

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



UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTE.

**THESE Présentée par**  
**M<sup>r</sup> CHERIF Nadjib**

**EN VUE DE L'OBTENTION**  
**DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES**  
**Option : Microbiologie appliquée et moléculaire**

**THEME**

**Production des Biosurfactants par les Microorganismes  
et leurs Applications.**

**Soutenu le : 20/04/2016**

**Devant le Jury composé de :**

**Président :**

M<sup>r</sup>. BENALI Mohamed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

**Examineurs :**

M<sup>r</sup>. RIAZI Ali (Professeur, Université de Mostaganem)

M<sup>r</sup>. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara)

M<sup>r</sup>. MEDDAH Boumediene (Professeur, Université de Mascara)

**Directeur de thèse :**

M<sup>r</sup>. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

**Année universitaire 2015/2016**

Remerciement

Résumé

Abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Généralités sur les biosurfactants                                                   | 3  |
| I.1. Définition                                                                         | 3  |
| I.2. classification des biosurfactants                                                  | 3  |
| I.2.1. Les glycolipides                                                                 | 4  |
| I.2.2. les lipopeptides et les lipoprotéines                                            | 7  |
| I.2.3. Les phospholipides, et les lipides neutres                                       | 8  |
| II. Application des biosurfactants                                                      | 9  |
| II.1. Les différents champs d'application                                               | 9  |
| II.2. Effet antimicrobien des biosurfactants                                            | 11 |
| II.3. remobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les biosurfactants | 11 |
| II.3.1. La mobilisation                                                                 | 12 |
| II.3.2. La solubilisation                                                               | 12 |
| III. La production des surfactants biologiques                                          | 13 |
| III.1. Les organismes producteurs                                                       | 14 |
| III.2. suivie de production des biosurfactants                                          | 16 |
| IV. Optimisation de la production des biosurfactants                                    | 17 |
| IV.1. Paramètres influençant la production                                              | 18 |
| IV.1.1. Influence de la source de carbone                                               | 18 |
| IV.1.2. Influence de la source d'azote                                                  | 19 |
| IV.1. 3 Influence du pH                                                                 | 19 |
| IV.1. 4 Influence des sels minéraux                                                     | 20 |
| IV.1. 5 Influence de l'agitation                                                        | 20 |
| IV.2. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance                             | 20 |
| IV.3. Identification des biosurfactants                                                 | 21 |
| V. Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs                                     | 21 |
| V.1. la concentration Micellaire Critique (CMC)                                         | 21 |
| V.2. Paramètres influençant la Micellisation                                            | 22 |
| V.3. Solubilité des tensioactifs en fonction de la température                          | 24 |
| V.4. Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants                                    | 24 |
| VI. Etude génétique de la production des rhamnolipids                                   | 27 |

## Chapitre II : Matériels et Méthodes

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Zones de prélèvement                                                                    | 30 |
| II. Isolement et purification                                                              | 34 |
| II.1. Préparation des dilutions et isolement                                               | 34 |
| II.2. Ensemencement et purification                                                        | 34 |
| II.3. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants                        | 34 |
| II.4. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir hémolytique        | 35 |
| II.4.1. Aspect macroscopique des colonies                                                  | 35 |
| II.4.2. Aspect microscopique des souches                                                   | 35 |
| II.4.3. Recherche de la catalase                                                           | 36 |
| II.4.4. Recherche de l'oxydase                                                             | 36 |
| II.4.5. Type respiratoire                                                                  | 36 |
| II.4.6. Détermination de l'activité amylolytique et caseinolytique                         | 36 |
| II.4.7. Recherche de lécithinase                                                           | 37 |
| II.4.8. La galerie API® 20 E                                                               | 37 |
| III. Etude de production des biosurfactants                                                | 37 |
| III.1. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants                     | 38 |
| III.1.1. Test de dispersion du pétrole                                                     | 38 |
| III.1.2. Test d'émulsification (E <sub>24</sub> )                                          | 39 |
| III.1.3. Test de « Drop Collapsing »                                                       | 40 |
| III.1.4. Mesure de la tension superficielle                                                | 41 |
| III.1.5. Swarming Motility                                                                 | 41 |
| III.1.6. Ensemencement du milieu CTAB                                                      | 42 |
| IV. Caractérisation des biosurfactants                                                     | 43 |
| IV.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture                                   | 43 |
| IV.2. Chromatographie sur couche mince                                                     | 45 |
| IV.3. Dosage des rhamnolipides par spectrophotométrie                                      | 45 |
| V. Optimisation des paramètres impliqués dans la production des biosurfactants             | 46 |
| VI. Etude de la cinétique de croissance bactérienne et de la production des biosurfactants | 46 |
| VII. Recherche des gènes qui codent la production des rhamnolipides.                       | 47 |
| VII.1. Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien                             | 47 |
| VII.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN :                                | 47 |
| VII.3. L'amplification des gènes RhIA, RhIB et RhIC                                        | 48 |
| VII.4. Electrophorèse sur gel d'agarose                                                    | 51 |

## Chapitre III : Résultats

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| I. Echantillonnage                                         | 52 |
| I.1. Sélection des souches productrices des biosurfactants | 53 |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I.2. Identification préliminaire des bactéries criblées                                                | 54        |
| I.2.1. Aspect macroscopique                                                                            | 54        |
| I.2.2 Etude microscopique et biochimique                                                               | 55        |
| II. Production des biosurfactants                                                                      | 63        |
| II.1 Test de « Oil Spreading »                                                                         | 63        |
| II.2. Test de « Drop Collapsing »                                                                      | 63        |
| II.3. L'index de l'émulsification ( $E_{24}$ )                                                         | 66        |
| II.4. Mesure de la tension superficielle                                                               | 67        |
| II.5. Swarming motility                                                                                | 69        |
| II.6. Ensemencement sur Gélose CTAB                                                                    | 70        |
| III. Caractérisation des biosurfactants                                                                | 71        |
| III.1. Chromatographie sur couche mince                                                                | 71        |
| IV. Etudes des paramètres influençant la production des biosurfactants                                 | 72        |
| IV.1. Effet de la concentration du glycérol sur la production des biosurfactants                       | 72        |
| IV.2. Effet de la température sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne         | 73        |
| IV.3. Effet du pH sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne                     | 74        |
| IV.4. Effet de la vitesse d'agitation sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne | 75        |
| IV.5. Effet de la source de carbone sur la production des rhamnolipides                                | 76        |
| IV.6. Effet de la source d'azote sur la production des rhamnolipides                                   | 77        |
| V. Suivi de la cinétique de croissance bactérienne et de production des biosurfactants                 | 78        |
| V.1. Chez la souche <i>P. aeruginosa</i> NF5                                                           | 78        |
| V.2. Chez les souches <i>B. subtilis</i> ZS1 et <i>B. cereus</i> ZS4                                   | 79        |
| VI. Effet de la source de carbone sur la cinétique de croissance et la production des rhamnolipides    | 81        |
| VII. Identification moléculaire des gènes qui codent pour la production des rhamnolipides              | 82        |
| VII.1. Dosage de l'ADN génomique bactérien par spectrophotométrie :                                    | 82        |
| <b>Chapitre IV : Discussion</b>                                                                        | <b>85</b> |
| Conclusion                                                                                             | 92        |
| Références bibliographiques                                                                            | 94        |
| Annexes                                                                                                | 107       |
| Publication internationale                                                                             |           |

## REMERCIEMENTS

*Nous y voilà ! Un manuscrit, et plein de gens qui, directement ou non, m'ont permis de voir le bout cette thèse et que je me dois de remercier.*

*Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH de m'avoir aidé à réaliser cet ouvrage.*

*Merci en tout premier, parce qu'il faut un premier, et parce que lui a été ce premier si important dans mon parcours, mon promoteur, Monsieur ABBOUNI Bouziane, professeur à l'université de Sidi Belabbes, pour avoir accepté de m'encadrer et aussi pour avoir cru en mes capacités jusqu'au bout. Merci de ne pas m'avoir laissée décrocher pendant mes moments de doutes. Merci de m'avoir interdit le renoncement. Merci de m'avoir supportée.*

*Merci à Monsieur BENALI Mohamed, professeur à l'université de Sidi Bel Abbes de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance.*

*Merci aux membres du jury pour leurs conseils avisés, leur rigueur scientifique et leur disponibilité. En particulier, Monsieur BELABID Lakhdar et Monsieur MEDDAH Boumediene, professeurs à université Mascara Monsieur RIAZI Ali de l'université de Mostaganem et qui m'ont accordé beaucoup de leurs temps pour examiner cette contribution. Merci à Monsieur Ibrahim M. BANAT de m'avoir reçu dans son laboratoire à l'institut des sciences biomédicales - université d'ULSTER en Irlande du Nord, et avec qui les discussions et les échanges enrichissants m'ont permis d'avancer dans mes réflexions.*

*Merci à mademoiselle MEDJBER Nacera pour son aide dans le traitement et l'interprétation de mes données.*

*Merci à Monsieur BELAOUNI Ahmed et Monsieur BENDAHA Amine avec qui j'ai pu travailler pendant ces cinq ans et qui ont rendu ce travail de thèse un peu moins solitaire.*

*Merci à tout le personnel de laboratoire de recherche sis à l'université Mostafa Stambouli à Mascara pour leur accueil et leur soutien. Merci à mademoiselle CHAMAKH Rajaa et DJAADOUNI Fatima, Monsieur AIT ABDESLEM et Monsieur BENGARNIA, Ils m'ont permis de m'intégrer à leur dynamique et à leur esprit d'équipe. Merci à mes collègues doctorants, MEDJBER Nacera, BELGHARBI Asma, BENDAHA Amine pour leurs soutiens et leurs conseils, en particulier MEDJBER Nacera qui m'a apporté un soutien moral qui m'a permis de traverser les moments de doute et de progresser dans la réalisation de ma thèse.*

*Merci à mes amis Boubakeur, Hamidou, Toufik, Bounouwar, Mohammed, ...pour m'avoir soutenue, encouragée dans mes moments de doutes et de fatigue.*

## *Liste des tableaux et des figures*

## Liste des Figures

- Figure 1** : la structure du tréhalolipide (**Cooper et al, 1989**).
- Figure 2** : la structure d'une molécule de sophorolipides (**Inoue et Itoh, 1987**).
- Figure 3** : la structure de Mono-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate (**Daisai et Banat, 1997**).
- Figure 4** : la structure de Di-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate (**Daisai et Banat, 1997**).
- Figure 5** : la structure d'une molécule de lipopeptide (**Yamane, 1987**).
- Figure 6** : structure des lipides neutres (**Kappeli et Finnerty, 1979**).
- Figure 7** : Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant (d'après **Edward et al., 1994**).
- Figure 8** : Représentation schématique d'une micelle de surfactant.
- Figure 9** : Représentation schématique d'une molécule de surfactant (d'après **Bai et al., 1998**).
- Figure 10** : Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température (d'après **Shinoda et Fontell, 1995**).
- Figure 11** : schéma générale du gène qui code la production des rhamnolipides.
- Figure 12** : Modèle de régulation de production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* (**Ochsner et Reiser, 1995**).
- Figure 13** : Schéma générale de la voie de synthèse du rhamnolipide par *P. aeruginosa* (**Déziel et al, 2003**).
- Figure 14** : Localisation de la région d'ARZEW (**Google Map, 2015**).
- Figure 15** : localisation et sites de prélèvements de l'Huilerie de FELAWCEN.
- Figure 16** : Bourbier et sol situés à l'huilerie de FELLAWCEN.
- Figure 17** : Station de distribution de carburant-Remchi (**Google map, 2015**).
- Figure 18** : Test de la dispersion du pétrole.
- Figure 19** : Test de l'indice de l'émulsification.
- Figure 20** : Test de collapsus de la goutte.
- Figure 21** : Description des étapes de mesure de la tensions superficielle.
- Figure 22** : Présentation d'un tensiomètre digital K10ST – KRUSS, et l'anneau en Platinum-Iridium.
- Figure 23** : Rota vapeur BUCHI E.L 131 équipé d'une pompe à vide.
- Figure 24** : Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000.
- Figure 25** : la mixture de l'amplification des gènes (BIOMETRA, 2010).
- Figure 26** : Thermocycleur TC-5000.
- Figure 27** : Répartition des souches isolées à partir des sites de prélèvements effectués.
-

**Figure 28** : Le criblage primaire des souches productrices de biosurfactants

**Figure 29** : Aspect macroscopique des 4 souches isolées.

**Figure 30** : Observation microscopique des souches NF5 (A), ZS1 (B), ZS4 (C) après coloration de Gram (Gross 100x10).

**Figure 31** : Observation microscopique des spores des souches ZS4 (A), ZS1 (B). (Gross 100x10).

**Figure 32** : La culture de *P. aeruginosa* NF5 isolée, sélectionnée productrice des biosurfactants sur la gélose au Cétrimide.

**Figure 33** : Ensemencement de la souche NF5 sur le milieu de culture King.

**Figure 34** : Souche NF3 amylase positive.

**Figure 35** : Souche NF3 Caséinase positive.

**Figure 36** : Souche NF4 Lécithinase positive.

**Figure 37** : Développement de *Pseudomonas aeruginosa* NF5 sur la surface de la gélose Viande-foie.

**Figure 38** : Illustration des diamètres de déplacement de l'huile des différents surnageant sur la surface de l'eau

**Figure 39**: Présentation du test « **Oil Spreading** ».

**Figure 40** : Illustration du test de « Drop Collapsing » chez les souches sélectionnées productrices de biosurfactants.

**Figure 41** : Evolution du test « Drop Collapsing » chez les souches sélectionnées productrices de biosurfactants.

**Figure 42** : L'index d'émulsification chez les trois souches sélectionnées productrices des biosurfactants.

**Figure 43** : Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion chez les différentes souches sélectionnées productrices de biosurfactants

**Figure 44** : Tension de surface en fonction de la concentration en surfactant.

**Figure 45** : Tension superficielle des différents surnageant et de milieu de culture non inoculé.

**Figure 46** : Swarming Motility de la souche *P. aeruginosa* NF5.

---

**Figure 47** : colonies de *P. aeruginosa* NF4 sur la gélose CTAB.

**Figure 48** : Chromatographie sur couche mince révélée par l'Orcinol Sulfurique.

**Figure 49** : Chromatographie sur couche mince révélé par la Ninhydrine.

**Figure 50** : Effet de source de carbone (glycérol) sur la production des rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa* NF5.



- Figure 51** : Effet de température sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*.
- Figure 52** : Effet de pH sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*.
- Figure 53** : Effet de la vitesse d'agitation sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*.
- Figure 54** : Effet de la source de carbone sur la production des rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa NF5*.
- Figure 55** : Effet de la source d'azote sur la production des rhamnolipides.
- Figure 56** : L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa NF5*.
- Figure 57** : L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la tension superficielle du milieu de culture chez *B. subtilis ZS1*.
- Figure 58** : L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la tension superficielle du milieu de culture chez *B. cereus ZS4*.
- Figure 59** : Effet de la source de carbone sur la production des biosurfactants et la croissance bactérienne.
- Figure 60** : Electrophorèse des produits de la PCR des gènes *RhIA*, *RhIB* et *RhIC* des trois souches étudiées, réalisée sur gel d'agarose à 1%.

## Liste des Tableaux

**Tableau 1** : application des différentes biosurfactants.

**Tableau 2** : Utilisations potentielles des biosurfactants (d'après **Banat *et al.*, 2000**).

**Tableau 3** : Principaux types de surfactants biologiques (adapté par **Desai et Banat, 1997** et **Banat *et al.*, 2000**).

**Tableau 4** : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (d'après **Christofi et Ivshina, 2002**).

**Tableau 5** : Les diamètres des zones d'hémolyses formées chez les souches productrices de biosurfactants.

**Tableau 6** : les amorces des différents gènes à amplifier.

**Tableau 7** : Programme de la PCR des gènes *Rhl*.

**Tableau 8** : Présentation des différentes souches hémolytiques.

**Tableau 9** : Présentation de différents aspects macroscopiques des colonies isolées.

**Tableau 10** : Illustration des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées.

**Tableau 11** : Illustration du profil biochimique des souches isolées, productrice de biosurfactant, par l'utilisation de la galerie API<sup>®</sup>20 E.

**Tableau 12** : Résultat du dosage de l'ADN génomique des trois souches étudiées.

*Résumé*

## Résumé

La majorité des surfactants commercialement disponibles, sont dérivés du pétrole et présente un risque majeur pour l'environnement par leur toxicités et non biodégradabilités. Les biosurfactants principalement produits par les levures, les champignons, les bactéries se développent dans des conditions aérobies sur des milieux de cultures liquides contenant une source de carbone, telles que les hydrates de carbone, les huiles et les hydrocarbures.

Dans ce présent travail, les sites de prélèvements ont été choisis sur la base de degré contamination des sols par les hydrocarbures ou les déchets des huileries.

Le criblage primaire de 37 souches isolées, effectué sur la gélose au sang a permis l'isolement de, (08) huit souches qui sont sélectionnées productrices de biosurfactants, dont (06) six souches isolées à partir des sols pollués par les hydrocarbures au niveau de la raffinerie pétrolière d'ARZEW.

Le criblage secondaire réalisé par des tests de « Drop Collapsing », « Oil Displacement », la mesure de l'index d'émulsification et de la tension superficielle a permis la sélection de trois souches potentiellement productrices de biosurfactants.

L'identification macroscopique, microscopique et biochimique, des trois souches NF5, ZS1 et ZS4 sélectionnées productrices de biosurfactants a révélé leur appartenance aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, et *Bacillus cereus* respectivement.

Ensuite, l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de biosurfactants est effectuée sur un milieu de culture, composé principalement de sels minéraux et de sources de carbone et d'azote. Les résultats obtenus ont montré qu'une importante production des rhamnolipides est observée durant de la phase exponentielle chez la souche *P. aeruginosa* NF5, lors de l'ajout de l'huile d'olive (30 g/l) et l'extrait de levure (5 g/l) au milieu culture ajusté à une valeur de pH de 7, incubé avec une vitesse d'agitation de 150 rpm et à une température de 30°C. Par ailleurs, une réduction considérable de la tensions superficielle à 37 mN/m est enregistrée chez la souche *B. subtilis* ZS1 lors de l'ajout du glucose (10g/l) et le sulfate d'ammonium (0.1 g/l) au milieu de culture comme source de carbone et d'azote.

**Mots clés** : Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, Rhamnolipides, Production.

## **Abstract**

The majority of commercially available surfactants are made from petroleum and presents a major risk to the environment and by their toxicities and biodégradabilités. The biosurfactants are mainly produced by yeast, fungi, bacteria that grow under aerobic conditions in liquid culture media containing a carbon source such as carbohydrates, oils and hydrocarbons.

The present work focused on bacteria that are distinguished by their ability to produce biosurfactants. These biomolecules have a preferred value in several areas including the sectors of environment, industry and medical sciences.

Thirty-seven strains has been isolated from various sites in particular polluted lands by hydrocarbons (petrol, diesel, oil) and waste from olive oil mill.

After preliminary screening, eight strains present a haemolytic activity on blood agar, reflecting their ability to produce biosurfactants. In the second screening performed by "Drop Collapsing", "Oil Displacement" tests, measurement of emulsification index and surface tension, three strains showed a high production potential of these biomolecules. Following the results of macroscopic, microscopic and biochemical identification, these strains affiliated to the species *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*.

The study of the parameters influencing the production of biosurfactants was carried out by fermentation on a mineral salt medium. High rhamnolipids production was observed during the exponential phase with the strain *P. aeruginosa NF5* using olive oil (30 g/l) and yeast extract (5 g/l) as carbon and nitrogen sources, and pH 7 with shaking at 150 rpm and a temperature of 30 ° C. Thus, a reduction in surface tension to 3.7 mN/m of the culture medium was observed with *B. subtilis ZS1* when using glucose (10 g/l) and ammonium sulfate (0.1 g/l) as carbon and nitrogen sources.

**Keywords** : Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, rhamnolipids, Production.

## ملخص:

اهتم هذا العمل بالبكتيريا المتميزة بقدرتها على انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي. هذه الجزيئات الحيوية لها أهمية كبيرة في عدة مجالات كالمجال البيئي والصناعي والعلوم الطبية. حوالي 37 سلالة تم عزلها من خلال عدة مناطق خصوصا الأتربة الملوثة بالمحروقات (بنزين، مازوت، بترول) ومخلفات معصرة زيتون.

بعد غربلة أولية، ثمان سلالات أظهرت نشاطا لتفكيك الدموي على هلام بالدم، الشئ الذي يفسر قدرتها على تصنيع الجزيئات ذات النشاط السطحي. من خلال الغربلة الثانية المحققة بواسطة اختبار ثبات القطرة ، اختبار تشتت الزيت قياس مؤشر الاستحلاب و النشاط السطحي، ثلاث سلالات أظهرت قوة كبيرة في انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي.

تبعاً لنتائج الكشف المظهري و المجهري و البيوكيميائي، هذه السلالات الثلاث تم معرفة انتمائها الى الأصناف

(*Pseudomonas aeruginosa*) و (*Bacillus cereus*) و (*Bacillus subtilis*)

دراسة العوامل المؤثرة على انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي. تم تحقيقها بتخمير في وسط به أملاح معدنية. انتاج غزير للجزيئات ذات النشاط السطحي لوحظ في المرحلة الأسية للسلالة *P. aeruginosa* NF5 باستعمال زيت الزيتون (30 غ/ل) و خلاصة الخميرة كمصدرين للكربون و الازوت، و معدل حموضة يساوي 7 ، مع رج بقوة 150د و حرارة 30°م. كذلك انخفاض في الضغط السطحي الى 3.7 ملي نيوتن/م لوسط الزرع سجل عند السلالة *B. subtilis* ZS1 عند استعمال الغلوكوز (10 غ/ل) و كبريتات الامونيوم (0.1 غ/ل) كمصدرين للكربون و الازوت.

**الكلمات المفتاحية:** الجزيئات ذات النشاط السطحي، انتاج ، *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*,

*Introduction*

Les surfactants ou les tensioactifs sont les produits les plus adaptables à l'industrie chimique, on les trouve dans divers produits, comme les huiles à moteurs, dans les produits pharmaceutiques et parapharmaceutiques, et dans les détergents (**Milton, 2004**).

La plupart des surfactants commercialisés sont d'origines chimiques, dérivées des produits pétroliers, parmi eux ; les alcools ethoxylates, alcanolamides gras, les nonyl phenol ethoxylates et les esters de glycol polyethylene (GPE) (**Canter, 2004**). Ces substances présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (**Vipulanandan et Ren, 2000**). La prise de conscience de ce problème et le développement de la biotechnologie ont conduit, les scientifiques à s'intéresser aux surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques. Ces biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables et non toxiques et sont également efficaces dans le cas de micro-organismes extrémophiles à des températures, des pH et des salinités extrêmes (**Banat et al, 2000**).

Ces tensioactifs sont d'origine biologique, synthétisés par les microorganismes (bactéries et levures) qui poussent sur des substrats variés. Les biosurfactants les plus étudiés et les plus utilisés sont d'origine glycolipidique et lipopeptidique. Les rhamnolipides sont des métabolites de *Pseudomonas aeruginosa* alors que les surfactines sont issues de la souche *Bacillus sp*.

Les études ont montré que les rhamnolipides produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa* sont non irritants et non toxiques du point de vue oculaire et dermique. **Haba et al. (2003)**.

Le principal obstacle de l'utilisation des biosurfactants est leurs coûts. A l'heure actuelle, il est possible de les diminuer grâce à la valorisation des sous produits. Il est possible d'utiliser des déchets agricoles et d'autres déchets de diverses industries (huiles de moteurs usagées...) pour diminuer les coûts de production des biosurfactants, d'une part, et diminuer la quantité des déchets à traiter d'autre part (**Makkar et Cameotra., 2002**).

Les Biosurfactants ont potentiellement remplacé les tensioactifs synthétiques dans plusieurs procédés industriels, comme la lubrification, mouillage, ramollissement, la fixation de colorants, la préparation d'émulsions, dispersions de stabilisation, moussants, prévention de la mousse, ainsi que dans les aliments, l'industrie biomédicale et pharmaceutique, et la bioremédiation des sites contaminés. Les glycolipides et les lipopeptides sont les biosurfactants les plus importants à des fins commerciales.

C'est dans cette optique que ce travail de thèse a été mené. En effet, une étude de production des biosurfactants (rhamnolipides et surfactine) par les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus sp* a été effectuée en utilisant différents substrats carbonés et azotés.



La production des biosurfactants est divisée en trois phases :

- Isolement, purification et identification des souches.
- Criblage des souches productrices des biosurfactants.
- Optimisation de la production par le changement de la source de carbone et la source d'azote
- Dosage des biosurfactants produites.
- Recherches des gènes qui codent pour la synthèse des biosurfactants.

*Chapitre 1 :*  
*Etude bibliographique*

### III. Généralités sur les biosurfactants

#### I.1. Définition

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di), le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (**Desai et Banat, 1997**).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants, les cationiques qui possèdent une charge positive, les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels d'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement, les non ioniques, sans charge, et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents, l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (**West et Harwell, 1992**).

#### I.2. classification des biosurfactants

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

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

Cinq grandes classes de biosurfactants ont été distinguées (**Healy *et al.*, 1996**):

- Les glycolipides.
- Les lipopeptides.
- Les phospholipides.
- Les liposaccharides.
- Les lipides neutres.

### I.2.1. Les glycolipides

Sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques (Healy *et al.*, 1996 ; Ron et Rosenberg, 2002). Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.

- **Les tréhalolipides**

Sont de nature non ioniques ou anioniques, et sont composées d'un disaccaride de tréhalose liées au niveau de C-6 et C-6' à une longue chaîne d'acide gras par une liaison ester dans lesquels il y a l'acide mycolique

L'acide mycolique est souvent trouvé comme parti des glycolipides de la paroi des *Mycobacterium*, *Nocardia*, et *Cornyebacter*. Les tréhalolipides synthétisées par les différents microorganismes se différencient par sa taille et le structure de l'acide mycolique, le nombre de carbones, et le degré de l'insaturation. (Asselineau, 1978 ; Cooper *et al.*, 1989).

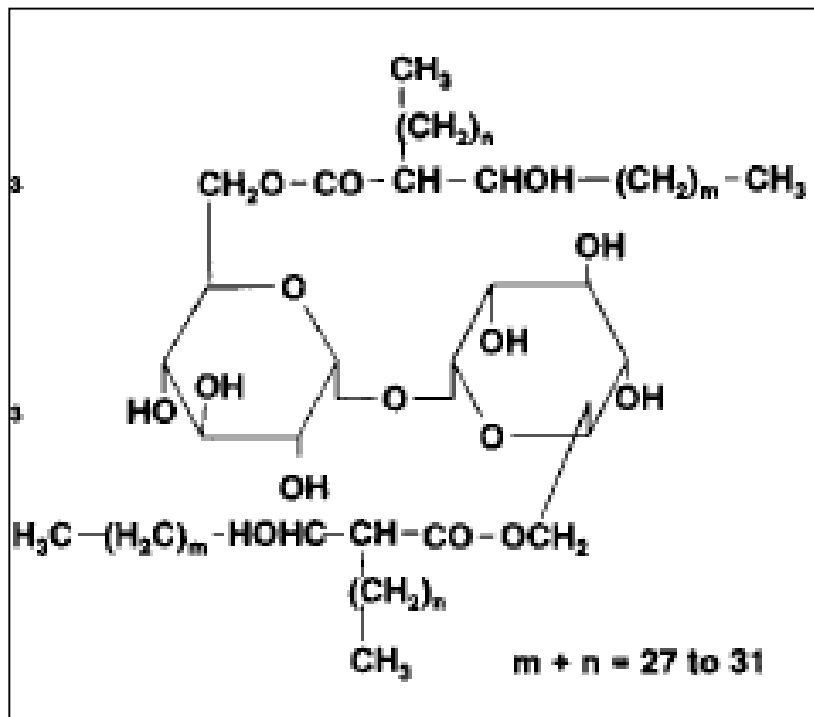
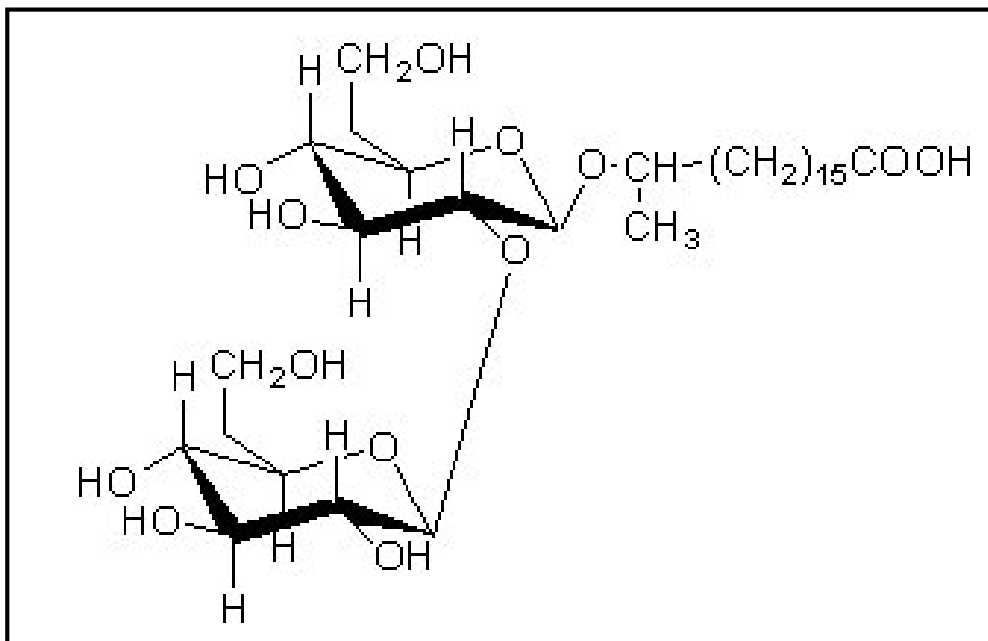


Figure 1 : la structure du tréhalolipide (Cooper *et al.*, 1989).

- **Les sophorolipides**

Qui sont produites principalement par les levures comme *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* et *T. apicola*, elles consistent en la liaison de deux molécules de sophorose à une longue chaîne d'acide gras. (Cooper et Paddock, 1984; Inoue et Itoh, 1987).

Culter et light, (1979) ont montré que *Candida bogoriensis* produit des glycolipides dans lesquels, le sophorose est lié à l'acide docosanoïque di-acétate. La nature des acides gras dans les sophorolipides se varie selon le type du substrat organique hydrophobe utilisé par la levure lors de leur croissance. C'est pourquoi les alcanes et les autres substrats lipophiles peuvent être directement incorporés dans les sophorolipides de *Torulopsis* durant sa croissance.

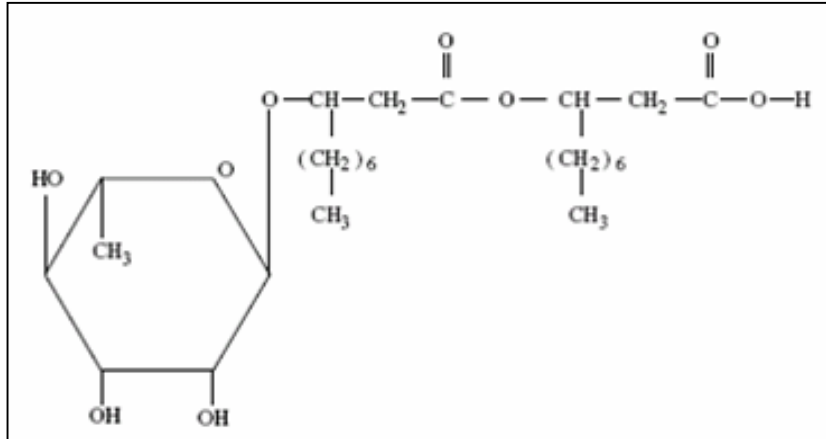


**Figure 2** : la structure d'une molécule de sophorolipides (Inoue et Itoh, 1987).

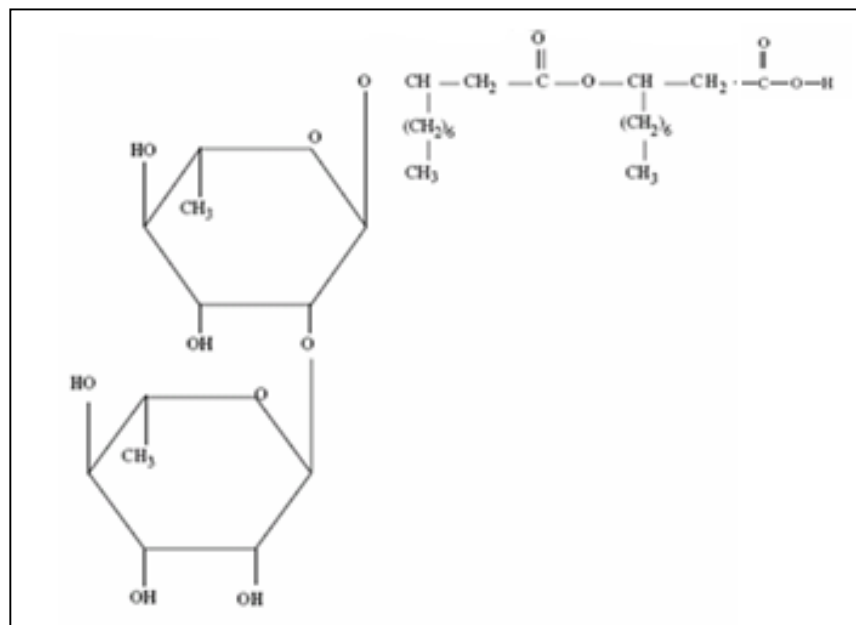
- **Les rhamnolipids**

Sont des biosurfactants dans lesquels une ou deux molécules de rhamnose sont liées à une ou deux molécules d'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque, se sont les biosurfactants les plus étudiés, la production des rhamnoses liés à des lipides chez *Pseudomonas aeruginosa* sont étudiés pour la première fois par Jarvis et Johnson.

L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate et L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate, sont référées comme des rhamnolipides R1 (Mono-rhamnolipide) et R2 (Di-rhamnolipide) respectivement, sont les principales rhamnolipides produites par *Pseudomonas aeruginosa*. (Desai et Banat, 1997)



**Figure 3** : la structure de Mono-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b-hydroxydecanoate (Desai et Banat, 1997).



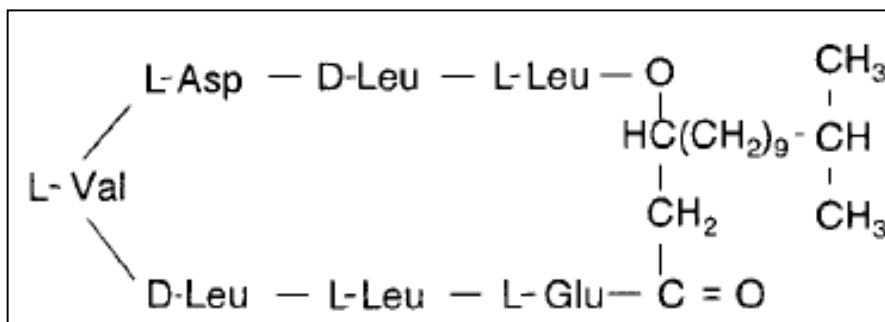
**Figure 4** : la structure de Di-rhamnolipide ou L-rhamnosyl-L-rhamnosyl-b-hydroxydecanoyl-b- hydroxydecanoate (**Daisai et Banat, 1997**).

### I.2.2. les lipopeptides et les lipoprotéines

Un grand nombre des lipopeptides cycliques comprenant des antibiotiques decapeptide (gramicidines) et des antibiotiques lipopeptide (polymyxines), produits par *Bacillus brevis* et le *B. polymyxa* respectivement, possèdent des propriétés tensio-actives remarquables (**Marahiel et al, 1977**).

L'ornithine contenant des lipides produits par *P. rubescens*. (**Yamane, 1987**) et *Thiobacillus thiooxidans* (**Knoche et Shiveley, 1972**), et la lysine contenant des lipides provenant d'*Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 montrent également une excellente activité tensio-active (**Tahara et al, 1976**).

Le surfactant lipopeptide cyclique, produit par *B. subtilis* ATTC 21332, est l'un des biosurfactants les plus puissants. Il abaisse la tension superficielle de 72 à 27.9 mN/m à des concentrations aussi basses que 0.005% (**Desai et Banat, 1997**).



**Figure 5** : la structure d'une molécule de lipopeptide (**Yamane, 1987**).

### I.2.3. Les phospholipides, et les lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'agents tensio-actifs de phospholipide pendant la croissance sur les *n-alkanes*. Dans l'espèce d'*acinétobactérie* des vésicules riches en phosphatidylethanolamine, sont produites, et qui forment des microémulsions optiquement clairs des alcanes dans l'eau.

La production des phospholipides a été également détectée dans quelques espèces d'*Aspergillus* et *Thiobacillus thiooxidans* (Kappeli et Finnerty, 1979).

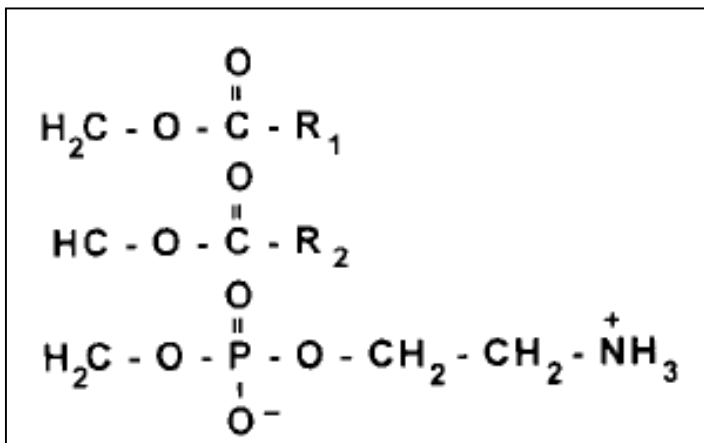
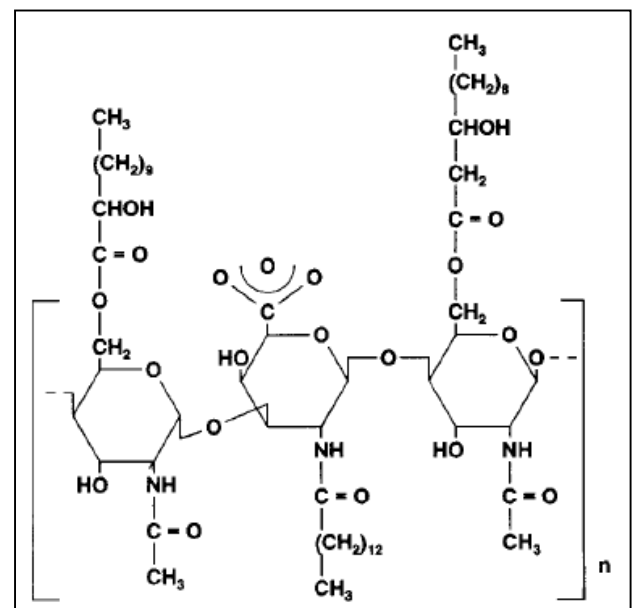


Figure 6 : structure des lipides neutres

(Kappeli et Finnerty, 1979).



