
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent



Faculté des Sciences
Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Microbiologie appliqué

Présenté par :
SLIMANI Ahlem
TALEB Nadia

Isolement des Souches Productrices des Biosurfactants

Encadrant :
M. CHERIF Nadjib
MCB à C.U.B.B.A.T.
Soutenu en 2018

Devant le jury composé de :

Président : M. ZIANE Mohammed (M.C.A)	C.U.B.B.A.T.
Examineurs : M. BENNABI Farid (M.C.B)	C.U.B.B.A.T.
Encadrant : M. CHERIF Nadjib (M.C.B)	C.U.B.B.A.T.

« Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise que les esprits préparés »

Louis Pasteur

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes parents

A mes frères

Et à une amie très chère

Nadia TALEB

Je dédie ce travail

A ma mère

A mon père

A mon frère

A ma petite sœur

Et à ma meilleure amie

SLIMANI Ahlem

Remerciements

Tout d'abord louange à dieu qui nous a donné la force de terminer ce mémoire.

En fin de ce travail, Nous remercions Dr. CHERIF Nadjib maître assistant de grade B au CUBBAT de nous avoir encadré et fournie certains outils pour pouvoir travailler.

Nous remercions également les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail, Dr. ZIANE Mohammed maître assistant de grade A au CUBBAT et Dr. BENNABI Farid maître assistant de grade B au CUBBAT.

Nous tenons à remercier vivement les techniciens du laboratoire de biologie M.RAHMANI Khaled, M. MOHAMEDI Mohamed Walid et Mme MFTEHE Chokria, pour leur dévouement, leurs conseils précieuses qui ont été d'une grande aide, et pour leur patience.

Nous remercions également M.MOUEDEN Riad d'avoir été là pour nous.

Nous remercions nos collègues de laboratoire, en particulier TLEMCENI Ibtissem, YAHLA Fatiha, ZNASNI Amina, GHORZI Imane, et MILOUDI asma pour leur aide, leur soutien morale, et d'avoir créés une belle ambiance.

Nous remercions nos amies KORIDEK Imen, MECHERI Amira, TALEB Zineb pour leurs encouragements et leur soutien moral.

Nous remercions M.BENNABI Farid, Mlle CHEBL Imane pour leur aide et leurs conseils.

*Bref un merci aux personnes que nous avons
Peut-être oublié de citer.*

Liste des abréviations

HOC : composé organique hydrophobe

CMC: Concentration micellaire critique

CTAB : Cetyl triméthylammoniumbromide

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

APG : alkylpolyglucosides

pH : Potentiel Hydrogène

MELS : lipides de mannosylérythritol

mN : millinewton

M : mètre

MEOR : récupération microbienne améliorée du pétrole

g : gramme

L : litre

C : Carbone

N : Azote

Mg : milligramme

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

SEAR : assainissement de l'aquifère amélioré par surfactant

NAPL : Non-Aqueous Phase Liquid

QS : Quorum Sensing

HAA : Acides 3- (3-hydroxyalcanoyloxy) alcanoïques

ml : millilitre

µl : Microlitre

°C : Degré Celsius

MSM : mineral salt medium

LB: Lurie-Bertani

h : heure

% : Pourcentage

E24 : Indice émulsification

NaCl : Chlorure de sodium

BM : Bleu de Méthylène

rpm : Rotation par minute

min : Minute

nm : nanomètre

CCM : Chromatographie sur couche mince

Rf : Rapport frontal

DO : Densité optique

VF : Viande-Foie

GN : Gélose Nutritive

FeSO₄ : Sulfate de fer

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Ca²⁺ : Ion Calcium

Fe²⁺ : Ion de fer

Liste des Figures

Figure 01 : Représentation schématique d'un surfactant et de son positionnement à l'interface des systèmes.....	03
Figure 02 : Formule développée du CTAB.....	04
Figure 03 : Structure chimique du savon.....	05
Figure 04 : Structure moléculaire de l'APG.....	06
Figure 05 : Représentation schématique d'un tensioactif zwitterion.....	06
Figure 06 : Exemples de tensioactifs amphotères.....	06
Figure 06 : Représentation d'une biomolécule amphiphile.....	08
Figure 07 : structures chimiques : (a) Tréhalolipide, (b) Sophorolipide.....	09
Figure 08 : structure chimique d'un : (a) monorhamnolipide, (b) dirhamnolipide produits par l'espèce <i>P. aeruginosa</i>	10
Figure 09 : Structure chimique de la surfactine.....	11
Figure 10 : Phosphatidyléthanolamine.....	12
Figure 11 : Mécanisme amélioré de récupération du pétrole par les biosurfactant.....	12
Figure 12 : Agrégation des molécules de surfactants en micelle.....	19
Figure 13 : Représentation schématique d'une molécule de surfactant.....	20
Figure 14 : Représentation schématique du processus abiotique dans un système sol/ liquide contenant des surfactants, des HAP, et de la matière humique du sol.....	22
Figure 15 : Modèle représentatif de la régulation de la production des rhamnolipides chez <i>P.aeruginosa</i>	24
Figure 16 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des rhamnolipides.....	25
Figure 17 : Zone de prélèvement d'un sol pollué par les hydrocarbures.....	26
Figure 18 : Schéma représentatif du test de dispersion du pétrole brut.....	28
Figure 19 : schéma représentatif du test de « Drop Collapsing ».....	29
Figure 20 : schéma représentatif du test E24.....	30
Figure 21 : Souche CH cultivée sur gélose au Cétrimide et observée sous UV.....	36
Figure 22 : Développement des souches sur milieu gélose au sang.....	38
Figure 23 : Les Six souches inoculées sur un milieu de sels minéraux.....	38
Figure 24 : Tests du « Drop Collapsing ».....	40
Figure 25 a : Tests positifs de dispersion du pétrole.....	41
Figure 25 b : Test négatif de dispersion du pétrole.....	41
Figure 26 : Test d'émulsification des surnageants du 1er milieu et du milieu MSM.....	42

Figure 27 : Swarming Motility de la souche CH.....	43
Figure 28 : Milieu CTABensemencé par les trois milieux.....	44
Figure 29 : Résultats de la CCM. R1 : monorhamnolipide, R2 : dirhamnolipide.....	45
Figure 30 : Observation sans UV De la Souche CH sur milieu King B à gauche, et sur milieu King A à droite.....	46
Figure 31a : Observation microscopique de la souche CH après coloration de Gram grossissement $\times 100$	47
Figure 31b : Observation microscopique de la souche C colorée au bleu de méthylène grossissement $\times 100$	47
Figure 32 : Croissance de la souche CH à la surface du milieu de culture VF.....	48
Figure 33 : Galerie api 20 E inoculée par la souche CH.....	49
Figure 34 : Mesure de la biomasse bactérienne en fonction du temps.....	50
Figure 35 : Mesure des rhamnolipides en fonction tu temps.....	51
Figure 36 : Mesure de la DO bactérienne et des rhamnolipides en fonction du temps.....	51

Liste des Tableaux

Tableau 01 : Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire.....	07
Tableau 02 : Différentes applications des biosurfactants et leur origine.....	13
Tableau 03 : Applications potentielles des biosurfactants	14
Tableau 04 : Types d'hémolyse et leur interprétation.....	27
Tableau 05 : Etapes de la réalisation de la CCM.....	32
Tableau 06 : étapes de la réalisation de La galerie API® 20 E.....	34
Tableau 07 : caractéristiques macroscopiques des Bacilles et des Pseudomonas.....	37
Tableau 08 : Critères de croissance des souches sur gélose au sang.....	37
Tableau 09 : Résultats du test de « Drop Collapsing » et du test de dispersion du pétrole...39	
Tableau 10 : Interprétation de l'ensemencement du milieu CTAB des trois surnageants Des milieux.....	43
Tableau 11 : Valeurs du poids des tubes et du poids sec des culots.....	44
Tableau 12 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu gélose au sang.....	46
Tableau 13 : Caractéristiques microscopiques de la souche CH.....	47
Tableau 14 : Résultats des tests biochimiques inoculés par la souche CH.....	48
Tableau 15 : Valeurs de la biomasse bactérienne et des rhamnolipides en fonction du temps.....	50

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
I.1. Définition des surfactants.....	3
I.2. Classification des surfactants.....	4
I.2.1. Les cationiques.....	4
I.2.2. Les anioniques.....	4
I.2.3. Les non ioniques.....	5
I.2.4. Les zwitterioniques ou les amphotères.....	6
II.1. Définition des biosurfactants.....	8
II.2. Types des biosurfactants.....	8
II.2.1. Les glycolipides.....	9
II.2.2. les lipopeptides t les lipoprotéines	10
II.2.3. les phospholipides et les lipides neutres	11
II.3. Utilisation des biosurfactants.....	12
III. la production des surfactants biologiques	15
III.1. les organismes producteurs	15
III.2. paramètres influençant la production.....	16
III.2.1. Influence de la source de carbone	16
III.2.2. Influence de la source d'azote.....	16
III.2.3. Autres facteurs	17
III.3. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance	18
IV. Propriétés physico-chimiques des biotentionoactifs.....	18
IV.1. La concentration micellaire critique (CMC).....	18
IV.2. paramètres influençant la micellisation	19
IV.3. Mode d'action des biosurfactants, exemple de remobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques	20
IV.3.1. La mobilisation.....	21

IV.3.2. La solubilisation.....	21
IV.4. Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants.....	23
V. Etude génétique de la production des rhamnolipides	23

Chapitre II : Matériels et méthodes

Zone de prélèvement.....	26
I. Isolement et purification.....	26
I.1. Préparation des dilutions et isolement.....	26
I.2. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants (test d'hémolyse).....	27
II. Etude de production des biosurfactants.....	28
II.1. production des bio-tensioactives.....	28
II.2. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants.....	28
II.2.1. Test de dispersion du pétrole.....	28
II.2.2. Test de « Drop Collapsing ».....	29
II.2.3. Test d'émulsification (E24).....	29
II.2.4. Swarming Motility.....	30
II.2.5. Ensemencement du milieu CTAB.....	30
III. Caractérisation des biosurfactants.....	31
III.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture.....	31
III.2. Chromatographie sur couche mince.....	31
IV. Identification de la souche productrice des rhamnolipides.....	32
IV.1. Aspect macroscopique des colonies.....	32
IV.2. Aspect microscopique des souches.....	32
IV.3. Type respiratoire.....	33
IV.4. La galerie API® 20 E.....	33
V. suivie de la cinétique bactérienne.....	34
V.1. Dosage des Rhamnolipides.....	35

Chapitre III : Résultats

I. Isolement et purification.....	36
I.1. Préparation des dilutions et isolement.....	36

I.2.Criblage des souches productrices des biosurfactants.....	37
I.2.1. Test d'hémolyse.....	37
II. Etude de production des biosurfactants.....	38
II.1. Production des tensioactives.....	38
II.2. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants.....	39
II.2.1. Test de « Drop Collapsing » et 2.Test de dispersion du pétrole.....	39
II.2.3. Test d'émulsification (E24).....	42
II.2.4. Swarming Motility.....	42
II.2.5. Ensemencement du milieu CTAB.....	43
III. Caractérisation des biosurfactants.....	44
III.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture.....	44
III.2. Chromatographie sur couche mince.....	45
IV. Identification de la souche productrice des rhamnolipide.....	46
IV.1. Aspect macroscopique des colonies.....	46
IV.2 Aspect microscopique des souches.....	47
IV.3. Type respiratoire.....	47
I.V.4. L'identification de la souche productrice des biosurfactants.....	48
V. Suivie de cinétique bactérienne et de production des Rhamnolipides.....	49
Discussion.....	51
Conclusion.....	55
Références bibliographiques.....	56
Table des annexes.....	66

Introduction

Le champ d'application des surfactants est probablement un des plus vastes de la science et de la technologie moderne. Dans notre vie quotidienne et dans les phénomènes biologiques, et même dans les procédés industriels qui mettent en jeu des fragments de matière dispersés sous forme de particules, de gouttes, ou de bulles, on trouve sans arrêt des surfaces et des interfaces.

Quand on examine une surface ou une interface, on est pratiquement sûr de rencontrer un surfactant qui joue un rôle déterminant en ce qui concerne les propriétés.

Les surfactants sont des composés amphipathiques possédant à la fois un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe, permettant la formation de structures spécialisées indispensables à leur action : réduction des tensions superficielles et interfaciales, formation des micelles et des microémulsions entre deux phases différentes (**christofi et Ivshina, 2002 ; georgiou et al. , 1992 ; Singh et al. , 2007 ; Banat et al. , 2010**).

Ils constituent une classe importante de produits chimiques industriels largement utilisés dans presque tous les secteurs de l'industrie moderne (**Banat et al. , 2000**). La plupart des surfactants dérivent du pétrole et sont synthétisés chimiquement. Cependant, la tendance dominante vers l'utilisation de technologies respectueuses de l'environnement a renforcé la recherche de composés biodégradables d'origine naturelle (**Randhawa et Rahman, 2014 ; makkar et al. , 2011**).

Les biosurfactants sont des composés structurellement divers, principalement produits par des micro-organismes utilisant des hydrocarbures et sont classés en fonction de leur structure moléculaire principalement en glycolipides (par exemple, rhamnolipides), les lipopeptides (ex : surfactine), biosurfactants polymères (ex : émulsan), les phospholipides (ex : phosphatidyléthanolamine) (**Banat et al. , 2000, 2010 ; Abdel-Mawgoud et al. , 2010**). Contrairement à leurs homologues synthétiques qui sont classés en fonction de la charge ionique résidant dans la partie polaire de la molécule (**christofi et Ivshina, 2002**).

Ils ont une large gamme d'applications biotechnologiques dans le pétrole, les aliments, les boissons, les cosmétiques, les détergents, les textiles, les peintures, les mines, la cellulose, les produits pharmaceutiques et les nanotechnologies (**Santos et al. , 2016**). Ils possèdent plusieurs propriétés fonctionnelles : émulsification, séparation de phase, mouillage, moussage, solubilisation, désémulsification, inhibition de la corrosion et réduction de la viscosité (par exemple des pétroles bruts lourds) (**Fiechter, 1992**).

Les tensioactifs sont connus pour améliorer l'efficacité de la désorption et de la biodisponibilité des composés organiques hydrophobes (HOCs) en améliorant leur solubilité dans les systèmes aqueux, par la mobilisation qui se produit à des concentrations inférieures à

la concentration critique en micelles (CMC) et la solubilisation a l'inverse du premier mécanisme, qui a eu lieu au-dessus du CMC (**Bezza et Nkhalambayausi-Chirwa, 2015**).

Les biosurfactants rhamnolipidiques ont été intensivement étudié et largement examiné. Ce sont des composés produits par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (**Abdel-Mawgoud et al. , 2010 ; Rahman et al, 2002**). Ils représentent l'une des classes les plus importantes de surfactants microbiens, présentant des rendements de production élevés et par conséquent un bon potentiel d'exploitation commerciale. Un autre avantage des rhamnolipides est le fait qu'ils peuvent être produits en utilisant des substrats hydrophiles ou hydrophobes relativement bon marché tels que des hydrates de carbone, des huiles végétales ou même des déchets de l'industrie alimentaire (**Nitschke et al. , 2005**).

L'objectif de ce travail et l'étude de souches capables de croître et de produire des tensioactifs sur des sols pollués par les hydrocarbures et plus particulièrement l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa*.

Le travail de ce présent mémoire est subdivisé aux parties suivantes :

- Isolement des souches productrices des biosurfactants ;
- criblage des microorganismes producteurs des biotensioactifs ;
- production des rhamnolipides par la souche *P. aeruginosa* ;
- caractérisation des rhamnolipides par Chromatographie sur couche mince.

Étude bibliographique

I.1. Définition des surfactants

En anglais, le terme surfactant (abréviation de **surface-active-agent**) désigne une substance qui présente une activité superficielle ou interfaciale (**Salager, 2002**). Les surfactants sont des substances chimiques à caractère amphiphile.

Le groupe polaire est un groupe fonctionnel qui comporte des hétéroatomes d'oxygène, de soufre, d'azote ou de phosphore (**Salager, 1992**).

Le groupe apolaire, il s'agit en général d'une chaîne hydrocarbonée ancrée directement sur le groupe polaire ou par l'intermédiaire d'un noyau aromatique (**Salager, 1992**). Ce qui explique leurs propriétés particulières, comme la faculté de se répartir à l'interface de fluides immiscibles : eau-air ou eau-huile (**Déziel, 1996**). Ces molécules sont tensioactives à la suite de la combinaison des propriétés hydrophobes et hydrophiles (**Azarmi et Ashjarian, 2015**).

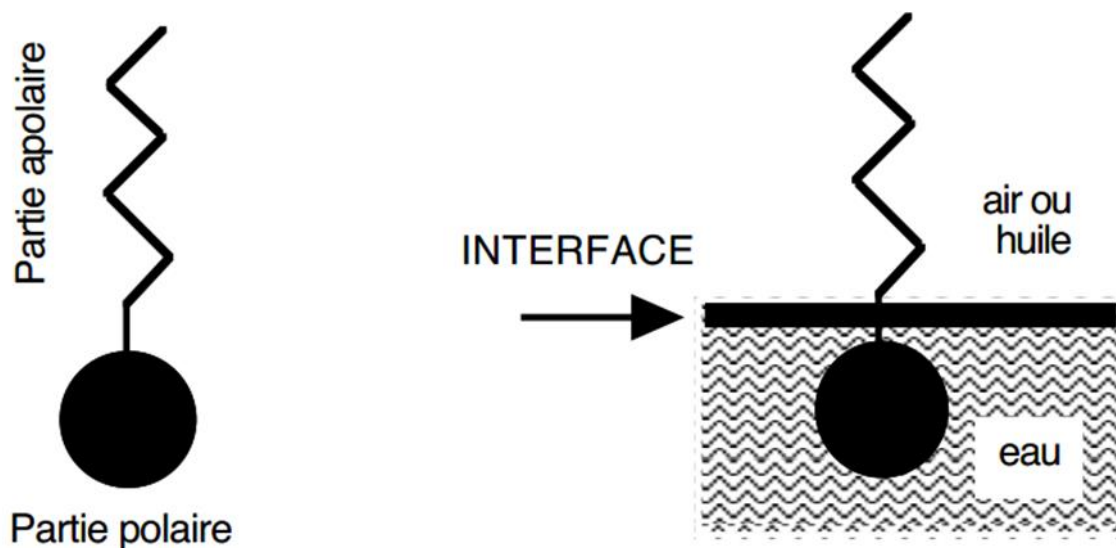


Figure 01 : Représentation schématique d'un surfactant et de son positionnement à l'interface des systèmes (**Salager, 1992**).

I.2. Classification des surfactants

La classification des tensioactifs la plus acceptée et scientifiquement fondée repose sur leur dissociation dans l'eau (**Salager, 2002**). La tête peut être un groupe anionique, cationique, zwitterion ou non ionique tandis que la queue est une chaîne hydrocarbonée non polaire (**Azarmi et Ashjarian, 2015**).

I.2.1. Les cationiques

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupements s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions tensioactifs chargés positivement (**Rondel, 2009**). Les plus importants sont les ammoniums quaternisés ou non (**Salager, 1992**). Ces surfactants sont en général plus coûteux que les agents anioniques (**Salager, 2002**) du fait de la complexité de leur fabrication (**Salager, 1992**).

Par conséquent, les tensioactifs cationiques sont utilisés uniquement dans des applications dans lesquelles ils ne peuvent pas être substitués par d'autres tensioactifs, c'est-à-dire ceux qui nécessitent une charge positive ou une action bactéricide (**Azarmi et Ashjarian, 2015**).

Le CTAB (Cetyl trimethylammoniumbromide) est un tensioactif cationique commercial. Il est utilisé dans les produits cosmétiques, les produits de soin des cheveux, en raison de ses propriétés émulsifiantes. Il est également utilisé dans les désinfectants et produits d'hygiène pour ses propriétés biocides (**Rondel, 2009**).

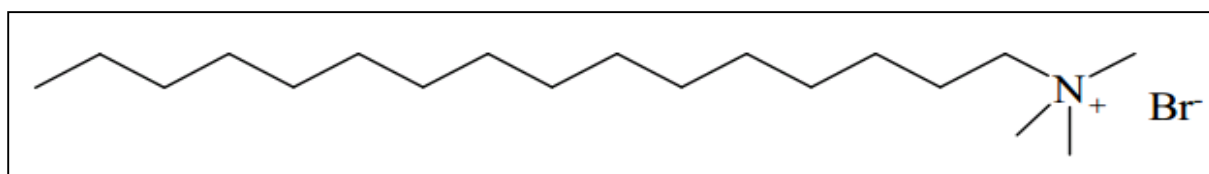


Figure 02 : Formule développée du CTAB

I.2.2. Les anioniques

Ces composés possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions chargés négativement (**Rondel, 2009**). Comme les carboxylates (savons), les sulfonates ou les sulfates de métaux alcalins (**Salager, 1992**).

