

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par : DELHOUM Djura.

Thème

**Caractérisation préliminaire de biosurfactant(s) secrété(s) par
Pseudomonas sp. et évaluation de deux effets : antibactérien et
stimulateur de croissance.**

Soutenu publiquement le : 25/09/2016.

Devant le jury :

Président : Mr OUELHADJ .A

Promoteur : Mr TAZDAIT .D

Co-Promoteur : Mme TAZDAIT .R

Examineur : Mme HELLAL .Z

Maitre de conférences A à l'UMMTO

Maitre de conférences B à l'UMMTO

Maitre de conférences B à l'UMMTO

Maitre assistante A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015/2016



Au nom d'Allah le clément, le miséricordieux,

Paix et Salam sur son prophète

LOUANGE A ALLAH,

L'éternel,

L'omniscient,

Le tout puissant.

Ta miséricorde est sur ceux qui espèrent en toi.

Tu as été, et tu es notre lumière dans les ténèbres de la vie.

*Guide nos pas sur le chemin qu'il nous reste à parcourir afin
que nous demeurions fidele à tes recommandations.*

Ouvres-nous les portes de ton savoir et de ta connaissance;

Certes tu es l'omniscient.

Amine.



Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon **DIEU** tout puissant de m'avoir aidée à réaliser ce modeste travail.*

*Je remercie très chaleureusement mon professeur et encadreur **Mr TAZDAIT. D.**, pour sa confiance, aide et pour son temps.*

Ce monsieur à qui j'exprime ma gratitude de m'avoir dirigée, encouragée et surtout aidée afin de réaliser ce travail.

*Je remercie mon Co-encadreur, Madame **TAZDAIT. R.**, pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apporté.*

*Je remercie l'ensemble du jury, Monsieur **OUELHADJ. A.**, Maitre de conférence A à l'UMMTO ; Madame **HELLAL. Z.**, Maitre assistante A à l'UMMTO ; qui ont bien voulu examiner ce travail.*

Je remercie tous les enseignants de mon cursus universitaire qui ont contribué à ma Formation.

*Je remercie le **Dr Cherffi** du laboratoire de recherche et d'analyse vétérinaire de DBK pour sa précieuse aide.*

*Je remercie **Mr Akouche** de la faculté des hydrocarbures et de chimie de Boumerdes « INH UMBB » pour sa précieuse aide.*

Mes vifs remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de microbiologie ainsi qu'à tous les laboratoires de l'université MOULOUD MAMMERI (UMMTO), pour leur aide, leur gentillesse et leur assistance.

Dans ces remerciements, je ne peux oublier mes amis pour leur amitié et leur appui constant pendant mes années d'études.

Je ne peux nommer ici toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidée et encouragée mais je les en remercie vivement. Mille fois merci à vous tous !!!

Une mention spéciale pour ma famille qui a toujours été présente la pour moi et qui ont su me supporter pendant ces années.

Enfin, il me serait si difficile d'omettre de remercier tous ceux qui ont contribué de pré ou de loin à ce travail. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de mes sincères remerciements.

Merci.



Dédicace

*Je tiens tout d'abord à remercier le bon **DIEU** de m'avoir aidée à réaliser cet ouvrage*

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance :

*A ma très chère mère **TASSADIT**:*

Je te dois l'essentiel de cette réussite, je suis consciente des énormes sacrifices que tu as consentis sans relâche pour m'éduquer et me permettre de gravir les échelons de notre société. Ton courage fait de toi, une femme d'une trempe bien rare. Je te remercie du plus profond de mon cœur, seul le bon Dieu saura te récompenser. Prions ensemble pour qu'il te garde encore longtemps auprès de nous.

*A mon très cher père **TAHAR** :*

Ta sagesse et ton courage ont toujours été sécurisant pour moi. Tu es aussi un travailleur exemplaire et infatigable. Avec tes modestes moyens, tu as toujours subvenu à nos besoins. Tu as rempli pleinement ton rôle de père. Ta persévérance m'a aidé à ne jamais me décourager. Que Dieu fasse que je continue à bénéficier longtemps encore de tes conseils.

*A mon adorable petite sœur **FATIHA**. Qui est toujours là pour moi, la voie t'est montrée. Que ce travail t'incite à faire mieux et aller plus loin. Tu peux toujours compter sur moi.*

A mes chers(es) et bien aimé grands-parents : Fatma, Ouerdia, Slimane.

A la mémoire de mon grand père qui n'a jamais cessé de nous encourager : Ahcène.

A mes chers cousins et cousines: Rémy, Amar, Zidane, Malik, Lyes, Amine, Ahcène, Abdeslam, Ahcène Katia et sa petite famille, Amal, Sabrina, Sara, Diana, Lila, Asia, Meriem, Chahinez, Wissam.

A mes oncles et tantes : Mohad, Hocine, Amirouche, Kamel, Mourad et leurs petites familles, Achour, Saïd, Akli, Ali ; Rosa, Djamilia, Zahia, Farida et leurs petites famille, Fadila, Nabila, Lamia.

*A **Hayat, Lamia et Wissam** :*

Qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessées de me soutenir et de m'encourager : jamais des simple mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements les plus profonds et les plus sincères mes très chères amies.

« Ôter l'amitié de la vie, ce qui reste est peu digne d'envie....L'amitié est ce trésor partagé »

Merci d'avoir toujours partagé avec moi les moments de joie et de peine, Recevez à ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble. J'espère sincèrement que notre amitié durera toute la vie.

A mes copains et copines de la promotion master II Biotechnologie microbienne

A tous mes amis(es): Ahmed, Rachid, Mourad, Ahmed ; Meriem, Melha, Ryna, Fatma, Racha, Sam, Jasmine, Rosasse, Sania.

A toute ma famille, A tous mes amis.

Ainsi qu'a tous ceux qui me sont chers.

Djura.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	III
Introduction générale	

Partie I : Etude bibliographique

CHAPITRE I : Les biosurfactants

Introduction	1
I. Présentation des différents biosurfactants.....	3
I.1. Définition	3
I.2. Propriétés et Classification.....	4
II. Production des biosurfactants	8
II.1. Paramètres influençant la production des biosurfactants	8
II.1.1. Influence de la source de carbone.....	8
II.1.2. Influence de l'azote.....	8
II.1.3. Influence du pH	9
II.1.4. Influence de l'âge de la culture.....	9
II.1.5. Influence des sels minéraux.....	9
II.1.6. Influence de l'oxygène	9
II.1.7. Influence de la vitesse d'agitation	9
II.2. Extraction des biosurfactants du milieu de croissance	10
II.3. Identification des biosurfactants	10
III. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants.....	11
III.1. Abaissement de la tension superficielle	11
III.2. Abaissement de la tension interfaciale	11
III.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)	11
III.4. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation	13
III.5. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température.....	14
III.6. Solubilisation des biosurfactants dans l'eau.....	15
III.6.1. La balance Lipophile-hydrophile ou HLB	16
IV. Sorption des biosurfactants sur les solides.....	17
IV.1. Mécanismes d'adsorption	18
IV.2. Paramètres influençant la sorption	19
V. Toxicité et biodégradabilité.....	19
VI. Applications	20
VI.1. Remobilisation des Hydrocarbures aromatiques polycycliques par l'utilisation des biosurfactants	20
VI.1.1. Modes d'action.....	20
VI.1.1.1. La mobilisation	21
VI.1.1.2. La solubilisation.....	21
VII. Avantage des biosurfactants	23

VIII. Application des biosurfactants	24
VIII.1. Application en industrie pétrolière	24
VIII.2. Application en industrie agroalimentaire	27
VIII.3. Applications en cosmétologie	27
VIII.4. Applications pharmaceutiques	27

CHAPITRE II : Les microorganismes producteurs

I. Microorganismes producteurs.....	30
I.1. Rôles des biosurfactants chez les microorganismes producteurs	32
II. Les rhamnolipides.....	33
II.1. Biosynthèse des rhamnolipides	36
II.2. Facteurs influençant la production des rhamnolipides	39
II.2.1. Source de carbone.....	40
II.2.2. Source d'azote	40
II.2.3. Conditions de culture	41
II.2.3.1. Le pH	41
II.2.3.2. La température	41
II.2.3.3. L'agitation	41
II.3. Rôles des rhamnolipides chez les <i>Pseudomonas</i>	42
II.3.1. Biodégradation d'hydrocarbures	42
II.3.2. Formation et maintien de biofilms.....	43
II.3.2.1. Cycle de développement du biofilm	43
II.4. Applications des rhamnolipides.....	44
III. Les <i>Pseudomonas</i>	49
III.1. Caractéristiques générales	49
III.2. Caractéristiques métaboliques	51
III.3. Classification du genre <i>Pseudomonas</i>	51
III.3.1. Etapes de la classification	52
III.3.2. Classification contemporaine	53
III.4. Distribution écologique	54

Partie 2 : Matériel et méthodes

CHAPITRE III : Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes	56
I.1. Matériel biologique	56
I.2. Milieux et conditions de culture	56
a) Milieux utilisés pour la production et la caractérisation de(s) biosurfactant(s)	56
b) Milieux utilisés pour l'entretien de la souche	56
I.3. Matériel physique (appareillage)	56
II. Méthodologie de travail	57
II.1. Revivification de la souche bactérienne	57

II.2. Ensemencement de la souche sur gélose nutritive.....	57
II.3. Repiquage des souches	57
II.4. Etude des caractères culturels de la souche.....	57
II.4.1. Etude macroscopique.....	57
II.4.2. Etude microscopique	58
II.4.2.1. Coloration de Gram	58
II.4.2.2. Réactifs	58
II.4.2.3. Mode opératoire.....	58
II.5. Préparation du milieu moût de dattes	59
II.5.1. Protocole de préparation	59
III. Caractérisation physico-chimique du moût de dattes	59
III.1. Mesure de la densité apparente du milieu moût de dattes.....	59
III.2. Mesure du taux de matière sèche (TMS)	60
III.3. Mesure du taux de cendres	60
III.4. Dosage des sucres réducteurs et des protéines	61
III.4.1. Dosage des sucres réducteurs (méthode à l'acide dinitrosalicylique)	61
III.4.1.1. Gamme d'étalonnage.....	61
III.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	61
III.4.2.1. Protocole.....	61
a) Préparation du réactif de Bradford	61
b) Préparation de la solution de BSA.....	62
c) Préparation des dilutions de la solution mère de BSA.....	62
d) Préparation de la gamme étalon.....	62
e) Mesure de la concentration d'un échantillon inconnu	62
III.5. Test d'antibiogramme	63
IV. Cinétique de production de(s) biosurfactant(s) sur le milieu moût de dattes.....	64
IV.1. Pré-culture.....	64
IV.2. La culture réalisée avec le milieu moût de dattes	64
IV.2.1. Mesure de la densité optique.....	64
IV.2.2. Détermination de l'index d'émulsion E ₂₄	65
IV.2.3. Mesure du <i>foaming</i> (mousse).....	66
IV.2.4. Test de l'activité de nettoyage du biosurfactant.....	66
IV.2.5. Détermination de la stabilité de l'émulsion	67
IV.2.5.1. Effet du pH.....	67
IV.2.5.1.1. Protocole	67
IV.2.5.2. Effet de la température	67
IV.2.5.2.1. Protocole	67
V. Caractérisation des biosurfactants produits pour le milieu moût de dattes.....	68
V.1. Test de la gélose au sang (test d'hémolyse)	68
V.2. Méthode de détection et d'analyse de rhamnolipides	68
V.2.1. Méthode qualitative	68
V.2.2. Méthode quantitative	69
V.3. Test phénol - acide sulfurique	70
V.3.1. Protocole utilisé pour réaliser ce test.....	70

V.4. Test à la Ninhydrine	70
V.4.1. Protocole.....	70
V.5. Test de croissance des lentilles.....	71
V.6. Analyse par Infra Rouge FTIR.....	71
V.6.1. Extraction du biosurfactant	71
V.6.2. L'analyse par infra rouge.....	72
V.6.2.1. Protocole.....	73

Partie 3 : Résultats et discussions

CHAPITRE IV : Résultats et discussions

I. Etude des caractères microscopiques de la souche.....	74
II. Caractérisation physico-chimique du milieu moût de dattes.....	75
II.1. Mesure du pH du milieu moût de dattes.....	75
III. Cinétiques de croissance de la souche bactérienne et de production de biosurfactants sur le milieu moût de dattes	76
IV. Dosage des protéines et des sucres réducteurs.....	79
IV.1. Dosage des sucres réducteurs.....	79
IV.2. Dosage des protéines.....	79
V. Test d'antibiogramme	80
VI. Test de la croissance des lentilles.....	82
VII. Mesure du <i>foaming</i> (mousse).....	84
VIII. Test de l'activité nettoyante du biosurfactant.....	84
IX. Effet de la température sur le biosurfactant produit	85
X. Effet du pH sur le biosurfactant produit	87
XI. Test de la gélose au sang	88
XII. Test phénol-acide sulfurique	89
XIII. Test à la Ninhydrine.....	89
XIV. Caractérisation structurale du biosurfactant par Infra Rouge.....	91
XIV.1. Première approche dans l'analyse d'un spectre IR	91
XIV.2. Résultats de l'analyse Infra Rouge de <i>Transformée de Fourier</i>	92
Conclusion	94
Références bibliographiques	IV
Annexes	V
Résumé	

Liste des abréviations

SDS: Dodécylsulfate de sodium

CTAB: Bromure d'hexadécyltriméthylammonium

UV-Vis : Lumière Ultra-violette et Visible

IR : Infra-Rouge

FTIR : Infrarouge à Transformée de Fourier

MS : Spectrométrie de Masse

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

CMC: Concentration Micellaire Critique

CMD : Dilution Micellaire Critique

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

CL₅₀ : Concentration Létale 50%

CE₅₀ : Concentration Effective à 50%

HLB: Balance Lipophile-hydrophile

NAPL: Non Aqueous Phase Liquids

ADSA-P: *Axysymmetric Drop Shape Analysis by Profile*

E₂₄: Index d'émulsification

TDP-rhamnose: Thymidinediphospho-rhamnose

PHA: Acides PolyHydroxyalcanoïques

HAA: Acides 3-(3-HydroxyAlcanoyloxy)Alcanoïques

C/N: Rapport Carbone/Azote

PMN : Leucocytes PolyMorphoNucléaire

EOR : Récupération Assistée du Pétrole

MEOR : Récupération Microbienne Améliorée du Pétrole

TPH : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

PAC : Carbone Actif en Poudre

HCB : HexaChloroBenzène

E.P.S : ExoPolySaccharides

BHIB : Bouillon cœur cervelle

BN : Bouillon nutritif

MH : Milieu Mueller-Hinton

DNS : Acide Dinitrosalicylique

BSA : Serum Albumine

DO : Densité Optique

UFC : Unité Formant Colonie

KBr : Bromure de Potassium

TMS : Taux de Matière Sèche

μ : Taux de Croissance Spécifique

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Représentations des deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces.	3
Figure 2	Structures majoritaires des acides gras : Saturée, Insaturée, β -hydroxylée, Iso, Anteiso et Cyclopropane.	5
Figure 3	Représentation schématisée d'agent tensioactif et de formation d'une micelle.	12
Figure 4	Schématisme des régions où a eu lieu la formation des micelles en fonction de la CMC.	13
Figure 5	Représentation schématisée d'une molécule de biosurfactant.	13
Figure 6	solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température.	15
Figure 7	Représentation schématisée de l'adsorption de biosurfactant sur un sol.	18
Figure 8	Représentation schématisée d'un pompage et traitement avec injection de biosurfactant.	21
Figure 9	Représentation schématisée des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant.	23
Figure 10	Exemple d'utilisation des biosurfactants pour le nettoyage des réservoirs de stockage d'hydrocarbures.	26
Figure 11	Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel.	29
Figure 12	Structure des rhamnolipides R1, R2, R3, R4, RA, et RB produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	34
Figure 13	Premier modèle de biosynthèse des rhamnolipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	37
Figure 14	Modèle proposé pour la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i> par l'entremise du système QS RhlR/RhlI.	38
Figure 15	Biosynthèse des rhamnolipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	39
Figure 16	Schéma illustrant les différentes étapes de développement d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> avec au-dessous ces mêmes étapes observées au microscope confocale avec un marquage DAPI (I à III), un marquage GFP (IV) et un marquage BacLigth® (V).	44
Figure 17	<i>Pseudomonas</i> .	50

Figure 18	Relations phylogénétiques entre les différents groupes des proteobacteries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux <i>Pseudomonas</i> .	50
Figure 19	Illustration de la méthode d'antibiogramme sur boîtes de Pétri.	63
Figure 20	Exemple de culture réalisée avec le milieu contenant le moût de dattes.	64
Figure 21	Test d'emulsification E ₂₄ .	65
Figure 22	Spectrophotomètre infra-rouge à Transformée de Fourier (BRUKER, ALPHA).	72
Figure 23	Les différentes étapes de l'analyse FTIR.	73
Figure 24	Résultat de la coloration de Gram.	74
Figure 25	Cinétique de croissance de la souche <i>Pseudomonas</i> sp. sur le milieu moût de dattes.	76
Figure 26	Résultat du test de croissance du témoin négatif et du milieu contenant le biosurfactant après 1 jour de croissance.	83
Figure 27	Résultat du test de croissance du témoin négatif et du milieu contenant le biosurfactant après 7 jours de croissance.	83
Figure 28	Mesure de la mousse pour le milieu de culture.	84
Figure 29	Résultats de l'activité nettoyante des béciers.	84
Figure 30	Photo représentant les résultats du test E ₂₄ pour les différentes valeurs de températures testées.	86
Figure 31	Photo représentant les résultats du test E ₂₄ pour les différentes valeurs de pH testées.	87
Figure 32	Test de la gélose au sang pour le biosurfactant.	88
Figure 33	Test phénol acide sulfurique pour le milieu de culture moût de dattes.	89
Figure 34	Test à la Ninhydrine pour le milieu de culture moût de dattes.	90
Figure 35	Le spectre IR du biosurfactant produit.	93

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	La distribution structurale des phospholipides majeurs.	5
Tableau II	Quelques types de surfactants chimiques.	7
Tableau III	Relation entre les propriétés des agents tensioactifs et leur balance Lipophile-hydrophile (HLB).	17
Tableau IV	Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques.	19
Tableau V	Avantages des biosurfactants.	24
Tableau VI	Utilisation potentielles des biosurfactants.	28
Tableau VII	Principaux types de surfactants biologiques et quelques microorganismes producteurs.	31
Tableau VIII	Taxonomie de <i>Pseudomonas</i> .	49
Tableau IX	Les espèces appartenant actuellement au genre <i>Pseudomonas</i> .	54
Tableau X	Observation microscopique de la souche.	74
Tableau XI	Résultats de la caractérisation physico-chimique.	75
Tableau XII	Mesure du pH du milieu moût de dattes.	75
Tableau XIII	Résultats du test d'antibiogramme pour le milieu moût de dattes.	81
Tableau XIV	Résultats de l'activité nettoyante du biosurfactant.	85
Tableau XV	Effet de la température sur le biosurfactant produit.	86
Tableau XVI	Effet du pH sur le biosurfactant produit.	87

Introduction

Introduction

Les biosurfactants regroupent une classe de molécules tensioactives, structuralement variées, et communément synthétisée par les microorganismes. Les molécules de surfactant se localisent préférentiellement à l'interface entre deux milieux fluides ayant différents degrés de polarité. Cette propriété rend les surfactants capables de former des émulsions entre le milieu huileux et le milieu aqueux. Les biosurfactants offrent des applications variées aussi bien dans le domaine environnemental que le domaine médical, les biosurfactants sont capable de solubiliser les composés xenobiotiques (polluants issus des activités humaines), et les métaux lourds, améliorant ainsi leur biodégradabilité et permettant ainsi leur élimination des sols contaminés. Récemment le rôle et les multiples applications des biosurfactants (principalement les glycolipides et les lipopeptides) ont fait l'objet d'intenses recherches dans les domaines médical et thérapeutique. Certains glycolipides sont d'excellents agents antibactériens, antifongiques et antiviraux et font aussi l'objet de recherches approfondies dans le domaine de la thérapie génique.

Les biosurfactants, de par leur faible toxicité vis-à-vis de l'environnement et de la santé humaine, leur compatibilité, leur sélectivité, pour une classe de polluant ou une espèce pathogène et pour les milieux extrêmes (variations élevées de températures, pH), possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants synthétiques. Par conséquent les recherches sur les biosurfactants se sont orientées vers la découverte de nouvelles molécules, l'étude de leur rôle naturel, et l'identification des gènes régulant leur biosynthèse.

Le sujet traité dans le cadre de ce travail concerne la caractérisation préliminaire de biosurfactant(s) secrété(s) par *Pseudomonas* sp. et l'évaluation de deux effets (l'effet antibactérien et l'effet stimulateur de croissance). L'effet de deux facteurs (pH et température) sur l'activité émulsifiante du biosurfactant produit a également été évalué.

Le test de l'activité nettoyante et aussi estimer afin de savoir si le biosurfactant produit agirait comme nettoyant des huiles de moteur qu'elles soient usées ou neuves.

Les deux premiers chapitres traitent d'une synthèse bibliographique sur les biosurfactants et les microorganismes producteurs. Le troisième chapitre est consacré à la partie matériel et méthodes, suivi dans le quatrième chapitre des résultats obtenus et leur discussion.