## IV. Application des biosurfactants

### II.1. Les différents champs d'application :

Les Biosurfactants ont potentiellement remplacé les tensioactifs synthétiques dans plusieurs procédés industriels, comme la lubrification, mouillage, ramollissement, la fixation de colorants, la préparation d'émulsions, dispersions de stabilisation, moussants, prévention de la mousse, ainsi que dans les aliments, l'industrie biomédicale et pharmaceutique, et la bioremédiation des sites contaminés. Les glycolipides et les lipopeptides sont les biosurfactants les plus importants à des fins commerciales (**tableau 2**).

Shete et al., (2006) ont cherché les brevets sur biosurfactants et bioémulsifiants, (255 brevets délivrés dans le monde). Ils ont indiqué le nombre élevé de brevets dans l'industrie du



pétrole (33%), les cosmétiques (15%), les agents antimicrobiens et de la médecine (12%) et la bioremédiation (11%). Les Sophorolipides (24%), la surfactine (13%) et les rhamnolipides (12%) représentent une grande partie des brevets.

**Tableau 1** : application des différents biosurfactants.

| Classe de biosurfactants  | Biosurfactants            | Microorganisme                                          | Application                                     |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| glycolipides              | Rhamnolipides             | <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. putida</i>                | Bioremédiation                                  |
|                           |                           | <i>P. chlororaphis</i>                                  | Agent de biocontrôle                            |
|                           |                           | <i>Bacillus subtilis</i>                                | Agent antifongique                              |
|                           |                           | <i>Renibacterium salmoninarum</i>                       | Bioremédiation                                  |
|                           | Sophorolipides            | <i>Candida bambicola</i> et <i>C. apicola</i>           | Emulsifiants, biodégradation des alcanes        |
|                           | Tréhalose lipides         | <i>Rhodococcus spp</i>                                  | Bioremédiation                                  |
|                           |                           | <i>Tsukamurella sp</i> et <i>arthrobacter sp</i>        | Agents antimicrobiens                           |
| Mannosylerythriol lipides | <i>Candida antarctica</i> | Antagonistes des neurorécepteurs, Agents antimicrobiens |                                                 |
|                           | <i>Kurtzmanomyces sp</i>  | Application biomédicales                                |                                                 |
| Lipopeptides              | surfactines               | <i>Bacillus subtilis</i>                                | Agents antimicrobiens, Application biomédicales |
|                           | Lichenysine               | <i>B. licheniformis</i>                                 | Agents hémolytiques et chélateurs               |

**Tableau 2** : Utilisations potentielles des biosurfactants (d'après Banat *et al.*, 2000)

| Fonction                        | Champ d'application                                                    |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Emulsifiant et dispersant       | Cosmétiques, peintures                                                 |
| Solubilisant et micro-émulsions | Pharmaceutique, articles de toilette                                   |
| Agent mouillant et pénétrant    | Pharmaceutique, industrie textile, peinture                            |
| Détergent                       | Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie |
| Agent moussant                  | Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais              |
| Agent épaississant              | Peintures                                                              |
| Agent séquestrant des métaux    | Minerais                                                               |

|                                  |                                                              |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Aide à la croissance bactérienne | Traitement d'huiles usagées pour boues de STEP, fermentation |
| Dé-émulsifiant                   | Traitement de déchets                                        |
| Agent réducteur de viscosité     | Transport par pipeline                                       |
| Dispersant                       | Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau       |
| Récupération de ressources       | Récupération assistée de pétrole                             |

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (**Desai et Banat, 1997 ; Banat et al., 2000**). C'est pourquoi ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines (**Tableau 2**). Cependant, il semblerait que les biosurfactants soient principalement utilisés par l'industrie pétrochimique (**Desai et Banat, 1997, Christofi et Ivshina, 2002**).

## II.2. Effet antimicrobien des biosurfactants :

Les rhamnolipides ont une activité antimicrobienne. Des auteurs ont montré que ces biosurfactants sont des agents bactériostatiques très efficaces contre *Listeria monocytogenes*, lié à la contamination alimentaire. Ces molécules ont montré un effet synergique lorsqu'il est combiné avec la Nisine, une bactériocine à large spectre. Les biosurfactants et surfactine se sont avérés capables de réduire l'adhérence bactérienne à des surfaces de polystyrène plus efficaces que le laurylsulfate de sodium, tensio-actif chimique. En outre, les rhamnolipides purifiée, inhibent pratiquement 100% de la croissance de la souche *L. monocytogenes* adhérente ([Araujo et al., 2011](#)).

Les lipopeptides, comme des tensioactifs, sont particulièrement intéressantes à raison de leurs activités de surface élevées et le potentiel antibiotique. Ces biosurfactants jouent des rôles antibiotiques, antiviraux et antitumoraux, aussi comme les immunomodulateurs et les inhibiteurs de toxines et des enzymes spécifiques. La Surfactine, un lipopeptide cyclique, est connu pour être actif dans plusieurs activités biologiques, telles que l'induction de la formation des canaux ioniques, un antiviral et antitumoral, un agent anti-inflammatoire. En outre, la surfactine présente une activité de réduction de la colonisation des bactéries pathogènes, tels que *L. monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii* et *Salmonella enteritidis*, lorsqu'il est appliqué à des surfaces solides avant l'infection (**Ongena, et Jacques, 2008**).

## **II.3. remobilisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques par les biosurfactants**

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

Enfin le caractère peu toxique et biodégradable des biotensioactifs facilite leur utilisation. Les études réalisées jusqu'à présent portent le plus souvent sur la remédiation assistée (SEAR) par des surfactants d'origine chimique. De nombreux auteurs (**West et Harwell 1992, Noordman et al., 2002, Bettahar et al., 1999, McCray et al., 2001**) expliquent que les tensioactifs agissent de façons différentes, par mobilisation et par solubilisation.

### **II.3.1. La mobilisation**

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des surfactants à diminuer les tensions interfaciales entre les NAPL (non aqueous phase liquids) et l'eau lorsque les molécules de tensioactifs se partagent à la surface du NAPL (**McCray et al., 2001**). La mobilisation se subdivise en deux étapes : une étape de déplacement et une étape de dispersion. Le déplacement correspond à la libération des gouttes de NAPL du milieu poreux grâce à la réduction des tensions interfaciales (**Abdul et Gibson, 1991, Bai et al., 1998**). La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions.

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 (**West et Harwell, 1992 ; Bettahar et al., 1999**).

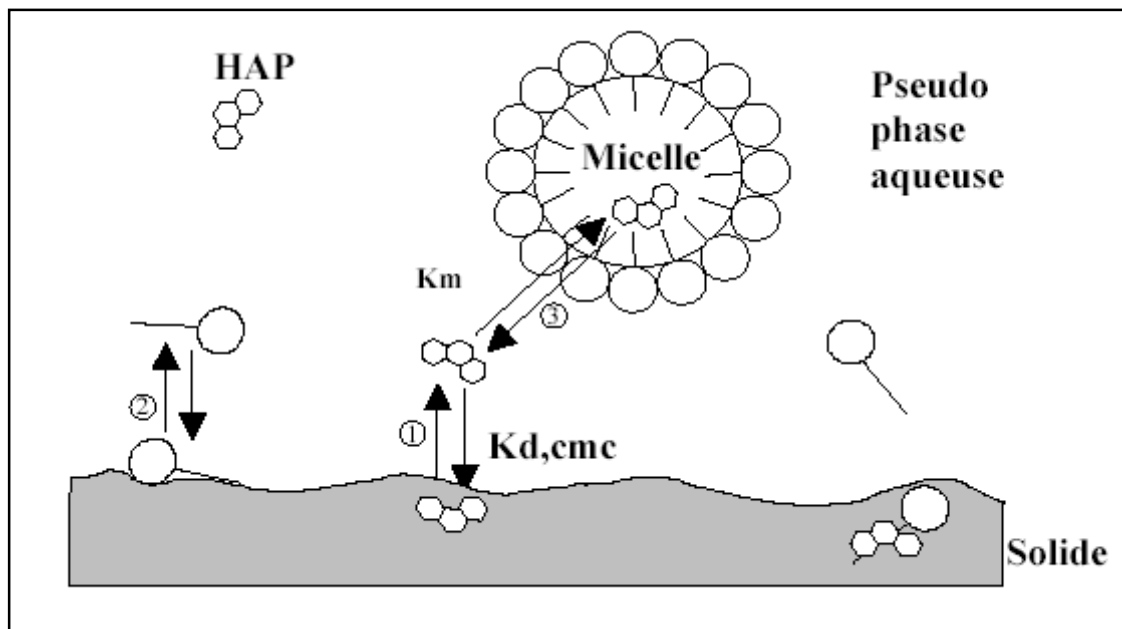
### **II.3.2. La solubilisation**

C'est le mode d'action privilégié pour traiter les sols ; elle résulte de la formation de micelles. La solubilisation est basée sur la capacité des solutions micellaires à augmenter la solubilité des contaminants hydrophobes. Généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effets sur la plupart des COH (**Pennel et al., 1993**). Au-dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des COH dans les micelles apparaît, permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente. **Bai et al., (1998)** indiquent qu'à de fortes concentrations, la solubilisation est le mécanisme principal. La Figure 7 schématise le mode d'action des

tensioactifs. Comme le montre ce schéma, la remédiation résulte de différentes interactions qui peuvent parfois être en compétition.

Du fait de leur caractère hydrophobe, les HAP ont une tendance naturelle à se sorber aux sols. Leur concentration 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 décrit 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 (**Karickhoff *et al.*, 1979**). En présence de tensioactif, Edwards *et al.* (1994) ont défini un coefficient de partage  $K_d$ , CMC qui représente le coefficient de partage du HAP entre le sol et la phase aqueuse en présence d'une solution micellaire. Ceci est représenté par l'équilibre (1) de la Figure 7.

D'un point de vue pratique, le mécanisme de solubilisation nécessite l'injection de grandes quantités de solutions tensioactives par rapport au mécanisme de solubilisation. Cela peut représenter un inconvénient majeur en termes de coût de dépollution.



**Figure 7** : Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant (d'après **Edward *et al.*, 1994**).

### III. La production des surfactants biologiques

Le principal frein à l'utilisation des biosurfactants est leur coût. En effet, **Bognolo, (1999)** indique que les prix varient de 8 €.mg<sup>-1</sup> pour de la Surfactine purifiée à 98 % (utilisations biomédicales) à 1 à 3 €.kg<sup>-1</sup> pour des formulations d'Emulsan utilisées dans les années 80 pour le nettoyage des cuves. De récentes estimations indiquent un coût de revient de 2 à 16 €.kg<sup>-1</sup>.

**Lang et Wullbrandt, (1999)** indiquent que pour la production de rhamnolipides en grande quantité dans des fermenteurs de 20 à 100 m<sup>3</sup>, les coûts diminuent de 16 à 4 €.kg<sup>-1</sup>. Par comparaison, les coûts de surfactants chimiques sont de l'ordre de 0,5 à 2 €.kg<sup>-1</sup>.

Ainsi, le succès de l'utilisation et la production des biotensioactifs passe par une diminution des coûts de production ; Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, **Makkar et Cameotra (2002)** indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...). Une étude réalisée par **Mercadé et Manresa (1994)** reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.L<sup>-1</sup> pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

#### III.1. Les organismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes qui se développent en aérobiose dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (**Bognolo, 1999 ; Mulligan et al., 2001**). Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (Tableau 03). Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire (**Christofi et Ivshina, 2002**).

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

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les HAP. Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2,

on obtient un mélange de deux, voire quatre rhamnolipides (**Van Dyke et al., 1993**). **Abalos et al. 2001**) indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Bien que de nombreuses espèces produisent des biotensioactifs, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (**Banat et al., 2000**). La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel de glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifiques, il y a intervention de donneurs rhamnosyl, les TPD transférases. Deux transférases différentes permettent la formation de quatre rhamnolipides différents (**Koch et al., 1991**). Les molécules de biosurfactant sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (**Thangamani et Shreve, 1994**).

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

**Tableau 3** : Principaux types de surfactants biologiques (adapté par **Desai et Banat, 1997** et **Banat et al., 2000**).

| Groupe                        | Biosurfactant  | Micro-organisme                                                    |
|-------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| Glycolipides                  | Rhamnolipides  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                      |
|                               | Trehalolipides | <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Nocardia</i> ,<br><i>Mycobacterium</i> |
|                               | Sophorolipides | <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida antartica</i>                |
| Lipopeptides et lipoprotéines | Surfactine     | <i>Bacillus subtilis</i>                                           |
|                               | Viscosine      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                     |
| Phospholipides                | Phospholipide  | <i>Corynebacterium insidiosum</i>                                  |

|                                     |                 |                                    |
|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| Acides gras                         | Acide gras      | <i>Corynebacterium lepus</i>       |
| Lipides neutres                     | Lipides neutres | <i>Clostridium pasteurianum</i>    |
| Lipopolysaccharides ou polymériques | Emulsan         | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |

### III.2. suivie de production des biosurfactants :

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

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

## V. Optimisation de la production des biosurfactants

Les Rhamnolipides sont produites principalement par des espèces de *Pseudomonas*, comme *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie produit les rhamnolipides en tant que métabolites secondaires et leur production peut se coïncider avec la phase stationnaire de croissance. Les Rhamnolipides peut être produites en utilisant des sources de carbone variées, comme les huiles végétales (par exemple, d'olive, de soja et de maïs), le glucose, le glycérol et des n-alcanes (**Banat, 1995**).

Les sources de carbone et d'azote sont des facteurs importants dans la production de ces biosurfactants et ont une grande influence sur leur coût de production, dont des efforts considérables ont été faits pour utiliser des sous-produits agro-industriels et de ressources renouvelables comme substrats dans le processus de production. Des études ont montrées que l'utilisation de substrats peu coûteux, tels que les matières brutes ou des déchets, affecte considérablement les coûts de production biosurfactants de (**Ron et Rosenberg, 2002**). Les différents substrats issus des déchets ont été utilisés pour la production rhamnolipides, tels que les

acides gras à partir de déchets de raffinerie d'huile de soja, la glycérine par les déchets de la production de biodiesel et les déchets des raffineries d'huile de tournesol (**Desai et Banat, 1997**).

La source d'azote, le rapport C / N et les sels minéraux sont également des variables importantes pour atteindre une meilleure productivité des rhamnolipides. Actuellement, la source d'azote principale utilisée pour promouvoir la production rhamnolipide est le nitrate. En contraste avec le nitrate, l'ammonium exerce une action inhibitrice la production des rhamnolipides (**Cameotra et Makkar, 1998**) Les conditions de croissance limitantes sont connues des accélérateurs de la production des rhamnolipides, ainsi que d'autres métabolites secondaires. Un grand teneur en ratio carbone-'azote (C / N) et carbone - phosphore inorganique (C / P) a un effet pour augmenter la productivité rhamnolipides. En outre, la limitation de la concentration des ions multivalents, tels que Mg, Ca, K, Na, et des oligo-éléments augmente le rendement en rhamnolipides (**Champion et al., 1995**). Les conditions de croissance qui ont une influence de surproduction des rhamnolipide par *P. aeruginosa* ont été intensivement étudiées. Les principales recherches sur ces conditions de croissance peuvent être divisées en :

- a. Les cultures dans des conditions limitant la croissance.
- b. Cultures sur agitation ou en bioréacteurs, qui comprennent la culture continue, les stratégies fed-batch et systèmes d'aération contrôlée, les stratégies biochimiques et moléculaires, conduisant à améliorer la capacité de la souche à produire ces biosurfactants.

## **IV.1. Paramètres influençant la production**

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

### **IV.1.1. Influence de la source de carbone**

La source de carbone est un des paramètres influençant le plus la production des biotensioactifs, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. La revue bibliographique a montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides, cependant les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles (**Desai et Banat, 1997 ; Cameotra et Makkar, 1998**), comme des n-alcane ou de l'huile d'olive. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas*



*aeruginosa* 19SJ a produit des tensioactifs sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène (Déziel *et al.*, 1996), la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène.

Mata-Sandoval *et al.*, (2000) reportent que les huiles végétales sont parmi les substrats qui fournissent des taux de production de rhamnolipides les plus élevés lorsqu'ils sont utilisés comme seule source de carbone et avec certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le changement du substrat carboné altère la structure des molécules produites. En effet, Fiechter (1992) indique que le remplacement du substrat initial par du sucrose entraîne la formation de glycolipides à base de sucrose au lieu de glycolipides à base de tréhalose. Il est également possible d'ajouter d'autres sources de carbone afin d'augmenter les rendements de production. Desai et Banat (1997) indiquent qu'un ajout d'hexadécane dans le milieu constitué de D-glucose pendant la phase de croissance stationnaire provoque une augmentation de rendement.

#### IV.1.2. Influence de la source d'azote

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

L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices, par exemple, la production de tensioactif par *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 est favorisée en présence d'ammonium plutôt qu'en présence de nitrates.

Par contre, Robert *et al.* (1989) indiquent que la production de surfactant à partir de *Pseudomonas* 44T1 cultivées sur de l'huile d'olive donnait de meilleurs rendements avec du nitrate de sodium. Hommel *et al.* (1994) indiquent que la production des sophorolipides par *Candida apicola* augmente avec la concentration initiale en sulfate d'ammonium et que la proportion des deux isomères produits varie aussi avec la concentration initiale en ammonium. Des résultats semblables ont été obtenus par Manresa *et al.* (1991) à partir d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

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

### **IV.1. 3 Influence du pH**

**Arino et al. (1996)** et **Desai et Banat (1997)** indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de tensioactif chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardia corynebacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0.

**Ishigami et al. (1987)** et **Champion et al. (1995)** ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées.

### **IV.1. 4 Influence des sels minéraux :**

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

### **IV.1. 5 Influence de l'agitation**

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance.

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

## **IV.2. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance**

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

La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, ou des techniques reposant sur la

précipitation du tensioactif (**Desai et Banat, 1997**). Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices.

Il est possible d'acidifier le milieu puis d'extraire le tensioactif par un mélange de solvants (chloroforme/méthanol) comme l'ont fait **Parra et al. (1989)**. Généralement, l'acidification permet une précipitation du tensioactif. Suite à cette précipitation, une étape de centrifugation puis de lavage est nécessaire pour récupérer et purifier le tensioactif.

Il existe des techniques de récupération en continu. **Reiling et al. (1986)** ont réalisé une adsorption sur de l'Amberlite XAD-2 suivie d'une purification et lyophilisation, donnant des rendements variant de 60 à 90 % en pureté.

La capacité des biosurfactants à s'agréger aux surfaces a également été utilisée pour les retenir sur des membranes de filtration. Par exemple, une membrane XM-50, dont le seuil de coupure est de 5000 D, a été utilisée sur une surfactine pure à 97 % et un taux de récupération de 98 % est obtenu, alors qu'une membrane avec un seuil de coupure plus élevé (10 000 D) fournit un rendement de récupération de 92 % (**Desai et Banat, 1997**).

### **IV.3. Identification des biosurfactants**

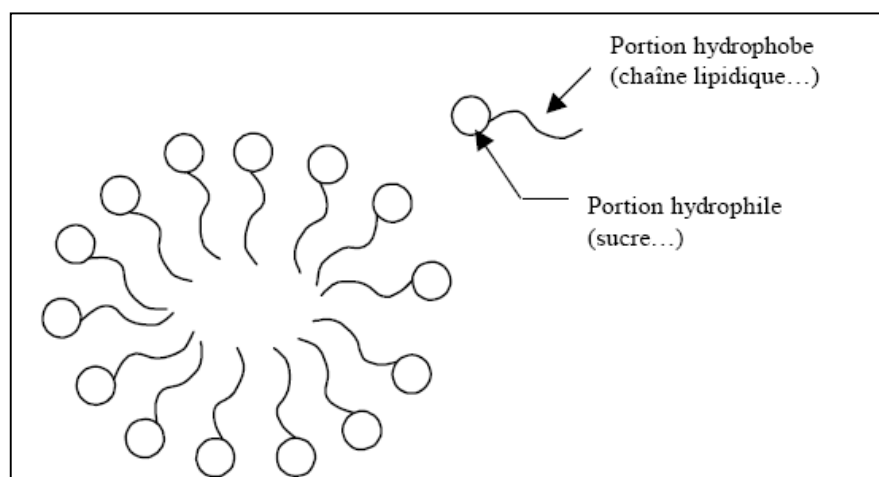
Une fois les produits (biosurfactants) sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquemment :

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

## V. Propriétés physico-chimiques des biotensioactifs

### V.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 (**Poré, 1992**). Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créent une forte augmentation de l'énergie libre du système. Une façon d'abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou de former des micelles (**Haigh, 1996**). En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (**Figure 8**).



**Figure 8** : Représentation schématique d'une micelle de surfactant.

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN/m en solution aqueuse).

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

La CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques (**Edwards et al., 1991**). Les effets des électrolytes sur

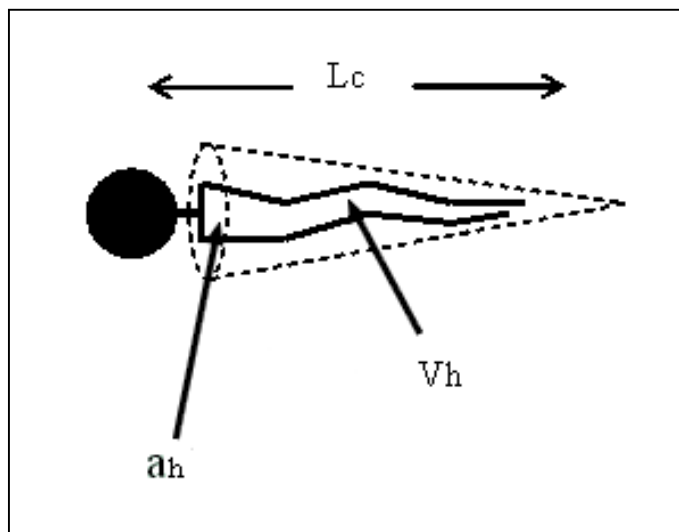
la CMC sont plus prononcés pour les surfactants ioniques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (Haigh, 1996).

## V.2. Paramètres influençant la Micellisation

Les micelles de surfactants s'arrangent en différentes micro-structures sphériques, globulaires ou cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bi-couches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées (Champion *et al.*, 1995).

Le volume intérieur des micelles dépend de la forme des micelles et du nombre d'agrégation (nombre de monomères constituant la micelle). Généralement, il faut de 50 à 100 monomères pour former une micelle (Christofi et Ivshina, 2002).

Le nombre d'agrégation augmente quand l'aire de la section transversale de la partie hydrophile ( $a_h$ ) diminue (Figure 9). Quand le nombre d'agrégation augmente, le volume intérieur de la micelle augmente.



**Figure 9** : Représentation schématique d'une molécule de surfactant (d'après Bai *et al.*, 1998).

$L_c$  représente la longueur de la chaîne hydrophobe.  $V_h$  le volume occupé par celle-ci.

$L_a$ , forme de la micelle dépend également de la structure du surfactant. À l'aide d'une approche géométrique, la forme de la micelle peut être déterminée par le rapport  $V_h/(a_h.L_c)$  (Bai *et al.*, 1998). Si ce rapport est inférieur à  $1/3$ , la micelle est de forme sphérique.

La morphologie des agrégats varie avec le pH, la concentration en surfactant, la température ou la force ionique (**Champion et al., 1995**). Par exemple, lorsqu'un cation comme Na<sup>+</sup> est ajouté en solution, il compense la charge négative de la tête du surfactant (anionique), réduisant ainsi les répulsions électrostatiques entre têtes polaires, entraînant une diminution de **ah**. Ceci va augmenter le nombre d'agrégation des micelles et le volume intérieur de ces micelles, et ainsi la solubilisation sera favorisée.

### **V.3. Solubilité des tensioactifs en fonction de la température**

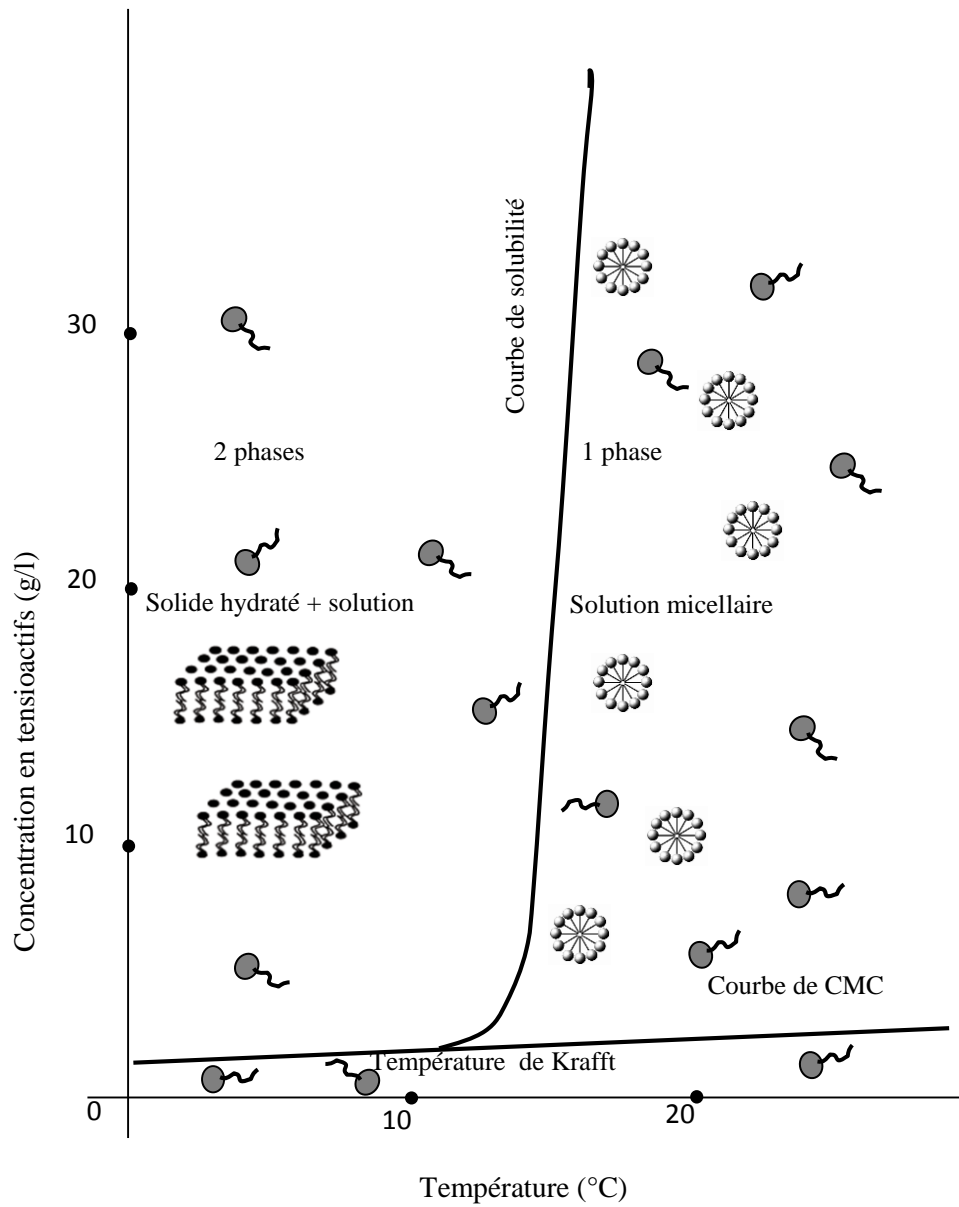
Pour les tensioactifs ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température (Figure 10) fait apparaître un comportement irrégulier, à partir d'une certaine température  $T_k$ , dite température de Krafft, la solubilité augmente brusquement. Sur ce même graphe, la courbe représentant la CMC en fonction de la température a été ajoutée. La température de Krafft correspond à l'intersection de la courbe de solubilité et celle de la CMC.

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

La température de Krafft des tensioactifs anioniques varie en fonction de la nature du groupement hydrophobe, mais également des ions présents en solution. Les tensioactifs non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble.

### **V.4. Toxicité et biodégradabilité des biosurfactants**

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. **Edwards et al. (2003)** ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (*Mysidopsis Bahia* et *Menidia Beryllina*). Ces auteurs concluent que les biotensioactifs ont des toxicités intermédiaires à celles des chimiques. Par exemple, l'Emulsan qui est le biosurfactant le moins toxique de l'étude, présente une CL50 (concentration létale) supérieure à 200 mg/l. A titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, a une CL50 de 2,5 à 6 mg/l. Le Tableau 4 regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques.



**Figure 10** : Solubilité d'un tensioactif ionique en fonction de la température (d'après Shinoda et Fontell, 1995).

**Tableau 4** : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (d'après **Christofi et Ivshina, 2002**).

CE50 : concentration effective à 50 %, c'est à dire affectant 50 % de la population testée

| Surfactant                                           | Origine    | CE50 (mg.L <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------------------|------------|----------------------------|
| <i>Rhodococcus ruber</i> AC 235 glycolipide complexe | Biologique | 650                        |
| Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i> |            | 49                         |
| Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>       |            | 286                        |
| Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       |            | 50                         |
| Stéarate de sucrose (DK 50)                          |            | 67                         |
| Finasol OSR-5                                        | Chimique   | 7                          |
| Corexit 9597                                         |            | 5                          |
| Inipol EAP 22                                        |            | 0,004                      |

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

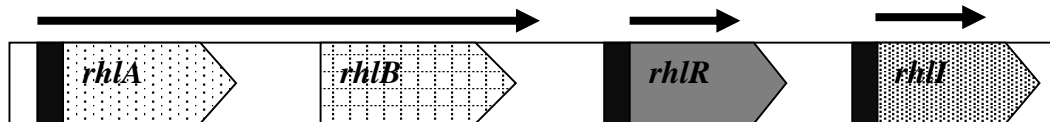
De nombreux auteurs indiquent que les biotensioactifs sont biodégradables (**Parra et al., 1989 ; Herman et al., 1995 ; Banat et al., 2000 ; Vipulanandan et Ren, 2000**). Une étude réalisée par **Deschênes et al., (1996)** reporte que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations (500 µg de tensioactif/g de sol). Ces auteurs indiquent de plus que le surfactant était biodégradable. De même, **Vipulanandan et Ren (2000)** ont prouvé que la biodégradation du biosurfactants produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphthalène. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Page et al., (1999)** qui expliquent le phénomène par le fait que les biotensioactifs sont des sous-produits ou des constituants membranaires des micro-organismes. Il faut cependant noter que la biodégradation des tensioactifs biologiques pose un problème économique, en effet, pour éviter toute perte d'efficacité de



dépollution, il est nécessaire d'augmenter les taux de tensioactifs appliqués, ce qui induit un surcoût.

## VI. Etude génétique de la production des rhamnolipids

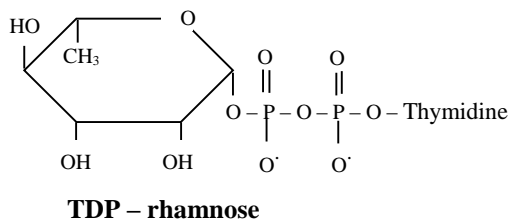
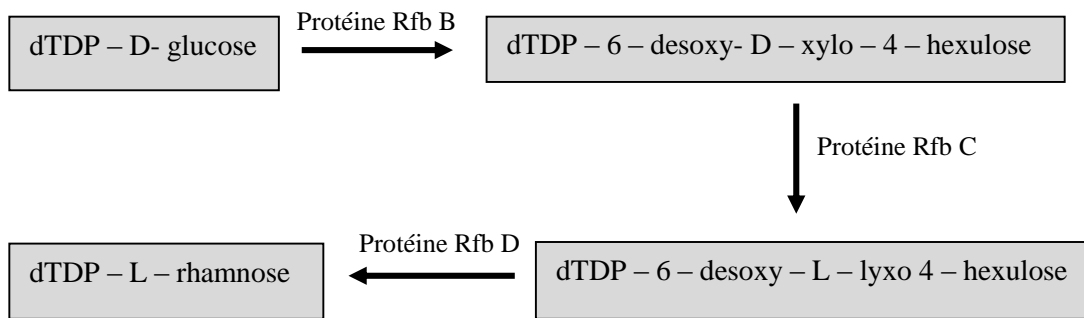
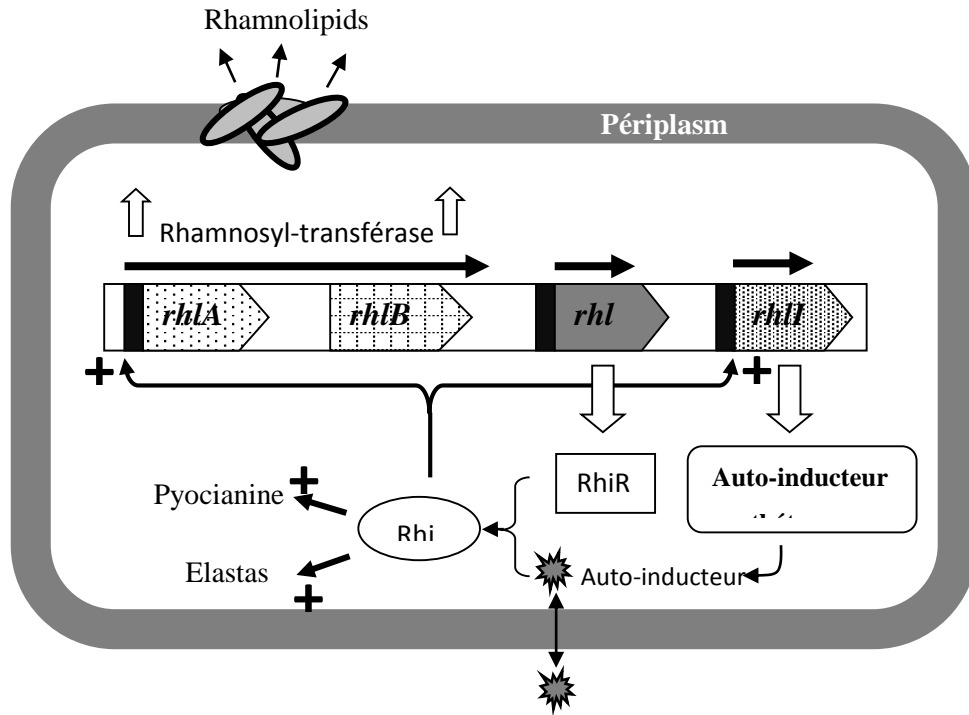
Les rhamnolipides sont synthétisées par une protéine enzymatique qui est la rhamnosyltransférase codée par l'opéron *rhlAB* qui catalyse le transfert du TDP-L-rhamnose à des fractions de 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) acide alcanoïque (HAA) de différentes longueurs (Déziel et al, 2003).



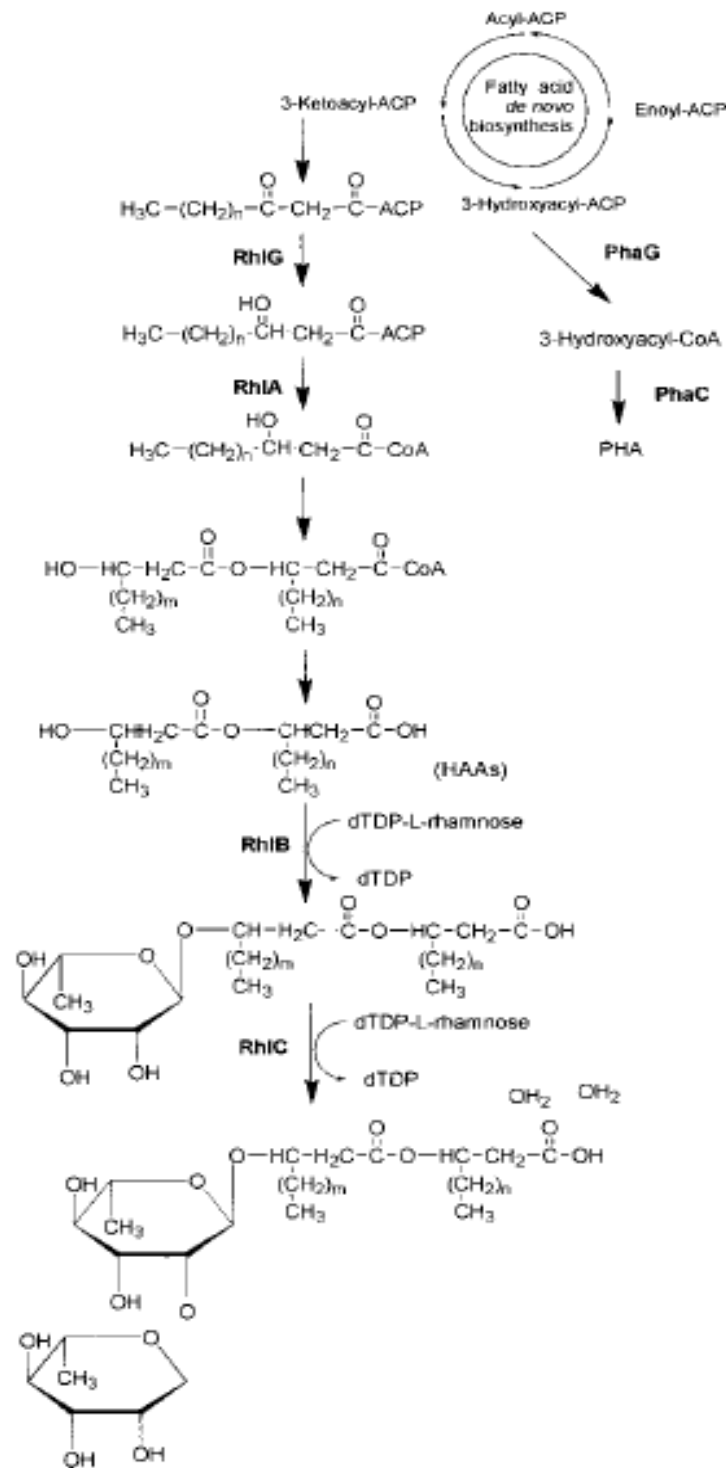
**Figure 11** : schéma générale du gène qui code la production des rhamnolipides.

Deux autres gènes sont impliqués dans la production des protéines régulatrices qui agissent sur l'opéron *rhlAB* et qui sont le *rhlR* et le *rhlI*. La protéine régulatrice RhIR est activée en se liant ses auto-inducteurs apparentés le facteur 2 et/ou qui sont produites par l'auto-inducteur synthétase RhIB.