C'est le type de tensioactif le plus largement utilisé pour le blanchiment, les liquides de vaisselles et les shampooings en raison de ses excellentes propriétés nettoyantes (**Azarmi et Ashjaran, 2015**).

Les tensioactifs anioniques sont historiquement les premiers tensioactifs utilisés sous la forme de savons (**Hadj Mohammed, 2013**).

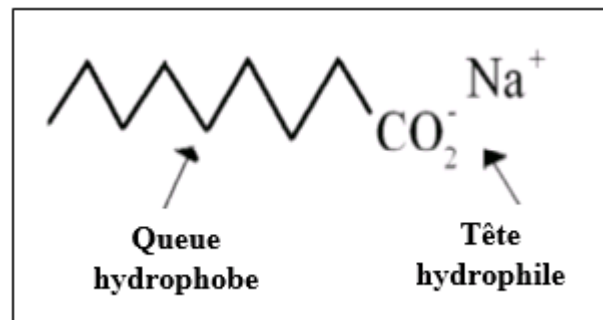


Figure 03 : Structure chimique du savon (**Azarmi et Ashjaran, 2015**)

I.2.3. Les non ioniques

Ces agents de surface ne donnent aucun ion en solution aqueuse. Leur caractère hydrophile provient de la présence, dans leur molécule, de groupement polaire de type éther, alcool, carbonyle ou même amine.

Les produits tensioactifs non ioniques sont principalement :

- des esters de polyols : esters de sorbitanne, de glycérol, de polyglycérol, de sucre...
- des éthers de polyols : éthers de glucose
- des alcanolamines
- des alkylpolyglucosides (APG) (**Rondel, 2009**).

Les tensioactifs non ioniques constituent la classe la plus récente de surfactants. De faible coût, ils sont rapidement utilisés pour leurs performances tensioactives à faible concentration. Peu moussants ils rentrent dans la composition des lessives (**Hadj-Mohammed, 2013**).

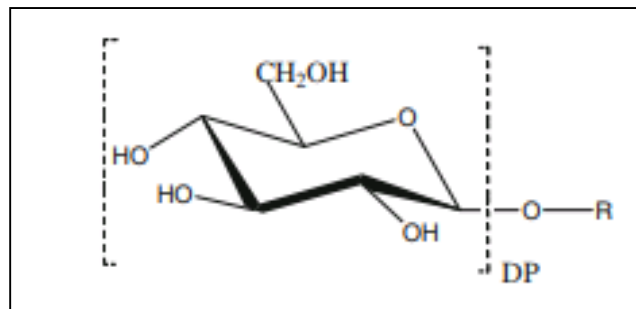


Figure 04 : Structure moléculaire de l'APG

I.2.4. Les zwitterioniques ou les amphotères

Un surfactant zwitterion a à la fois une charge positive et une charge négative dans le groupe de tête (**Azarmi et Ashjaran, 2015**). Certains tensioactifs amphotères sont insensibles au pH, tandis que d'autres sont cationiques à faible pH et anioniques à pH élevé, avec un comportement amphotère à pH intermédiaire (**Salager, 2002**). Ils présentent un caractère moins agressif que les tensioactifs anioniques et sont recommandés pour les peaux fragiles.

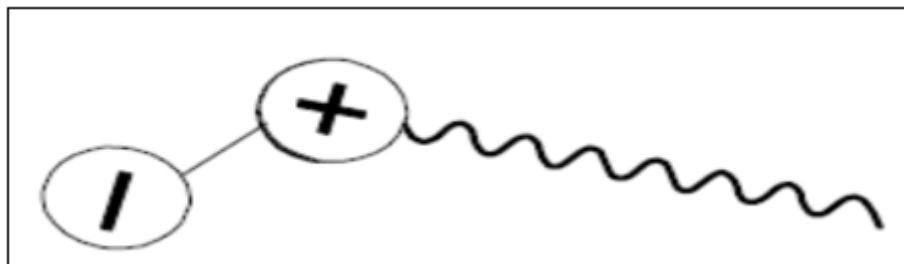


Figure 05 : Représentation schématique d'un tensioactif zwitterion (**Azarmi et Ashjaran, 2015**)

Les dérivés de la bétaine et les phospholipides sont les tensioactifs zwitterioniques les plus rencontrés (**rondel, 2009**).

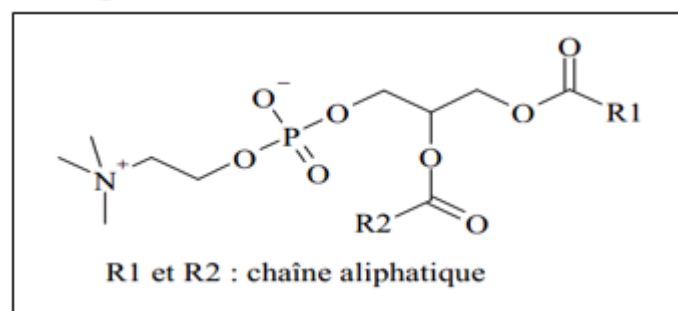


Figure 06 : Structure chimique du phospholipide

Tableau 01 : Classification des tensioactifs en fonction de la nature de leur tête polaire (rondel, 2009)

Types de surfactants	Exemples	Principales propriétés et applications
Anioniques	savons (RCOO^-) carboxylates (RCO_2^-)	agents nettoyants (détergents) agents moussants
Non ioniques	Alkylpolyglucosides (APG)	Non irritants (produits de soin de la peau)
Cationiques	Ammoniums quaternaires (R_4N^+)	Emulsionnants, bactéricides
Amphotères	Bétaïnes phospholipides	Moussants Détergents Peu irritants (hygiène corporelle)

II.1. Définition des biosurfactants

Un biosurfactant est une molécule tensioactive produite par des cellules vivantes- dans la majorité des cas, par des micro-organismes (**Fiechter, 1992**). Ils sont synthétisés par un large éventail de microorganismes (tels que les bactéries, les levures et les champignons) (**Irorere et al. , 2017**). Sécrétés soit extracellulairement ou attachés à des parties de cellules, principalement pendant la croissance sur des substrats non miscibles à l'eau (**Desai et Banat, 1997**). Des hydrocarbures qui présentent une activité de surface (**Banat et al. , 2000**). Ces biomolécules peuvent modifier les conditions interfaciales et de surface (**Parra et al. , 1989**).

Les composés microbiens qui présentent une activité superficielle et une activité émulsifiante particulièrement élevée sont classés comme biosurfactants (**Banat et al. , 2000**). Ces interactions de surface sont médiées par la nature amphiphile des molécules (**Marchant et Banat, 2012**). Qui les amènent à s'agréger aux interfaces entre fluides de polarités différentes tels que l'eau et les hydrocarbures (**Jennings et Tanner, 2000**). Ils sont constitués d'un groupement hydrophile comprenant un acide, des cations peptidiques ou des anions, des mono-, di- ou polysaccharides et un groupement hydrophobe de chaînes hydrocarbonées insaturées ou saturées ou d'acides gras (**Banat et al, 2010**).

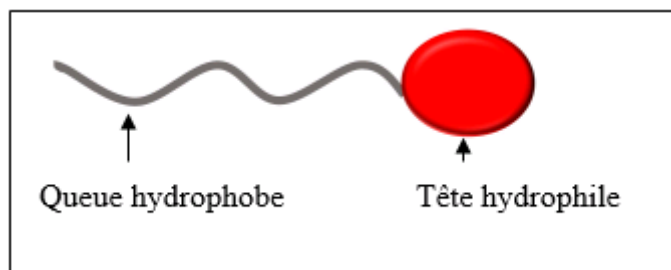


Figure 06 : Représentation d'une biomolécule amphiphile (**Santos et al. ,2016**)

II.2. Types des biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés structurellement divers (**Banat et al. , 2000**) et sont principalement classés selon leur structure chimique (**Banat et al. , 2010**), plutôt que sur la charge comme c'est le cas pour les surfactants synthétiques (**Déziel, 1996**). Plusieurs types de biosurfactants ont été isolés et caractérisés, incluant les glycolipides, les phospholipides, les lipopeptides, les lipides neutres (**Abu-ruwaida et al. , 1991**).

II.2.1. Les glycolipides

Les surfactants microbiens les mieux étudiés sont les glycolipides. Les biosurfactants glycolipidiques comprennent une section d'hydrate de carbone hydrophile (des mono- ou des disaccharides) et une chaîne d'acide gras hydrophobe (des acides aliphatiques à longue chaîne ou des acides hydroxyaliphatiques). Le lien est par le biais de soit un éther ou un groupe ester. Le sucre à l'extrémité hydrophile est le sophorose chez les sophorolipides, le rhamnose chez les rhamnolipides et le mannose et l'érythritol chez les lipides de mannosylérythritol (MELS). Il existe quelques autres biosurfactants glycolipidiques, par ex. les lipides de tréhalose. Ce sont les composés les plus connus (Banat et al. , 2010 ; Marchant et Banat, 2012 ; Healy et al, 1996).

Les Sophorolipides, qui sont produits principalement par les levures. Les lipides tréhalose sont obtenus à partir de *Mycobacterium* et de bactéries apparentées. Les tréhalolipides de différents organismes diffèrent dans la taille et la structure de l'acide mycolique, le nombre d'atomes de carbone et le degré d'insaturation (Rodrigues et al. , 2006 ; Désai et Banat, 1997).

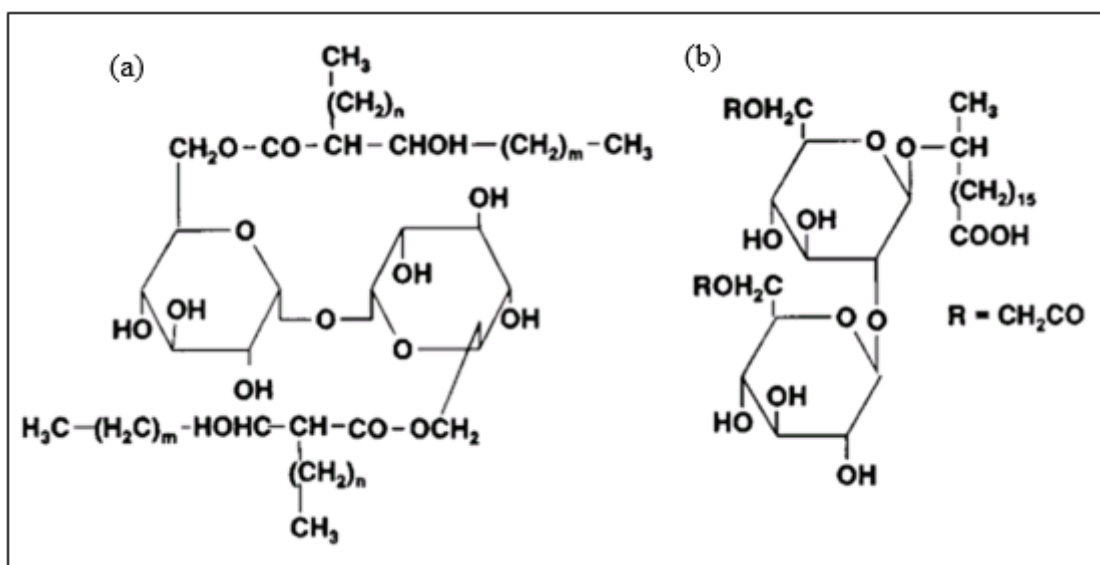


Figure 07 : structures chimiques : (a) Tréhalolipide, (b) Sophorolipide

Les rhamnolipides se présentent sous forme de monorhamnolipide et de dirhamnolipide en fonction du nombre d'unités de rhamnose dans la molécule et se différencient en divers congénères en fonction de la composition des unités d'acides gras (**Irorere et al, 2017**). *P. aeruginosa* produit deux types de rhamnolipides : les formes mono- et di- qui renferment respectivement une ou deux molécules de rhamnose attachées à des chaînes d'acide β -hydroxy-décanoïque (Marchant et Banat, 2012).

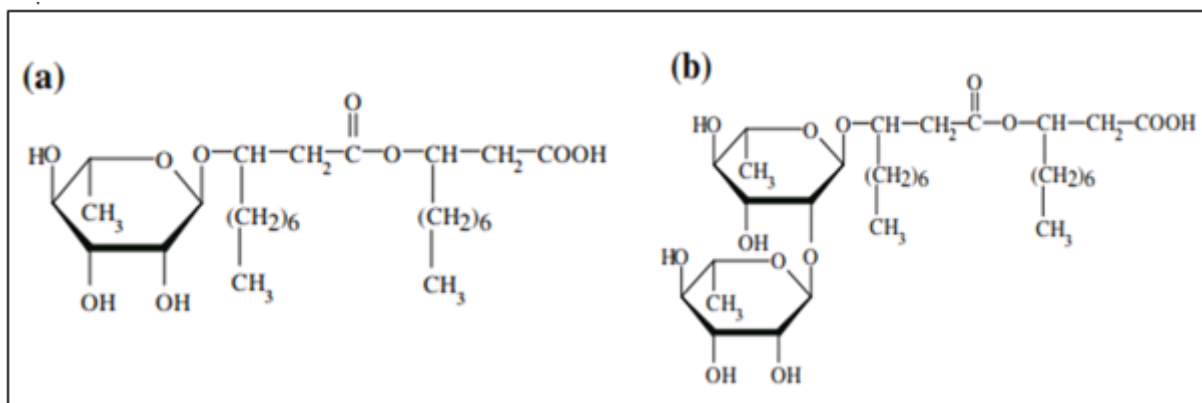


Figure 08 : structure chimique d'un : (a) monorhamnolipide, (b) dirhamnolipide produits par l'espèce *P. aeruginosa* (**Marchant et Banat, 2012**).

II.2.2. Les lipopeptides et les lipoprotéines

Les lipopeptides et les lipoprotéines consistent en un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Plusieurs biosurfactants ont montré une action antimicrobienne contre diverses bactéries, algues, champignons et virus (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**).

Ils ont des rôles très diversifiés pour la croissance des bactéries et qui dépendent de la niche écologique dans laquelle elles se trouvent (**BENDAHA, 2016**).

Les lipopeptides sont des structures cycliques généralement produites par les espèces de *Bacillus* et de *Pseudomonas*. Ils sont principalement constitués de peptides hydrophiles, généralement de 7 à 10 acides aminés, liés à une structure d'acide gras hydrophobe. Les lipopeptides cycliques de *Bacillus* sont constitués de trois groupes principaux connus sous le nom de familles de surfactine, d'iturine et de fengycine (**Smyth and al. , 2010**). Plusieurs antibiotiques lipopeptidiques montrent de puissantes propriétés tensioactives. *Bacillus subtilis* produit un lipopeptide cyclique appelé surfactine. C'est l'un des biosurfactants les plus puissants. La surfactine peut contribuer dans certaines des propriétés biologiques, telles que la

formation de pores conducteurs d'ions dans les membranes (**Ron et Rosenberg, 2001; Vijayakumar et Saravanan, 2015**).

Bacillus licheniformis produit plusieurs biosurfactants qui présentent une excellente stabilité dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**). Les souches de *Pseudomonas* produisent de la viscosine, un biosurfactant peptidolipidique qui abaisse la tension de surface à 27 mN / M (**Ron et Rosenberg, 2001**).

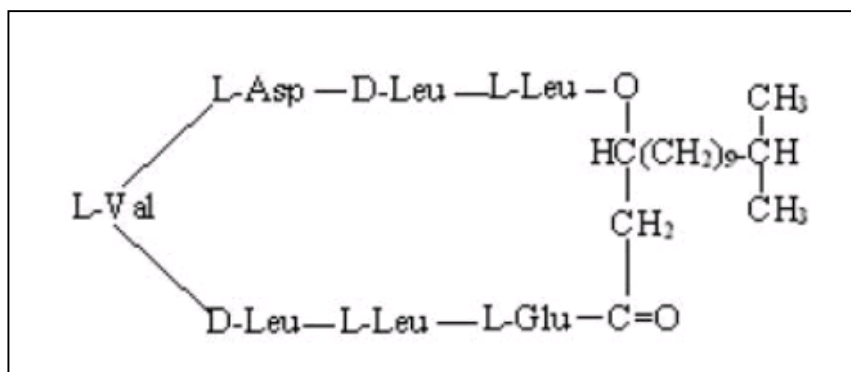


Figure 09 : Structure chimique de la surfactine (**Gautam et Tyagi, 2006**)

II.2.3. Les phospholipides et les lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités de surfactants d'acides gras et de phospholipides au cours de leur croissance sur des n-alcanes (**Desai et Banat, 1997**). Les acides gras saturés les plus actifs sont dans la gamme C-12 à C-14. En plus de la chaîne linéaire d'acides gras, les micro-organismes produisent des acides gras complexes tels que les acides corynomycoliques contenant des groupes hydroxyle et des branches d'alkyle, ce sont des tensioactifs puissants.

Les phospholipides sont des lipides contenant un groupe acide phosphorique, ce sont les constituants essentiels des membranes microbiennes, en milieu aqueux, de telles molécules amphiphiles tendent à s'organiser de telle sorte que seule leur tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau, ce qui aboutit typiquement à des structures en micelle ou en bicouche lipidique (**BENDAHA, 2016**).

Chez *Acinetobacter sp.* HO1-N, des vésicules riches en phosphatidyléthanolamine sont produites, formant des microémulsions d'alcanes optiquement claires dans l'eau (**KÄPPELI et FINNERTY, 1979 ; Gautam et Tyagi, 2006**).

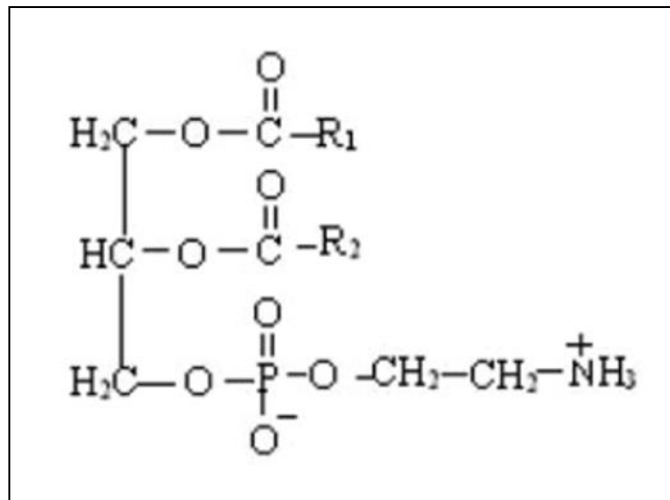


Figure 10 : Phosphatidyléthanolamine

II.3. Utilisation des biosurfactants

Les biosurfactants ont une large gamme d'applications biotechnologiques dans le pétrole, les aliments, les boissons, les cosmétiques, les détergents, les textiles, les peintures, les mines, la cellulose, les produits pharmaceutiques et les nanotechnologies. Actuellement, le marché principal est l'industrie pétrolière, qui se situe dans le domaine de la récupération et du traitement du pétrole. Puisque les technologies traditionnelles de récupération du pétrole ne peuvent récupérer qu'environ 40-45% du pétrole présent dans le réservoir (Santos et al. , 2016; Banat et al, 2010).

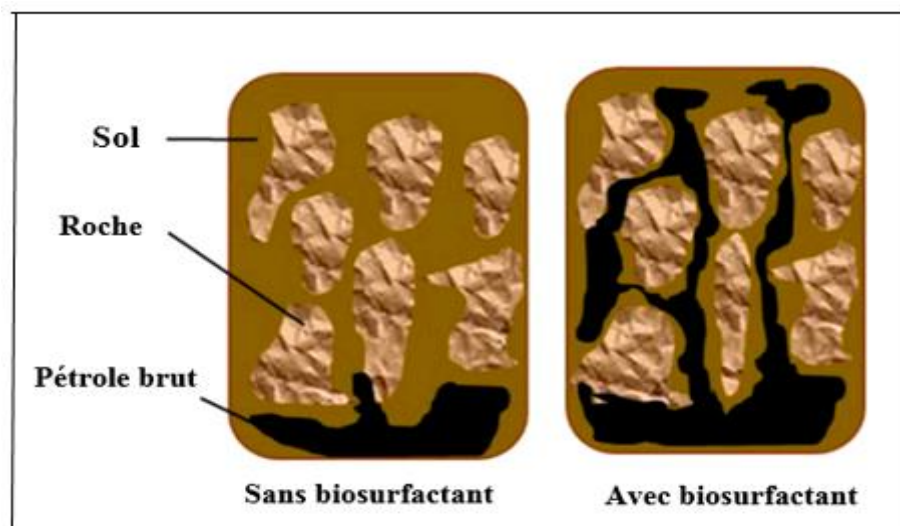


Figure 11 : Mécanisme amélioré de récupération du pétrole par les biosurfactant

Tableau 02 : Déférentes applications des biosurfactants et leur origine

Microorganisme	Groupe de biosurfactant	Class de biosurfactant	Application	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Glycolipides	Rhamnolipides	Bioremediation des hydrocarbures ; émulsification des hydrocarbures et des huiles végétales ; l'élimination des métaux du sol.	Pacwa-Plociniczak et al. , 2011
<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T.petrophilum</i>		Sophorolipides	Récupération d'hydrocarbures à partir de lies et de boues ; l'élimination des métaux lourds des sédiments.	
<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	phospholipides	Phosphatidyl��t hanolamine	Augmentation de la tolérance des bactéries aux métaux lourds	
<i>Candida bombicola</i>	Glycolipides	sophorolipides	détergence	Banat et al. , 2010
<i>Candida antarctica</i>	Glycolipides	MELs	Propriétés antimicrobienne, immunologique et neurologiques	Rodrigues et al. ,2006
<i>Bacillus subtilis</i>	lipopeptides	surfactine	Activités antimicrobienne et antifongique	
		iturine	Activité antifongique contre les mycoses profondes	

Dans MEOR (récupération microbienne améliorée du pétrole), les microorganismes dans les réservoirs sont stimulés pour produire des polymères et des tensioactifs, ce qui aide MEOR en abaissant la tension interfaciale à l'interface huile-roche. Cela réduit les forces capillaires empêchant le pétrole de se déplacer à travers les pores de la roche (**Banat et al. ,2000**).

