobienne:

L'activité antimicrobienne de biosurfactant a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par Meddour et al**. [79].**

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle **[80].**

II.2.5.4. Fraction bioactive purifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du biosurfactant:

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. **[83]**

La chromatographie en phase liquide a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse **[80]** (**figure II.6**) **[86]**.

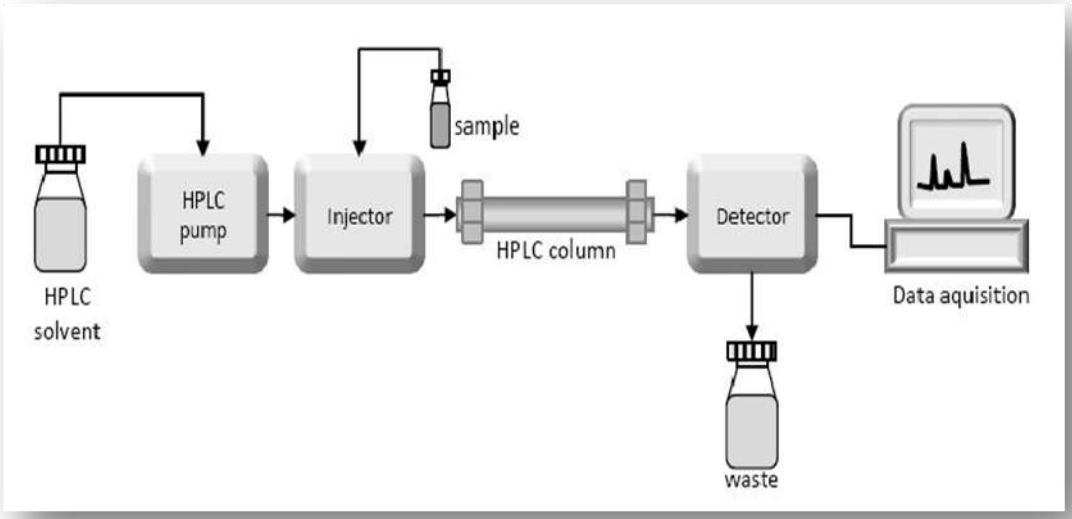


Figure II.6 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un HPLC **[86].**

II.2.6. Les avantage des biosurfactants:

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs contreparties chimiquement synthétisées, certains d'entre eux sont:**[46]**

a). Biodégradabilité:

Les agents de surface biologiques se dégradent facilement par les microorganismes.

b). Faible toxicité:

Le biosurfactant présente une faible toxicité à celle du tensioactif d'origine chimique. Il a également été signalé que les biosurfactants a montré une CE 50 plus basse (concentration efficace pour diminuer de 50% de la population) que les dispersants synthétiques **[64]**.

c). Disponibilité des matières premières:

Des biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières de très bon marché disponibles en grande quantité. La source de carbone peut provenir des hydrocarbures, des glucides et / ou lipides, pouvant être utilisés séparément ou en combinaison avec chaque autre.

d). Facteurs physiques:

De nombreux biosurfactants ne sont pas affectés par les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la force ionique tolérances.

e). Surface et activité d'interface:

Une bonne surfactant peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane de 40 à 1 mN/M. La Surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN/M et la tension interfaciale eau / hexadécane à <1 mN / M.

f). Autres avantages:

La biocompatibilité et la digestibilité qui permet leur application dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et en tant que additifs alimentaires fonctionnels **[46].**

II.2.7. Extraction de biosurfactants:

Pour extraire le biosurfactants du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer la biomasse (cellules bactériennes) de ce milieu (par centrifugation par exemple).

La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants: chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactants. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices **[67, 68].**

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le biosurfactants par un mélange des solvants (chloroforme/méthanol). Généralement, l'acidification permet une précipitation du biosurfactants. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation et de lavage sont nécessaires pour récupérer et purifier le biosurfactant **[68].**

II.2.8. Application des biosurfactants:

Les biosurfactants ont une meilleure compatibilité avec l'environnement et possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants chimiques, tels que la biodégradabilité, la faible toxicité, plus sélectifs, la stabilité thermique et chimique élevée, etc.… **[64].**

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les surfactants biologiques sont largement utilisés dans de nombreux domaines tels que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique (la lutte contre de nombreuses maladies, agents thérapeutiques conduisant à une réduction d'un grand nombre d'infections sans l'utilisation de produits chimiques de synthèse et de médicaments), la cosmétique (les crèmes antirides, crèmes hydratantes, et les cosmétiques de nettoyages) et les applications environnementales, tels que la biorestauration des polluants, la récupération améliorée du pétrole, la lubrification, la détergence, la solubilisation et la dispersion **[68].**

Le tableau ci-dessous englobe les principaux domaines d'application des biosurfactants.

Tableau II.3. Différents domaines d'application des biosurfactants **[75, 64]**

Domaine	Application
Environnement	Bioremédiation : Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures; Assainissement et rinçage du sol; Solubilisation des huiles.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole (MEOR).
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds: Elimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments.
Aliments	Solubilisation des huiles aromatisées; Amélioration de la texture des produits à base de matières grasses.

Médicaments	Agents antiadhésifs; antifongiques; antibactériens; antiviraux; anticancéreux, cicatrisants.
Agriculture	Biopesticides; fongicides; antiparasites.
Domestiques	Nettoyant; Préparation des crèmes hydratantes dermatos logiquement compatibles, les crèmes antirides.
Chimie	Détergent domestique et industriel; Peinture: dispersant, émulsifiant. Textile: agent de mouillage.

II.2.9. Toxicité d'un biosurfactant:

Le biosurfactant est une biomolécule issue d'un groupe diversifié des microorganismes dont le pouvoir toxique est faible ou inexistante complètement.

Humberto et al. **[65]**, Luna et al **[66]**, Haba et al. **[67]** et d'autres ont évalué la toxicité des différents biosurfactants par des méthodes normalisées tel que le test de germination de blé et les bioessaies d'Artémia et ils ont montré que le Rhamnolipides produit par P.aeruginosa, le glycolipide issu de Candida sphaeric UCP 0995et le biosurfactant produit par Gordonia sp. Sont des biosurfactants non toxiques **[65, 66, 67]**.

Deepansh Sharma et al. Ont comparé dans leur étude le glycolipide produit par *L.helveticus*MRTL91 avec le surfactant SDS. Ils ont trouvé que le biosurfactant est moins toxique à sa concentration en CMC par rapport au SDS synthétisé chimiquement **[68]**.

Conclusion :

À l'ère de l'industrialisation mondiale, l'exploration des ressources naturelles a été une source d'expérimentation pour la science et les technologies de pointe, donnant lieu à la fabrication de produits à valeur globale élevée sur le marché mondial, tels que les biosurfactants.

Les biosurfactants sont des molécules microbiennes qui se caractérisent par leur amphipathie en raison d'une grande variété de structures chimiques dans leurs molécules qui impliquent

des groupes hydrophobes et hydrophiles, ce qui leurs permet de jouer un rôle clé dans l'émulsification, la formation de mousse, la détergence et la dispersion, qualités recherchées dans différentes industries. La production de biosurfactants est considérée comme l'une des technologies clés du développement du 21ème siècle. En plus d'exercer un impact positif fort sur les principaux problèmes mondiaux, la production de biosurfactants revêt une importance considérable pour l'implantation de processus industriels durables, tels que l'utilisation de ressources renouvelables et de produits «verts».

La biodégradabilité et la faible toxicité ont conduit à l'intensification des études scientifiques sur un large éventail d'applications industrielles pour les biosurfactants dans le domaine de la Bioremédiation ainsi que dans les industries du pétrole, de l'agroalimentaire, de la santé, de la chimie, de l'agriculture et de la cosmétique **[67].**

CHAPITRE III

Matériels et méthodes

III.1. Matériel et méthodes pour la production de biosurfactant:

Introduction

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de HALL DE technologie, département de Génie des procédés, Faculté de la technologie. Université de Médéa En collaboration avec laboratoire de site de production SAIDAL Médéa.
L'objectif principal de ce travail est de produire et caractériser une nouvelle biomolécule à partir d'une souche bactérienne ***Marinobacter****SDK644*.

III.1.1. Matériels et méthodes:

III.1.1.1. Matériels:

- **Appareillage*:*** Le matériel de laboratoire utilisé au cours de notre étude est le suivant **Tableau III.1**

Tableau III.1. Photo/ appareil /type de matériel de laboratoire utilisé au cours de notre étude.

 1 **Autoclave** niive OT012	 2 **Etuve** mlw Ts100
 3 **Vortex** vtx 3000L	 4 **Tensionmetre** gibertini



9 **Agitateur**
MR 3001 K



10 **Incubateur**
Sl 500



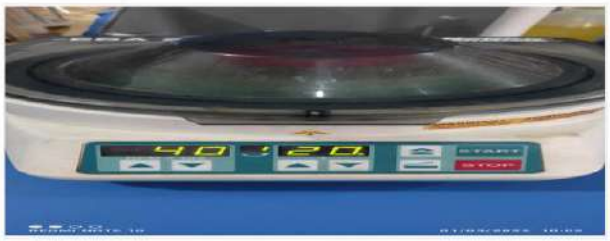
11 **Spectrophotometre**
Lambda 25



12 **Bec benzene**



5 **PHmetre**
827 pH lab



6 **Centrifugeuse**
EBA 200



7 **Refregerateur**
Condor



8 **Balance**
sartorius



13 **hplc**
permalink series 200



14 **FTIR**
JASCO FT/IR-6800



15 **Purificateur D'eau**
sartorius

III.1.2. Repiquage et conservation de la souche:

III.1.2.1. Repiquage de la souche:

Le repiquage se fait par ensemencement en stries croisées sur milieu LB gélosé, stérilisé à l'autoclave (120 °C/20 min), puis incubé à 30 °C pendant 24 h (**Figure III.1**).

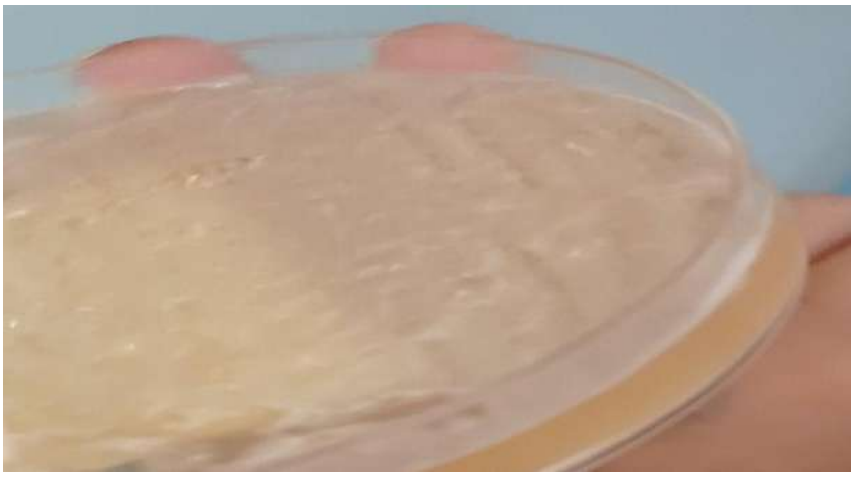


Figure III.1: La Souche bactérienne *Marinobacter*SDK644 après Repiquage

III.1.2.1.1. Repiquage dans un milieu liquide:

Repiquer ce qui est prélevé à l'intérieur de la boucle.



Figure III.2: Repiquage dans un milieu liquide

III.1.2.1.2. Repiquage sur milieu solide:

Repiquer en déplaçant en zigzag l'aiguille sur la surface de l'agar, du fond du tube vers l'ouverture, en prenant soin de ne pas érafler la gélose.

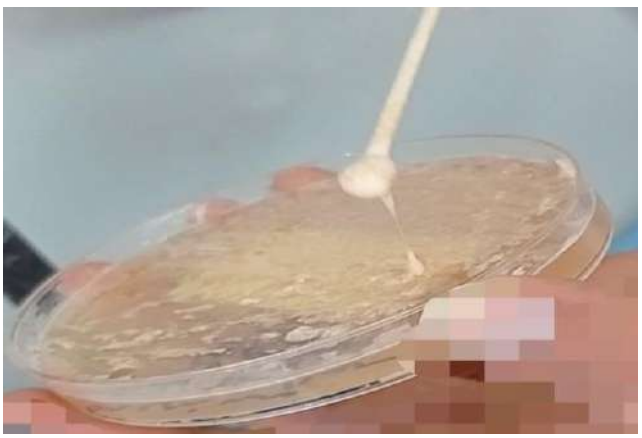


Figure III.3: Repiquage sur milieu solide

III.1.2.2. Conservation de la souche :

a). Conservation de courte durée:

Les souches pures ont été repiquées sur milieu riche LB solide et conservées à +4°C pour les prochaines manipulations. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois **[87]**.

b). Conservation de longue durée:

A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, les souches sont conservées dans du bouillon LB en présence de 25% de glycérol à -40°C dans des pastilles **[88]**.

III.1.2.3. Milieu de culture :

Tous les milieux préparés dans le but de la réalisation de cette étude sont autoclaves à 120 °C pendant 20 min afin de garantir leur stérilisation totale.

III.1.2.3.1. Milieu LB (luria Bertani):

Ce milieu de culture appelé LB (Luria Bertani) est composé selon le tableau suivant :

Tableau III.2 : les composants de milieu LB

Composants	**Quantité en Gramme**
Peptone	10
Extrait de levure	5
Nacl	23

Pour la conservation de la souche bactérienne (**figure III.4**)



Figure III.4: Préparation de milieu LB

III.1.2.3.2. La préparation du milieu minéral MM:

Ce milieu est préparé selon le tableau Suivant:

Tableau III.3 : les composants de milieu MM.

Composants	**Quantité En Grammes**
Nacl	23
NH_4Cl	0.4
K_2HPO	0.3
KH_2PO	0.3
$MgCl_2$	0.33
$CaCl_2$	0.05
HCl à 35%	6.7 ml

Ce milieu est supplémenté de 1 ml d'une solution des éléments traces métalliques ou des Oligo-éléments préparé suivant le tableau suivant:

Tableau III.4 : les composants des oligo-éléments.

Composants	**Quantité En M. Grammes**
$FeCl_2$	1500
$CoCl_2$	190
$MnCl_2$	100
$ZnCl_2$	70
H_3BO_3	6
$MaMnO_4$	36



Figure III.5: préparation de milieu MM.

Le pH du milieu est ajusté à 7 avec une solution de soude caustique (**NaOH 1M**).
Afin d'éviter la précipitation des sels après Autoclavage.

III.1.2.4. Milieu de production et conditions de culture:

III.1.2.4.1. Préparation de l'inoculum:

- Dans un environnement stérile, et à partir d'une culture sur gélose nutritive on prélève une surface d'environ 10 cm^2 de la meilleure souche productrice sélectionnée, au moyen d'un fil à boucle stérilisé et on l'introduit dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de Bouillon Nutritif préalablement autoclave.
- Dans un volume de 1000ml. Le pH de cette solution doit être égal à 7, Alors en utilisant un pH-mètre et une solution de NaOH 1M on fait l'ajustement du PH à 7.
- L'étape suivante est de faire la stérilisation ou autoclavage, alors on doit partager les milieux dans des petits flacons de 200 ml et les introduire dans l'autoclave.
- La stérilisation est faite dans l'autoclave à une température de 120 °C pendant 20 minutes.
- Les colonies sélectionnées sont alors introduites dans le milieu LB stérile devant un bec
- Benzène pour éviter la contamination et incuber les flacons dans une étuve a une température de 30°C pendant 24 heures (**III.6**)



Figure III.6:milieu LB après 24heures d'incubation

III.1.2.4.2. Préparation de milieu de production:

La production de biosurfactant s'effectue dans des flacons de 200 ml contenant 100 ml de milieu MM (dont la composition est donnée dans le tableau précédent) Additionné de 1% d'huile d'olive qui a été séparément stérilisée sur filtre seringue de 0.45 µm comme seule source de carbone.