La liaison de la protéine RhIR activée aux sites-cibles en amont du promoteur *rhlA* améliore la transcription de l'opéron *rhlAB*, qui code pour la rhamnosyltransférase, l'enzyme clé de la biosynthèse des rhamnolipides (Ochsner et Reiser, 1995).



**Figure 12** : Modèle de régulation de production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner et Reiser, 1995).



**Figure 13** : Schéma générale de la voie de synthèse du rhamnolipide par *P. aeruginosa* (Déziel et al, 2003).

*Chapitre II :*  
*Matériels et Méthodes*

## **II. Zones de prélèvement**

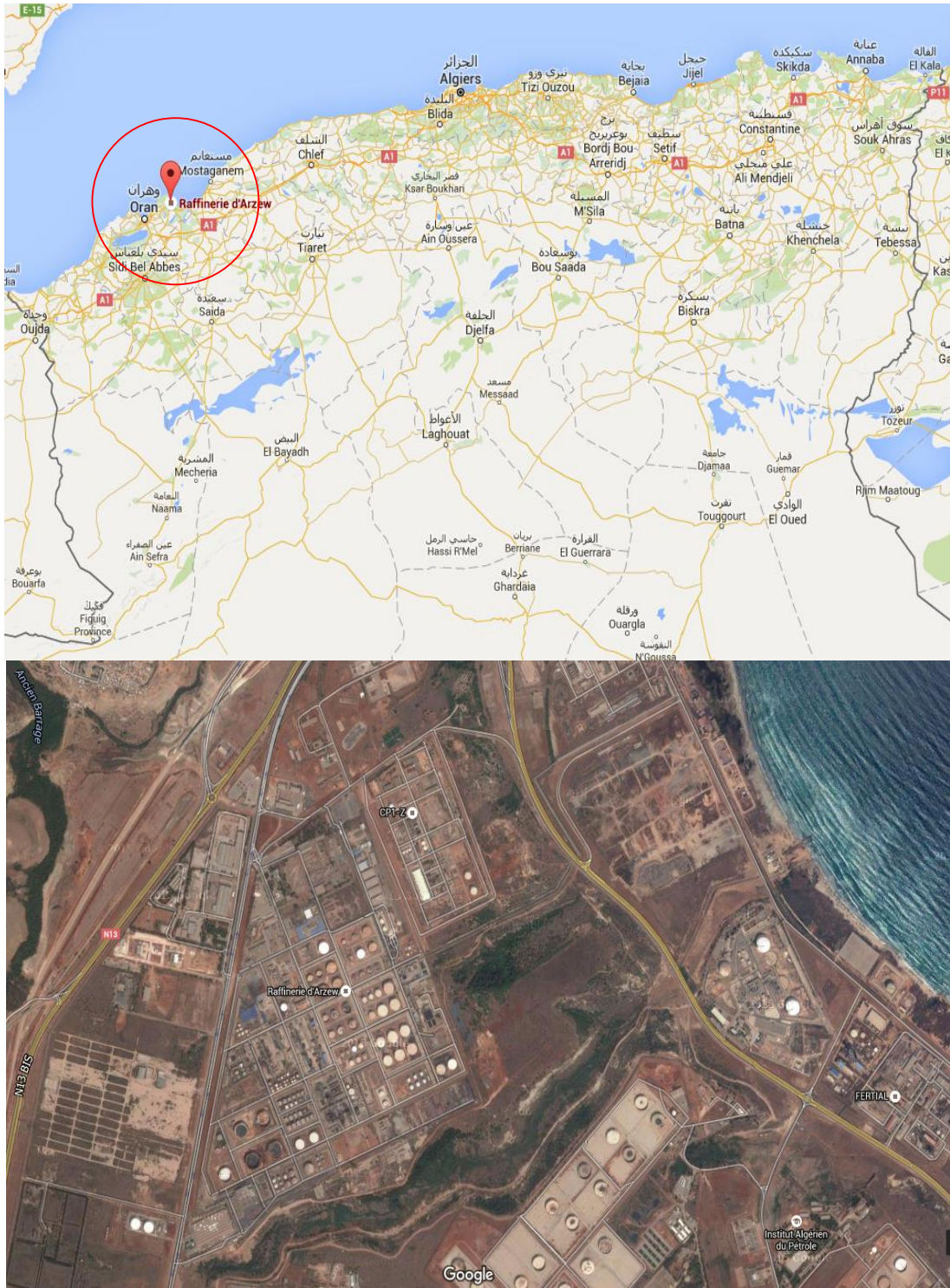
Les échantillons ont été prélevés à partir du sol de trois sites différents. Les zones d'étude ont été choisies sur la base de son degré de pollution par des hydrocarbures ou des huiles végétales. Un bournier est construit de telle sorte qu'il occupe une surface aussi réduite que possible et que les déchets de l'industrie pétrolière ou des huiles rejetés y soient contenus sans engendrer des risques de pollution.

Des prélèvements ont été effectués à partir de deux types de bourniers, le premier est de nature pétrolier, situé au niveau de la raffinerie de pétrole à ARZEW wilaya d'ORAN, et le deuxième est une accumulation des déchets d'une huilerie d'olive à FELAWCENE wilaya de TLEMEN. La raffinerie d'ARZEW est située dans la zone industrielle sur le plateau d'El MAHGOUNE à deux kilomètres de la ville d'ARZEW et environ 40 kilomètres de la ville d'[ORAN](#). Elle occupe 170 hectares et se situe au voisinage du port.

L'huilerie de FELLAWCENE a commencé ses activités dès l'année 2000, un sol pollué par ces déchets est choisi pour effectuer les prélèvements.

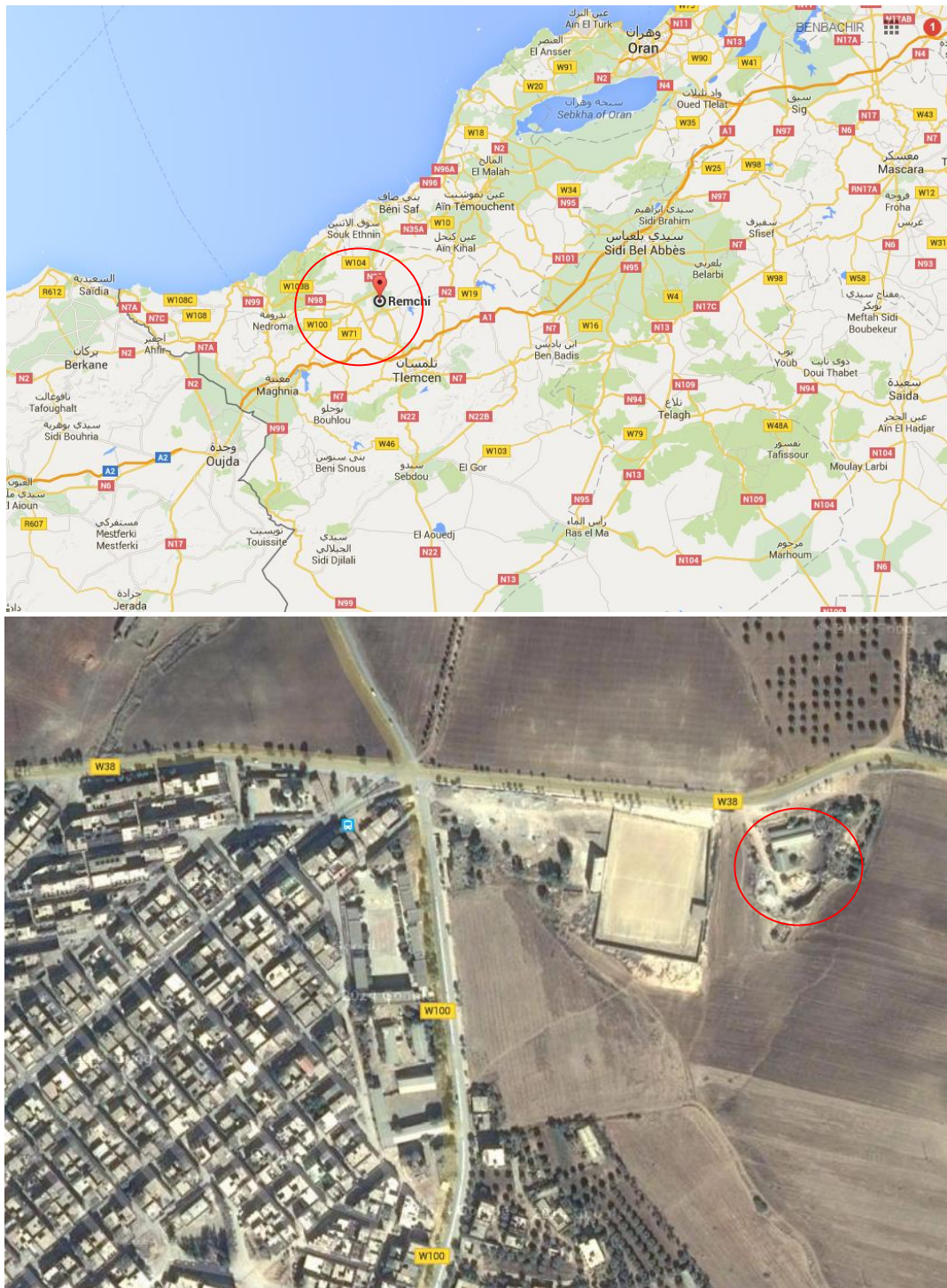
Le 3<sup>ème</sup> site choisi pour faire des prélèvements est situé au niveau d'un sol pollué par les carburants de la station de distribution des hydrocarbures à la commune de REMCHI, wilaya de TLEMEN.

Tous les prélèvements ont été effectués à une profondeur de 10 cm du sol ou de bournier, les échantillons prélevés sont mis dans des boîtes de Pétri stériles puis transportés au laboratoire de microbiologie de l'université de Mascara dans une glacière à une température optimale de 4°C.



**Figure 14 : Localisation de la région d'ARZEW (Google Map, 2015).**





**Figure 15** : Localisation et sites de prélèvements de l’Huilerie de FELAWCEN.





**Figure 16** : Bourbier et sol situés à l'huilerie de FELLOWCEN.



**Figure 17** : Station de distribution de carburant-Remchi (Google map, 2015).

## II. Isolement et purification



## II.1. Préparation des dilutions et isolement

Dans un flacon stérile de 250 ml, une pesée de 10 g de sol est diluée dans un volume de 90 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 1 ml du surnageant, récupéré est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une dilution décimale de  $10^{-2}$ . Des dilutions successives ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) ont été préparées par la suite.

## II.2. Ensemencement et purification

L'ensemencement est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur un boîtier de Pétri contenant la gélose nutritive à l'aide d'un râtelier stérile en verre. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures. Les observations macroscopiques des colonies obtenues ont été effectuées afin de déterminer leurs formes, couleur et d'autres caractéristiques. Ensuite, les colonies sont purifiées par des repiquages successifs sur la gélose nutritive, incubées à une température 30°C pendant 24 heures.

## II.3. Criblage primaire des souches productrices des biosurfactants

### a. Test d'hémolyse

Dans le but d'explorer le pouvoir hémolytique des souches isolées, un test d'hémolyse est effectué par un ensemencement sur la surface de la gélose au sang **Mulligan et al., (1984)**.

Une concentration de 5-7% du sang de mouton ou de cheval défibriné est ajoutée à la gélose de base préalablement liquéfiée et maintenue à 45°C (en surfusion), suivi d'une homogénéisation douce pour l'élimination de la formation de toutes éventuelles bulles d'air (**Marchal et al., 1982**). Le sang est préchauffé préalablement à une température de 37°C dans un bain marie, afin d'empêcher la formation des grumeaux dans la gélose préparée.

Une colonie pure isolée est ensemencée sur la surface de la gélose par strie ou par spots à l'aide d'une anse de platine, puis incubée à une température de 30°C pendant 24-72 heures. Une lecture positive se traduit par l'apparition d'une zone claire autour des spots, le diamètre de la zone dépend fortement de la concentration des tensioactives (**Mulligan et al., 1984**).

**Tableau 5** : Les diamètres des zones d'hémolyses formées chez les souches productrices de biosurfactants.

| Diamètre       | Hémolyse              |
|----------------|-----------------------|
| _ ( 0 cm)      | Pas d'hémolyse        |
| + ( 1mm)       | Hémolyse incomplète   |
| ++ (<1 cm)     | Hémolyse complète I   |
| +++ (1<H<3 cm) | Hémolyse complète II  |
| ++++ (>3 cm)   | Hémolyse complète III |

#### **II.4. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir hémolytique**

Les souches isolées, dotées d'un pouvoir hémolytique sont sélectionnées comme étant bactéries productrices de biosurfactants. L'identification préliminaire des souches se repose sur l'examen macroscopique, l'observation microscopique et l'étude de quelques caractéristiques enzymatiques et biochimiques.

##### **II.4.1. Aspect macroscopique des colonies**

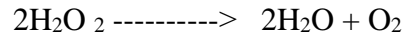
Le diagnostic bactérien primaire est basé sur la description macroscopique des souches isolées sélectionnées productrices de biosurfactants qui permet la détermination des principaux caractères tels que la forme, la taille, la couleur et la consistance des colonies.

##### **II.4.2. Aspect microscopique des souches**

La purification des souches isolées sélectionnées productrices de biosurfactants est procédée par des repiquages successifs. La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands groupes bactériens, des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs avec la détermination de la forme, la taille, et le mode de regroupement. Cependant, l'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes.

### **II.4.3. Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme qui intervient dans la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



Après l'étalement d'une colonie bactérienne sur une lame propre, une goutte d'eau oxygénée 10 volumes est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Une lecture positive de la présence du catalase se manifeste par l'apparition de bulles d'air, due principalement à la décomposition de l'eau oxygénée et la production d'oxygène.

### **II.4.4. Recherche de l'oxydase**

La recherche de l'oxydase est utilisée pour l'identification des bacilles. La présence de l'enzyme phénylène diamine oxydase est mise en évidence après le dépôt du disque d'oxydase sur une lame propre et leur imprégnation avec une suspension bactérienne pendant 2 minutes. Une réaction positive de la présence de l'oxydase se manifeste par le virage de la couleur du disque au rose-rouge (Joffin et Leyral, 2006).

### **II.4.5. Type respiratoire**

Dans le but d'explorer le type respiratoire des souches isolées, productrices de biosurfactants, une gélose viande-foie (VF) est préparée par régénération dans des tubes à essai de type Crayon dans un bain marie à une température de 100°C.

L'ensemencement est effectué sur l'état de surfusion (40-45°C) par l'enfoncement d'une pipette Pasteur boutonnée chargée de l'échantillon bactérien jusqu'au fond du tube, en retirant en faisant une spirale sur toute la hauteur du milieu jusqu'au surface. Les tubes sont ensuite renfermés sans les visser afin de permettre une pénétration progressive de l'oxygène, refroidis dans un bain marie froid et incubés à une température 30°C pendant 24-48 heures.

### **II.4.6. Détermination de l'activité amylolytique et caseinolytique**

Un ensemencement en spots ou en stries des souches isolées, productrices de biosurfactants sur la surface de la gélose de base additionnée d'une concentration de 10% d'amidon a été réalisé afin de déterminer l'activité amylolytique, Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 3-5 jours, ensuite recouvertes avec une solution de Lugol. Une réaction positive de

l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**De Vos et al., 2009**).

Le même protocole de préparation et de l'ensemencement du milieu de culture additionné de 10% du lait stérile est réalisé afin de déterminer le pouvoir de la bactérie à dégrader la caséine. Une réaction positive de la dégradation de cette protéine se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie.

#### **II.4.7. Recherche de lécithinase**

La mise en évidence de la présence de l'enzyme Lécithinase chez les souches isolées, productrices de biosurfactants est effectuée par ensemencement en spots ou en stries de la surface de la gélose Trypticase Soja Agar (TSA), additionnée d'une concentration de 10% d'émulsion de jaune d'œuf stérile. Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 3-5 jours. Une lecture positive de la production de phosphoryle-choline, diester d'acide gras et de glycérol se manifeste par l'apparition d'une zone opalescente autour de la colonie (**De VOS et al., 2009**).

#### **II.4.8. La galerie API® 20 E**

L'utilisation de la galerie API® 20 E permet la mise en évidence de quelques tests biochimiques tels que la  $\beta$ -galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H<sub>2</sub>S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres.

La galerie API® 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes de la galerie API® 20 E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les réactions positives des tests effectués sont traduites par les virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. Une lecture est effectuée à l'aide du tableau (**Biomérieux., 2006**).

### **IV. Etude de production des biosurfactants**

Des pré-cultures des souches isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants sont inoculées dans un volume de 10 ml de bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C pendant 18 heures. La biomasse bactérienne produite lors de la culture est ajustée à 0.8 à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Deux milieux de culture de fermentation à base de sels minéraux (MBS1, MBS2), préconisés pour la production des biosurfactants chez *Bacillus* et les petits coccobacilles ont été préparés.

Une suspension bactérienne d'une densité optique initiale de 0.8 est inoculée dans des Erlenmeyer stériles de 500 ml contenant un volume de 150 ml du milieu de fermentation, incubée à une température de 30°C avec une vitesse d'agitation de 150 rpm pendant 4 jours.

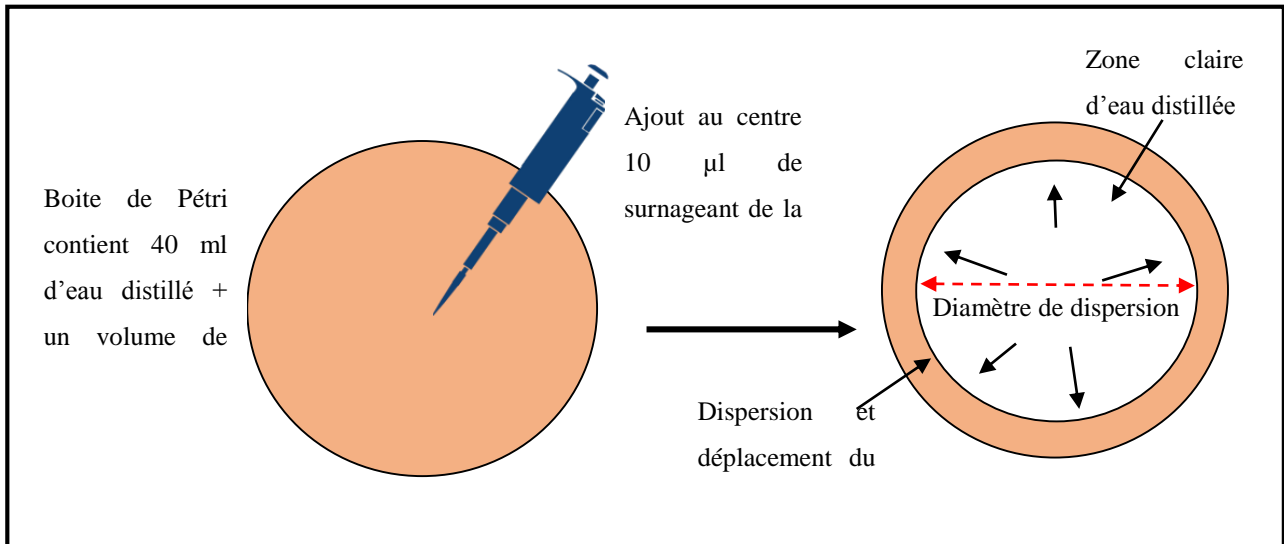
### **III.1. Criblage secondaire des souches productrices des biosurfactants**

Dans le but d'explorer la production de biosurfactants, un criblage secondaire est effectué chez les souches sélectionnées. A cet effet, différents tests basés essentiellement sur les caractères de la tension superficielle et le pouvoir émulsifiant ont été réalisés. Les surnageant des milieux de cultures contenant les souches sélectionnées productrices de biosurfactants sont récupérés par une centrifugation à une vitesse de 12000 g pendant 10 mn à une température de 4°C.

#### **III.1.1. Test de dispersion du pétrole**

**Morikawa et ses collaborateurs (2000)** ont développé le test de la dispersion du pétrole, qui consiste à introduire dans une boîte de Pétri un volume de pétrole brut à la surface d'un volume de 40 ml d'eau distillée, afin de former une mince couche d'huile. Ensuite, un volume de 10 µl d'une suspension bactérienne ou du surnageant est déposé doucement sur le centre de la couche du pétrole. La présence des biosurfactants dans le surnageant est traduite par le déplacement de l'huile et la formation d'une zone claire.

Une corrélation entre le diamètre de la zone claire formée sur la surface de l'huile et l'activité tensio-actif, appelée également l'activité de dispersion de pétrole est observée. La présence d'une concentration très élevée de biosurfactants, augmente considérablement le diamètre formé de la dispersion de l'huile. Par ailleurs, cette méthode est même applicable en présence d'une faible quantité de biosurfactants avec une faible activité tensio-actif (**Youssef et al., 2004 ; Plaza et al., 2006**).

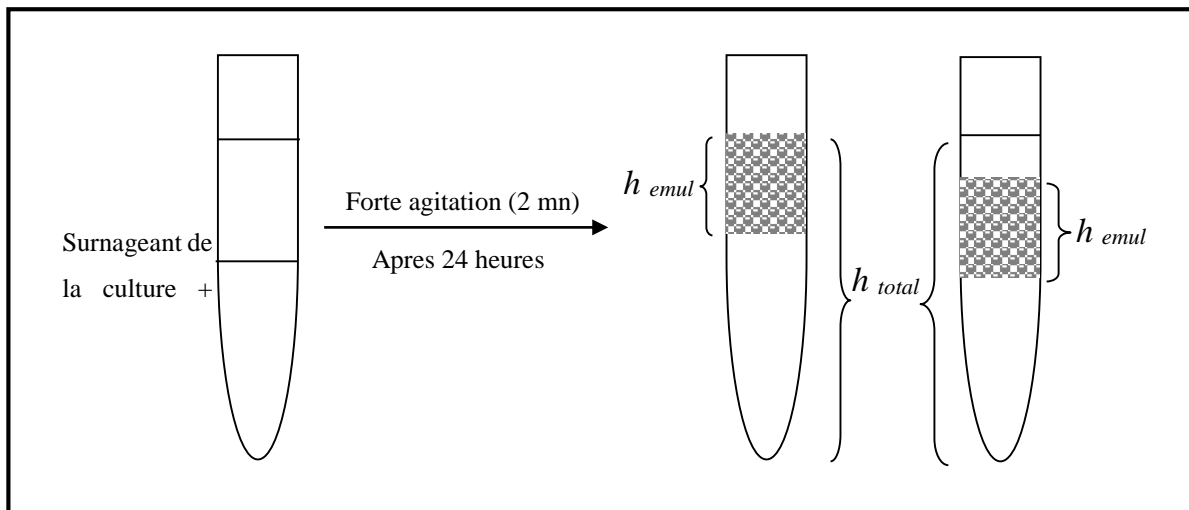


**Figure 18** : Test de la dispersion du pétrole.

### III.1.2. Test d'émulsification ( $E_{24}$ )

**Cooper et Goldenberg, (1987)** ont développé le test d'émulsification de biosurfactants ( $E_{24}$ ), qui consiste à ajouter un volume de kérosène à un volume de l'échantillon aqueux. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex à une grande vitesse pendant 2 minutes. Après 24 heures, la hauteur ( $h$ ) de la couche d'émulsion stable est mesurée. L'indice d'émulsion calculé  $E_{24}$  est le rapport de la hauteur de la couche d'émulsion et la hauteur totale du liquide (**Cooper et Goldenberg., 1987**).

$$E_{24} = \frac{h_{emulsion}}{h_{total}} \times 100\%$$

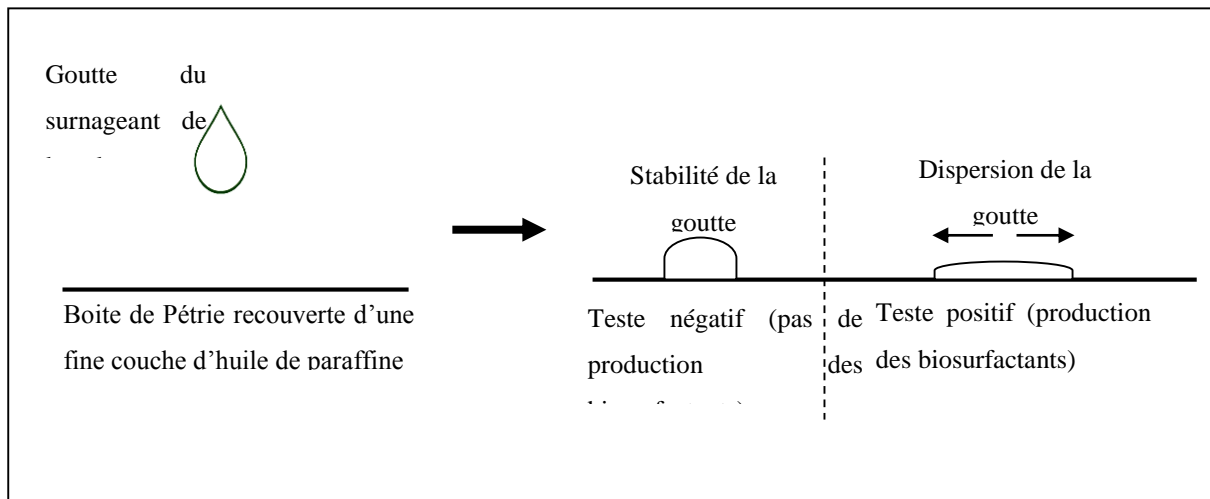


**Figure 19** : Test de l'indice de l'émulsification.

Le «  $E_{24}$  » est fortement lié à la concentration de tensioactifs. Le test d'émulsification permet le dépistage de la production des biosurfactants chez les microorganismes (**Chen et al., 2007** ; **Bento et al., 2005**).

### III.1.3. Test de « Drop Collapsing »

Ce test se repose sur la déstabilisation d'une gouttelette de surnageant de la culture sous l'action des agents tensioactifs (**Jain et al., 1991**). Une goutte d'une suspension bactérienne ou de surnageant est déposée sur une boîte de Pétri recouverte avec une couche fine d'huile de paraffine. L'absence de biosurfactants dans le surnageant permet le repoussement des molécules d'eau polaires à partir de la surface hydrophobe et la goutte reste stable. Cependant, la présence des agents tensioactifs dans le surnageant permet la dispersion de la goutte due principalement à la tension interfaciale produite entre la goutte du surnageant et la surface hydrophobe. La stabilité des gouttes est fortement liée à la concentration des agents tensioactifs. Le témoin utilisé est le milieu de culture inoculé avec une suspension bactérienne avec une densité optique initiale de 0.5. Les diamètres de la goutte formée indiquent la concentration des biosurfactants produite.



**Figure 20** : Test de collapsus de la goutte.

### III.1.4. Mesure de la tension superficielle

La méthode Du-Nouy-Ring est basée sur la mesure de la force de détachement d'un anneau, ou une boucle de fil d'une interface (**Tadros, 2005**).

La force de détachement est proportionnelle à la tension interfaciale, mesurée à l'aide d'un tensiomètre digitale K10ST - KRUSS. L'anneau est de nature de platine et d'iridium, exempt de tous contaminants. La plaque de Wilhelmy est utilisée de la même manière. (**Tuleva et al., 2005, Chen et al., 2007**). La mesure de la tension superficielle consiste à brûler l'anneau avant son utilisation, submerger et retirer afin de former un ménisque de liquide. Ensuite, le ménisque se détache de l'anneau et revient à sa position initiale. La force exercée de la surface du surnageant atteinte une valeur maximale et diminue progressivement avant le détachement de l'anneau. Le processus est illustré dans la figure 21.

Le dispositif de Nouy-Ring est largement appliqué pour le criblage de la production des biosurfactants (**Bodour et Miller, 1998 ; Das et al., 1998**).

### III.1.5. Swarming Motility

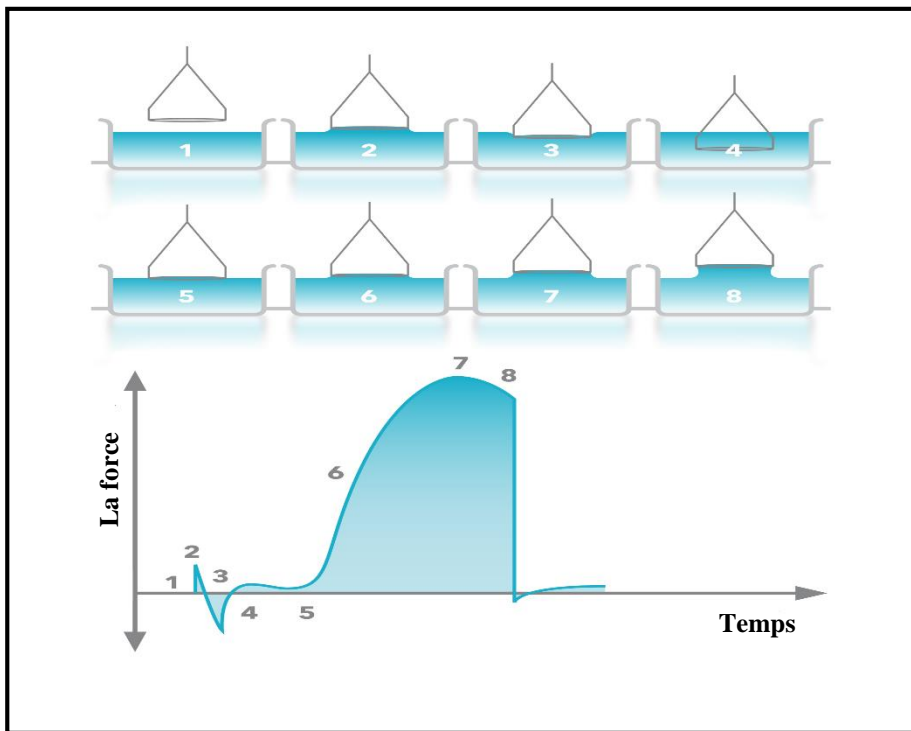
Ce test se repose sur le phénomène d'essaimage bactérien sur un milieu semi-solide qui est préparé à base de sels minéraux et une concentration de 1% d'agar.

La boîte de Petri contenant le milieu estensemencée par un seul spot central de 1µl contient la suspension bactérienne de la souche isolée sélectionnée productrice des biosurfactants, l'incubation dure dans un premier temps 2 heures à la température ambiante de laboratoire, ensuite, pendant 24-48 heures dans un incubateur à 30 °C. Les souches productrices de substances tensio-actives se manifestent par un envahissement de toute la boîte par une seule colonie bactérienne.



### III.1.6. Ensemencement du milieu CTAB

Le teste de l'ensemencement de la gélose CTAB est une méthode semi-quantitative pour la détection de la production des glycolipides extracellulaires ou autres surfactants anioniques. Il a été développé par **Siegmund and Wagner (1991)**. Les biosurfactants sont observé sous forme d'un halo bleu foncé autour les colonies.



**Figure 21** : Description des étapes de mesure de la tentions superficielle.

- 1- L'anneau est au-dessus de la surface et la force est remise à zéro.
  - 2- L'anneau fusionne la surface et création d'une légère force positive à raison de la force d'adhésion entre l'anneau et la surface du surnageant.
  - 3- L'anneau est poussé à travers la surface (à cause de la tension de surface), ce qui provoque une petite force négative.
  - 4- L'anneau traverse la surface et une petite force positive est mesurée.
  - 5- Dès le soulèvement de l'anneau de la surface, la force mesurée commence à augmenter.
  - 6- Une augmentation de la force jusqu'elle atteinte sa valeur maximale.
-

7- En aval du pique de la force, une diminution est enregistrée qui se termine par une chute libre due à la rupture de l'anneau.

---



**Figure 22 :** Présentation d'un tensiomètre digital K10ST – KRUSS, et l'anneau en Platinum-Iridium.

## V. Caractérisation des biosurfactants

### IV.1. Extraction des biosurfactants du milieu de culture

Dans le but de favoriser la précipitation de la biomasse bactérienne des souches productrices de biosurfactants, inoculées dans un milieu de culture de fermentation, incubées pendant 4 jours, le pH du milieu est ajusté à une valeur de 8,0 par la solution de NaOH à une concentration de 20%. Ensuite, la biomasse bactérienne est séparée du surnageant par centrifugation à une vitesse de 3500 g pendant 20 minutes.

Le surnageant est ajusté avec une solution acide de 4 N HCl à une valeur de pH de 3, incubé pendant une nuit à une température 4°C.

Le surnageant de la souche *Bacillus* est centrifugé à une vitesse de 13.000 g pendant 15 minutes à 4°C pour obtenir une pastille au fond des tubes. Les traces de l'HCl sont éliminées de cette pastille par deux lavages successifs avec l'eau distillée stérile. Le film formé est extrait

ensuite par le méthanol pendant 2 heures, puis filtré pour éliminer les débris et séché à l'aide d'un rota vapeur BUCHI E.L 131 équipé d'une pompe à vide jusqu'à l'obtention d'une poudre jaune.

L'extraction des biosurfactants à partir du surnageant de la souche *Pseudomonas* est effectué par l'addition d'un même volume d'Ethyle acétate dans une ampoule à décantation suivie d'une forte agitation. Après la séparation, la phase organique est récupérée alors que la phase aqueuse est re-extraite deux fois avec le même protocole. Le sulfate de magnésium est ajouté à la phase organique pour éliminer les traces d'eau restantes, puis filtrée et séchée par un rota vapeur BUCHI E.L 131 équipé d'une pompe à vide pour obtenir une gomme de couleur marron.



**Figure 23** : Rota vapeur BUCHI E.L 131 équipé d'une pompe à vide.

## IV.2. Chromatographie sur couche mince

Une caractérisation des biosurfactants obtenus est effectuée par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur une plaque de dimension 20cm/20cm (TLC on silica gel 60 F<sub>254</sub>).

Une hauteur de 0.5 cm de la cuve est rempli avec le solvant de migration constitué d'un mélange de Chloroforme/Méthanol/Eau (70 :10 : 0.5, v/v/v). Le solvant de migration est maintenu dans la cuve pour attendre la saturation en vapeur. Un volume de 30 µl est déposé en spot sur la plaque à un 1 cm du front inférieur.

Ensuite, la plaque est déposée délicatement dans la cuve contenant le solvant, qui migre du bas en haut par capillarité. La migration est achevée lors de l'arrivée du solvant à 1cm du front supérieur de la plaque. Le séchage de la plaque est effectué à l'air libre et la révélation des tâches exige des réactifs spécifiques.

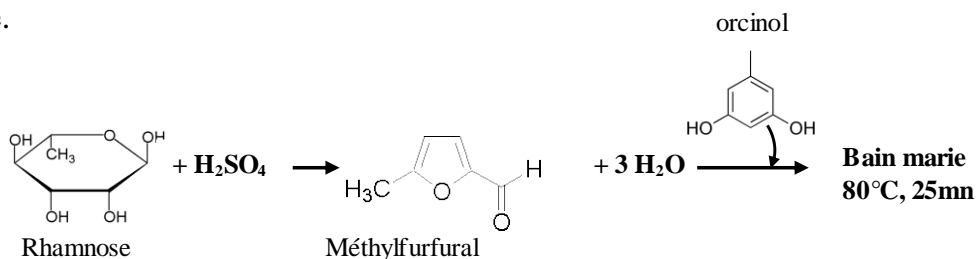
Les biosurfactants de nature glycolipide sont révélés par la nébulisation du réactif à base de l'Orcinol sulfurique, préparé par la dissolution de 1 g de l'orcinole (5-méthylbenzène-1,3-diol) dans un volume de 100 ml de l'acide sulfurique à une concentration de 40%. Le traitement thermique de la plaque à une température de 80°C pendant 15 mn induit une réaction entre le réactif et la partie glucidique du biosurfactant, traduite par l'apparition d'une coloration dorée des taches migrées.

Par ailleurs, la révélation des biosurfactants peptidiques exige l'utilisation du réactif de la Ninhydrine à une concentration de 1%, solubilisé dans l'acétone ou l'éthanol. La pulvérisation de la plaque par ce réactif permet la révélation des taches de biosurfactants peptidiques avec une couleur violacée.

---

## IV.3. Dosage des rhamnolipides par spectrophotométrie

La mesure de la densité optique par un photomètre est la technique utilisée dans le dosage de rhamnolipides par la réaction entre la molécule de rhamnose avec l'orcinol sulfurique.



Ce réactif est préparé à partir de 1.5g d'Orcinol dilué dans 100ml d'acide sulfurique à 30%. Dans un tube à hémolyse en verre, 200µl de l'échantillon à doser est ajoutée à 400µl d'Orcinol sulfurique et 3ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60%), après homogénéisation, les tubes sont portés

dans un bain marie à une température de 80°C pendant 25mn, puis refroidis pendant 30mn à l'obscurité.

La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (UVmini 1240 – SHIMADZU-), à une longueur d'onde  $\lambda = 420$  nm. La courbe d'étalonnage est calculée par le dosage de différentes concentrations de 0,5 à 3 g/l d'une solution de rhamnose.

## **V. Optimisation des paramètres impliqués dans la production des biosurfactants**

Dans le but d'optimiser la production des biosurfactants chez les souches sélectionnées productrices, trois paramètres physicochimiques tels la vitesse d'agitation, la température et la valeur de pH du milieu de culture ont été étudiés.

La vitesse de l'agitation permet l'homogénéisation des ingrédients du milieu de culture et la pénétration de l'oxygène à l'intérieure de la cellule. Les souches sélectionnées productrices des biosurfactants sont inoculées dans un milieu de fermentation, incubées à une température de 30°C avec des vitesses d'agitations variables entre 100-300 rpm, pendant 4 jours.

Cependant, l'optimisation de la valeur du pH impliquée dans l'optimisation de la production des biosurfactants est réalisée par l'incubation des milieux de fermentation ajustés à des valeurs de pH variables entre 5-8.

L'étude de l'effet de la variation de la température d'incubation sur la production des biosurfactants chez les souches productrices a été réalisée entre 20 et 45°C.

## **VI. Etude de la cinétique de croissance bactérienne et de la production des biosurfactants**

Un suivi de la cinétique de croissance des souches sélectionnées productrices des biosurfactants a été mis en évidence. Pour ce faire, les souches sélectionnées sont inoculées dans les milieux de culture MSM1 et MSM2, incubées à une température de 30°C, pendant 4 jours. Des prélèvements à un intervalle de temps réguliers de 1.5 heure ont été effectués, afin de mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm et la tension superficielle du milieu.

## **VII. Recherche des gènes qui codent la production des rhamnolipides.**

La production des rhamnolipides par la souche *Pseudomonas aeruginosa* est assurée par deux types d'enzymes, la Rhamnosyltransferase I pour la synthèse des mono-rhamnolipides, et la Rhamnosyltransferase II pour les di-rhamnolipides. Ces deux enzymes sont codées par trois différent gènes, *RhlA* et *RhlB* pour la première protéine, et *RhlC* pour la deuxième.