Etude Bibliographique

Chapitre I
Les biosurfactants

Introduction

Depuis la révolution industrielle, au siècle dernier, l'homme n'a pas cessé de proposer de nouvelles sources d'énergie. La découverte du pétrole a donné un essor considérable à l'industrie. Depuis, les réserves naturelles de pétrole ont été utilisées sans limite et risquent d'être épuisées à court et à moyen terme **(SOLTANI, 2004)**.

Sachant que ces ressources ne sont pas renouvelables, il est indispensable de songer à une meilleure exploitation des gisements et à une récupération maximale du pétrole, aussi bien des puits que des centaines. De là est née la nécessité d'utiliser des substances, « les surfactants chimiques », qui permettent une récupération totale du pétrole.

Le marché mondial des tensioactifs s'élève à environ 12,9 millions de tonnes par an **(liens 1)** On estime que le marché global des tensioactifs devrait générer des revenus de plus de 41 milliards de dollars américains en 2018, soit une croissance annuelle de 4,5% **(liens 2)**. Avec une part d'environ 37% de la consommation mondiale, l'Asie-pacifique est le plus grand débouché, suivi de l'Amérique du Nord et de l'Europe de l'Ouest. La demande mondiale pour les tensioactifs anioniques a été d'environ 6,5 millions de tonnes en 2010 **(liens 3)**. L'ensemble des tensioactifs anioniques et non ioniques représente environ 85% de la demande mondiale de tensioactifs. Les tensioactifs non ioniques devraient connaître la plus forte croissance dans les années à venir. En dépit de cette tendance pour les tensioactifs non ioniques, les anioniques devraient rester les tensioactifs les plus utilisés.

Les plus importants acheteurs au niveau mondial incluent les fabricants de lessives et produits d'entretien ménagers **(liens 4)**. Leur demande de tensioactifs devrait croître de 2,6% par an jusqu'en 2018.

Les produits d'entretien industriel ont représenté un peu moins de 9% en 2010. Les produits de soin corporel et les cosmétiques ont eu une part de marché de 9,5%. D'autres applications industrielles, telles que les produits agrochimiques, les produits chimiques, les matériaux de construction ; les denrées alimentaires, les adhésifs, les lubrifiants, le travail des métaux, l'exploitation minière et les pâtes et papiers, ont représenté environ 11% de la consommation mondiale. Le marché européen des tensioactifs, quant à lui, s'élève à environ 2,5 millions de tonnes **(WERTZ, 2012)**.

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (**PARRA *et al.*, 1989 ; HEALY *et al.*, 1996 ; PAGE *et al.*, 1999 ; VIPULANANDAN et REN, 2000**). C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants.

Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et qui sont également efficaces, dans le cas des microorganismes extrêmophiles, à des températures, des pH et des salinités extrêmes (**BANAT *et al.*, 2000**). Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation (**BOGNOLO, 1999**). Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques (**VAN DYKE *et al.*, 1991 ; FIECHTER, 1992**).

Grâce à leur performance, les biosurfactants ont donné lieu à de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole pour extraire le pétrole adsorbé sur la roche du réservoir. Cette application consiste en la récupération assistée des hydrocarbures par l'utilisation des microorganismes, ainsi que, l'exploitation de leurs métabolites afin d'augmenter la production du pétrole. Dans le domaine de la protection de l'environnement et la biorémédiation, les biosurfactants (les rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures. En agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans les formulations d'herbicides et des pesticides. D'autres part, les biosurfactants de structure glycolipides peuvent avoir des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.

I. Présentation des différents 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 polaire est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés (**DESAI et BANAT, 1997**) (**Figure 1**).

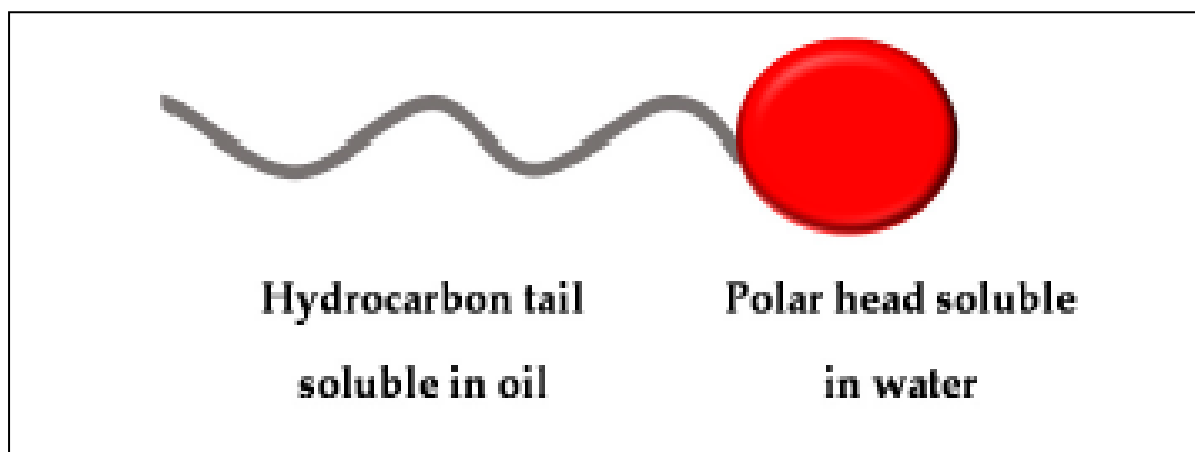


Figure 1 : Représentations des deux parties (hydrophile et hydrophobe) des molécules amphiphiles des agents de surfaces (**DANYELLE *et al.*, 2016**).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de tensioactifs chimiques (**PARRA *et al.*, 1989** ; **WEST et HARWELL, 1992** ; **PORE, 1992**) :

- Les cationiques qui possèdent une charge positive ;
- les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ;
- les non ioniques, sans charge ;
- les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre.

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (**WEST et HARWELL, 1992**).

I.2. Propriétés et Classification

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le microorganisme. 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.

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

Les glycolipides, sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyliphatiques. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (**RON et ROSENBERG, 2002**).

Les lipopeptides, sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Les lipides d'ornitine sont les plus connus (**HEALY *et al.*, 1996**). Parmi les biosurfactants bactériens de nature lipopeptidique, on distingue :

- La Surfactine ;
- la lichenysine ;
- les lipoamino-acides (l'ornitine)
- les antibiotiques

Les phospholipides, sont formés de groupement alcool et phosphate et de chaîne lipidique (**HEALY *et al.*, 1996**). **BOGNOLO (1999)** indique que bien que présents dans tous les microorganismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire (**Tableau I**).

Tableau I : La distribution structurale des phospholipides majeurs (ZAJIC et MOHAMEDY, 1984).

Phosphatidyl glycérol	Présent chez tous les bactéries (exception les actinomycétales)
Biphosphatidyl glycérol	Composant majeur des bactéries gram négatifs et aussi présent chez les <i>Bacillaceae</i>
Phosphatidyl inositol	Chez les <i>Propionibacterium</i> , les <i>Corynebacterium</i> , les <i>Arthrobacter</i> et les <i>Nocardia</i>
Phosphatidyl inositol mannosides	Chez les <i>Corynebacterium</i> et les <i>Actinomycetal</i> , il peut être présent aussi chez les <i>Propionibacterium</i> .

Les lipopolysaccharides ou polymériques, sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras (HEALY *et al.*, 1996).

Les acides gras et lipides neutres, sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée (HEALY *et al.*, 1996) (Figure 2).

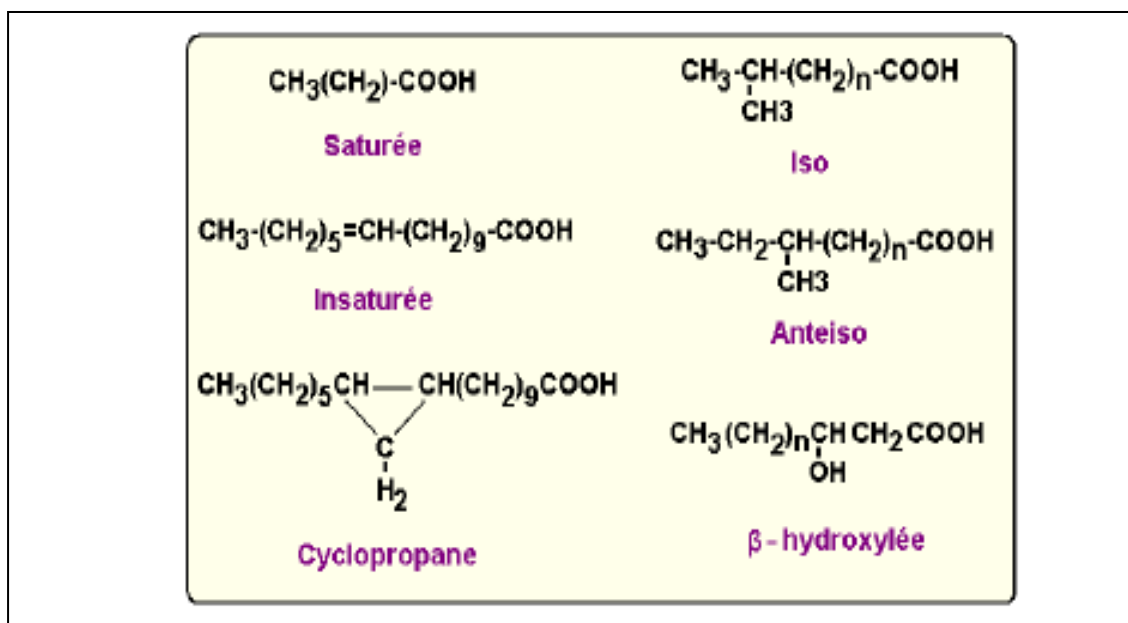


Figure 2 : Structures majoritaires des acides gras : Saturée, Insaturée, β-hydroxylée, Iso, Anteiso et Cyclopropane (ZAJIC et MOHAMEDY, 1984).

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides **(DESAI et BANAT, 1997)**.

Tous comme leur analogues de synthèse chimique **(Tableau II)**, ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes. Certaines de ces propriétés peuvent, de plus, être conservées dans des conditions extrêmes telles que pH acides, température élevée, etc. **(HERRY et BELLON-FONTAINE, 2001)**.

Tableau II : Quelques types de surfactants chimiques (TABKA, 2014).

Type	Mécanisme	Exemple	Application
ANIONIQUE	Libèrent une charge négative (anion) en solution aqueuse.	SDS (Dodécylsulfate de sodium) $\text{NaSO}_4(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ sodium stéarate, potassium laurate sodium dodecyl sulfate, sodium sulfosuccinate	Principalement utilisés dans les lessives et produits de nettoyage.
CATIONIQUE	Libèrent une charge positive (cation) en solution aqueuse.	CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) $(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3\text{Br}$ Quaternary ammonium salts	Principalement utilisés dans les milieux industriels et hospitaliers, en raison de leur propriété désinfectante.
AMPHOTERE	Suivent le pH du milieu où ils se trouvent, ils libèrent un ion positif et un ion négatif.	N dodécyl-sulfobétaine	Formulation spéciales en pharmaceutiques et en cosmétique...
NON-IONIQUE	La molécule ne comporte aucune charge nette.	Triton $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{C}_6\text{H}_4(\text{OC}_2\text{H}_4)_9\text{OH}$ Polyglycol, Fatty acid esters, Lecithin	Utilisés dans l'industrie textile, la métallurgie et en cosmétologie (hygiène corporelle et beauté) en raison d'une moindre agressivité et d'un faible pouvoir moussant.

II. Production des biosurfactants**II.1. Paramètres influençant la production des biosurfactants**

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

II.1.1. Influence de la source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite. La revue bibliographique a montrée 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 BANNAT, 1997 ; CAMEOTRA et MAKKAR, 1998**), comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive. En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes. Par exemple, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ a produits des tensioactifs sur un substrat constitué de phénanthrène ou de naphthalène (**DEZIEL et al., 1996**), la production étant plus faible pour le phénanthrène que pour le naphthalène.

II.1.2. Influence de l'azote

De nombreuses études ont montrés 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. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices (**LANG et WULLBRANDT, 1999**).

Pour avoir des rendements de production optimum, il est donc nécessaire d'avoir un rapport C/N idéal, et surtout que l'azote soit un facteur limitant (stress) pour favoriser la production de biosurfactant (**GABET, 2004**).

II.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 biosurfactants 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.

II.1.4. Influence de l'âge de la culture

L'âge de la culture est une variable importante pour la production en batch de biosurfactant. L'âge de la culture augmente le phénomène d'autolyse avec la libération des lipides et des biosurfactants intracellulaire, ainsi que des fragments de la paroi et de la capsule possédant une activité de biosurfactant (**DESAI et BANAT, 1997**).

II.1.5. 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**).

II.1.6. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (**GABET, 2004**).

II.1.7. Influence de la vitesse d'agitation

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**).

II.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 par exemple).

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, etc. Ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices (**DESAI et BANAT, 1997**).

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. Comme il existe aussi des techniques de récupération en continu (**REILING *et al.*, 1986**).

II.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**).

III. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

III.1. Abaissement de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide due à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface (**HOLMBERG et al., 2001**).

La tension superficielle s'exprime en Dyne.cm^{-1} ($= \text{mN.m}^{-1}$).

Les biosurfactants diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées. Ceci apparaît dans l'exemple : la tension superficielle de l'eau pure est de 62,80 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle peut atteindre approximativement une valeur de 30 mN/m (**HOLMBERG et al., 2001**).

L'adsorption des biosurfactants et la diminution de la tension superficielle sont responsables de la formation de mousses.

III.2. Abaissement de la tension interfaciale

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (**NEINDRE, 1993**).

La tension interfaciale de l'eau contre un alcane (n-octane) est de 50,81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m (**HOLMBERG et al., 2002**).

III.3. Concentration Micellaire Critique (CMC)

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se rassemblent pour former des micelles (**PORE, 1992**).

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, créant 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 3**).

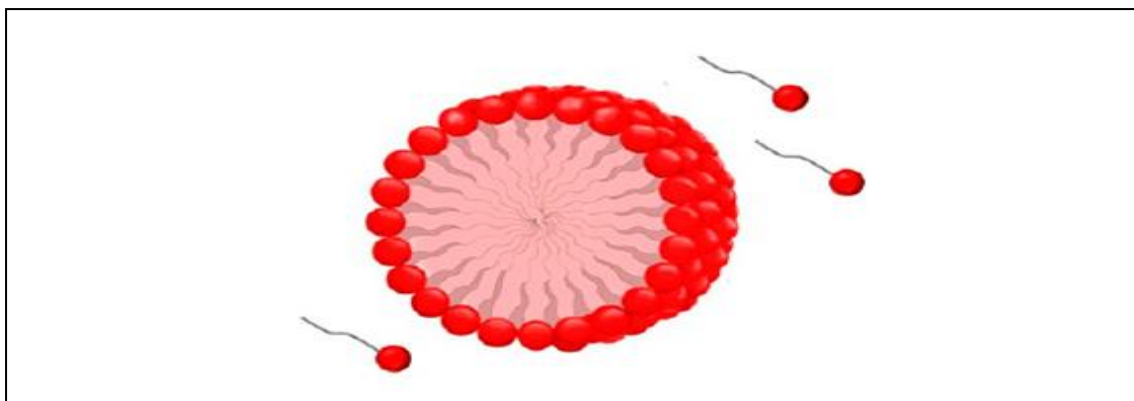


Figure 3 : Représentation schématique d'agent tensioactif et de formation d'une micelle
(DANYELLE *et al.*, 2016).

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN.m^{-1} en solution aqueuse). Pour de nombreux biosurfactants, 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^{-1} (ZHANG et MILLER, 1992 ; ABALOS *et al.*, 2001) (Figure 4).

La CMC d'un biosurfactant 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 biosurfactants 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).

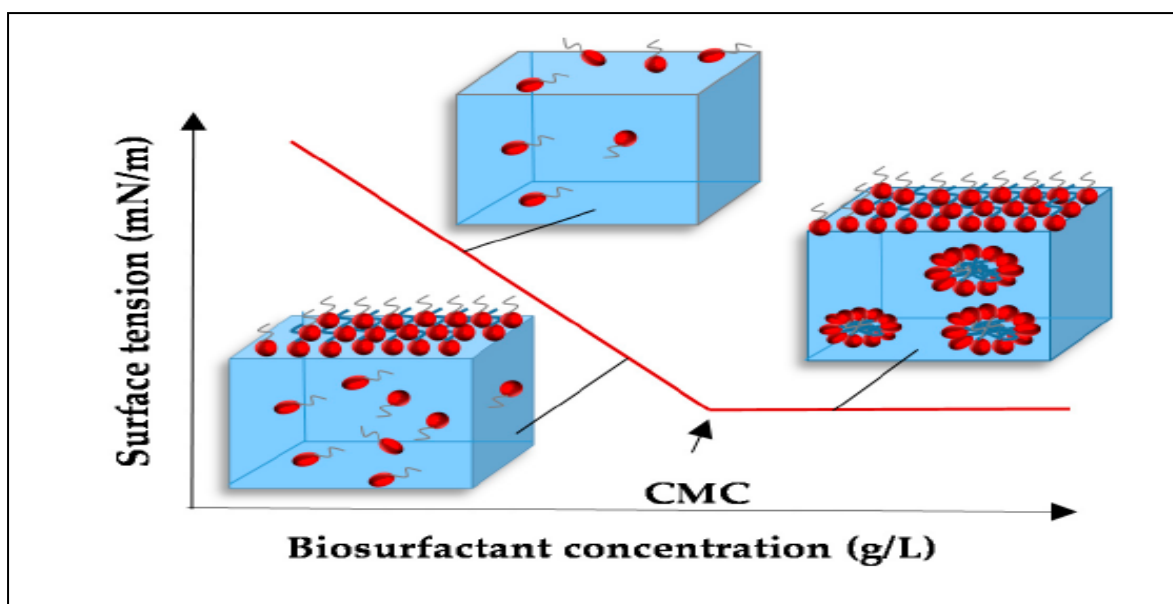


Figure 4 : Schématisation des régions où a eu lieu la formation des micelles en fonction de la CMC (CAMPOS *et al.*, 2013).

III.4. Structure des biosurfactants et paramètres influençant leur micellisation

Les micelles de biosurfactants s'arrangent en différentes microstructures sphériques, globulaires et cylindriques, mais des vésicules sphériques et irrégulières, des bicouches tubulaires ou des structures lamellaires sont le plus souvent rencontrées (CHAMPION *et al.*, 1995).

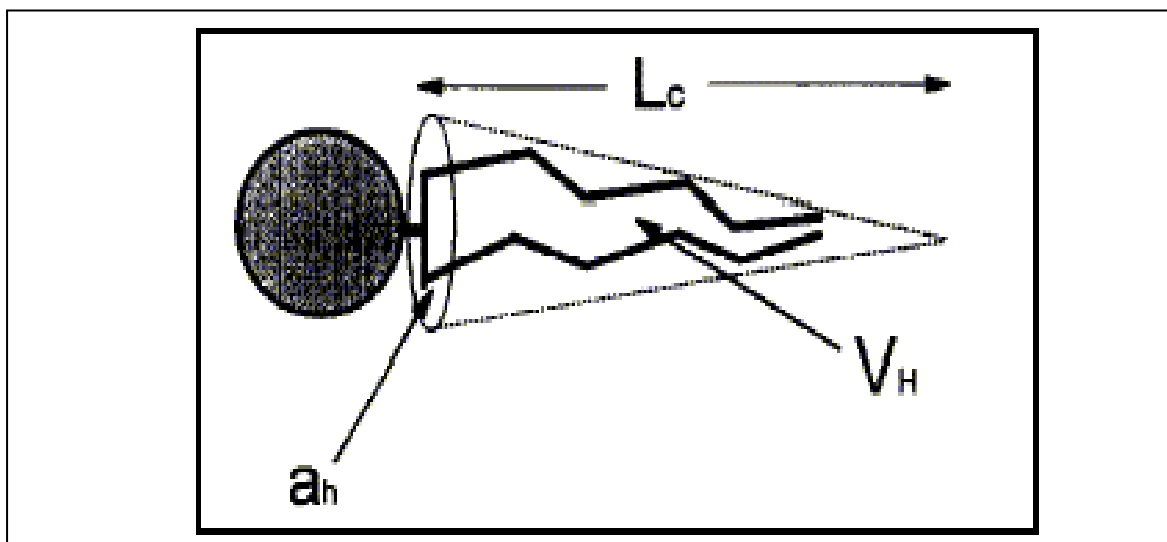


Figure 5 : Représentation schématique d'une molécule de biosurfactant (BAI *et al.*, 1998).

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'air de la section transversale de la partie hydrophile (a_h) diminue (**Figure 5**).

L_c représente la longueur de la chaîne hydrophobe et V_H le volume occupé par celle-ci. La forme de la micelle dépend également de la structure du biosurfactant. A l'aide d'une approche géométrique, la forme de la micelle peut être déterminée par le rapport de l'équation 1 :

$$F_m = V_H / (a_h * L_c)$$

Equation 1

F_m : Forme de micelle.

Si ce rapport est inférieur à 1/3, la micelle est de forme sphérique (**BAI et al., 1998**).

La morphologie des agrégats varie avec le pH, la concentration en biosurfactant, la température ou la force ionique (**CHAMPION et al., 1995**).