Ce milieu est aussi préalablement stérilisé dans l'autoclave à une température de 120 °C pendant 20 minutes.

Par la suite on ajoute 2% de l'inoculum bactérien au milieu MM prépare avant. Les cultures sont maintenues à 30°C sous une agitation de 150tr /min.

La production de biosurfactant a été suivie pendant 3jours figure (**III.7**)



Figure III.7: la production de biosurfactant après 3 jours d'incubation

III.1.2.5. Extraction de biosurfactant :

III.1.2.5.1. Filtration et centrifugation :

Après trois jours de culture et lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le milieu (Cela est vérifié par un examen rapide avec le test de déplacement de pétrole), le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 3900tr/min pendant30 min suivi par une filtration ordinaire.



A filtration pour éliminer la biomasse

B centrifugation

Figure III.8:(A) Filtration pour éliminer la biomasse (B) Centrifugation

Le surnageant correspondant au biosurfactant brut est Partiellement purifié selon le protocole suivant:

III.1.2.5.2. Le premier protocole:

Nous avons tenté de précipiter le biosurfactant par acidification à PH 2 à l'aide d'une solution de HCL (6M), une conservation à froid à +4°C pendant une nuit **[94]** Et une centrifugation à vitesse maximale de 3900 tr/min. (figure **III.9**)

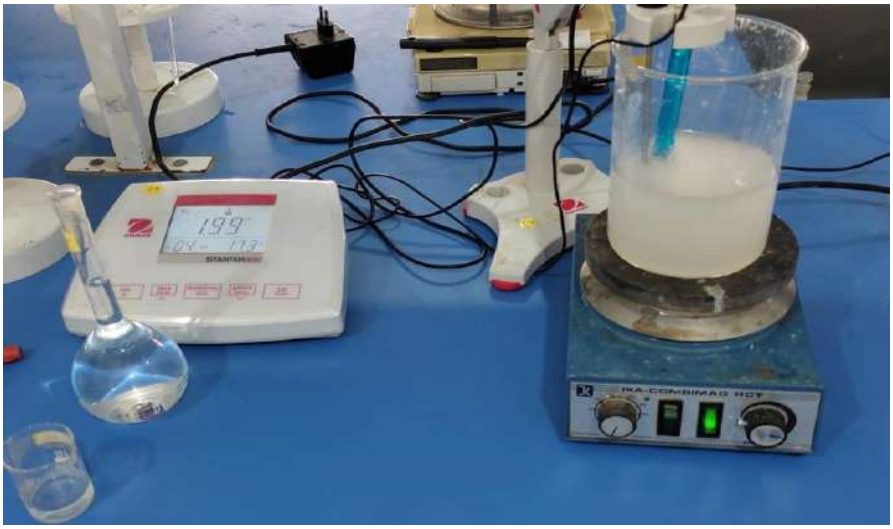


Figure III.9: Extraction par acidification

III.1.2.5.3. le deuxième protocole:

Est l'extraction par l'acétone **[95]**. Alors après une centrifugation à 6000tr/min.

Le liquide récupéré est précipité par l'acétone, 3volume d'acétone sur 1 volume du

Surnagent sous agitation avec utilisation de la glace à 4°C .Le mélange est refroidi pendant 24Heures en suivi par une centrifugation à 200 tr/min. **[99,97]**). (**Figure III.10**).

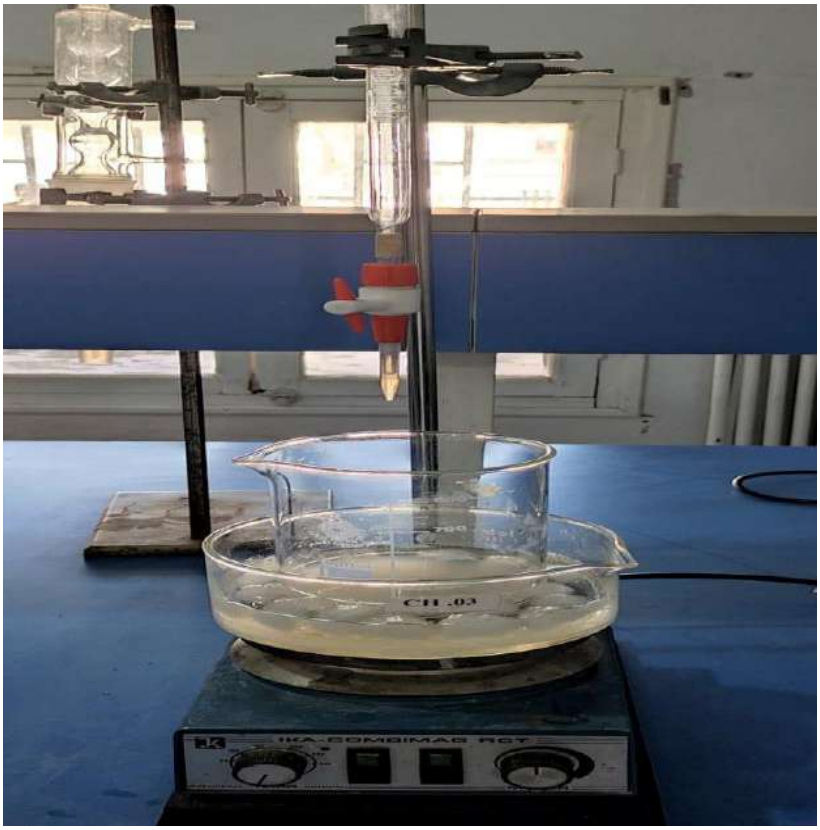


Figure III.10:Extraction par acétone.

III.1.2.5.4. Séchage et récupération du biosurfactant:

Le solide a été séché dans l'étuve pendant 48 heures à 37°C et la poudre est récupérée dans des tubes secs (**figure III.11**).



A **B**

la poudre récupérer par acétone **la poudre récupérer par acidification**

Figure III.11: La poudre rècupèrer après le sèchage

III.1.2.6. Techniques de mesure employées pour estimer la production de biosurfactant :

La production de biosurfactants a été suivie par la mesure de diamètre de déplacement de pétrole (DDP) et la réduction de la tension de surface (TS). D'autre technique complémentaire (indice d'émulsification, E24) a été employée pour la confirmation de la production.

III.1.2.6.1. Test de déplacement de pétrole (DDP):

C'est un test quantitatif de détection du taux de production du biosurfactants. Pour cet essai, 20 µL de pétrole brut est ajoutée à la surface de 40 ml d'eau distillée dans une boite de Pétri pour former une mince couche d'huile **[89].**

Ensuite 10 µL de la culture sont placés doucement au milieu de la couche d'huile. Si le biosurfactant est présent dans le surnagent, l'huile est déplacée, et le diamètre (en cm) de la surface, un halo clair et visible (zone de compensation) est mesuré après 30 secondes. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante (Figure **III.12**) **[90].**

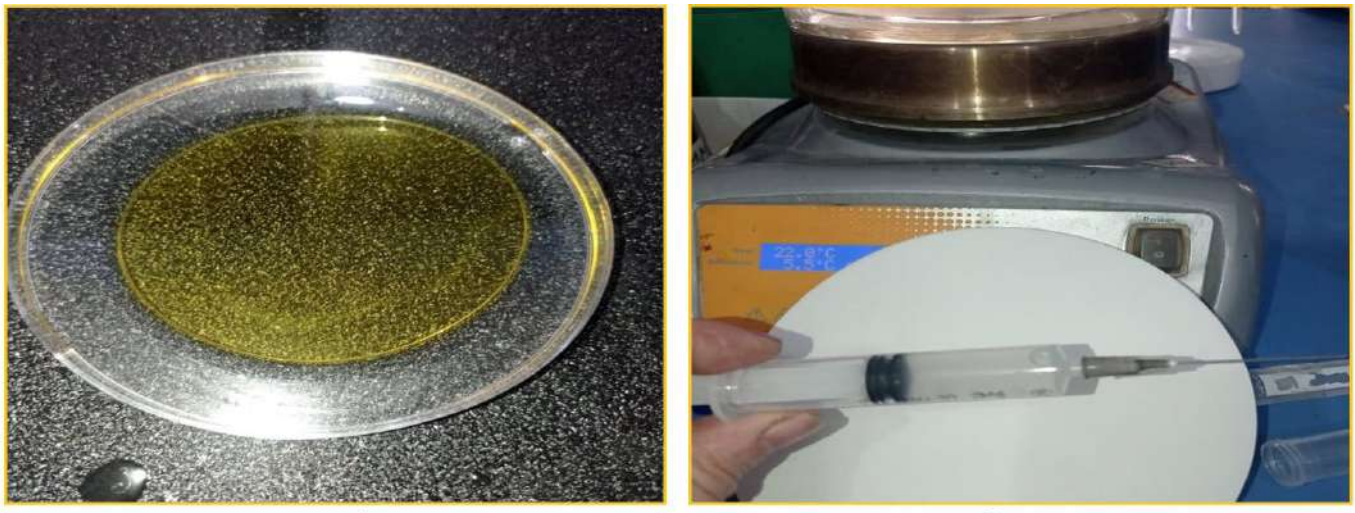


Figure III.12: Technique de déplacement du pétrole (A) Couche huileuse d'huile ou de pétrole sur une surface d'eau distillée (B) le surnageant

III.1.2.6.2. Tension de surface (TS):

Un volume d'environ 20 ml du surnageant est nécessaire pour la mesure de la tension de surface. La mesure a été réalisée par la méthode de lame de Wilhelmy à l'aide d'un tensiomètre, les lectures ont été effectuées pour chaque échantillon. L'unité de la tension de surface est le mN.m-1.**[91]**

III.1.2.6.3. Indice d'émulsion (E24):

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capa0cité de la souche à émulsionner une phase hydrophobe dans une phase hydrophile.

Le test consiste à mélanger 4 ml de surnagent de biosurfactants avec 4 ml de liquide hydrophobe dans des tubes. Les tubes sont ensuite mixés à l'aide d'un vortex pendant 2 min. Après l'homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 h à température ambiante (**Figure III.13**).

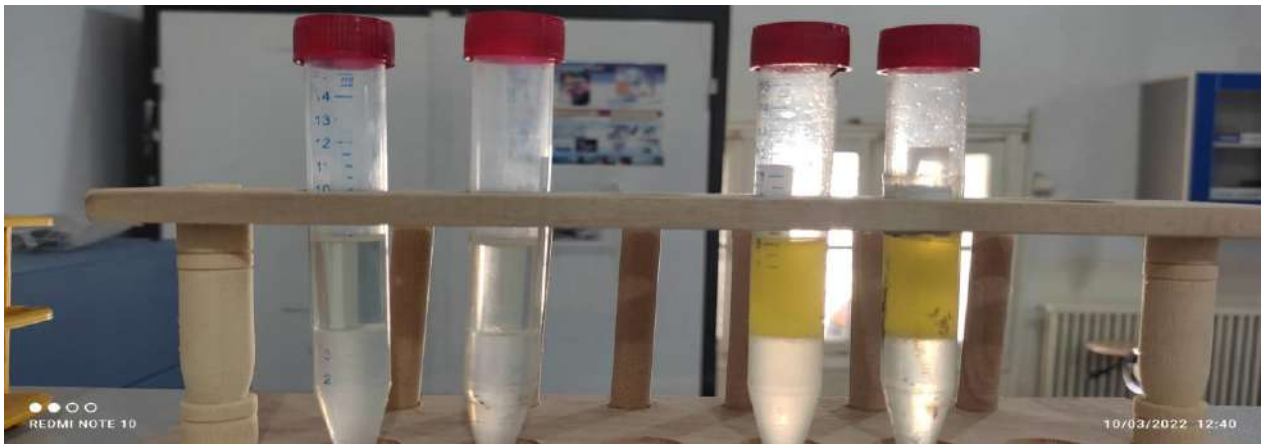


Figure III.13 : Test d'emulssificatio E_{24}

On mesure par la suite la hauteur de l'émulsion et on calcule l'E24 selon la relation d'écrite ci-dessous **[74]:**

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

He: hauteur d'émulsion

Ht: hauteur total.

III.1.2.7. Caractérisation structurale de biosurfactant:

III.1.2.7.1. Dosage de protéine:

On mélangeant 04 ml du réactif de biuret [20 ml de $CuSO_4$ (0,5%) + 20 ml de NaOH (10%)] avec 1 ml de la solution à tester et 2 ml de NaCl (0,9%), le mélange est laissé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min, on mesuré la densité optique à 540 nm contre un blanc qui ne contient pas la substance à tester **[92, 93]**. Figure (**III.14**)



Figure III.14: (A) Nacl ;(B) réactif de biuret ;(C) biosurfactant

Une courbe d'étalonnage obtenue par le tracé de la densité optique en fonction des concentrations préparées d'une protéine de référence (gélatine), est nécessaire pour calculer les taux des protéines dans notre solution de biosurfactant figure (**III.15**).

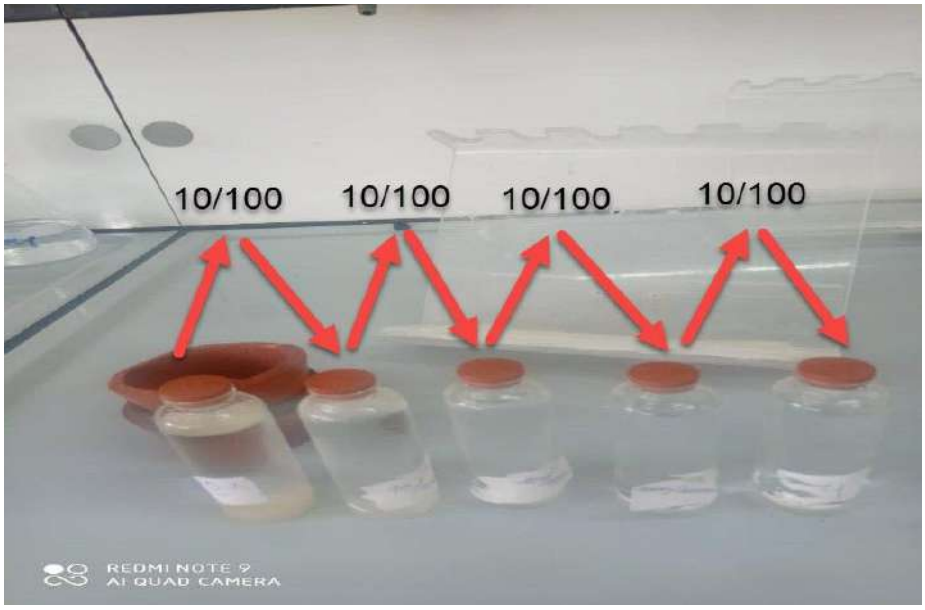


Figure III.15: la dilution en série d'une protéine de référence (gélatine)

III.1.2.7.2. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (FTIR):

L'analyse FTIR KBr a été réalisée en utilisant un spectromètre avec un échantillon de biosurfactant dispersé dans les pastilles de KBr, puis lyophilisée par la fraction active. Le BS brute a été broyée dans environ 80 mg de KBr de qualité spectrale. Ensuite, pressée en pastilles sous la pression à l'aide d'une presse hydraulique. Avant les mesures spectrales, et pendant environ une heure, le spectromètre a été purgé avec de l'azote sec pour éliminer les traces de dioxyde de carbone **[98]**.