---

Une caractérisation moléculaire de ces trois gènes codant la production des mono et di rhamnolipides chez trois souches de *P. aeruginosa* différentes a été effectuée. Ces bactéries ont ainsi été sujet à une extraction d'ADN génomique, puis d'une amplification des gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* en utilisant des amorces spécifiques à ces derniers.

### **VII.1. Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien**

L'extraction de l'ADN se fait par précipitations différentielles et séparation des deux phases obtenues liquide/solide par centrifugation. Elle permet d'isoler l'ADN des cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire.

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'une culture jeune sur milieu GN. Le tapi bactérien est lavé deux fois dans des micro-tubes Eppendorf avec une solution tampon saline PBS (Phosphate-buffered saline) stérile en centrifugeant à 13000g pendant 10 mn.

Le culot bactérien est ensuite suspendu dans 300  $\mu$ l de la solution CHELEX et chauffé pendant 15mn à 100°C. Les tubes sont agités par le vortex et centrifugés à 13000g pendant 10mn. Le surnageant qui contient l'ADN est transféré dans d'autres tubes stériles.

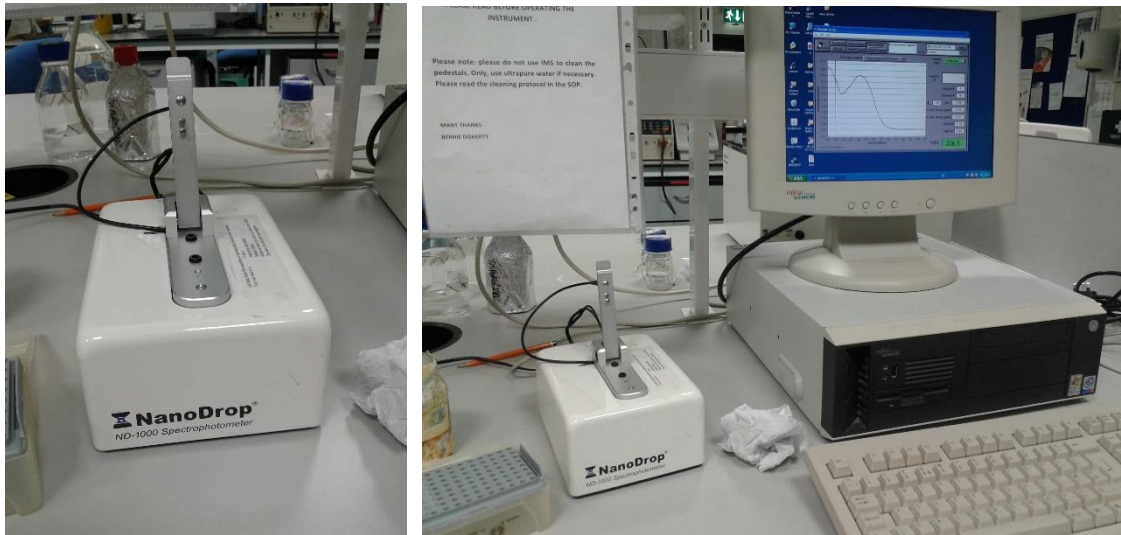
La purification de l'ADN bactérien et l'élimination d'éventuels contaminants tels que les protéines ou des molécules d'ARN est effectué avec un Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System PROMEGA.

### **VII.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN :**

- **Dosage de l'ADN par spectrophotométrie NanoDrop :**

Le dosage d'ADN par spectrophotométrie constitue une méthode de choix non dénaturante et assez précise de quantification et de control de pureté de l'ADN extrait (**Loncle *et al.*, 1993**). La spectrophotométrie NanoDrop, est une technique à haute précision pour analyser une quantité de 1  $\mu$ l de l'échantillon.

Deux lecture de densité optique sont effectués, une à  $\lambda=260$  nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximal des acides nucléiques, et une autre à  $\lambda =280$  nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximal des protéines qui absorbent également à 260 nm. Dans le but d'estimer la pureté de l'ADN extrait le rapport  $R= DO_{260}/280$  doit être compris entre 1,8 et 2. Si **R** est inférieur à 1,8, des protéines contaminent sont probablement disponibles dans la solution. Une valeur supérieure à 2 indique une probable contamination par des ARN.



**Figure 24** : Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000.

### **VII.3. L'amplification des gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC***

Découverte en 1983 et mise au point par K.Mullis en 1985, la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de répllication ciblée *in vitro*, qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant d'ADN, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

L'ADN est dénaturé par chauffage à 95°C, puis apparié à un excès de deux oligonucléotides spécifiques complémentaires aux brins opposés de l'ADN, Chaque oligonucléotide sert d'amorce (primer) à une ADN polymérase (Taq polymérase, résistante à des températures de 100°C) pour copier chacun des brins d'ADN. Ce cycle peut être répété de manière automatisée par dénaturation renaturation successives : 20 cycles permettent ainsi une amplification théorique de 220 fois de la séquence cible initiale (**Bouissac, 2005**).

En vue de la mise en évidence des gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* codant la Rhamnosyltransférase I et II chez les souches *P. aeruginosa*, des couples d'amorces spécifiques sont utilisés à ces gènes de production des biosurfactants, le tableau suivant illustre ces différentes séquences des amorces.

**Tableau 6** : Les amorces des différents gènes à amplifier.

| Gène        | Forward Primer                 | Reverse Primer                   |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|
| <i>RhlA</i> | 5'-TCTGTTGGTATCGGTTTGCAAGGG-3' | 5'-ACAGCACCCACGTTGAAATGTTCCGG-3' |
| <i>RhlB</i> | 5'-CATCGCTCACGAGAAGTACG-3'     | 5'-GTTGAACTTGGGTGTACCG-3'        |
| <i>RhlC</i> |                                |                                  |

- **Préparation de mixture pour PCR**

Le mélange des différents réactifs utilisés pour l'amplification des gènes est préparé à l'aide d'un logiciel BIOMETRA (2010). La figure 25 montre les différents volumes et concentration des réactifs utilisés pour avoir un volume de 25 µl.

| PCR mastermix setup                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--|------------|--|------------|--|---------|------------|---------|------------------|---------|-------|---------|----------------|---------|----------------|---------|------------|----------|-----------------|-----------------|------------------------|
| No. of reactions:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 1 rxn                  |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Reaction volume per rxn:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 25 µl                  |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Safety margin:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 5 %                    |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <b>Biometra</b> - your source for Biometra products in Germany.<br>An Analytik Jena Company<br>You're located elsewhere?<br>Find your local distributor at <a href="http://www.biometra.com">www.biometra.com</a> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <b>Reagent</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Stock conc.</b>     | <b>Final conc. in reaction</b> |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Additive 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Additive 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| PCR Buffer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 10 X                   | 1,0 X                          |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <i>Mg conc of buffer</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | mM                     | 1,5 mM Mg total                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| separate Mg solution                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 50 mM                  |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| dNTPs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 2 mM each              | 0,2 mM each                    |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Forward primer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 10 µM                  | 0,5 µM                         |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Reverse primer                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 10 µM                  | 0,5 µM                         |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Polymerase                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 5,0 U/µl               | 1,0 U                          |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Template                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 200 ng/µl              | 200 ng                         |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| PCR grade water                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <table border="1" style="margin-left: auto;"> <thead> <tr> <th colspan="2"><u>Mastermix setup (µl)</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Additive 1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Additive 2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2,63 µl</td> <td>PCR Buffer</td> </tr> <tr> <td>0,79 µl</td> <td>separate Mg sol.</td> </tr> <tr> <td>2,63 µl</td> <td>dNTPs</td> </tr> <tr> <td>1,31 µl</td> <td>Forward primer</td> </tr> <tr> <td>1,31 µl</td> <td>Reverse primer</td> </tr> <tr> <td>0,21 µl</td> <td>Polymerase</td> </tr> <tr> <td>16,33 µl</td> <td>PCR grade water</td> </tr> <tr> <td><b>25,20 µl</b></td> <td><b>TOTAL MASTERMIX</b></td> </tr> </tbody> </table> |                        |                                | <u>Mastermix setup (µl)</u> |  | Additive 1 |  | Additive 2 |  | 2,63 µl | PCR Buffer | 0,79 µl | separate Mg sol. | 2,63 µl | dNTPs | 1,31 µl | Forward primer | 1,31 µl | Reverse primer | 0,21 µl | Polymerase | 16,33 µl | PCR grade water | <b>25,20 µl</b> | <b>TOTAL MASTERMIX</b> |
| <u>Mastermix setup (µl)</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Additive 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| Additive 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 2,63 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | PCR Buffer             |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 0,79 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | separate Mg sol.       |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 2,63 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | dNTPs                  |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 1,31 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Forward primer         |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 1,31 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Reverse primer         |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 0,21 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Polymerase             |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| 16,33 µl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | PCR grade water        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <b>25,20 µl</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>TOTAL MASTERMIX</b> |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |
| <i>Aliquot per single rxn 24 µl of Mastermix per tube and add 1 µl of Template</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |                                |                             |  |            |  |            |  |         |            |         |                  |         |       |         |                |         |                |         |            |          |                 |                 |                        |

**Figure 25** : La mixture de l'amplification des gènes (BIOMETRA, 2010).

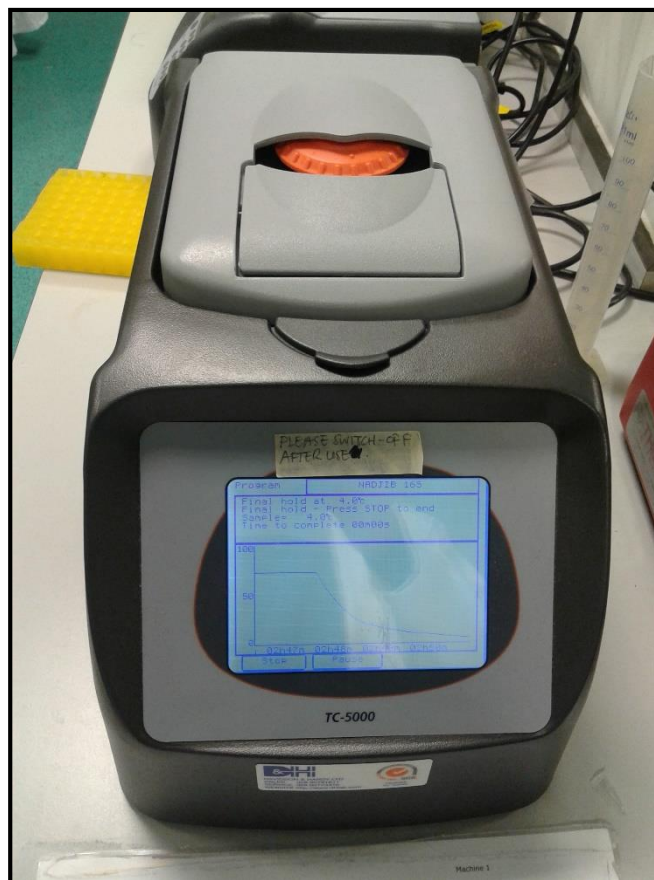
- **Programme d'amplification**

Dans des micro-tubes stériles, 1 µl de la suspension d'ADN pure à la concentration de 100 ng/µl est ajoutée à 24 µl de la mixture PCR, agités sur un Vortex puis centrifuger pendant 5 secondes à 3000g pour homogénéiser le mélange. Les tubes sont ensuite transférés à un Thermocycleur TC-5000 dont le programme de l'amplification utilisé est comme suit :



**Tableau 7** : Programme de la PCR des gènes *Rhl*.

| Nombre de cycles | Température           |      | Temps |
|------------------|-----------------------|------|-------|
| 01               | Dénaturation initiale | 95°C | 5mn   |
| 30               | Dénaturation          | 94°C | 3mn   |
|                  | Alignement            | 57°C | 1mn   |
|                  | Extension             | 72°C | 1mn   |
| 01               | Extension finale      | 72°C | 5mn   |



**Figure 26** : Thermocycleur TC-5000.

#### **VII.4. Electrophorèse sur gel d'agarose :**

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de biologie moléculaire utilisée soit à des fins analytiques pour séparer et identifier des fragments d'ADN pour déterminer leur taille et estimer leur quantité, soit pour purifier un fragment d'ADN de taille connu (**Loncle *et al.*, 1993**).

Un gel d'agarose à 1% est préparé par le mélange de 50ml de tampon TBE 1X (Tris 40 mM, borate de sodium 5 mM pH 8, EDTA 1 mM), et la poudre d'agarose à raison de 0,5g. Le mélange est porté à ébullition dans un micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose et

l'obtention d'un liquide transparent. Après refroidissement (à environ 45°C), 2,5 µl de bromure d'ethidium (BET) 10mg/ml sont ajoutés au mélange d'agarose et TBE.

Après avoir préparé la cuve d'électrophorèse et placer le peigne, le gel est coulé lentement sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Après solidification de ce dernier, le peigne est enlevé et le gel immergé dans la cuve avec le tampon TBE 1X, utilisé comme tampon de migration. Les puits sont chargés par le marqueur de taille (The TrackIt™ 100 ng DNA Ladder) et les échantillons d'ADN. Chaque échantillon (7µl) est additionné de 3µl de tampon de charge. La manipulation est réalisée dans un appareil d'électrophorèse (RunOne Power Supply), à 100 V, pendant environ 30 minutes.

*Chapitre III :*

*Résultats*

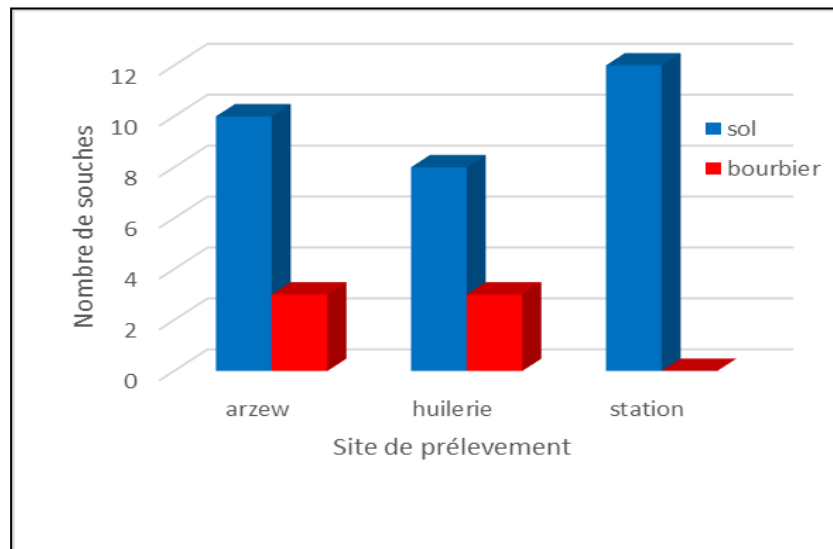
## I. Echantillonnage

Les prélèvements effectués dans ce présent travail sont choisis sur la base du degré de la pollution des sites. A cet effet, les échantillons sont collectés à partir du sol et des bourbiers pollués par les hydrocarbures des régions d'ARZEW (raffinerie de pétrole) et REMCHI (station des hydrocarbures) et de déchets d'une huilerie d'olive, située à FELLAWCEN.

La couleur et l'odeur des échantillons sont des paramètres indicateurs de pollution. Les sols de couleur marrons foncés avec une odeur fétide sont hautement contaminés. Les prélèvements effectués sont ensuite transportés au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université Mostafa STAMBOLI à MASCARA afin de procéder les analyses microbiologiques.

Des dilutions décimales ( $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ) à partir de la solution mère des sols et des bourbiers ont été préparées. L'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur la surface de gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'isolement de 37 différentes souches (**Figure 25**), répartis sur les sites de prélèvements effectués..

D'après l'histogramme, il en ressort qu'il y a présence d'une microflore dans les trois sites de prélèvements effectués. La comparaison de la charge microbienne totale présente dans les trois sites a permis de déduire que le sol de la station des hydrocarbures contient une microflore assez importante par rapport à la raffinerie d'ARZEW et l'huilerie. Cependant, les bourbiers ont montré la présence d'une faible diversité microbienne.



**Figure 27** : Répartition des souches isolées à partir des sites de prélèvements effectués.

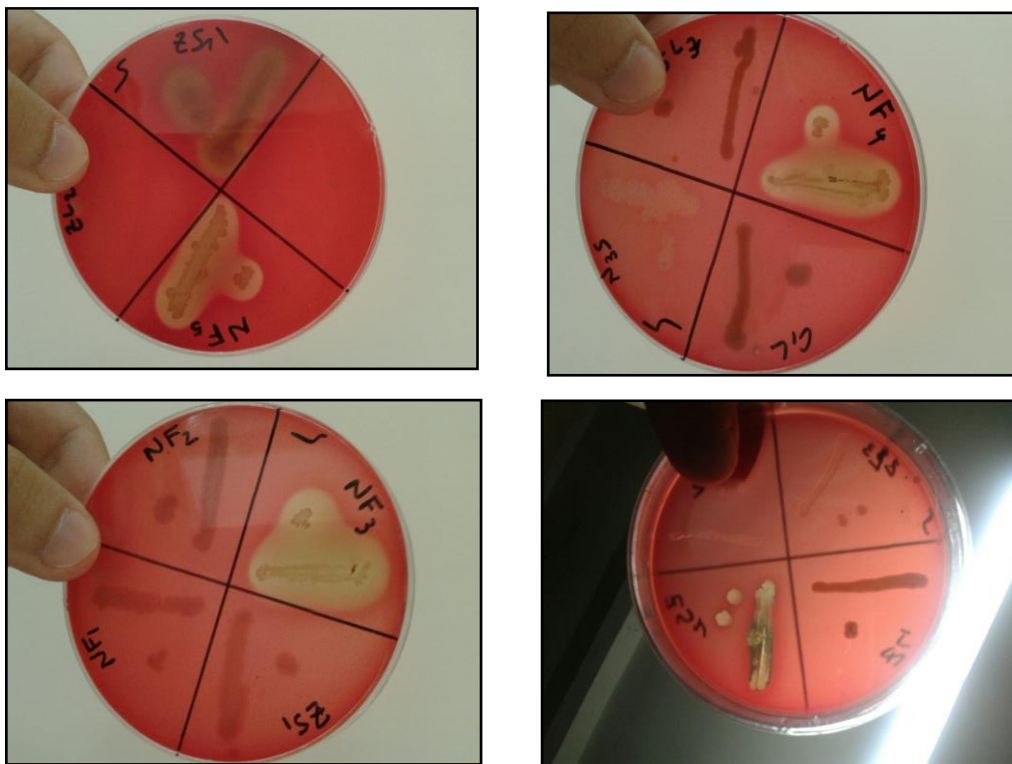
## I.1. Sélection des souches productrices des biosurfactants

La sélection des souches productrices des biosurfactants est basée sur la présence du pouvoir hémolytique. Le criblage primaire réalisé par un ensemencement sur la surface de gélose au sang a permis l'isolement de 8 souches distinctes, caractérisées par la formation de la zone d'hémolyse autour des colonies obtenues à partir des trois prélèvements effectués. Les zones d'hémolyses formées sont généralement visibles, avec des diamètres qui varient entre 5 et 12 mm. Une forte richesse dans la composition de la flore tellurique a été observée (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Présentation des différentes souches hémolytiques.

| Codification         | NF3                       | NF4 | NF5 | ZS1                | ZS4 | NL1              | NS3 | NS5 |
|----------------------|---------------------------|-----|-----|--------------------|-----|------------------|-----|-----|
| Site de prélèvements | Station des hydrocarbures |     |     | Raffinerie d'ARZEW |     | Huilerie d'olive |     |     |

S : Sol                      L : Bourbier                      F : sol de Naftal

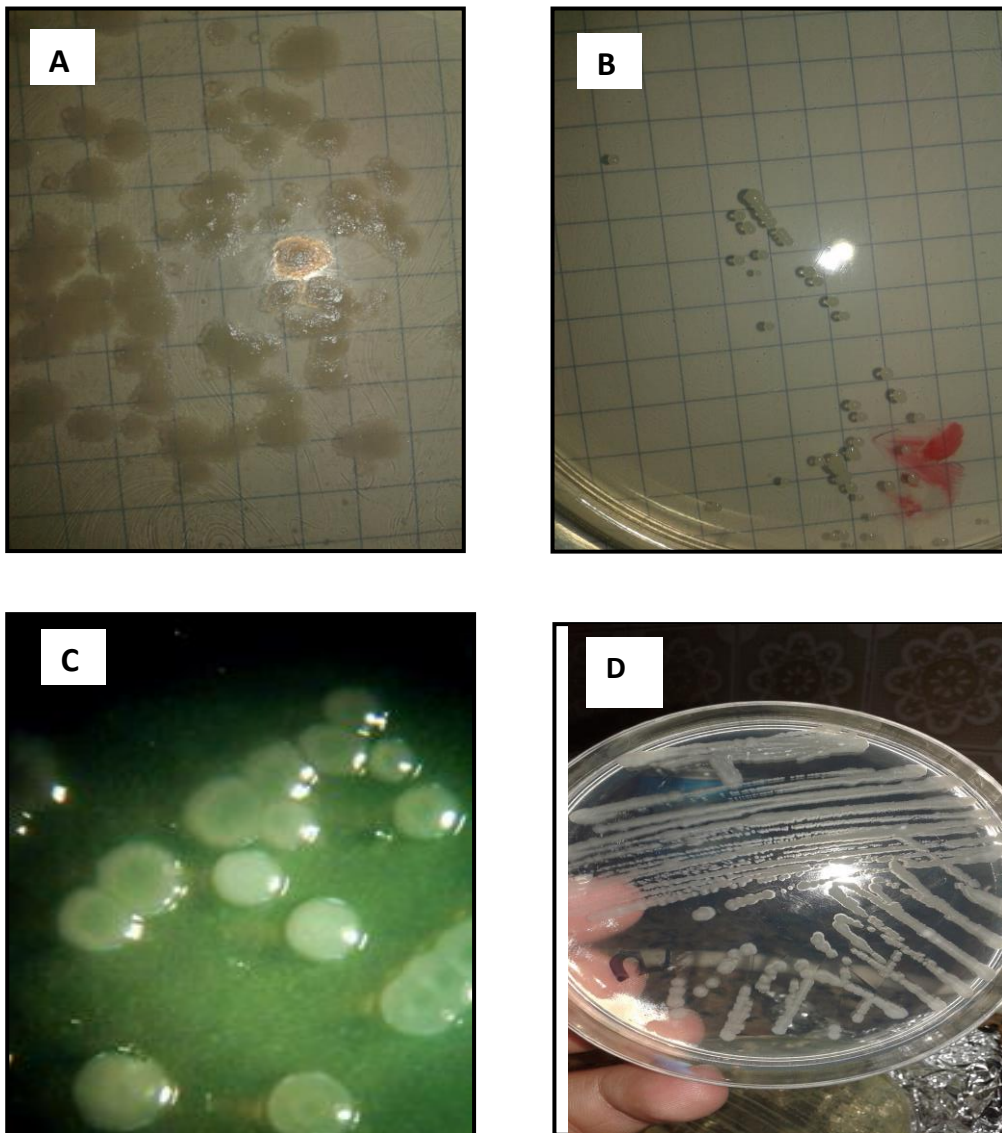


**Figure 28** : Le criblage primaire des souches productrices de biosurfactants.

## I.2. Identification préliminaire des bactéries criblées

### I.2.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique et l'aspect des colonies isolées ont permis d'effectuer une caractérisation phénotypique primaire. De plus, l'ensemencement des souches isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants sur la surface de la gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'observation de trois types de colonies, distinctes par leur forme, leur taille et leur aspect (**Tableau 9**).



**Figure 29** : Aspect macroscopique des 4 souches isolées, « **A** » souche ZS1, « **B** » souche NL1, « **C** » souche NF5 sur la gélose au cétrimide, « **D** » souche ZS4.

**Tableau 9** : Présentation de différents aspects macroscopiques des colonies isolées.

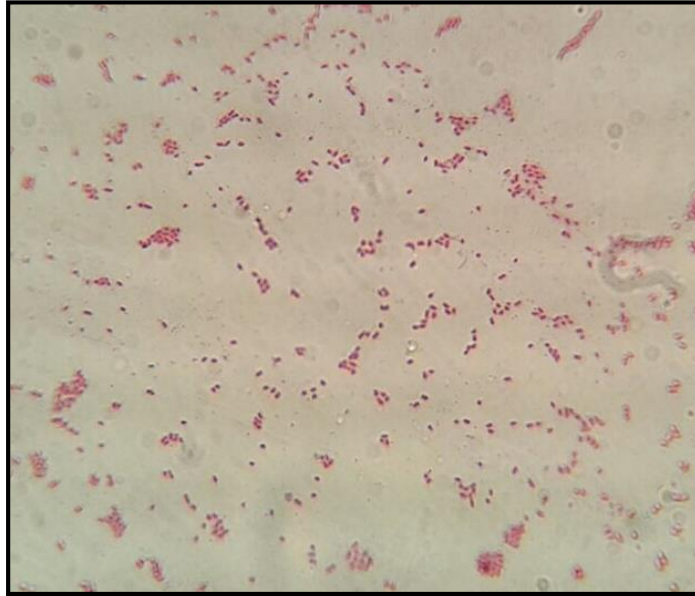
| <b>Critère<br/>Souche</b> | <b>Diamètre</b> | <b>Couleur</b> | <b>Forme</b> | <b>Surface</b> | <b>Consistance</b> |
|---------------------------|-----------------|----------------|--------------|----------------|--------------------|
| <b>NF3</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |
| <b>NF4</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |
| <b>NF5</b>                | <3mm            | transparente   | ronde        | rugueuse       | crémeuse           |
| <b>ZS1</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |
| <b>ZS4</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |
| <b>NL1</b>                | <3mm            | transparente   | ronde        | lisse          | élastique          |
| <b>NS3</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |
| <b>NS5</b>                | >3mm            | Blanche        | irrégulière  | rugueuse       | crouteuse          |

### **I.2.2 Etude microscopique et biochimique**

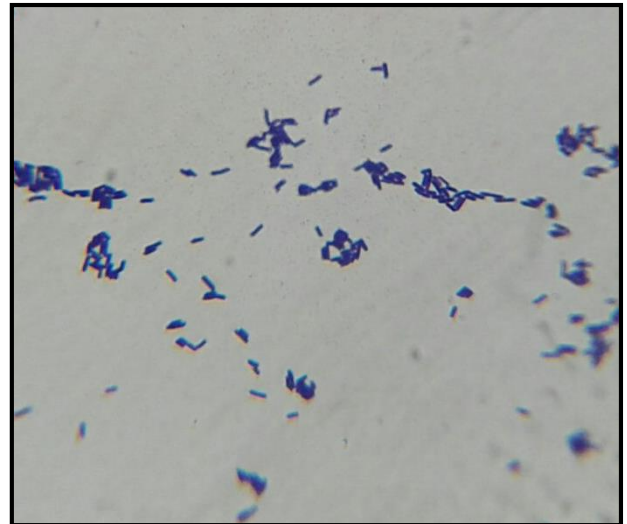
L'observation microscopique est réalisée en deux étapes, la coloration de Gram et l'observation à l'état frais. Les résultats illustrés dans le tableau 8 ont montré une variété de types bactériens. Toutes les bactéries observées sont mobiles et présentent différentes formes bacillaires du groupe coccobacilles aux gros bacilles. Elles sont assemblées en amas, en chainettes, ou même isolées. Elles présentent une paroi à Gram positive ou négative. Des spores sont observées dans les bactéries de formes bacillaires.



A

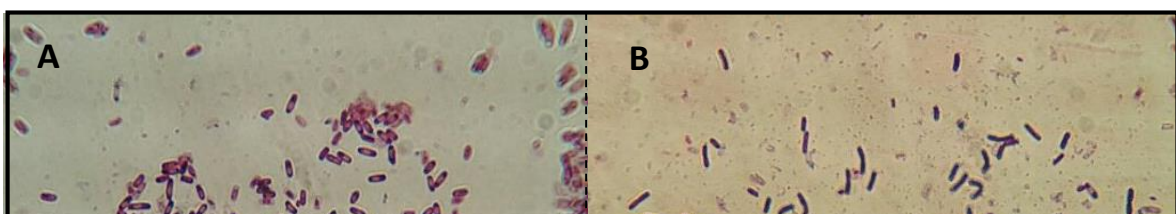


B



C

**Figure 30** : Observation microscopique des souches NF5 (A), ZS1 (B), ZS4 (C) après coloration de Gram (Gross 100x10).





**Figure 31** : Observation microscopique des spores des souches ZS4 (A), ZS1 (B). (Gross 100x10).

La totalité des souches testées ont manifesté une réaction positive du test catalase, traduite par une effervescence lors du contacte des souches testées avec de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). L'apparition d'une coloration bleu foncée des disques à Oxydase a indiqué que 100% des souches possèdent l'enzyme de cytochrome oxydase.

Deux tests complémentaires, basés sur l'observation microscopique et l'aspect des cellules ont été effectués. Un ensemencement des souches isolées, après un chauffage à 80°C pendant 10 mn, sur la surface de la gélose nutritive, a permis la sélection des gros bacilles à Gram positif. Dans un second temps, l'ensemencement des huit souches sélectionnées sur la gélose sélective à base de Cétrimide (**figure 32**) a permis la sélection de deux souches appartenant au genre *Pseudomonas*.

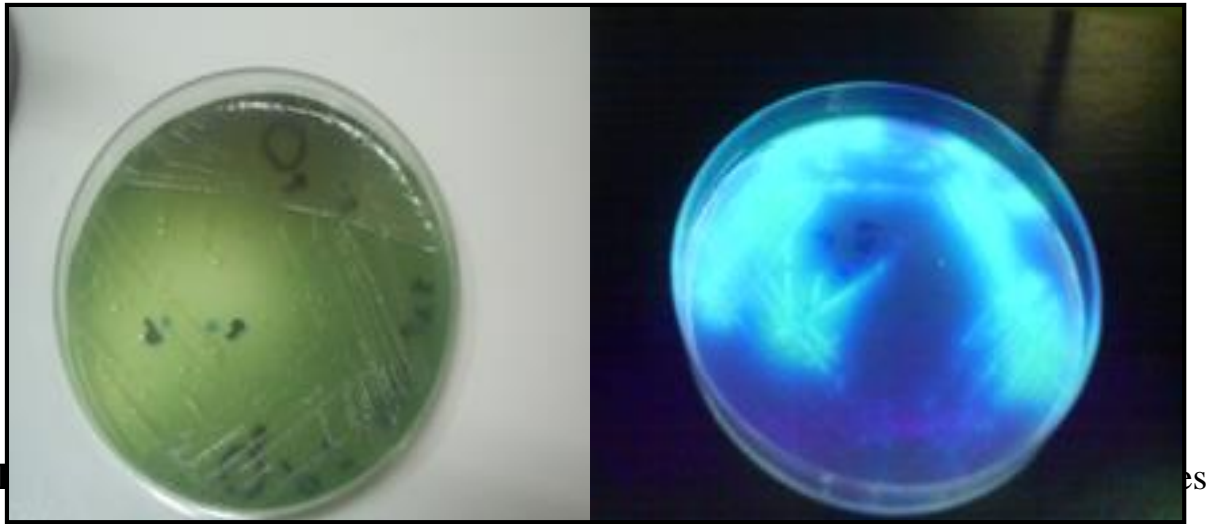
Les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des souches NF3, NF4, ZS1, ZS4, NS3 et NS5, laissent croire par leurs formes bacillaires, présence des endospores et la croissance sur la gélose nutritive après le traitement thermique leur appartenance au genre *Bacillus*.

Les 6 souches isolées, sélectionnées productrices des biosurfactants NF3, NF4, ZS1, ZS4, NS3 et NS5 ont subi le test d'aérobiose. Les résultats de la croissance obtenus ont montré que la totalité des souches testées ont un type respiratoire aéro-anaérobies facultatives. Cependant, deux souches NF5 et NL1 ont manifesté une croissance seulement sur la surface de la gélose nutritive, ce qui explique un type respiratoire aérobie strict.

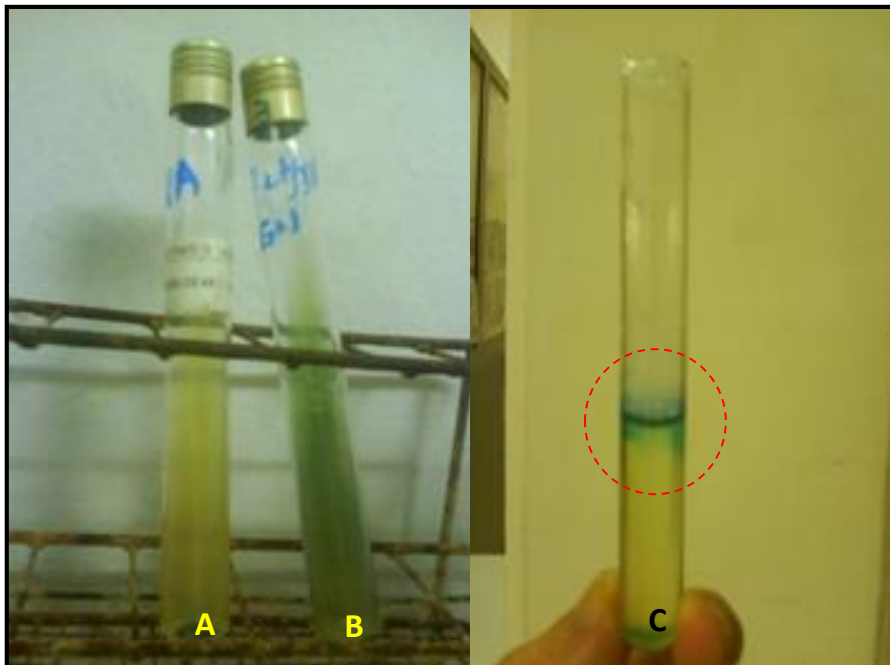
La mise en évidence de la production de  $\alpha$ -amylase, chez les souches isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants, révélées par l'ajout de la solution du Lugol a montré la formation d'une zone claire autour des colonies (NF3, NF4, ZS1, ZS4, NS3 et NS5), ensemencées sur gélose de base contenant l'amidon, ce qui explique le pouvoir amylolytique de ces souches. Par ailleurs, les deux souches NF5 et NL1 n'ont révélé aucune activité amylolytique. La mise en évidence de la dégradation de la lécithine est effectuée après l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants sur la gélose au jaune d'œuf et l'incubation à une température de 30°C.

Les résultats obtenus ont montré que les 8 souches testées sont lécithinase positives, traduite par la formation d'une zone opaque autour des colonies ensemencées.

Les souches du genre *Bacillus* ont montré une activité caseinolytique sur une gélose de base additionnée du lait stérile.



biosurfactants sur la gélose au Cétrimide.



**Figure 33** : Ensemencement de la souche NF5 sur le milieu de culture King.

(A) pigmentation jeune vertes sur gélose King B.

(B) pigmentations bleues vertes sur gélose King A.

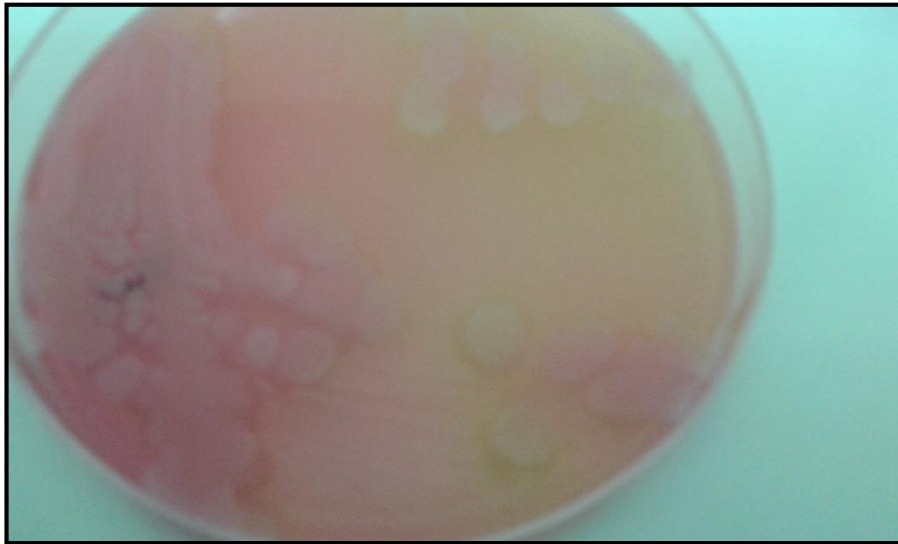
(C) pigmentations bleues vertes sur bouillon King A (aérobie stricte).



**Figure 34** : Souche NF3 amylase positive.



**Figure 35** : Souche NF3 Caséinase positive.



**Figure 36 :** Souche NF4 Lécithinase positive.

**Tableau 10 :** Illustration des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches isolées.

| Souche<br>Caractère  | NF3          | NF4           | NF5                  | ZS1          | ZS4          | NL1                  | NS3          | NS5          |
|----------------------|--------------|---------------|----------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|--------------|
| Mobilité             | +            | +             | +                    | +            | +            | +                    | +            | +            |
| Coloration de Gram   | +            | +             | -                    | +            | +            | -                    | +            | +            |
| Taille de la cellule | <1 µm        | <1 µm         | <1 µm                | >1 µm        | <1 µm        | <1 µm                | <1 µm        | <1 µm        |
| Forme                | Gros Bacille | Gross Bacille | Petits coccobacilles | Gros Bacille | Gros Bacille | Petits coccobacilles | Gros Bacille | Gros Bacille |
| Présence Endospores  | +            | +             | -                    | +            | +            | -                    | +            | +            |
| Mode regroupement    | amas         | amas          | Amas                 | amas         | Chaine       | Amas                 | amas         | amas         |
| Catalase             | +            | +             | +                    | +            | +            | +                    | +            | +            |
| Oxydase              | +            | +             | +                    | +            | +            | +                    | +            | +            |
| Gélose au Cétrimide  | -            | -             | +                    | -            | -            | +                    | -            | -            |

+ : résultat positif - : résultat négatif



**Figure 37** : Développement de *Pseudomonas aeruginosa* NF5 sur la surface de la gélose Viande-foie.

L'inoculation de la souche ZS1, sélectionnée productrice de biosurfactants dans la galerie API®20 E a indiqué le profil de l'espèce *Bacillus subtilis*. Cependant, les trois souches ZS4, NF3 et NF4 ont montré une similarité avec l'espèce *Bacillus cereus* et les souches NS3 et NS5 se rapprochent au genre *Bacillus sp.*

Cependant, les souches NF5 et NL1 se rattachent selon leur aspect microscopique au genre *Pseudomonas*. Ces souches se présentent sous forme de petits bacilles non sporulés avec une coloration de Gram négative et une réaction positive au test d'oxydase et catalase. Ces observations ont suggéré la culture de ces souches sur des milieux de culture King A, King B et sur la gélose sélective au Cétrimide. Ce groupe bactérien présente un type respiratoire aérobie strict avec la présence de l'enzyme ADH.