Tableau 03 : Applications potentielles des biosurfactants (D'après Banat et al, 2000)

Fonction	Champ d'application
Emulsifiants et dispersants	Cosmétiques, peintures, additifs pour l'huile de roulement
Solubilisants et microémulsions	Articles de toilette, produits pharmaceutiques
Agents mouillants et pénétrants	Pharmacie, industrie textile, peintures
Détergents	Produits ménagers, produits agricoles, produits de haute technologie
Agents moussants	Articles de toilette, cosmétiques, flottation de minerai
Agents épaississants	peintures
Agents séquestrants métalliques	Exploitation minière
Vésicules formant des matériaux	Cosmétiques, systèmes de délivrance de médicaments
Amplificateurs de croissance microbienne	Traitements des boues d'épuration pour les déchets huileux, fermentation
Désémulsifiants	Traitement des déchets
Agents réducteurs de viscosité	Transport par pipeline
Dispersants	Mélange charbon-huile, boue charbon-eau

III. La production des surfactants biologiques

Certains types structuraux de surfactant sont produits à l'aide de systèmes biologiques et ne peuvent pas être facilement synthétisés par des processus chimiques (**Banat et al, 2000**).

III.1. Les organismes producteurs

Les organismes qui produisent les biosurfactants comprennent un grand nombre de levures, de bactéries et de champignons filamenteux (**Fiechter, 1992**). Les plantes, les animaux et les humains sont aussi capable d'en produire (**christofi et Ivshina, 2002**).

Les surfactants pulmonaires, constituent un mélange complexe de phospholipides, de petites quantités de protéines, d'hydrates de carbone et de lipides neutres, et se trouvent à l'interface air-liquide dans les alvéoles pulmonaires. Ils sont essentiels pour la respiration normale et leur déficience peut conduire à un collapsus alvéolaire chez les prématurés (**Fiechter, 1992**).

La plupart des organismes producteurs de biosurfactants sont aérobies, il existe quelques exemples de producteurs anaérobies. Comme *Bacillus licheniformis* JF-2 (**Mulligan et al. , 2000**).

Le rôle des biosurfactants est l'émulsification de la source de carbone, l'adhésion des cellules microbiennes à l'hydrocarbure. L'adsorption cellulaire des microorganismes dégradant les hydrocarbures sur des substrats non miscibles à l'eau (**Fiechter, 1992**). La liaison aux métaux lourds, la pathogénèse bactérienne, le quorum sensing et la formation de biofilm (**Rodrigues et al, 2006**).

Dans la littérature les bactéries du genre *Pseudomonas* et *Bacillus* sont les grands producteurs de biosurfactants (**Santos et al, 2016**).

Candida bombicola et *Candida lipolytica* sont parmi les levures les plus couramment étudiées pour la production de biosurfactants (**Santos et al, 2016**).

III.2. Paramètres influençant la production

La production de biosurfactants peut être spontanée ou induite par la présence de composés lipophiles ou lorsque la croissance cellulaire est maintenue dans des conditions de stress, comme une faible concentration d'azote (**Santos et al, 2016**).

III.2.1. Influence de la source de carbone

Le choix de la source de carbone joue un rôle important sur le rendement et la structure des surfactants microbiens (**georgiou et Sharma, 1992**), Et varie d'une espèce à l'autre (**Santos et al. ,2016**). Il peut être divisé en trois catégories : l'hydrate de carbone, l'hydrocarbure, et les huiles végétales. Certains microorganismes produisent des biosurfactants en utilisant seulement une source de carbone hydrophobe : l'hydrocarbure ou les huiles végétales, d'autres utilisent que des glucides et d'autres encore utilisent plusieurs sources de carbone en combinaison ou individuellement (**Gautam et Tyagi, 2006**). Des sources de carbone hydrosolubles telles que le glycérol, le glucose, le mannitol et l'éthanol ont toutes été utilisées pour la production de rhamnolipides par *Pseudomonas spp.* Cependant, la production de biosurfactant était inférieure à celui obtenu avec des substrats non miscibles à l'eau tels que les n-alcanes et l'huile d'olive (**Desai et Banat, 1997**). Un rendement très faible a été trouvé lorsque seulement du glucose ou de l'huile végétale a été utilisé pour la production d'un biosurfactant par *T. bombicola*, mais le rendement a augmenté à 70 g / L lorsque les deux sources de carbone ont été fournies ensemble (**Santos et al. , 2016**).

Des preuves de plus en plus nombreuses permettent de conclure que la source de carbone disponible, en particulier l'hydrate de carbone utilisé a une grande influence sur le type de biosurfactant produit (**Désai et Banat, 1997**).

III.2.2. Influence de la source d'azote

La production de biosurfactants est stimulée lorsque certains nutriments sont limités, en particulier l'azote (**Jennings et Tanner, 2000**). Dans les processus de fermentation, le rapport C / N affecte l'accumulation de métabolites. Des rapports C / N élevés (c'est-à-dire de faibles niveaux d'azote) limitent la croissance bactérienne, en favorisant le métabolisme cellulaire vers la production de métabolites. Par contre, un excès d'azote conduit à la synthèse de matériel cellulaire et limite l'accumulation de produits (**Santos et al. , 2016**). Parmi les sels inorganiques testés, les sels d'ammonium et l'urée étaient les sources d'azote préférées pour la production de

biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* (Gautam et Tyagi, 2006). Syldatk et al. ont montré que la limitation de l'azote ne causé pas seulement une surproduction de biosurfactants mais modifié également la composition du biosurfactant produit (Désai et Banat, 1997).

Les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* ont un système de quorum sensing régulé par la limitation de l'azote. Le stress avec de faibles taux d'azote, favorise la production de rhamnolipides (Ocampo, 2016).

Des rendements élevés de lipides sophorose, qui sont des biosurfactants produits par les champignons : *T. bombicola* et *C. Bombicola*, ont été obtenus en utilisant l'extrait de levure et l'urée comme source d'azote (Santos et al. , 2016).

III.2.3. Autres facteurs

Les facteurs environnementaux et les conditions de croissance tels que le pH, la température, l'agitation et la disponibilité en oxygène affectent également la production de biosurfactants par leurs effets sur la croissance ou l'activité cellulaire (Gautam et Tyagi, 2006). Un brusque changement de pH ou de température induit une surproduction de biosurfactants par *Rhodococcus erythropolis* lors de la culture sur un alcane (Déziel, 1996).

La Production de rhamnolipides chez *pseudomonas sp.* était à son maximum à un pH compris entre 6 et 6,5 et diminuait nettement au-dessus de 7 (Gautam et Tyagi, 2006).

Chez *A. paraffineus* et *Pseudomonas sp.* DSM-2874, la température provoque une altération dans la composition du biosurfactant produit (Désai et Banat, 1997). Le temps d'incubation exerce également un effet significatif sur la production de biosurfactants. Les micro-organismes produisent des biosurfactants à différents intervalles de temps. La production maximale de biosurfactants par *Aspergillus ustus* a été observée après cinq jours d'incubation (Santos et al. , 2016).

Les milieux de culture sont agités lors de la production de tensioactifs. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (Gabet, 2004).

Une concentration minimisée des sels respectifs de magnésium, de calcium, de potassium, de sodium et des éléments traces augmente le rendement de la production de

biosurfactants (**Guerra Santos et al, 1986**). La concentration de fer ou de manganèse affecte la production de surfactine par *Bacillus subtilis* (**Déziel, 1996**).

L'ajout d'antibiotiques, tels que la pénicilline ou le chloramphénicol, peut améliorer ou inhiber la production de divers biosurfactants (**georgiou et Sharma, 1992**).

III.3. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance

Il existe plusieurs moyens de séparation : l'extraction par solvant, l'adsorption, la chromatographie par échange d'ions, la centrifugation et la filtration sur membrane (**Lilly, 2011**).

Pour extraire le biotensioactif du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple) (**Gabet, 2004**).

La récupération du biosurfactant dépend principalement de sa charge ionique, de sa solubilité et de sa localisation (intracellulaire, extracellulaire ou liée aux cellules). Les techniques les plus largement utilisées sont les extractions par solvants : chloroforme-méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc, Ou des techniques reposant sur la précipitation du tensioactif. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices. Des sophorolipides de plusieurs espèces de levures et des rhamnolipides de *Pseudomonas spp.* sont quelques-uns des exemples bien connus de récupération de biosurfactants par extraction par solvant. La capacité d'agrégation des biosurfactants a également été utilisée pour les retenir sur des membranes filtrantes (**Désai et Banat, 1997 ; Gabet, 2004**).

IV. Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs

La structure particulière des surfactants leur confère deux propriétés fondamentales qui sont responsables de pratiquement toutes les propriétés des systèmes qui contiennent ces substances : leur adsorption aux surfaces ou aux interfaces, et leur association polymoléculaire sous forme de micelle ou autres structures (**A.salager, 1992**).

IV.1. La concentration micellaire critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former

des micelles (**Gabet, 2004**). La chaîne d'hydrocarbure, qui est incapable de liaison hydrogène, augmente l'énergie libre du système. Celle-ci peut être minimisée si la partie hydrophobe est isolée de la phase aqueuse. Par l'agrégation des molécules tensioactives en micelles (**Haigh, 1996**).

Les molécules tensioactives sont orientées pour former des agrégats sphériques avec leurs queues lipophiles groupées ensemble tandis que les extrémités hydrophiles s'étendent vers l'extérieur (**Margaritis et al. , 1979**).

À ce stade, il y a un changement brusque dans les propriétés de la solution, telles que la tension superficielle qui devient minimale (environ 30mN/m en solution aqueuse), la pression osmotique, la viscosité, la densité et la conductivité électrique (**Margaritis et al. , 1979 ; CHERIF, 2016**).

Les CMC des biosurfactants varient de 1 à 200 mg / litre (**Zhang et Miller , 1992**).

La plupart des biosurfactants ont des valeurs CMC plus faibles et un nombre d'agrégations micellaires plus élevé que les synthétiques (**Mata-sandoval, 2000**).

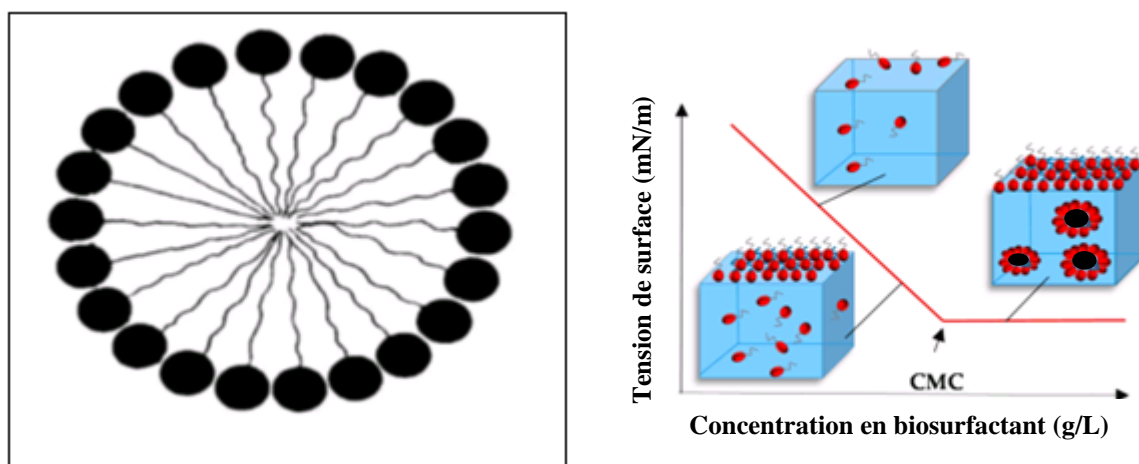


Figure 12 : Agrégation des molécules de surfactants en micelle (**Margaritis et al, 1979**)

IV.2. Paramètres influençant la micellisation

Les surfactants forment une variété de microstructures : des micelles sphériques, globulaires ou cylindriques, des vésicules sphériques et irrégulières, des bicouches tubulaires et irrégulières ou des structures lamellaires. La morphologie de ces agrégats est influencée par les changements du pH, la concentration du surfactant, la température et la force ionique de la solution (**champion et al. , 1995**).

Le volume intérieur d'une micelle dépend à la fois de la forme de la micelle et du nombre d'agrégation de la micelle (le nombre de monomères formant une micelle, et qui dépend de la structure des monomères) (**Bai et al. , 1998**).

Pour la formation d'une micelle, il faut 50 à 100 molécules de surfactants (**Christofi et Ivshina, 2002**). Le nombre d'agrégation augmente quand la surface de la section transversale de la partie hydrophile diminue. Il augmente également à mesure que la longueur de la queue hydrophobe augmente. La forme de la micelle dépend également de la structure du surfactant.

Par une approche géométrique la forme de la micelle peut être déterminée selon le rapport suivant : $V_H / (a_h L_c)$. Par exemple : un rapport supérieur à $\frac{1}{2}$ signifie que la forme de la micelle est cylindrique (**Bai et al. , 1998**).

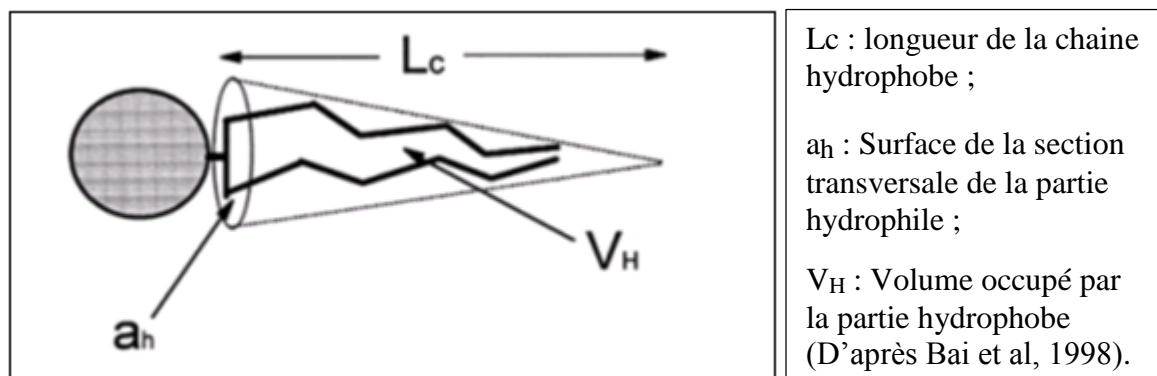


Figure 13 : Représentation schématique d'une molécule de surfactant

IV.3. Mode d'action des biosurfactants, exemple de remobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont des composés hydrophobes très peu solubles dans l'eau, qui ont tendance à s'adsorber fortement à la matière organique des sols et sont par conséquent moins accessibles à l'attaque microbienne (**Déziel, 1996**). Le principal rôle physiologique des biosurfactants est de permettre aux micro-organismes de croître sur des substrats non miscibles à l'eau, rendant ainsi le substrat plus facilement disponible pour l'absorption (**Fiechter, 1992**). Les bactéries de genres divers tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus* sont capables de produire des biosurfactants pendant la dégradation des hydrocarbures (**Bezza et Nkhalambayausi-Chirwa, 2015**).

Les biosurfactants ont un potentiel considérable pour l'application de SEAR (assainissement de l'aquifère amélioré par surfactant). Ils sont naturels, biodégradables et non toxiques pour les microorganismes dégradant les hydrocarbures (**McCray et al. , 2001**). La plupart sont non ioniques ou anioniques (**MAKKAR et ROCKNE, 2003**). Ce qui les rend moins sensibles à la sorption sur les sols (**Gabet, 2004**). Et ont des valeurs CMC plus faibles et un nombre d'agrégations micellaires plus élevé que les synthétiques (**Mata-sandoval et al. , 2000**).

Les surfactants améliorent l'élimination des NAPL (Non-Aqueous Phase Liquid) des milieux poreux par deux méthodes : par solubilisation et par mobilisation (**McCray et al, 2001**).

IV.3.1. La mobilisation

La mobilisation est causée par la réduction de la tension interfaciale de NAPL dans l'eau qui se produit lorsque les molécules de surfactant se répartissent sur les surfaces de NAPL (**McCray et al. , 2001**).

La mobilisation peut être divisée en déplacement et dispersion :

Le déplacement est la libération de gouttelettes de NAPL à partir de milieux poreux en raison d'une réduction de la tension interfaciale (**Bai et al. , 1997**).

La dispersion est le processus dans lequel la NAPL est dispersée dans la phase aqueuse sous la forme de très petites émulsions (**Bai et al. , 1997**). La réduction des tensions interfaciales diminue les forces capillaires piégeant les globules de NAPL, permettant ainsi leur remobilisation. Cependant, le contrôle hydrodynamique des NAPL ainsi solubilisés est difficile à maintenir, et bien qu'ayant un potentiel plus grand pour la réhabilitation, cette technique est peu utilisée (**Gabet, 2004**).

IV.3.2. La solubilisation

La solubilisation d'un hydrocarbure dans une solution de tensioactif implique la séparation des hydrocarbures à l'intérieur des micelles (**Bai et al. , 1998**). Le pouvoir de solubilisation du surfactant dépend de la capacité du surfactant à augmenter la solubilité apparente en phase aqueuse des constituants de NAPL. Qui est observée au-dessus de la CMC, attribuée à la séparation dans le noyau hydrophobe des micelles.

Dans ce procédé, des concentrations élevées de tensioactif sont généralement requises car la solubilité des constituants de NAPL dans les solutions tensioactives dépend entièrement de la concentration du tensioactif (**Bai et al. , 1997**). Les molécules de surfactants peuvent se sorber en association avec les HAP sur le sol ou seuls (**Edwards et al. , 1994**), entraînant une perte d'efficacité pour le traitement des sols et il en résulte une concentration en tensioactif dans la phase aqueuse inférieure à la concentration totale en tensioactif. Ainsi, pour que les micelles se forment, il faut ajouter suffisamment de tensioactif pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC (**Gabet, 2004**).

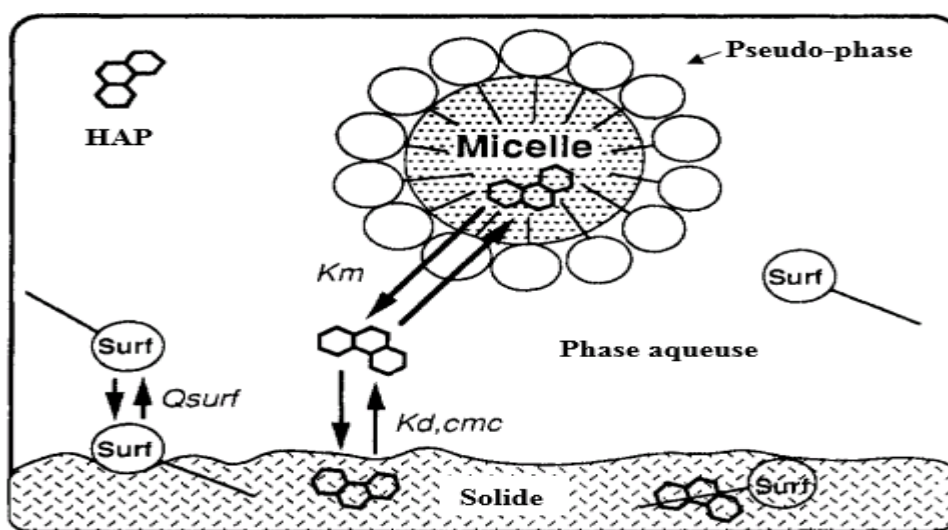


Figure 14 : Représentation schématique du processus abiotique dans un système sol/liquide contenant des surfactants, des HAP, et de la matière humique du sol (**D'après Edwards et al, 1994**)

La concentration des HAP en phase aqueuse dépend fortement de l'équilibre d'adsorption/désorption des HAP avec le sol. La capacité de sorption d'un sol ou d'un sédiment peut être décrite par un coefficient de distribution K_d entre la phase solide et la phase aqueuse du milieu, K_d dépend principalement de la teneur en carbone organique des sols. En présence de tensioactif, un coefficient de partage $K_{d, cmc}$ représente le coefficient de partage du HAP entre le sol et la phase aqueuse en présence d'une solution micellaire (**Gabet, 2004**).