III.5. Solubilité des biosurfactants en fonction de la température

Pour les biosurfactants ioniques, la courbe représentant la solubilité en fonction de la température 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 (**Figure 6**) (**SHINODA et FONTELL, 1995**).

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 biosurfactant 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 biosurfactant se retrouve à la fois sous forme de micelles et de monomères (**GABET, 2004**).

Les biosurfactants non ioniques ne présentent pas de température de Krafft, mais se caractérisent par une température appelée point de trouble (**GABET, 2004**).

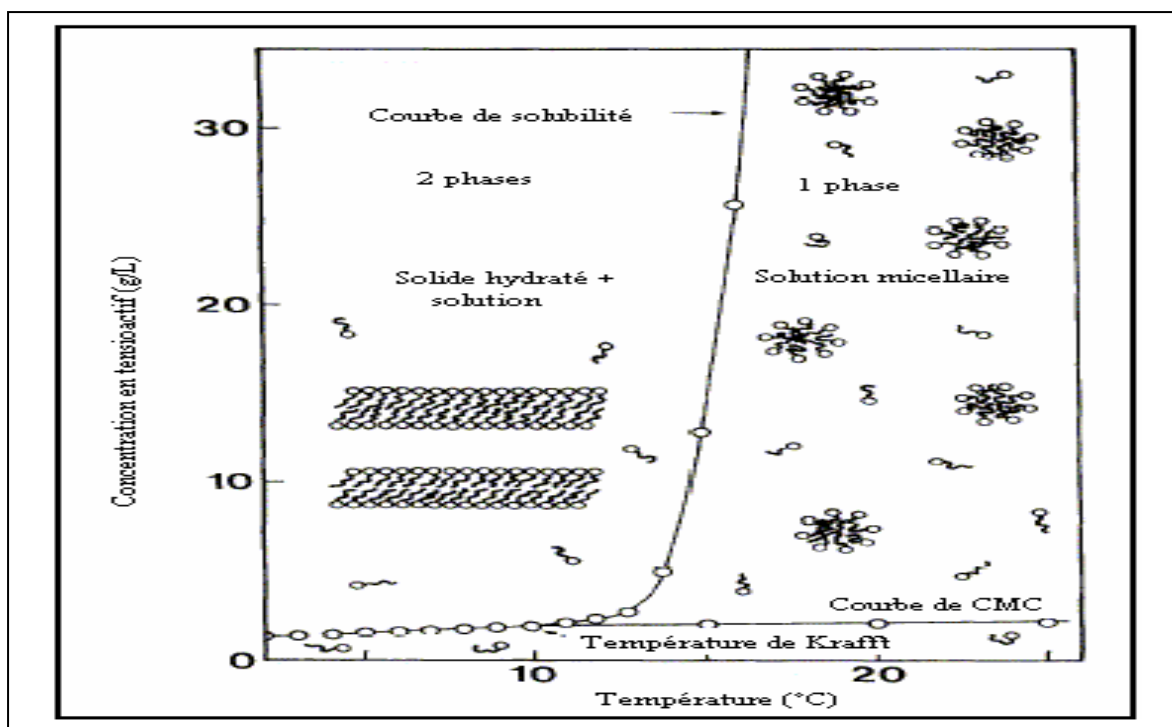


Figure 6 : Solubilité d'un biosurfactant ionique en fonction de la température
(SHINODA et FONTELL, 1995).

III.6. Solubilisation des biosurfactants dans l'eau

Les agents tensioactifs, au dessus de leur concentration micellaire critique augmentent, de façon significative, la solubilité des produits insolubles ou peu solubles dans l'eau. Ce phénomène est appelé "solubilisation" (MARCOU, 1989).

La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures dépend du nombre de liaisons C-C présentes dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant (MIMOUNI, 1995), c'est-à-dire :

- Si la longueur de la chaîne (de la partie lipophile) est inférieure à 12 liaisons C-C, le surfactant est soluble dans l'eau,
- si la partie non polaire (lipophile) à plus de 16 liaisons C-C, le surfactant est non soluble dans l'eau.

Cette propriété de solubilité devient aisée quand il y a formation de micelle, car la molécule individuelle du biosurfactant est relativement peu soluble dans l'eau, du fait qu'elle renferme une partie hydrocarbonée importante insoluble dans l'eau, par contre la micelle réalise des conditions meilleures de solubilité puisque des parties hydrocarbonées sont soustraites à l'eau et que sa surface est recouverte par l'ensemble hydrosoluble (MIMOUNI, 1995).

Selon **LARPENT (2000)** la solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures est fonction de l'importance relative de leur partie hydrophobe et hydrophile ou plus précisément de leur "balance lipophile-hydrophile" (HLB).

III.6.1. La balance lipophile-hydrophile ou HLB

Ce système imaginé par **GRIFFEN en 1949**, consiste à attribuer à chaque agent de surface ou tensioactif, une valeur illustrant sa balance lipophile-hydrophile. Selon **MARCOU (1992)**, cette HLB varie de 0 à 20 :

- La valeur 0 correspond à un produit totalement hydrophobe,
- La valeur 20 correspond à un produit totalement hydrophile.

La connaissance de HLB de chaque agent de surface ou tensioactif est très importante, car les diverses propriétés (émulsion, mouillage, etc.) correspondent à des valeurs données du HLB (**Tableau III**).

Tableau III : Relation entre les propriétés des agents tensioactifs et leur balance lipophile-hydrophile (HLB) (MARCOU, 1992).

Solubilité dans l'eau	Valeur du HLB	Propriétés
Insoluble	2	Emulsionnant Eau dans l'huile
	3	
Se disperse progressivement	5	
	6	
Forme une dispersion laiteuse	7	Mouillant
	8	
	9	
	10	
Forme une dispersion translucide	11	Emulsionnant Huile dans l'eau
	12	
	13	
	14	
	15	
	16	
	17	
	18	
	19	
	20	
Soluble		

IV. Sorption des biosurfactants sur les solides

Les biosurfactants utilisés lors des traitements des sols pollués voient leur efficacité diminuer suite à deux phénomènes principaux : la **précipitation** du biosurfactant ou la **sorption** de ce dernier au sol. Ces deux phénomènes aboutissent à une réduction en phase aqueuse de la concentration active en surfactant pour mobiliser et transporter les contaminants organiques dans les sols et parallèlement à une augmentation des coûts de dépollution (**WEST et HARWELL, 1992**).

IV.1. Mécanismes d'adsorption

L'adsorption résulte d'interactions "énergétiquement" favorables entre l'adsorbat (le sol) et le soluté. C'est un processus complexe car il peut être influencé par tout composé solide, solvant ou soluté présent dans le système. Cette adsorption peut-être de nature physique ou chimique, la différence entre les deux dépendant de la nature des forces mises en jeu (**KARICKHOFF *et al.*, 1979 ; SOMASUNDARAN et KRISHNAKUMAR, 1997**).

Plusieurs auteurs (**ABDUL et GIBSON, 1991 ; WEST et HARWELL, 1992 ; EDWARDS *et al.*, 1994**) travaillant avec des surfactants chimiques anioniques ont proposé un modèle selon lequel l'adsorption des surfactants comprendrait trois étapes.

La première serait un recouvrement partiel de la surface des sols ou sédiments par des monomères. Cette étape est contrôlée par des interactions électrostatiques entre les monomères anioniques du surfactant et les sites de surface de charge opposée. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en surfactant, les monomères s'auto-associent sous l'effet de forces électrostatiques et hydrophobes, pour donner des hemimicelles puis des admicelles (**Figure 7**).

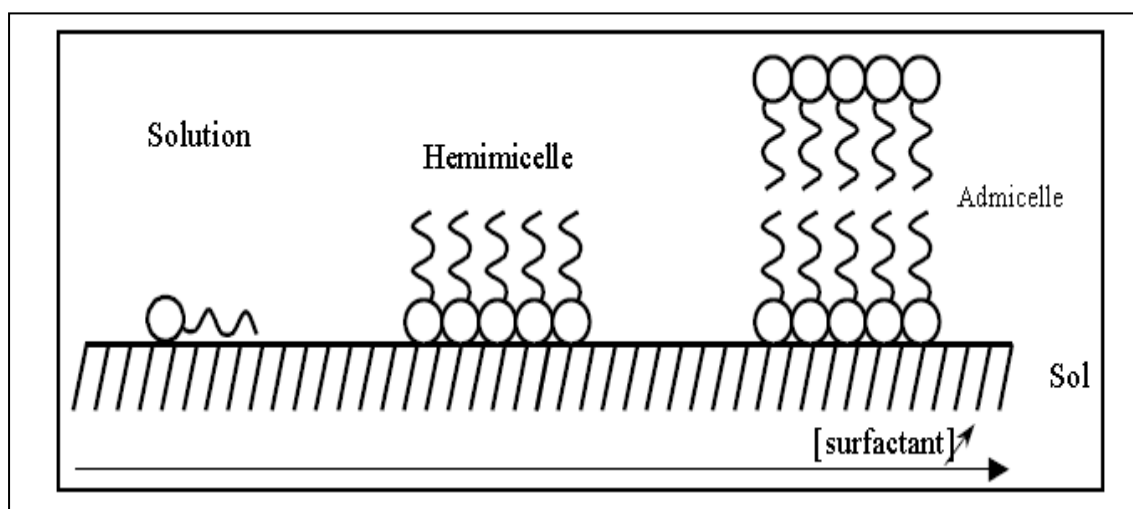


Figure 7 : Représentation schématique de l'adsorption de biosurfactant sur un sol
(**WEST et HARWELL, 1992**).

Une fois que la concentration en surfactant adsorbé à la surface du sol est maximale, tout ajout supplémentaire de surfactant restera en solution pour solubiliser les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Le type de surfactant influe sur sa sorption. **SOMASUNDARAN et KRISHNAKUMAR (1997)** indiquent que l'adsorption des surfactants non ioniques diffère de celle des surfactants ioniques du fait de l'absence d'interactions électrostatiques.

Les biosurfactants anioniques sont préférentiellement choisis lors des traitements de sols pollués car ils s'adsorbent moins aux surfaces minérales, mais ils ont la particularité de précipiter et de déstabiliser les particules fines des sols (DWARAKANATH *et al.*, 1999).

IV.2. Paramètres influençant la sorption

- Concentration, structure et nature du tensioactif ;
- Environnement chimique de tensioactif.

V. Toxicité et biodégradabilité

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherche 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 ne 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⁻¹. A titre de comparaison, le Triton X 100, d'origine chimique et largement utilisé dans l'industrie, à une CL₅₀ de 2,5 à 6 mg.L⁻¹. Le Tableau IV regroupe quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs analogues chimiques.

Tableau IV: Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (CHRISTOFI et IVSHINA, 2002).

Surfactant	Origine	CE ₅₀ (mg.L ⁻¹)
<i>Rhodococcus ruber</i> AC 235 glycolipide complexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>		49
Tréhalose tetraester de <i>R. erythropolis</i>		286
Rhamnolipide de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		50
Stéarate de sucrose (DK50)		67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597		5
Inipol EAP 22		0,004

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

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 **DESCHENES et al. (1996)** rapporte 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⁻¹ de sol).

Ces auteurs indiquent de plus que ce biosurfactant était biodégradable. De même, **VIPULANANDAN et REN (2000)** ont prouvé que la biodégradation du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas* était en compétition avec la biodégradation du naphthalène. Ces résultats sont en accord avec ceux de **PAGE et al. (1999)** qui expliquent le phénomène par le fait que les biotensioactifs sont des sous-produits ou des constituants membranaires des microorganismes. 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.Applications

VI.1. Remobilisation des Hydrocarbures aromatiques polycycliques par l'utilisation des biosurfactants

Bien qu'utilisés dans de nombreux domaines, les surfactants d'origine biologique voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sols (**GABET, 2004**).

VI.1.1. Modes d'action

La remédiation assistée par les biosurfactants présente de nombreux avantages. **WEST et HARWELL (1992)** indiquent que les tensioactifs cationiques s'adsorbent 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 leurs homologues chimiques, ce qui les rend efficaces à de plus faibles concentrations. Enfin, le caractère peu toxique et biodégradable des biosurfactants facilite leur utilisation.

Les biosurfactants agissent de façon différentes : par **mobilisation** et par **solubilisation**.

VI.1.1.1. La mobilisation

Par définition, la mobilisation dépend de la capacité des biosurfactants 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 (MC CRAY *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. La dispersion est le processus au cours duquel les NAPL se dispersent dans la phase aqueuse sous forme de fines émulsions (ABDUL et GIBSON, 1991 ; BAI *et al.*, 1997).

La réduction des tensions interfaciales diminue les forces capillaires piégeant les globules de NAPL, permettant ainsi leur remobilisation. Cependant, le contrôle hydrodynamique des NAPL ainsi solubilisés est difficile à maintenir, et bien qu'ayant un potentiel plus grand pour la réhabilitation, cette technique est peu utilisée (WEST ET HARWELL, 1992 ; BETTAHAR *et al.*, 1999).

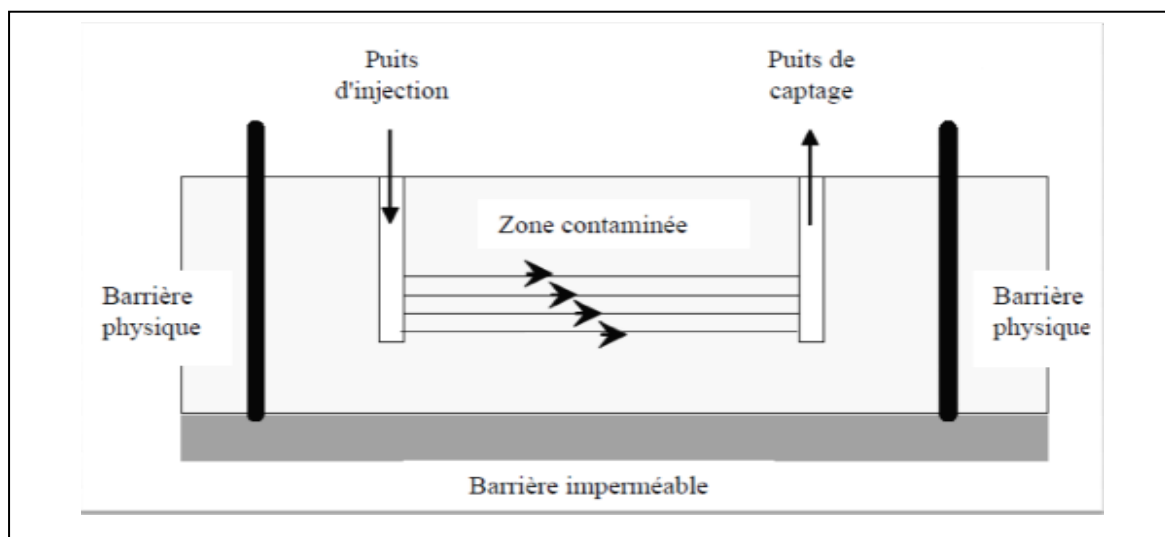


Figure 8 : Représentation schématique d'un pompage et traitement avec injection de biosurfactant (AUGUESTIJN *et al.*, 1994).

VI.1.1.2. 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 (GABET, 2004).

Généralement, en deçà de la CMC, les monomères en solution n'ont pas ou peu d'effets sur la plupart des hydrocarbures (PENNEL *et al.*, 1993).

Au dessus de la CMC, le phénomène d'incorporation des hydrocarbures dans les micelles apparait, permettant ainsi une augmentation de leur solubilité apparente (**GABET, 2004**).

BAI et al. (1998) indiquent qu'à fortes concentrations, la solubilisation est le mécanisme principal. La Figure 9 schématise le mode d'action des tensioactifs. Comme le montre ce schéma, la remédiation résulte de différentes interactions qui peuvent parfois être en compétition.

La capacité de sorption d'un sol ou d'un sédiment peut être décrite par un coefficient de distribution K_d entre la phase solide et la phase aqueuse du milieu, K_d dépend principalement de la teneur en carbone organique des sols (**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 de l'hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) entre le sol et la phase aqueuse en présence d'une solution micellaire. Ceci est représenté par l'équilibre (1) de la Figure 9.

Les monomères de tensioactifs peuvent s'adsorber sur les sols (équilibre 2 de la Figure 9), entraînent une perte d'efficacité pour le traitement des sols et il en résulte une concentration en tensioactif dans la phase aqueuse inférieure à la concentration totale en tensioactif. Ainsi, pour que les micelles se forment, il faut ajouter suffisamment de biosurfactant pour que la concentration en phase aqueuse atteigne la CMC réelle. La sorption dépend donc de la concentration de biosurfactant en solution (**VAN DYKE et al., 1993**).

EDWARDS et al. (1994) indiquent de plus que les monomères adsorbés peuvent agir comme des sorbants envers les HAP. Le rôle principal du tensioactif est de solubiliser les molécules hydrophobes en les piégeant dans la pseudo-phase hydrophobe formée par les micelles, permettant ainsi d'augmenter la solubilité apparente des polluants. Ceci est représenté par l'équilibre 3 sur la Figure 9, et est décrit par le coefficient de partage micelle/eau (K_m).

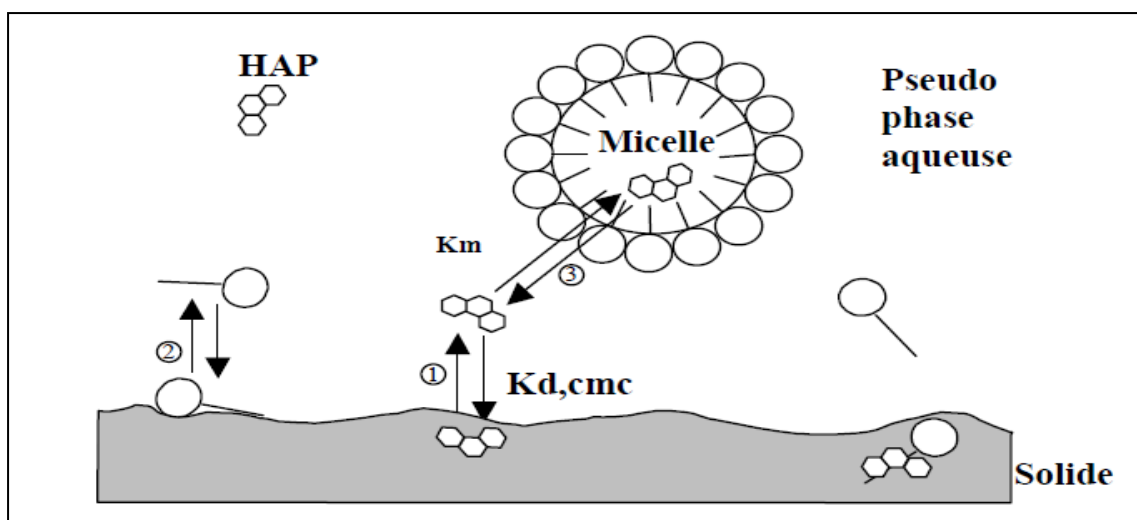


Figure 9 : Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité des HAP en présence de surfactant (d'après **EDWARD et al., 1994**).

VII. Avantage des biosurfactants

Les biosurfactants présentent plusieurs avantages :

Les biosurfactants à l'opposé des surfactants chimiques ne sont pas des dérivés du pétrole et ont l'avantage d'être produits rapidement.

Les caractéristiques structurales et les propriétés physiques des biosurfactants sont supérieures ou comparables à celles des surfactants synthétiques (**ZAJIC et DONALDSON, 1985**).

Les biosurfactants sont biodégradables et plus acceptés écologiquement que les surfactants chimiques dont l'usage doit être limité car ils sont toxiques, non biodégradables, donc sources de pollution (**BENERJEE, 1991**).

Pour des applications spécifiques, la structure chimique et les propriétés physiques des biosurfactants peuvent être modifiées grâce à la génétique et aux transformations chimiques (**ZAJIC et DONALDSON, 1985**).

Les biosurfactants sont utilisés pour la lutte contre la pollution engendrée par les hydrocarbures (exemple : nettoyage des bacs de stockage du pétrole brut). Les méthodes conventionnelles utilisées pour le nettoyage sont plus chères, durent longtemps et sont sources de danger (**BANAT et al., 1991**).

Les biosurfactants peuvent réduire la viscosité du pétrole par la formation d'émulsion huile dans l'eau (**SINGER et al., 1983**).

Les biosurfactants résistent à l'autoclavage à 121°C pendant une heure et gardent leur pouvoir émulsifiant (**BENERGEE, 1991**).

Tableau V : Avantages des biosurfactants (TABKA, 2014).

Caractéristiques techniques excellentes	• Abaissement de la tension interfaciale ($\sim 0,1$ dyne/cm) ; • Abaissement de la tension superficielle (~ 27 dyne/cm, • Emulsification (50-100%) ; • Pouvoir moussant (mousse stable (15min)) ; • Pouvoir mouillant (abaissement de l'angle de contact $>30\%$) ; • CMC (20-2000mg/l) ; • Pouvoir antibiotique ou fongicide.
Stabilité thermique et chimique	• Plus stables que les surfactants synthétiques ; • T° (4-100°C) ; • pH (4-9) ; • Salinité (5-20%).
Caractéristiques écologiques	• Biodégradable 100%, non toxiques, biocompatibles, d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques et agroalimentaire.