La souche NF5 manifeste une capacité de développement sur la gélosé au Cétrimide, incubée à une température de 41°C, ce qui mène vers l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi l'inoculation des deux souches NF5 et NL1 sur la galerie API®20 E a révélé l'appartenance à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* pour la souche NF5 et *Pseudomonas sp* (souche NL1) (**Tableau 11**).

**Tableau 11** : Illustration du profil biochimique des souches isolées, productrice de biosurfactant, par l'utilisation de la galerie API®20 E.

| Test<br>Isolat | ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H <sub>2</sub> S | Urée | TDA | IND | VP | GEL | GLU |
|----------------|------|-----|-----|-----|-----|------------------|------|-----|-----|----|-----|-----|
| NF3            | -    | +   | -   | -   | -   | -                | -    | +   | -   | -  | +   | -   |
| NF4            | -    | +   | -   | -   | -   | -                | -    | +   | -   | -  | +   | -   |
| NF5            | -    | +   | -   | -   | +   | -                | +    | -   | -   | -  | +   | -   |
| ZS1            | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -    | -   | -   | +  | +   | -   |
| ZS4            | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -    | -   | -   | +  | +   | -   |
| NL1            | -    | +   | -   | -   | +   | -                | -    | -   | -   | -  | -   | -   |
| NS3            | -    | -   | -   | -   | -   | -                | -    | -   | -   | +  | +   | -   |
| NS5            | -    | -   | -   | -   | +   | -                | -    | -   | -   | -  | -   | -   |

+ la couleur du milieu a complètement changé,

- la couleur du milieu n'a pas changé.

## II. Production des biosurfactants

Après avoir identifié les souches qui ont le pouvoir de produire les biosurfactants, une fermentation a été effectuée pendant 90 heures dans un incubateur agitateur à une température de 30°C et une agitation de 150 rpm. Le suivi de l'évolution de quelques paramètres tel que la stabilité et la tension superficielle du surnageant, la dispersion de l'huile, l'index de l'émulsification, a permis de confirmer la production des différents biosurfactants.

### II.1 Test de « Oil Spreading »

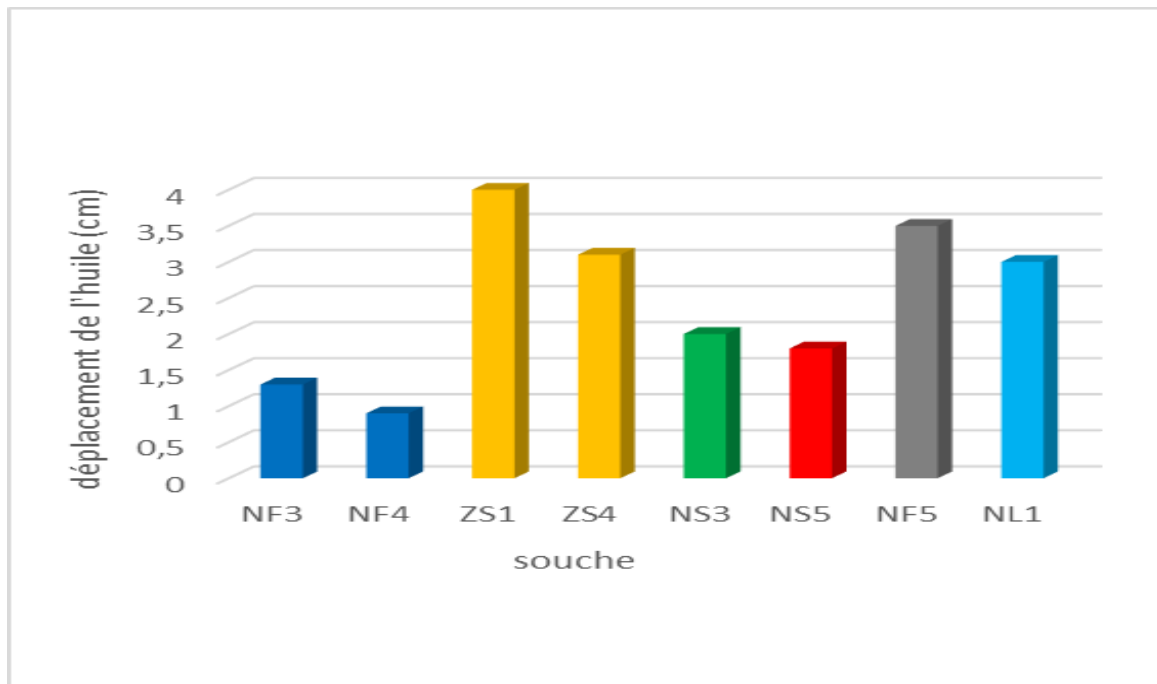
Dans le but d'explorer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test de « Oil Spreading » ou la dispersion de l'huile est mis en œuvre. Cette technique consiste à introduire un volume de 10 µl de surnageant, récupéré par centrifugation dans une boîte de Pétri contenant un volume de 50 ml d'eau distillée ajouté à un volume de 1 ml de pétrole brute. Une lecture positive de la présence du biosurfactants dans le surnageant est traduite par l'apparition d'une zone claire sur un fond marron.

Les résultats obtenus ont montré que les souches ZS1, ZS4 et NF5 sont productrices de biosurfactants avec des diamètres des zones claires formées 40 mm, 30 mm et 35mm respectivement (**Figure 38**). Cette constatation laisse suggérer que les trois souches présentent un intérêt industriel majeur, dans la mesure où elles sont capables de produire des molécules avec une activité émulsifiante.

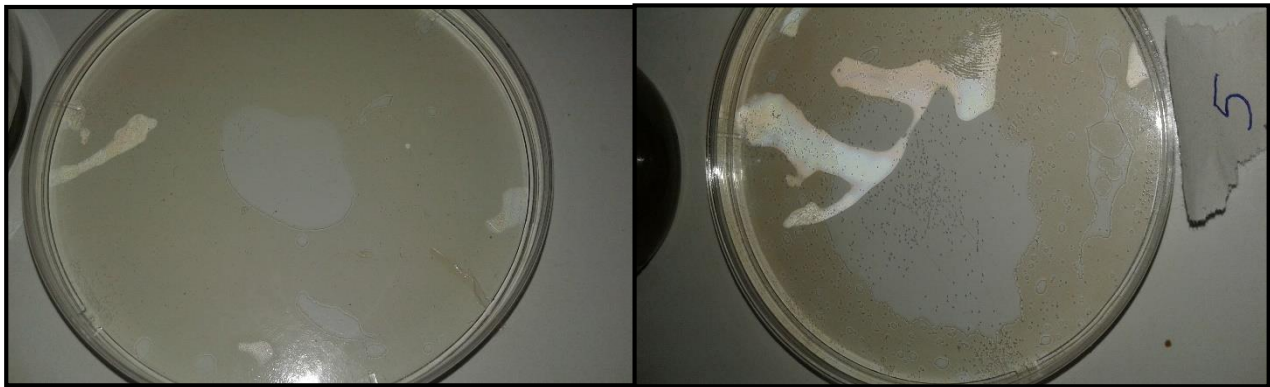
## II.2. Test de « Drop Collapsing »

Le test de Drop Collapsing a permis la mise en évidence de l'instabilité d'une goutte de la suspension bactérienne ou du surnageant récupéré par centrifugation sur un fond huileux. Les résultats obtenus ont montré que les surnageants des trois souches sélectionnées productrices de biosurfactants (ZS1, ZS4 et NF5) ont produit une instabilité remarquable de la couche d'huile (**Figure 41**), ce qui a été expliqué après passage d'un intervalle de temps de 30 mn ( $t_{30}$ ).

L'étude du suivi du déplacement de la goutte du surnageant de la souche sélectionnée productrice de biosurfactant ZS1 a révélé que dans un premier temps la goutte s'est étendue à 9 mm, et à 15 mm à la 30<sup>ème</sup> minute ( $t_{30}$ ). Cependant, la souche NF5 a manifesté un comportement similaire à la souche ZS1 avec un diamètre de déplacement de 7.5 mm dans un premier temps, et 13 mm dans le dernier temps mesuré, et avec l'enregistrement d'un changement des dimensions de la goutte ZS4, ce qui explique la production des substances tensio-actives chez les trois souches.



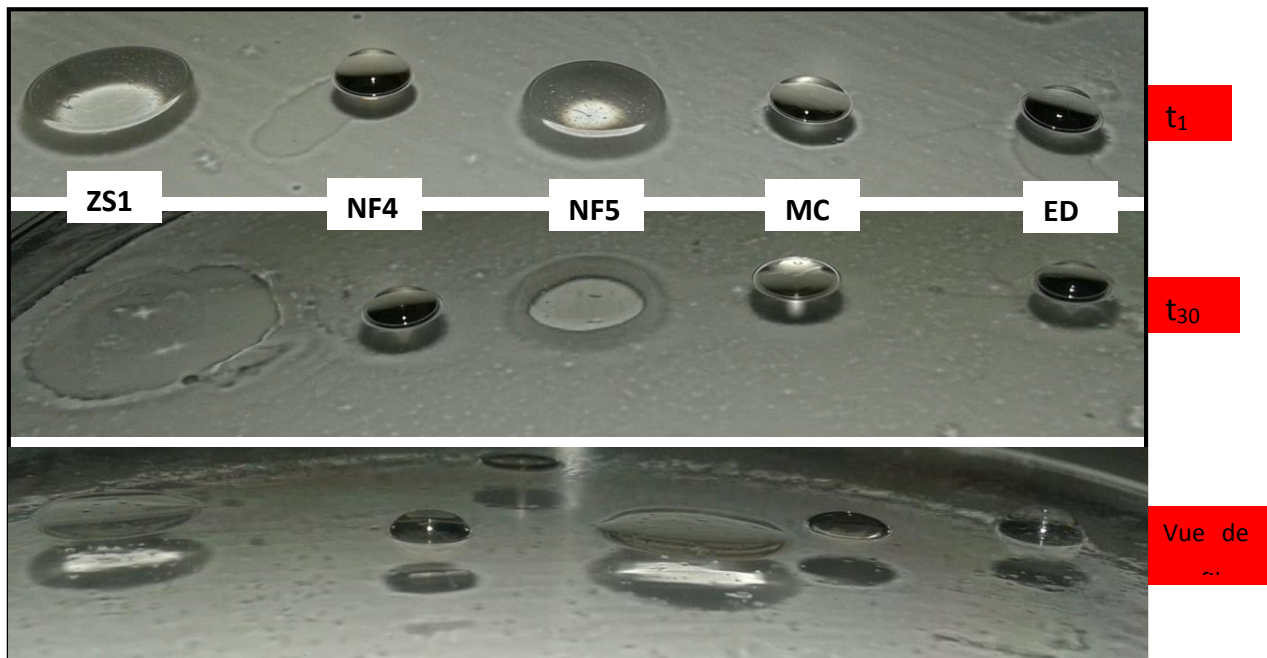
**Figure 38** : Illustration des diamètres de déplacement de l'huile des différents surnageant sur la surface de l'eau.



(A)

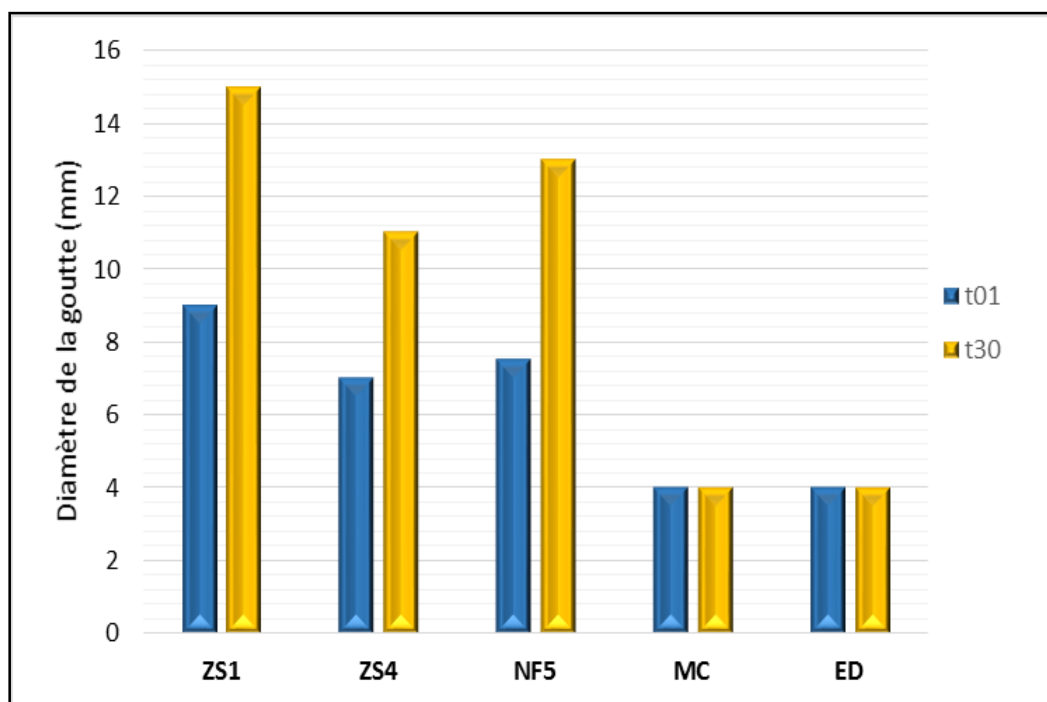
(B)

**Figure 39:** Presentation du test « Oil Spreading » (A): *Pseudomonas aeruginosa*.  
(B) : *Bacillus subtilis*.



**Figure 40 :** Illustration du test de « Drop Collapsing » chez les souches sélectionnées productrices de biosurfactants ; *B. subtilis* ZS1; ; *Bacillus sp* NF4; ; *P. aeruginosa* NF5.



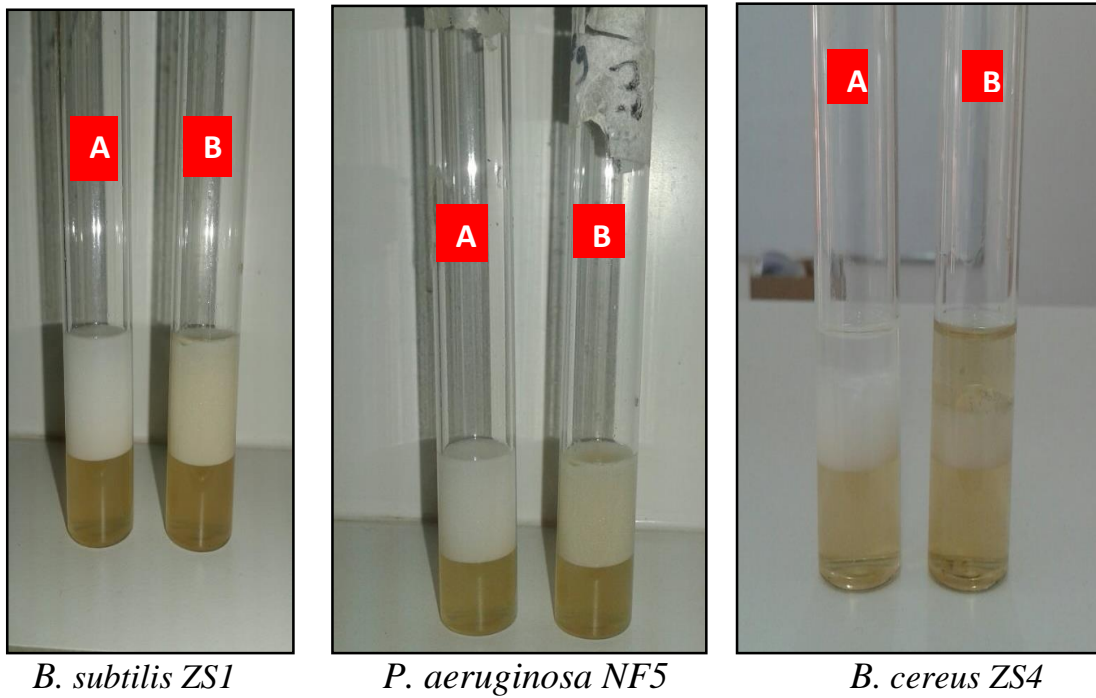


**Figure 41** : Evolution du test « Drop Collapsing » chez les souches sélectionnées productrices de biosurfactants *B. subtilis* ZS1; *B. cereus* ZS4; *P. aeruginosa* NF5.

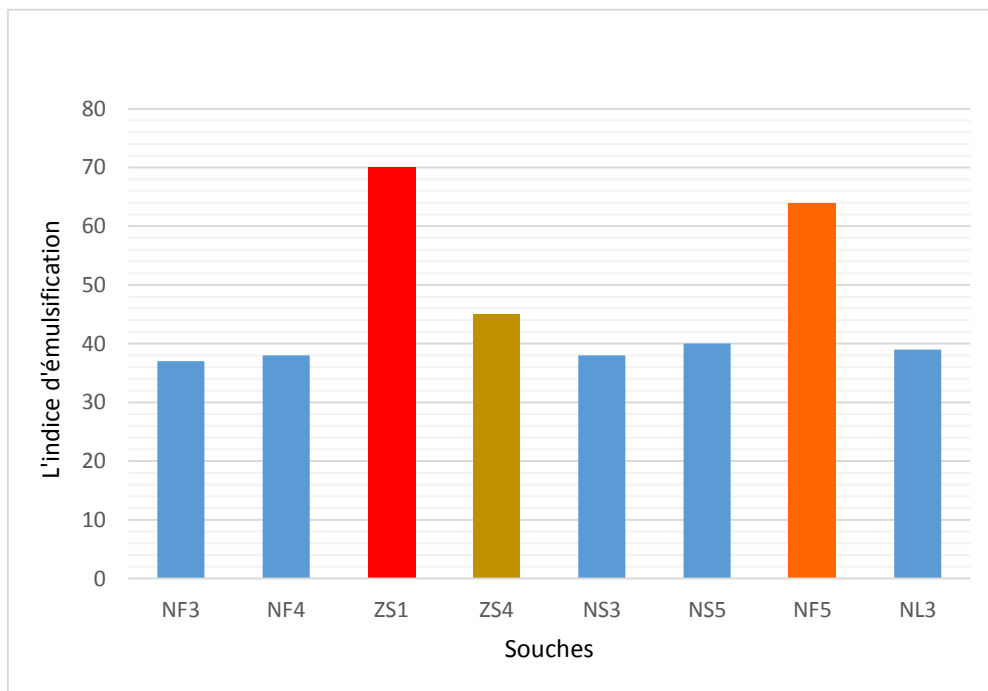
### II.3. L'index de l'émulsification ( $E_{24}$ )

Dans le but d'estimer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test d'émulsification ( $E_{24}$ ) est mis en évidence. Ce dernier consiste à l'homogénéisation d'un volume de milieu de culture avec le même volume de Kérosène ou de pétrole brute (**Cooper et Goldenberg, 1987**).

Les résultats obtenus ont montré que les trois souches ZS1, NF5 et ZS4 se manifestent productrices de biosurfactants avec un index d'émulsification de (70, 64 et 45%) respectivement (**Figure 18**).



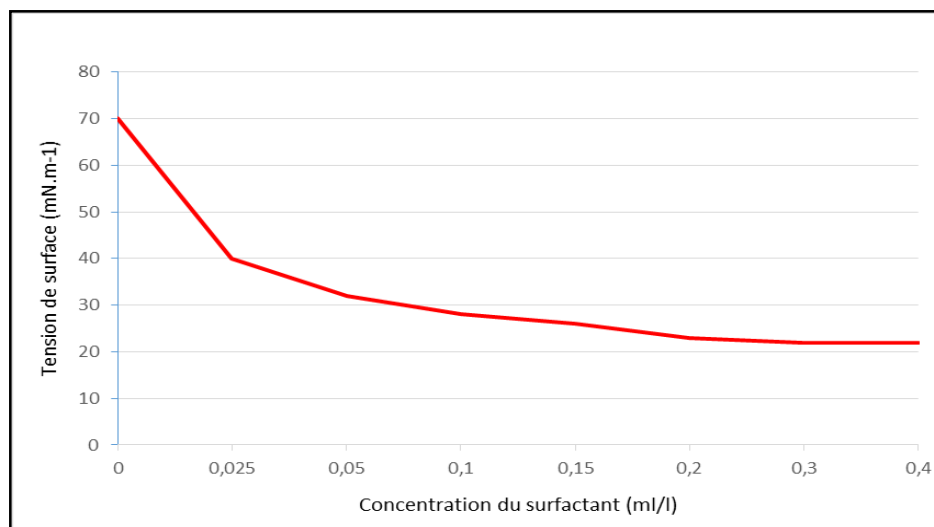
**Figure 42** : L'index d'émulsification chez les trois souches sélectionnées productrices des biosurfactants.  
**A** : Kérosène ; **B** : Gasoil.



**Figure 43** : Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion chez les différentes souches sélectionnées productrices de biosurfactants.

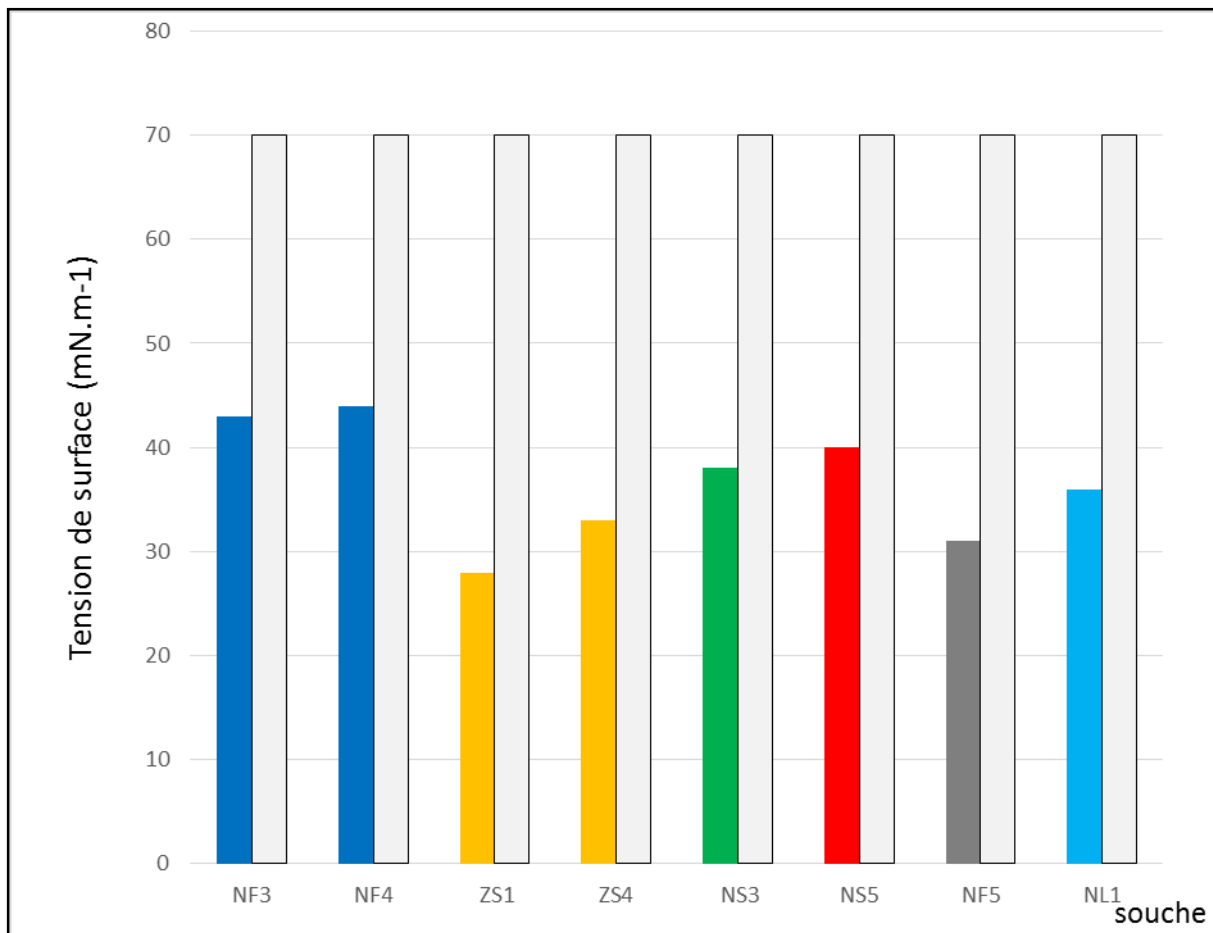
## II.4. Mesure de la tension superficielle

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (Neindre, 1993). Les résultats obtenus de l'effet des surfactants sur la tension de surface de l'eau pure ont montré une valeur proche de 70 mN/m (Figure 44). Ensuite, la tension de surface décroît de manière exponentielle, et atteint un minimum proche de 26 mN/m en présence d'une concentration de surfactant supérieure à 0,15 ml/l. Les biosurfactants peuvent contribuer d'une manière considérable à la réduction des tensions de surface à des valeurs comprises entre 25-30 mN/m (Rahman *et al.*, 2002 et Haba *et al.*, 2003).



**Figure 44** : Tension de surface en fonction de la concentration en surfactant.

Par ailleurs, la lecture des histogrammes obtenus sur la variation de la tension superficielle des différentes souches isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants a révélé que la souche *B. subtilis* ZS1 a diminué considérablement la tension du milieu de culture utilisée à une valeur de 28 mN/m en comparaison avec la valeur de l'eau de 70 mN/m et celle du milieu de culture stérile (75mN/m). Cependant, le milieu de cultureensemencé avec la souche *P. aeruginosa* NF5 a présenté une valeur minimale de la tension superficielle de 32 mN/m. Une diminution de la valeur de la tension superficielle à 34 mN/m chez la souche *B. cereus* ZS4 indique sa capacité de produire des biosurfactants.



**Figure 45** : Tension superficielle des différents surnageant et de milieu de culture non inoculé. En gris claire le milieu de culture ; en couleurs le surnageant.

## II.5. Swarming motility

L'essaimage ou le «Swarming motility» est une translocation rapide d'une population bactérienne sur des surfaces solides ou semi solides (2-10 $\mu$ m/s), ce test a été rapporté par **Jorgen Henrichsen (1972)** et a été principalement étudié dans le genre *Serratia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Vibrio* et *Escherichia*.

Les résultats de l'incubation des souches sélectionnées productrices des biosurfactant pendant 24 heures sur un milieu de culture semi-solide, a montré un envahissement de toute la surface de la gélose par les colonies des différentes souches.

Ces résultats expliquent la sécrétion des biosurfactants par les souches qui baissent la tension superficielle du milieu en facilitant l'essaimage de la colonie (**figure 46**).

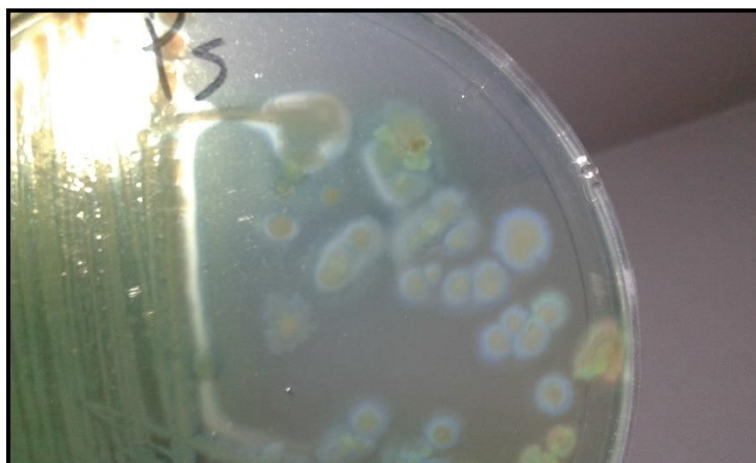


**Figure 46** : Swarming Motility de la souche *P. aeruginosa* NF5.

## **II.6. Ensemencement sur Gélose CTAB**

Le milieu de culture CTAB est un milieu de base de bromure de cetyltriméthylammonium et le bleu de méthylène. Les biosurfactants glycolipidiques se complexent avec ces deux molécules et forment un halo bleu autour des colonies.

Seules les souches du genre *Pseudomonas* ont donné des résultats positifs après incubation pendant 48 heures à 37°C sur la gélose CTAB, ce qui explique la production des glycolipides (rhamnolipides) par ces souches.



**Figure 47** : colonies de *P. aeruginosa* NF4 sur la gélose CTAB.

## **III. Caractérisation des biosurfactants**

### **III.1. Chromatographie sur couche mince**

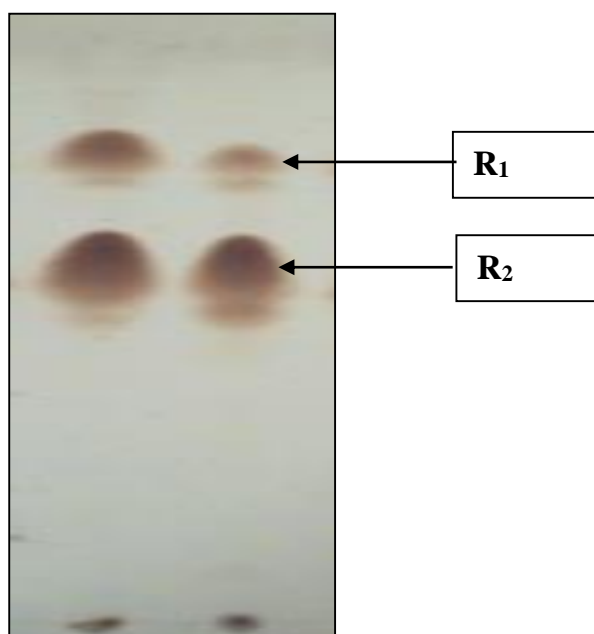
Les genres bactériens *Pseudomonas* et *Bacillus* sont caractérisés par leur pouvoir de synthétiser deux types de biosurfactants, de nature lipopeptide et les glycolipides. A cet effet, deux types de révélateurs ont été utilisés, la Ninhydrine pour les biosurfactants lipopeptidiques, et l'Orcinol pour les Glycolipides.

Le traitement des plaques chromatographique avec la solution de l'Orcinol sulfurique a révélé la présence de deux spots, qui correspondent à la migration des composants du surnageant de la culture de la souche *P. aeruginosa NF5*, ce qui explique la production des biosurfactants de nature glycolipidique appelés « Rhamnolipides ».

Les références frontales des spots obtenus sont de l'ordre de 0,71 et 0,60 correspondent aux mono-rhamnolipide et di-rhamnolipide respectivement (**figure 48**).

Par ailleurs, l'intensité de la couleur des spots est fortement liée à la concentration des rhamnolipides produites chez *P. aeruginosa NF5*.

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince ont montré que la concentration des di-rhamnolipides est très importante par rapport aux mono-rhamnolipides.

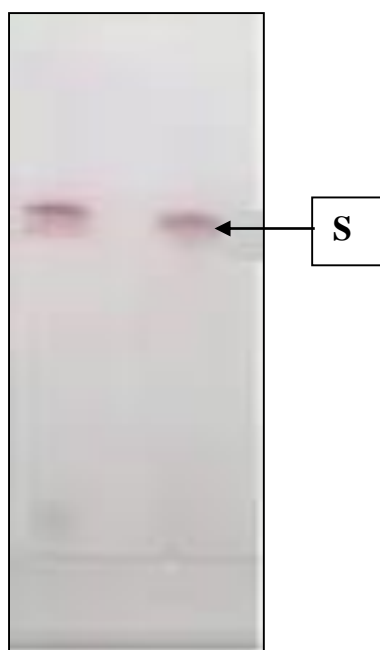


**Figure 48** : Chromatographie sur couche mince révélée par l'Orcinol Sulfurique.

**R<sub>1</sub>** : mono-rhamnolipide **R<sub>2</sub>** : di-rhamnolipide.

Le traitement des plaques chromatographique sur couche mince avec le réactif de Ninhydrine a révélé la présence de taches violacées (**figure 49**), qui explique la production biosurfactants de nature lipopeptidiques chez la souche *B. subtilis ZS1*. Cette biomolécule

constituée essentiellement de sept acides aminés liés à une longue chaîne d'acide gras porte le nom de « Surfactine ».



**Figure 49** : Chromatographie sur couche mince révélé par la Ninhydrine.

S : tache violette de surfactine.

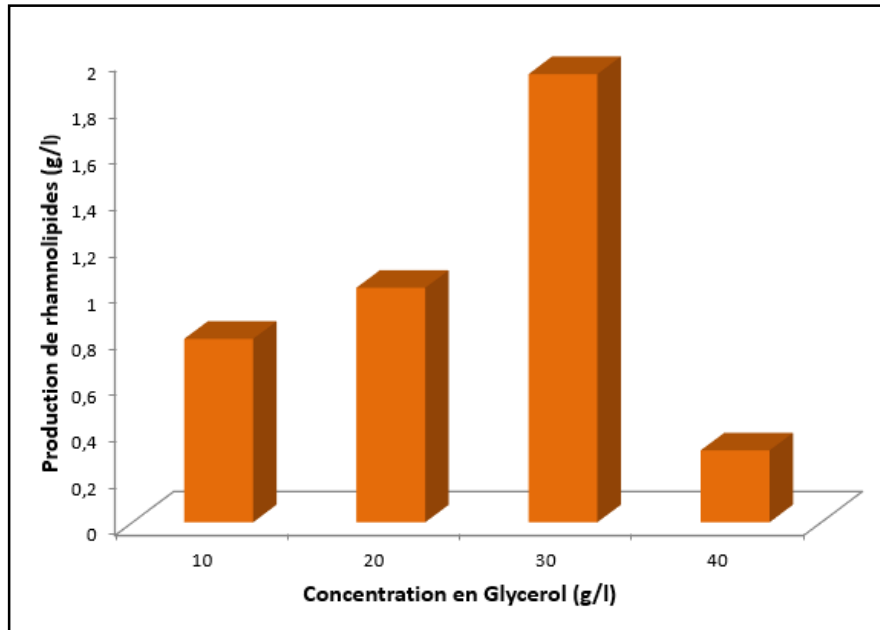
#### **IV. Etudes des paramètres influençant la production des biosurfactants**

##### **IV.1. Effet de la concentration du glycérol sur la production des biosurfactants**

Dans le but d'explorer l'effet de la concentration du glycérol dans le processus de la production des biosurfactants chez *P. aeruginosa NF5*, différentes concentrations de ce substrat (10, 20, 30, 40 g/l) ont été ajoutés au milieu de culture de fermentation.

Les résultats obtenus ont montré un taux élevé de production des rhamnolipides de 1.9 g/l lors de l'utilisation d'une concentration de 30 g/l de glycérol (**Figure 50**).

Cependant, l'utilisation d'une concentration de 40 g/l de glycérol a diminué considérablement le taux de production des rhamnolipides à 0.3 g/l, ceci peut s'expliquer par une certaine toxicité due principalement à la présence d'une forte concentration de glycérol dans le milieu de culture.

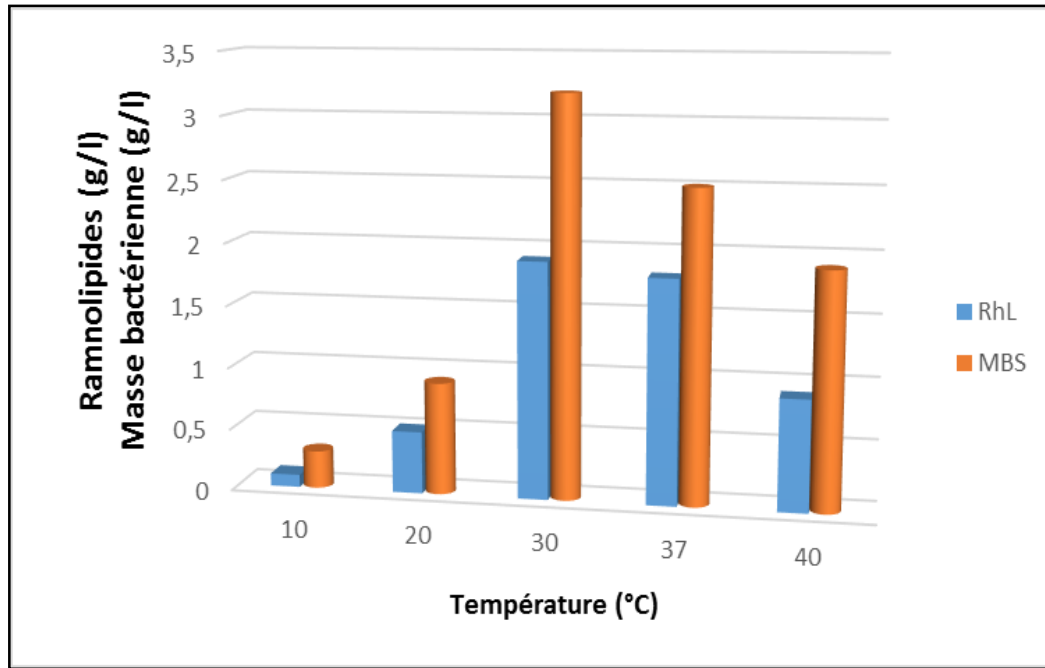


**Figure 50** : Effet de source de carbone (glycérol) sur la production des rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa* NF5.

#### **IV.2. Effet de la température sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne**

Dans le but d'étudier l'influence de la température sur la production des biosurfactants et la croissance bactérienne chez *P. aeruginosa*, le milieu de fermentation est incubé à différentes températures 10, 20, 30, 40°C. Les résultats obtenus ont montré la production d'une quantité faible de biosurfactants, accompagnée d'une faible croissance bactérienne à des températures de (10, 20, 40°C) (**Figure 51**). A l'opposé, une importante production des rhamnolipides avec une biomasse bactérienne considérable est observée dans les cultures incubées à des températures de 30°C et 37°C avec des valeurs de 1.8 g/l et 1.5 g/l respectivement.