IV.4. Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants

De nombreux surfactants synthétisés chimiquement causent des problèmes écologiques en raison de leur résistance à la dégradation, leur toxicité et leur accumulation dans les écosystèmes naturels (Healy et al. , 1996). Les biosurfactants sont facilement dégradés par les micro-organismes dans l'eau et le sol, ce qui rend ces composés adéquats pour la bioremediation et le traitement des déchets (Santos et al. , 2016). Le fait qu'ils puissent être facilement biodégradés signifie qu'ils sont nettement moins nocifs pour l'environnement que les surfactants chimiques plus récalcitrants (Marchant et Banat. , 2012). Une faible toxicité est également d'une importance fondamentale pour les applications environnementales. Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières largement disponibles ainsi que les déchets industriels (Santos et al. , 2016). Ils se produisent naturellement dans le sol, ce qui les rend acceptables d'un point de vue social et écologique, Et peuvent donc les rendre aptes au remplacement des produits chimiques (Banat et al. ,2000).

V. Etude génétique de la production des rhamnolipides

La synthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* est réalisée par l'opéron *rhlAB*, qui contient en aval deux gènes supplémentaires indépendants de l'opéron *rhlAB* qui codent pour les protéines régulatrices (RhlR et RhlI), et quelques autres gènes sont nécessaires (Ron et Rosenberg, 2001).

La réponse du quorum sensing (QS) régule au niveau transcriptionnel la production de rhamnolipides. L'autoinducteur, la butanoyl-homosérine lactone (C4-HSL), qui se lie à RhlI favorise l'expression, entre autres, de *rhlAB* et de *rhlC*. En outre, RhlR active la transcription de *rhlAB* lorsqu'il est couplé avec C4-HSL mais réprime sa transcription lorsqu'il n'est pas couplé avec son autoinducteur. C4-HSL est synthétisé par RhlI (Soberón-Chávez et al. , 2005).

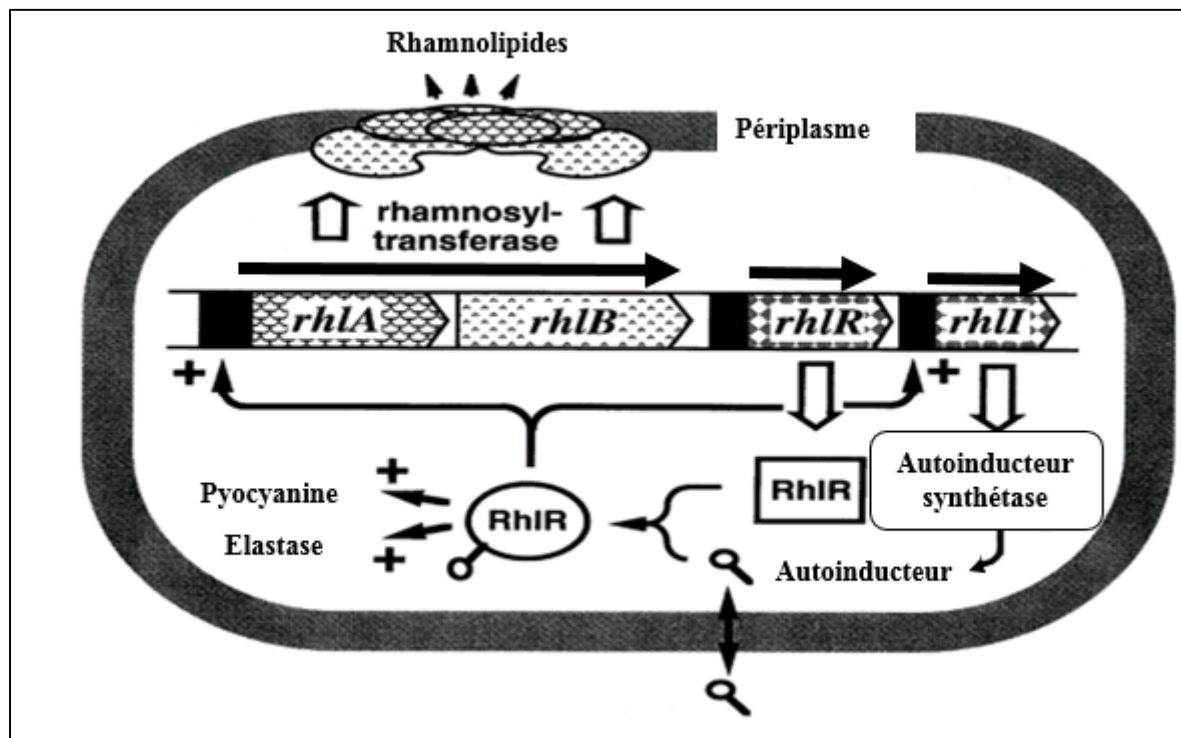


Figure 15 : Modèle représentatif de la régulation de la production des rhamnolipides chez *P.aeruginosa* (D'après Ochsner et Reiser, 1995).

La RhlA est impliqué dans la synthèse de la fraction dimère d'acides gras des rhamnolipides et des HAA libres. La réaction suivante est catalysée par la RhlB une rhamnosyltransférase qui utilise le dTDP-L-rhamnose et un HAA comme précurseurs, donnant des monorhamnolipides. Ces composés sont à leur tour les substrats, avec le dTDP-L-rhamnose, de RhlC pour produire des dirhamnolipides (Soberón-Chávez et al. , 2005).

AlgC joue un rôle central dans la voie de biosynthèse du dTDP-L-rhamnose ; il catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en glucose- 1-phosphate, un précurseur du dTDP-D-glucose et du dTDP-L-rhamnose. Les enzymes catalysant les conversions du glucose-1-phosphate par le dTDP-glucose, le dTDP-6-désoxyD-xylo-4-hexulose et le dTDP-6-désoxy-L-lyxo-4-hexulose sont codées par *rmlA*, *rmlB*, *rmlC*, et *rmlD*, respectivement, et forment l'opéron *rmlBCAD*.

L'enzyme responsable du drainage des précurseurs d'acides gras des rhamnolipides à l'écart de la voie de biosynthèse générale est appelée RhlG. Il est spécifiquement impliqué dans la production de rhamnolipides (Soberón-Chávez et al. , 2005).

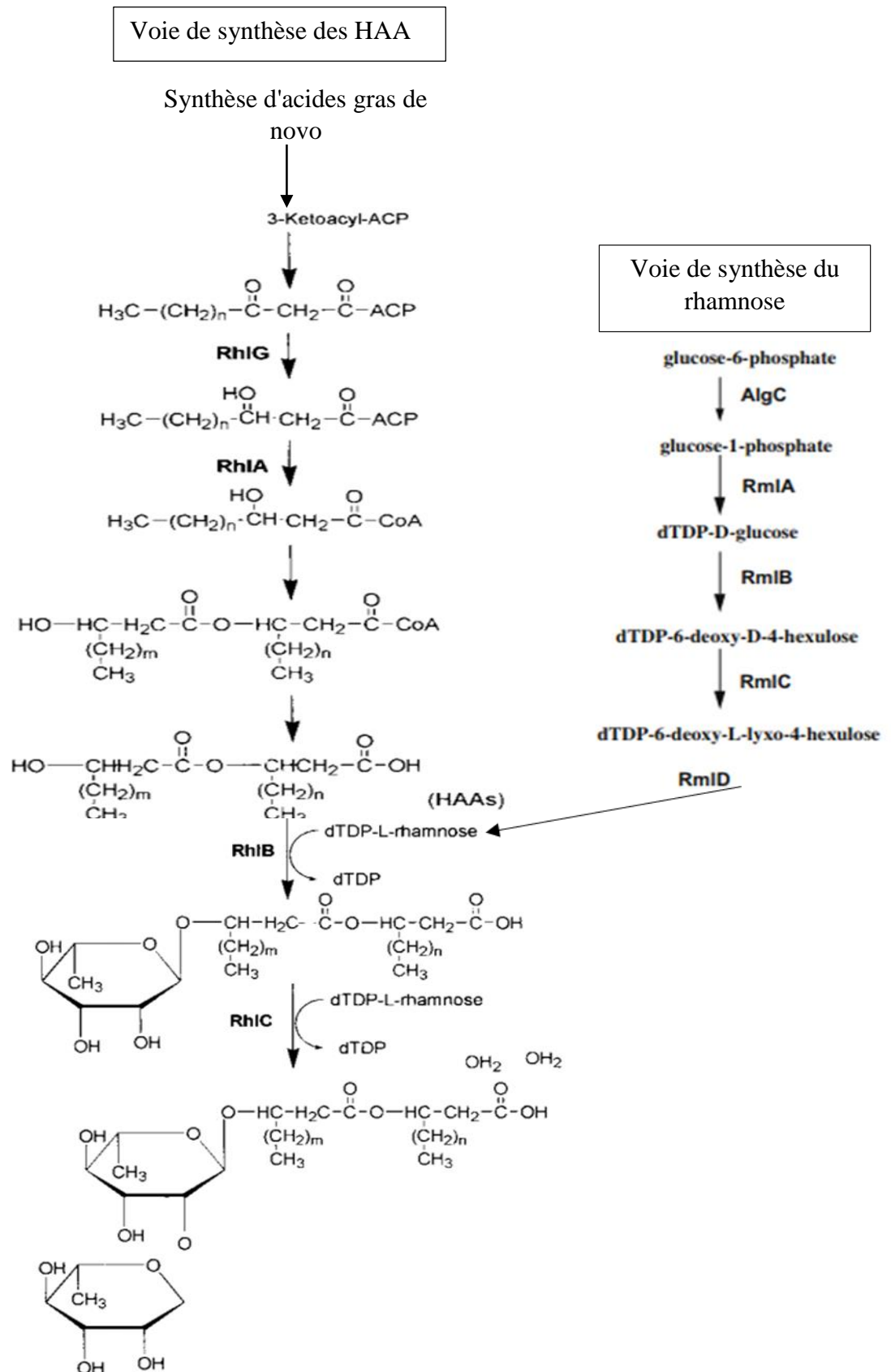


Figure 16 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des rhamnolipides
 (D'après Déziel et al, 2003, Soberón-Chávez et al, 2005)

Matériels et méthodes

Zone de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués au niveau de la wilaya d'Ain Témouchent. La zone de prélèvement a été choisie en fonction de la nature des substrats polluants le sol. Les échantillons ont été extraits à partir d'une profondeur de 5 cm des sols pollués par les hydrocarbures (les stations de services et de distribution des carburants, les chemins de fer, les ateliers de réparation automobiles), ou des sols agricoles (pois chiches, vignes).



Figure 17 : Zone de prélèvement d'un sol pollué par les hydrocarbures

I. Isolement et purification

I.1. Préparation des dilutions et isolement

Une pesée de 1 g de chaque échantillon a été diluée dans 9 ml d'eau physiologique, puis homogénéisée à l'aide d'un agitateur, afin d'obtenir une solution mère. Les dilutions ont été réalisées jusqu'à 10^{-2} , 100 μ l de chaque préparation a étéensemencé en surface sur des boîtes de Pétri contenant de la Gélose au Cétrimide, ensuite les échantillons ont été mis au bain marie à 80 °C pendant 10 min et ensemencés sur GN (gélose nutritive).

Après une incubation à 37 °C pendant 24h à 72h, une observation macroscopique a été entreprise en analysant la forme, la taille, la couleur et l'odeur.

Les colonies ayant le même aspect ont été repiquées et ensemencées par stries sur GN pour obtenir des souches pures.

I.2. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants (test d'hémolyse)

Les biosurfactants peuvent provoquer une lyse des érythrocytes. Ce principe est utilisé pour le test d'hémolyse (Walter et al. , 2010).

L'ensemencement sur gélose au sang est souvent utilisé pour le criblage de microorganismes producteurs des biosurfactants, ce milieu de croissance est riche pour la croissance de nombreux microorganismes (Walter et al. , 2010).

Une concentration de 5% de sang frais maintenu à une température ambiante, a été ajoutée aseptiquement au milieu de culture gélose de base préalablement autoclavé et liquéfié, puis refroidie a une température de 40°C à 45°C (milieu en surfusion) (Sidkey et al. , 2016), afin d'éviter la dénaturation des hématies. Le mélange a été ensuite homogénéisé délicatement par retournements successifs du flacon, pour empêcher la formation de bulles d'air puis coulé sur des boites de pétri.

Pour réaliser, un criblage primaire des souches productrices de biosurfactants, les colonies isolées et purifiées ont été ensemencées par spot à l'aide d'une pipette pasteur stérile sur la gélose au sang, et incubées à 37°C, pendant 72h.

L'activité hémolytique est détectée par la présence d'une zone claire autour des colonies (Carrillo et al. , 1996).

Tableau 04 : Types d'hémolyse et leurs résultats

Type d'hémolyse	Résultat
Hémolyse β (complète)	++
Hémolyse α (partielle)	+
Hémolyse γ	-

II. Etude de production des biosurfactants

II.1. Production des bio-tensioactives

Pour l'étude de la production des biosurfactants, un milieu de sels minéraux a été préparé (annexe 2-A), des concentrations respectives de 2% et 3% de glucose et d'extrait de levure, ont été ajoutées au milieu de fermentation (El-Sheshtawy et al. , 2016).

Un volume de 2 ml de pré culture des souches sélectionnées comme productrices des biosurfactants a été ajouté à 150 ml de milieu de fermentation dans des erlenmeyer de 500 ml fermés par du coton cardé stérile, la culture dure 72h à 37°C sous agitation.

Deux autres milieux de base ont été préparés : le milieu MSM (mineral salt medium) avec une concentration de 0,7% d'huile d'olive comme source de carbone, et un milieu LB (Lurie-bertani) sans source de carbone afin de voir l'effet de la source de carbone sur la production des biosurfactants (annexe 3-A) (Rikalović et al. , 2012).

II.2. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants

II.2.1. Test de dispersion du pétrole

10µl de pétrole brut a été déposé à la surface de 40 ml d'eau distillée dans une boîte de Pétri (150 mm de diamètre) pour former une fine membrane. 10µl du milieu de culture ou du surnageant a été déposé doucement au centre de la membrane huileuse. La surface du cercle claire formée par le déplacement de l'huile indique l'activité des biosurfactants. Cette zone présente des relations linéaires avec la quantité de surfactants testés (Morikawa et al. , 2000).

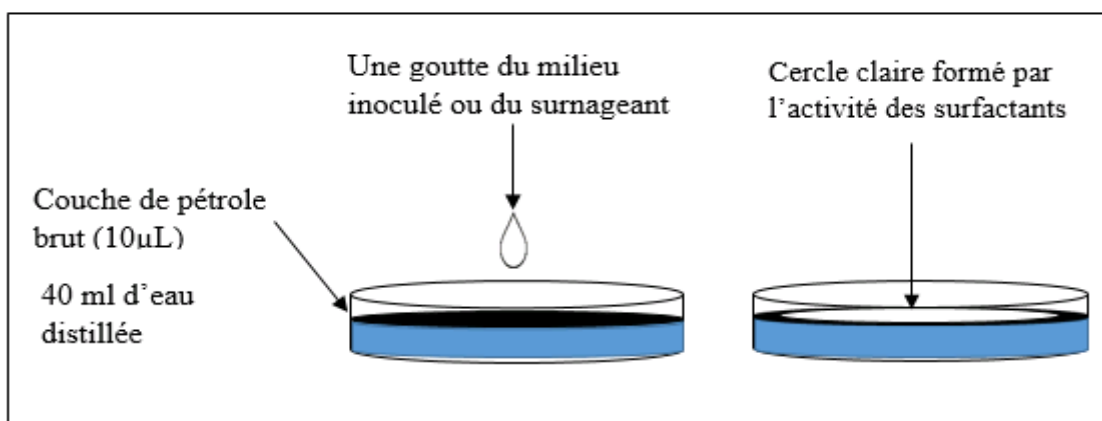


Figure 18 : Schéma représentatif du test de dispersion du pétrole brut

II.2.2. Test de « Drop Collapsing »

Le test de « Drop Collapsing » (effondrement des gouttes) est rapide et facile à réaliser, il repose sur la stabilité ou l'instabilité des gouttelettes liquides. Par conséquent, des gouttes d'une suspension bactérienne ou d'un surnageant de culture ont été déposées sur une surface solide revêtue par une fine couche huileuse, la propagation des gouttes indique la présence des molécules interfaciales, car la force ou la tension entre la goutte de liquide et la surface hydrophobe est réduite. La stabilité des gouttes dépend de la concentration des tensioactifs (Walter et al. , 2010). La durée minimale de la réaction indique une activité élevée du surfactant (Sidkey et al. , 2016).

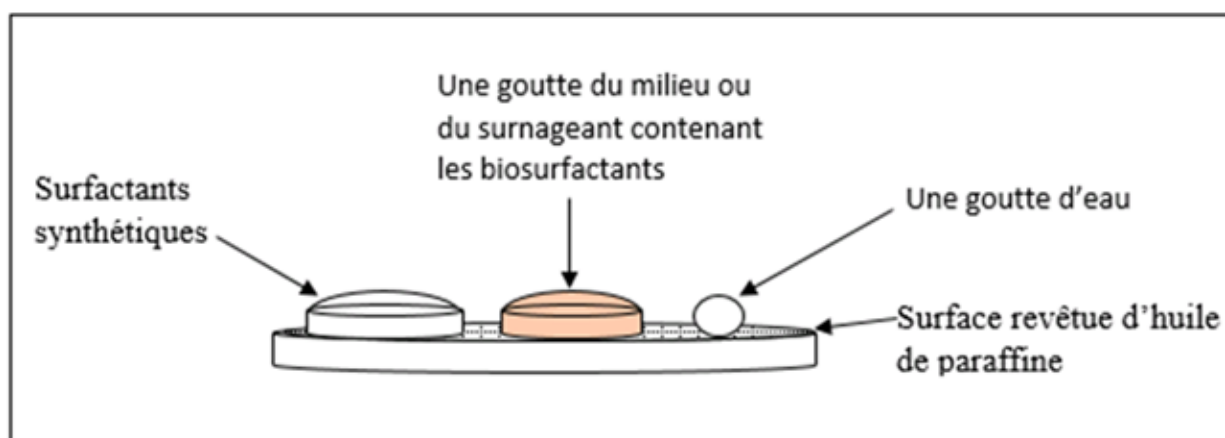


Figure 19 : schéma représentatif du test de « Drop Collapsing »

II.2.3. Test d'émulsification (E24)

Le E24 ou l'indice émulsification est mesuré en ajoutant un volume de kérosène à un volume du surnageant du milieu de fermentation dans un tube à essai, une forte agitation pendant 02 minutes puis un repos de 24 heures ont été effectués.

L'indice d'émulsification est calculé en utilisant l'équation suivante : la hauteur de la couche d'émulsion, divisée par la hauteur totale, multipliée par 100 (Sidkey et al. , 2016 ; COOPER et Goldenberg, 1986).

$$E24 = (h \text{ émulsion} / h \text{ totale}) \cdot 100\%$$

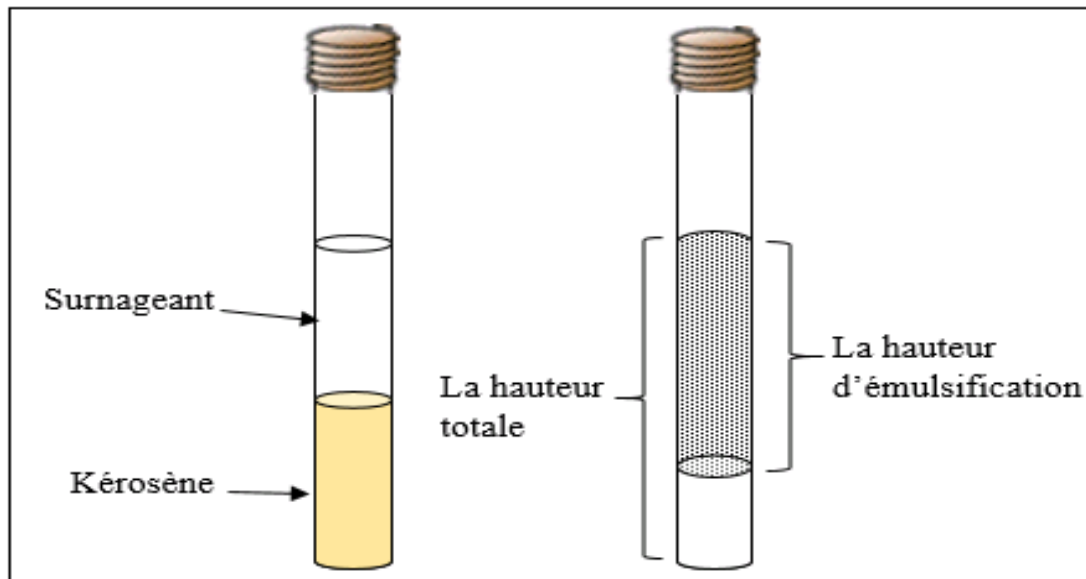


Figure 20 : schéma représentatif du test E24

II.2.4. Swarming Motility

L'essaimage est le mode bactérien le plus rapide de translocation de surface et permet la colonisation rapide d'un environnement riche en nutriments (Wang et al. , 2014)

De nombreuses bactéries synthétisent et sécrètent des surfactants, qui leur permettent un étalement sur les surfaces semi-solides (0,4 à 1,0% d'agar) (Kearns, 2010 ; Köhler et al. , 2000).