Les mesures spectrales ont été effectuées en mode absorbance. Les spectres ont été normalement acquis avec une résolution donnant des traces IR sur une gamme des nombres d'ondes de 400 à 4 000 cm **[83].**

Cette technique de FTIR utilisé également pour détecter le spectre d'un biosurfactant lipopeptidique standard.

III.1.2.7.3. Activité antimicrobienne:

L'activité antimicrobienne de biosurfactant a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par Meddour et al. **[79].**

10 souches de référence ATCC, provenant du laboratoire de site de production saidal Médéa au niveau de laboratoire microbiologie Sont testées.
Liste des milieux de cultures et souches avec référence ATCC (annexe).

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau distillée stérile.

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension pour étaler la surface entière déjà remplie par la gélose Mueller Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné tout autour du bord de la surface de la gélose.

Des disques de papier Wattman stériles (6 mm de diamètre) sont imprégnés de concentration 100 g/L de biosurfactant solubilisé dans de l'eau distillée stérile et appliqués, à l'aide d'une pince, sur la surface du milieu MH. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 h à 37 °C.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle **[79].** Figure (**III.16**) :

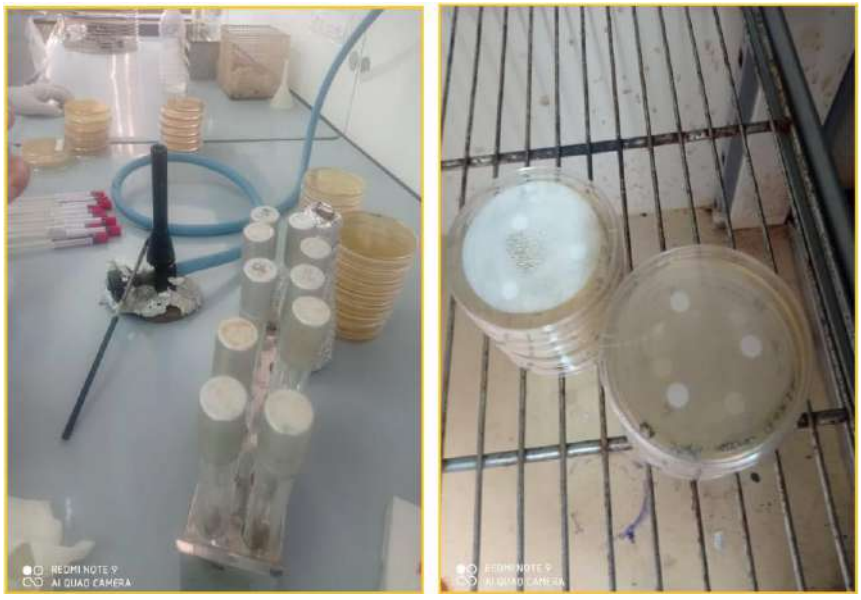


Figure III.16:repiquage par la méthode des stries

III.1.2.7.4. Fraction bioactive purifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du biosurfactant:

- L'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance a également été réalisée en dissolvant le biosurfactant dans de l'acétonitrile (ACN), en le Centrifugeant et en le filtrant. D'acétone nitrile (ACN) **[83].**
- Centrifugé et filtré, puis placé dans une colonne C18 à l'aide d'une HPLC **[99]** dans une colonne C18 à l'aide d'une pompe HPLC **[99]**.
- Le surfactant a été élué dans des conditions isocratiques à une vitesse de 1 min avec un mélange d'AC N et d'eau (60:40, v/v).et détecté à 280 nm **[83]** l'analyse Chromatographique -ysis relative à la spectroscopie de masse (LC-MS) a été appliquée pour 150 mm). Les conditions d'analyse HPLC étaient les suivantes :
- Cinq microlitres d'échantillons ont été injectés à un taux de fractionnement de1:4
- La colonne a été éluée initialement à un débit de 250 m3/s
- un mélange de 25% D'AC N et 75% d'eau, puis par application d'un gradient linéaire sur 30 minutes à 50 % d'ACN Et 50 % d'eau et sur une période de 30 minutes ; à 50 % d'eau et 50 % d'ACN sur une période de 15 Min

- à 90 % d'ACN et 10 % d'eau. La colonne a ensuite été recouverte pendant 1 minute, puis rééquilibrée.
- et finalement rééquilibrée à 25% ACN et 75% eau pendant 30 min.
- Pour l'ionisation électrostatique avec une polarité d'ion positive, la tension capillaire est de 0,5 %.positive, la tension capillaire a été réglée à 3,5 kV, la température de séchage à 350 °C
- Et la température d'étalonnage à 350 °C. La pression du nébuliseur à 40 p si, et le débit de Gaz de séchage à 10 L min.¡1. L
- Le temps d'accumulation maximal était de 50 ms, la vitesse de balayage était de 26 000 mhz.
  (Mode ultra scan), et le temps de fragmentation était de 30m **[83].**

III.1.2.7.5. Détermination de concentration micellaire critique:

Comme étant un paramètre essentiel dans notre étude, La concentration micellaire critique joue un rôle important lors de l'évaluation de l'activité des biosurfactant.

La CMC est déterminée par une série de dilution de surnageant en fonction de la tension de surface (mN.m-1). La plus faible valeur de la tension de surface correspond à la CMC, au-delà, il y aura une saturation du milieu par les micelles et donc une stabilité de valeur de la TS **[25].**Figure **III.17**



Figure III.17: une série de dilution de surnageant

III.2. Matériels ET Méthodes Pour La Synthèse ET La Caractérisation Des Nanoparticules:

Introduction

Les nanoparticules de magnétite ont reçu beaucoup d'attention en raison de leur utilisation potentielle dans diverses applications. Compte tenu de l'importance des nanoparticules de magnétite, ces dernières années, une grande attention a été accordée à la synthèse de nanoparticules magnétiques de taille uniforme. **[100,101,102,103].**
Parmi les méthodes de synthèse des nanoparticules magnétique de Fe_3O_4, la Co-précipitation chimique est la plus efficace, la moins chère et la voie la plus simple. **[104]**

Alors, Pour la synthèse de nanoparticules magnétiques dans cette étude, on utilise la méthode de Co- précipitation qui a été réalisé au niveau de laboratoire de chimie, hall technologie, université de Médéa.

III.2.1.Matériels:

Le matériel du laboratoire utilisé au cours de notre étude est mentionné dans le tableau ci-dessous:

Tableau III.5 : le matériel utilisé dans la synthèse des nanoparticules de magnétite.

Appareil	**Balance électronique**	**Secoueur orbitale**	**Agitateur magnétique**	**agitateur aérien**	**PH-mètre**	**ETUVE**
Photo						
Marque	**Sartorius**	**GFL3006**	**Heidolph MR3001K**	**Heidolph RZR2051**	**Starter3100**	**Memmert**

III.2.2.Protocole et montage expérimentaux :

III.2.2.1.Définition de la réaction de Co-précipitation :

Les nanoparticules de magnétite sont synthétisées par un procédé de Co-précipitation en phase aqueuse à partir de sulfate ferreux **$FeSO_4$**, le chlorure ferrique **$FeCl_3$** et hydroxyde d'ammonium **NH_4OH.** Les équations de réaction **[105]** sont les suivantes:

$$FeCl_3 + 3\ NH_4OH \longrightarrow 3\ NH_4Cl + Fe(OH)_3$$

$$FeSO_4 + 2\ NH_4OH \longrightarrow Fe(OH)_2 + (NH_4)_2SO_4$$

$$Fe(OH)_X^{3-X} + Fe(OH)_Y^{2-Y} \xrightarrow{\text{Oxydation à ph 8-10}} Magnétite\ Fe_3O_4$$

$$Fe^{+2} + Fe^{+3} + 8\ OH^- \longrightarrow Fe_3O_4 + 4\ H_2O$$

III.2.2.2. La stabilité des nanoparticules de magnétite:

Les méthodes de préparation de nanoparticules de magnétite sont nombreuses. Toutefois, certaines applications demandent une stabilité de ces nanoparticules vis-à-vis de l'agglomération, ou encore des fonctions particulières qui nécessiteront éventuellement un enrobage de celles-ci.

Par conséquent, la stabilisation des NP de magnétite est nécessaire pour améliorer leur stabilité de dispersion dans les milieux réactionnels lors de l'enrobage procédé préalable à la fabrication des nanostructures cœur/coquille. Pour cela, les chercheurs ont utilisé divers tensioactifs et stabilisants pour la modification de surface de NP magnétiques au cours du processus de synthèse **[106].**

Dans notre travail, deux types d'expériences sont réalisés pour comparer les influences des différents agents stabilisateurs utilisés.

Tout d'abord, nous avons seulement choisi deux agents stabilisants:

- Une base organique (hydroxyde de tétraméthylammonium) **N $(CH_3)_4OH$** est utilisée comme agent de précipitation et aussi comme agent stabilisateur.
- Un tensioactif biologique (biosurfactant) que nous avons produire précédemment (partieI: production de biosurfactant).

III.2.2.3. Réactifs utilisés:

Comme nous l'avons écrit, la méthode de Co-précipitation est choisie comme la voie chimique de synthèse des nanoparticules magnétite. Le tableau suivant:

Tableau III.6. Les matières premières et les concentrations initiales utilisées

Réactifs	*Fournisseur*	*Masse molaire (g/mol)*
$FeCl_3$ (97%)	**SIGMA-ALDRICH**	**162.20**
$FeSO_4$ **(**85%)	**Riedel-deHaen**	**151.91**
NH_4OH (30%)	**SCIENCE Company**	**35.05**
HCl (37%)	**SIGMA-Aldrich**	**36.5**
TMAH (25%)	**SIGMA-Aldrich**	**91.15**

- On commence par ; **17.87** grammes de **$FeSO_4$** est pesé et mis dans **100** millilitres d'eau distillé pour préparer la solution de **2** mol/L (M) de **$FeSO_4$**.Ensuite, **16.7** grammes de **$FeCl_3$** est pesé et mis dans **100** millilitres d'eau distillé pour préparer **1** mol\L (M) de **$FeCl_3$**.
- On dilué **23** millilitres de **NH_4OH** dans **250** millilitres d'eau distillé pour préparer **0.7** mol\L (M) de **NH_4OH** et **33** millilitres de **HCl** dilué dans **100** millilitres d'eau distillé pour obtenir **4** M de **HCl** .Ainsi **18** millilitres de TMAH dilué dans **100** millilitres d'eau distillé pour préparer **1**M de **TMAH**.
- Enfin **1**grammes de biosurfactant **BS** produire mis dans**100** millilitres d'eau distillé.

III.2.2.4. Montage expérimental et protocole opératoire:

La magnétite est préparée par Co-précipitation d'ions **Fe^{2+}** et **Fe^{3+}** en solution aqueuse à **25°C** par les étapes suivantes **[104]** :

➢ **On utilise agent stabilisateur le TMAH :**

1. On prépare tous d'abord les solutions de $FeSO_4$; de $FeCl_3$ et de BS et mis dans un secoueur orbitale à 120 tours pendant 20 min, pour former des solutions homogènes. (**Figure III.18)**

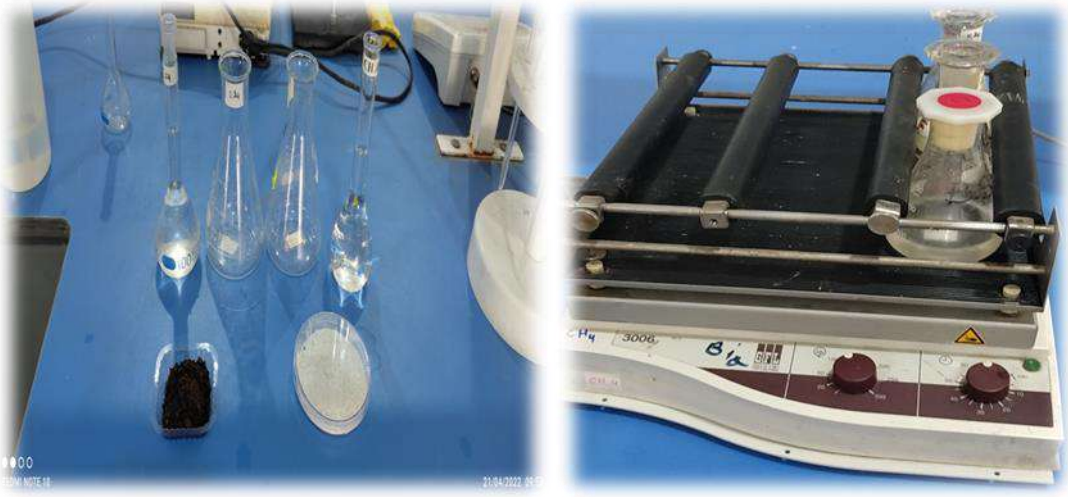


Figure III.18: Préparation des solutions de $FeSO_4$, de $FeCl_3$ et de BS.

2. On prépare les solutions de **NH_4OH;** de **HCl** et de TMAH et on utilise un agitateur magnétique pour homogénéiser les solutions. (**Figure III.19)**



Figure III.19: Préparation des solutions de HCl et NH_4OH

3. Dans un bêcher de 1000 ml on verse 20 ml de **$FeCl_3$** a l`aide d'un agitateur aérien à 200 tours pendant 5 min. Puis On ajoute 5 ml de **$FeSO_4$** avec une agitation pendant 5 min. (**Figure III.20**)



Figure III.20: Solution marron de Fe^{2+} et Fe^{3+}

4. On ajoute 25 ml de HCl goutte à goutte pour ajuster le PH de la solution sous agitation à 300 tours pendant 5 min, on observe que la couleur de solution vire au jaune.
5. On mélange la solution de base **NH_4OH** 250 ml avec l'agent stabilisateur Ce dernier est ajouté à la première solution avec augmentation de vitesse de l'agitateur à 600 tours pendant 30 min, remarquez que la couleur de la solution devenue noire. (**Figure III.21)**

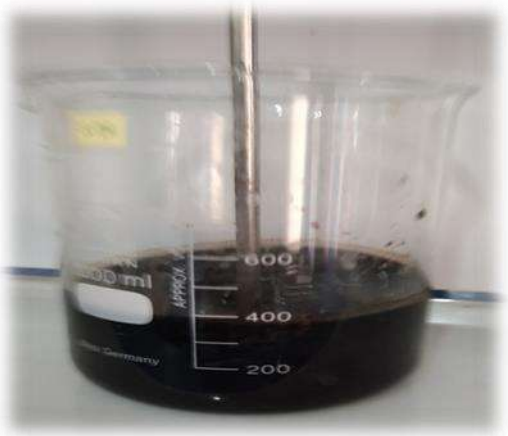


Figure III.21: Production des nanoparticules d'oxyde de fer.