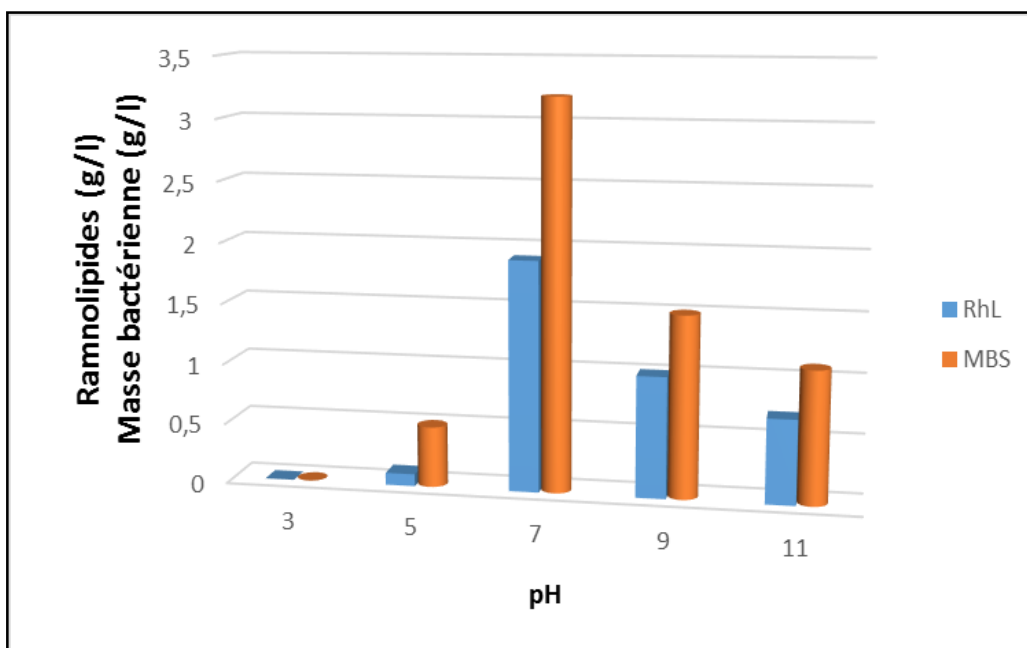
**Figure 51** : Effet de température sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa* NF5. RhL : rhamnolipides ; MBS : masse bactérienne sèche.

### IV.3. Effet du pH sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne

Afin d'explorer l'effet de la valeur du pH sur la production des biosurfactants et la croissance bactérienne chez *P. aeruginosa*, des milieux de fermentation de différentes valeurs de pH (6, 6.5, 7, 8, 9) sont inoculés et incubés à une température de 30°C.

Les résultats obtenus ont montré qu'une production maximale de biosurfactants de 1,8 g/l, accompagnée d'une importante croissance bactérienne avec une masse sèche de 3,2 g/l a été observée à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,5 (**Figure 52**).

Par contre une très faible production de biosurfactants accompagnée d'une faible croissance bactérienne à des valeurs de pH 3, 5 et 11 a été remarquée.



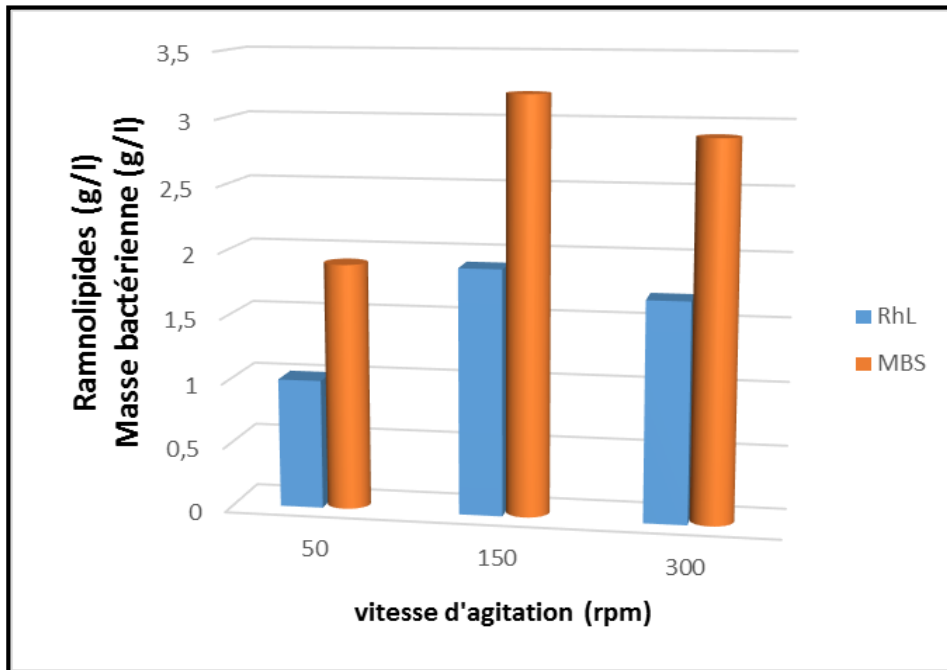
**Figure 52** : Effet de pH sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*.

#### **IV.4. Effet de la vitesse d'agitation sur la production des rhamnolipides et la croissance bactérienne**

La vitesse d'agitation joue un rôle majeure dans la fermentation et la production des biosurfactants par la souche *P. aeruginosa NF5*, ce paramètre assure une bonne homogénéisation du milieu de culture ainsi qu'une bonne intégration de l'oxygène.

Une haute production des biosurfactants a été remarquée lors de l'incubation de la souche *P. aeruginosa NF5*, pendant 4 jours à 30°C sous une agitation de 150 rpm, alors qu'une basse agitation conduit à une mauvaise aération du milieu de culture en donnant un faible rendement en production des biosurfactant.

Un excès du mouvement du milieu dans les erlens sous une agitation de 300 rpm a provoqué une chute légère de la production des rhamnolipides (**figure 53**).

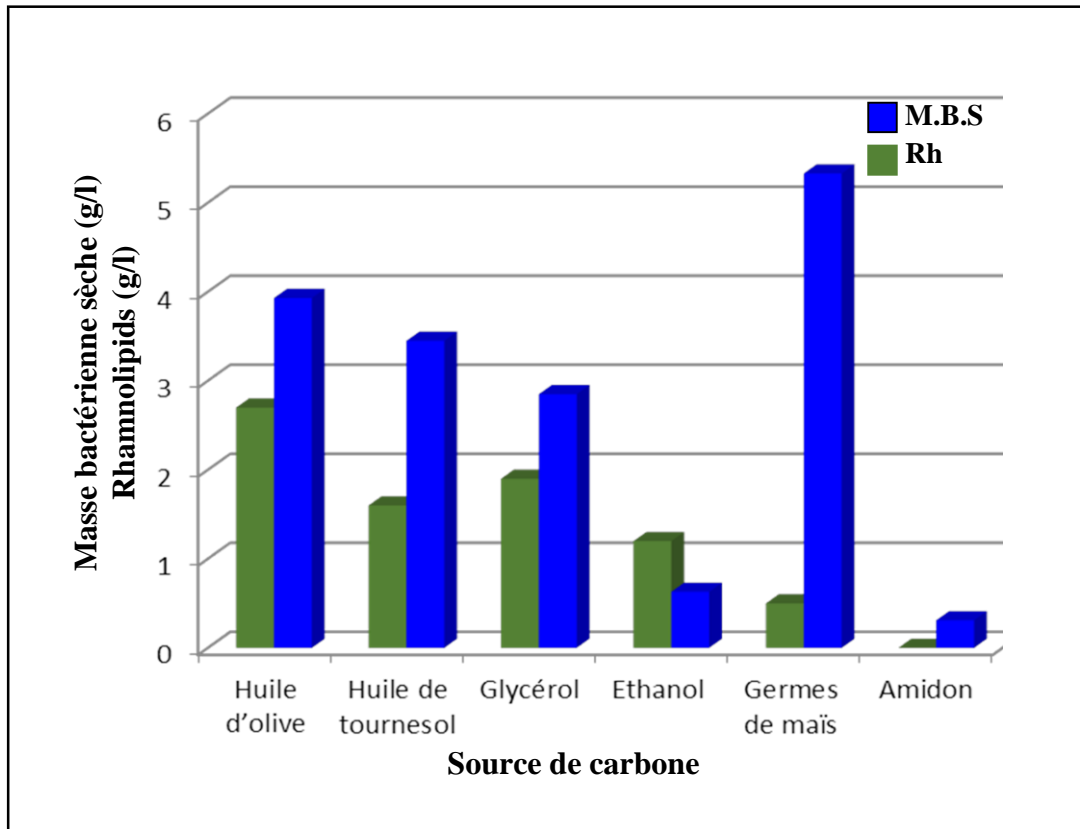


**Figure 53 :** Effet de la vitesse d'agitation sur la production des rhamnolipides et la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*.

#### IV.4. Effet de la source de carbone sur la production des rhamnolipides

Dans le but d'explorer l'effet de la source de carbone adéquate impliquée dans le processus de la production des biosurfactants chez *P. aeruginosa NF5*, différentes sources telles que l'huile olive, l'huile de tournesol, glycérol, éthanol, germes de maïs et l'amidon ont été ajoutées au milieu de fermentation à une concentration de 3%.

Les résultats obtenus ont montré que les taux de production des rhamnolipides de (2,7 ; 1,6 et 1,9 g/l) ont été observés chez *P. aeruginosa*, lors de l'utilisation de l'huile d'olive, l'huile de tournesol et le glycérol comme seule source de carbone respectivement (**Figure 54**). Par ailleurs, l'utilisation de l'éthanol et des germes de maïs ont réduit considérablement la production des rhamnolipides de (1.1 g/l et 0.5 g/l)

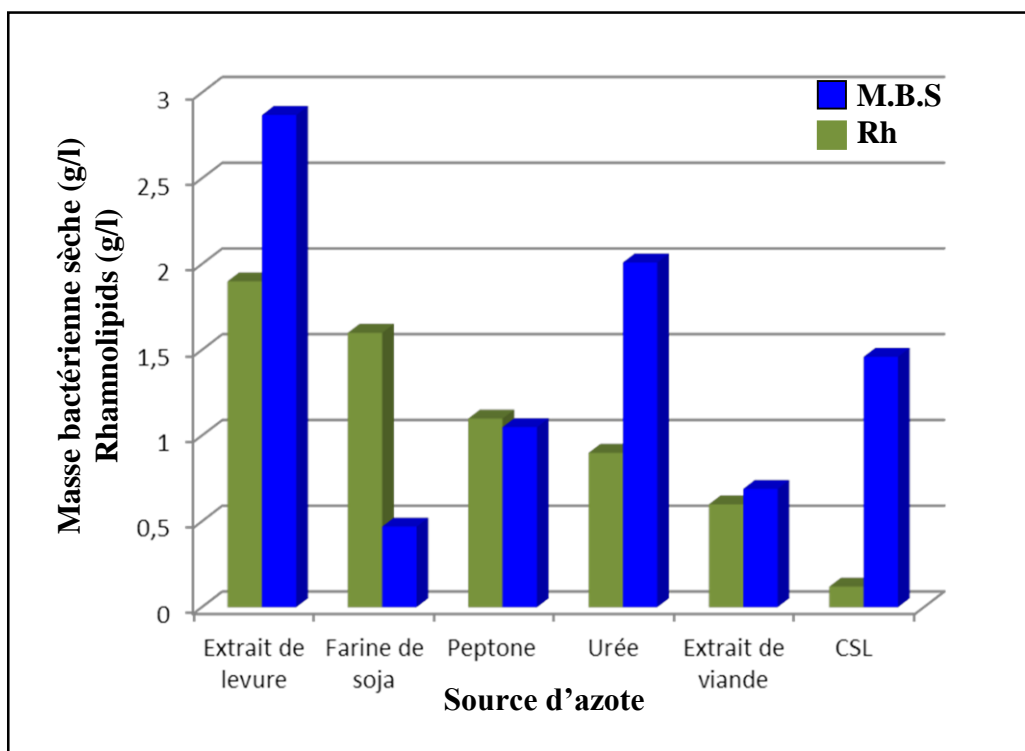


**Figure 54** : Effet de la source de carbone sur la production des rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa NF5*.

#### IV.5. Effet de la source d'azote sur la production des rhamnolipides

Dans le but d'explorer l'effet de la source d'azote adéquate impliquée dans la production des biosurfactants chez la souche *P. aeruginosa NF5*, différentes sources telles que l'extrait de levure, la farine de soja peptone, urée, l'extrait de viande et CSL ont été ajoutées au milieu de fermentation à une concentration de 5 g/l en présence de 3% glycérol comme source de carbone. Les résultats obtenus ont montré que des taux de production des rhamnolipides de (1,85 ; 1,6 et 1,1 g/l) sont observés chez *P. aeruginosa NF5*, lors de l'utilisation de l'extrait de levure, la farine de Soja et la peptone comme seule source d'azote respectivement (**Figure 55**).

Par ailleurs, une faible production des rhamnolipides de (0,8 ; 0,55 et 0,2 g/l) est enregistrée lors de l'utilisation de l'urée, l'extrait de viande et la liqueur de maïs respectivement.



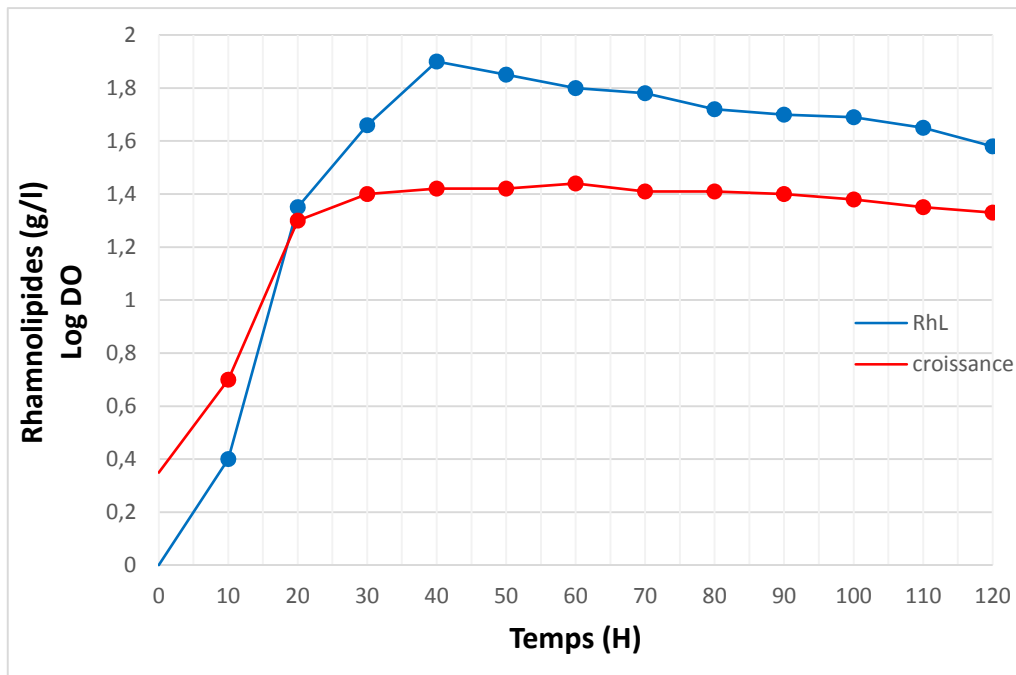
**Figure 55** : Effet de la source d'azote sur la production des rhamnolipides.

## V. Suivi de la cinétique de croissance bactérienne et de production des biosurfactants

### V.1. Chez la souche *P. aeruginosa* NF5

Dans le but d'explorer la production des biosurfactants, l'étude de la croissance de la souche *P. aeruginosa* NF5 et le dosage des rhamnolipides dans le milieu de culture contenant 3% de glycérol comme source de carbone a été déterminée.

Les résultats obtenus ont montré qu'une importante production de la biomasse bactérienne, accompagnée d'une quantité intéressante en rhamnolipides (1,9 g/l) sont observées durant les premières heures d'incubations, avec l'atteinte des valeurs maximales dans les 20<sup>ème</sup> heures, qui correspond à la phase exponentielle de croissance. Ensuite, un ralentissement de la croissance bactérienne, suivie d'une stabilisation de la quantité du rhamnolipides produites durant cette phase ont été remarqués, ce qui explique le déclenchement de la phase stationnaire. Une diminution considérable du taux des rhamnolipides produits de (1,6 g/l) est observée après 120<sup>ème</sup> heures d'incubation, ce qui confirme que le processus de la production des rhamnolipides par la souche *P. aeruginosa* NF5 est effectué durant la phase exponentielle de croissance.



**Figure 56 :** L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa NF5*.

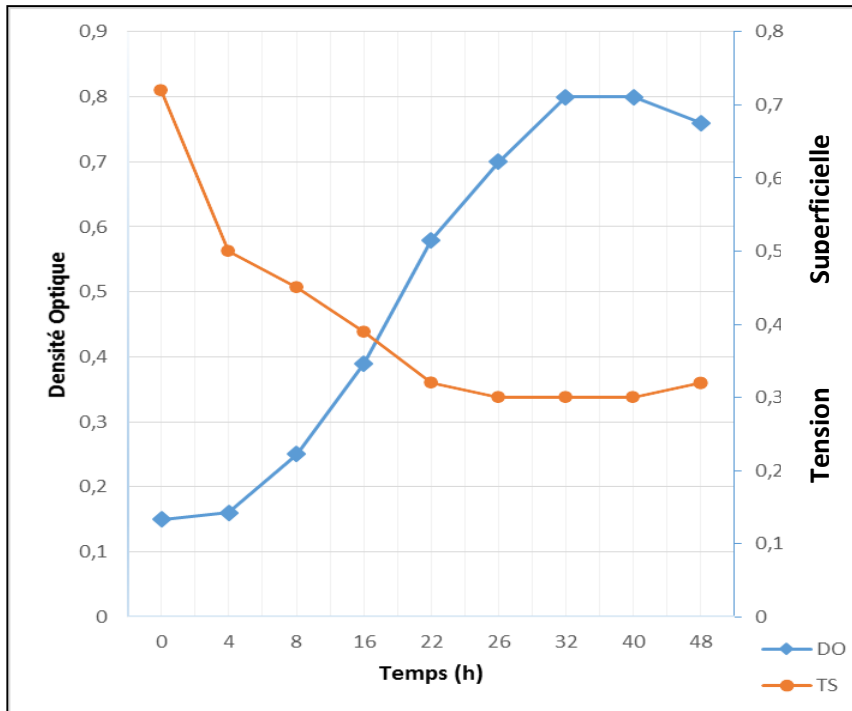
## V.2. Chez les souches *B. subtilis ZS1* et *B. cereus ZS4*

Les résultats de l'étude de la croissance de la souche *B. subtilis ZS1* et la mesure de tension superficielle du milieu de culture contenant le glucose comme seule source de carbone sont illustré dans la figure 57.

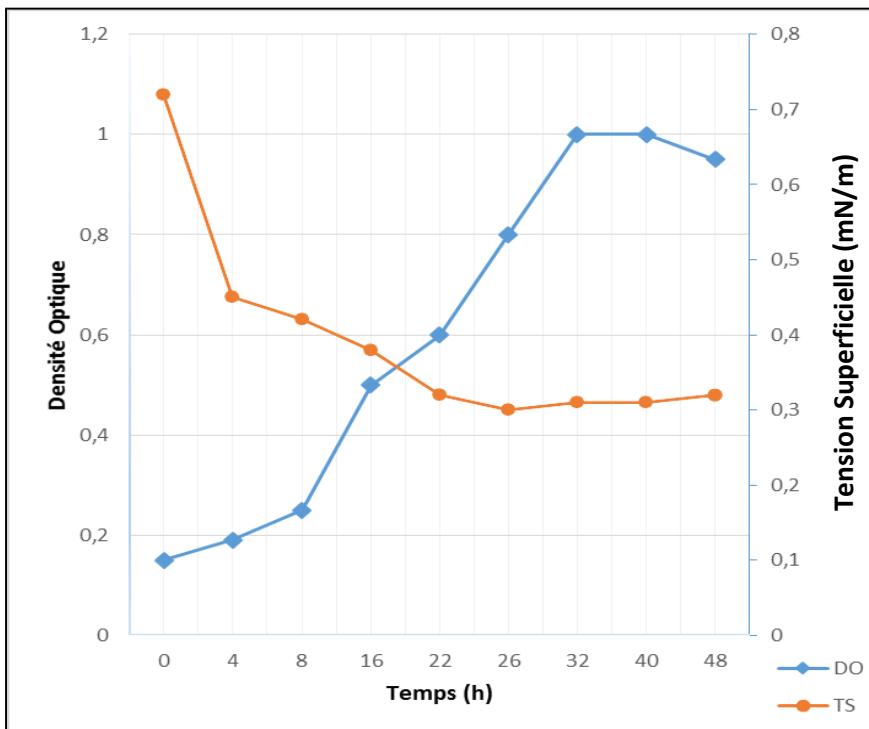
Les résultats obtenus ont montré qu'une importante production de la biomasse bactérienne, accompagnée d'une importante réduction de la tension superficielle du milieu de culture (32.1 mN/m) sont observées durant les premières heures d'incubations, avec l'atteinte des valeurs maximales dans les 22<sup>ème</sup> heures, qui correspond à la phase exponentielle de croissance. Durant cette phase, une quantité importante des Surfactines est produite, ce qui conduit à une chute rapide de la tension superficielle de 70mN/m jusqu'à 32 mN/m.

Ensuite, une stabilisation de la tension superficielle a été remarquée, ce qui explique la saturation du milieu de culture en molécules tensio-actives.

Des résultats très proches sont enregistrés lors du suivie cinétique de croissance de la souche *B. cereus ZS4* et le changement de la tension superficielle de milieu de fermentation (**figure 58**).



**Figure 57 :** L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la tension superficielle du milieu de culture chez *B. subtilis* ZS1.



**Figure 58 :** L'étude du suivi de la cinétique de croissance et la tension superficielle du milieu de culture chez *B. cereus* ZS4.

## **VI. Effet de la source de carbone sur la cinétique de croissance et la production des rhamnolipides**

L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne en présence de différentes concentrations du glycérol à des différentes périodes d'incubation est mise en évidence. L'absence de source de carbone adéquate au début de la fermentation est à l'origine du ralentissement de la croissance et absence de production des rhamnolipides.

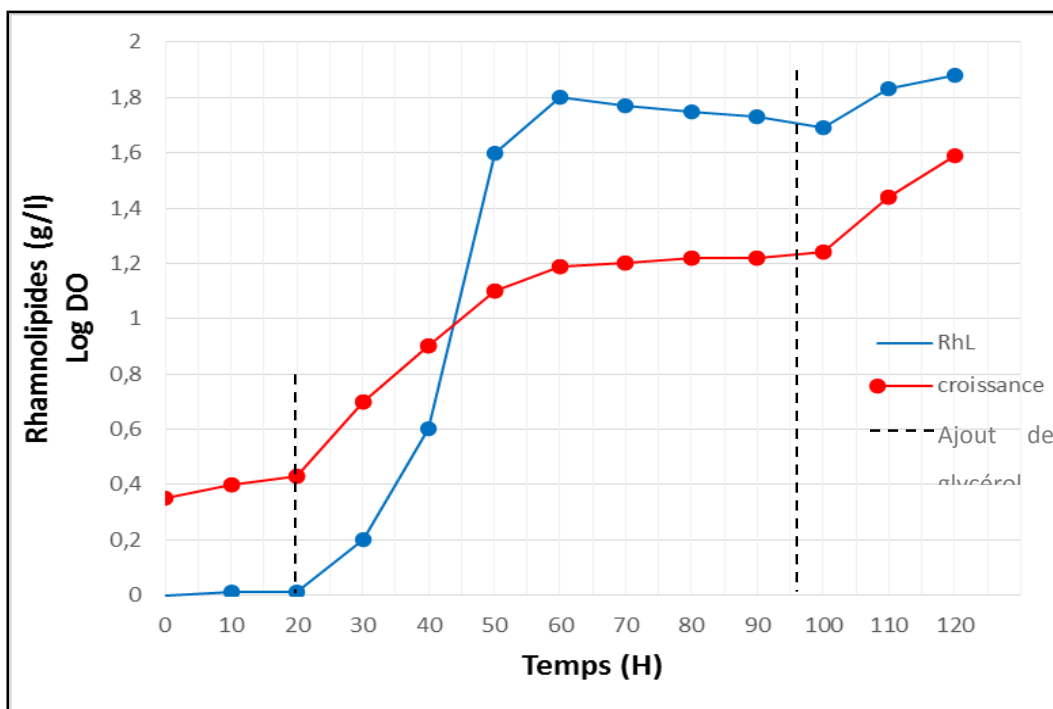
La culture de la souche *P. aeruginosa NF5* en présence d'une concentration de 3% de glycérol a accéléré la croissance bactérienne, accompagnée par l'initiation de la production des biosurfactants. L'ajout du glycérol, après 40 heures d'incubation a augmenté la production de la biomasse bactérienne de 0,4 à 1,2g/l suivie d'une augmentation considérable de la quantité des biosurfactants de 0 à 1,8 g/l, ce qui explique le déclenchement de la phase exponentielle (**Figure 59**).

Ensuite, la quantité des biosurfactants commence à se stabiliser à une concentration de 1,8 g/l sur un intervalle de temps 70 heures, ceci est expliqué par l'épuisement des sources d'énergie dans le milieu de culture utilisé.

Les résultats obtenus suggèrent que les métabolites produits chez la souche *P. aeruginosa NF5*, sont synthétisés durant la phase exponentielle de croissance.

L'ajout de 1% du glycérol, après 96<sup>ème</sup> heures d'incubation a augmenté considérablement la production des biosurfactants de 1,7 à 1,9 g/l.





**Figure 59** : Effet de la source de carbone sur la production des biosurfactants et la croissance bactérienne.

## VII. Identification moléculaire des gènes qui codent pour la production des rhamnolipides

### VII.1. Dosage de l'ADN génomique bactérien par spectrophotométrie :

L'ADN génomique des trois souches bactériennes *P. aeruginosa NF5*, *Pseudomonas sp NL1* et *Pseudomonas sp NL6* non productrice des rhamnolipides a été extrait avant d'être dosé par spectrophotométrie NanoDrop. Les résultats de la lecture des D.O et les concentrations d'ADN sont illustrés dans le tableau suivant.

**Tableau 12** : Résultat du dosage de l'ADN génomique des trois souches étudiées.

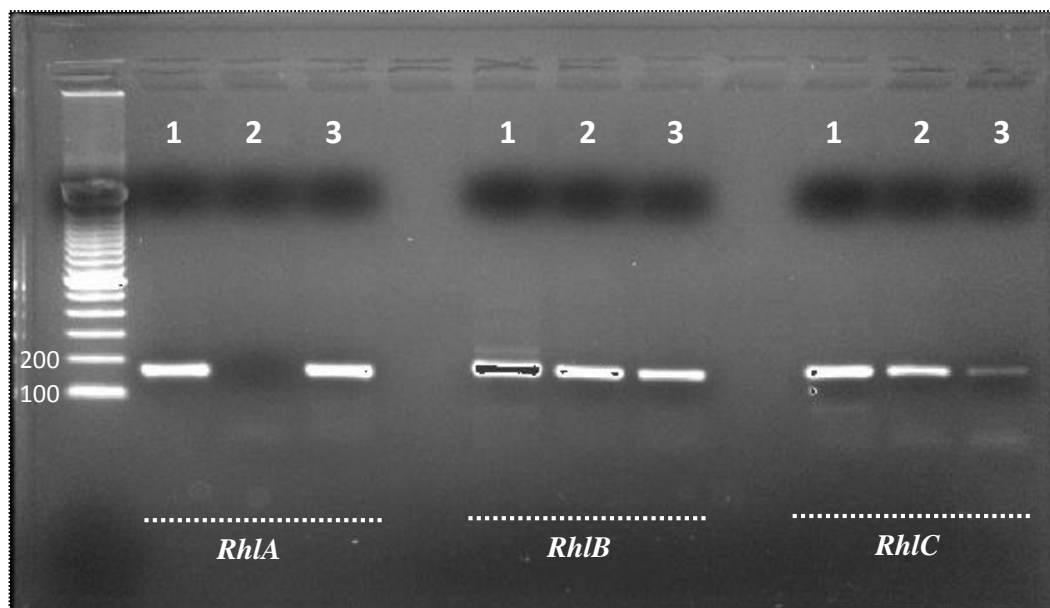
| Echantillon |                                           | [ADN] ng/μl | Ratio DO 260/280 |
|-------------|-------------------------------------------|-------------|------------------|
| 1           | <i>P. aeruginosa NF5</i>                  | 1866.4      | 1.96             |
| 2           | <i>Pseudomonas sp NL6 non productrice</i> | 1802.6      | 1.96             |
| 3           | <i>Pseudomonas sp NL1</i>                 | 2386.1      | 1.93             |

Les rapports optiques 260/280 nm qui sont supérieures à 1.9 ont permis de prouver la pureté des ADN obtenus après extraction.

La PCR réalisée sur les gènes responsables de la production des rhamnolipides a permis d'amplifier tous les fragments cibles des souches étudiées, soit un taux d'amplification de 100 %. Les résultats obtenus montrent la présence d'une seule bande d'ADN au niveau de chaque échantillon, sans la présence d'un « smear », ce qui explique l'absence de contamination, ou de dégradation de l'ADN extrait.

L'évaluation visuelle par comparaison aux marqueurs de tailles utilisés (100pb) ; la taille de la bande obtenue correspond au poids moléculaire de 185 pb.

D'après l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% des produits de l'amplification des gènes *RhIA*, *RhIB* et *RhIC*, réalisée sur les trois souches étudiées, il en ressort que seules les deux souches *P. aeruginosa NF5* et *Pseudomonas sp NLI* possèdent ces trois gènes responsables de la production des mono et di rhamnolipides. L'absence de la production des rhamnolipides chez la souche *Pseudomonas sp NL6* s'est expliquée par l'absence du gène *RhIA* responsable de la production des mono-rhamnolipides, ce qui empêche automatiquement la production des di-rhamnolipides.



**Figure 60** : Electrophorèse des produits de la PCR des gènes *RhIA*, *RhIB* et *RhIC* des trois souches étudiées, réalisée sur gel d'agarose à 1%.

**1.** *P. aeruginosa NF5* ; **2.** *Pseudomonas sp NL6 non productrice* ; **3.** *Pseudomonas sp NLI*.

*Chapitre IV :*  
*Discussion*

La majorité des surfactants commercialement disponibles, dérivés du pétrole présente un risque majeur pour l'environnement par leur toxicités et non biodégradabilités.

Depuis quelques années, grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes tels que les tensioactifs biologiques appelés encore biosurfactants, qui possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, avec un avantage d'être biodégradables, non toxiques et efficaces dans le cas de microorganismes extrémophiles à des températures, des pH et des salinités extrêmes. Les biosurfactants principalement produits par les levures, les champignons, les bactéries se développant dans des conditions aérobies sur des milieux de cultures liquides contenant une source de carbone, telles que les hydrates de carbone, les huiles et les hydrocarbures.

Les tensioactifs jouent un rôle physiologique dans la mesure où ils permettent aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles par la réduction de la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, qui rend ce dernier plus facilement accessible.

Les bactéries largement utilisées dans la production des biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes telles que les HAP.

Dans ce présent travail, les sites de prélèvements ont été choisis sur la base de degré de contamination des sols par les hydrocarbures ou les déchets des huileries. La couleur et l'odeur des échantillons étudiés constituent le premier indicateur de pollution. Les sols et les bourbiers prélevés présentent une couleur brunâtre et une odeur fétide indiquant l'influence des déchets sur leur qualité. Le criblage primaire effectué a permis l'isolement de 37 souches, dont (08) huit souches sont sélectionnées productrices de biosurfactants. (06) six souches sélectionnées productrices de biosurfactants sont isolées à partir des sols pollués par les hydrocarbures au niveau de la raffinerie pétrolière d'ARZEW.

**Kaya et al., (2014) ; Yalçin et Ergene, (2010) et Saadat et al., (2013)** et ont isolé des souches productrices des biosurfactants à partir des raffineries situées en Turquie et en Iran. La sélection des souches productrices de biosurfactants est effectuée par le test d'hémolyse et la mesure de la tension superficielle du milieu de culture de fermentation.

**Bernheimer et Avigad, (1970)** ont rapporté que la souche *B. subtilis* isolée à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures a manifesté une activité hémolytique.

**Banat, (1993) et Yonebayashi et al., (2000)** ont suggéré que le test d'hémolyse effectué sur la gélose au sang est le seul procédé préconisé pour la sélection des souches productrices des biosurfactants.

**Mulligan et al., (1984) ; Carrillo et al., (1996) et Yonebayashi et al., (2000),** ont testé le pouvoir hémolytique de différentes bactéries productrices des biosurfactants isolées à partir des

sols pollués par les hydrocarbures. **Carrillo et ses collaborateurs (1996)** ont recommandé après l'étude de la relation entre l'activité hémolytique et la production des tensioactifs, l'utilisation du test d'hémolyse comme méthode principale du dépistage de l'activité tensioactive chez les bactéries.

**Noha et ses collaborateurs (2004)** ont suggéré que le test d'hémolyse est insuffisant dans l'exploration de la production des biosurfactants.

Par ailleurs, autres tests confirmatifs dans la production des biosurfactants sont mis en évidence, tel que test de « Drope Collapsing », qui se repose sur l'observation des dépôts en goutte du milieu de culture sur un fond d'huile de paraffine.

Les variations dimensionnelles de la goutte prélevée du milieu de fermentation en comparaison avec celle de l'eau distillée sont expliquées par la réduction de la tension superficielle causée par la production des biosurfactant dans le milieu de culture.

Les souches ZS1 et ZS4, NF5 isolées à partir de la raffinerie d'ARZEW et de la station des biocarburants respectivement sont sélectionnées productrices des biosurfactants.

La goutte prélevée du milieu de culture de la souche ZS1 a manifesté une importante instabilité avec un diamètre de déplacement de 15 mm pendant une période de dépôt de 30 mn. Par ailleurs, des résultats similaires ont été obtenus chez les deux autres souches testées (ZS4, NF5).

**Bodour et al., (2003)** ont utilisé la méthode de « Drope Collapsing » pour la sélection des microorganismes producteurs des biosurfactants dans l'environnement. Cependant, **Jain et al., (1991)** ont suggéré l'utilisation de la méthode de l'instabilité de la goutte comme méthode sensible, facile pour la détection de la production des biosurfactants. Par ailleurs, **Bodour et Miller-Maier, (1998)** ont utilisé le test de l'instabilité de la goutte comme technique d'analyse quantitatif des biosurfactants.

Dans le but d'explorer la production de biosurfactants chez les souches isolées, sélectionnées productrices, autres tests d'analyses qualitatives et quantitatives sont mis en évidence. A cet effet, une fine couche de pétrole déposée sur la surface de la boîte de Pétri, remplie avec un volume de 20 ml d'eau distillée, est déplacée sous l'effet de la présence des biosurfactant produites dans le milieu de culture utilisé. Le dépôt de 10 µl des surnageants des souches isolées sélectionnées productrices de biosurfactants *P. aeruginosa* NF5, *B. subtilis* ZS1 et *B. cereus* ZS4 sur la couche de pétrole, a provoqué leur déplacement, accompagné avec la formation diamètres de 3,5 ; 4 et 3 cm respectivement. Cette différence dimensionnelle formée est expliquée par la concentration des biosurfactants produits chez les souches sélectionnées productrices.

L'utilisation de cette méthode a permis la comparaison entre l'activité des deux formes cycliques et linéaires de biosurfactants (la surfactine et l'arthrofactine) et la révélation que la zone de déplacement avec la solution contenant l'agent tensioactif est relativement proportionnelle à la concentration des biosurfactants (**Morikawa et al., 2000**).

**Noha et al., (2004)** ont rapporté que le technique de « le Déplacement du pétrole » est une méthode fiable pour mise en évidence de la production biosurfactants. **Čipinytė, et al., (2011)** ont rapporté la présence d'une relation proportionnelle entre la concentration des biosurfactants et la surface de la zone claire de déplacement.

L'étude du pouvoir des tensioactives des émulsions avec le kérosène et le gasoil, a permis l'estimation de l'index d'émulsification des souches sélectionnées productrices de biosurfactants. La souche *B. subtilis* ZS1 est sélectionnée émulsifiante des hydrocarbures avec des pourcentages de (78,8 et 77%) pour le kérosène et le gasoil respectivement. Cependant, la souche *P. aeruginosa* NF5 a engendré un indice d'émulsification de Kérosène de 71%.

**Pereira et al., (2013)** ont isolé une souche appartenant au genre de *B.subtilis* à partir d'un champ pétrolier au Brésil, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadecane de 52.7 %.

Des résultats proches ont été enregistrés chez la même espèce par **Benincasa et Accorsini, (2008)** et **Lovaglio et al., (2011)** avec un index d'émulsion de 50% et 58% respectivement. **Patel et Desai, (1997)**, **Benincasa et al., (2004)** et **Wei et al., (2005)** ont rapporté que différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles.

**Rosen, (1978)** a défini la tension superficielle comme une mesure de l'énergie libre de la surface par unité de champ. l'efficacité des biosurfactants est déterminée par l'abaissement de la tension des surfaces (**Tabatabaee et al., 2005**).

**Mulligan et al., (2014)** ont indiqué qu'un bon surfactant peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72mN/cm à 35mN/cm, et la tension inter-faciale (entre un liquide polaire et apolaire) de l'eau contre le n-hexadécane de 40mN/cm à 1 mN/cm.

Les souches *B. subtilis* ZS1, *B. cereus* ZS4 et *P.aeruginosa* NF5, sélectionnées productrices de biosurfactants, peuvent réduire la tension superficielle de 70 mN/m jusqu'à 28 mN/m, 34 mN/m et 32 mN/m respectivement, ce qui suggère à une production de biomolécules spécifiques de propriétés tensio-actives.

Par ailleurs, **Banat et al., (1991)**, ont isolé de nombreuses bactéries capables de réduire la tension superficielle du milieu de culture même à des à des valeurs inférieures à 40 mN/m et ont constaté que les rhamnolipides et les surfactines produites chez *P. aeruginosa* et *B. subtilis* ont manifesté une importante capacité de réduction de la tension superficielle de l'eau de 72-30 mN/m. **Eder et al., (2007)** et **Somayeh et al., (2008)** ont abouti à réduire la tension superficielle, lors de

l'ensemencement de différents milieux de culture, avec les souches de *P. aeruginosa* et *P. citronellolis*, isolées à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures jusqu'à 36 mN/m.

La méthode habituellement utilisée pour la mesure de la tension superficielle et de la production des biosurfactants, la période de temps consommée pour la réalisation de ce test présente un inconvénient majeur pour le criblage des souches productrices. (**Bosch et al., 1988 ; Neu et Poralla, 1990 ; Noordmans et Busscher, 1991 ; Willumsen et Karlson, 1997 ; Makkar et Cameotra, 1997,1998**)

La technique de la chromatographie sur couche mince, une méthode physique qui permet la séparation des différents constituants présent dans le surnageant de la culture bactérienne, est basée sur l'affinité des biosurfactants à l'égard de la phase stationnaire qui est souvent le gel de silice, et la phase mobile constitué d'un mélange de chloroforme et de méthanol.

Les biosurfactants séparées sur la plaque chromatographique sont révélés par la réaction entre les molécules de l'Orcinol et la Ninhydrine avec les parties non lipidiques des Rhamnolipides et les Surfactines, respectivement.