VIII. Application des biosurfactants

VIII.1. Application en industrie pétrolière

- **Bio-nettoyage des tanks de stockage et des cuves pétrolières**

Grâce à leurs performances, les biosurfactants ont donnés de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole pour extraire ce dernier adsorbé sur les tanks de stockage ainsi que sur les cuves pétrolières, dont les boues et les sédiments réduisent leur capacité de stockage (BANAT *et al.*, 1991).

Les bioprocédés, basés sur l'emploi des biosurfactants, peuvent constituer une alternative dans la mesure où ils sont efficaces, rentables et écologiques. En effet, de nombreuses études ont démontré que les biosurfactants peuvent nettoyer les boues et permettent la récupération d'un pourcentage significatif de pétrole brut commercialisable (JOBSON *et al.*, 1972 ; MULKILNS-PHILIPS et STEWART, 1974 ; WALKER et COLWEL, 1974 ; HITZMANN, 1983 ; SINGER *et al.*, 1983).

- **Dégradation des hydrocarbures d'origine pétrolière**

La pollution par les hydrocarbures en milieu marin ou terrestre, qu'elle soit chronique ou accidentelle, pose d'importants problèmes d'élimination. Les voies d'éliminations chimiques et physiques ont leurs limites du fait de leur coût ou de leur impact secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de par le monde.

La dégradation d'un pétrole brut par des microorganismes est un phénomène bien établi et il est considéré comme le mécanisme le plus efficace pour l'élimination de ce polluant (MALLEI, 2000).

Depuis 1972, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la dégradation des hydrocarbures cycliques et linéaires par les bactéries de l'environnement. La propriété de résister physiquement à des concentrations élevées d'hydrocarbures serait liée à la capacité de la bactérie de synthétiser des biosurfactants. Ceux-ci protègent la bactérie du contact direct avec les hydrocarbures et lui permettent de les émulsionner en microgouttelettes plus rapidement assimilables (LAHOUSINE, 1999).

La Figure 10 montre un exemple d'utilisation des biosurfactants pour le nettoyage des réservoirs de stockage des hydrocarbures (CEDOU, 2013).

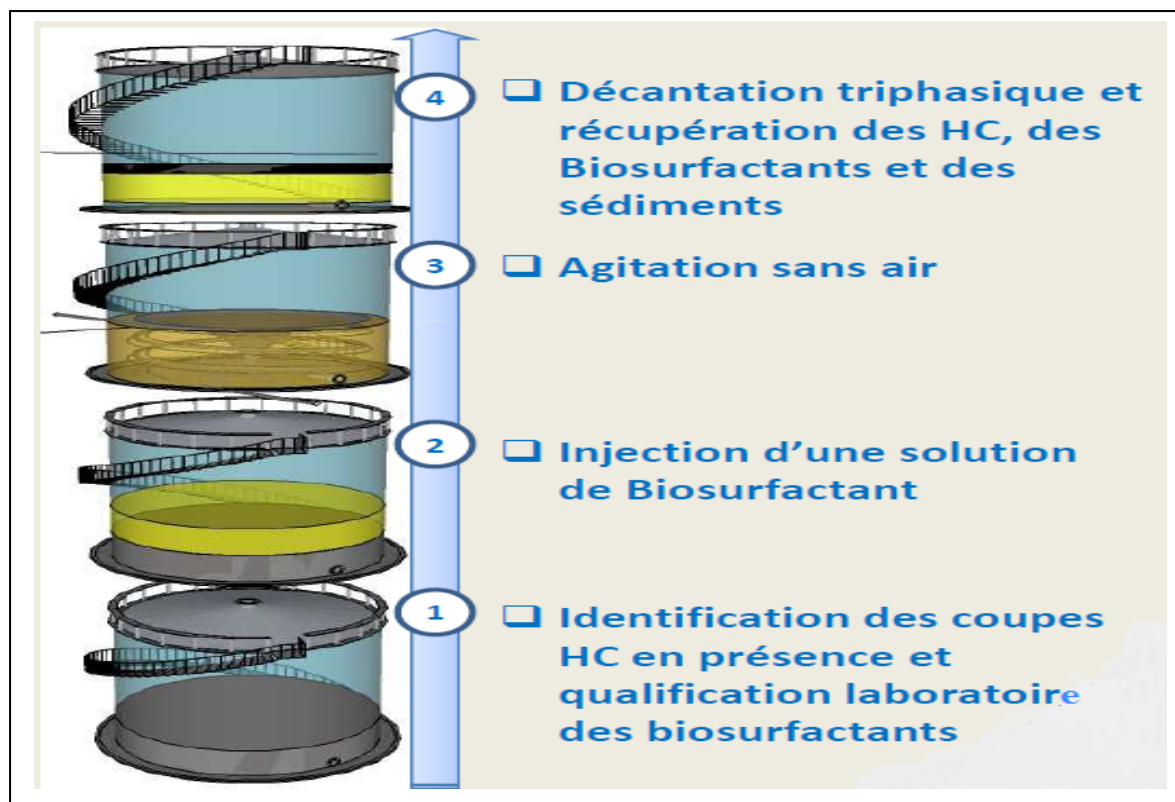


Figure 10: Exemple d'utilisation des biosurfactants pour le nettoyage des réservoirs de stockage d'hydrocarbures (CEDOU, 2013).

- **Récupération assistée du pétrole par voie microbienne**

Utilisation des microorganismes naturellement présents dans le milieu pour l'extraction du pétrole des puits grâce à plusieurs mécanismes tels que l'augmentation de la solubilité du pétrole résiduel dans les gisements de pétrole brut à l'aide de biosurfactants produits par des bactéries. Les microorganismes peuvent présenter certains avantages économiques et environnementaux comparativement aux méthodes classiques de récupération fondées sur l'injection d'eau et de produits chimiques dans le puits.

Les avantages économiques découlent des coûts initiaux et opérationnels inférieurs liés à l'application d'un procédé de récupération de pétrole. Les avantages environnementaux résultent du fait que les procédés classiques d'injection sont plus énergivores et font appel à des produits chimiques tels que des acides (CHEMANI, 2001).

VIII.2. Application en industrie agroalimentaire

Les graisses ou déversement des résidus gras issus des industries agroalimentaires constitue un problème majeur de pollution organique. Les procédés de biodégradation de ces graisses associent des biosurfactants (produits par les bactéries sur le site même, ils facilitent le contact entre les bactéries et les graisses), des microorganismes (particulièrement adaptés à la dégradation des graisses agroalimentaires) et des nutriments (ils soutiennent et assurent un travail biologique complet). Cette synergie permet une biodégradation performante (MARQUIS, 2000).

VIII.3. Applications en cosmétologie

L'emploi de tensioactifs devrait connaître la plus grande croissance dans les marchés du soin corporel et des cosmétiques (liens 5) (WERTZ, 2012).

Un autre rôle physiologique des biosurfactants qui peut être d'une grande valeur pour les applications cosmétiques est leur effet antibiotique sur divers microbes (COCHET, 2000).

Utilisés dans la préparation des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles et aussi dans la préparation des shampoings et savons riches en huiles essentielles (TABKA, 2014).

VIII.4. Applications pharmaceutiques

Plusieurs biosurfactants ont des propriétés antimicrobiennes telles que la Sufactine qui a un pouvoir antibactérien (PEYPOUX *et al.*, 1999), anti-tumoral, hypercholestérolémique, inhibiteur de la formation de caillot de fibrine (LAURILA, 1985), et dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (BANAT, 2000).

Tableau VI : Utilisation potentielles des biosurfactants (d'après BANAT *et al.*, 2000).

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peinture
Solubilisant et microémulsions	Pharmaceutique, article 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	Peinture
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

Pour que l'application des biosurfactants soit intensive dans le prochain avenir, il faudra que la protection de l'environnement devienne une priorité et un critère de choix pour la sélection des produits.

Il s'agit donc de mettre au point des procédés de traitement biologique efficaces à partir d'une culture microbienne sélectionnée in situ (telle que *Pseudomonas*) capable de dégrader les hydrocarbures et de produire des biosurfactants.

Ainsi l'usage d'une culture microbienne productrice de biosurfactant dans la biorémédiation et l'augmentation de la production pétrolière sont plus compatibles avec notre réalité économique, tandis que l'emploi direct de biosurfactant pure est plus qualifié aux autres domaines industriels (détergence, papeterie, pharmacie, textile) (**Figure 11**).

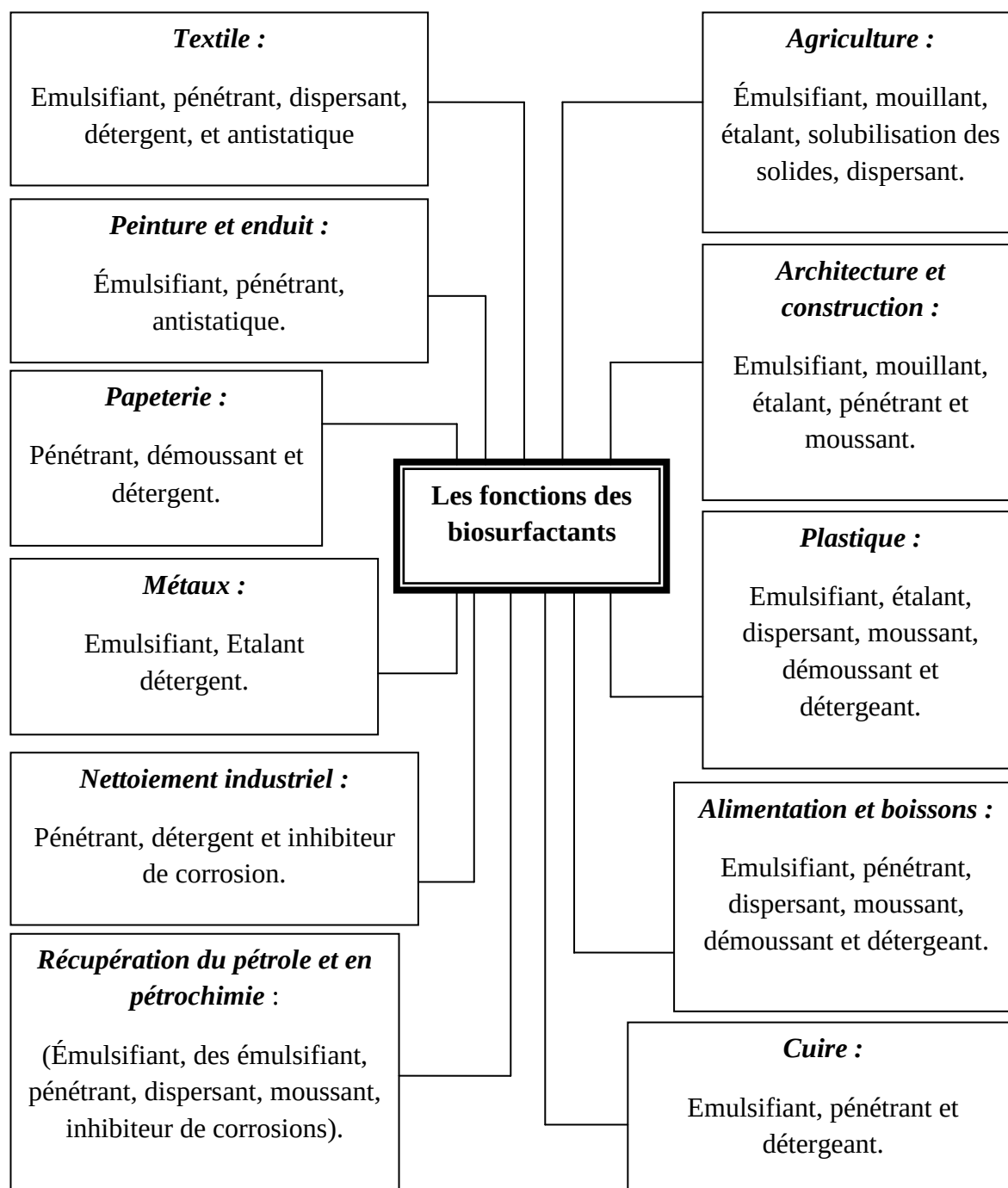


Figure 11 : Les fonctions des biosurfactants les plus demandées pour usage industriel (KHEMILI, 2008).

Chapitre II

Les microorganismes
producteurs

I. Microorganismes producteurs

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie (**MULLIGAN *et al.*, 2001**) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (**BOGNOLO, 1999 ; MULLIGAN *et al.*, 2001**).

Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire (**CHRISTOFI et IVSHINA, 2002**).

Le principale rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes 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 hydrocarbures aromatiques polycycliques (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* sont actuellement les bactéries les plus étudiées (**BANAT *et al.*, 2000**).

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciales, ainsi que des polymères de masses molaires élevées, qui se lient fortement aux surfaces (**RON et ROSENBERG, 2002**).

Les biosurfactants de faibles masses molaires sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masses molaires élevées sont constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoprotéines. Ces derniers sont moins efficaces pour réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence (**Tableau VII**).

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 fluoréthylène-propylène et le profil de la goutte est déterminé.

D'autre méthode ont été décrites comme l'hémolyse du sang, qui est une caractéristique connue de certains biosurfactants et un index d'émulsification (E_{24}) obtenu sur kérosène (BANAT, 1995).

Le test du « drop-collapsing » est utilisé pour voir les colonies bactériennes produisant les biosurfactants : des gouttes contenant des cellules en suspension sont placées sur une surface recouverte d'huile ; si la goutte reste stable, cela démontre l'absence de tensioactif (JAIN *et al.*, 1991).

Tableau VII: Principaux types de surfactants biologiques et quelques microorganismes producteurs (BANAT *et al.*, 2000).

Groupe	Biosurfactant	Micro-organisme
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus sp</i> ; <i>Nocardia</i> , <i>mycobacterium</i>
	Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida</i> <i>antartica</i>
Lipopeptides et lipoprotéines	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
	Viscosine	<i>Pseudomonas aeruginosa</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>

En plus de *Pseudomonas aeruginosa*, qui est l'espèce la plus reconnue pour la production de rhamnolipides, il ya d'autres espèces appartenant à cette famille de bactérie qui sont capables d'en produire. En 2002, *Pseudomonas putida*, a été isolée d'eau de rejets industriels pour sa capacité de biodégrader les hydrocarbures ainsi que pour sa production de biosurfactants lesquels furent identifiés comme étant des rhamnolipides (TULEVA *et al.*, 2002).

Par la suite, en 2004, la production de rhamnolipides par *Pseudomonas chlororaphis*, une bactérie non pathogène, a aussi été décrite (**GUNTHER et al., 2005**). Cette découverte est très intéressante au point de vue de la commercialisation de l'utilisation des rhamnolipides puisque *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste et l'emploi à des fins industrielles et commerciales de ses produits extracellulaires est un sujet controversé. *P. chlororaphis* est donc une candidates intéressante à des fins de production industrielle de rhamnolipides. Plus récemment, la production de biosurfactants glycolipidiques par *Pseudomonas fluorescens* HW-6 a été décrite (**VASILEVA-TONKOVA et al., 2006**). Finalement, il est à noter ici qu'au moins un autre type de biosurfactants a été observé chez les *Pseudomonas*. C'est le cas d'un lipopeptide cyclique, la Viscosine, qui est produit par *Pseudomonas libanensis* M9-3 (**SAINI et al., 2008**).

Finalement, la production de rhamnolipides chez d'autres espèces de bactéries n'appartenant pas à la famille des *Pseudomonas* a aussi été rapportée dans la littérature. Ces deux espèces appartiennent à la famille des *Burkholderia* (**DUBEAU, 2009**).

I.1. Rôles des biosurfactants chez les microorganismes producteurs

Une des nombreuses caractéristiques associées aux biosurfactants est qu'ils possèdent souvent une activité biologique (**KITAMOTO et al., 2002**). Par exemple, les biosurfactants présentent souvent une activité antibactérienne ou antivirale. Ces activités peuvent être utiles pour la défense du microorganisme. Les biosurfactants peuvent parfois être considérés comme des facteurs de virulence visant à affaiblir les défenses d'un hôte. De plus, on retrouve aussi des activités cytolytiques associées aux biosurfactants (**CAMEOTRA et MAKKAR, 2004**). Plusieurs bactéries pouvant naturellement dégrader des hydrocarbures produisent également des biosurfactants (**KOCH et al., 1991 ; MILLER, 1995 ; DEZIEL et al., 1996**).

Il existe plusieurs études qui démontrent que ces molécules tensio-actives sont des agents émulsifiants qui permettent d'augmenter la biodisponibilité des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau, ce qui facilite l'accès à des substances nutritives pour ces microorganismes permettant une amélioration de certains procédés de biorémédiation (**BOGNOLO, 1999 ; RON et ROSENBERG, 2002 ; SINGH et al., 2007**). Un autre rôle naturel des biosurfactants est associé à la régulation de l'attachement et du détachement des microorganismes aux surfaces lors de la formation d'un biofilm. Ces biofilms permettent l'établissement de communautés bactériennes protégées (**NEU, 1996 ; ROSENBERG et RON, 1999**).

II. Les rhamnolipides

Les tensioactifs ou les agents tensioactifs, sont des composés qui réduisent la tension superficielle et interfaciale entre les liquides ou un liquide et un solide. Les tensioactifs sont synthétisés chimiquement à partir de composés amphiphiles contenant des groupes à la fois hydrophobes et hydrophiles. Les biosurfactants sont des tensioactifs d'origine biologique, produits par des microorganismes, et une grande importance a été accordée à eux récemment en raison de leurs caractéristiques exceptionnelles, telle qu'une faible toxicité, une biodégradabilité, une sélectivité et une activité spécifique à des conditions extrêmes (température, pH, salinité, etc.). Cependant, les coûts de production des biosurfactants les empêchent de rivaliser avec leurs homologues synthétiques. L'utilisation de substrats moins chers est le facteur de production le plus important dans cet environnement concurrentiel, et à cette effet des études actuelles sur les biosurfactants ont été mise au point pour l'augmentation du rendement et la réduction des coûts de production (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**).

Les biosurfactants peuvent être produits à partir de déchets industriels, ce qui signifie qu'une meilleure production sur le marché est possible. En outre, l'utilisation des déchets réduit leurs effets polluants sur la nature. Les biotensioactifs sont classés principalement sur la base de leur composition chimique, dont les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, les complexes de polysaccharides-proteines, les peptides, les phospholipides et les lipides naturels (**COOPER et GOLDENBERG, 1987**).

Les rhamnolipides sont des biosurfactants de type glycolipidiques. Ces molécules tensio-actives appartiennent à la classe de biosurfactant à faible poids moléculaire et leur production chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été exhaustivement étudiées (**DUBEAU, 2009**).

Ils sont retrouvés, pour la première fois, par **BERGSTROÏM et al. (1946)** chez *Pseudomonas pyocyanea* cultivée sur gélose. Ces auteurs étaient incapables de déterminer la structure moléculaire des deux composants qui les constituent (rhamnose et l'acide β -hydroxydecanoïque). Elle a été déterminée par **JAVRVIS et JOHSON (1949)**, qui ont mis en évidence une liaison glycosidique sur 3% du glycérol. Cependant, la liaison précise entre les deux unités du rhamnose n'était pas clair, c'est ainsi qu'**EDWARDS et HAYASHI (1965)** ont démontré une liaison 1-2 dans le premier rhamnolipide identifié, appelé aussi R2, qui est constitué de deux molécules de rhamnose et de deux molécules d'acide β -hydroxydecanoïque. Le R2 est le produit unique de *Pseudomonas aeruginosa* S7B1 cultivée sur un substrat qui est le n-hexadécane ou les n-paraffine (C14-C18) (**HISATSUKA et al., 1971**).

Par ailleurs, la culture de *Pseudomonas aeruginosa*, sur d'autres substrats tels que les n-alcanes, aboutit à la production de rhamnolipides distincts : R1, R3, R4, RA et RB (**LANG et WULLBRANDT, 1999**). Les structures des rhamnolipides analogues : R1, R2, R3, R4, RA et RB sont illustrées dans la Figure 12.

Récemment, **THANOMSUB et al. (2006)** ont déterminé deux types de rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir de perte d'usine de lait (lactosérum). Ces deux biosurfactants ont été identifiés comme L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate ou Rha-Rha C10-C10 et L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate ou Rha-Rha C10-C12.