6. On arrête l'agitation et laisse le mélange précipiter à l'aide d'un agitateur magnétique pour accélérer l'opération, après une précipitation parfaite on élimine le liquide avec une pipette, ensuite on fait le lavage des nanoparticules d'oxyde de fer **Fe_3O_4** ou bien un rinçage par l'eau distillé de 50-100 ml avec une agitation de 300 tours pendant 5 min, puis on précipite le mélange et éliminer l'eau. (**Figure III.22)**



Figure III.22: Solution de Fe_3O_4 nanoparticules avant et après la précipitation.

➢ **On utilise agent stabilisateur le BS produire :**

Nous répétons la même expérience précédente avec toutes ses étapes, la seule différence sera de remplacer l'agent stabilisateur **TMAH** par 100 ml de biosurfactant **BS** que nous avons le produire (partie1 : production de biosurfactant).

7. Après lavage à l'eau distillé 3 fois, les échantillons soit en suspension, soit en poudre sont préparés pour effectuer les analyses par différentes techniques. les particules obtenues sont filtrées puis sont séchées pendant 24 h à **70 °c**

Les poudres obtenues sont noire et rocheux. (**Figure III.23)**

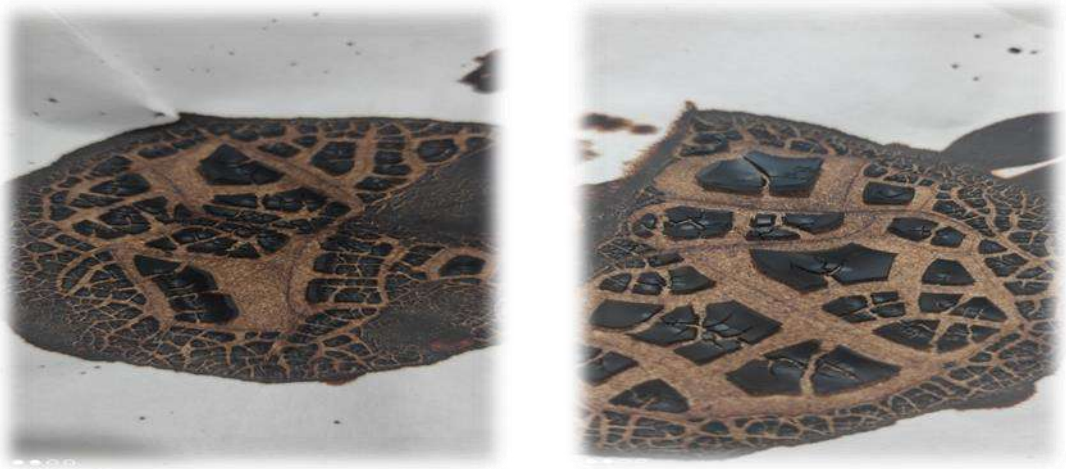


Figure III.23: La poudre de Fe_3O_4 nanoparticules par TMAH(1) ;

La poudre de Fe_3O_4 nanoparticules par BS (2).

III.2.3. les caractérisations des nanoparticules:

III.2.3.1. Propriétés magnétiques:

Les propriétés magnétiques des nanoparticules magnétiques facilitent l'enrichissement et la séparation, ou la localisation mobile directionnelle. Les effets magnétiques sont formés par le mouvement de particules ayant une masse et une charge. Ces particules comprennent des électrons, des protons, des ions chargés positivement et négativement, etc. La rotation des particules chargées crée des dipôles magnétiques, ou magnons. Le domaine magnétique fait référence à la disposition de tous les magnétons dans un volume de matériau ferromagnétique dans la même direction sous l'action de la force d'échange**.**

Le ferrofluide (fluide magnétique) est un liquide qui devient très magnétique sous l'action d'un champ magnétique extérieur, c'est un nouveau type de matériau fonctionnel à la fois magnétique et fluide. Ce dernier est une solution colloïdale composée de ferromagnétisme ou de ferrimagnétisme à l'échelle nanométrique ne restent généralement pas magnétiques en l'absence d'un champ magnétique appliqué et sont donc classés comme super paramagnétiques. **[107]**

On fait l'expérience sur notre échantillon dans ses deux cas: liquide et poudre avec un champ magnétique.

III.2.3.2. la microscopie à force atomique:

Lors de cette étude, on imageront l'échantillon de nanoparticule magnétite avec un **AFM** modèle ICON à l'air et à température ambiante avec une sonde **AFM** de type ScanAsyst air ou liquide (0.2N/m < k < 1N/m).

À la fin de la séance, on sauvegardera les données acquises sur nos clés USB ainsi qu'une version du logiciel permettant d'ouvrir et de traiter les images obtenues en mode Peak Force. On pourra ainsi analyser les images et données afin de les inclure dans notre étude. **(Figure III.24)**

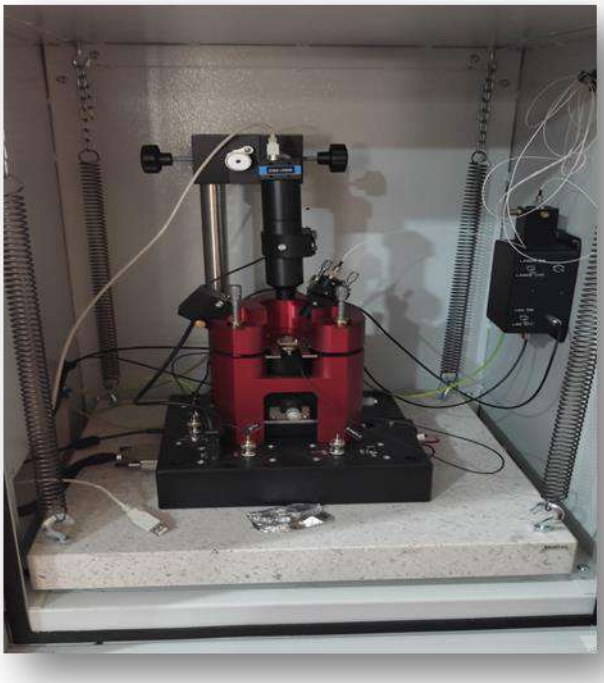


Figure III.24 L'appareil de microscopie à force atomique

III.2.3.3. Le microscope optique :

Le microscope optique utilise la lumière. Il est doté de deux lentilles :

- l'objectif, pour agrandir l'objet que l'on souhaite observer (il existe plusieurs grossissements) ;
- l'oculaire pour que les rayons arrivent à l'œil de manière parallèle, ce qui permet à l'œil de se reposer.

La résolution des microscopes optiques ne peut être supérieure à 0, 2 micromètre, cette résolution étant limitée par la diffraction de la lumière.

Des instruments supplémentaires permettent de régler la quantité de lumière (le diaphragme) ou la mise au point (molettes liées à un système de crémaillère) pour affiner l'observation de l'échantillon placé sur la platine porte-échantillon. (**Figure III.25**)



Figure III.25: L'appareil de microscope optique.

CHAPITRE IV

Résultats et discussion

IV.1. La production de biosurfactant:

La production de la biomolécule tensioactive par la souche ***marinobacter SDK644*** a été étudié dans un milieu minimum contenant 1 % (v/v) d'une source de carbone (l'huile d'olive) a 30°C sous une agitation ; après 72 h d'incubation nous avons remarqué un trouble ce qui est présenté dans le tableau ci-dessous

Tableau IV.1: la production de biosurfactant par la souche *marinobacter SDK644*

Temps de production (h)	0 h	72 h
Apparence de milieu de culture		

IV.1.1. Le test du déplacement de pétrole (DDP) :

Est un test qualitatif qui nous a permis de confirmer les résultats déjà remarqués visuellement ceci est éclairci dans le tableau et le graphe suivants :

+

Tableau IV.2 : suivi de production en fonction du temps

Temps (s)	2	5	15	30	60
DDP (cm)	6	6.5	7	8.2	8.3
Photos de la zone claire					

Le test de déplacement de pétrole (DDP) du surnageant contenant le biosurfactant est positif par rapport au temps mis.

L'étude de la capacité productrice de biosurfactant par la souche marinobacter est basée sur la mesure de la tension de surface et du diamètre de la surface halo clair (DDP).

Les résultats expérimentaux montrent clairement que la plus grande réduction de la tension de surface (28 mN. m-1) est obtenue après 1 jour d'incubation.

À cette valeur de TS; le diamètre de la surface halo clair étaient de 8.3 cm d'après Hentati.

IV.1.2. Extraction et purification de biosurfactant:

Deux méthodes ont été utilisées pour la récupération de biosurfactant ; on fait l'extraction par acétone nous a donné une bonne quantité (rendement 8g/l) de biosurfactant.

D'autre coté l'utilisation de la méthode de l'acidification donné une quantité moins (rendement 5g/l) de biosurfactant au total, le rendement obtenu égale à (13g/l)

Est par conclusion Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sarubbo et al. (2007), qui ont rapporté un rendement de 8 g/L pour un biosurfactant produit par Candida lipolytica en utilisant l'huile végétale et le glucose comme source de carbone. De même, Rufino et al. (2011) et Luna et al. (2013), ont signalé un rendement de 8,0 g/L pour Candida lipolytica et Candida sphaerica. Cependant, 13,1 g/L des glycolipides ont été produits par Cryptococcus humicola JCM 1461 après 11 jours de culture, en utilisant un milieu optimisé qui contient (10% de glucose, 0,1% de peptone, 0,3% d'extrait de levure et 0.1% d'extrait de malt, pH 6.0) (Morita et al., 2011). Sen et al. (2017), ont étudié la production des biosurfactants sur milieu Bushnell-Haas contenant du glucose (10%) par Rhodotorula babjevae YS3, et le rendement obtenu était 19,0 g/L. Pour les deux moisissures des rendements successifs de 11,15 +0,7 g/L pour Aspergillus sp. FS11 et 13,15 0,52 g/L pour Penicillium sp.FS13, ont été obtenus. Avec ces rendements, il ressort que nos moisissures sont des productrices efficientes des biosurfactants

IV.1.3. Activité biologique:

IV.1.3.1. Caractérisations antimicrobiennes de biosurfactant:

L'activité antimicrobienne de biosurfactant de la souche *marinobacter SDK644* a été testée sur dix souches bacteriennes Gram-,Gram+.

Le résultat du tableau **IV.3** indique que cette biomolécule a une activité variant de forte intensité dont les deux souches Staphylococcus epidermidis et Pseudomonas aeruginosa

D'un autre côté des résultats négatifs ont été enregistrés avec Aspergillus Brasiliens ; Salmonella Typhimuriem ; Staphylococcus aureus ; Candida albicans ; Escherichia coli ; Bacillus subtilis ; Salmonella Typhimurium

Lang et Philip [**60**] disent que certains nombres de biosurfactants présentent une activité antimicrobienne, tels que les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* et les lipopétides de *B. subtilis.* Rufino et al. Ont également testé l'activité antimicrobienne d'un biosurfactant pur isolé de *C.lipolytica* UCP 0988et des résultats positifs ont été trouvés. Par contre, le biosurfactant produit par *C. sphaerica* UCP 0995 n'a démontré aucune activité antimicrobienne contre les souches testées **[60].**

Le rôle et les multiples applications des biosurfactants ont fait l'objet d'intenses recherches dans le domaine médical et thérapeutique.

Tableau IV.3 : Activité antimicrobienne de biosurfactant contre dix souches ATCC

Souches ATCC	**GRAM**	**résultats**
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	-	-
Aspergillus Brasiliensis ATCC 16404	-	-
Salmonella Typhimuriem ATCC 14028	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 6538	-	-
Candida albicans ATCC 10231	-	-
Escherichia coli ATCC 8739	-	-
Bacillus subtilis ATCC 6633	-	-
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	-	-
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	+	+ + +
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	+	+ + +

IV.1.3.2. la concentration micellaire critique (CMC) :

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.1

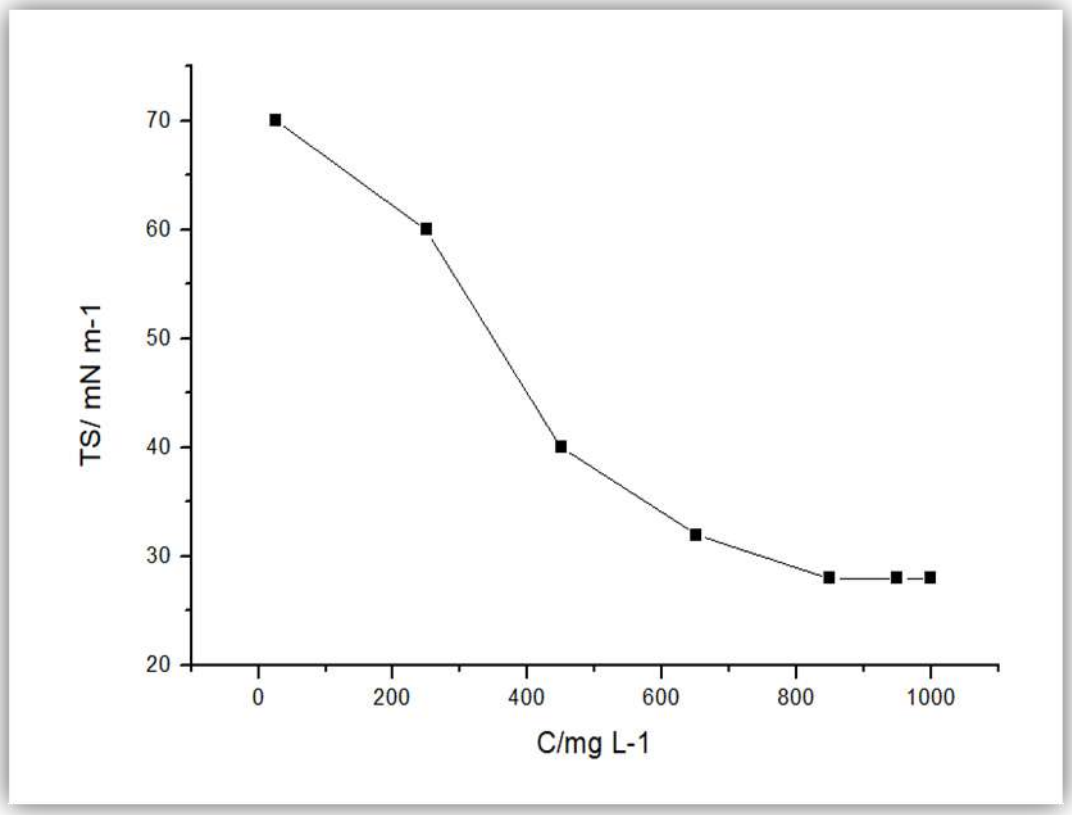


Figure IV.1 : Détermination de la CMC de biosurfactant de la souche *SDK644*

Le biosurfactant de la souche *SDK644* a décrit une tension superficielle minimale inférieure à celle de *C. antarctica* (35 mN/m) et de *Y. lipolytica* (50 mN/m) **[61].**

Le biosurfactant produit par *C. lipolyrica UCP0992* a montré une valeur de CMC inférieure à celle d'autres biosurfactants issus de levures décrites dans la littérature, avec des valeurs de 2.5% trouvées pour les biosurfactants de *C. lipolytica* et *Candida glabrata*, et de 0.6% pour le biosurfactant de *C. antarctique*.

Selon Rufino et al les propriétés tensioactives du biosurfactant dépendent principalement de sa capacité à réduire les tensions superficielles et interfaciales, la valeur de la CMC et la formation d'une émulsion stable. L'aptitude à réduire la tension superficielle dépend de la concentration spécifique du composé tensioactif, c'est-à-dire de la CMC, définie comme étant la concentration minimale de tensioactif requise pour obtenir une réduction maximale de la tension superficielle de l'eau et initier la formation de micelles. Les tensioactifs efficaces ont

de très faibles valeurs de CMC, c'est-à-dire qu'il faut moins de tensioactif pour diminuer la tension superficielle.