Une concentration de 1% d'agar a été additionnée au milieu de base LB, contenant une concentration de 2% de NaCl, cette préparation a été portée à ébullition. Après autoclavage, le milieu a été coulé dans des boîtes de Petri.

A l'aide d'une pipette pasteur imbibée par la suspension bactérienne ou une micropipette, un spot a été déposé au centre de la boîte contenant le milieu semi-solide, laissée pendant 2h à une température ambiante avant d'être incubée à 37°C pendant 24 à 48h.

II.2.5. Ensemencement du milieu CTAB

Le test de la gélose CTAB-bleu de méthylène est basé sur la propriété des tensioactifs anioniques à former une paire d'ions insolubles avec des substances cationiques : les colorants basiques, les tensioactifs cationiques...etc. La combinaison de Cetyltrimethyl-ammonium

bromide (CTAB) et le bleu de méthylène (BM), rend le test avec le biosurfactant plus intensif (Siegmund et Wagner, 1991).

Des quantités de 0,2g de CTAB et de 0,005g de bleu de méthylène, avec des concentrations de 1,5% d'agar et de glucose (source de carbone), ont été ajoutées au milieu MSM. Ce milieu a été agité et porté à ébullition.

Trois puits ont été creusés sur les plaques de gélose CTAB-bleu de méthylène, ou 30 μ L du milieu inoculé ou du surnageant a été déposé. La boîte a été incubée à 37°C pendant 24 à 48h. Sur les plaques de couleur bleu clair, les colonies produisant des rhamnolipides extracellulaires sont entourées d'halos bleu foncé (Siegmund et Wagner, 1991).

III. Caractérisation des biosurfactants

III.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture

Après réalisation du second criblage, les trois milieux de fermentation inoculés ont été centrifugés à 15000 rpm pendant 15 min, afin de récupérer leur surnageant.

De l'eau physiologique a été ensuite ajoutée au culot et agitée au vortex, pour décoller le culot de la paroi du tube. A la fin de la centrifugation les culots ont été récupérés sans les surnageants (l'eau physiologique), et mis dans un incubateur à 37°C pendant 48h à 72h pour le séchage pour déterminer leurs poids sec.

III.2. Chromatographie sur couche mince

La méthode CCM (chromatographie sur couche mince) a été réalisée, dans un but d'analyse des composés des surnageants des milieux de fermentation.

Le solvant représentant la phase mobile est un mélange de chloroforme de méthanol et d'eau distillée. La phase stationnaire est une plaque de silice ou une ligne de 1 cm a été tracée pour y déposée les surnageants afin d'éviter que le solvant ne les atteignent.



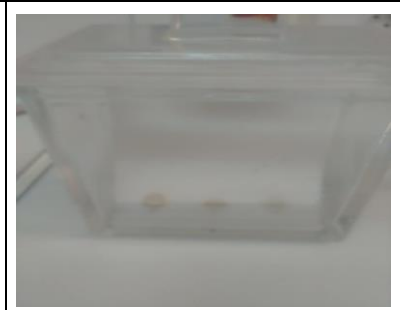
Le dépôt des gouttes a été effectué en répétition plusieurs fois, en séchant entre chaque dépôt. La plaque de silice a été ensuite introduite au niveau de la cuve en verre contenant la phase mobile.

La plaque a été enlevée, lorsque le solvant a atteint 0,5 cm du sommet de la phase stationnaire après sa migration par capillarité. Un réactif contenant un mélange d'orcinol sulfurique et d'acide sulfurique a été pulvérisé, dans le but de révéler la présence des rhamnolipides par l'interaction du réactif de l'orcinol sulfurique et des rhamnolipides. La plaque a été ensuite séchée à 80°C pendant 15min (CHERIF, 2016).

La solubilité relative des composés a été calculée par l'équation suivante :

$$R_f = \frac{\text{la distance parcourue par le composé}}{\text{la distance parcourue par l'éluant}}$$

Tableau 05 : Etapes de la réalisation de la CCM

		
<p>La cuve en verre a été remplie avec 0.5cm de l'éluant (le solvant de migration)</p>	<p>La plaque a été découpée selon la hauteur de la cuve. Une ligne a été tracée délicatement au crayon à un trait de 1cm, afin de mettre les solutions à chaque point</p>	<p>Les surnageants ont été déposés au niveau de chaque point, ensuite la plaque a été introduite délicatement dans la cuve.</p>

IV. Identification de la souche productrice des rhamnolipides

IV.1. Aspect macroscopique des colonies

Une observation à l'œil nu, des colonies sélectionnées productrices de biosurfactants a été de rigueur afin, de voir leur taille, forme, consistance et couleur (les pigmentations).

IV.2. Aspect microscopique des souches

La forme des bactéries et leur mode de regroupement ont été mis en évidence par une observation microscopique.

La coloration de Gram a été réalisée, dans le but de révéler à quel groupe bactérien, l'espèce étudiée appartient.

IV.3. Type respiratoire

La mise en évidence du type respiratoire est réalisée sur une gélose VF. Le milieu a été liquéfié au bain-marie bouillant et régénéré pendant 20 min. Un ensemencement en profondeur dans la gélose VF en surfusion a été réalisé par pique centrale. Associée a une agitation en spirale toute au long du tube à essai, afin de dispersé la souche bactérienne. (Delarras, 2007)

Le tube a été légèrement visé pour permettre la pénétration du dioxygène à l'intérieur du tube et incubé à 37°C pendant 24 à 48h.

IV.4. La galerie API® 20 E

Ce système est composé de microtubes contenant des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser les tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique.

La galerie API® 20 E est un système standardisé permettant d'identifier les entérobactéries et même des non entérobactéries : les *pseudomonas* (Delarras, 2014).

Une colonie bactérienne d'une culture pure a été inoculée dans 5 ml d'eau distillée stérile. La suspension a été ensuite déposée au niveau des microtubes et incubée à 37°C pendant 24h. Après incubation des réactifs ont été ajoutés.

Tableau 06 : étapes de la réalisation de La galerie API® 20 E

Tests biochimiques	Mode de remplissage
ONPG, TDA, IND, GLU, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY, ARA	Les tubes ont été remplis par la suspension bactérienne
CIT, VP, GEL	tubes et cupules ont été remplis par la suspension bactérienne.
ADH, LDC, ODC, H ₂ S, et URE	Les tubes ont été remplis par la suspension bactérienne et les cupules par l'huile de paraffine.
TDA	Réactif ajouté : perchlorure de fer
VP	Réactif ajouté : VP1 (KOH)
IND	Réactif ajouté : Kovacs

V. suivie de la cinétique bactérienne

La spectrophotométrie est une méthode reposant sur l'absorbance des rayons lumineux par le milieu étudié, en vue de déterminer le dosage d'un échantillon selon la longueur d'onde utilisée.

2ml de la suspension bactérienne préalablement pré-enrichi a été inoculé dans un volume de 200 ml du milieu de fermentation dans une fiole erlenmeyer de 500 ml.

L'étalonnage du spectrophotomètre a été effectué par le milieu de fermentation vierge à une longueur d'onde de 600nm, suivi par la mesure de la charge bactérienne à t_0 .

Le milieu inoculé a été ensuite incubé à 37°C avec agitation, une heure après, la charge a été de nouveau mesurée.

V.1. Dosage des Rhamnolipides

A la 3^{ème} heure, le contenu de la cuve mesuré a été transféré dans un microtube et centrifugé à 12000 rpm pendant 15min. En fin de centrifugation, 200µL du surnageant a été transféré dans un tube à hémolyse en verre, ou une quantité de 400 µl du réactif d'orcinol sulfurique a été ajoutée suivie de 3ml d'acide sulfurique concentré à 60%.

Le mélange a été homogénéisé et mis au bain marie à 80°C pendant 25min, puis il a été refroidi à l'obscurité pendant 30min. La mesure de la DO pour les rhamnolipides a été effectuée à 420nm.

L'étalonnage a été réalisé en utilisant le milieu de fermentation vierge qui a suivi la même procédure de préparation de la mesure des rhamnolipides.

La mesure de la biomasse bactérienne et la production des rhamnolipides ont été effectuées après chaque 1h 30 min. en suivant à chaque fois les mêmes étapes de préparation, et en gardant entre chaque dosage, le milieu inoculé en étuve et sous agitation afin de permettre aux microorganismes de croître et de produire leurs biomolécules (**CHERIF, 2016**).

Résultats

I. Isolement et purification

I.1. Préparation des dilutions et isolement

Différents aspects de colonies bactériennes provenant des échantillons du sol ont été isolés sur GN, allant d'une forme irrégulière à une forme ronde, d'un relief bombé à un relief plat, d'une couleur blanche-grisâtre à une opacité réduite, d'une texture visqueuse à une texture rigide.

Les mêmes colonies isolées sur le milieu de confirmation gélose au cétrimide n'ont révélé aucune présence des deux espèces recherchées : *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*.

Aucune pigmentation de type Pyoverdine produite par ces deux espèces n'a été diffusée sur ce milieu, même si certaines espèces ont pu croître sur ce milieu sélectif. Seule la souche CH (**CHERIF**) qui a été précédemment prélevée à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures et purifiée auparavant, a produit de la Pyoverdine (figure 21).

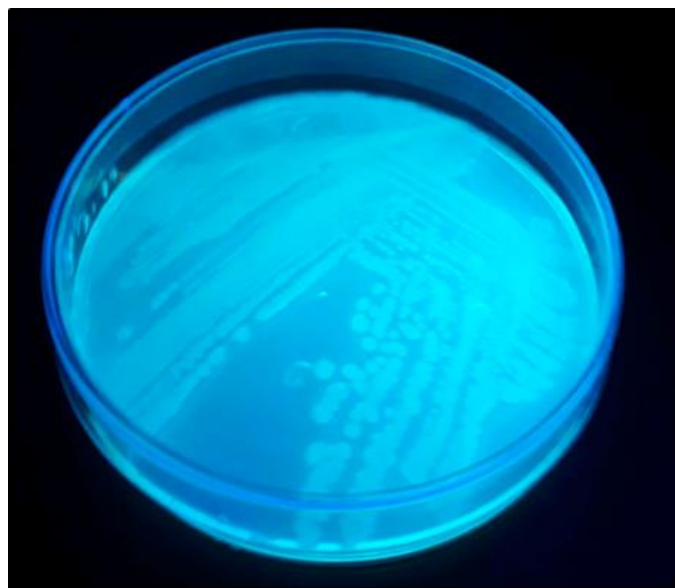


Figure 21 : Souche CH cultivée sur gélose au Cétrimide et observée sous UV

Les colonies présumées être des *Bacilles* ou des *Pseudomonas* selon le biotypage de la première étape du diagnostic bactérien reposant sur la morphologie et l'odeur de la colonie, ont été purifiées, afin de procéder au criblage primaire (test d'hémolyse).

Tableau 07 : caractéristiques macroscopiques des *Bacilles* et des *Pseudomonas*

Forme : irrégulière Relief : lobé Couleur : blanche-grisâtre Texture : rigide	Caractéristiques des <i>Bacilles</i>
Forme : plus au moins ronde Relief : convexe Couleur : crème d'une opacité réduite Texture : visqueuse	Caractéristiques des <i>Pseudomonas</i>

I.2. Criblage des souches productrices des biosurfactants

I.2.1. Test d'hémolyse

Les isolats bactériens retenus pour le test d'hémolyse ont révélé que six espèces provenant des prélèvements, et cinq autres souches initialement purifiées, ont été hémolytiques. Cela a été traduit par la création de zones claires ou incolores autour des colonies.

Ces résultats positifs, ont suggéré que ces souches sont productrices de biosurfactants. Les souches ont été repiquées sur GN inclinée, pour être conservées pendant une certaine durée.

Tableau 08 : Critères de croissance des souches sur gélose au sang

Souche /critère	Diamètre (mm) De la zone d'hémolyse	Couleur	Résultats
C	2	transparent	++
M'	1,4	transparent	++
M''	1,5	transparent	++
SM'	1.2	transparent	++
L	0,0	absence	-
HL	2	verdâtre	+
SR	0.9	verdâtre	++
CH	3	Transparent	++
3	2.2	Transparent	++

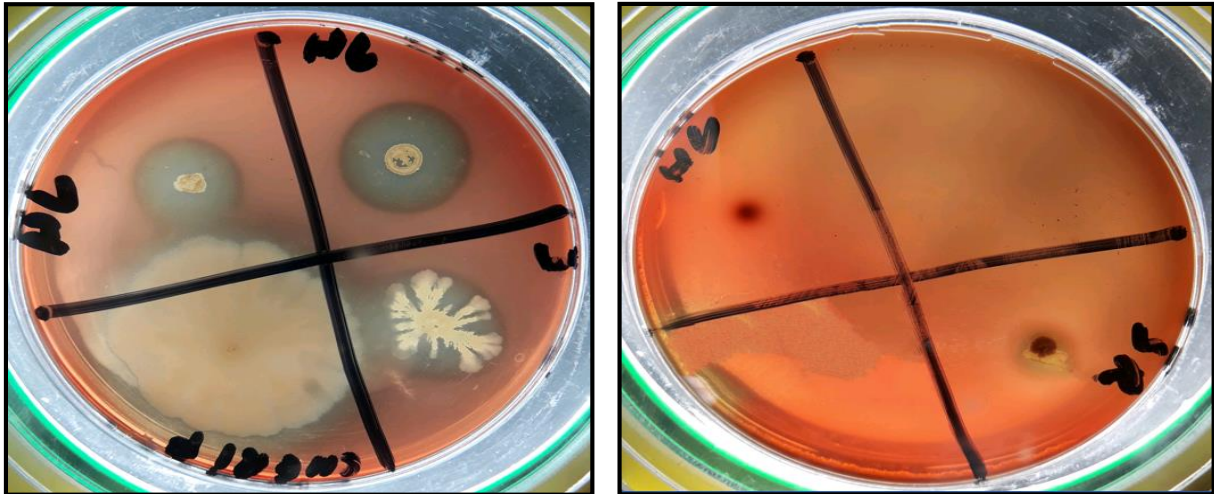


Figure 22 : Développement des souches sur milieu gélose au sang

II. Etude de production des biosurfactants

II.1. Production des tensioactives

Six souches bactériennes ont été sélectionnées pour l'étude de la production des biosurfactants. Trois souches provenant des prélèvements du sol ainsi que trois autres déjà prêt à l'emploi, ont été choisies en fonction de leur diamètre hémolytique produit.

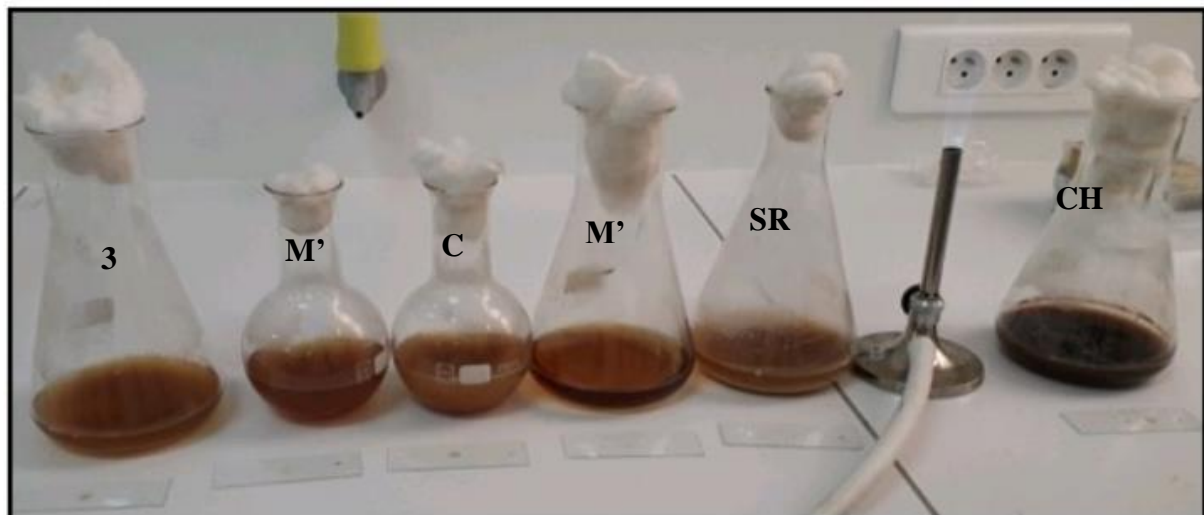


Figure 23 : Les Six souches inoculées sur un milieu de sels minéraux

II.2. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants

II.2.(1,2). Test de « Drop Collapsing » et Test de dispersion du pétrole

Le test positif du « Drop Collapsing », a révélé que la souche CH est une souche productrice de biosurfactants.

La production de mousse a été observée au niveau du 1^{er} milieu et du milieu MSM. Après séparation des surnageants et des culots des trois milieux de fermentation, le test de « Drop Collapsing » et de dispersion du pétrole ont été refaits pour voir la production des biosurfactants de la souche CH dans chacun des trois milieux utilisés.

Pour le « Drop Collapsing », la goutte des surnageants du 1^{er} milieu et du milieu MSM ont subi un effondrement au contact de l'huile de paraffine contrairement à la goutte du surnageant du milieu LB qui elle, été restée stable.

Pour le test de dispersion du pétrole, de grandes zones claires ont été créés après l'ajout du surnageant du 1^{er} milieu et du milieu MSM, en revanche aucune zone n'a été détectée pour le milieu LB.