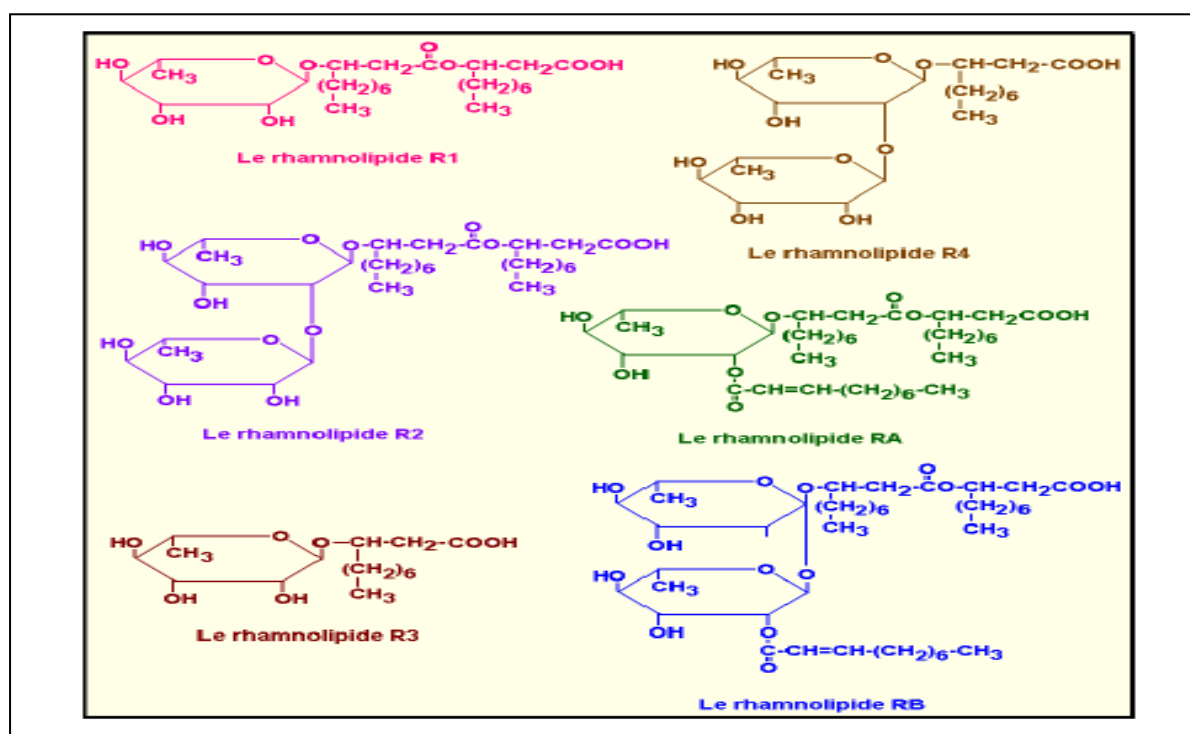


Figure 12 : Structures des rhamnolipides R1, R2, R3, R4, RA, et RB produits par *Pseudomonas aeruginosa* (**LANG et WULLBRANDT, 1999**).

LANG et WULLBRANDT (1999) indiquent que pour la production de rhamnolipides en grande quantité dans des fermenteurs de 20 à 100 m³, les coûts diminuent de 16 à 4 €.kg⁻¹. Par comparaison, les coûts de surfactants chimiques sont de l'ordre de 0,5 à 2 €.kg⁻¹. 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 des substrats de croissance de produits à faible coûts. 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 **MERCADE et MANRESA (1994)** reporte des taux de production de rhamnolipides de 1,4 g.L⁻¹ pour des *Pseudomonas* cultivées sur des sous-produits industriels.

Ces tensioactifs d'origine biologique sont en grande partie produits par *Pseudomonas* spp. *Pseudomonas aeruginosa* produit deux formes de rhamnolipides, mono- et di-rhamnolipides en culture liquide ; les rhamnolipides avec une molécule de sucre sont définis comme mono-rhamnolipides, tandis que ceux avec deux molécules de sucre sont définis comme di-rhamnolipides (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**).

Certaines espèces de *Pseudomonas* ne produisent que des mono-rhamnolipides, tandis que d'autres produisent les deux. **JARVIS et JOHNSON** les premiers à rapporté la production de rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* en 1949. On faisant incubé *P. aeruginosa* dans un milieu nutritif contenant 4% de peptone et 3% de glycérol dans un ballon d'agitation à 30°C pendant quatre à cinq jours et isolés 2,5 g/L du produit. Le premier brevet (US 4,628,030) pour la production de rhamnolipide a été reçu par **KAEPPELI et GUERRA SANTOS (1986)** pour leur étude menée sur *P. aeruginosa* DSM2659.

Les rhamnolipides sont principalement produits par *P.aeruginosa*, et les autres espèces de *Pseudomonas* qui ont été signalées produisant des rhamnolipides sont *P. chlororaphis* (**GUNTHER et al., 2005**), *P. putida* (**WITTGENS et al., 2011 ; NANGANURU et KORROPATI, 2012**) , *P. fluorescens* (**ABOUSEOUD et al., 2008 ; EL-AMINE BENDAHA et al., 2012**), *P. nitroreducens* (**ONWOSI et ODIBO, 2012**), et *P. alcaligenes* (**OLIVEIRA, 2009**).

Les rhamnolipides réduisent la tension superficielle de l'eau de 72 mN.m^{-1} à moins de 30 mN.m^{-1} et la tension interfaciale du système eau / huile de 43 mN.m^{-1} à environ 1 mN.m^{-1} . En outre, ils ont de nombreuses applications environnementales, telles que l'amélioration de la récupération assistée des hydrocarbures, la dégradation des hydrocarbures, et l'élimination des métaux du sol (**BORDOLOI et KONWAR, 2008 ; AMANI *et al.*, 2010 ; DAS et CHANDRAN, 2011**).

Au cours des trois dernières décennies, des recherches considérables ont été menées sur la production et l'application des rhamnolipides (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**).

II.1. Biosynthèse des rhamnolipides

La biosynthèse des rhamnolipides implique 3 enzymes codées par les gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* (**DEZIEL *et al.*, 2003**). Plusieurs stimuli environnementaux tels que la densité cellulaire, le stress et la carence nutritionnelle stimulent la biosynthèse des rhamnolipides (**DEKIMPE et DEZIEL, 2009 ; DEZIEL *et al.*, 2005 ; DIGGLE *et al.*, 2003 ; MCKNIGHT *et al.*, 2000 ; MEDINA *et al.*, 2003a ; MEDINA *et al.*, 2003b**). Cette biosynthèse coïncide avec la phase stationnaire de croissance. Elle est régulée soit au niveau de la transcription soit à un niveau post-transcriptionnel. Parmi les régulateurs impliqués, il y a le quorum-sensing et les systèmes à deux composantes tels que *GacS/GacA* (**CAMPOS-GARCIA *et al.*, 1998 ; DEKIMPE et DEZIEL, 2009 ; DEZIEL *et al.*, 2005 ; DIGGLE *et al.*, 2003 ; HAUSER et KARNOVSKY, 1957 ; HEURLIER *et al.*, 2004 ; MCKNIGHT *et al.*, 2000 ; OCHSNER *et al.*, 1994 ; OCHSNER *et al.*, 1995 ; PESSI *et al.*, 2001 ; RAHIM *et al.*, 2001**).

Depuis leur découverte, les rhamnolipides ont été exhaustivement étudiés sur tous leurs aspects. La voie de biosynthèse de ces molécules a été investiguée *in vivo* à l'aide de différents précurseurs radioactifs comme l'acétate (C^{14}) et le glycérol (C^{14}) (**HAUSER et KARNOVSKY, 1957 ; HAUSER et KARNOVSKY, 1958**). Finalement, suite à des essais enzymatiques, la proposition d'un modèle de biosynthèse des rhamnolipides basé sur deux réactions séquentielles de transfert de groupes glycosylés a été élaborée. Cette réaction implique deux rhamnosyltransferase distinctes qui utilisent des molécules de thymidinediphosphorhamnose (TDP-rhamnose) comme donneur du groupement rhamnosyl et soit le β -hydroxydécanoyle- β -hydroxydécanoate ou bien le L-rhamnosyl- β -hydroxydécanoyle- β -hydroxydécanoate comme accepteur (**Figure 13**) (**BURGER *et al.*, 1963**).

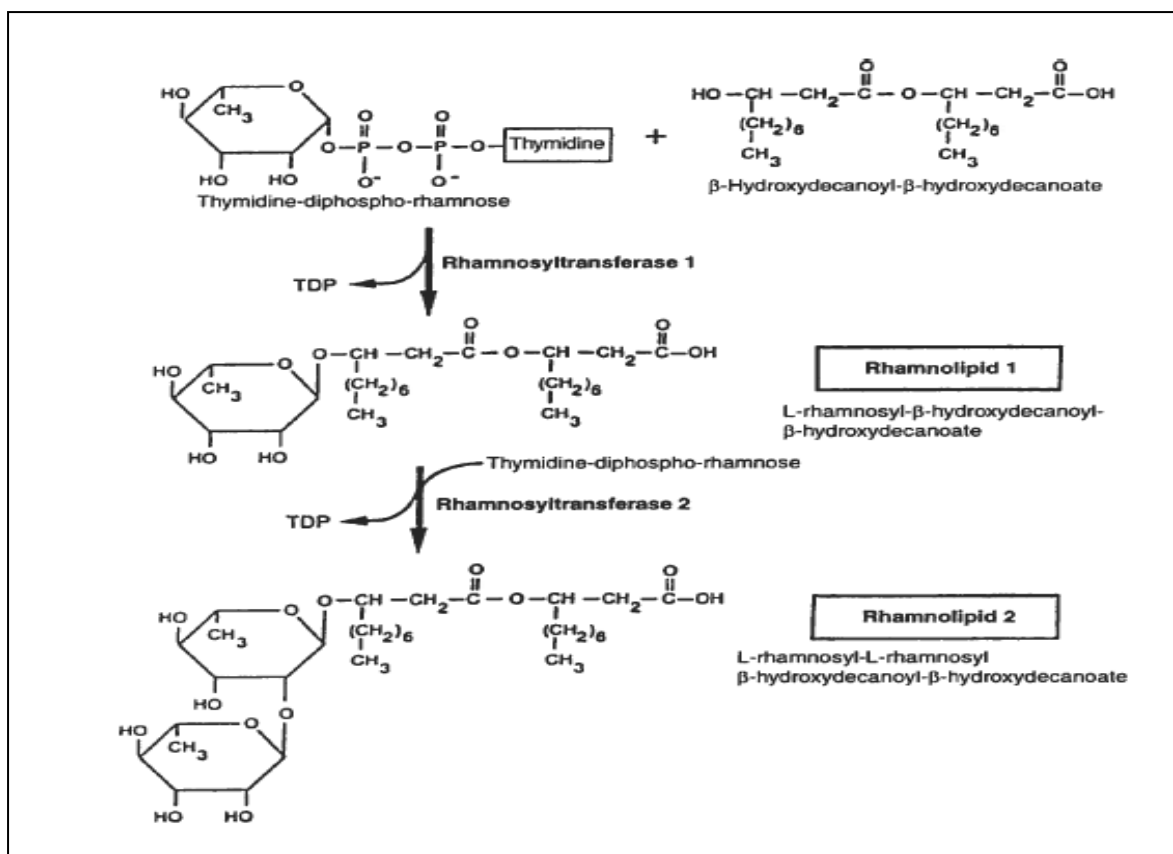


Figure 13: Premier modèle de biosynthèse des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* (BURGER *et al.*, 1963 ; OCHSNER *et al.*, 1994a).

Ce n'est que plus de 30 ans plus tard que la première rhamnosyltransferase a été découverte avec la mise en évidence des gènes *rhlA* (32,5 KDa) et *rhlB* (47 KDa) et par la démonstration que *RhlB* est la protéine catalytique de la première rhamnosyltransferase produisant un monorhamnolipide (OCHSNER *et al.*, 1994a). Cependant, le rôle précis de *RhlA* restait mal défini et était associé à la synthèse ou au transport des substrats précurseurs de *RhlB* ou bien simplement à la stabilisation de *RhlB* (OCHSNER *et al.*, 1994a). La même équipe a aussi déterminé le rôle de *rhlR*, qui code pour une protéine régulatrice de type LuxR et qui est nécessaire pour la biosynthèse des rhamnolipides (OCHSNER *et al.*, 1994b). Remarquablement, *rhlR* et *rhlI* se retrouvent directement en amont de l'opéron *rhlAB*. La Figure 14 montre l'organisation génétique de gènes *rhlABRI* tel que rapporté pour la première fois par l'équipe (OCHSNER et REISER, 1995).

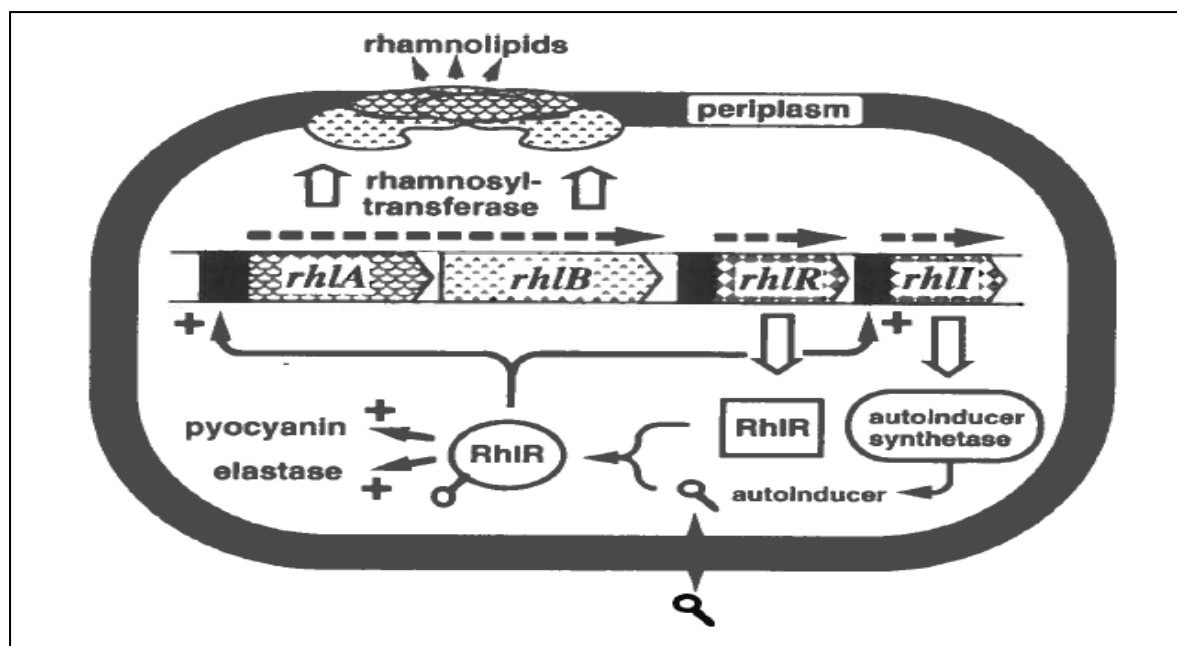


Figure 14 : Modèle proposé pour la régulation de la biosynthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* par l'entremise du système QS RhlR/RhlI (OCHSNER et REISER, 1995).

En 2001, la deuxième rhamnosyltransférase permettant le couplage d'une seconde molécule rhamnose au monorhamnolipide a été identifiée. Ce gène, nommé *rhlC*, est retrouvé en opéron avec un gène présent en amont (PA1131) mais dont la fonction reste inconnue encore à ce jour. La protéine RhlC compte 325 acides aminés et a un poids moléculaire de 35,9 KDa. *rhlC* semble être régulé à un même niveau transcriptionnel que l'opéron *rhlAB* (OCHSNER *et al.*, 1994a ; RAHIM *et al.*, 2001).

Suite à la position initiale du rôle de RhlA dans la stabilisation membranaire de RhlB, une autre hypothèse a été émise à l'effet que RhlA serait impliquée dans la conversion des 3-hydroxyacyl-ACP en 3-hydroxyacyl-CoA à cause d'une homologie partagée avec la transférase PhaG (REHM *et al.*, 1998). Ces molécules sont des intermédiaires communs dans la biosynthèse des acides polyhydroxyalcanoïques (PHA). Les véritables précurseurs des rhamnolipides, les acides 3-(3-hydroxyalcanoyloxy)alcanoïques (HAA) ont été découverts chez *P. aeruginosa* en 2002 (LEPINE *et al.*, 2002). De plus, cette dernière étude a démontrée que pour les différents congénères de HAAs libres retrouvés dans les cultures de *P. aeruginosa*, il y a une préférence pour le résidu 3-hydroxyalcanoyl le plus court à la position hydroxy. Cette observation a aussi été notée chez les rhamnolipides, et ce, dans les mêmes abondances relatives que les HAAs libres (DEZIEL *et al.*, 1999 ; DEZIEL *et al.*, 2000 ; LEOINE *et al.*, 2002). Il a été démontré par la suite que RhlA est requise pour la biosynthèse de ces HAAs (DEZIEL *et al.*, 2003).

Finalement, ce n'est que très récemment que la fonction précise de RhIA a été élucidée. Celle-ci a été associée à la conversion de β -hydroxyacyl-ACP provenant du cycle de biosynthèse des acides gras, en β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate, le HAA majoritaire retrouvé chez *P. aeruginosa* (ZHU et ROCK, 2008). La Figure 15 résume ainsi la voie de biosynthèse de rhamnolipides suite à toutes ces découvertes.

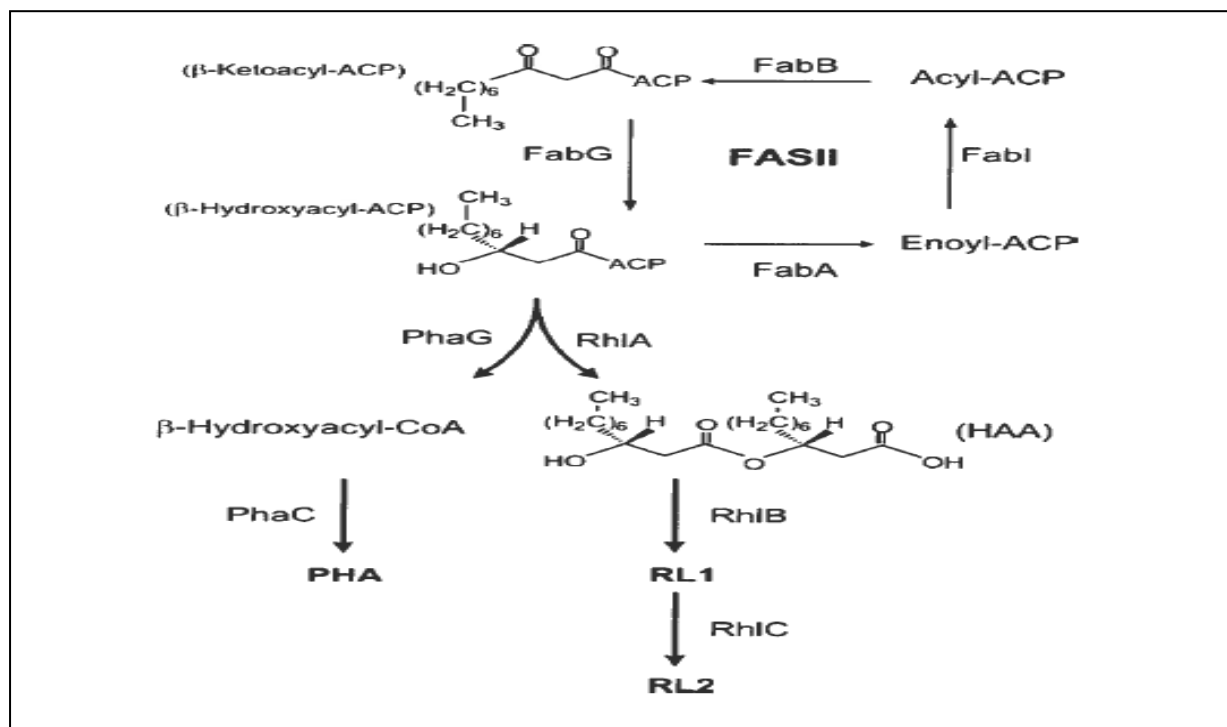


Figure 15: Biosynthèse des rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* tel que décrite par ZHU et ROCK (2008).

II.2. Facteurs influençant la production des rhamnolipides

Comme tous les biosurfactants, la composition et le rendement des rhamnolipides dépendent des conditions de culture, ainsi que des souches productrices. Il y a un certain nombre d'études dans la littérature sur les effets de divers facteurs sur la production de rhamnolipides, en particulier sur le rendement. La source de carbone et d'azote, la quantité d'ions utilisés dans le milieu et les conditions de culture, tels que le pH, la température et l'agitation, influent sur la qualité et la quantité de rhamnolipides produits (KASKATEPE et YILDIZ, 2016).

II.2.1. Source de carbone

De nombreux microorganismes synthétisent les biosurfactants en utilisant différentes sources de carbone. Des études indiquent que le rendement d'un biosurfactant varie en fonction de la source de carbone et le milieu nutritif (**ROBERT *et al.*, 1989 ; BODOUR *et al.*, 2003 ; SOBERON-CHAVEZ *et al.*, 2005**). Le pétrole brut, le glucose, le saccharose, et le glycérol ont été rapportés en tant que de bonnes sources de carbone pour la production de biosurfactants (**GUERRA-SANTOS, 1984 ; DESAI *et* BANAT, 1997**). Les sources de carbone utilisées dans la production de biosurfactants peuvent être divisées en trois catégories, y compris les hydrates de carbone, les hydrocarbures et les huiles végétales. Des sources de carbone soluble dans l'eau tels que le glycérol, le glucose, le mannitol et l'éthanol, ont été recommandées pour la production des rhamnolipides par *Pseudomonas spp* (**SANTA ANNA *et al.*, 2001 ; SILVA *et al.*, 2010**).

II.2.2. Source d'azote

L'azote est un élément essentiel pour la croissance microbienne et la production d'enzymes pour le processus de fermentation et donc un facteur important pour la production de biosurfactants. Différentes sources d'azote ont été utilisées pour la production, tel que la peptone, l'urée, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, nitrate de sodium, l'extrait de viande et l'extrait de malt (**KASKATEPE *et* YILDIZ, 2016**).