Les tensions superficielles par rapport aux concentrations isolées de BS ont été tracées à la Figure **IV.1** la tension superficielle de l'eau a diminué progressivement avec l'augmentation de la concentration en biosurfactants de 70 mN.m-1 á 28 m.N.m-1 avec un volume de surnageant de 0.85 g/l. Depuis elle reste constant

IV.1.4. Caractérisation biochimique et structurale du biosurfactant :

IV.1.4.1. Taux de protéine (méthode de Biuret):

Nous avons constaté que DO du tube 07 (1.0246nm) de teneur en protéine de (7.2 g / l) qui présente celle de biosurfactant est plus fort que DO du tube 06 (0.9685 nm) de teneur en protéine de (1.2 g / l) qui présente celle de surnageant ; On conclure que le dernier et moins purifié que le BS.

Tableau IV.4 : DO en protéine (gélatine) correspondante et de biosurfactant et de surnageant

Tubes N° :	0	1	2	3	4	5	6	7
DO à 540 nm (A)	0	1.0738	0.9836	0.8519	0.8358	0.7806	0.9685	1.0246
[protéine](gelatin) g /l	0	15	1.5	0.15	0.015	0.0015	Surnageant 1.2	BS 7.2

On cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser

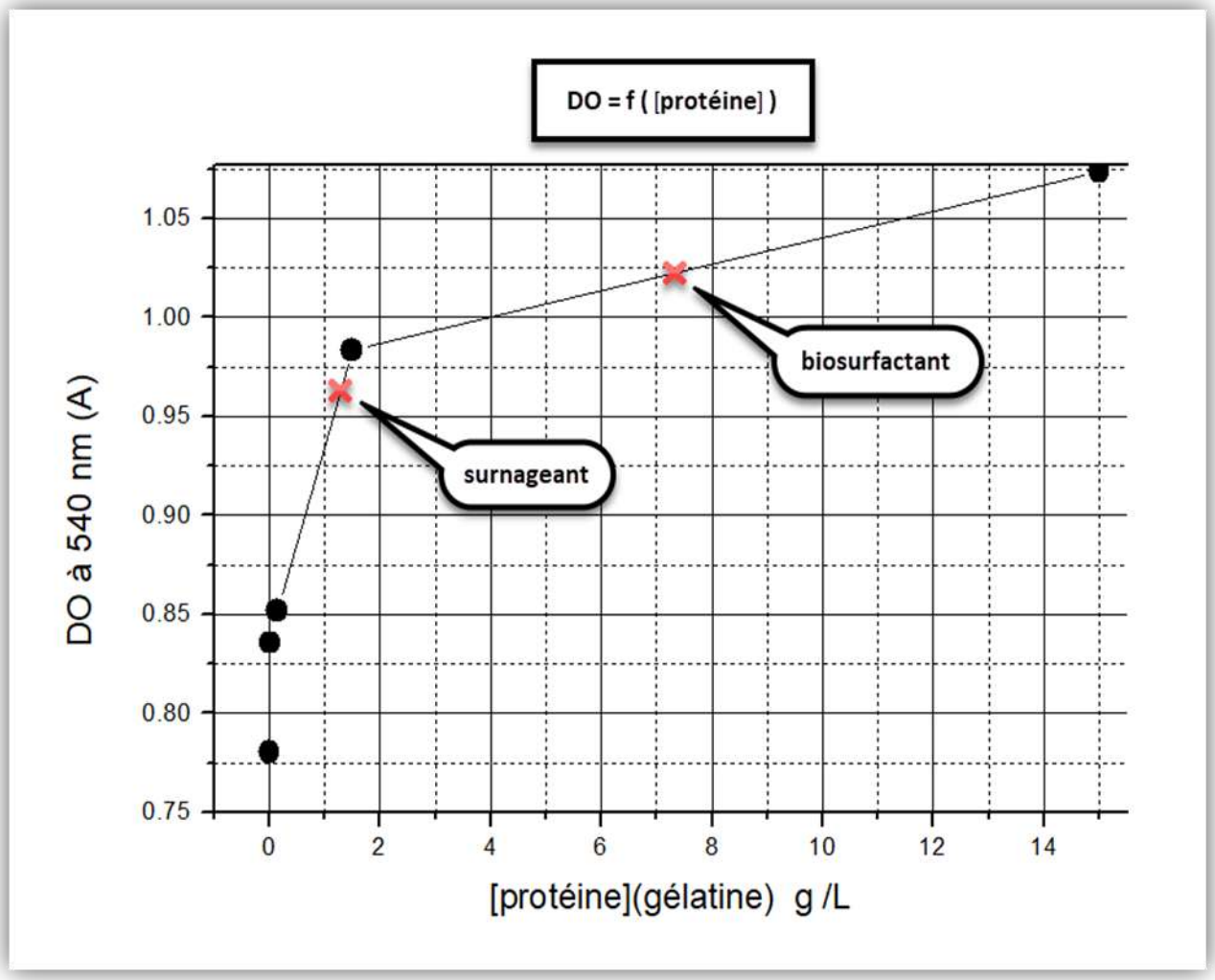


Figure IV.2 : Graphe explicative de dosage de protéine avec projection.

D'après le graphe et par projection et extrapolation on déduire la concentration de protéine.On Conclure que la souche ***SDK644***, Il contient des protéines, au milieu des quelles sont formées des ions cuivre, ces liaisons de type peptidique.

La biosurfactant lipopeptidique de la souche *Staphylococcus haemolyticus* Il est composé de 7.21 % de protéine **[25].** Le biosurfactant produit par B. megaterim a été classé en tant que glycolipide avec une combinaison glucidique et lipidique de 28% et 70% successivement

IV.1.4.2. Caractérisation structurale par FTIR (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier):

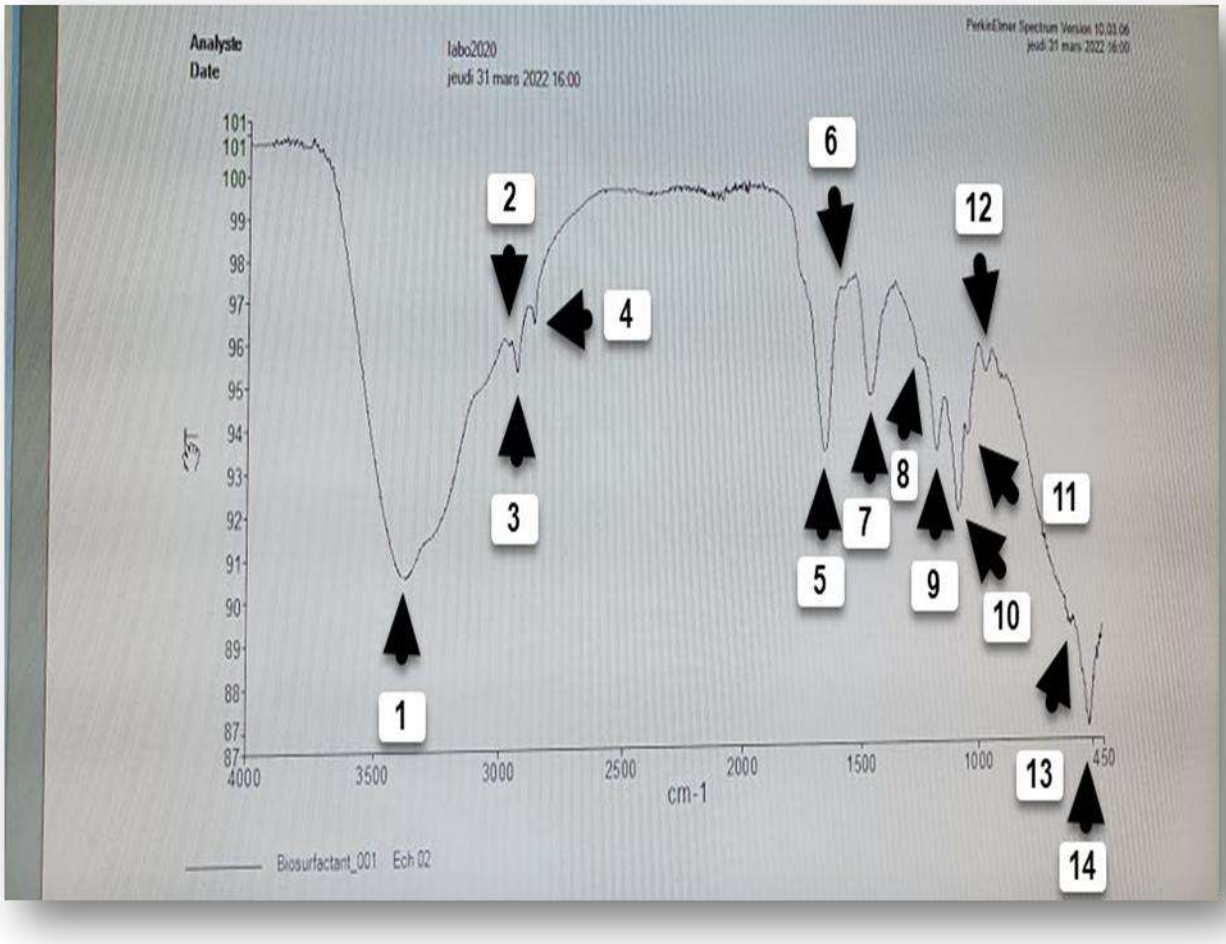


Figure IV.3 : Spectres d'absorption FTIR de l'extrait organique de substances actives de surface de la souche *SDK644*

1: 3400 cm-1	**2**: 2920 cm-1	**3:** 2970 cm-1	**4**: 2850 cm-1
5: 1745 cm-1	**6**: 1643 cm-1	**7:** 1403 cm-1	**8**: 1455 cm-1
9: 1374 cm-1	**10**: 1264cm-1	**11**: 1044 cm-1	**12**: 950cm-1
	13: 505cm-1	**14**: 455 cm-1	

L'analyse qualitative par spectres d'absorption FTIR de l'extrait organique de substances actives de surface de la souche SDK644 donné en Figure **IV.3** a montré les bandes suivantes :

-Les bandes les plus importantes se situaient entre 404 et 3423 cm-1

-À 3400 cm-1 qui indique la présence d'une liaison O-H liée (liaison hydrogène), à 2850 cm-1 ; Caractérisant la présence des liaisons C-H à 1643 cm-1 qui indique la présence de C=0 (cétone). --À 1374 cm -1 liaison C-N (amide)

- À 1455 cm-1 liaison O-H (des acides carboxyliques). Les pics de 1264 à 1044 cm-1 indiquent la présence des liaisons C-O et C-0-C, ce qui affirme la présence d'hydrates de carbone (Lee et al. 2018).

- À 1403.67 cm-1 Groupes C-N amide (Pele et al. 2019). Le spectre infrarouge du biosurfactant a suggéré la présence des monomeres polysaccharidiques et le groupe amide des protéines. Ainsi, nous avons fortement suggéré que le composé est de nature glycoprotéique. Ces résultats sont en corrélation avec ceux rapportés par Pele et al. (2010). En effet, les mêmes auteurs ont obtenu le même spectre infrarouge pour le biosurfactant produit par Rhinos arrhizus les résultats obtenus la nature glycoprotéique a été fortement suggéré par la CMC et l'estimation

IV.1.4.3. Caractérisation structurale par chromatographie liquide à haute performance (HPLC):

L’analyse Limite de détection (LOD) :

-La limite de détection (LOD) maximal du biosurfactant est trouvée à la zone 703367.99 UV. Sec de la hauteur de 48315.42 UV de 38.90 % dans le temps de 2.890 min; Comme le pique le plus élevé.

-La limite de détection (LOD) minimal du biosurfactant s’est trouvée à la zone 9911.55 UV. Sec de la hauteur de 521.96 UV de 0.55 % dans le temps de 41.742min

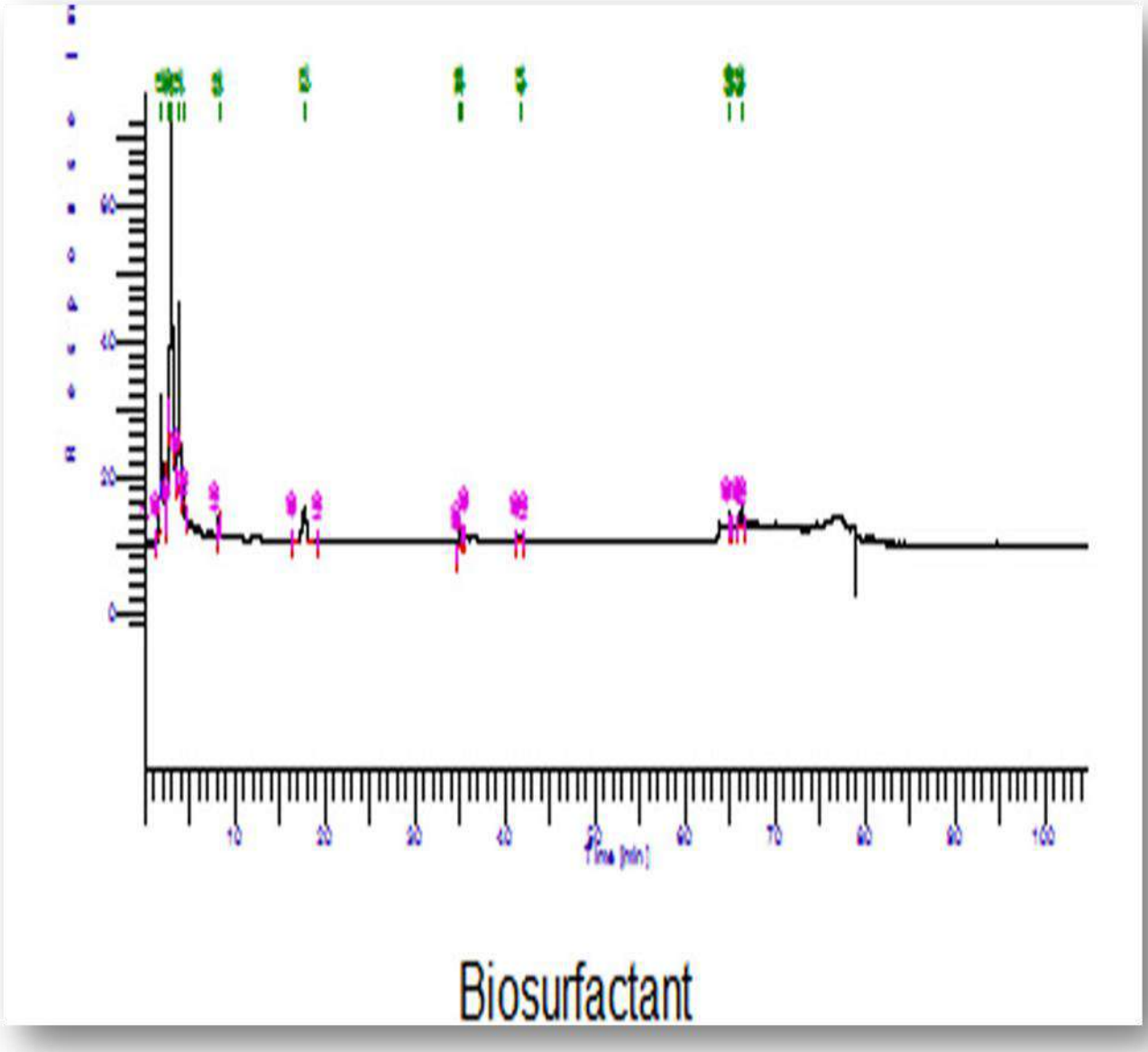


Figure IV.4: HPLC de biosurfactant

.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableaux IV.5 : les résultats obtenus dans l'analyse d'HPLC

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [uV*sec]	Height [uV]	Area [%]	Norm. [%]
1		1,732	394292,84	20107,52	21,80	21,80
2		2,595	40209,82	7535,84	2,22	2,22
3		2,890	703367,99	48315,42	38,90	38,90
4		3,782	334553,06	27412,97	18,50	18,50
5		4,193	39329,02	3376,74	2,17	2,17
6		8,227	28793,26	2479,86	1,59	1,59
7		17,725	162587,25	5312,78	8,99	8,99
8		34,843	34605,40	2850,45	1,91	1,91
9		35,305	8774,09	806,91	0,49	0,49
10		41,742	9911,55	521,96	0,55	0,55
11		64,995	17939,46	2578,25	0,99	0,99
12		66,263	33965,00	2662,49	1,88	1,88
			1808328,73	123961,20	100,00	100,00

On note aussi qu'il y a 12 piques de hauteurs différentes avec temps maximal de 66.263 min de la hauteur de 2662.49 UV et de 1.88 %.