Tableau 09 : Résultats du test de « Drop Collapsing » et du test de dispersion du pétrole

Souches	Production de mousse	Test de « Drop Collapsing »	Test de dispersion du pétrole
C	-	-	-
M'	-	-	-
M''	-	-	-
3	-	-	-
SR	-	-	-
CH	+	+	+

Test positif : + Test négatif : -

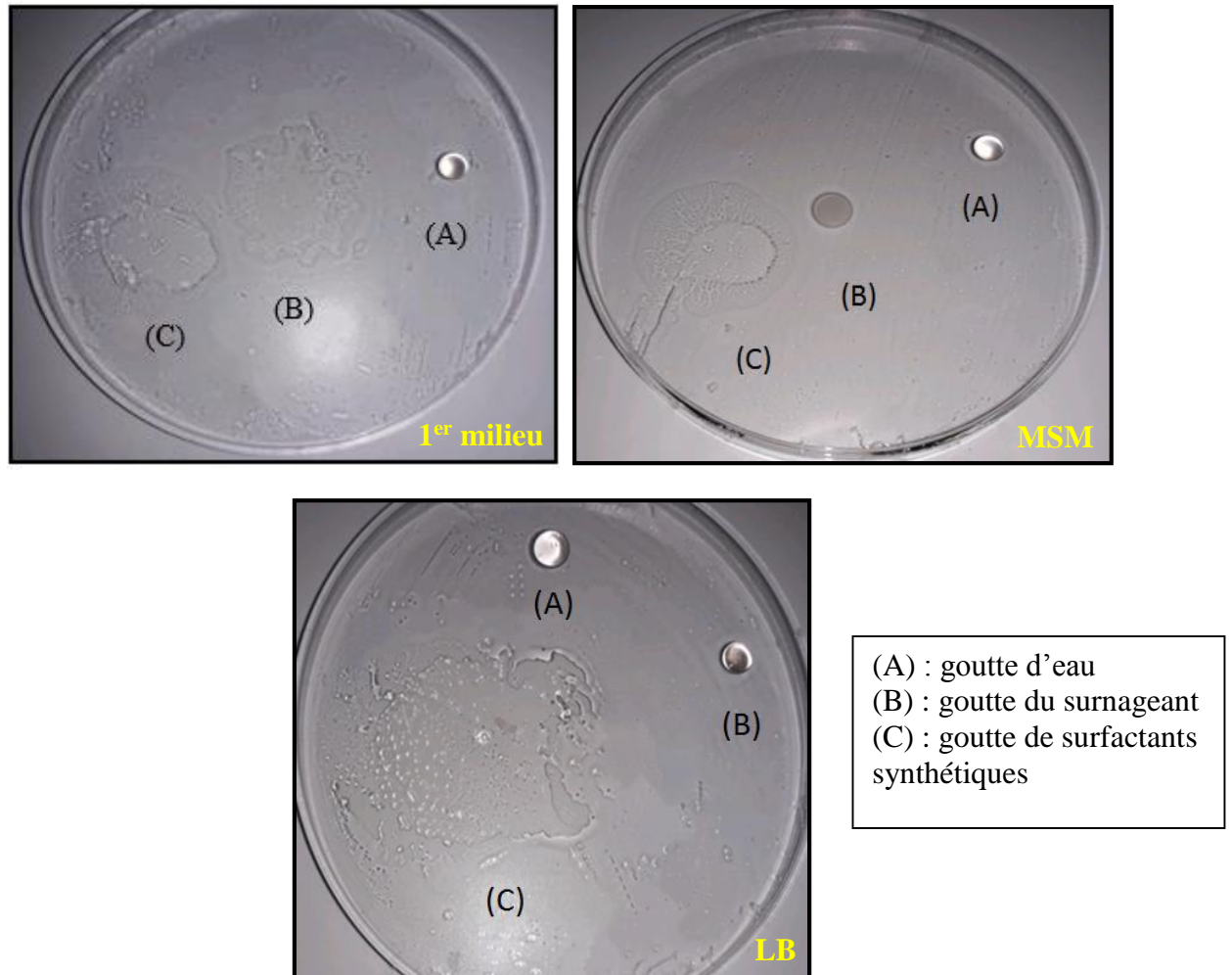


Figure 24 : Tests du « Drop Collapsing »

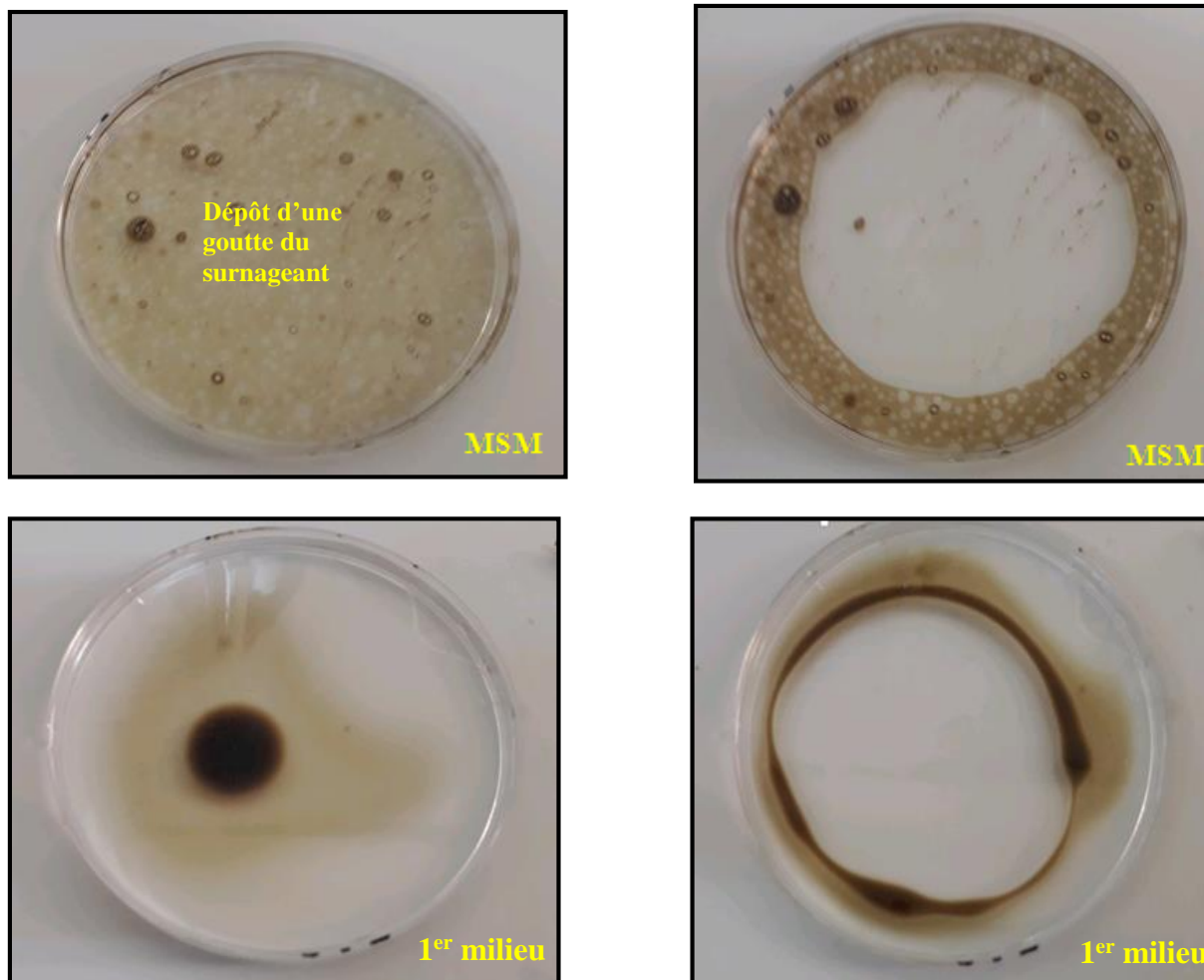


Figure 25 a : Tests positifs de dispersion du pétrole

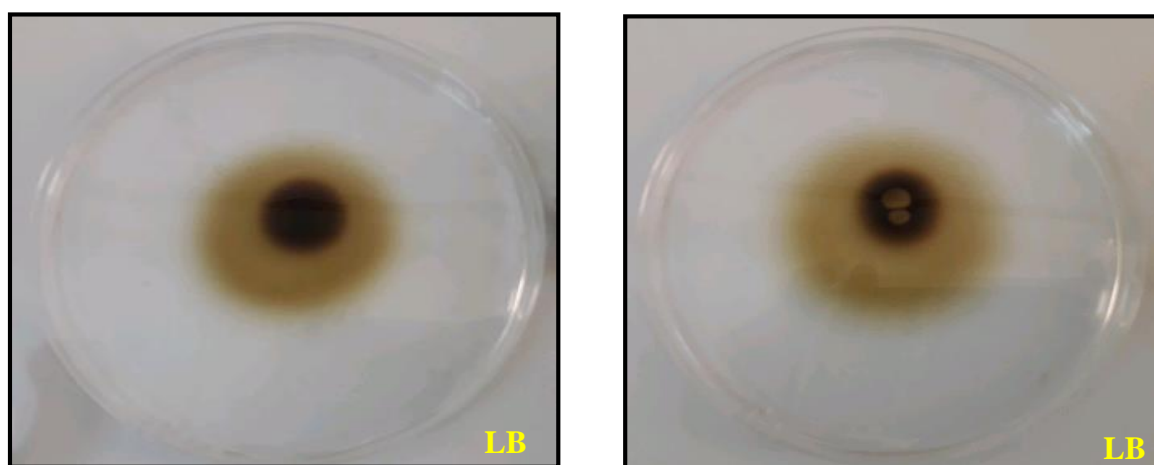


Figure 25 b : Test négatif de dispersion du pétrole

II.2.3. Test d'émulsification (E24)

Une grande hauteur au niveau de la partie supérieure du tube en verre, contenant le surnageant du 1^{er} milieu a été émulsionnée. En revanche, une partie infime d'émulsion entre les deux phases du kérosène et du surnageant du milieu MSM a été formée.

L'index d'émulsification du 1^{er} milieu :

$$E24 = (4,9/6,5) \cdot 100\%$$

$$E24 = 75,36\%$$

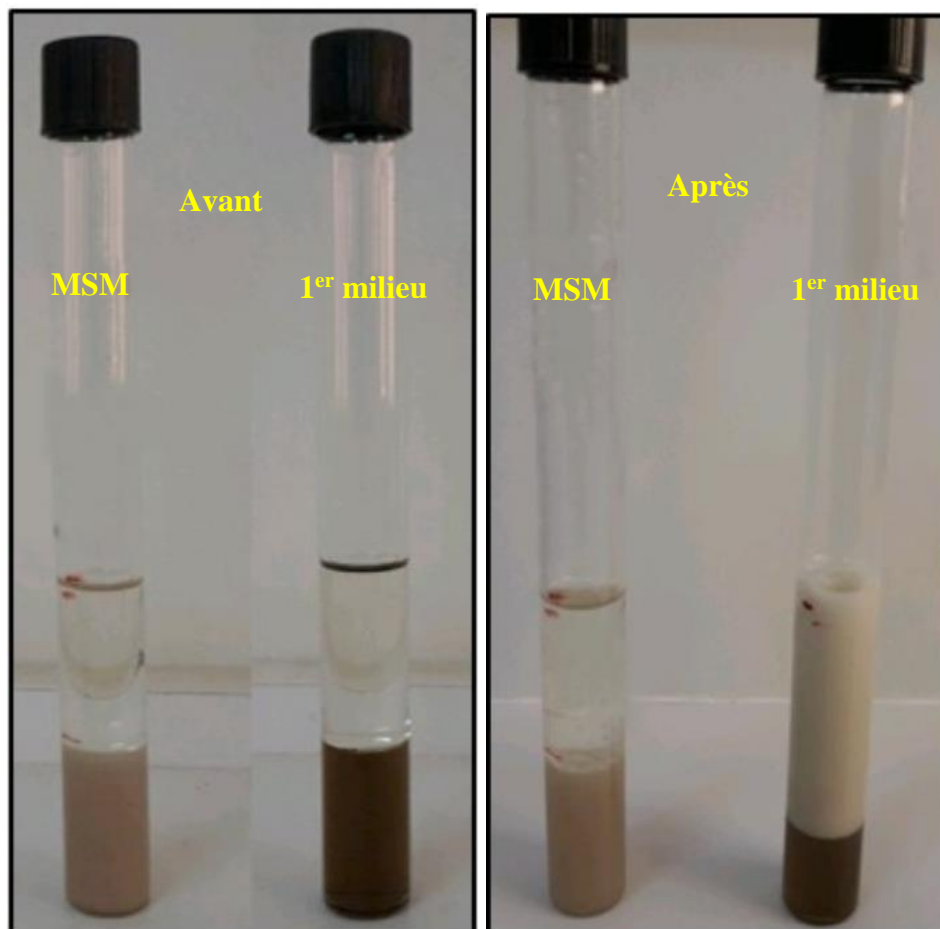


Figure 26 : Test d'émulsification des surnageants du 1^{er} milieu et du milieu MSM

II.2.4. Swarming Motility

Une surface de translocation bien définie, a été formée par l'effet d'envahissement de la souche CH sur le milieu nutritif additionné par 1% d'agar, ce qui montre que cette souche possède le mode de motilité « Swarming ».



Figure 27 : Swarming Motility de la souche CH

II.2.5. Ensemencement du milieu CTAB

Deux zones bleu foncées ont été formées sur le milieu CTAB, autour de deux des trois puits qui ont été inoculés par les surnageants des trois milieux de fermentation inoculés par la souche CH.

Tableau 10 : Résultats de l'ensemencement du milieu CTAB des trois surnageants des milieux de fermentation

Surnageant du milieu	Résultats
sels minéraux	+
MSM	+
LB	-

Zone bleu foncé : +

Pas de zone bleu foncé : -

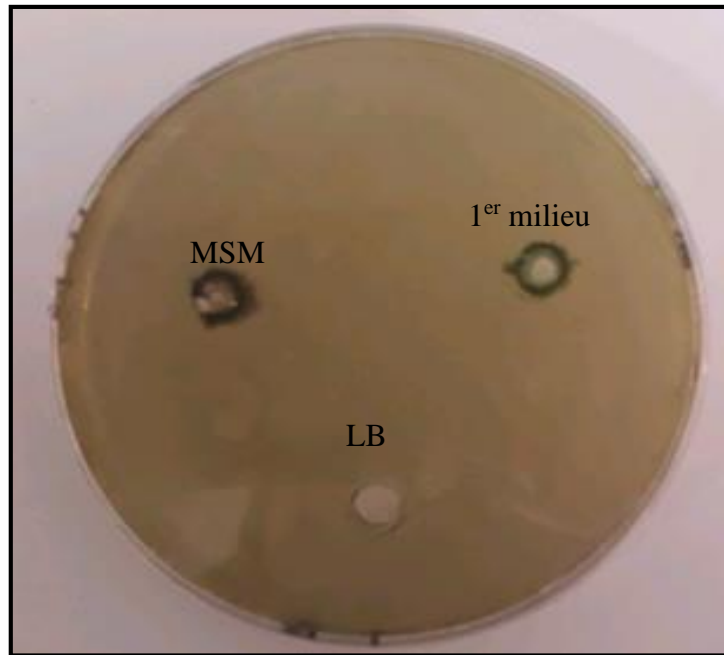


Figure 28 : Milieu CTAB ensemencé par les trois surnageants des milieux de fermentation

III. Caractérisation des biosurfactants

III.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture

La pesée des trois culots a révélé la biomasse bactérienne de chaque milieu qui a été utilisé.

Tableau 11 : Valeurs des poids des tubes et des poids secs des culots

Milieux	Total : Poids sec (culot) + poids du tube (g)	Poids du tube (g)	Poids sec du culot (g)
1 ^{er} Milieu	11,55	10,07	1,48
MSM	10,89	10,15	0,74
LB	10,34	10,29	0,05

III.2. Chromatographie sur couche mince

Le chromatogramme a révélé que le 1^{er} milieu contenait des dirhamnolipides, et le milieu MSM contenait des monorhamnolipides, alors que le milieu LB été exempt de rhamnolipides.

La migration du dirhamnolipide est moins importante que la migration de monorhamnolipide part à part à la phase mobile. Un composé moins soluble à une valeur Rf plus petite qu'un composé plus soluble.

Le rapport frontal du 1^{er} milieu :

$$R_f = 4,7/12,5 \quad R_f = 0,376$$

Le rapport frontal du milieu MSM :

$$R_f = 8/12,5 \quad R_f = 0,64$$

La solubilité relative des composés des trois surnageants des milieux de fermentation reposant sur le nombre de rhamnose produit (poids moléculaire), a permet une différenciation entre la présence, l'absence et la forme des rhamnolipides produits par la souche CH dans chaque milieu de fermentation.

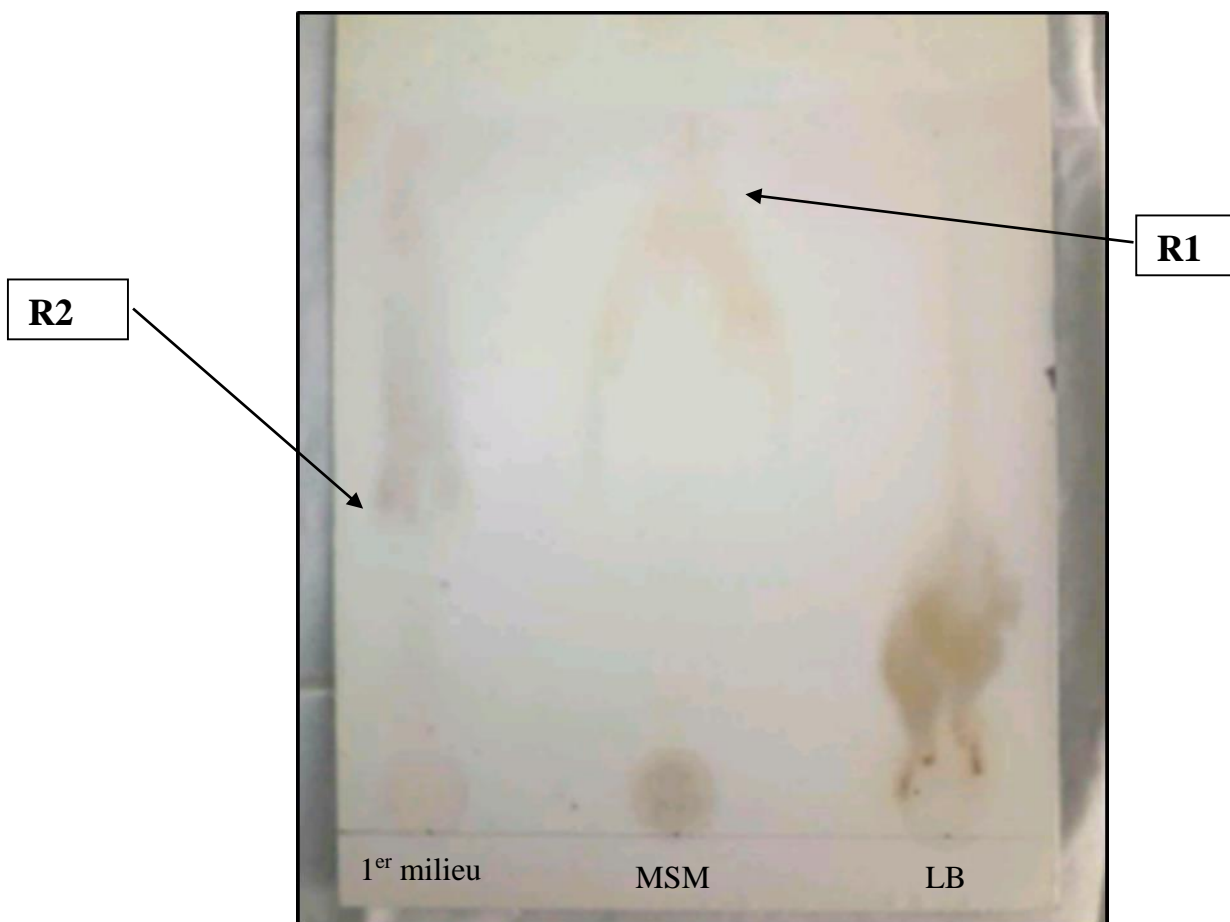


Figure 29 : Résultats de la CCM. R1 : monorhamnolipide, R2 : dirhamnolipide

IV. Identification de la souche productrice des rhamnolipides

IV.1. Aspect macroscopique des colonies

Tableau 12 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu gélose au sang

Souche /critère	Forme	Couleur	Relief	Texture
C	Régulière	Blanche claire	Plat	Visqueuse
M'	Irrégulière	Blanche	Plat	Rigide
M''	Régulière	Grise	Plat	Rigide
F	Irrégulière	Blanche	Plat	Rigide
SM'	Régulière	Grise	Bombé	Rigide
H	Irrégulière	Transparente	Plat	Rigide
3	Irrégulière	grise	Plat	Rigide
HL	Régulière	Crème	Plat	Visqueuse
SR	Régulière	Marron	Plat	Visqueuse
CH	Régulière	Transparente	Plat	Visqueuse
R	irrégulière	Blanche	Plat	Rigide

-Une diffusion du pigment jaune-vert (Pyoverdine) produit par la souche CH, a été observée sur le milieu King B.

La production de la Pyocyanine par la même souche a aussi été observée sur le milieu King A.

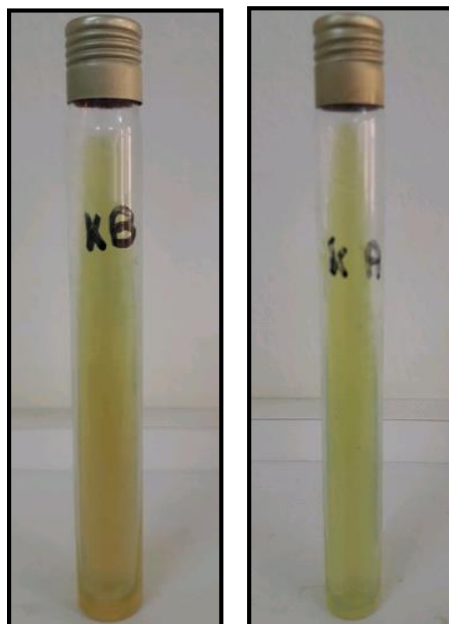


Figure 30: Observation sans UV De la Souche CH sur milieu King B à gauche, et sur milieu King A à droite

IV.2. Aspect microscopique des souches

Pour la souche CH, la coloration de Gram a révélé les caractéristiques suivantes :

Tableau 13 : Caractéristiques microscopiques de la souche CH

Caractéristiques	Résultats
Morphologie	Bacilles droits et fins
Mode de regroupement	Isolés ou diplobacilles
Gram	-

Pour la souche C la coloration au bleu de méthylène a révélé une forme bacillaire.