ROBERT *et al.* (1989) ont observé que le nitrate est la meilleure source d'azote pour la production de biosurfactants par la souche de *Pseudomonas* 44T1.

GUERRA SANTOS *et al.* (1986) ont déterminé que le rendement maximal des rhamnolipides est obtenu après la limitation de l'azote, à un rapport C : N de 16 :1 à 18 :1. **SYLDATK *et al.* (1985)** ont montré que la limitation de l'azote modifié également la composition du biosurfactant produit. **ONWOSI *et* ODIBO (2012)** ont signalé un niveau de production de rhamnolipides de 4,39 g/L par *P. nitroreducens* avec du nitrate de sodium comme source d'azote, et l'efficacité de la source d'azote observée est de l'ordre de nitrate de sodium < extrait de levure > urée.

D'après de nombreuses études, le nitrate de sodium était plus efficace que le sulfate d'ammonium et de l'urée pour la production de rhamnolipides (**GUERRA-SANTOS *et al.*, 1986 ; SANTA-ANNA *et al.*, 2001 ; JEONG *et al.*, 2004 ; RASHEDI *et al.*, 2005**). Le nitrate de sodium a également été signalé comme étant la meilleur source d'azote pour la production de rhamnolipides par *P. aeruginosa* (**WEI *et al.*, 2005 ; PRIETO *et al.*, 2008 ; WU *et al.*, 2008**).

Selon **ABOUSEOUD et al. (2008)**, le nitrate d'ammonium était la meilleure source d'azote pour la production de rhamnolipides par *P. fluorescens*. Par conséquent, les résultats en rapport avec des sources d'azote peuvent varier selon l'espèce *Pseudomonas* utilisée dans les études, afin que la source d'azote doit être choisie en fonction des espèces de *Pseudomonas* qui seront utilisées dans l'étude. Mais de façon générale, on peut dire que le nitrate de sodium et le nitrate d'ammonium sont les meilleures sources pour la production des rhamnolipides (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**).

II.2.3. Conditions de culture

II.2.3.1. Le pH

Une grande variété de conditions de culture ont été testés pour la production de biosurfactants pour l'obtention de grandes quantités du produit d'intérêt. Selon **GUERRA-SANTOS et al. (1984)**, le rendement maximal de rhamnolipides est obtenu dans la gamme de pH 6,0 à 6,5 et le rendement diminue nettement à pH 7,0. **MATA SANDOVAL et al. (2001)** ont rapporté dans leur étude avec *P. aeruginosa* UG2 que les conditions de culture neutre (pH 7,0) augmentent les niveaux de production moyens de toutes les espèces rhamnolipides de 25% par rapport à leur production dans des conditions légèrement acides (pH 6,25).

II.2.3.2. La température

Les gammes de température optimales ont été identifiées comme 30-37°C dans une étude de **WEI et al., (2005)** et 30-35°C par **SAHOO et al. (2011)** avec *P. aeruginosa*. **CHEN et al. (2007)** ont rapporté la température optimale de 37°C en fonction de leur enquête sur des températures comprises entre 30 et 42°C.

II.2.3.3. L'agitation

La vitesse d'agitation et le procédé appliqué au cours de l'incubation sont importants dans la production d'un biosurfactant pour assurer le transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**). **PIMIENIA et al. (1997)** ont rapporté que l'agitation orbitale est plus efficace que le secouage latéral. Dans les études avec des ballons, les vitesses secousse ont été variées entre 120 et 220 rpm.

WEI et al. (2005) ont testé des vitesses d'agitation dans une gamme comprise entre 50 et 250 tours par minute dans leur étude avec *P. aeruginosa* isolée à partir des eaux usées de la pétrochimie et ont observés un meilleur résultat à 200 rpm. En plus des sources de microorganismes, carbone et d'azote, l'optimisation du milieu et les conditions de culture sont les paramètres importants pour augmenter le rendement des rhamnolipides (**KASKATEPE et YILDIZ, 2016**). En outre, selon **BANAT et al. (2010)**, les souches productrices recombinantes et mutantes peuvent donner des rendements élevés de biosurfactants, et peut être une étape importante de leur production économique.

II.3. Rôles des rhamnolipides chez les *Pseudomonas*

Le rôle des rhamnolipides dans la physiologie de la bactérie est encore mal connu. Néanmoins, ils sont des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. En effet, ils ont été détectés dans le crachat des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont la capacité d'inhiber le phénomène de clairance ciliaire (**HASTIE et al., 1986 ; KOWNATZKI et al., 1987**).

En outre, les rhamnolipides jouent un rôle dans le changement de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (**AL-TAHHAN et al., 2000**), dans la solubilisation du PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), la mobilité de type « swarming » (**DEZIEL et al., 2003**) et dans l'architecture du biofilm (**FILLOUX et VALLET, 2003 ; KOWNATZKI et al., 1987**). Ils ont une activité antimicrobienne (**WANG et al., 2005**) et une activité hémolytique (**FUJITA et al., 1988**). En plus, ils inhibent la phagocytose et induisent la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) (**JENSEN et al., 2007**).

II.3.1. Biodégradation d'hydrocarbures

Plusieurs études ont été réalisées sur le rôle des rhamnolipides dans la biodégradation des hydrocarbures. Entre autres, une étude a été menée sur la biodégradation d'hexadécane par des espèces de *Rhodococcus* et de *Pseudomonas*. Les *Rhodococcus* produisent des trehalolipides tandis qu'on retrouve principalement des rhamnolipides chez *Pseudomonas*. L'étude a démontré que ces derniers biosurfactants étaient requis pour que l'espèce puisse croître sur cette substance hydrophobe. Contrairement aux trehalolipides qui n'ont permis que l'émulsification du substrat, c'est plutôt la capacité des rhamnolipides à pseudo-solubiliser ce même substrat qui a permis sa biodégradation. Cette étude a de plus mis en relief différents modes d'acquisition de substrats hydrophobes possibles lors de la biodégradation (**BOUCHEZ-NAITALI et al., 1999 ; BOUCHEZ-NAITALI et VANDECASTEELE, 2008**).

II.3.2. Formation et maintien de biofilms

Bien que les bactéries aient surtout été étudiées dans leur état planctonique, ces dernières occupent plutôt un mode de vie en communauté bactérienne très organisée dans l'environnement. C'est ce qu'on appelle les biofilms. Plusieurs études ont démontrées les différents rôles joués par les rhamnolipides au niveau de la formation et du maintien de ces structures complexes. En premier lieu, des tunnels qui permettent un mouvement continu d'éléments nutritifs et d'oxygène à l'intérieur de ces biofilms ont été identifiés grâce à la microscopie confocale. Les rhamnolipides ont été associés au maintien de cette architecture au sein des biofilms (**DAVEY *et al.*, 2003 ; ESPINOSA-URGEL, 2003**). Deuxièmement, le rôle des rhamnolipides dans la formation des structures de style « champignon » composés de surpopulations cellulaires a aussi été démontré (**LEQUETTE et GREENBERG, 2005**). Néanmoins, les rhamnolipides jouent aussi d'autres rôles chez les biofilms tels la formation de microcolonies dans les phases initiales de développement ainsi que la dissémination du biofilm mature. Ainsi, un mutant *rhIA-* est incapable de produire de telles microcolonies (**PAMP et TOLKER-NIELSEN, 2007**) (**Figure 16**).

II.3.2.1. Cycle de développement du biofilm

Le cycle de développement du biofilm comprend cinq étapes clés (**Figure 16**) : l'attachement réversible, l'attachement irréversible, la maturation I, la maturation II et la dispersion. Chaque cycle aboutit à la libération d'individus mobiles capables de coloniser de nouvelles surfaces et de donner naissance à de nouveaux biofilms (**YADAV *et al.*, 2008**). Une étape initiale peut être ajoutée : la reconnaissance d'une surface par le microorganisme. (**PESSEREAU, 2016**).

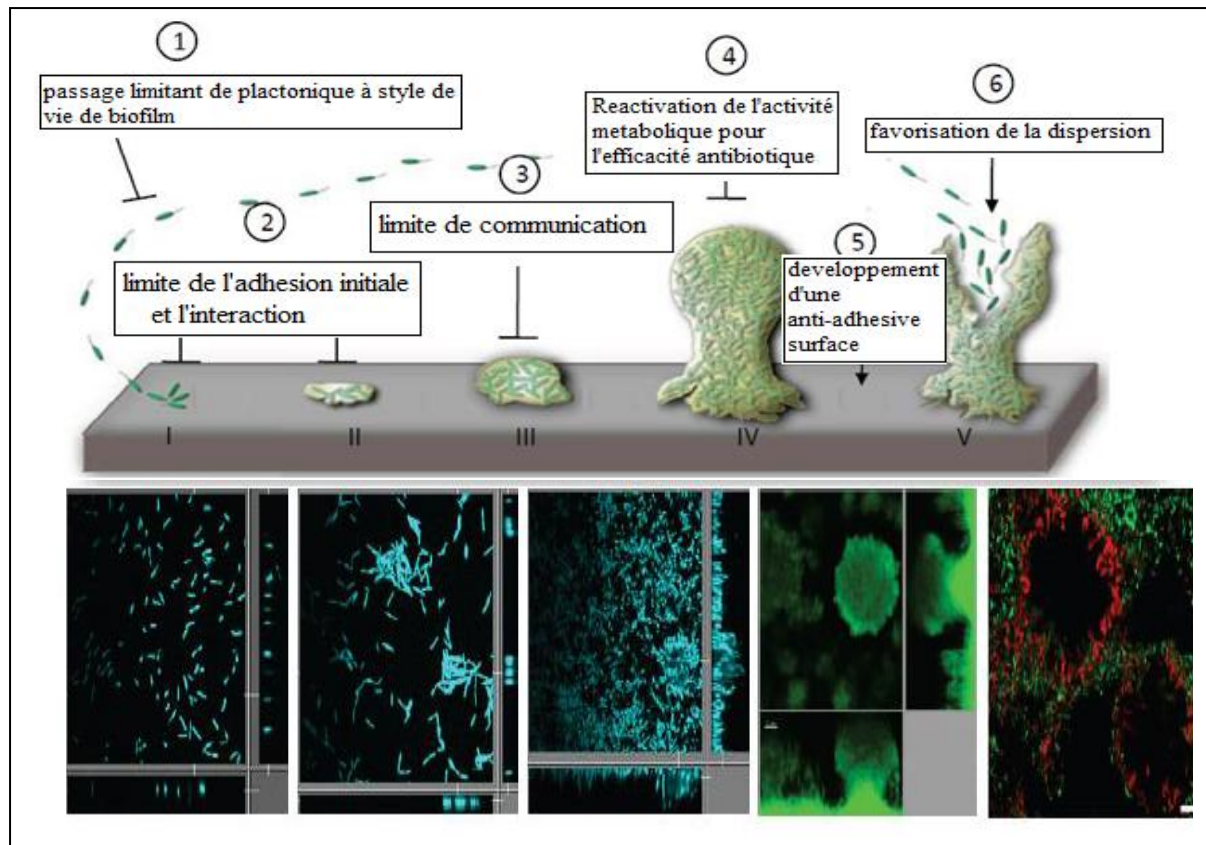


Figure 16: Schéma illustrant les différentes étapes de développement d'un biofilm de *P. aeruginosa* avec au-dessous ces mêmes étapes observées au microscope confocale avec un marquage DAPI (I à III), un marquage GFP (IV) et un marquage BacLigth® (V) (**BORDI et BENTZMANN, 2011**).

II.4. Applications des rhamnolipides

Application environnementale

Les produits à base de pétrole sont la principale source d'énergie pour l'industrie et la vie quotidienne. Les déversements d'hydrocarbures dans l'environnement sont une cause principale de la pollution d'eau et des sols, et ils peuvent donner lieu à la fois à des dommages environnementaux immédiats et à long terme. La biodegradation est un processus comprenant la décomposition de la matière organique et l'enlèvement du pétrole et les autres hydrocarbures polluants de l'environnement par des microorganismes, et il est moins cher que les autres technologies d'assainissement (**DAS et CHANDRAN, 2011**).

Les tensioactifs synthétisés chimiquement ont été utilisés pour la récupération assistée du pétrole (EOR) et pour le nettoyage des déversements d'hydrocarbures pendant des décennies. Toutefois, en raison de leur toxicité et leur résistance à la dégradation, les agents tensioactifs chimiques peuvent provoquer de graves problèmes environnementaux **(MULLIGAN, 2005)**. Les biosurfactants ont été testés pour EOR et ont démontrés leur efficacité dans la récupération microbienne améliorée du pétrole (MEOR), où leur toxicité et leur biodégradabilité représentent des avantages.

MEOR est une technique qui permet de récupérer l'huile résiduelle en utilisant des microorganismes ou leur produits **(BORDOLOI et KONWAR., 2008 ; AMANI et al., 2010)**. Les rhamnolipides ont été trouvés des composés efficaces pour MEOR, et ils peuvent modifier les propriétés physiques et chimiques du pétrole brut et de stimuler les interactions huile-eau qui améliorent la récupération du pétrole **(AMANI et al., 2010 ; 2013 ; AMANI, 2015)**.

Dans les discussions de la revue de **BANAT (1995) et REIS et al., (2013)**, sur la production de biosurfactants et la possibilité d'utilisation dans MEOR et la remédiation à la pollution pétrolière les trois principales stratégies indiquées, impliquant l'utilisation de biosurfactants en MEOR sont: (i) l'injection des microorganismes produisant les biotensioactifs dans un réservoir à travers le puits, avec la multiplication ultérieure des microorganismes *in situ* dans les roches réservoirs ; (ii) l'injection de nutriments sélectionnées dans un réservoir pour stimuler la croissance des microorganismes produisant les biosurfactants indigènes ; et (iii) la production d'agent tensioactifs biologique dans des bioréacteurs *ex situ* et leur injection ultérieure dans un réservoir.

Divers bactéries du genre *Pseudomonas* en particulier les souches de *P.aeruginosa*, sont les bactéries les plus connues capables d'utiliser un certain nombre d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques comme source de carbone et d'énergie. Ces bactéries peuvent habiter les sols contaminés et d'améliorer la disponibilité et la biodegradation des composants organiques **(DAS et CHANDRAN, 2011 ; KADALI et al., 2012 ; SAIKIA et al., 2012 ; PUSKAROVA et al., 2013)**. Les biosurfactants jouent un double rôle dans la biorémédiation en augmentant la surface spécifique et la biodisponibilité des substrats hydrophobes, insoluble dans l'eau **(KASKATEPE et YILDIZ, 2016)**.

Il existe un grand nombre de publication de recherche sur l'efficacité des rhamnolipides dans la biodegradation ainsi que dans le nettoyage des sols contaminés avec de l'essence et d'autre hydrocarbures. A l'origine **ITOH et SUZUKI** ont montré en 1972 que les milieux de culture d'hydrocarbures ont stimulé la croissance d'une souche *P. aeruginosa* rhamnolipides productrice. Des études ultérieures ont confirmées les effets des rhamnolipides sur la biodegradation des hydrocarbures (**ARINO et al., 1998**) et ont indiqué que l'addition de rhamnolipides améliore la biodegradation de l'hexadécane, l'octadécane, et le n-paraffine dans un système de mélange de liquide hydrocarboné dans le sol. Le déversement de l'Exxon Valdez est un exemple bien connu de l'utilisation de biosurfactant dans la biodegradation (**HARVEY, 1990**).

ZHANG et MILLER (1997) ont étudié les effets de dispersion sur les rhamnolipides octadécane et la biodegradation et ont montré que la minéralisation octadécane est passée de 5 à 20% dans les 84 heures en présence de 300 mg/L de rhamnolipides. **VAN DYKE et al. (1993)** ont démontré une augmentation de 25 à 70% dans la récupération d'hydrocarbures à partir d'un sol sableux limoneux contaminé et une augmentation de 40 à 80% dans la récupération d'hydrocarbures à partir d'une glaise limoneuse lors de l'utilisation de rhamnolipides de *P. aeruginosa*. **RAHMAN et al. (2003)** ont étudié la biodegradation des n-alcanes dans les boues de pétrole contaminées par 87,4% d'huile et ont démontré que, avec l'addition de rhamnolipides, C8-C11, C12-C21, C22-C31 et C32-C40 alcanes ont été dégradés à 100%, 83-98%, 80-85% et 57-73%, respectivement, au bout de 56 jours. Plusieurs études ont rapportées que les rhamnolipides sont efficaces dans l'élimination / nettoyage des métaux lourds en raison des interactions entre leurs groupes glycosidique polaires et des ions métalliques.

Les interactions rhamnolipides avec des composés organiques augmentent la biodisponibilité de celui-ci. Les agents tensioactifs rhamnolipidiques se sont révélés être efficaces pour réduire la concentration d'hydrocarbures dans les sols contaminés, ainsi que leur addition à une faible concentration (80 mg/L) à un système diesel / eau augmenté la croissance de la biomasse et la dégradation du diesel (**WHANG et al., 2008**).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) polluent l'environnement et sont des composés toxiques, mutagènes et carcinogènes. Ils sont émis dans l'environnement en tant que sous-produits de la transformation du charbon et par les déversements de pétrole. La raison de la présence prolongée des composés hydrophobes à grande masse moléculaire dans des milieux aquatiques est leur faible solubilité.

La faible solubilité aqueuse des HAP limite leur disponibilité pour les microorganismes. Cela pose un problème potentiel pour la biorémédiation d'une zone contaminée par ces composés. Les biosurfactants accélèrent l'utilisation des composés hydrophobes en augmentant la solubilité des HAP pour leur biorémédiation (**CAMEOTRA et BOLLAG, 2003**). **DESCHENES et al. (1996)** ont rapporté que les rhamnolipides sont plus efficaces que le dodécylsulfate de sodium pour augmenter la solubilisation des HAP. **DAZIEL et al. (1996)** ont montré dans leur étude que la production de rhamnolipides est responsable d'une augmentation de la solubilité aqueuse du naphthalène.

ZHANG et al. (1997) ont étudié l'effet de deux formes de rhamnolipides sur la dissolution et la biodisponibilité du phenanthrene et trouvé que le mono-rhamnolipide était plus efficace que le di-rhamnolipide pour la solubilisation, mais le phenanthrene avec des micelles mono-rhamnolipide était moins disponible que le phénanthrène avec des micelles di-rhamnolipide. Donc, ils ont indiqués que l'effet d'un agent tensioactif sur la biodegradation est une combinaison du pouvoir solubilisant de l'agent tensioactif et la biodisponibilité du substrat dans les micelles tensioactives. Dans une autre étude, il a été démontré que l'ajout d'un producteur de rhamnolipides, *Pseudomonas spp.* DS10-129, a augmenté le processus de biorémédiation dans un sol contaminée d'huile (**RAHMAN et al., 2002**). De même, **STRAUBE et al. (2003)** ont signalé que l'ajout de la souche *P. aeruginosa* 64 a amélioré la biorémédiation d'un sol contaminé par les HAP et le pentachlorophénol.

KUMAR et al. (2008) ont rapporté qu'un biosurfactant brut provenant de la souche *Pseudomonas* DHT2 isolée d'un sol contaminé par l'huile a amélioré la solubilité des HAP d'une manière dépendante de la dose. **MULLIGAN, (2009)** a examiné dans les applications environnementales détaillées de biosurfactants pour un nettoyage des sols hydrocarbonés et contaminés par des métaux.

WEN et al. (2009) ont étudié l'utilisation de rhamnolipides pour la biorestauration des sols contaminés par des Cd et Zn et ont indiqué que les rhamnolipides restent dans le sol assez longtemps pour améliorer la phytoextraction métallique.

Dans une étude de **OBAYORI et al. (2009)**, les propriétés de biodegradation d'un biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas sp* LP1 ont été étudiés pour le pétrole brut et le diesel. Les auteurs ont rapporté une dégradation de 92,34% du pétrole brut et 95,29% d'élimination de l'huile diesel. **GOZINI et al. (2010)** ont observé que, avec l'augmentation de la dose de rhamnolipides, l'efficacité d'élimination du gasoil a augmentée jusqu'à 86,7%.

ZHANG *et al.* (2011) ont étudié l'effet des rhamnolipides sur la remise en état d'un sol contaminé par le pétrole brut et le sel. Ils ont observé une nette baisse de la concentration d'hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) dans le sol lors de l'utilisation des rhamnolipides pendant une période de remise en état de 30 jours, avec une réduction de TPH maximum de 86,97%. **WANA *et al.* (2011)** ont étudié l'adsorption sélective de l'hexachlorobenzène (HCB) à partir d'une solution de rhamnolipide dans du carbone actif en poudre (PAC) et ont observé que quand une solution à 25 g/L de rhamnolipides a été appliqué le lessivage des sols de HCB était de 55-71%, après trois cycles de nettoyage et d'élimination de HCB par le PAC, il était près de 90%. **PACWA-PLOCINICZAK *et al.* (2014)** ont étudié une souche de *Pseudomonas sp* P-1 isolée d'un sol contaminé par le pétrole pour son potentiel de biorestauration et ont indiqué que la souche a la capacité de dégrader divers hydrocarbures (hexadécane, le pétrole brut, et les fractions A5 et P3 du pétrole brut). Dans une autre étude menée par **GUDINA *et al.* (2015)**, avec des sous-produits agro-industriels (liqueur de maïs et de mélasse raide), les rhamnolipides ont présentés une meilleure performance pour éliminer le pétrole du sable contaminé par rapport à deux agents tensioactifs chimiques (Enordet et Petrostep).