La nébulisation de l'Orcinol sulfurique sur la plaque, contenant le surnageant de la culture de *P. aeruginosa NF5* a montré la présence de deux taches de couleur dorées avec des références frontales, Rf de 0,71 et 0,6 ; qui correspond aux mono-rhamnolipides et aux di-rhamnolipides, respectivement. Des travaux antérieurs réalisés par **Cochis et al., (2012)** et **Sharma et al., (2014)** ont montré des valeurs proches de nos résultats obtenus avec une référence frontale égale à 0,69 pour les mono-rhamnolipides.

La présence des surfactines dans le milieu de culture ensemencé par la souche *B. subtilis ZSI* a été confirmée par l'apparition d'une tache violette sur la plaque chromatographique, qui se résulte par la réaction entre la Ninhydrine et la partie peptidique de ce tensioactif (**Yin et al., 2008 ; Shaikh et al., 2013**).

**Syldatk et Wagner, (1987)** ont rapporté que l'utilisation des substrats hydrocarbonés stimule la synthèse des biosurfactants chez certains microorganismes. **Mulligan et ses collaborateurs (2014)** ont montré que les biotentionactifs ont un pouvoir d'émulsification des substrats immiscibles présents dans le milieu de culture, ce qui facilite leur dégradation par les microorganismes.

L'ajout de différentes sources de carbone dans le milieu de culture de fermentation, a montré qu'une production optimale de rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa NF5* est observée lors de l'utilisation d'une concentration de 30 g/l de glycérol. Par ailleurs, l'utilisation des concentrations de 2 % et 1 % du glycérol a diminué production des biosurfactants. Cependant, la concentration de 4 % a causé la toxicité cellulaire, qui provoque une chute considérable du taux des biosurfactants dans le milieu de culture.

**Robert et al., (1989)** ont rapporté que l'utilisation du glycérol comme source de carbone a augmenté considérablement la production des rhamnolipides chez la souche *P. aeruginosa 44T1*.

Lors de l'étude de l'effet de quelques sources de carbone sur la production des biosurfactants et sur la croissance de la souche *P. aeruginosa NF5*, des résultats variables sont enregistrés. L'ajout d'une concentration de 3 % de l'huile d'olive au milieu de culture a augmenté la concentration des rhamnolipides produites à 2,7 g/l. Cependant, une production de 1,6 g/l est enregistrée en présence d'une concentration de 3 % de l'huile de tournesol dans le milieu de culture.

**Ferraz et al., (2002)** ont constaté que l'utilisation des huiles végétales comme des substrats carbonée pour la production des biosurfactants, présente une alternative intéressante.

La libération des acides gras (la partie hydrophobe des biosurfactants) chez la souche *P. aeruginosa* par hydrolyse des substrats lipidiques augmente considérablement la concentration des rhamnolipides produites.

**Abouseoud et ses collaborateurs (2007)** ont rapporté que la culture de *P. fluorescens* en présence de l'huile d'olive comme source de carbone a manifesté une excellente production de biosurfactants, accompagnée à une réduction de la tension superficielle à 38 mN/m et une augmentation de l'activité d'émulsification à 49%.

Par ailleurs, **Haba et al., (2000)** ont rapporté que l'utilisation de l'huile d'olive et de tournesol comme source de carbone chez 36 souches du genre *Pseudomonas* isolées, sélectionnées productrices de biosurfactants ont manifesté une excellente production de la biomasse bactérienne avec une réduction de la tension superficielle du milieu de culture.

Le glycérol ajouté comme source de carbone au milieu de culture à une concentration de 3 % a montré une importante production de rhamnolipides de 1,9 g/l et une production considérable de la biomasse bactérienne (2,7 g/l), ce qui explique que la production de la biomasse bactérienne est fortement liée à celle des rhamnolipides. Des travaux antérieurs réalisés par **Syldatk et al., (1987)** ont indiqué que la présence des substrats hydrophobes dans le milieu de culture ont favorisé la production des biosurfactants. Le processus de formation des micelles est impliqué dans la pénétration de ces substrats à travers la paroi et la membrane bactérienne pour les dégrader.

Par ailleurs, **Edward et al., (1994)** ont rapporté que les rhamnolipides produits interviennent dans la solubilisation des différentes molécules hydrophobes telles les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), captées par les micelles formées, en augmentant la solubilité des polluants présents dans l'environnement.

**Banat, et ses collaborateurs (1991, 1995)** ont rapporté que l'utilisation des sources de carbone facilement assimilables par les bactéries a contribué à la réduction considérable de la production des biosurfactants. **Desai et Banat, (1997)** ont publié que la présence de source d'azote



et les sels minéraux dans le milieu de culture affectent considérablement la quantité des biosurfactants produits. Des études antérieures ont été réalisées sur l'effet de limitation de la source d'azote sur la stimulation de la production des biosurfactants chez certains microorganismes (**Suzuki et al., 1974 ; Gerra Santos et al., 1987**).

Dans le but d'optimiser la production de biosurfactants chez *Pseudomonas aeruginosa*, différentes sources d'azotes tels que l'extrait de levure et de viande, la peptone et la farine de Soja ont été ajoutées au milieu de culture. Les résultats obtenus ont montré qu'une importante production des rhamnolipides (1,9 g/l) a été observée, lors de l'ajout d'une concentration de 0.5 % d'extrait de levure au milieu de culture contenant 3% du glycérol comme source de carbone. Par ailleurs, l'ajout de la farine de Soja et la peptone comme sources d'azotes au milieu de culture de fermentation à une concentration de 0.5 % ont montré une production de rhamnolipides de (1,6 et 1,2 g/l) respectivement.

**Moussa et al., (2006)** ont rapporté que l'ajout de l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium à un milieu de culture minimal en présence d'une source de carbone a montré un taux de production de biosurfactants de 1.7 g/l chez différents microorganismes.

**Rikalović et al., (2012)** ont rapporté que la culture *P. aeruginosa sanatei* dans un milieu de culture contenant une concentration de 2,25% de peptone et 3,5 % de l'huile d'olive a manifesté une importante production de des biosurfactants de 1,59 g/l.

La production de biosurfactants est fortement liée à la composition du milieu de culture en sels minéraux tels que le potassium, le phosphore, le sodium, le magnésium, le calcium, le chlore et en oligo-élément, qui interviennent dans l'accélération des activités enzymatiques.

**Rosenberg et al., (1989)** et **Wei et Chu, (1998)** ont constaté que l'ajout des sels minéraux dans le milieu de culture augmente considérablement la production des biosurfactants accompagnée avec une amélioration de la croissance bactérienne.

La température et le pH sont des facteurs très importants dans le processus de fermentation et de production des biosurfactants. Pour obtenir un bon rendement en biosurfactants, il est nécessaire d'optimiser les conditions de culture par le changement des valeurs de ces deux facteurs physiques.

Les résultats obtenus ont montré qu'une haute production des rhamnolipides est observée dans un intervalle de température entre 30°C et 40°C, avec un taux maximale de 1,9 g/l de rhamnolipides et 3,2 g/l en masse bactérienne séché à une température de 30°C.

**Priya et Usharani (2009)** et **Moussa et al., (2014)**, ont cultivé une souche *P. aeruginosa* dans un milieu de culture à base de sel minérales pour explorer l'influence de la température sur la production des rhamnolipides. Ils ont constaté que la production des biosurfactants a été augmentée à une température de 25 à 30°C et reste constante à un niveau maximal entre 30°C à

37°C, alors qu'une diminution légère de taux de production a été enregistrée à une température de 40°C.

**Abu-Ruwaida et al., (1991)** ont trouvé qu'une production optimale de biosurfactant par la souche *Rhodococcus. sp* est enregistré à une température de 37°C.

D'autre côté, le pH, qui constitue un facteur importants dans l'action des rhamnosyltransferases, les enzymes responsable de la synthèse des rhamnolipides (**Irfan et Asif, 2011**), a influencé considérablement la production des rhamnolipides.

La souche *P. aeruginosa NF5* a manifesté une haute production (1,9 g/l) de biosurfactants à un pH de 7 et une température de 30°C, une chute de production est observée à des pH supérieurs de 7, alors qu'une production minimale est enregistrée dans les milieux acides. La souche *P. aeruginosa NF5* a excrété les biosurfactants d'une manière très accélérée dans les conditions de cultures neutres.

Ces valeurs sont conformes à celles rapportées par (**Priya et Usharani, 2009 ; Praveesh et al., 2011 ; Moussa et al., 2014**), ils ont montré une production maximale des rhamnolipides par la souche *P. aeruginosa* à un pH 7. Par contre, **Yin et al., (2008)** ont isolée une souche *P. aeruginosa S6* à partir des déchets des huiles, ils ont arrivé à réduire la tension superficielle du milieu de culture à 33mN/m et à un pH 9 .

L'opéron Rhamnosyltransférase (*Rhl*) est un ensemble de gènes responsables de la régulation de la synthèse des biosurfactants de type rhamnolipides chez la souche *Pseudomonas aeruginosa*. L'enzyme RhamnosyltransféraseI (RhlAB) responsable de la synthèse des mono-rhamnolipides est constituée de deux sous unités protéiques RhlA et RhlB codées respectivement par les deux gènes *RhlA* et *RhlB*, alors que les di-rhamnolipides sont produites par l'enzyme RhamnosyltransféraseII (RhlC) codée par le gène *RhlC*. cette enzyme catalyse la réaction entre une molécule de mono-rhamnolipide et une de dTDP-L-rhamnose pour former une molécule de di-rhamnolipides (**Dubeau et al., 2009; Abdel-Mawgoud et al., 2011**).

La transcription de ces trois gènes est sous la régulation de deux autres gènes *RhlR* et *RhlIII* responsables des protéines inductrices qui activent leurs région promoteur et leurs transcription (**Rahim et al., 2001**).

La recherche des gènes responsables de la production des biosurfactants dans ce travail a révélé des résultats proportionnels avec les résultats de la caractérisation de ces molécules. L'amplification des fragments d'ADN de la souche *P. aeruginosa NF5* par les trois différentes amorces *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* a montré la présence de ces trois gènes responsables de la production des mono-rhamnolipides et di-rhamnolipides. Cependant, la souche *P. aeruginosa* sélectionnée non productrice de biosurfactants, le gène *RhlA*, n'a pas été apparu sur le gel d'électrophorèse, lors de son amplification par la technique de la PCR.

**Rahim et al., (2001)** ont rapporté que l'absence du gène *RhlA* empêche la production de tous types de rhamnolipides chez *P. aeruginosa PAO1*. Une seule sous-unité enzymatique produite par le gène *RhlB* est incapable de synthétiser des mono-rhamnolipides, alors qu'en absence de ce dernier, la Rhamnosyltransférase II codé par le gène *RhlC* ne produit pas les di-rhamnolipides.

*Conclusion*

De nombreux problèmes environnementaux affectent notre monde entier, et l'un des plus grands problèmes, c'est la gestion des déchets de l'industrie pétrolière.

Cependant, les effets dévastateurs de cette industrialisation et leur impact ont été évalués sur l'environnement. En effet, de nombreux dégâts réels ont été constatés lors des accidents (fuite de pétrole), de rejets ou de déversements volontaires, pouvant entraîner des catastrophes écologiques irréversibles. Les conséquences de ces pollutions écologiques, peuvent avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et sur l'équilibre des écosystèmes (**Gabet, 2004**).

L'objectif de cette étude est focalisé sur la recherche des souches productrices des biosurfactants. Dans un premier temps, les échantillons des sols pollués par les hydrocarbures prélevés à partir de borbier de la raffinerie d'ARZEW et la station des hydrocarbures à REMCHI ont subi des analyses microbiologiques.

L'isolement des différentes souches existantes dans le sol a abouti à l'identification de trois souches NF5, ZS1 et ZS4. Sur la base des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, la souche NF5 a été rapprochée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, la souche ZS1 correspond à l'espèce *Bacillus subtilis* et la souche ZS4 à *Bacillus cereus*.

La sélection des meilleures souches productrices de biosurfactants a été fondée sur leur grand pouvoir émulsifiant et sur la valeur minimale de la tension superficielle atteinte.

La culture de *P. aeruginosa NF5* sur un milieu de production en présence d'huile d'olive (30 g/l) et de l'extrait de levure (5 g/l) comme sources de carbone et d'azote a permis de produire une quantité importante de biosurfactants glycolipidiques avec une valeur de 2,7 g/l, capable de réduire la tension superficielle et ayant un bon index d'émulsion.

Le glucose et le sulfate d'ammonium avec des concentrations de 10 g/l et 0.1 g/l respectivement sont définis comme les substrats adéquats pour la production des Surfatinés par les souches du genre *Bacillus* avec une réduction de la tension superficielle à 37 mN/m.

L'ajout du glycérol comme source de carbone à des temps variables lors de la fermentation, augmente le rendement de production des rhamnolipides par la souche *P. aeruginosa NF5*.

L'étude moléculaire des gènes qui codent pour la synthèse des rhamnolipides a montré que la souche *P. aeruginosa NF5* a le pouvoir d'exprimer l'opéron responsable de la production de deux types d'enzymes essentielles à la biosynthèse de ces métabolites, la rhamnosyltransférase I codée par le gène *RhlAB* et la rhamnosyltransférase II codée par le gène *RhlC*.

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- L'isolement d'autres souches productrices des biosurfactants.

- Utilisation des déchets de l'industrie pour optimiser la production et donner des biosurfactants avec des faibles couts.
- Elargir l'étude sur les applications des rhamnolipides et des surfactines dans les domaines écologiques et médicales.
- Séquencer et identifier les gènes responsables de production des biosurfactants.

*Références bibliographiques*

## A

- Abdul A.A. Et Gibson T.L. (1999). Laboratory studies of surfactant-enhanced washing of biphenyl from sandy material, *Environ. Sci. Technol.*, 25, (4), 665-671.
- Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., Garcia F. et Manresa A. (2001). Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir.*, 17, (5), 1367- 1371.
- Abdel-Mawgoud A.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A.H. (2008). Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5 *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 150 pp. 305–325
- Abouseoud M., Maachi R et Amrane A. (2007). Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto S., Salem A. & Kadri, M. (1991). Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotechnologica* 11: 315-324.
- Araujo L.V., Abreu F., Lins U., Anna L.M.M.S., Nitschke M., Freire D.M.G. (2011). Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion *Food Research International*, 44 , pp. 481–488
- Arino S., Marchal R. et Vandecasteele J.P. (1996). Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 162-168.
- Asselineau C. et Asselineau J. (1978). trehalose containing glycolipids, *Prog.Chem. Ftas Lipids*, vol. 16, 59-99

## B

- Bai G., Brusseau M. L. et Miller R. M. (1998). Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon biosurfactant, *J. Contam. Hydrol.*, 30, 265-279.
- Banat I. M., Samarah N., Murad M.R. Horne., et Benerjee S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7:80–84.
- Banat, I.M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus* species. *Biotechnol. Lett.* 15 (6),591– 594.



- Banat I.M. (1995). Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation, *Bioresource Technology*, 51, 1-12.
- Banat M., Makkar R.S. et Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
- Benincasa M et Accorsini F. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *BioresourceTechnology*, 99 : 3843–3849.
- Bernheimer A.W., Avigad L.S., (1970). Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 61, 361–369.
- Bettahar M., Schafer G. et Baviere M. (1999). An optimized surfactant formulation for the remediation of diesel oil polluted sandy aquifers, *Environ. Sci. Technol.*, 33, (8), 1269-1273.
- Bodour A., Miller-Maier R. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods.* 32(3):273–280.
- Bodour, A.A., Drees, K.P et Maier, R.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), 3280–3287.
- Bognolo G. (1999) Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152, (1-2), 41-52.
- Bosch M.P., Robert M., Mercade M.E., Espuny M.J., Parra J.L et Guinea J., (1988). Surface-active compounds on microbial cultures. *Tenside Surfactants Deterg.* 25, 208–211.
- Bouissac J. (2005). Rôle de la voie Notch dans la spécification des cellules souches neurales et dans la différenciation des précurseurs neuraux. Utilisation du système modèle des neurosphères, neurosciences. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur.

## C

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

- Canter N. (2004). The benefits of rhamnolipids biosurfactants. *Tribol Lubr Technol.*, 60 (12):13-15.
- Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S.J., Giulietti A.M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 82– 84.
- Champion J.T., Gilkey J.C., Lamparski H., Retterer J. et Miller R.M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane, *J. Environ. Qual.*, 24, 19-28.
- Chen C., Baker S et Darton R. (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J Microbiol Methods.* 70:503–510.
- Christofi N. et Ivshina I.B. (2002). A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation, *Journal of Applied Microbiology*, 93, 915-929.
- Čipinytė V., Grigiškis S., Šapokaitė D et Baškys E. (2011). Production of biosurfactants by arthrobacter sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment. Technology. Resources.* ISBN 97 8-9984-44-070-5.
- Cochis A., Fracchia L., Martinotti M. G., Rimondini L. (2012). Biosurfactants prevent in vitro *Candida albicans* biofilm formation on resins and silicon materials for prosthetic devices. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.* 113(6):755–761. doi: 10.1016/j.oooo.2011.11.004.
- Cooper De et Goldenberg B. (1987). Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 53(2):224–229.
- Cooper D.G., Liss S.N., Longay R. et Zajic J.E. (1989). Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*, *J. Ferment. Technol.*, Vol. 59, 97-101.
- Cooper D.G. et Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactants from *Torulopsis bombicola*. *App. Environ. Microbiol.*, Vol.47, 173-176.
- Cutler A. J. and Light, R. J. (1979). Regulation of hydroxydocosanoic and sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the level of Glucose and yeast extract in the growth medium. *J. Biol. Chem.*, 254: 1944-1950.

## D

- Daniel H. J., Otto R. T., Binder M., Reus M., Sylđatk C. (1999). Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 40–45 10.1007/s002530051360
- Das M., Das S., Mukherjee R. (1998). Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. *Bioresour Technol.* 63(3):231–235.
- Desai J.D et Banat I.M. (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. Vol. 61, No. 1, p. 47–64.
- Deschenes L., Lafrance P., Villeneuve J.-P. et Samson R. (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 638-646.
- De Vos A., De Stobbeleir K et Meganck A. (2009). The relationship between career-related antecedents and graduates' anticipatory psychological contracts. *Journal of Business and Psychology*, 24(3), 289-298.
- Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F. et Bisailon J.-G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons, *Applied Environ. Microbiol.*, 62, (6), 1908-1912.
- Dubeau D., Deziel E., Woods D. E., Lepine F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiol.* 9:263. 10.1186/1471-2180-9-263.

## E

- Eder C. Santos, Rodrigo J.S. Jacques, Fa'tima M. Bento, Maria do Carmo R. Peralba Pedro A. Selbach, Enilson L.S. Sa', Fla'vio A.O. Camargo, 2007. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 1 -6.
- Edwards D. A., Adeel Z. et Luthy R.G. (1994). Distribution of non-ionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (8), 1550-1560.

## F

- Fiechter A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, 10, 3-12.
- Ferraz, A.A., De Arújo and. Pastore G.M. (2002). Applied Biochemistry and Biotechnology, 100, 841.

## G

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

## H

- Hommel R.K., Stegner S., Weber L. et Kleber H.P. (1994). Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 192-197.
- Haba E., Espuny M.J., Busquets M. et Manresa A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 379-387.
- Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R. et Manresa A. (2003). Physicochemical Characterization And Antimicrobial Properties Of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81, (3), 316-322.
- Haigh S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil, *The Science of the Total Environment*, 185, 161-170.
- Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R. (1996). Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*, 18, 41-57.

## I

- Inoue S. Et Itoh S. (1987). Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactant in Alkane fermentation, *biotechnol. Let.*, vol. 4, 199-205.
- Irfan Maqsood M. et Asif J. (2011). Factors affecting Rhamnolipid biosurfactant production. *Pak. J. Biotech.* 8 (1): 1-5.

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

## J

- Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H. et Trevors J.T. (1991). A dropcollapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 13, 271-279.
- Joffin J.N., Leyral G. (2006). *Microbiologie Technique, tome2 : documentation technique, collection biologie technique*. Ed. Doin, CRDP Aquitaine. 363p.

## K

- Kappeli O. et Finnerty W. R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol*, 140:707–712.
- Karickhoff S.W., Brown D. S., Scott T. A. (1979)- Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.*, 13, pp. 241-248.
- Kaya T., Aslım B., Kariptaş E. (2014). Production of biosurfactant by *Pseudomonas* spp. isolated from industrial waste in Turkey. *Turk J Biol* 38: 307–317.
- Koch A.K., Käppeli O., Fiechter A. et Reiser J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants, *Journal of Bacteriology*, **173**, (13), 4212-4219.
- Knoche H.W et Shively JM. (1972) The structure of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J Biol Chem*. Jan 10;**247**(1):170–178.

## L

- Lang S. et Wullbrandt D. (1999). Rhamnolipid biosynthesis – Microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 22-32.
- Loncle V., Casetta A., Buu-Hoi A. et El Solh, N. (1993) Analysis of pristinamycin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates responsible for an outbreak in a Parisian hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2159–2165.
- Lovaglio R. B., dos-santos F. J., Junior M. J., Contiero J. (2011). Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301–305.

## M

- Makkar R.S et Cameotra S.S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 37– 42.
- Makkar R.S et Cameotra, S.S. (1998). Biosurfactant production at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20, 48– 52.
- Makkar R.S. Et Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.
- Manresa M.A., Bastida J., Mercadé M.E., Robert M., De Andrés C., Espuny M.J. Et Guinea J. (1991). Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 133-136.
- Marahiel, M. A., Danders W., Krause M. et Kleincauf H. (1979). Biological Role of Gramididine S in Spore Function. Studies on Gramicidine-S negative Mutants of *Bacillus brevis* ATCC9999is. *European Journal of Biochemistry.* 99-1; (49).50.
- Marchal N, Bourdon .JL et Richard C. (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin, Paris.
- Mata-Sandoval J.C, Karns J. Et Torrents A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci. Technol.*, 34, (23), 4923-4930.
- McCray J.E., Bai G., Maier R.M., Brusseau M.L. (2001). Biosurfactant-enhanced solubilization of NADL mixtures. *J. Contam. Hydrol.*, 48(1-2): 45-68.
- Mercade M.E. et Manresa M.A. (1994). The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, *J.A.O.C.S.*, 71, (1), 61-64.
- Morikawa M., Hirata Y et Imanaka T.A. (2000) study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta.* 1488(3):211–218.
- Moussa T.A.A., Ahmed A.M., Abdelhamidm S.M.S. (2006). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *J. Appl. Sci. Res.* 2:844– 850.
- Mulligan C., Cooper D et Neufeld R. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *J Fermentation Technol*;62(4):311–314.
- Mulligan C.N., Young R.N. et GIBBS B.F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60, 371-380.

- Milton J. Rosen. (2004). Surfactants and Interfacial Phenomena. 3rd Edition. ISBN: 9780471478188.
- Mulligan C.N., Sharma S.K et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants research trends and applications. International standard book number: 13:978-1-4665-1724-4-7.

## N

- Neu T.R., Poralla K. (1990). Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 521–525.
- Noha H.Y., Kathleen E. D., David P. N., Kristen N. S., Roy M. K et Michael J. M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of Microbiological Methods 56, 339– 347.
- Noordmans J et Busscher H.J. (1991). The influence of droplet volume and contact angle on liquid surface tension measurement by axisymmetric drop shape analysis by profile. Colloids Surf. 58,239–249.
- Noordman W.H., Wachter J.H.J .(2002). The enhancement by surfactants of hexadecane by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. J Biotechnol; 94:195-212.

## O

- Ochsner U. A., et Reiser J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6424–6428.
- Ongena M et Jacques P. (2008). *Bacillus lipopeptides*: Versatile weapons for plant disease biocontrol, Trends Microbiol. 16 115–125.

## P

- Page C.A, Bonner J.S, Kanga S.A, Mills M.A Et Auteurieth R.L. (1999). Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons, *Environmental Engineering Science*, 16, (6), 465-474.
- Parra J.L., Guinea J., Manresa M.A., Robert M., Mercadé M.E., Comelles F. Et Bosch M.P. (1989). Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S.*, 66, (1), 141-145.
- Patel R. M. et Desai A. J. (1997). Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.

- Pereira J.F.B., Gudiña E. J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A. , Coutinho J.A.P et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259–268.
- Peypoux F., Bonmatin J. M., and Wallach J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 553–563.
- Plaza G., Zjawiony I et Banat I. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated bioremediated soils. *J Petro Science Eng.* 50(1):71–77.
- Pore J. (1992). *Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples*, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.
- Praveesh, B.V., Soniyamby, A.R., Mariappan, C., Kavithakumari, P., Palaniswamy, M., and Lalitha, S. (2011). “Biosurfactant Production by *Pseudomonas* Sp from Soil Using Whey as Carbon source. *New York Sci. Journal* 4(4):99-103.
- Priya T., & Usharani G. (2009). Comparative study for Biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Botany Research International*, 2(4):284-287.

## R

- Rahim R., Ochsner UA., Olvera C., Graninger M., Messner P., Lam JS., Sobero'n-Chavez G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnolipin transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40:708–718
- Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Käppeli O. Et Fiechter A. (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51, (5), 985-989.
- Rikalović M.G., Cvijović G.G., Vrvic M.M., Karadžić I. (2012). Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. *J Serb Chem Soc* 77 (1): 27–42
- Robert M., Mercadé M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. Et Guinea J. (1989). Effect of carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, *Biotechnology letters*, 11, (12), 871-874.
- Ron E.Z. et Rosenberg E. (2002). Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*, 3, 249-252.



- Rosen J. (1978). Surfactants and interfacial phenomena. ISBN 0471736007. New York : Wiley, c1978
- Rosenberg E., Schwartz Z., Tenenbaum A., Rubinovitz C., Legmann R., et Ron E. Z. (1989). A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersant in grinding limestone and making paper. *J. Dispersion Sci. Technol.* 10:241–250.

## S

- Saadat A., Roozbehani B., Jaafarzadeh N. (2013). Production of Biosurfactants from Oil Sludge Using Isolated Pseudomonas. *Journal of Environmentally Friendly Processes*; ISSN: 2328-1383 Volume 1, Issue 2.
- Shaikh R.A., Banani R.C., Prajna M et Sisir R. (2013). Screening and Characterization of Biosurfactants Producing Microorganism from Natural Environment (Whey Spilled Soil). *Journal of Natural Sciences Research* : ISSN 2224-3186 .Vol.3, No.13
- [Sharma D.](#), [Saharan B.S.](#), [Chauhan N.](#), [Bansal A.](#), et [Procha S.](#) (2014). Production and Structural Characterization of *Lactobacillus helveticus* Derived Biosurfactant. *ScientificWorldJournal*. 2014: 493548.
- Shete A. M., Wadhawa G., Banat I. M., Chopade B. A. (2006). Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. *J. Sci. Ind. Res.* 65, 91–115 10.4172/2157-7463.1000133.
- Shinoda K. Et Fontell K. (1995). Ionic surfactants capable of being used in hard water, *Advances in Colloid and Interface Science*, 54, 55-75.
- Siegmund I., Wagner F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by Pseudomonas species during growth on mineral agar *Biotechnol Tech* 5:265.
- Somayeh V., Abbas A. S. et Nouhi A. S. (2008). Study the role of isolated bacteria from oil contaminated soil in bioremediation. *J Bacteriol*, 1365 : 678–707.
- Spoeckner S., Wray V., Nimtz M. et Lang S. (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 51: 33-39.
- Syldatk C et Wagner F. (1987). Production of Biosurfactants. In biosurfactants and biotechnology, surfactant science series, Vol 25. New York. PP 89-120.

- Suzuki T., Tanaka H et Itoh S. (1974). *Agric. Biol.Chem.*, 38: 557-563.

## T

- Tabatabaee A., Assadi M. M., Noohi A. A. et Sajadian V. A. (2005). Isolation of biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian J. Env. HealthSci. Eng.* 2: 6-12.
- Tahara Y., Yamada Y., Et Kondo K. (1976). A new lysin containing lipid isolated from *Agrobacterium tumefaciens*. *Agric. Biol. Chem.* 40:1449–1450.
- Tadros T. (2005). Adsorption of surfactants at the air/liquid and liquid/liquid interfaces. In: *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley VCH. 81–82.
- Thangamani S. Et Shreve G.S. (1994). Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environ. Sci. Technol.*, 28, (12), 1993-2000.
- Tuleva B., Christova N., Jordanov B. et al. (1993). (2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Z Naturforsch (C)* ;60(7-8):577–582.

## V

- Van DYKE M.I., COUTURE P., BRAUER M., LEE H. Et TREVORS J.T. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil, *Can. J. Microbiol.*, 39, 1071-1078.
- Vipulanandan C. et Ren X. (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant, *Journal of Environmental Engineering*, 126, (7), 629-634.

## W

- Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. (2005). Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27 : 146–154.
- West C.C et Harwell J.H. (1992). Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.*, 36, (12), 2324-2330.
- Willumsen P.A et Karlson U. (1997). Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7, 415– 423.

## Y

- [Yalçın E](#) et [Ergene A](#). (2010). Preliminary characterization of biosurfactants produced by microorganisms isolated from refinery wastewaters. [Environ Technol.](#) ;31(2):225-32.

- Yamane T. (1987). Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 64:1657–1662.
- Yin, H., Qiang, Y., Jia, J., Ye, H., Peng, H., Qin, N., Zhang, N., et He, B. (2008). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil –containing wastewater. *Process Biochemistry*, 44, 302-308.
- Yonebayashi H., Yoshida S., Ono K., Enomoto H. (2000). Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery process. *Sekiyu Gakkaishi* 43 (1), 59– 69.
- Youssef N., Duncan K., Nagle D. et al. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods*. 56(3):339–347.

## Z

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

*Annexes*

## Gélose au Cétrimide

- Peptone de gélatine:.....16,0 g
- Peptone de caséine:.....10,0 g
- Bromure de tétradonium (cétrimide):.....0,2 g
- Acide nalidixique:.....15,0 mg
- Sulfate de potassium:.....10,0 g
- Chlorure de magnésium.....1,4 g
- Agar:.....10,0 g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7.1

## Gélose King A

- Peptone dite "A" :.....20,0 g
- Glycérol :.....10,0 g
- Sulfate de potassium :.....10,0 g
- Chlorure de magnésium :.....1,4 g
- Agar purifié :.....12,0 g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7.2

## Gélose King B

- Peptone dite "B" .....20,0 g
- Glycérol .....10,0 g
- Hydrogénophosphate de potassium .....1,5 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté .....1,5 g
- Agar purifié .....12,0 g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7,2

### **Milieu VF (Viande-Foie)**

- Base viande foie : .....30,0 g
- Glucose : .....2,0 g
- Agar : .....6,0 g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7

### **Gélose nutritive**

- Extrait de viande .....1,0g
- Extrait de levure..... 2,0g
- Peptone .....5,0g
- Chlorure de sodium .....5,0g
- Agar..... 15,0g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7,4

### **Gélose de base au sang**

- Mélange spécial de peptones : .....23 g
- Amidon : .....1 g,
- Chlorure de sodium : .....5 g,
- Agar : .....10 g,
- Sang : du mouton.....50 mL.
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7,3

### **Gélose Cétrimide au bleu de Méthylène (CTAB)**

- Peptone de gélatine:.....16,0 g

- Peptone de caséine:.....10,0 g
- Bromure de tétradonium (cétrimide):.....0,2 g
- Acide nalidixique:.....15,0 mg
- Sulfate de potassium:.....10,0 g
- Chlorure de magnésium.....1,4 g
- Bleu de Méthylène.....0.005g
- Agar:.....10,0 g
- Eau distillée (QSP).....1000ml

pH 7.1

### Gélose Trypticase soja

- Peptone de farine de soja..... 3,0 g
- D(+)- glucose..... 2,5 g
- Peptone de caséine ..... 17,0 g
- Chlorure de sodium .....5,0 g
- Phosphate dipotassique .....2,5 g
- Eau (QSP).....1000 ml

pH 7,3

### Milieu de sels minéraux MSM1 pour *Pseudomonas*

- $K_2HPO_4$  .....1g
- $MgSO_4$  .....0.5g
- $KH_2PO_4$ ..... 0.5g
- $CaCl_2$  .....0.01g
- Source d'azote .....5g
- Source de carbone .....30g
- Eau distillée (QSP)..... 1000ml

pH 6.8

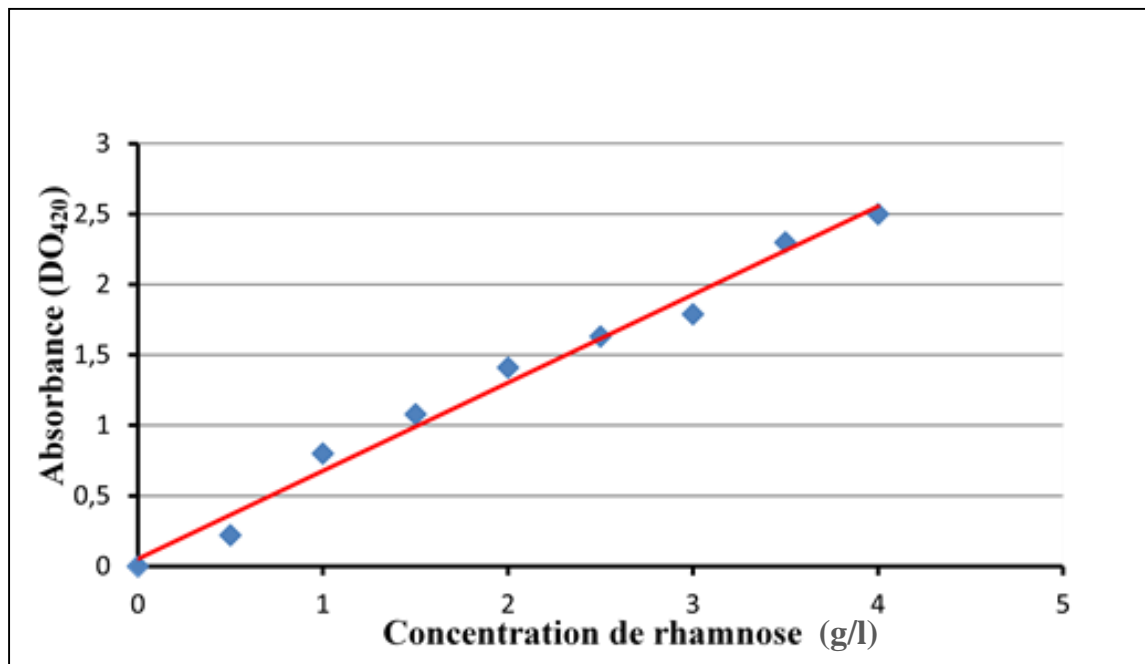
### Milieu de sels minéraux MSM1 pour *Bacillus*

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| • $NaNO_3$ .....0,1g | <b>Trace élément</b>  |
| • KCL.....0,1g       | • $FeSO_4$ .....0,1g  |
| • $KH_2PO_4$ .....3g | • $H_3BO_3$ .....0,2g |
|                      | • $CoCl_3$ .....0,4g  |
|                      | • $CuSO_4$ .....0,08g |

- $K_2HPO_4$ .....7g
- $CaCl_2$ .....0,01g
- $MgSO_4$ .....0.5g
- Trace élément .....5ml
- Glucose.....10g
- Eau distillée (QSP)..... 1000ml

**pH 7**

**Courbe d'étalonnage pour les rhamnolipides (rhamnose comme étalon).**





# Lecture de la galerie API 20<sup>E</sup>

| TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E |                                          |                                                                         |                 |                                                                                     |            |            |  |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--|
| Microtube                                             | Substrat :                               | Caractère recherché :                                                   | Révélateur      | Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)                                   | Résultat - | Résultat + |  |
| ONPG                                                  | ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside    | Beta galactosidase                                                      |                 | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| ADH<br>LDC<br>ODC                                     | Arginine<br>Lysine<br>Ornithine          | Arginine Dihydrolase<br>Lysine Décarboxylase<br>Ornithine Décarboxylase | Rouge de Phénol | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| LCIIJ                                                 | Citrate                                  | Utilisation du citrate                                                  | BBT             | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| H <sub>2</sub> S                                      | Thiosulfate de sodium                    | Production d'H <sub>2</sub> S                                           |                 | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| URÉ                                                   | Urée                                     | Uréase                                                                  | Rouge de Phénol | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| TDA                                                   | Tryptophane                              | Tryptophane désaminase                                                  |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III       |            |            |  |
| IND                                                   | Tryptophane                              | Tryptophanase ou production d'indole                                    |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter une goutte de réactif Kovacs                    |            |            |  |
| VPJ                                                   | Pyruvate de sodium                       | production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)                               |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2. Attendre 10 minutes     |            |            |  |
| GELJ                                                  | Gélatine                                 | gélatinase                                                              |                 | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| GLU à<br>ARA<br>= zymogramme                          | Substrat carboné (glucide)               | Utilisation de substrats carbonés (glucides)                            | BBT             | Lecture directe                                                                     |            |            |  |
| NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>                      | Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | Nitrate réductase                                                       |                 | <b>Lecture indirecte</b><br>Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement |            |            |  |

## Tampon TBE 10 x (Tris, Borate, EDTA) pour électrophorèse

- 107,8 g (89 mM) TRIS

- 55g (89 mM) Acide borique
- 05,8 g (2 mM) EDTA disodium salt
- Eau distillée (QSP)..... 1000ml