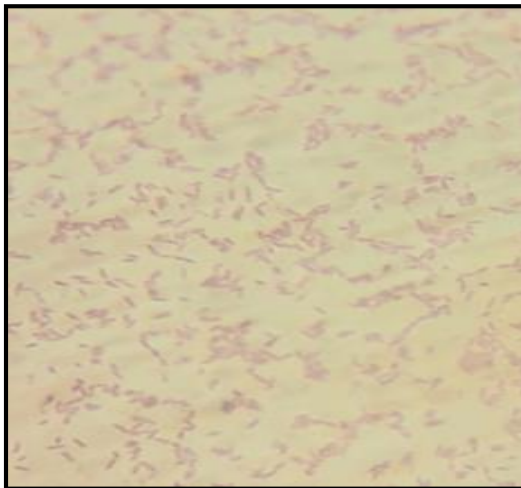


Figure 31a : Observation microscopique de la souche CH après coloration de Gram grossissement $\times 100$

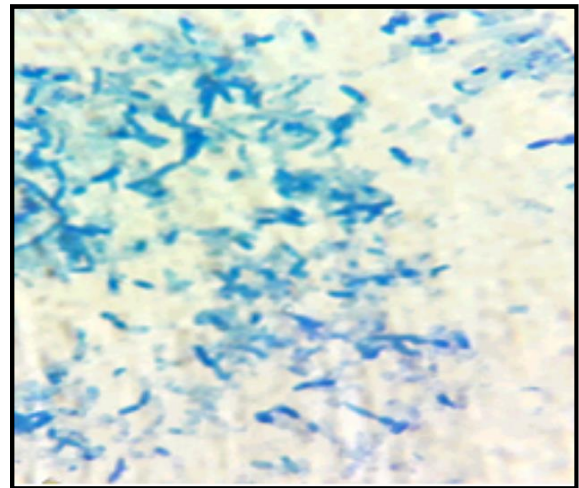


Figure 31b : Observation microscopique de la souche C colorée au bleu de méthylène grossissement $\times 100$

IV.3. Type respiratoire

Le développement de la culture de la souche CH sur milieu VF, a été détecté seulement à la surface du milieu, ce qui signifie que la souche CH est aérobie stricte.

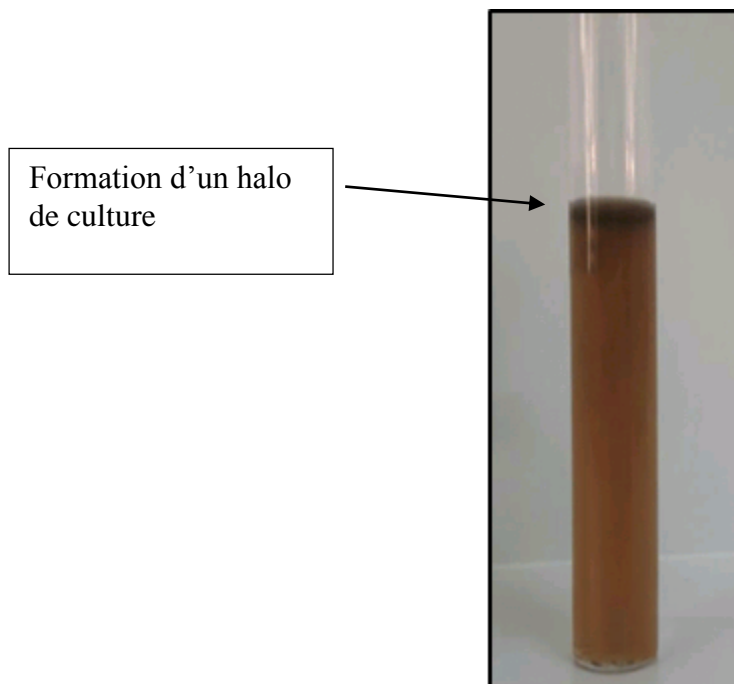


Figure 32 : Croissance de la souche CH à la surface du milieu de culture VF

I.V.4. L'identification de la souche productrice des biosurfactants

Les résultats des tests précédemment effectués ont montré que la souche CH peut être une *P.aeruginosa*.

Pour confirmer ce résultat, d'autres tests biochimiques ont été réalisés. L'identification de l'espèce *P.aeruginosa* par le système API 20 E, repose sur en moins quatre tests biochimiques : CIT, GEL, GLU et ARA qui doivent d'être positifs au moment de la lecture de la galerie (annexe 4-A), selon le résultat du biotype du profil API 20E obtenu par **AMATO et al. , 1980**. Ces tests inoculés par la souche CH ont été positifs.

Tableau 14 : Résultats des tests biochimiques inoculés par la souche CH

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	+	-	-	-	-	-	-	-	+



Figure 33 : Galerie API 20 E inoculée par la souche CH

V. Suivre de cinétique bactérienne et de production des Rhamnolipides

Les valeurs enregistrées de la DO de la souche CH ont révélé une phase d'adaptation de 3h au milieu de fermentation utilisé (1^{er} milieu) avec une charge initiale de 0,014 sans aucune production des rhamnolipides.

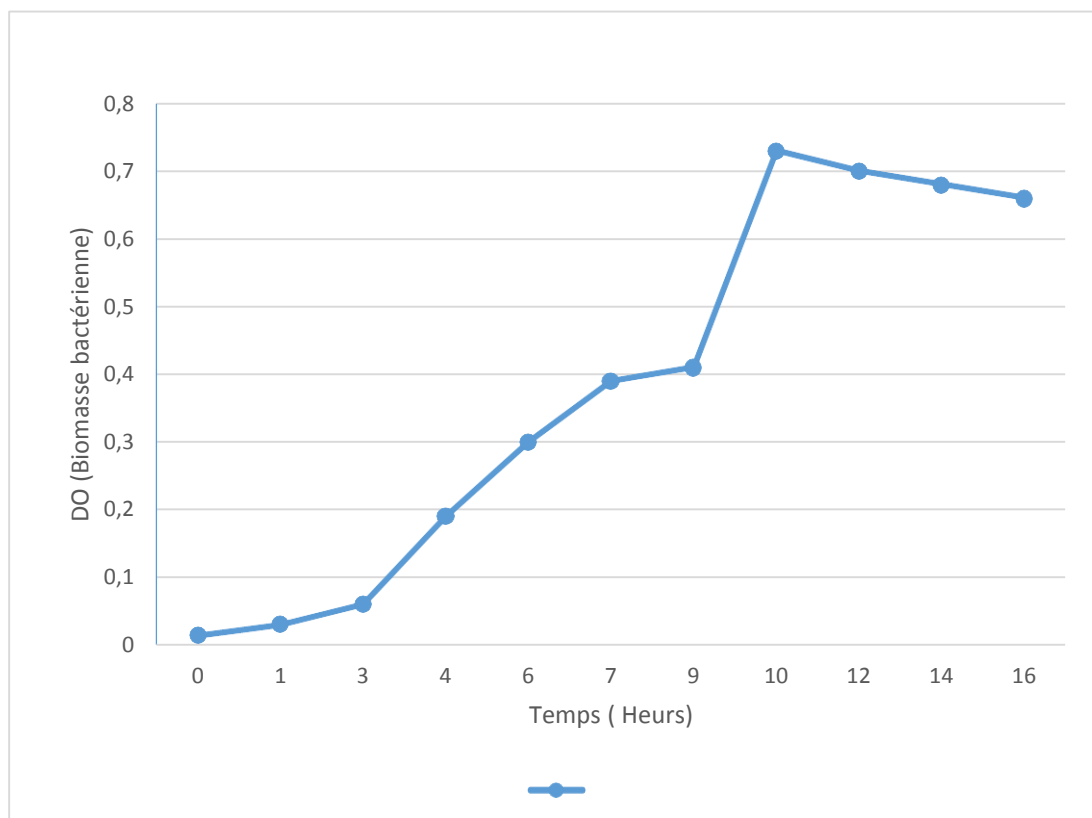
Le début de la phase exponentielle a été constaté à la 3^{ème} heure, avec une légère production des rhamnolipides, la production de ces biomolécules a été à son maximum à la 6^{ème} heure vers la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire avec une biomasse bactérienne de 0,3. Après la 6^{ème} heure la concentration en rhamnolipides a diminué avec le ralentissement de la croissance de la souche CH (phase stationnaire de 7h à 9h).

Un pic dans la biomasse bactérienne a été observé à la 10^{ème} heure, avec une DO de 0,73 ; 2^{ème} phase exponentielle de 9 à 10h mais toujours avec la diminution de la concentration des rhamnolipides présents dans le milieu de fermentation.

A la 10^{ème} heure jusqu'à la 16^{ème} heure, diminution de la biomasse bactérienne (Phase de déclin), avec un abaissement remarqué de la concentration en rhamnolipides se trouvant dans le milieu de fermentation entre la 10^{ème} heure et la 12^{ème} heure. Une légère remontée dans la concentration des biosurfactants a été observée à la 16^{ème} heure.

Tableau 15 : Valeurs de la biomasse bactérienne et des rhamnolipides en fonction du temps

Temps (h)	Biomasse bactérienne	Rhamnolipides
0	0,014	0
1	0,03	0
3	0,06	0,8
4	0,19	2,1
6	0,3	3,2
7	0,39	2,5
9	0,41	1,5
10	0,73	1,4
12	0,7	0,8
14	0,68	0,77
16	0,66	0,79

**Figure 34** : Mesure de la biomasse bactérienne en fonction du temps

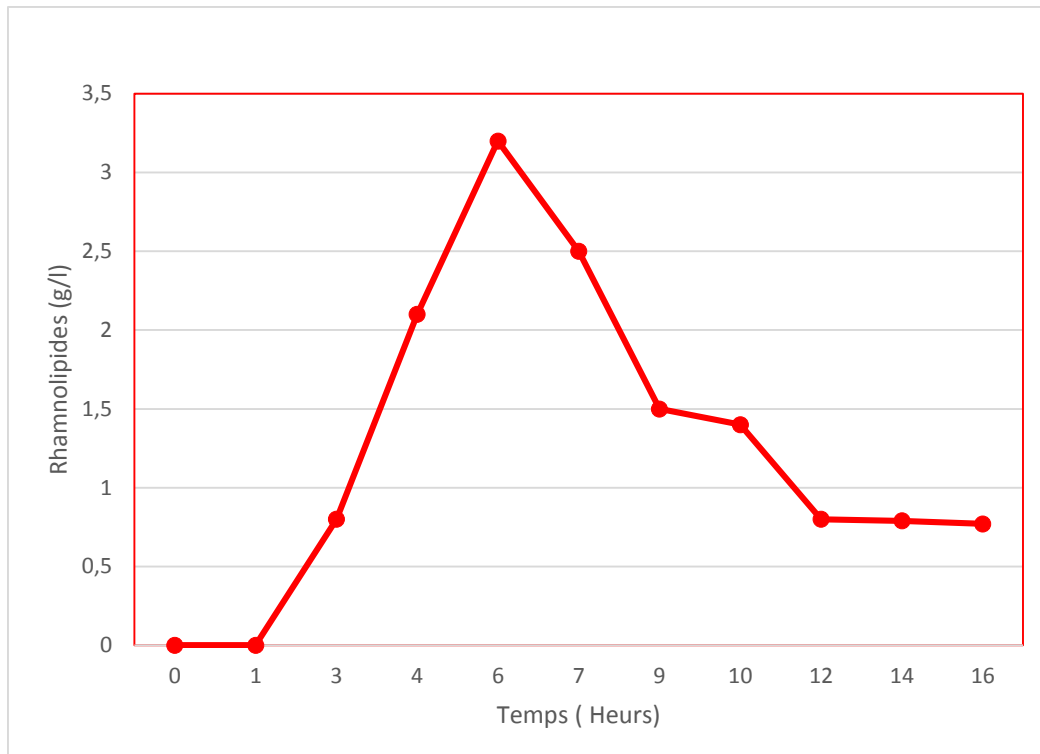


Figure 35 : Mesure des rhamnolipides en fonction tu temps

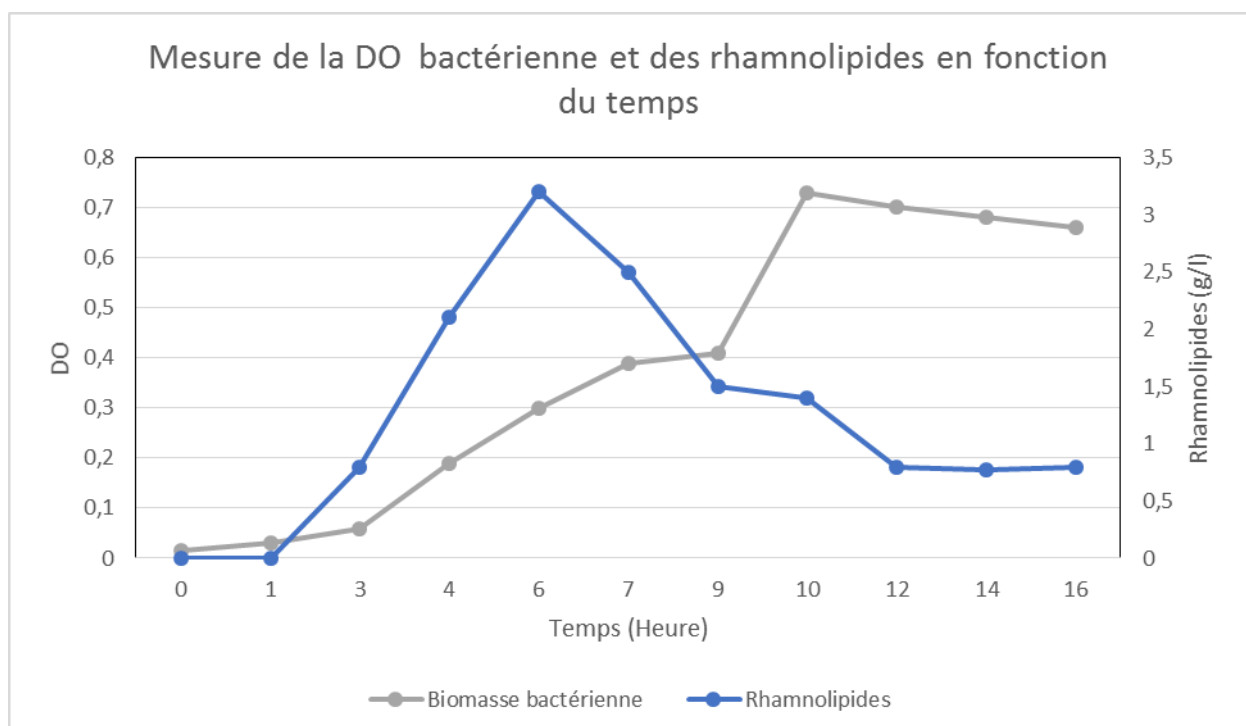


Figure 36 : Mesure de la DO bactérienne et des rhamnolipides en fonction du temps

Discussion

Les biosurfactants sont des biomolécules d'origine microbiennes qui ont différents macrobiotes. Les hydrocarbures sont utilisés comme substrat pour la production de biosurfactants. Il a été postulé que la fonction biologique des composés tensioactifs est liée à l'absorption d'hydrocarbures, et donc une libération spontanée se produit avec ces substrats (**Guerra-Santos et al, 1984**).

Rocha et al. , 1992 ainsi que **Shafeeq et al. , 1989** ont isolé des souches productrices de biosurfactants de *P. aeruginosa* provenant respectivement de différentes sources liées au pétrole au Venezuela et d'échantillon d'hydrocarbures épandus au Pakistan.

Sur les vingt prélèvements qui ont été prélevés de sols pollués par les hydrocarbures, plus quatre provenant de terres agricoles, douze issus des sites pollués ont été positives au test d'hémolyse.

D'après **Banat, 1993**, l'une des caractéristiques de certains biosurfactants est leur capacité à hémolyser le sang. Les travaux menés par **Jarvis et Johnson en 1940** ; et **sierra en 1960**, démontrent que les glycolipides produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa* ont un excellent effet hémolytique.

Parmi les douze souches positives, la souche CH qui produit de la Pyoverdine sur gélose au cétrimide, c'est avérée une colonie envahissante sur gélose au sang.

Jain et al. , 1991 ont étudié le test de «Drop Collapsing» en utilisant des souches spécifiques. La goutte contenant la souche *A. calcoaceticus ATCC 31012* qui a produit des biosurfactants seulement en présence d'hydrocarbures a été stable lorsque la souche a été cultivée avec du glucose, en revanche lorsque la source de carbone a été de l'hexadécane une instabilité instantané de la goutte au contact de la surface huileuse a été constatée. Au parallèle la goutte contenant la suspension de *P. aeruginosa UG2* cultivée sur du glucose et qui a produit une quantité plus grande de biosurfactants, a présenté une instabilité et un effondrement plus rapide au contact de la surface que celle qui a été cultivée sur de l'acétate de sodium. En revanche la goutte de la suspension *E. coli N_{xr}* était restée stable, ce qui a indiqué l'absence de production de surfactants. Le test d'hémolyse a révélé que la souche productrice de biosurfactants *P. aeruginosa UG2* était hémolytique, alors que la souche *E. coli N_{xr}* n'avait aucun pouvoir hémolytique.

Parmi les six souches qui ont été inoculées dans un milieu de base contenant du glucose et du glycérol comme source de carbone, du nitrate de sodium comme source d'azote, FeSO₄ comme source de fer, et CaCl₂ comme source de calcium avec un pH de 7,07. Seule la souche CH présentait une instabilité au test de « Drop Collapsing ».

Désai et banat, 1997, ont rapporté que la vitesse d'agitation ainsi que l'aération influencé le rendement de production des biosurfactants.

La souche CH a été réinoculée dans le 1^{er} milieu avec la même température d'incubation, mais avec une agitation plus rapide et donc une meilleure aération, a produit une grande quantité de biosurfactants, qui a été constatée par la formation de mousse et un effondrement plus grand et plus rapide au test de «Drop Collapsing» que sa première inoculation.

La formation de mousse est observée lorsque des quantités importantes de rhamnolipides sont produites (**Syldatk et al. , 1985**).

La souche CH a été aussi inoculée dans deux autres milieux de fermentation : le milieu MSM contenant de l'huile d'olive comme unique source de carbone, du nitrate d'ammonium comme source d'azote, FeSO₄ comme source de fer, et du CaCl₂ comme source de calcium avec un pH de 6,93, et le milieu LB contenant aucune source de carbone et du chlorure de sodium avec un pH de 6,9.

Une quantité de production moins importante de biosurfactants a été observée sur milieu MSM par à port au 1^{er} milieu, par l'émulsification de l'huile d'olive et le test de « Drop Collapsing », avec une faible formation de mousse sur la surface du milieu. En revanche sur milieu LB aucune production de tensioactives n'a été décelée.

Itoh et al. , 1971 ; Robert et al. , 1989, démontrent par leurs travaux que les meilleurs sources de carbone pour les rhamnolipides sont les substances non miscibles à l'eau et le glycérol, selon **Syldatk et al, 1985**, un rendement de production rhamnolipidiques plus élevé est obtenu, quand les cellules cultivées sur du glucose utilisent le glycérol ou les huiles végétales (huile d'olive) comme source de carbone.

Les recherches menées par **Guerra-Santos et al en 1984 et 1986**, montrent clairement qu'une bonne production de rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* réside dans son contrôle métabolique via les exigences qualitatives et quantitatives nutritionnelles et environnementales par une concentration minimisée en fer et en sels respectifs de sodium et de traces éléments, un rapport C/N optimal ainsi que le bon choix de la source d'azote, l'optimum du pH et de la température. Les mêmes constatations ont été obtenues par **Syldatk et al. , 1985**, ou les ions multivalents Ca²⁺, Fe²⁺ ont été essentiels pour la croissance de *Pseudomonas spec. DSM 2874*. Le Ca²⁺ a une grande quantité provenant de CaCl₂ n'avait aucune influence sur la production de rhamnolipides, contrairement à l'ion de Fe²⁺ ou une légère inhibition dans la production a été observée même à une faible quantité, les limitations d'azote ainsi que ces différents sources avait aussi une influence sur la production. Une concentration élevée

en chlorure de sodium a conduit à une inhibition distincte de la production de rhamnolipides. Il avait aussi constaté que l'optimum du pH pour la production de rhamnolipides est entre un intervalle de 6,0 et 7,2 avec une production maximale à une température de 37°C.

Le test de « Drop Collapsing » peut donner des résultats négatifs si le taux de surfactants est faibles (**Jain et al. , 1991**).

La souche C qui a été réinoculée dans le milieu LB avec comme source de carbone de l'huile d'olive et une durée d'incubation réduite, a été positive au test de dispersion du pétrole, mais négative au premier test de «Drop Collapsing».

Sidkey et al. , 2016 ont rapporté que la grandeur de la zone claire formée dans le test de dispersion du pétrole est corrélée avec le taux de production de biosurfactants.

El-Sheshtawy et Doheim, 2013, indiquent que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est hautement positive pour la production de biosurfactants par le test de déplacement du pétrole ou une zone de 8 cm de diamètre a été formée.

Une grande zone claire, d'un diamètre important a été formée par la souche CH, par contre celle de la souche C a été négligeable par rapport à celle de la souche CH.

P. aeruginosa est capable de se propager sur des surfaces semi-solides par le mode de «Swarming Motility» (**Köhler et al. , 2000**).

Siegmund et Wagner, 1991, ont développé le test CTAB pour détecter la production de surfactants anioniques (les rhamnolipides).

La souche CH a été capable de se propager sur un milieu contenant 1% d'agar, et le test CTAB a été positif pour les surnageants des deux milieux de fermentation : le 1^{er} milieu et le milieu MSM.