III. Les *Pseudomonas*

III.1. Caractéristiques générales

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par **MIGULA**, il appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, famille des *pseudomonaceae*, ordre des *pseudomonadales* (**MOORE et al., 2006**) (**Tableau VIII**). Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux, et souvent pathogènes des animaux et des végétaux. Elles possèdent plusieurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes pour une utilisation comme agents de lutte biologique. Ainsi leur capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population est remarquable (**HAAS et KEEL, 2003**). Sont des bacilles à Gram négatif de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de long, mobiles et asporulées (**BELL-PERKINS et LYNCH, 2002**) (**Figure 17**). Les différentes espèces de *Pseudomonas* sont divisées en cinq groupes selon leur ARNr. Le sous groupe des *Pseudomonas* fluorescents, appartenant au premier groupe génomique, est certainement le plus étudié. Il se distingue par la production de pigments jaune-vert fluorescents (pyoverdine ou pseudobactine) dans des conditions de carence en fer. Les espèces appartiennent à ce groupe sont : *Pseudomonas aeruginosa*, espèce pathogène pour l'homme, *P. syringae*, espèce phytopathogène et *P. fluorescens*, *P. putida*, et *P. chlororaphis* (= *Pseudomonas aerufaciens*) rassemblent des espèces saprophytes (**HOFTE et ALTIER, 2010**).

Tableau VIII : Taxonomie de *Pseudomonas* (MOORE et al., 2006).

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>

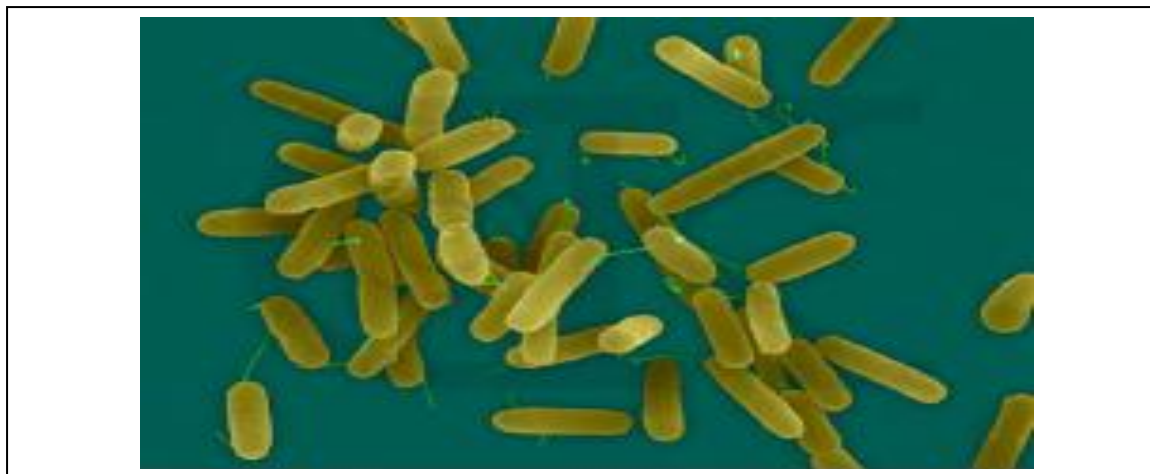


Figure 17: *Pseudomonas* sp. (Liens 7).

Cette grande rhizocompetence vient de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres bactéries ; et de leur capacité à utiliser une gamme de substrats très large, souvent issus des exsudats racinaires, comme source d'azote ou de carbone. De plus, elles sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire et se prêtent aisément aux manipulations génétiques (MOORE *et al.*, 2006).

Le nombre d'espèce a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et à divers changements de la définition du genre (Figure 18). Néanmoins, 188 espèces sont actuellement répertoriées sur le site internet (voir liens 6).

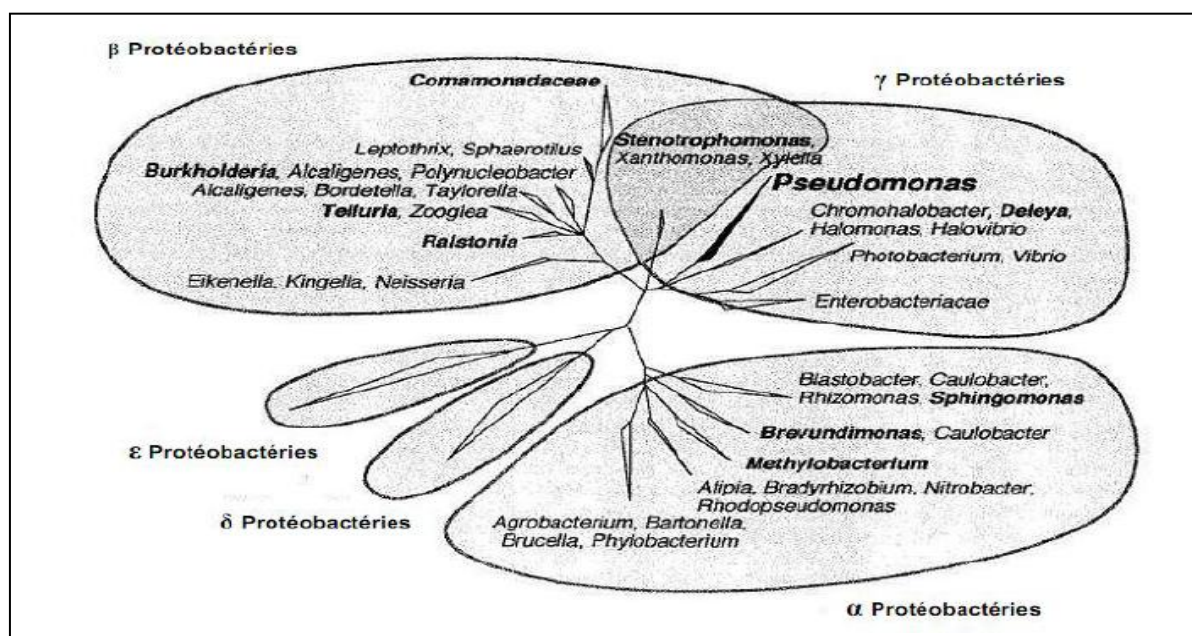


Figure 18 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des proteobacteries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (BOSSIS *et al.*, 2000).

III.2. Caractéristiques métaboliques

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons, et même quelques souches utilisent la dénitrification (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose). Les températures cardinales auxquelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4,5 (**PALLERONI, 1984**).

En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles sont souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques ce qui explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier ou elles peuvent être isolées de l'environnement humide (**EUZEBY, 2008**).

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exopolysaccharides (E.P.S) leur permet de former des biofilms, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (**VISCA et al., 2007**). Ce genre produit beaucoup de polyhydroxyalcanoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (**HOLLOWAY, 1992**).

III.3. Classification du genre *Pseudomonas*

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimioorganotrophe. Mais cette définition ne permet pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (**PALLERONI, 2008**).

III.3.1. Etapes de la classification

En 1960 **STANIER et al.** dans une approche de clarification de la taxonomie du genre, ont publié un travail reportant les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre ; basé sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests considérés comme déterminants dans la classification du genre. Dans la même décennie, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN par **MARMUR**, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, par les essais d'hybridation ADN/ADN (**COLWELL et MANDEL, 1964 ; COLWELL et al., 1965 ; JOHNSON et ORDAL, 1968**).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques fut atteint par **PALLERONI** et ses collaborateurs. Qui ont classifiés ce groupe bactérien en cinq sous groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN (**PALLERONI et al., 1973**). Toutefois ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignés, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (**PEIX et al., 2009**).

Les principaux changements dans la taxonomie viennent de **WOESE**, qui proposa de les classifier et de les identifier en fonction de leurs ARN ribosomiaux (**WOESE et al., 1984**). Toutefois ce nouveau schéma d'identification n'a pas été pris en considération dans l'édition 1994 du **BERGEY'S MANUAL**. Pourtant, c'est la classification phylogénétique basée sur les gènes codant l'ARNr 16S, établie par **WOESE et al. (1984)**, qui a permis plus tard la subdivision par **KERSTERS et al (1996)** des protéobactéries en 15 genres appartenant aux classes α , β et γ proposé par **STACKEBRANDT et al. (1987)**.

En même temps, *Pseudomonas acidovorans* et *P. testosteroni* inclus dans le groupe ARNr III sont reclassifiés en 1987 dans le genre *Comamonas* (**TAMAOKA et al., 1987**), alors que les espèces *P. flava*, *P. palleroni*, *P. taeniospiralis*, *P. pseudoflava* et *P. carboxydoflava* seront reclassifiés deux ans plus tard dans le genre *Hydrogenophaga* (**WILLEMS et al., 1989**).

Depuis 1990, le séquençage du gène codant ARNr 16S a débuté, et est appliqué pour toutes les bactéries connus. Partiel au début, mais plus tard des génomes entiers ont été séquencés et déposés dans les banques de données. Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et le développement des modèles mathématiques des arbres représentant les similitudes des séquences ont permis une classification phylogénétique des procaryotes (**PEIX et al., 2009**). Et depuis, la reclassification des espèces initialement incluses dans les groupes ARNr de **PALLERONI** continue.

Les espèces du groupe ARNr III comme *P. facilis*, *P. delafieldii* et d'autres isolats cliniques sont désormais reclassifiés dans le genre *Acidovorax* (WILLEMS *et al.*, 1990), des espèces phytopathogène comme *P. avenae* et *P. catleyae* ont aussi été reclassifiés dans ce genre (WILLEMS *et al.*, 1992). En effet, ces nouveaux genres sont inclus dans la classe des *beta-Proteobacteria*, au même titre que *Burkholderia* (YABUUCHI *et al.*, 1992) et *Ralstonia* (YABUUCHI *et al.*, 1995). Ces deux derniers genres proviennent de la reclassification des espèces du groupe ARNr II comme *P. cepacia* (désigné comme espèce type du genre *Burkholderia*), *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* et *P. solanacearum* (YABUUCHI *et al.*, 1992, 1995).

Le groupe ARNr V, est phylogénétiquement le plus proche des vrais *Pseudomonas* (ARNr groupe I), *Xanthomonas maltophilia* reclassifiés dans le genre *Stenotrophomonas* en 1993, mais appartenant à la classe des *gamma-Proteobacteria* (PALLERONI et BRADBURY, 1993).

Dans la première décennie du nouveau millénaire, la révision taxonomique la plus détaillée du genre *Pseudomonas* basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, fut entreprise par ANZAI *et al.* (2000). En analysant les séquences de 128 espèces de *Pseudomonas* (certaines sont des souches de références), ils ont conclu que 57 seulement appartenaient aux groupe des *Pseudomonas sensu stricto* ; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisées en 7 classes :

- Le groupe des *P. syringae* ;
- Le groupe des *P. chlororaphis* ;
- Le groupe des *P. fluorescens* ;
- Le groupe des *P. putida* ;
- Le groupe des *P. stutzeri* ;
- Le groupe des *P. aeruginosa* ;
- Le groupe des *P. pertucinogena*.

Depuis l'an 2000, la reclassification continue toujours (Tableau IX).

III.3.2. Classification contemporaine

L'édition actuelle du BERGEY'S (PALLERONI, 2005) compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques, le pouvoir pathogène et la structure antigénique (PEIX *et al.*, 2009).

Tableau IX : Les espèces appartenant actuellement au genre *Pseudomonas* (PEIX *et al.*, 2009).

<i>P. abietaniphila</i> ^a	<i>P. cuatrecasasensis</i> ^b	<i>P. mandelii</i> ^a	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^a
<i>P. aeruginosa</i> ^a	<i>P. delhiensis</i> ^b	<i>P. marginalis</i> ^a	<i>P. psychrophila</i> ^b
<i>P. agarici</i> ^a	<i>P. duriflava</i> ^b	<i>P. maricola</i> ^b	<i>P. psychrotolerans</i> ^b
<i>P. alcaligenes</i> ^a	<i>P. extremorientalis</i> ^b	<i>P. mediterranea</i> ^c	<i>P. putida</i> ^a
<i>P. alcaliphila</i> ^b	<i>P. fuscovaginata</i> ^a	<i>P. meltae</i> ^a	<i>P. reinekei</i> ^b
<i>P. amygdali</i> ^a	<i>P. fluorescens</i> ^a	<i>P. mendocina</i> ^a	<i>P. resinovorans</i> ^a
<i>P. anguilliseptica</i> ^a	<i>P. flectens</i> ^a	<i>P. meridiana</i> ^c	<i>P. thiosphaerae</i> ^b
<i>P. antarctica</i> ^b	<i>P. fragi</i> ^a	<i>P. migulae</i> ^a	<i>P. rhodesiae</i> ^a
<i>P. argentinensis</i> ^b	<i>P. frederiksbergensis</i> ^b	<i>P. mohnii</i> ^b	<i>P. sabulinigri</i> ^b
<i>P. asplenii</i> ^a	<i>P. fulva</i> ^a	<i>P. montellii</i> ^a	<i>P. salomonii</i> ^b
<i>P. avellanae</i> ^a	<i>P. gelidicola</i> ^c	<i>P. moorei</i> ^b	<i>P. savastanoi</i> ^a
<i>P. azotifigens</i> ^b	<i>P. geniculata</i> ^c	<i>P. moraviensis</i> ^b	<i>P. segetis</i> ^b
<i>P. azotoformans</i> ^a	<i>P. gessardii</i> ^a	<i>P. mosselii</i> ^b	<i>P. simiae</i> ^b
<i>P. balearica</i> ^a	<i>P. graminis</i> ^a	<i>P. mucidolens</i> ^a	<i>P. straminea</i> ^a
<i>P. betelii</i> ^c	<i>P. grimontii</i> ^b	<i>P. multiresinivorans</i> ^a	<i>P. stutzeri</i> ^a
<i>P. borboni</i> ^b	<i>P. guineae</i> ^b	<i>P. nitroreducens</i> ^a	<i>P. synxantha</i> ^a
<i>P. boreopolis</i> ^b	<i>P. halophila</i> ^a	<i>P. oleovorans</i> ^a	<i>P. syringae</i> ^a
<i>P. brassicacearum</i> ^b	<i>P. indica</i> ^b	<i>P. orientalis</i> ^a	<i>P. taetrolens</i> ^a
<i>P. brenneri</i> ^b	<i>P. japonica</i> ^b	<i>P. oryzae</i> ^a	<i>P. thermotolerans</i> ^b
<i>P. caeni</i> ^b	<i>P. jessenii</i> ^a	<i>P. otitidis</i> ^b	<i>P. thivervalensis</i> ^b
<i>P. cannabina</i> ^a	<i>P. jinjuensis</i> ^b	<i>P. pachastrellae</i> ^b	<i>P. tolaasii</i> ^a
<i>P. caricapayae</i> ^a	<i>P. kilonensis</i> ^b	<i>P. palleroniana</i> ^b	<i>P. tremiae</i> ^a
<i>P. cedrella</i> ^a	<i>P. knackmussii</i> ^b	<i>P. panacis</i> ^b	<i>P. trivialis</i> ^b
<i>P. chloritidis</i> ^b	<i>P. koreensis</i> ^b	<i>P. panipatensis</i> ^b	<i>P. tuomuerensis</i> ^b
<i>P. chlororaphis</i> ^a	<i>P. libanensis</i> ^a	<i>P. parafulva</i> ^b	<i>P. umsongensis</i> ^b
<i>P. cichorii</i> ^a	<i>P. lini</i> ^b	<i>P. pertucinogena</i> ^a	<i>P. vancouverensis</i> ^a
<i>P. cissicola</i> ^b	<i>P. lundensis</i> ^a	<i>P. pictorum</i> ^c	<i>P. veronii</i> ^a
<i>P. citronellolis</i> ^a	<i>P. lurida</i> ^b	<i>P. plecoglossicida</i> ^b	<i>P. viridiflava</i> ^a
<i>P. congelans</i> ^b	<i>P. lutea</i> ^b	<i>P. poae</i> ^b	<i>P. vranovensis</i> ^b
<i>P. corrugata</i> ^a	<i>P. luteola</i> ^a	<i>P. pohangensis</i> ^b	<i>P. xanthomarina</i> ^b
<i>P. costantinii</i> ^b		<i>P. proteolytica</i> ^b	<i>P. xiamenensis</i> ^b
<i>P. cremoricolorata</i> ^b			<i>P. xinjiangensis</i> ^b

a : espèces incluses dans le **BERGEY'S MANUAL (PALLERONI, 2005)** ; **b** : espèces décrites après la publication du **BERGEY'S MANUAL (2005)** ; **c** : espèces décrites avant la publication du **BERGEY'S MANUAL (2005)** qui n'ont pas été incluses dans cette édition mais dont les noms sont validés (PEIX *et al.*, 2009).

III.4. Distribution écologique

Les espèces de *Pseudomonas* décrites durant la dernière décennie montrent que c'est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différents espèces ont été isolées de niches écologiques diverse. En effet, *P. plecoglossicida* est un pathogène de poissons (NISHIMORI *et al.*, 2000) ; *P. salomonii* et *P. palleroniana* sont des espèces phytopathogène (GARDAN *et al.*, 2002) ; *P. simiae* a été isolé d'un échantillon clinique de singe (VELA *et al.*, 2006) et *P. costantinii* est un pathogène de champignons comestibles (MUNSCH *et al.*, 2002).

D'autre sont des bactéries associées aux racines, et ont été isolés de différentes plantes *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* isolés respectivement de plantes d'ail et de riz (**ACHOUAK *et al.*, 2000**). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (**PEIX *et al.*, 2003, 2004, 2005**).

Certaines ont été isolés de la phyllosphère des plantes, c'est le cas de *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (**BEHRENDT *et al.*, 2007**). Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme c'est le cas de *P. maricola* (**ROMANENKO *et al.*, 2008**), ou encore d'écosystèmes désertiques *P. duriflava* (**LIU *et al.*, 2008**), *P. guineae*, une bactérie psychrotolérante du sol de l'antarctique (**BOZAL *et al.*, 2007**), *P. thermotolerans*, qui peut croître à 55°C isolée d'échantillons animaux (**MANAIA et MOORE, 2002**).

Cette distribution mondiale semble être due à une adaptabilité physiologique et génétique élevée (**SPIERS *et al.*, 2000**). La clé de cette adaptabilité de souches individuelles à de tels environnements, est la présence chez ce genre bactérien de nombreux ilots génomiques, c'est le cas de la souche *P. aeruginosa* PSE9 (**BATTLE *et al.*, 2009**).

Etude Expérimentale

Chapitre III

Matériel et Méthodes

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie situé au niveau de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO). Il a pour objectif la caractérisation du ou des biosurfactant(s) produit(s) par une souche microbienne appartenant au genre *Pseudomonas*.

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel biologique

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé une souche bactérienne du genre *Pseudomonas* qui a été sélectionnée dans le cadre de travaux précédemment réalisés.

I.2. Milieux et conditions de culture

Pour cela nous avons utilisé des milieux de culture spécifiques que nous avons préparé nous-mêmes, leur compositions est indiquée en annexes :

a) Milieux utilisés pour la production et la caractérisation de(s) biosurfactant(s)

- Milieu moût de dattes.
- Gélose au sang (**Annexe III**).

b) Milieux utilisés pour l'entretien de la souche

- Bouillon cœur cerveau (BHIB) (**Annexe I**) ;
- Bouillon nutritif (BN) (**Annexe I**) ;
- Gélose nutritive (**Annexe II**) ;
- Milieu Mueller-Hinton (MH) (**Annexe II**) ;

I.3. Matériel physique (appareillage)

- Etuve (BINDER modèle Fd 53, 7124) ;
- Etuve (MEMMERT modèle U200) ;
- Bain marie (NÚVE, NB9) ;
- Four à moufle (Controller B 170, Nabertherm) ;
- Spectrophotomètre UV-visible (UV– 9200, UV-VIS Spectrophotometer) ;
- Spectrophotomètre à transformée de Fourier (BRUKER, ALPHA) ;
- Autoclave (SE 105 /S.N webeco);
- Agitateur magnétique avec plaque chauffante ;
- pH mètre (inoLab pH level 1).

II. Méthodologie de travail

II.1. Revivification de la souche bactérienne

Cette opération a été réalisée dans des tubes à essai, les uns contenant le bouillon BHIB et les autres contenant le bouillon nutritif (BN) préalablement autoclavés à 120°C pendant 20 min.

L'incubation s'est faite dans l'étuve (BINDER modèle Fd 53, 7124) à 37°C pendant 24 à 48 heures.

II.2. Ensemencement de la souche sur gélose nutritive

Les cultures issues de l'étape de revivification ont servi à l'ensemencement de la souche revivifiée dans les boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

II.3. Repiquage des souches

Cette opération peut être réalisée sur des boîtes de Pétri ou sur bouillon.

Après l'apparition des colonies sur les milieux solides, nous avons procédé à leur repiquage sur des milieux neufs (BN, BHIB).

II.4. Etude des caractères cultureux de la souche

L'objectif de cette étude est de vérifier la pureté de la souche utilisée.