### **Tampon TBE 1 x pour électrophorèse**

- 100ml Tampon TBE x10
- 900ml eau distillée
- 30 µl BET Bromure d'éthidium

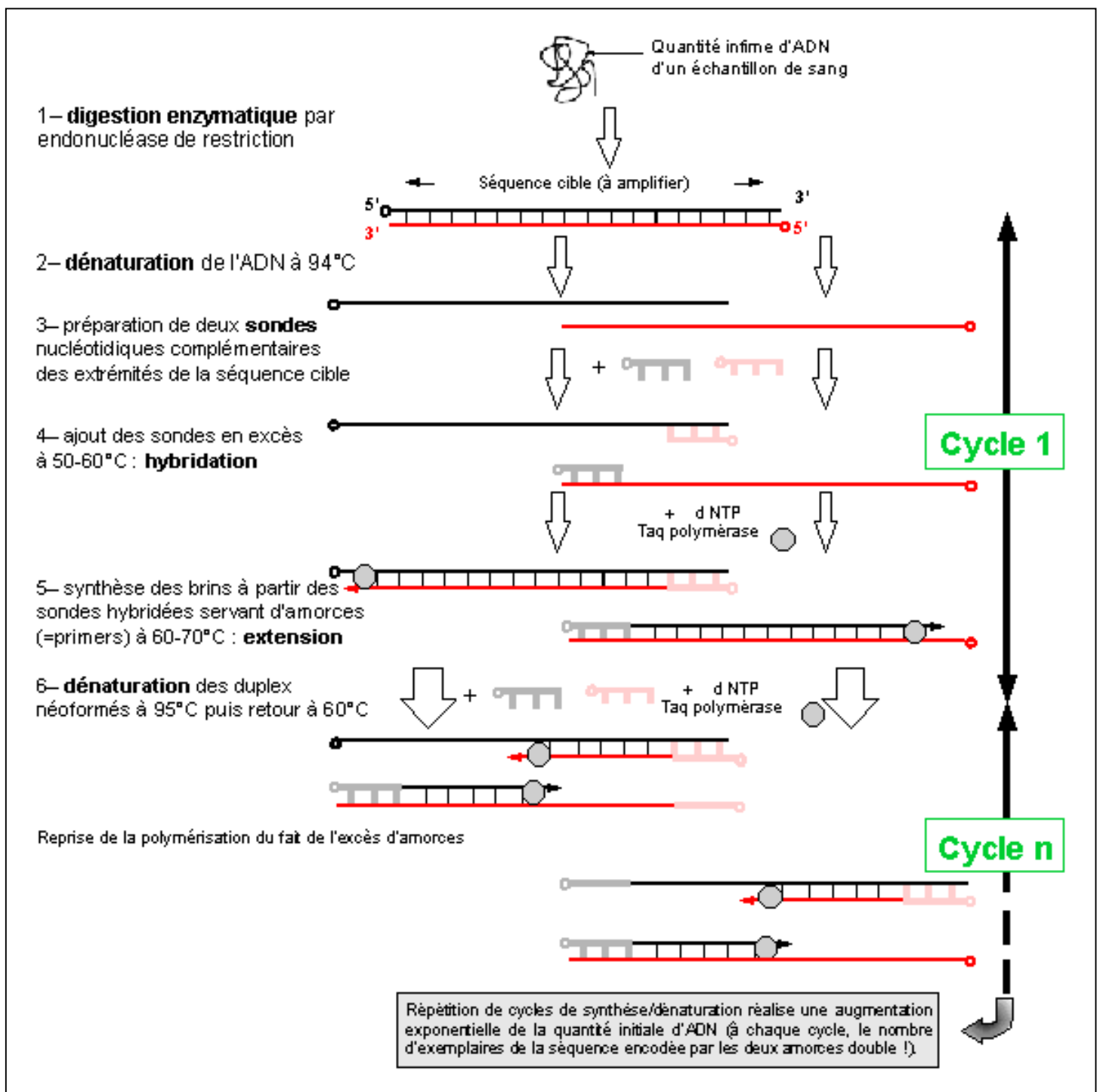
### **Tampon phosphate salin PBS (phosphate buffered saline)**

- 137 mM NaCl.....8g
- 2,7 mM KCl.....0,2g
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1,44g
- 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,24g

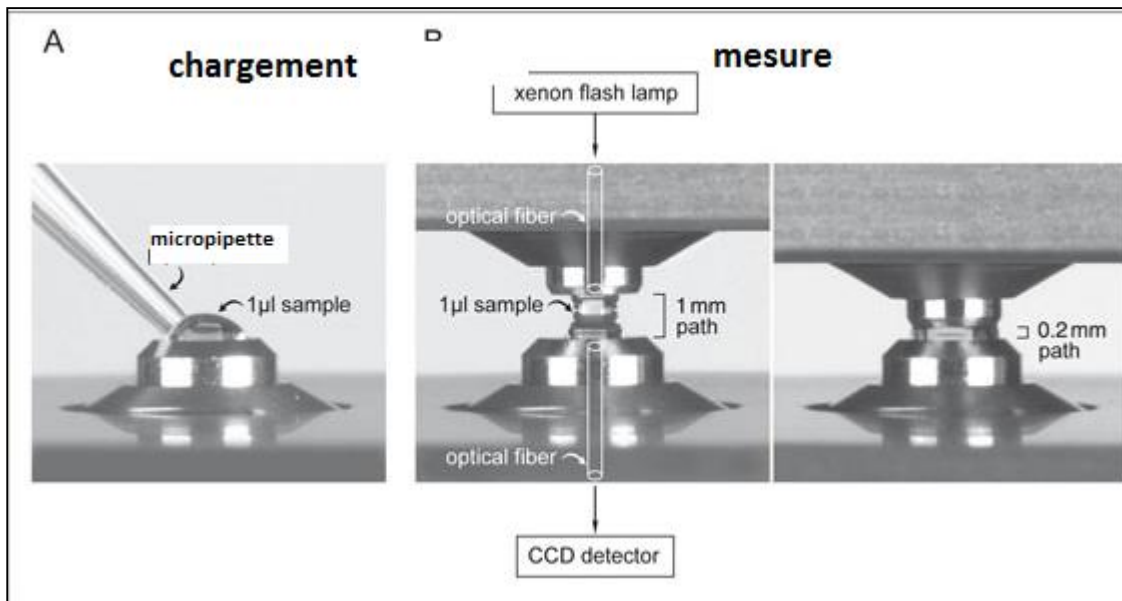
### **Preparation du gel d'agarose 1%**

- Tampon TBE 1 x .....50ml
- Agarose .....0.5g

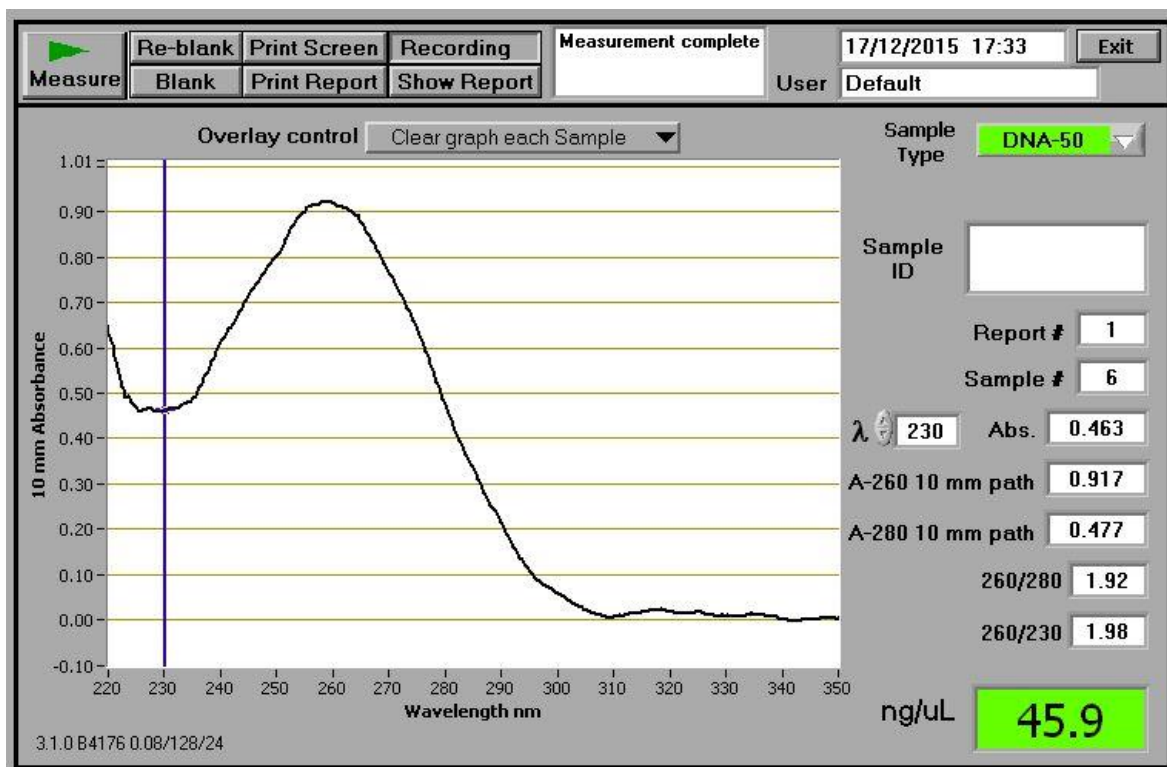
## Schéma de l'amplification de l'ADN par la méthode PCR



## La spectrophotométrie NanoDrop



## Résultat de dosage de l'ADN par spectrophotométrie NanoDrop



*Publication internationale*



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2015, 7 (8):42-48  
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



## Effect of carbon and nitrogen source on the microbial production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*

N. Cherif, A. Tifrit, K. Larbi Daouadji, S. Mezouari, Z. Chama and B. Abbouni<sup>1</sup>

Laboratory for Molecular microbiology proteomics and health. Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Djillali Liabès of Sidi Bel Abbès, Algeria.

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mascara.

---

### ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants substances produced by bacterial fermentation process of *Pseudomonas aeruginosa*, required for the remobilization of oil and used for fight against pollution. In the present study, 26 bacterial strains were isolated from soil and sewage of two different sites polluted by hydrocarbons, in which 3 selected strains producing Rhamnolipids belonging to the genus of *Pseudomonas aeruginosa* were purified, identified and used for further characterization. The secondary screening of the selected *Pseudomonas aeruginosa* revealed that one strain manifested a high performance for Rhamnolipids production. For the optimization of several parameters implicated in the biosurfactants production, five carbon sources such as olive oil, sunflower oil, glycerol, ethanol, corn germ and six nitrogen sources such as yeast extract, soybean meal, peptone, meat extract, urea, corn steep liquor has been investigated. The obtained results showed that the maximum Rhamnolipids production (2.7 g/l) was yielded by the using olive oil at a concentration of 3% as carbon source and 5 g/l of extract yeast as nitrogen source.

**Key words:** Rhamnolipids, *Pseudomonas aeruginosa*, polluted soils.

---

## INTRODUCTION

Microbiological derivative surfactants or biosurfactants are heterogeneous group of surface-active molecules produced by a wide variety of bacteria, yeast, filamentous fungi, which adhere to cell surface or excrete in the supernatant of the growth culture medium [1, 2, 3].

The biosurfactants with their both hydrophobic and hydrophilic moieties, are able to reduce the surface tension and interfacial tension between two fluids at the surface and the interface respectively. Furthermore, these are also able to form micro emulsion, where hydrocarbons can solubilise [4, 5, 6].

Recently, the environmental impacts caused by chemical surfactants due to their toxicity and difficulty encountered by their degradation in the environment become great emphasis.

The increasing environmental problems, the advance in biotechnology and the emergence of more stringent laws have led the utilisation of biosurfactants as a potential alternative to the chemical surfactants available on the market [7, 8, 9].

The advantages of biosurfactants were their lower toxicity, their biodegradability, their specific activity at extreme temperatures, pH and salinity. Furthermore, their production through fermentation process, their potential applications in environmental protection and crude oil recovery, their use as antimicrobial agents in health care and food processing industries [1, 15].

The mainly produced glycolipid biosurfactants as rhamnolipids (RLs) by *Pseudomonas aeruginosa* are the most intensively studied [25]. The first process of rhamnolipids production was observed at 1946, when Bergström and co-workers (1946) has reported that only glycolipid was produced by *Pseudomonas pyocyanea*, cultivated on the culture medium containing the glucose as carbon source. The biosynthesis process of rhamnolipids production was subsequently studied *in vivo* by using various radioactive processors such as <sup>14</sup>C-acetate and <sup>14</sup>C-glycerol [8].

The biosurfactants consist one of the most virulence factors contributing to the pathogenesis of *Ps. aeruginosa* infections due to their relatively high yields after relatively short incubation periods and their easy cultivation [13].

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

The used strains in this work belonging to the genus of *Ps. aeruginosa* was isolated from the most contaminated soils with diesel, in the region Remchi (Tlemcen), located in the North West of Algeria. The isolated strain was maintained on nutrient Broth agar slants, conserved at 4°C and subcultures were made every 2 weeks.

### Growth conditions

The used mineral salt culture medium (MS) in this study was containing the following components (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O (1.0) ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5) ; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.5) ; CaCl<sub>2</sub> (0.01) ; yeast extract (5.0); glycerol (30.0) as sole carbon source, pH 6.8. The bacteria strains were inoculated in a 250 mL flasks containing a volume of 100 mL of culture medium MS, incubated at a temperature of 30°C by stirring in a rotary shaker at 220 rpm for seven days. The bacterial growth was monitored by measuring of the optical density at a wavelength A<sub>600</sub>.

### Detection of biosurfactants activity

The obtained overnight culture medium from fermentation was diluted with fresh culture medium, plated on the cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB)-methylene blue agar, prepared by adding of 0.2 g CTAB, 0.005 g of

methylene blue, and 15 g agar in a volume of 1L of MS culture medium. The rhamnolipids producing colonies on CTAB agar plates, were identified by the formation of dark blue halos around the colonies on a light blue-plate background [6].

On others hand, the indirect way for the exploration of rhamnolipids producing colonies is based on their hemolytic properties, which the rhamnolipids producing strains was inoculated on blood agar plates. The Formation of a halo clear around the colony indicated the presence of RLs [8].

Furthermore, the drop collapsing test is a more sensitive method for the rapid screening of rhamnolipids producing colonies by various isolates [12]. This assay consists to apply a drop of bacterial culture supernatant over a plate covered with oil. The droplet will spread over the oil only if the culture supernatant sample contains RLs.

### Quantification of rhamnolipids

Rhamnolipids were purified by separating of the cells biomass from supernatant of the inoculated culture medium by centrifugation (12500 g) for 10 min at a temperature of 4°C. The recuperated supernatant of the culture medium was then acidified by the using 4 N hydrochloric acid adjusted to pH-value of 3.0, the precipitated rhamnolipids was collected by centrifugation (12000 g). After that, the RLs were extracted for three times with a chloroform-Methanol (1:1) mixture, which was then evaporated and leaving behind relatively pure Rhamnolipids having an oil-like appearance [26].

The extract fractions were further separated on thin-layer chromatography (TLC) by the using of aluminium silica gel 60 F<sub>254</sub> plates and a chloroform: methanol: distilled: water (65:25:4) solvent system. The RLs was visualized by the using the orcinol test [14]. The quantification of RLs has achieved by orcinol assay [5].

This test was used for direct assessment of the amount of glycolipid in the culture supernatant. For this purpose, a volume of 400 µl of solution containing 1,5 g of orcinol diluted in 100 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30%) was added to 200 µl of each sample with suitable dilution. After heating for 30 min at temperature of 80°C, the samples were cooled to room temperature and the DO<sub>420</sub> was measured. The RLs concentration was calculated from a standard curve prepared with L-rhamnose monohydrate and expressed as rhamnose monohydrate equivalents (RME) (mg/mL).

### Optimization of carbon and nitrogen source for biosurfactants production

In order to explore the effect of carbon and nitrogen sources on the Rhamnolipids production, the investigated carbon source in MS culture medium was replaced by using ethanol (30 g/L), corn germ (30 g/L), sunflower oil (30

g/L) and olive oil (30 g/L) and the used nitrogen source was also replaced by meat extract (5g/l), corn steep liquor (5g/l), urea (5g/l), soybean flour (5g/L) and peptone (5g/L) .

### Study of bacterial cell growth and rhamnolipids production

The Study of bacterial cell growth and rhamnolipids production were carried out at optimized culture conditions between inoculum of fresh overnight culture and 7 days old culture. In this experiment, variations in biomass and RLs production were recorded at different time intervals over a period of 7 days. Biomass was expressed as optical density (OD) of culture broth measured at 600 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Detection and quantification of the surface-active compounds

The haemolysis of blood agar was first used for the screening of the biosurfactant-producing bacteria [3] and the method of Moran and co-workers (2002) was applied for the quantification of the amount of the produced surfactin by *B. Subtilis*, where was demonstrated the presence of the biosurfactants caused the lyses of the red blood cells on the agar. The inoculated *P. aeruginosa* on blood agar shows remarkable hemolysis zones, However, the obtained hemolytic zone formation on blood agar plates is not only dependant on the produced RLs and may be affected by divalent ions and other hemolysins produced by the bacteria under investigation. The accumulation of the insoluble ion pair precipitate in the agar plate containing methylene blue exhibited dark blue color against the light blue background.



The obtained diameter of the dark blue region has been shown to be semi quantitatively proportional to the concentration of the Rhamnolipids [22, 24].

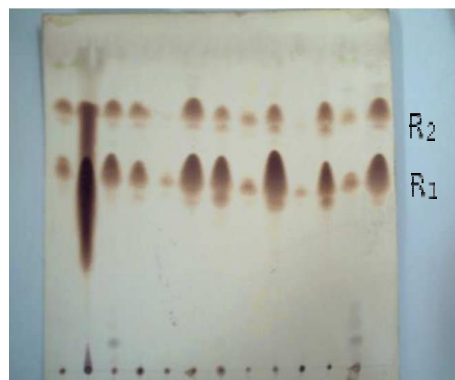
The colony manifested the largest dark blue halo was identified as *P. aeruginosa* and selected for further investigation. Jain and co-workers (1991) has suggested the drop collapse method as a sensitive and easy for the investigation of the biosurfactant production. However, the drop collapse technique was only applied as a qualitative method for detection of biosurfactant production [4].

The obtained results showed that the culture supernatants *P. aeruginosa* manifested permanent movement, explained by the presence of produced biosurfactants.

The excreted biosurfactants in the supernatant culture of *P. aeruginosa* are most probably a mixture of Rhamnolipids, the amphiphilic surface-active glycolipids [10, 23].

From 26 isolated strains belonging to the family of Pseudomonaceae, the highest displayed producing biosurfactant strain was selected and identified as *P. aeruginosa*.

Furthermore, the use of the thin-Layer Chromatography, has revealed the presence of two typical glycolipid spots after the orcinolsulfuric staining at  $R_f$  0.77 and 0.62 corresponding to the reference mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid from *P. aeruginosa* (Figure 1).



**Figure 1: Illustration of the thin layer chromatography of different broth in the presence of several carbon and nitrogen source, R1: di-rhamnolipid; R2: mono-rhamnolipid**

### Effect of carbon source on the RL production

The obtained results of the effect of several carbon source such as sunflower oil, olive oil, glycerol, ethanol and corn germ on the production of RLs by *P. aeruginosa*, inoculated in the MS culture medium is presented in Figure 2.

The histogram shows that the yield of RLs and bacterial dry weight are the highest by the using of olive oil as source of carbon (2.7 g/L and 3.93 g/L respectively) and glycerol (1.9 g/L and 3.45 g/L). Santa Anna *et al.* (2002) has reported that the use of glycerol yielded more Rhamnolipids than others used different oils. The use of glycerol as carbon sources for RLs production seems to be an interesting and low cost alternative [10, 11]. An important RLs production was achieved by the using of the sunflower oil (1.6 g/L) and ethanol (1.2 g/L), accompanied with a cell dry weight of 3.45 g/L and 0.63 g/L respectively.

Some reports showed that the used vegetable oils were more efficient substrates for Rhamnolipids production by *P. aeruginosa*, when compared with glucose, glycerol, and hydrocarbons [16,18]. Low Rhamnolipids production was obtained by the using of corn germ (0.5 g/L). Therefore, the glycerol was selected as the optimal carbon source. The use of vegetable oil and glycerol as carbon sources for Rhamnolipids production seems to be an interesting and low cost alternative [21].

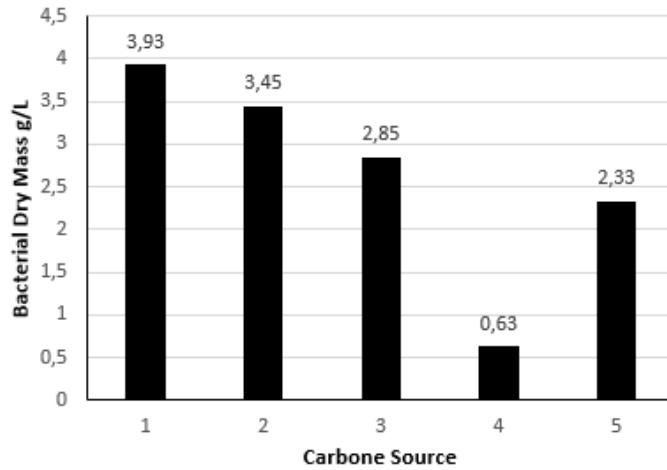


Figure 2: Effect of carbon source such as 1olive oil (1), sunflower oil (2), glycerol (3), ethanol (4), corn germ (5) on the production of Rhamnolipids by *P. aeruginosa*

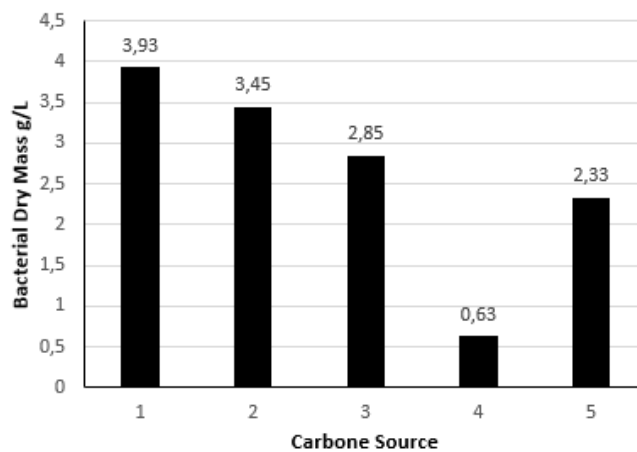


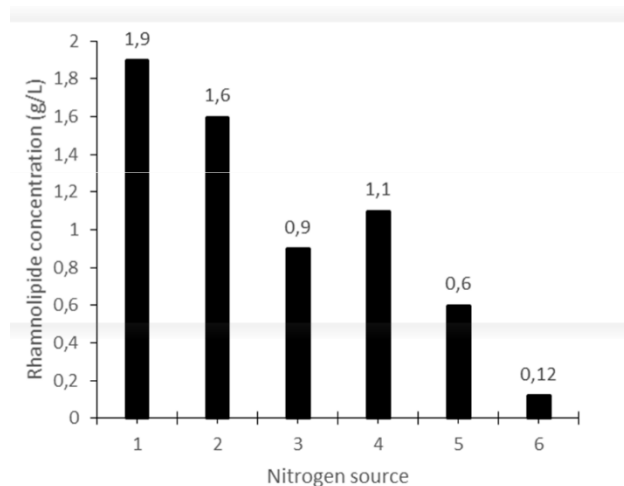
Figure 3: Effect of carbon source such as olive oil (1), sunflower oil (2), glycerol (3), 4-ethanol (4), corn germ (5), on the bacterial dry weight of *P. aeruginosa*

### Effect of nitrogen source on the production of RLs

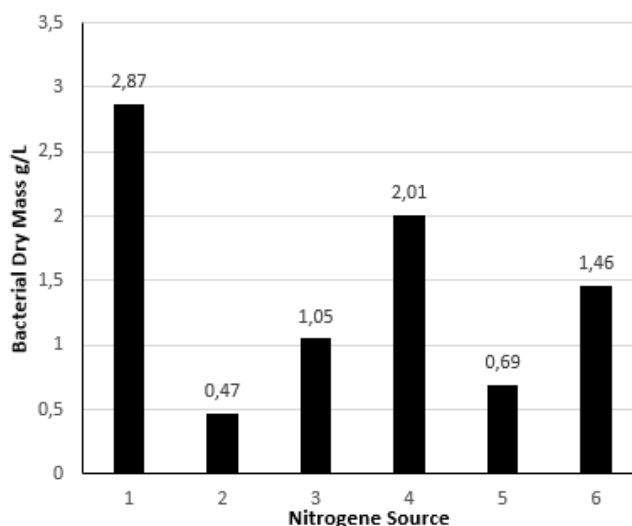
The use of MS culture medium supplemented with glycerol as a source of carbon and six several nitrogen sources such as meat extract, yeast extract, soybean flour, peptone and corn steep liquor, their effect on the RLs production by *P. aeruginosa* has been investigated.

The obtained results (Figure 4) in the presence steep liquor and meat extract as unique nitrogen sources indicated that these sources were not suitable for an optimal RLs production with a rate of 0.12 g/L and 0.6 g/L respectively.

The Figure 4 showed that the highest RLs production and cell dry weight were achieved by the using of yeast extract (1.9 g/L and 2.87 g/L) respectively. However, the use of soy flour yielded a rate of biosurfactants of 1.6 g/L, and 0.45 g/L of cell dry weight. The produced RLs in the supplemented MS culture medium on peptone and urea was low. Whereas, the yeast extract was the best nitrogen source for growth and RLs Production. Therefore, the yeast extract was selected as the optimal nitrogen source.



**Figure 4: Effect of nitrogen source such as yeast extract (1), soy flour (2), 3-peptone (3), urea (4), 5-meat extract (5), corn steep liquor (6) on the production of Rhamnolipids by *P. aeruginosa***



**Figure 5: Effect of nitrogen source such as yeast extract (1), soy flour (2), 3-peptone (3), urea (4), 5-meat extract(5), corn steep liquor (6) on the bacterial dry weight of *P. aeruginosa***

### Bacterial cell growth and Rhamnolipids production

The RLs Production was high yielded by some microorganisms, especially *Pseudomonas spp* [17]. The obtained results indicated the profile of bacterial growth and RLs production in the fermentation medium containing glycerol as carbon source and yeast extract as nitrogen source (Figure 6). The exponential phase extended up to 10 hours, where RLs production and bacterial cell growth was found to be normal. This observation suggests that the produced biosurfactants in the culture broth is a secondary metabolite [7]. During the stationary phase of cell growth, the RLs production increased at a higher rate and maximum product accumulation occurred after 40 h of cultivation (1.9 g/L). After 40h incubation, the concentration of RLs was dropped, may be due to the degradation of these molecules.

Rhamnolipids yield was then calculated by a coefficient of 3.4 obtained from the correlation of pure rhamnolipids/rhamnose (1.0 mg of rhamnose corresponds approximately to 3.4 mg of RLs) [20]. The RLs production is typical secondary metabolite and increased considerably in the stationary phase.

The obtained results of the inoculation of *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation medium in the absence of a carbon source, showed a feeble bacterial cell growth, accompanied with the low yield fall of RLs production during the first 24 hours (Figure 7).

The addition of glycerol at a concentration of 3% in the fermentation medium after 24 hours incubation times indicated that the bacterial cell growth accelerated and the RLs production rate was triggered and reached a high rate of 1.79 g/L at the 60<sup>th</sup> hours. From the 3<sup>rd</sup> day, the bacterial cell growth reached the stationary phase and the RLs production decreased to a level of 0.7 g/L in the 96<sup>th</sup> hours.

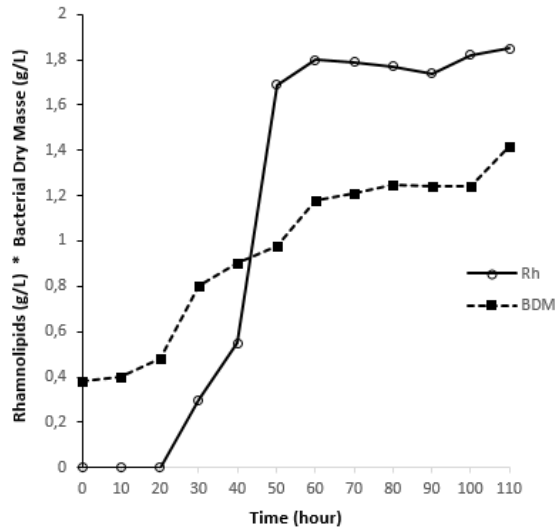


Figure 6 : Bacterial growth of *Ps. aeruginosa* and Rhamnolipids production in the presence of 3% of glycerol, incubated at a temperature of 30°C by stirring in a rotary shaker at 220 rpm for 110 hours

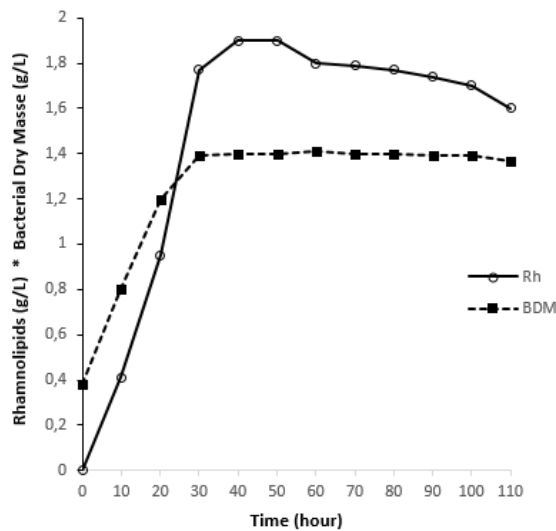


Figure 7: Bacterial growth of *Ps. aeruginosa* and Rhamnolipids production in the presence of 3% of glycerol for 24<sup>th</sup> and 1% for 100<sup>th</sup> hours

## CONCLUSION

The isolated strain from contaminated soil was identified as *Pseudomonas aeruginosa*, it is capable of effectively producing Rhamnolipids by the using several carbon and nitrogen sources. Furthermore, the identified strain has manifested a important potential for the biosurfactants production and the application in bioremediation of oil pollutants. Among the five investigated carbon and six nitrogen sources, the used olive oil and glycerol was presented as the most efficient carbon sources, whereas the yeast extract as the best nitrogen source for Rhamnolipids production. The optimization of several parameters implicated in the RLs production in batch cultures indicated that optimum of temperature, pH-value and agitation rate were 30°C, pH 6,8 and 220 rpm, respectively.

Furthermore, the TLC analysis of the RLs showed that the purified product contained mono-rhamnolipids and di-

rhamnolipid.

In conclusion, the biosurfactant produced by *P. aeruginosa* could be used for potential application in bioremediation of crude oil contamination. Whereas, Rhamnolipids produced by *Ps. aeruginosa* presented a great potential for biotechnological and biopharmaceutical applications, due their biological properties. Further studies should be done for the characterization of the chemical structure and cellular toxicity of these compounds.

## Acknowledgement

We would like to express my sincere thank to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the financial support to Mr. Harrachi Abdelkader for providing us with the bacterial strains and to Prof. Dr. Mohamed Benali, Director of Laboratory for Biototoxicology, for your encouragement, your support and your useful discussion. Without the kind cooperation of the above mentioned people the work could not have been possible.

## REFERENCES

- [1] IM Banat ; RS Makkar ; SS Cameotra. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2000**, 53(5), 495-508. [2] S Bergström ; H Theorell ; H Davide. *Arkiv Chem Mineral Geol.*, **1946**, 23A(13):1–12.
- [3] AW Bernheimer; LS Avigad. *J Gen Microbiol.*, **1970**, Jun; 61(3):361–369.
- [4] AA Bodour ; KP Drees ; RM Maier. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2003**, 69 (6), 3280–3287.
- [5] EV Candrasekaran ; JN Bemiller. Constituent analysis of glycosaminoglycans. In: Whistler RL, Wolfrom ML editors. *Methods in carbohydrate chemistry.*, New York: Academic Press Inc , **1980**, 89 – 96.
- [6] PG Carrillo ; C Mardaraz ; SI Pitta-Alvarez ; AM Giulietti. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **1996**, 12: 82-84. [7] S Datta , S Sahoo ; D Biswas. *J AdvSci Res.*, , **2011**, 2(3): 32-36.
- [8] G Hauser ; ML Karnovsky. *J Bacteriol.*, **1954**, 68:645–654.
- [9] M Henkel , MM Müller ; JH Kügler; R B Lovaglio ; J Contiero ; C Syldatk. *Process Biochemistry.*, **2012**, 47(8), 1207-19.
- [10] K., Hisatsuka ; T Nakahara ; N Sano ; K Yamada. *Agric. Biol. Chem.*, **1971**, 35:686-692. [11] S Itoh ; H Honda ; F Tomita ; T Suzuki. *J. Antibiot.*, **1971**, 24:855-859.
- [12] DK Jain ; DL Collins-Thomson. ; H Lee ; JT Trevors. *J. Microbiol. Methods.*, **1991**, 13: 271-279. [13] F G Jarvis ; M J Johnson. *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71:4124-4126.
- [14] A K Koch ; O Kappeli ; A Fiechter ; J Reiser. *J. Bacteriol.*, **1991**, 173, 4212-4219. [15] N Kosaric. *Pure & Applied Chemistry.*, **1992**, 64:11, 1731, (1992).
- [16] RM Maier ; G S Chavez. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2000**, 54, 625-33.
- [17] S Maneerat. *J. Sci. Technol.*, **2005**, 27, 675-683.
- [18] JC.Mata-Sandoval ; J Karns ; A Torrents. *Microbiol. Res.*, **2001**, 155, 249-56. [19] AC Moran ; MA Martinez ; F Sineriz. *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 24,177–180.
- [20] AA Pantazaki ; M I Dimopoulou ; OM Simou ; AA Pritsa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 88 939-51.
- [21] LM Santa Anna; GV Sebastian ; E P Menezes ; T LM. Alves ; A S Santos., J .N. Pereira and D. M. G. Freire, *Braz. J. Chem. Eng.*, **2002**, 19, 159-166.
- [22] I Siegmund ; F Wagner. *Biotechnol. Tech.* ,**1991**, 5: 265-268.
- [23] C Syldatk ; S Lang; F Wagner ; V Wray ; L Witte. *Z. Naturforsch.*, **1985**, 40:51– 60. [24] A Tahzibi ; F Kamal ; MM Assadi. *Iran. Biomed. J.*, **2004**, **8**, 25-31.
- [25] JD Van Hamme ; A Singh ; OP Ward. *Biotechnology Advances.*, **2006**. 24(6), 604-20. [26] Y Zhang ; RM Miller. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1992**, 58:3276-3282.

## Résumé

La majorité des surfactants commercialement disponibles, sont dérivés du pétrole et présente un risque majeur pour l'environnement par leur toxicités et non biodégradabilités. Les biosurfactants principalement produits par les levures, les champignons, les bactéries se développent dans des conditions aérobies sur des milieux de cultures liquides contenant une source de carbone, telles que les hydrates de carbone, les huiles et les hydrocarbures. Dans ce présent travail, les sites de prélèvements ont été choisis sur la base de degré de contamination des sols par les hydrocarbures ou les déchets des huileries.

Le criblage primaire de 37 souches isolées, effectué sur la gélose au sang a permis l'isolement de, (08) huit souches qui sont sélectionnées productrices de biosurfactants, dont (06) six souches isolées à partir des sols pollués par les hydrocarbures au niveau de la raffinerie pétrolière d'ARZEW.

Le criblage secondaire réalisé par des tests de « Drop Collapsing », « Oil Displacement », la mesure de l'index d'émulsification et de la tension superficielle a permis la sélection de trois souches potentiellement productrices de biosurfactants.

L'identification macroscopique, microscopique et biochimique, des trois souches NF5, ZS1 et ZS4 sélectionnées productrices de biosurfactants a révélé leur appartenance aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, et *Bacillus cereus* respectivement.

Ensuite, l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de biosurfactants est effectuée sur un milieu de culture, composé principalement de sels minéraux et de sources de carbone et d'azote. Les résultats obtenus ont montré qu'une importante production des rhamnolipides est observée durant de la phase exponentielle chez la souche *P. aeruginosa* NF5, lors de l'ajout de l'huile d'olive (30 g/l) et l'extrait de levure (5 g/l) au milieu culture ajusté à une valeur de pH de 7, incubé avec une vitesse d'agitation de 150 rpm et à une température de 30°C.

Par ailleurs, une réduction considérable de la tensions superficielle à 37 mN/m est enregistrée chez la souche *B. subtilis* ZS1 lors de l'ajout du glucose (10g/l) et le sulfate d'ammonium (0.1 g/l) au milieu de culture comme source de carbone et d'azote.

**Mots clés :** Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, Rhamnolipides, Production.

## Abstract

The majority of commercially available surfactants are made from petroleum and presents a major risk to the environment and by their toxicities and biodégradabilités. The biosurfactants are mainly produced by yeast, fungi, bacteria that grow under aerobic conditions in liquid culture media containing a carbon source such as carbohydrates, oils and hydrocarbons.

The present work focused on bacteria that are distinguished by their ability to produce biosurfactants. These biomolecules have a preferred value in several areas including the sectors of environment, industry and medical sciences.

Thirty-seven strains has been isolated from various sites in particular polluted lands by hydrocarbons (petrol, diesel, oil) and waste from olive oil mill. After preliminary screening, eight strains present a haemolytic activity on blood agar, reflecting their ability to produce biosurfactants. In the second screening performed by "Drop Collapsing", "Oil Displacement" tests, measurement of emulsification index and surface tension, three strains showed a high production potential of these biomolecules. Following the results of macroscopic, microscopic and biochemical identification, these strains affiliated to the species *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*.

The study of the parameters influencing the production of biosurfactants was carried out by fermentation on a mineral salt medium. High rhamnolipids production was observed during the exponential phase with the strain *P. aeruginosa* NF5 using olive oil (30 g/l) and yeast extract (5 g/l) as carbon and nitrogen sources, and pH 7 with shaking at 150 rpm and a temperature of 30 ° C. Thus, a reduction in surface tension to 3.7 mN/m of the culture medium was observed with *B. subtilis* ZS1 when using glucose (10 g/l) and ammonium sulfate (0.1 g/l) as carbon and nitrogen sources.

**Keywords :** Biosurfactants, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, rhamnolipids, Production.

## ملخص:

اهتم هذا العمل بالبكتيريا المتميزة بقدرتها على انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي. هذه الجزيئات الحيوية لها أهمية كبيرة في عدة مجالات كالمجال البيئي والصناعي والعلوم الطبية. حوالي 37 سلالة تم عزلها من خلال عدة مناطق خصوصا الأثرية الملوثة بالمحروقات (بنزين، مازوت، بترول) ومخلفات معصرة زيتون.

بعد غربلة أولية، ثمان سلالات أظهرت نشاطا لتفكيك الدموي على هلام بالدم، الشيء الذي يفسر قدرتها على تصنيع الجزيئات ذات النشاط السطحي. من خلال الغربلة الثانية المحققة بواسطة اختبار ثبات القطرة، اختبار تشتت الزيت قياس مؤشر الاستحلاب والنشاط السطحي، ثلاث سلالات أظهرت قوة كبيرة في انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي.

تبعاً لنتائج الكشف المظهري والمجهري والبيوكيميائي، هذه السلالات الثلاث تم معرفة انتمائها الى الأصناف (*Pseudomonas aeruginosa*) و (*Bacillus subtilis*) و (*Bacillus cereus*)

دراسة العوامل المؤثرة على انتاج الجزيئات ذات النشاط السطحي. تم تحقيقها بتخمير في وسط به أملاح معدنية. انتاج غزير للجزيئات ذات النشاط السطحي لوحظ في المرحلة الأسية للسلالة *P. aeruginosa* NF5 باستعمال زيت الزيتون (30 غ/ل) و خلاصة الخميرة كمصدرين للكربون و الأزوت، و معدل حموضة يساوي 7، مع رج بقوة 150د و حرارة 30°م. كذلك انخفاض في الضغط السطحي الى 3.7 ملي نيوتن/م لوسط الزرع سجل عند السلالة *B. subtilis* ZS1 عند استعمال الغلوكوز (10 غ/ل) و كبريتات الامونيوم (0.1 غ/ل) كمصدري الكربون و الأزوت.

**الكلمات المفتاحية:** الجزيئات ذات النشاط السطحي، انتاج ، *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*,