La présence des pics supplémentaires dans le chromatogramme indique que la biomolécule *SDK644* contient plusieurs composants.

Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons obtenu à l'analyse précédents de l'infrarouge (**FTIR**), et la méthode de biuret à savoir la présence des liaisons amide des protéines et des acides carboxyliques et d'hydrates de carbone ,puis des liaison hydrogènes .

IV.2.1. La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer:

La méthode de précipitation dans le domaine de synthèse des nanoparticules de magnétite s'identifie à une réaction de coprécipitation ; C'est la méthode qui a attiré notre attention, et qui a été retenue dans notre travail pour l'élaboration des particules de magnétite. Cela été détaillé précédemment dans le chapitre **III**.

Le chlorure ferrique et le sulfate ferreux ont été mélangés. Les solutions de $\mathbf{Fe^{2+}}$ et $\mathbf{Fe^{3+}}$ ont été préparées ; en faisant leurs solutions aqueuses dans de l'eau distillée et cette solution contenant les deux ions, la solution a été précipitée par une solution d'hydroxyde

d'ammonium **NH_3O_4** et de l'agent stabilisant (**$N(CH_3)_4OH$** ou bien le **BS**) sous agitation continue sur l'agitateur aérien à 600trs/30min à 25°C.

On remarque une apparition des fines particules dispersé dans les deux solutions préparées. Un précipité de couleur noire est rapidement formé.

(Figure IV.5)

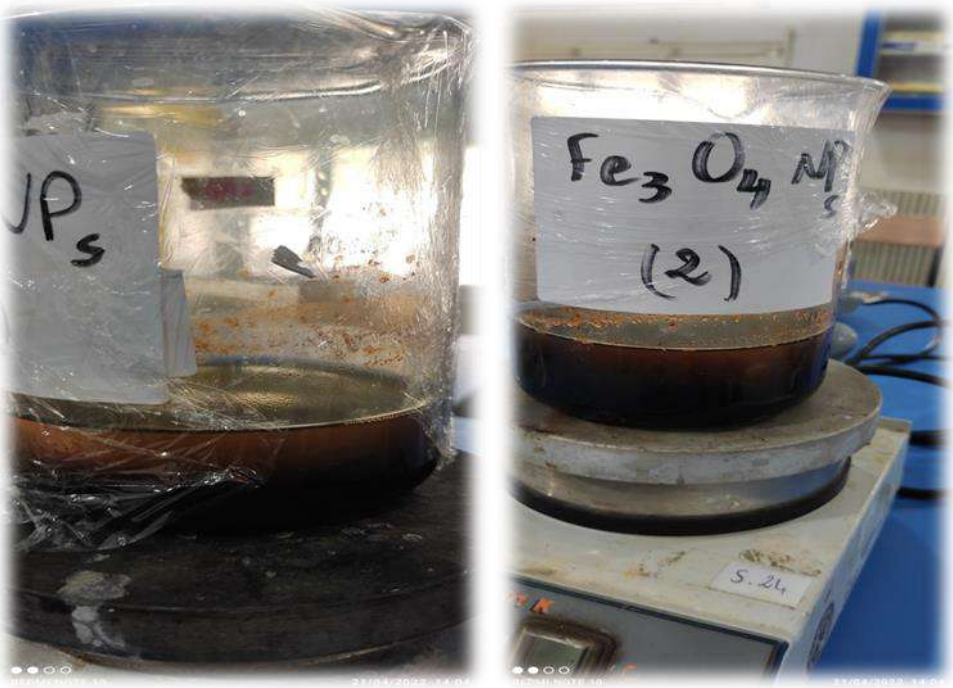


Figure IV.5: Solution Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ;Solution de Fe_3O_4 NPs par BS (2)

Les Particules d'oxyde de fer **Fe_3O_4** de couleur noire ont été précipitées. Ces particules ont ensuite été séparées de la solution à l'aide d'un aimant puissant(Agitateur magnétique), puis ont été lavés trois fois à l'eau distillée.**(Figure IV.6)**

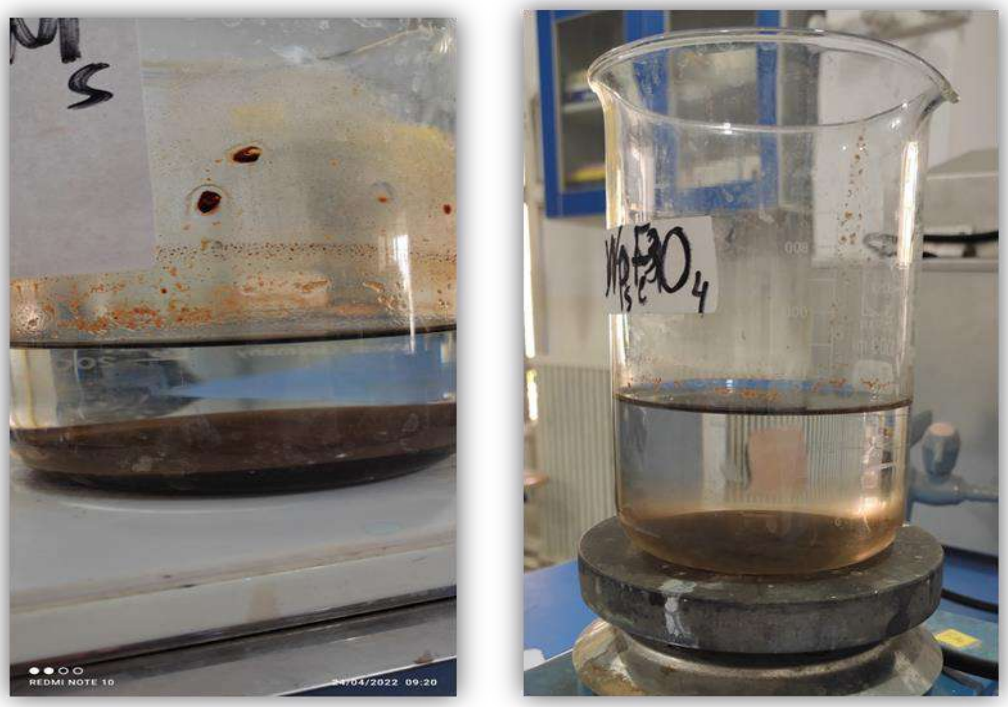


Figure IV.6: Le précipite de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ;Le précipite de Fe_3O_4 NPs par BS (2)

Le précipité de la magnétite de couleur noire était filtrée et sécher au four à air chaud à **70ºC** pendant **24** heures. On obtenue deux poudres noires mates du même rendement 1.91g de nanoparticules de magnétite. **(Figure IV.7)**



Figure IV.7: La poudre de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ; La poudre de Fe_3O_4 NPs par BS (2)

IV.2.2. Les caractérisations des nanoparticules:

IV.2.2.1. Propriétés magnétiques:

Pour étudier les propriétés magnétiques, les nanoparticules synthétisées ont été placées à côté d'un aimant comme le montre la figure suivante : **(Figure IV.8)**.

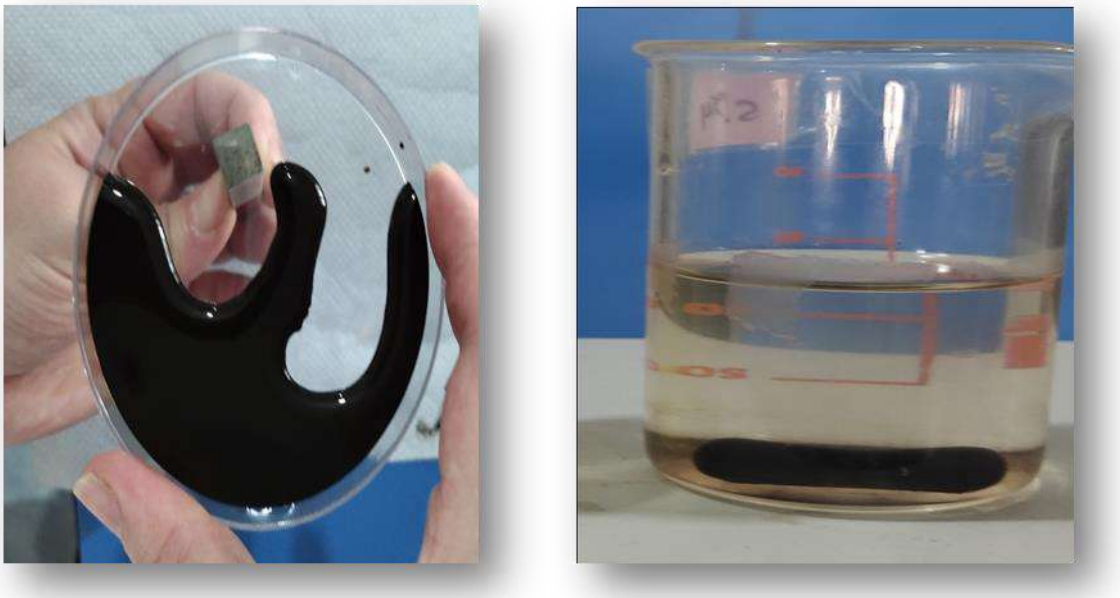


Figure IV.8: Fe_3O_4 NPs placées à coté d'un aimant (a) ;
Fe_3O_4 NPs placées à coté d'un barreau magnétique (b).

On peut se rendre compte que les **Fe_3O_4** nanoparticules produites ont affiché leurs propriétés magnétiques lorsqu'il est exposé au champ magnétique. Ce test préliminaire a prouvé que les particules synthétisées ont démontré les propriétés magnétiques.

Ensuite, ce test a été répété sous les poudres des nanoparticules obtenues. **(Figure IV.9)**.

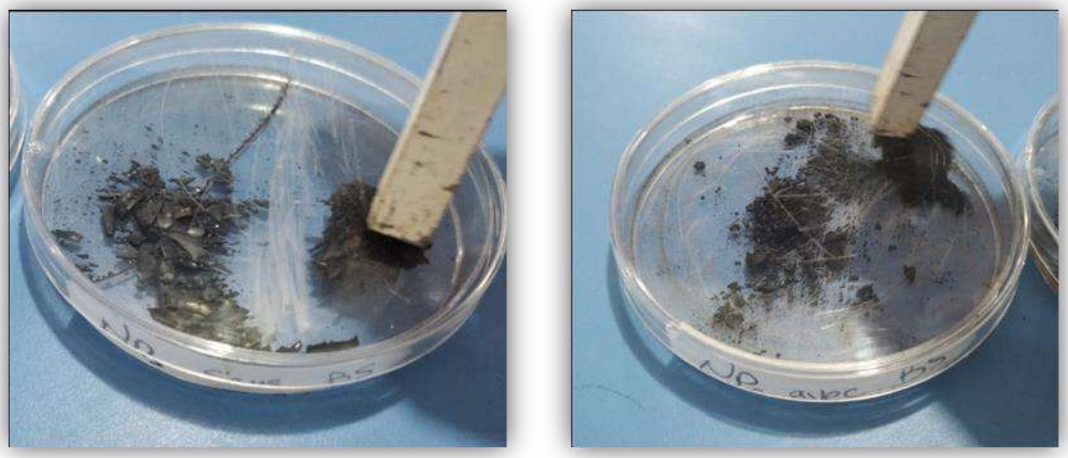


Figure IV.9: La poudre de Fe_3O_4 NPs par TMAH (1) ;

La poudre de Fe_3O_4 NPs par BS (2)

Le mouvement de masse des particules moyennes est très rapide. En secondes, presque toutes les particules déplacé vers l'aimant tel qu'observé à l'œil nu.

IV.2.2.2. la microscopie à force atomique :

Les images **AFM** topographiques nous indiquent la morphologie de la surface étudiée à une échelle nanométrique. Pour caractériser nos surfaces d'oxyde de fer nous pouvons mesurer la hauteur de marche des terrasses sur un profil. Le but de cette partie est de présenter une analyse statistique de la morphologie.

Une image de 50 µm x 50 µm de nanoparticules affichée sous forme de projection tridimensionnelle. Ces nanoparticules sont de hauteur maximale de 5.8 µm présenté dans la figure ci-dessous

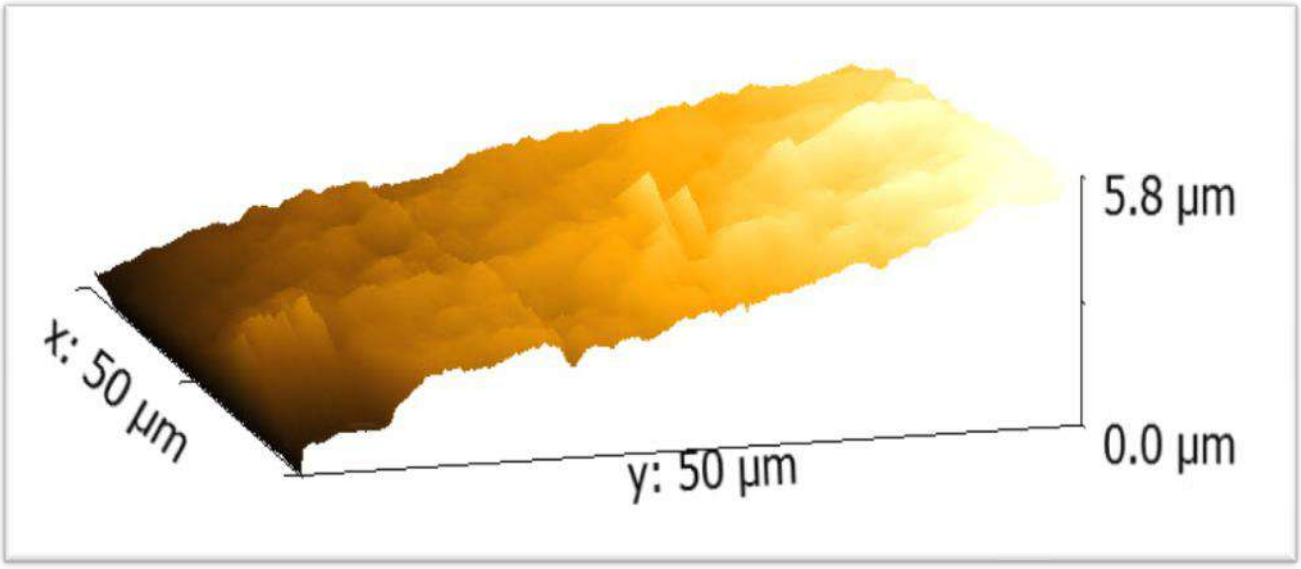


Figure IV.10 : Topographie AFM 3D de Fe_3O_4 NPs par TMAH

IV.2.2.3. Le microscope optique:

La figure **IV.11** présente une des images obtenues au microscope pour une échelle de 10 µm. Nous pouvons voir que les nanoparticules sont de forme circulaire pour la plupart, de gris à noir : lorsqu'elles sont plus sombres, cela correspond au fait qu'il y a un empilement des nanoparticules, et donc un épaississement de l'échantillon.