Guerra Santos et al. , 1986, ont étudié l'influence du taux de croissance (dilution) sur la production de biosurfactants. À des taux de dilution plus élevés, une diminution de la production de biosurfactants est produite, par contre la concentration de biomasse diminue légèrement à mesure que le taux de dilution augmente.

L'analyse des poids secs des culots de la souche CH, dans chaque milieu a montré une corrélation entre le taux de production des biosurfactants et la biomasse bactérienne. La plus grande biomasse a été enregistrée dans le 1^{er} milieu où la production des biosurfactants a été la plus élevée.

El-Sheshtawy et Doheim, 2013 ; Sidkey et al. , 2016, ont obtenu un pouvoir émulsifiant de leurs souches respectives de *P.aeruginosa* de 70% et 66,8%. Un pouvoir émulsifiant de 75,36% a été calculé chez la souche CH.

Un rapport frontal de 0,64 a été calculé, ce qui a confirmé la présence de glycolipides au niveau des deux milieux de fermentation : le 1^{er} milieu et le milieu MSM. La valeur Rf des rhamnolipides standard est de 0,69 (**Sharma, 2014**).

Pseudomonas aeruginosa produit deux formes de rhamnolipides les monorhamnolipides et les dirhamnolipides (**Guerra-Santos et al. , 1984**).

La CCM a révélé la production de deux formes de rhamnolipides les monorhamnolipides et les dirhamnolipides par la même souche : la souche CH.

En fonction des résultats obtenus au niveau macroscopique, microscopique, du type respiratoire, et des deux tests positifs d'hémolyse et de «Swarming Motility», qui laissent suggérés que la souche CH étudiée est une *P.aeruginosa*.

Le système multitest API-20E permet d'identifier des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* (**AMATO et al. , 1980**).

Amato et al. , 1980, ont réussi à identifier des isolats de *P.aeruginosa* en utilisant le système API 20 E, une excellente identification a été obtenue par le profile biotique de la galerie API 20E suivant ; 2206006.

Le profile biotypique de la galerie API 20 E sans le 21^{ème} test d'oxydase qui a été obtenu de la souche CH a été le suivant : 2206002.

Conclusion

Au cours des dernières années, les biosurfactants ont reçu une attention considérable en raison de leur origine naturelle, de leur faible toxicité et de leur biodégradabilité élevée (**Ben Belgacem et al. ,**). Mais d'un point de vue économique, ils ne sont pas compétitifs avec leurs homologues synthétiques. Les coûts de production élevés ne peuvent être acceptés que pour les biosurfactants utilisés dans les produits à faible volume et dans les produits à prix élevé tels que les cosmétiques et les médicaments. Néanmoins, les biosurfactants peuvent être produits avec un rendement élevé par certains micro-organismes, en particulier *Pseudomonas spp.* en utilisant diverses ressources de renouvellement et déchets industriels (**Kaskatepe et al. , 2015**).

Les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent réduire la tension de surface, stabiliser les émulsions et favoriser le moussage (**Rahman et al. , 2002**), ils présentent un bon pouvoir émulsifiant par rapport aux tensioactifs chimiques (**Syldatk et al. , 1985**).

La souche CH qui a été utilisée dans cette étude, a été extraite d'un sol pollué par les hydrocarbures à Tlemcen, et a été identifiée comme une *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette souche a été capable de produire des biosurfactants rhamnolipidiques de deux formes : les monorhamnolipides et les dirhamnolipides dans deux milieux différents. Les dirhamnolipides ont été produits sur le 1^{er} milieu, alors que les monorhamnolipides ont été produites sur le milieu MSM.

Le meilleur rendement de production de ces biosurfactants par la souche CH a été obtenu vers la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire, ou les nutriments devenaient limités.

Les deux formes de rhamnolipides ont manifesté un grand potentiel de dispersion d'huile de moteur, ce qui peut être utile dans la bioremediation contre les déversements du pétrole et de ces dérivés dans les sols et les eaux.

Quant aux dirhamnolipides, ils ont aussi présenté un excellent pouvoir émulsifiant de 75,36%, ainsi qu'une capacité de formation de mousse. Ces caractéristiques peuvent être utilisées dans divers domaines en particulier dans les domaines : cosmétiques, produits ménagers et alimentaires.

En plus de ces propriétés, ils ont la capacité de réduire la tension superficielle entre deux phases immiscibles. Cette caractéristique est très utilisée dans le domaine de récupération du pétrole.

D'après cette étude et les résultats obtenus :

-Les sols pollués par les hydrocarbures sont des sites adéquats pour l'isolement de souches productrices de biosurfactants ;

-la culture de ces souches peut se faire sur des substrats peu coûteux et donner un bon rendement de production.

Et comparé aux résultats obtenus par d'autres :

- Un bon rendement est obtenu lorsque la souche est cultivée sur le même substrat (source de carbone) ou de même nature que le substrat trouvé dans son habitat (adaptation environnementale).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- A. MARGARITIS, J. E. (1979). Surfactants, Production and Surface-Active Properties of Microbial. *Biotechnology and Bioengineering*, , 12.
- ABU-RUWAIDAA, .. S. (1991). Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria. *Act& Biotechnologica 11* , 10.
- Amato, S., Vanik, J., & Kocka, F. E. (1980). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* with the API-20E system. *Canadian journal of microbiology*, 26(4), 554-555.
- Antón, R. E. (1992). *Contribution al'étude du comportement de phase des systemes: Mélanges de surfactifs-eau-huile* (Doctoral dissertation, PhD Dissertation, Univ de Pau PA, France).
- Ashjaran*, R. A. (2015). Type and application of some common surfactants. *Chemical and Pharmaceutical Research*, , 09.
- Azarmi, R., & Ashjaran, A. (2015). Type and application of some common surfactants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(2), 632-640.

B

- Bai, G., Brusseau, M. L., & Miller, R. M. (1997). Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology*, 25(1-2), 157-170
- Bai, G., Brusseau, M. L., & Miller, R. M. (1998). Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *Journal of Contaminant Hydrology*, 30(3-4), 265-279
- Banat*, T. J. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. *K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, , 18.
- Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology letters*, 15(6), 591-594
- Banat, R. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett* , 9.
- BANAT, J. D. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* , 18.

Références bibliographiques

- BENDAHA, M. E. (2017). Isolement, caractérisation et exploitation des métabolites microbiens en bioremédiation de l'environnement.
- Bestetti, I. M. (2010). Microbial biosurfactants production, applications. *MINI-REVIEW*, 18.
- Bezza, F. A., & Nkhalambayausi-Chirwa, E. M. (2015). Desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated soil and the effect of biosurfactant supplementation on the rapidly desorbing fractions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(4), 680-688.

C

- C.N Mulligan, R. Y. (2000). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil. *Engineering Geology*, 10.
- Cameotra, I. M. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *MINI-REVIEW*, 14.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 82-84
- Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J., & Miller, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170(2), 569-574
- CHERIF, N., & ABBOUNI, B. (2016). Production des biosurfactants par les microorganismes et leurs applications (Doctoral dissertation).
- Christofi, N., & Ivshina, I. B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 915-929.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229.

D

- Danyelle Khadydja F. Santos 1, 2. R. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Molecular Sciences*, 31.

Références bibliographiques

- Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
- Delarras, C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier-Tec & Doc.
- Déziel, É. (1996). *Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
- Déziel, E., Lepine, F., Milot, S., & Villemur, R. (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149(8), 2005-2013.
- Déziel, G. S.-C. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 8.

E

- Edwards, D. A., Adeel, Z., & Luthy, R. G. (1994). Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environmental science & technology*, 28(8), 1550-1560.
- El-Sheshtawy, H. S., & Doheim, M. M. (2014). Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(1), 1-6
- El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnaser, A. A., & Kobisy, A. S. (2016). Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(3), 293-298.

F

- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in biotechnology*, 10, 208-217.
- FINNERTY*, O. K. (1979). Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. *BACTERIOLOGY*, , 6.

Références bibliographiques

G

- Gabet, S. (2004). *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique* (Doctoral dissertation, Limoges).
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155-166.
- Georgiou, G., Lin, S. C., & Sharma, M. M. (1992). Surface-Active Compounds from Microorganisms. *Nature Biotechnology*, 10(1), 60.
- GOLDENBERG, D. G. (1987). Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, , 6.
- Guerra-Santos, L. H., Käppeli, O., & Fiechter, A. (1986). Dependence of Pseudomonas aeruginosa continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 443-448
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., & Fiechter, A. (1984). Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and environmental microbiology*, 48(2), 301-305.

H

- Haigh, S. D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic. *he Science of the Total Environment* , 10.
- Healy, M. G., Devine, C. M., & Murphy, R. (1996). Microbial production of biosurfactants. *Resources, conservation and recycling*, 18(1-4), 41-57.

I

- Inka Siegmund* and Fritz Wagner. (1991). NEW METHOD FOR DETECTING RHAMNOLIPIDS EXCRETED BY PSEUDOMONAS SPECIES DURING GROWTH ON MINERAL AGAR. *Biotechnology Techniques Vol* , 4.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., & SUZUKI, T. (1971). Rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *The Journal of antibiotics*, 24(12), 855-859.

Références bibliographiques

- Ivshina², N. C. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Applied Microbiology* , 15.

J

- J.L Parra o, J. G. (1989). Chemical Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactants. *JAOCS*, Vol. 66, no. 1 , 5.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271-279.
- Jarvis, F. G., & Johnson, M. J. (1949). A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 71(12), 4124-4126.
- John E. McCray a,). G. (2000). Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixtures. *Contaminant Hydrology* , 24.

K

- Käppeli, O., & Finnerty, W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *Journal of bacteriology*, 140(2), 707-712.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634.
- Klimaszewska, M. W. (2013). Alkyl Polyglucosides as Components of Water Based Lubricants. DOI 10.1007/s11743-012-1428-y , 7.

L

- Lilly, J. (2011). Separation of Rhamnolipid Biosurfactants. *Department of Chemical & Biomolecular Engineering* , 25.
- Luis H. Guerra-Santos, *. O. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 6.

M

- Magdalena Pacwa-Płociniczak 1, G. A.-S. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Molecular Sciences ISSN 1422-0067* , 22.
- Margaritis, A., Zajic, J. E., & Gerson, D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(7), 1151-1162
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environmental science & technology*, 34(23), 4923-4930.
- MILLER*, Y. Z. (1992). Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* , 7.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218

N

- N. M. Sidkey1*, H. F. (2016). Evaluation of Different Screening Methods for Biosurfactant Producers Isolated from Contaminated Egyptian Samples Grown on Industrial Olive Oil Processing Waste. *British Microbiology* , 19.
- Nkhalambayausi-Chirwaa, F. A. (2015). Desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from contaminated soil and the effect of biosurfactant supplementation on the rapidly desorbing fractions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* , 10.

O

- Ocampo, G. Y. (2016). Role of Biosurfactants in Nature and Biotechnological Applications. *Bacteriology & Mycology:* , 2.

Références bibliographiques

- Ochsner, U. A., & Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6424-6428

P

- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.
- Pinzon, N. M., & Ju, L. K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Applied microbiology and biotechnology*, 82(5), 975-981.

R

- Reiser, U. A. (2016). Autoinducer-Mediated Regulation of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *National Academy of Sciences*, 6.
- Rikalovic, M. G., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M., & Karadzic, I. (2012). Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain ai. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(1), 27-42.
- Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., & Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, 11(12), 871-874
- Rocha, C., San-Blas, F., San-Blas, G., & Vierma, L. (1992). Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of microbiology and biotechnology*, 8(2), 125-128.
- ROCKNE*, R. S. (2003). COMPARISON OF SYNTHETIC SURFACTANTS AND BIOSURFACTANTS IN ENHANCING BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, No. 10, pp. 2280–2292, 2003, 13.
- Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- Rondel, C. (2009). *Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives* (Doctoral dissertation).

Références bibliographiques

- Rosenberg, E. Z. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 8.

S

- S. Vijayakumar and V. Saravanan (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Microbiology*, 13.
- Salager, J. L. (2002). Surfactants types and uses. *FIRP booklet*, (E300A).
- samples grown on industrial olive oil processing waste. *British Microbiology Research Journal*, 17(4), 1-19.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.
- Shafeeq, M., Kokub, D., Khalid, Z. M., Khan, A. M., & Malik, K. A. (1989). Degradation of different hydrocarbons and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters Dégradation de différents hydrocarbures et production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* isolé d'eaux côtières. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology*, 5(4), 505-510.
- Shiwei Wang, a. S. (2014). Coordination of Swarming Motility, Biosurfactant Synthesis, and Biofilm Matrix Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *aem.asm.org*, 9.
- Sidkey, N. M., Mohamed, H. F., & Elkhoully, H. I. (2016). Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian
- Sierra, G. (1960). Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 26(1), 189-192.
- Smyth, T. J., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010). Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 3687-3704). Springer Berlin Heidelberg.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(6), 718-725.

Références bibliographiques

- Sułek, M. W., Ogorzałek, M., Wasilewski, T., & Klimaszewska, E. (2013). Alkyl polyglucosides as components of water based lubricants. *Journal of surfactants and detergents*, 16(3), 369-375.
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U., & Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 40(1-2), 61-67.

T

- THILO KOHLER, I. L.-C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *BACTERIOLOGY*, 7.
- Tyagi, K. G. (2006). Microbial of Surfactants . *OLEO SCIENCE* , 12.

V

- V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., & Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(10), 3941-3951.

W

- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.
- Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., ... & Ma, L. Z. (2014). Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, 80(21), 6724-6732

Annexe

Composition des milieux de culture

Gélose nutritive

Composition type g /l

Extrait de viande.....	1,0
Extrait de levure.....	2,0
Peptone.....	5,0
Chlorure de sodium.....	5,0
Agar.....	15,0

pH =7,4

Gélose au Cétrimide

Composition type g /l

Peptone de gélatine.....	16,0
Peptone de caséine.....	10,0
Bromure de tétradonium (cétrimide).....	0,2
Acide nalidixique.....	0,015
Sulfate de potassium.....	10
Chlorure de magnésium.....	1,4
Agar.....	10,0

pH =7,1

Gélose de base Columbia

Composition type g /l

Mélange spécial de peptones.....	23
Amidon.....	1
NaCl.....	5
Agar.....	10

pH = 7,3

Gélose King A

Composition type g /l

Peptone dite A :.....	20g
Glycerol :.....	10g
Sulfate de potassium :.....	10g
Chlorure de magnesium:.....	1,4g
Agar purifie :.....	12g
Eau distillée (QSP) :.....	1000ml

PH 7,2

Gélose King B

Composition type g /l

Peptone dite B :.....	20g
Glycérol :.....	10g
Hydrogénophosphate de potassium :.....	1,5g
Sulfate de magnésium heptahydraté :.....	1,5g
Agar purifie :.....	12g
Eau distillé (QSP) :.....	1000ml

PH 7,2

Milieu de sels minéraux

Composition type g /l

NaNO3.....	2,5
KCl.....	0,1
KH2PO4.....	3,0
K2HPO4.....	7,0
CaCl2.....	0,01
MgSO4.7H2O...0,5	
Eléments traces	0,005
Glucose.....	20
Extrait de levure....	30

Eléments traces

FeSO4.....	0,1
ZnSO4.....	0,17
H3BO3.....	0,2
CoCl3.....	0,4
CuSO4.....	0,08
MnSO4.....	0,08
[NH4]MoO2.....	0,02

Source de carbone ajoutée : glycérol

Milieu VF (Viande-foie)

Composition type g /l

Base viande foie.....30,0

Glucose.....2,0

Agar.....6,0

PH = 7

Les milieux de base

Milieu MSM (mineral salt medium)

Composition type g /l

NH₄NO₃.....4,0

KH₂PO₄.....4,08

Na₂HPO₄.....5,68

CaCl₂.....7,77.10⁻⁴

MgSO₄.7H₂O.....0,2

Sodium EDTA.....1,49.10⁻³

FeSO₄.7H₂O.....5,56.10⁻⁴

Source de carbone ajoutée aux milieux de base : huile d'olive

Milieu LB (Lurie-Bertani)

Composition type g /l

NaCl.....5

Extrait de levure.....5

Peptone I.....10

TABLEAU DE LECTURE

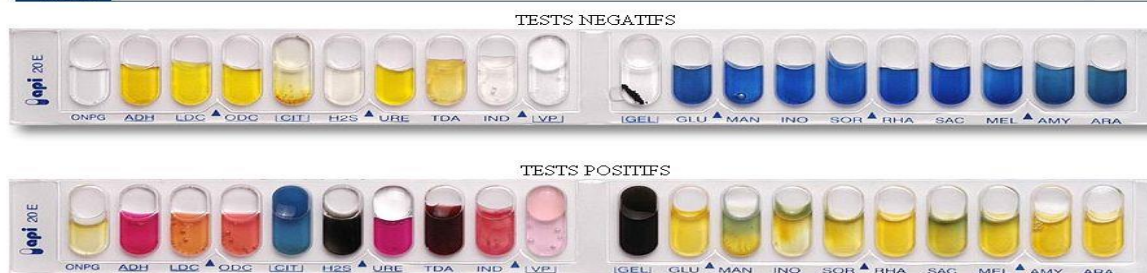
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune (1)
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (3)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune-gris
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (3)	bleu / bleu-vert	jaune
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (2)
H ₂ S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incolore / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	TDA / immédiat marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incolore vert pâle / jaune	JAMES / immédiat rose
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	
NO ₂	(tube GLU)	-	production de NO ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min jaune / rouge	

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Lecture dans le cupule (zone aérobie).

(3) La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.

API 20 E



Résumé

Les surfactants d'origine microbienne, sont des composés produits principalement par les microorganismes se développant sur des substrats non miscibles à l'eau. Faisant d'eux d'excellents moyens de dépollution.

Les souches prélevées ont été principalement isolées de sols pollués par les hydrocarbures à des niveaux variables.

Parmi ces souches, douze d'entre elles ont été positives au test d'hémolyse. Un deuxième criblage a été nécessaire pour évaluer la potentialité de production des tensioactives par les souches, comprenant le test de « Drop Collapsing », le test de dispersion du pétrole, et l'index d'émulsification.

Seule la souche CH a été positive aux trois tests, au parallèle des tests macroscopiques, microscopiques et biochimiques, ont révélé que la souche appartient à l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa*.

Deux tests spécifiques à cette souche productrice de rhamnolipides ont été effectués : test de «Swarming Motility» et ensemencement sur milieu CTAB.

Les types de rhamnolipides produits par la souche CH dans les deux milieux de fermentation ont été révélés par CCM, et l'analyse du taux de production de la souche ainsi que sa biomasse par spectrophotométrie.

Mots clés : surfactants- souches- hydrocarbures- production-*Pseudomonas aeruginosa* -rhamnolipides

Abstract

Surfactants of microbial origin are compounds produced mainly by microorganisms growing on substrates immiscible with water. Making them excellent means of depollution.

The strains taken were mainly isolated from soils polluted by hydrocarbons at varying levels.

Twelve of these strains were positive for the haemolysis test. A second screening was required to evaluate the whole pot of surfactant production by the strains, including the Drop Collapsing test, the oil dispersion test, and the emulsification index.

Only the CH strain was positive in the three tests, in parallel with the macroscopic, microscopic and biochemical tests, revealed that the strain belongs to the species of *Pseudomonas aeruginosa*.

Two tests specific to this rhamnolipid producing strain were carried out: "Swarming Motility" test and seeding on CTAB medium.

The types of rhamnolipids produced by the CH strain in both fermentation media were revealed by TLC, and analysis of the production rate of the strain as well as its biomass by spectrophotometry.

Key words: surfactants- strains- hydrocarbons- production-*Pseudomonas aeruginosa*-rhamnolipids

الملخص:

الجزينات ذات النشاط السطحي من الأصل الميكروبي، هي مركبات تنتج أساساً من الكائنات الحية الدقيقة تنمو على ركائز غير قابلة للمزج مع الماء. مما يجعلها وسائل ممتازة لإزالة التلوث.

تم عزل السلالات من التربة الملوثة بالهيدروكربونات على مستويات مختلفة.

ومن بين هذه السلالات، كان 12 منها إيجابياً لاختبار انحلال الدم. كان الفحص الثاني ضرورياً لتقييم الإنتاج المحتمل لمخفف التوتر السطحي بواسطة السلالات وذلك عن طريق مجموعة من الاختبارات: اختبار قطرة الإنزال، اختبار التشتت البترولي، ومؤشر الاستحلاب. فقط السلالة CH كانت إيجابية في الاختبارات الثلاثة، كما كشفت الاختبارات الميكروسكوبية والكيميائية الحيوية أن السلالة

هي *Pseudomonas aeruginosa*

بعد ذلك تم الكشف عن نوع الرامنوليبيدات التي أنتجتها السلالة CH في وسطين مختلفين بواسطة TLC، وتحليل معدل إنتاج السلالة وكذلك الكتلة الحيوية من خلال القياس الطيفي.

كلمات مفتاحية: سطحي – سلالات -هيدروكربونات -إنتاج- *Pseudomonas aeruginosa* - الرامنوليبيدات