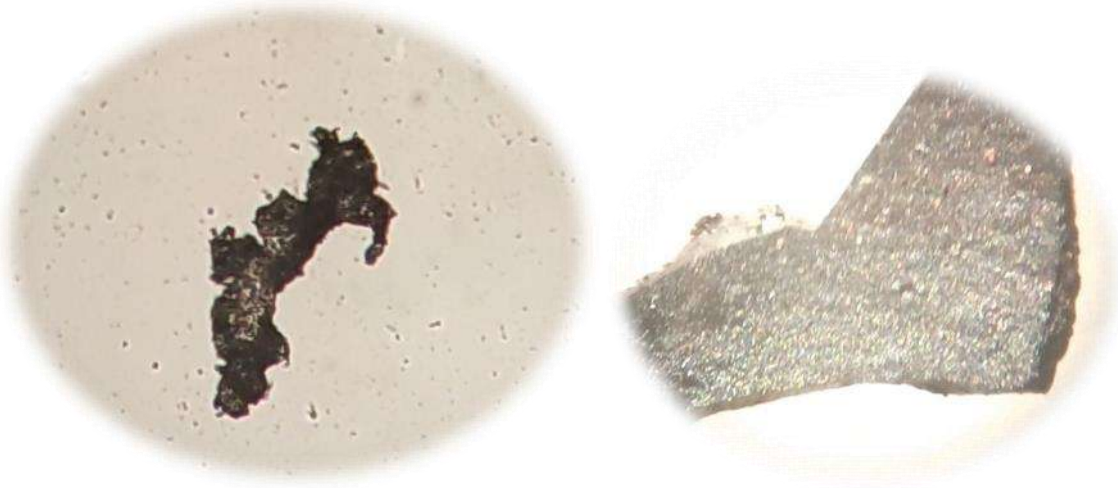


Figure IV.11 : Observation au microscope optique (10 µm) de l'échantillon de Fe_3O_4 NPs par le BS

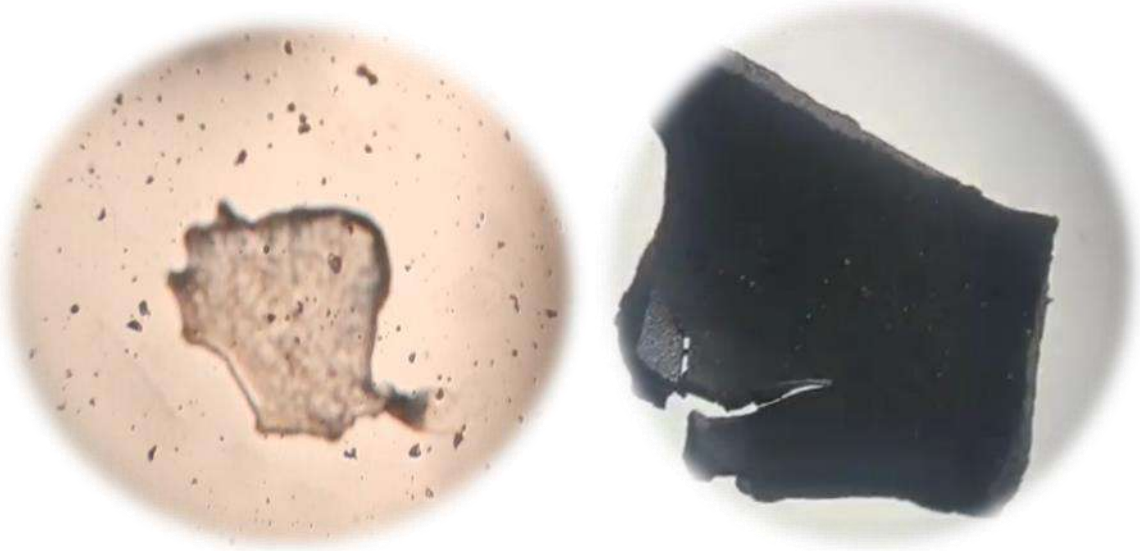


Figure IV.12 : Observation au microscope optique (10 µm) de l'échantillon de Fe_3O_4 NPs par le TMAH

Conclusion générale

Cette étude a été consacrée à l'élaboration de nanoparticules de magnétite **Fe_3O_4** par un procédé de Co- précipitation. La stabilité des nanoparticules obtenues à été confirmé par un agent stabilisant biologique un biosurfactant qui a été produire par une souche bactérienne, une source de carbone et d'azote.

Dans un premier temps, une production de biosurfactant été réalisé dans laboratoire de hall technologie par la souche bactérienne ***marinobacter SDK644***, cette souche a montré sa capacité d'utiliser l'huile d'olive en aérobiose comme la seule source de carbone et d'énergie pour produire une biomolécule de type biosurfactant avec un rendement de l'ordre de 13g/l ce qui nous permet de passer à l'échelle industrielle. Cette biomolécule est caractérisée par des propriétés tensioactives intéressantes tels que un bon résultat a été approuvé et traduit par un halo de **DDP** de **8,3** cm et une tension de surface réduite jusqu'à **28** $mN.m^{-1}$ avec une concentration micellaire critique **CMC 0.85** g/L.

Les analyses spectrométriques par **FTIR** et la méthode de biuret montrent que le biosurfactant appartient aux glycolipides avec une concentration de **7.2** g/L en protéine, il présente une activité antimicrobienne intéressante contre certains microorganismes pathogènes. En outre l'analyse de chromatographie liquide à haute performance (**HPLC**) donne un bon résultat représenté par La présence des pics supplémentaires dans le chromatogramme indique que la biomolécule ***SDK644*** contient plusieurs composants.

Après la production de biosurfactant on passe à la deuxième partie la synthèse des nanoparticules de magnétite **Fe_3O_4** stabilisé par un agent stabilisateur. Dans notre travail, deux types d'expériences sont réalisés pour comparer les influences des différents agents stabilisateurs utilisés: Une base organique (hydroxyde de tétraméthylammonium) **$N(CH_3)_4OH$** est utilisée comme agent de précipitation et aussi comme agent stabilisateur et un tensioactif biologique (biosurfactant) que nous avons produire.

Par conséquent, la stabilisation des NP de magnétite est nécessaire pour améliorer leur stabilité de dispersion dans les milieux réactionnels.

La stabilité de la dispersion des nanofluides préparés dans différentes agents stabilisants est étudiée par les techniques sont également utilisées pour

la caractérisation morphologique de particules organiques, et plus particulièrement des nanoparticules magnétite, telles la microscopie à force atomique (**AFM**), le microscope optique et les propriétés magnétique. Les résultats montrent qu'avec la présence de l'agent de **TMAH** ou le biosurfactant, la stabilité du nanofluide noir d'oxyde de fer est améliorée. Les influences du tensioactif sur la stabilité des nanofluides respectent la théorie de l'adsorption monocouche ou la théorie de l'adsorption électrique à double couche.

Enfin, les agents stabilisants ou les surfactants nécessaires à la préparation de nanofluides sont calculées en simplifiant les modèles de dispersion et les résultats sont conformes aux résultats expérimentaux.

Références bibliographiques

[1]: Gerd Binnig, H.R., *The scanning tunneling microscope*. Scientific American, 1985. 253(2): p.50—56.

[2]: U.S.Choi.Enhancing thermal conductivity of fluids with nanoparticles, Developments and applications o non-Newtonian flows, FED, 231:99-105, 1995.12.
[3]: Li Y., Zhou J., Tung S., Schneider E., Xi S., A review on development of nanofluid Preparation and characterization, Powder Technology, 196 (2009), 89-101.
[4]: Bang I. C., Chang S. H., boiling heat transfert performance and phenomena of Al2O3-Water nanofluids from a plan surface in a pool, International Journal of heat and Mass Transfer, 48 (2005), 2407-2419.
[5]: http://www.cooling-masters.com/articles-46-1.html
[6]: Galdaneo, S. (2001). "Influence des conditions de broyage sur la distribution de nanoparticules magnétiques (Fe,Co) dans une matrice de cuivre." Thèse de l'Université Paris 7.

[7]: Wei Li. Elaboration par un procédé de précipitation de nanoparticules aux propriétés contrôlées: application à la magnétite. Autre Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. P73

[8]: Wang, H.; Nakamura, H.; Yao, Y.; Maeda, H.; Abe, E.Chem. Lett. 2001, 1, 1168.
[9]: Helmi Rashid Farimani, M.; Shahtahmasebi, N.; Rezaee Roknabadi, M.; Ghowsc, N.; Kazemi, A. Physica E 2013,53, 207–216.
[10] : Mme YATAGHENE née OUALI AZIZA ; Production de Biosurfactants par *Pseudomonas sp*.Application à la Bioremédiation des milieux pollués par les Hydrocarbures ; Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene à 2009

[11]: AFSSET, 2006. Les nanomatériaux: effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement, Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, Juillet 2006, Paris, 248 p.

[12]: Amandine Andrieux - Ledier. Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métalloorganiques: contrôle de taille, stabilité, organisation et

propriétés physiques. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français.
[13]: Brust, M., Walker, M., et al. (1994). "Synthesis of thiol-derivatized gold Nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system." Journal of the Chemical Society Chemical Communications" (7).
[14] : Kanninen, P., Johans, C., et al. (2008). "Influence of lagan structure on the stability and oxidation of copper nanoparticles." Journal of Colloid and Interface Science 318(1): 88-95.
[15] : Wikander, K., Petit, C., et al. (2006). "Size control and growth Process of alkylamine-stabilized platinum nanocrystals: A comparison between the phase transfer and reverse micelles methods." Langmuir 22(10).
[16]: Demortiere, A. and Petit, C. (2007). "First synthesis by liquidliquid Phase transfer of magnetic CoxPt100-x nanoalloys." Langmuir 23(16).
[17] : Yang, J., Lee, J. Y., et al. (2011). "Phase transfer and its applications in Nanotechnology." Chemical Society Reviews 40" (3).
[18] : Petit, C., Rusponi, S., et al. (2004). "Magnetic properties of cobalt and Cobalt-platinum nanocrystals investigated by magneto-optical Kerr effect." Journal of Applied Physics 95(8).
[19]: Lopez-Quintela, M. A., Tojo, C., et al. (2004)."Microemulsion dynamics and reactions in microemulsions." Current Opinion in Colloid & Interface Science 9(3-4).
[20] : Courty, A., Mermet, A., et al. (2005). "Vibrational coherence of selforganized silver nanocrystals in f.c.c. supra-crystals." Nature Materials 4(5): 395-398.
[21]: Chaudret, B. (2005). "Organometallic approach to nanoparticles synthesis and self-organization." Comptes Rendus Physique 6(1): 117-131.
[22]: Philippot, K. and Chaudret, B. (2003). "Organometallic approach to The synthesis and surface reactivity of noble metal nanoparticles." Comptes Rendus Chimie 6(8-10): 1019-1034.
[23] : Garcia-Barrasa, J., Lopez-de-Luzuriaga, J. M., et al. (2011). "Synthesis of thiolate-protected silver nanocrystal superlattices from an organometallic precursor and formation of molecular di-n-alkyldisulfide lamellar phases." Journal of Nanoparticle Research 13(2): 791-801.
[24]: Shao, H. H., Y.; Lee, H.; Suh, Y.J.; Kim C. (2006). "Effect of surfactants on the size and shape of cobalt nanoparticles synthesized by thermal decomposition." Journal of Applied Physics 99(08N702).

[25]: Hambrock, J., Becker, R., et al. (2002). "A non-aqueous organometallic route to highly monodispersed copper nanoparticles using Cu (OCH (Me) CH_2NMe_2) (2)." Chemical Communications (1).

[26] : Nakamoto, M., Yamamoto, M., et al. (2002). "Thermolysis of gold (I) thiolate complexes producing novel gold nanoparticles passivity by alkyl groups." Chemical Communications (15).

[27] : Navaladian, S., Viswanathan, B., et al. (2007). "Thermal decomposition as route for silver nanoparticles." Nanoscale Research Letters 2(1).

[28]: Pillai, Z. S. and Kamat, P. V. (2004). "What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method?" Journal of Physical Chemistry B 108(3).

[29] : Zheng, N., Fan, J., et al. (2006). "One-step one-phase synthesis of monodisperse noble-metallic nanoparticles and their colloidal crystals." Journal of the American Chemical Society 128(20): 6550-6551.

[30]: Goubet, N. and Pileni, M. P. (2011). "Analogy Between Atoms in a Nanocrystal and Nanocrystals in a Supracrystal: Is It Real or Just a Highly Probable Speculation?" Journal of Physical Chemistry Letters 2(9): 1024-1031.

[31]: Tang, Y. and Ouyang, M. (2007). "Tailoring properties and functionalities of metal nanoparticles through crystallinity engineering." Nature Materials 6(10): 754-759.

[32]: Sanchez-Peinado et al, 2010 Sanchez-Peinado, M. D. M., et al., (2010). Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of *Alphaproteobacteria, Actinobacteria*, and *Acidobacteria* communities in a soil microcosm. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int., 17*, 779–790.

[33]: Kiran, S. G., et al, (2010). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA 13 in solid-state culture. *Bioresour. Technol., 101*, 2389–2396.

[34]: Saikia, J. P., et al, (2013). Possible protection of silver nanoparticles against salt by using rhamnolipid. *Colloids Surf. B. Biointerfaces, 104*, 330–332.

[35]: Konwarh, R., (2010). Magnetically recyclable, antimicrobial, and catalytically enhanced polymer-assisted “green” nanosystem-immobilized *Aspergillus Niger* amyloglucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol, 87*, 1983–1992.

[36] : Wu D., Zhu H., Wang L., Liua L., Critical issues in nanofluids preparation, characterization and thermal conductivity, Curr. Nanosci. 5 (2009) 103–112.

[37] : Teissier A., Synthèse de matériaux à base de pentoxyde de niobium et de nanotubes de carbone pour la limitation optique dans l’infrarouge, Thèse Doctorat, Université de Strasbourg (2009).

[38] : Etarajan E., Sathish R., Role of nanofluids in solar water heater international journal of advanced manufacturing technology, 2009.

[39]: D. Murugesapillai *et al*, DNA bridging and looping by HMO1 provides a mechanism for stabilizing nucleosome-free chromatin [archive], Nucl Acids Res (2014) 42 (14): 8996-9004

[40] : Schneider T, Jannson A, Jensen KA, Kristjansson V, Luotamo M, Nygren O, Savolainen K, Skaug V, Thomassen Y, Tossavainen A, Tuomi T, Wallin H, 2007. Evaluation and control of occupational health risks from nanoparticles, Nordic Council of Ministers, Copenhagen, TemaNord, 2007: 581, 96 p.

[41]: AFSSET, 2006. Les nanomatériaux: effets sur la santé de l’homme et sur l’environnement, Agence française de sécurité sanitaire de l’environnement et du travail, Juillet 2006, Paris, 248 p.

[42] : IRSST Catherine Woods et Brigitte Soucy, Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST 2e éditionIRSST/Université de Montréal. Mai 2010.p17

[43]: Salma Halelfadl. Caractérisation des propriétés thermo-physiques et d’échanges de chaleur des nanofluides à base de nanotubes de carbone. Génie mécanique [physics.class-ph]. INSA de Rennes, 2014.

[44]: I M. Banat á R. S. Makkar á S.S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Apple Microbial Biotechnol (2000) 53: 495=508.

[45]: Desai, J. D., and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and the commercial potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:47-64.

[46]: Fakruddin Md. 2012.Biosurfactant: Production and Application. J Pet Environ Biotechnol, 3:4, DOI: 10.4172/2157-7463.1000124.

[47]: Dorra HENTATI. 2018. Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production de biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de MONTPELLIER.

[48]: MAYOT. E. 2007. « Monobactames et triazoles fluorocarbures amphiphiles: vers des systèmes cat anioniques a propriétés Multiples ». Université Henri Poincaré.

[49]: OTHMANI HADJIRA. 2012. Propriétés physico-chimique d'un système micellaire mixte tensioactif non ionique fluore/cationique.

[50]: BENHAMZA Med EL HOCINE. Intitulé Nouvelles formulations pour peintures, resins et adjuvants a base de tensioactifs biodégradables.

[51]: MAMERI YAZID. 2010. Phototransformation de tensioactif anionique induite par un oxyhydroxyde de fer (iii) (goethite) en solution aqueuse. Université mentouri-Constantine.

[52]: SEFROU ZEYNEB. 2012. Etude de la formulation d'emultion dans l'extraction du plomb (II) per membrane liquide.

[53]: RONDELE CAROLINE. 2009. L'université de Toulouse France.

[54] : Kamel EDDOUAOUDA.2012. Etude du potentiel biodégradât de souches isolées du sol de hassi messaoud contamine par du pétrole: criblage, biodégradation de hap et production de biosurfactant. Université SAAD DAHLAB de BLIDA.

[55]: Rupshikha Patowary & Kaustuvmani Patowary & Mohan Chandra Kalita & Suresh Deka1.2016. Utilization of Paneer Whey Waste for Cost-Effective Production of Rhamnolipides Biosurfactant. Appl Biochem Biotechnol (2016) 180:383–399.DOI 10.1007/s12010-0162105-9.

[56]: Sandra Hewald, Katharina Josephs, and Michael Bolker. 2005. Genetic Analysis of Biosurfactant

[57]: Danyelle Khadydja F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna, Valdemir A. Santos and Leonie A. Sarubbo 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences. 17, 401; doi: 10.3390/ijms 17030401.

[58] : Eric DÉZIEL 1996 Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

[59]: Maneerat, S. 2005.Biosurfactants from marine microorganisms. Journal of Science Technology. 27(6): 1263-1272 Song klana karin

[60]: KK Gautam and V.K Tyagi. 2006. Microbial Surfactants, journal of oleo science, Vol. 55, No. 4, 155-166.*Torulopsis*

[61]: Cooper, D.G.; Paddock D.A. 1984. Production of a biosurfactant from bombicola Appl. Environ. Microbiol. 47, 173-176.

[62]: Kang, S.W.; Kim, YB; Shin, J.D.; Kim E.K. 2010. "Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipidl, Appl. Biochem Biotechnol Journal, V.160, 780–790.

[63]: Singh, P., Patil, Y., Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. Journal of Applied Microbiology, 1, 12

[64]: Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. Intemational Journal of Molecular Sciences, 17(3), 401.

[65] : Humberto Bezerra de Souza Sobrinho, Juliana Moura de Luna, Raquel Diniz Rufino, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Léonie Asfora Sarubbo. 2013. Evaluation de la toxicité d'un biosurfactant issu de Candida sphaerica UCP 0995 cultivé avec des résidus industriels dans un bioréacteur Journal électronique de biotechnologie, 0717-3458. DOI: 10.2225 /vol16issue 4-fulltext-4

[66]: Juliana M. Lunaa, Raquel D. Rufinoa, Leonie A. Sarubboa, Galba Maria CamposTakakia. 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 (2013) 202-209.

[67]: Khamili Souad 2008. Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelque champ pétrolier du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites.

[68]: Deepansh Sharma, Baljeet Singh Saharan Nikhil Chauhan. Anshul Bansal, and Suresh Procha. 2014. Production and Structural Characterization of Lactobacillus helveticus Derived Biosurfactan. The Scientific World Journal, 493548.

[69]: Marchant ET Banat, 2012. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants.

[70]: (Salihu et al. 2009) Prevalence of Campylobacter species in apparently healthy goats in Sokoto state

[71]: Padmapriya et al. 2013. Prevalence and patterns of physical activity among medical students in Bangalore, India

[72]: Phetrong, 2007 Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant

[73] : Muthusamy et al. 2008 Biosurfactants: Properties, commercial production and application

[74] : Mouffok et al. 2016 Cinétique de production de biosurfactant(s) par une souche de Pseudomonas cultivée sur milieux empiriques et évaluation de deux effets : antimicrobien et stimulateur de croissance.

[75] : Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied microbiology and biotechnology, 53(5), 495-508.

[76]: Markets and Markets, 2016. https://www.marketsandmarkets.com/Market-

Reports/biosurfactants-market-493.html. Accessed March 8, 2018
[77]: Grand View Research,
2015. https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/ biosurfactants-industry. Accessed March 8, 2018.
[78]: Global Market Insights, 2018. https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactantsmarket-
report. Accessed March 8, 2018

[79]: Rodrigues et al, 2006 New Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) leaves as partial replacement for soya bean meal in sugar cane juice diets for growing pigs. Livest. Res. Rural Dev., 18

[80]: Pattanathu et al. 2008 Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review

[81]: Sobrinho et al., 2013 Journal of Medicinal Plants Research A review on antimicrobial potential of species of the genus Vernonia (Asteraceae).

[82] : Pacwa–Plociniczak et al. 2011 Environmental applications of biosurfactants: recent advances.

[83] : Das et al. 2008 sigmas chemicals.

[84] : Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine - Académie de Rouen

[85] : (Hellal, 2014) Caractéristiques économiques de la Population en 2014.
[86]: Malviya, Rishabha & Bansal, Vvipin & Pal, Om & Sharma, Pramod. (2010). High-performance liquid chromatography: A short review. Journal of Global Pharma Technology. 2. 22-26.
[87]: www.perrin33.com>genie-ferment.

[88]: www.e-sante.Futura-science.com

[89]: Morikawa M, Daido H. Takao T, Satoru M, Shimonishi Y. Imanaka T. 2000.Anew lipopeptide biosurfactants produced by arthrobactersp.strain MIS38.journal of bacteriology vol,175.p:6459-6466.

[90]: Sorkhoh, N. A., Ghannoum, M. A., Ibrahim, A. S., Stretton, R. J., Radwan, S. S., —Crude Oil and Hydrocarbon-Degrading Strains of Rhodococcusrhodochrous Isolated from Soil Kuwaitl, Marine Environments in Pollution Journal, V. 65, (1990), 1-17.

[91]: Amodu et al. (2014). Biosurfactants & emulsions, BioResources 9(2), 3508-3525.

[92]: Gomall .1949. J.Biol. Chem: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction

[93]: Droguet. Sebastien.l-monsite. comparaison-méthode de dosage des protéines dans de milieux.

[94]: Pereira, 2013 ; Yalaoui-Guellal et al. 2017: Techniques de criblage des bactéries productrices

[95]: Pruthi.V et Cameotra S.S ,1995. Rapid method for monitoring maximum biosurfactant

[97]: Pereira et al 2013: Factores relacionados con el cumplimiento del tratamiento en pacientes con tuberculosis, Pereira, Colombia, 2012-2013

[98]: Yalaoui-Guellal, 2017: Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria

[99]: Shim adzu (LC-10ATv p Avec un détecteur UV ou SPD -10Avp, Japon

[100] : Chu, M.; Shao, Y.; Peng, J.; Dai, X.; Li, H.; Wu, Q.; Shi, D.Biomatériaux 2013, 34, 4078.

[101]: Xiao, L.; et al. ACS Nano 2011, 5, 6315–6324.

[102]: Ataie, Kazemzadeh, H.; Nikkhah-Moshaie, R.; Ahmed, F.-M. IEEE Trans.Magn. 2009, 45.

[103]: ElGhandoor, H.; Zidan, H.-M., Khalil Mustafa, M. H.; Ismail, M.-I.-M. Int. J. Electrochemist. Sci. 2012, 7, 5734.

[104]: Koo *et al. / Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences Vol. 5, No. 1 (2019) 23-31*

[105]: Wei Li. Elaboration par un procédé de précipitation de nanoparticules aux propriétés contrôlées: application à la magnétite. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. P73.

[106]: Helmi Rashid Farimani, M.; Shahtahmasebi, N.; Rezaee Roknabadi, M.; Ghowsc, N.; Kazemi, A. Physica E 2013,53, 207–216.
[107]: Zhang Xiaoyan , Wang Yin , Zhang Yafei ;Préparation et application de nanoparticules magnétiques « Matériaux et dispositifs magnétiques » Citations : 252 - 2004

Annexes

1. Principe du dosage des protéines par la méthode du biuret :

Cette méthode consiste à doser la quantité de liaisons peptidiques. Le biuret (formule H_2N-CO-NH-CO-NH_2, soit deux molécules d'urée) donne avec les ions cuivriques Cu^{2+} et en milieu alcalin un complexe absorbant fortement à 540 nm (coloration bleue violette due à la formation du complexe Cu^{2+}-biuret).
La liaison peptidique établie entre deux acides aminés est également capable, dans les mêmes conditions expérimentales, de former un complexe avec les ions cuivriques.
Ce complexe peut être dosé par spectrophotométrie d'absorption à 540 nm.

On réalise une gamme étalon à partir d'un standard de concentration connue ; la mesure de la concentration protéique de l'échantillon est déterminée par comparaison avec cette gamme étalon.

Le dosage par la méthode du biuret est réalisé grâce au réactif de Gornall, qui contient :
-du sulfate de cuivre : source d'ions Cu^{2+} ;
-de l'hydroxyde de sodium NaOH permettant l'alcalinisation du milieu ;
-de l'iodure de potassium qui évite la réduction (gain d'électron) du cuivre en Cu^{+} ;
-du tartrate de sodium ou de potassium qui forme avec les ions Cu^{2+} un complexe, ce qui empêche leur précipitation sous forme de di hydroxyde de cuivre $Cu(OH)_2$ à pH alcalin.

L'échantillon à doser est incubé en présence du réactif de Gornall pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance à 540 nm est alors déterminée à l'aide de cuves spectrophotométriques en plastique.

Réactifs

- Solution de réactif de Gornall présenté en distributeur automatique.
- Solution étalon de protéine (gélatine) notée: $\rho_{\text{(gélatine; sol. étalon)}} = 15\ g.L^{-1}$.
- Gélatine protéinée à doser pré diluée au $1/10^{ème}$ notée BP10.
- Diluents (eau distillée).

Réalisation du spectre d'absorption du complexe [Cu^{2+} - liaison peptidique] :

-Introduire 2 ml de solution gélatine et 4 ml de réactif de Gornall dans un tube à essai.

-Parafilmé. Bien homogénéiser pour obtenir une solution homogène.

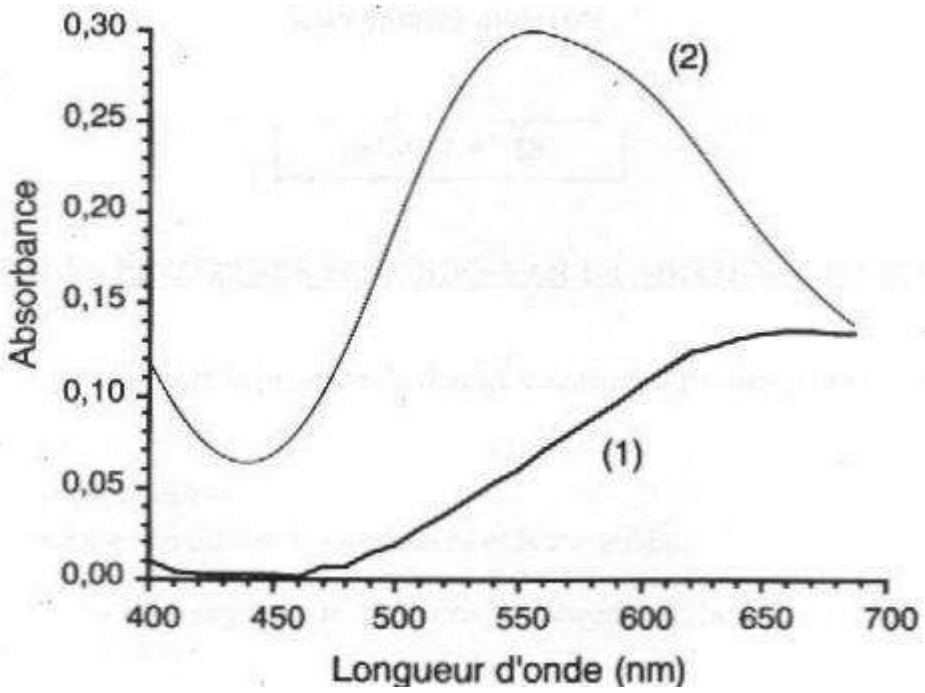
-Attendre 30 minutes à l'obscurité.

-Ajuster à zéro contre de l'eau distillée.

-Mesurer l'absorbance entre 400 nm et 800 nm par pas de 10 nm.

Spectre d'absorption du complexe protéine-Cu^{2+} (courbe 2)

Spectre d'absorption du Gornall seul (courbe 1)



En déduire la concentration en protéines dans la gélatine protéinée non dilué de la gamme d'étalonnage et des dosages

- la droite d'étalonnage est de type **: y = a. x + b**
  - on connait la valeur **« y »** de l'essai : l'absorbance**.**
  - **« a »** désigne le coefficient directeur.
  - **« b »** désigne l'ordonnée à l'origine.

Avantages: Cette technique de dosage des protéines a certains avantages dont la rapidité et la fiabilité pour les solutions concentrées. Elle permet d'avoir une absorption égale pour toutes les protéines.

II. Liste des milieux de culture et souches :

code	Désignation	masse
ATCC 9763	Saccharomyces cerevisiae	01flacon
ATCC 16404	Aspergillus Brasiliensis	02coffres
ATCC 14028	Salmonella Typhimuriem	02coffres
ATCC 6538	Staphylococcus aureus	02coffres
ATCC 10231	Candida albicans	02coffres
ATCC 8739	Escherichia coli	02coffres
ATCC 6633	Bacillus subtilis	02 flacons
ATCC 14028	Salmonella Typhimurium	02 flacons
ATCC 12228	Staphylococcus epidermidis	02 flacons
ATCC 9027	Pseudomonas aeruginosa	02 flacons