II.4.1. Etude macroscopique

C'est la première étape qui oriente le processus d'identification des bactéries. Elle porte sur la description de colonies obtenues sur le milieu solide en se basant sur les caractères morphologiques. L'observation à l'œil nu est basée sur les éléments d'identifications donnés par **THOMA *et al.* (1970)** :

- La forme des colonies : circulaire, ondulée, filamenteuse.
- La taille des colonies : punctiforme (moins de 1 mm de diamètre), non punctiforme (supérieure à 1 mm).
- La chromogénèse : couleur de pigment.
- L'opacité : transparente, translucide ou opaque.
- Elévation : colonie plate, convexe ou concave.
- L'aspect de la surface : lisse, sèche, rugueuse, brillante ou émoussée.
- L'aspect du contour : régulier ou non (denté, étoilé...).

- La consistance : visqueuse ou non visqueuse.
- L'odeur : présence ou absence, et sa nature.

II.4.2. Etude microscopique

Plusieurs étapes ont été réalisées pour l'étude microscopique, et chacune d'elle doit fournir un certain nombre d'informations pour l'élaboration du résultat final.

II.4.2.1. Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer deux types de bactéries : Gram positif et Gram négatif, et les différencier d'après leur morphologie, cette distinction est fondamentale pour leur identification.

En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (**BENT MOHAMED et SIDI BABA, 2007**).

II.4.2.2. Réactifs

- Violet de gentiane
- Lugol (iodo-ioduré de potassium)
- Alcool à 95%.
- Safranine (ou Fushine).

II.4.2.3. Mode opératoire

- Réaliser un frottis et le fixer à la flamme ;
- Verser le violet de gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute ;
- Jeter le colorant et finir de le chasser par la solution de lugol ; laisser agir le lugol environ 1 minute ;
- Jeter le lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation pendant 30 secondes; rincer immédiatement à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 minute. Laver abondamment ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec benzène.

II.5. Préparation du milieu moût de dattes

II.5.1. Protocole de préparation

La préparation du milieu moût de dattes passe par plusieurs étapes :

(1,0 Kg de dattes / 4,0 L d'eau distillée)

- Laver les dattes avec de l'eau distillée pour éliminer les impuretés ;
- Séparation de la graine de la chaire ;
- Couper la chaire en petits morceaux à l'aide d'un couteau ;
- Peser : 300,0 g des morceaux de dattes ;
- Mettre dans un Erlenmeyer et ajouter 1200,0 mL d'eau distillée ;
- Mettre dans un bain marie (NŮVE, NB9) et mesurer la température à (75-80°C) et la maintenir à cette température pendant 45 min en agitant en continue ;
- Après les 45 min filtrer le jus de dattes obtenu à l'aide d'une bande à gaz ou d'une passoire pour séparer les débris de cellulose de la phase riche en sucres, qui est dilué avec de l'eau distillée pour obtenir les concentrations des sucres réducteurs ;
- Après filtration, neutraliser le pH du milieu obtenu ;
- Mettre dans les flacons et mettre dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min (OULD EL HADJ *et al.*, 2006).

III. Caractérisation physico-chimique du moût de dattes

III.1. Mesure de la densité apparente du milieu moût de dattes

La densité apparente est définie comme étant le rapport entre la masse de l'échantillon à analyser et son volume apparent (**Equation 2**).

$$d = m / V$$

Equation 2

d : densité apparente ;

m : masse (g) ;

V : volume (ml).

Dans notre cas, la mesure a porté sur un volume de 100,0 ml de moût de dattes après détermination de la masse (100,06 g).

III.2. Mesure du taux de matière sèche (TMS)

Le séchage du milieu moût de dattes a été réalisé en introduisant 20,0 ml du milieu dans des coupelles destinées pour le séchage (la mesure a été effectuée en réalisons trois essais) et mis dans l'étuve (MEMMERT modèle U200) à 105°C pendant 24 heures.

Après avoir séché, le rapport matière sèche / matière fraîche a été déterminé selon l'Equation 3.

$$\text{TMS (\%)} = (\text{MS} / \text{MF}) \times 100$$

Equation 3

MS : matière sèche (g) ;

MF : matière fraîche (g) ;

TMS : taux de la matière sèche (%).

III.3. Mesure du taux de cendres

Après avoir effectué le séchage, les coupelles sèches (les trois essais) sont mises dans un four à moufle (Controller B 170, Nabertherm) pendant 1 heure à 600°C.

Et le rapport cendre / matière sèche a été déterminé (**Equation 4**).

$$T = C / MS$$

Equation 4

T : taux de cendre ;

C : cendres (g) ;

MS : matière sèche (g).

III.4. Dosage des sucres réducteurs et des protéines**III.4.1. Dosage des sucres réducteurs (méthode à l'acide dinitrosalicylique)**

Le réactif au DNS (acide dinitrosalicylique) est un mélange de deux solutions :

- Solution 1 : dissoudre 300,0 g de tartrate de sodium et de potassium dans 500,0 ml d'eau distillée.
- Solution 2 : dissoudre 10,0 g de DNS dans 200,0 ml de soude à 2 N.

Mélanger extemporanément les solutions 1 et 2 et compléter à 1 L avec de l'eau distillée.

Après avoir préparé la solution de DNS, on a réalisé la courbe d'étalonnage (**BOULAL *et al.*, 2013**).

III.4.1.1. Gamme d'étalonnage

Dans une série de six tubes à essai :

- On introduit 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1,0 ml de solution étalon à 0,45 g/L de glucose.
- On complète à 1 mL avec de l'eau distillée.
- On ajoute 2 mL de réactif au 3,5-dinitrosalicylate.
- Trois essais ont été réalisés pour chaque tube.

Tous les tubes, bouchés, sont portés au bain-marie bouillant (100°C) en même temps exactement cinq minutes, puis ils sont refroidis dans un bain d'eau glacée. On complète chaque tube à 10,0 ml avec de l'eau distillée. On homogénéise et on laisse reposer 15 minutes à température ambiante.

Les lectures des densités optiques sont réalisées à 540 nm contre le blanc réactif.

III.4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford**III.4.2.1. Protocole****a) Préparation du réactif de Bradford**

- 12,5mg de bleu de Coomassie ;
- 12,5mL de méthanol ;
- 25mL d'acide phosphorique ;
- 212,5mL d'eau distillée.

Mélanger l'acide phosphorique avec l'eau distillée, ajouter le méthanol puis les mélanger avec le bleu de Coomassie (**MINT EL MOUKHTAR, 2010**).

b) Préparation de la solution de BSA

La solution mère de Serum Albumine (BSA) à 2 g/L (2 mg/mL), est obtenue par la solubilisation de 40,0 mg de la BSA dans 20,0 mL d'eau distillée.

c) Préparation des dilutions de la solution mère de BSA

Volume totale = 2,0 mL par dilution

N° tube	1	2	3	4	5	6
[BSA] (mL)	0	0,25	0,5	1,0	1,4	2,0
Eau distillée (mL)	2,0	1,75	0,5	1,0	0,6	0

d) Préparation de la gamme étalon

Nous avons utilisé 6 points pour tracer la droite pour un volume total de 3,1mL par échantillon.

N° tube	Volume BSA en mL	[BSA] dilution (mg/mL)	Réactif de Bradford
1(blanc)	0,1	0	3
2	0,1	0,25	3
3	0,1	0,5	3
4	0,1	1,0	3
5	0,1	1,4	3
6	0,1	2,0	3

La lecture de l'absorbance (à 594 nm) de chaque tube se fait contre le blanc (tube ne contenant pas la protéine).

e) Mesure de la concentration d'un échantillon inconnu

Pour évaluer la concentration d'un échantillon, il suffit alors d'utiliser le même volume que celui utilisé pour les points de la gamme (volume total et volume du réactif), d'en lire l'absorption à 594 nm au spectrophotomètre puis d'en reporter la mesure sur la courbe étalon qui nous donnera la concentration correspondante.

III.5. Test d'antibiogramme

La technique consiste à utiliser des disques imprégnés de biosurfactant(s) (0,015g de biosurfactant dans 3,0 mL d'eau distillée).

Dans notre cas les disques ont été préparés à partir de papier Whatman (n°1, diamètre 5) imbibés par les solutions de(s) biosurfactant(s) extrait(s) à partir du moût de fermentation. Les disques sont déposés par la suite à la surface d'une gélose (MH) uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à tester (deux souches bactériennes pathogènes de référence : *E. coli* ATCC25922 ($1,491.10^7$ UFC/mL) ; *Staphylococcus aureus* ATCC43300 ($1,433.10^7$ UFC/mL) et trois souches de provenance hospitalières *Staphylococcus Sp* ($1,533.10^7$ UFC/mL); *E. coli* ($1,491.10^7$ UFC/mL) ; *Klebsiella Sp* ($1,466.10^7$ UFC/mL)), après incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures, il apparaît des zones claires autour de quelques disques ayant des diamètres variables, ce sont des zones d'inhibition ou de sensibilité. A l'aide d'une règle graduée, on a mesuré le diamètre des zones d'inhibition (Figure 19).

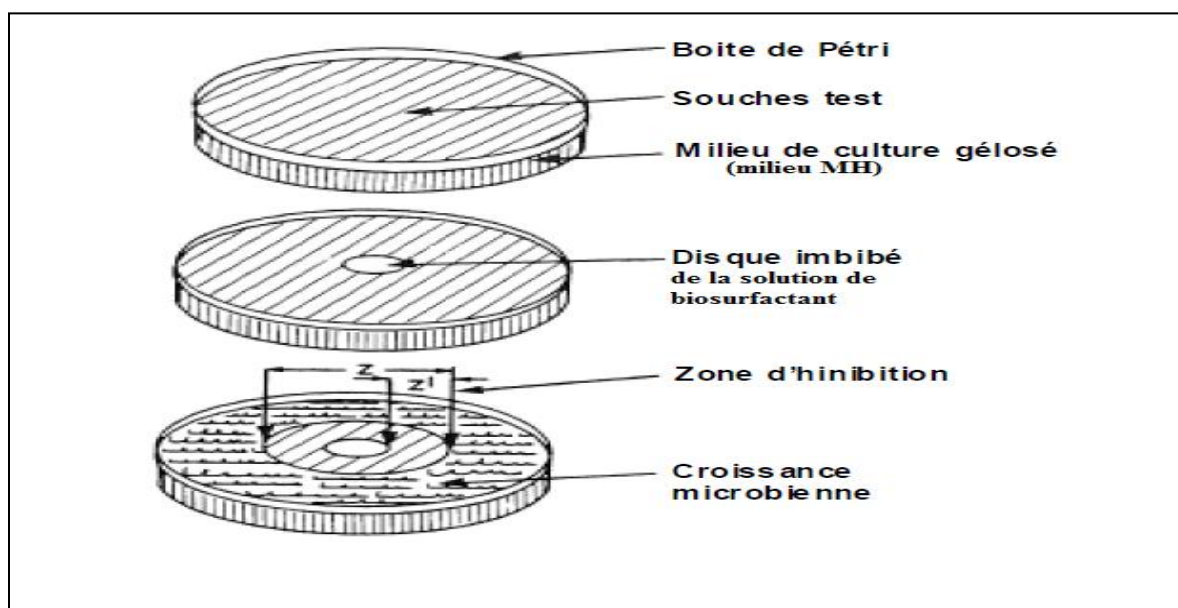


Figure 19 : Illustration de la méthode d'antibiogramme sur boîtes de Pétri (ZAIKA, 1988).

IV. Cinétique de production de(s) biosurfactant(s) sur le milieu moût de dattes

IV.1. Pré-culture

La pré-culture a été réalisée dans un Erlenmeyer de 100,0 mL contenant 50,0 mL du milieu moût de dattes etensemencée avec 1 mL de la suspension bactérienne ($1,5 \cdot 10^7$ UFC/mL) et incubée sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique (50 tr/min) pendant 48 heures.

IV.2. La culture réalisée avec le milieu moût de dattes

La culture a été réalisée dans un Erlenmeyer de 500,0 ml contenant 250,0 ml du milieu moût de dattesensemencé avec 50,0 ml de la pré-culture, l'incubation a été effectuée à température ambiante ($22,733^\circ\text{C} \pm 1,048^\circ$) sous agitation (150 tr/min) pendant 5 jours (Figure 20).



Figure 20: Exemple de culture réalisée avec le milieu contenant le moût de dattes.

A l'issu de cette période d'incubation, la culture obtenue a fait l'objet des mesures suivantes :

IV.2.1. Mesure de la densité optique

La mesure de la croissance bactérienne a été réalisée en mesurant la densité optique (DO) au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible (UV- 9200, UV-VIS Spectrophotometer) à une longueur d'onde de 600 nm. Cette mesure est considérée comme indicateur biologique direct.

Rappelons que la mesure de la densité optique est basée sur la loi de Beer-Lambert : (Equation 5).

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon . l . C$$

Equation 5

A : densité optique.

I₀ : intensité de la lumière incidente.

I : intensité de la lumière émergente.

ε : absorption molaire (absorption d'une solution $c = 1$ mol/l dans une cuvette de dimension de $l = 1$ cm) [L/ mole.cm].

C : concentration molaire [mole/L].

l : épaisseur de la cuvette [cm].

La loi de Beer-Lambert est valable seulement pour les solutions suffisamment diluées.

IV.2.2. Détermination de l'index d'émulsion E_{24}

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (Gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 2 mL du milieu de culture (surnageant) (centrifugation 3000 tr/ 20 min) avec 2 mL de gasoil (trois essais ont été réalisés). Les tubes sont agités au vortex pendant 2 min.

Après homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante (BODOUR *et al.*, 2004) (Figure 21).

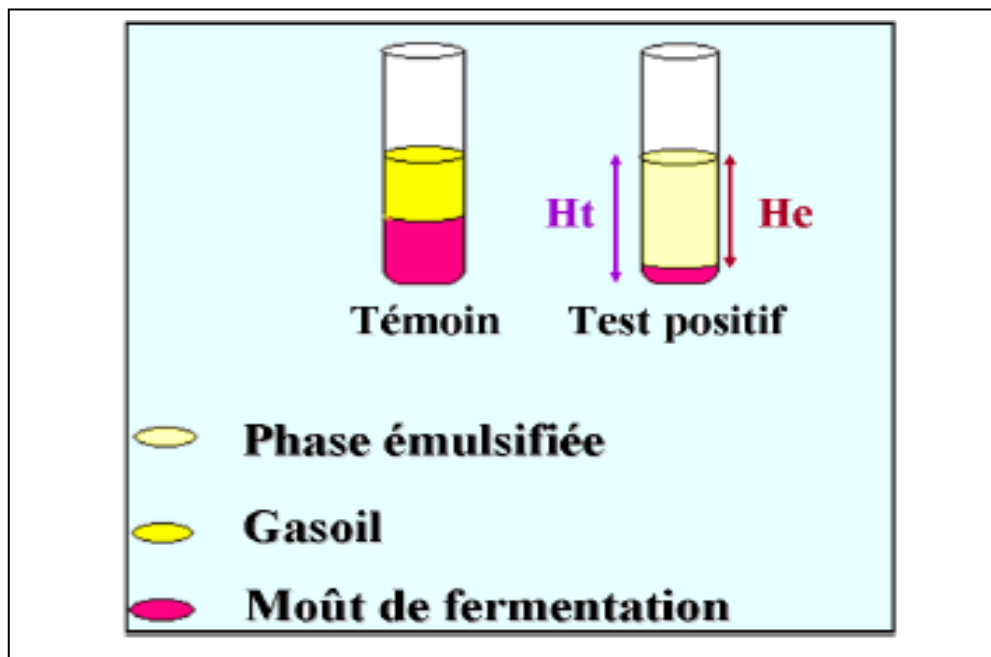


Figure 21: Test d'émulsification E_{24} .

– Calcul de l'index de l'emulsion E_{24}

C'est le rapport de la hauteur de l'emulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 (**Equation 6**).

$$E_{24} = (H_e / H_t) \times 100$$

Equation 6

H_e : hauteur d'émulsion (cm) ;

H_t : hauteur totale (cm).

IV.2.3. Mesure du *foaming* (mousse)

La hauteur de la mousse formée par le(s) biosurfactant(s) présent(s) dans le milieu de culture est déterminée par l'agitation du surnageant pendant 2 min, comme indiqué par **MOHAMMED, 1997** ; et elle est calculée par l'**Equation 7**.

$$\text{Foaming} = (\text{hauteur de la mousse formée} / \text{hauteur totale}) \times 100$$

Equation 7**IV.2.4. Test de l'activité de nettoyage du biosurfactant**

Pour déterminer si le ou les biosurfactant(s) produit(s) possède(nt) une activité de nettoyage on a réalisé le test décrit par **PRUTHI et CAMEOTRA, 2000** mais modifié par rapport au volume utilisé.

La paroi interne d'un bécher de 10,0 mL a été imbibé avec de l'huile de moteur neuf (Rebex LUBRIFIANTS, CHABA HD40), puis 10,0 mL du milieu de culture centrifugé (à 3000 tr/ 20 min) ont été introduits, le tout a été agité pendant 1 min et laissé reposer pendant 6 heures. La capacité de nettoyage est exprimée par la mesure de la hauteur de la paroi du bécher débarrassée d'huile.

Des essais témoins (milieu neuf (témoin négatif) et solution de SDS (témoin positif)) ont été réalisés dans les mêmes conditions, en utilisant le même volume et la même huile de moteur, sauf que les milieux diffèrent (l'un étant le milieu neuf et l'autre étant de la solution de SDS à 0,2%), les conditions de centrifugation du milieu neuf (3000 tr/20 min) ainsi que l'agitation et le temps de repos des béchers étant le même que celui du le milieu de culture.

IV.2.5. Détermination de la stabilité de l'émulsion

La stabilité de l'émulsion formée par le(s) biosurfactant(s) a fait l'objet de tests portant sur l'effet de deux facteurs physicochimiques que sont le pH et la température.

IV.2.5.1. Effet du pH

Ce test a été décrit par **CAMERON *et al.* (1988)**. Il consiste à étudier l'effet du pH (2, 6, 10, 14) sur la valeur du E_{24} .

IV.2.5.1.1. Protocole

- Centrifugation du milieu de culture moût de dattes (3000 tr/20 min).
- Récupération du surnageant
- 2,0 mL du surnageant ont été pris et pour lesquels le pH est ajusté et maintenu à la valeur souhaité (exemple pH = 2) à l'aide de HCl concentré ou de NaOH 2N.
- 2,0 mL de gasoil ont été ajouté aux tubes contenant les 2,0 mL du surnageant pour lesquels le pH été ajusté et maintenu.
- Agitation du mélange à l'aide d'un vortex pendant 2 min.
- Après homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante.
- l'index d'émulsion E_{24} a été calculé pour chaque tube du milieu de culture.

IV.2.5.2. Effet de la température

Ce test consiste à étudier l'effet de la température (4°C, 26°C, 50°C, 120°C) sur la valeur du E_{24} .

IV.2.5.2.1. Protocole

- Centrifugation du milieu de culture moût de dattes (3000 tr/20 min).
- Récupération du surnageant
- 2,0 mL du surnageant ont été pris et pour lesquels la température est maintenue a la valeur souhaité (exemple T = 50°C) pendant 60 min.
- 2,0 mL de gasoil ont été ajouté aux tubes contenant les 2,0 mL du surnageant pour lesquels la température été maintenue.
- Agitation du mélange à l'aide d'un vortex pendant 2 min.
- Après homogénéisation des deux phases, les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante.

- l'index d'émulsion E_{24} a été calculé pour chaque tube du milieu de culture moût de dattes.

V. Caractérisation des biosurfactants produits pour le milieu moût de dattes

V.1. Test de la gélose au sang (test d'hémolyse)

La méthode de la gélose au sang est largement utilisée pour cribler la production de biosurfactants, plusieurs études où cette méthode a été employée sont rapportées dans la littérature (**RODRIGUES *et al.*, 2005**). Brièvement, la souche a étéensemencée sur des boîtes de gélose au sang et incubées pendant 48 heures à 37°C ou 31°C. Les boîtes ont été inspectées visuellement pour les zones de dégagement autour des colonies. Le diamètre des zones claires dépend de la concentration du biosurfactant produit par la souche.

V.2. Méthode de détection et d'analyse de rhamnolipides

V.2.1. Méthode qualitative

Le test de la chute écroulé (**JAIN *et al.*, 1991**) est une méthode sensible pour le dépistage rapide de la production de rhamnolipides par différents isolats. Ce dosage consiste à appliquer une goutte de surnageant de la culture bactérienne à tester sur une plaque de polystyrène contenant des puits peu profonds recouvert d'huile. La gouttelette se répandra sur l'huile que si la culture échantillon de surnageant contient des rhamnolipides. Une approche similaire est utilisée dans l'essai d'étalement d'huile, dans lequel une goutte de surnageant bactérien est ajouté au-dessus d'une interface eau / huile (**MORIKAWA *et al.*, 2000**). La présence d'une molécule tensioactive provoquera la repoussée de l'huile, en formant une zone de compensation, dont le diamètre peut être corrélé avec l'activité des composés tensioactifs dans le surnageant.

Une approche plus précise sur la base des propriétés tensioactives des rhamnolipides est la mesure directe de la tension superficielle des bouillons de culture. Cette méthode est typiquement réalisée avec un tensiomètre DuNouy-type, qui mesure la force nécessaire pour tirer un anneau métallique mince sur la surface de la solution. La mesure de la tension superficielle après dilution successive de la solution, donne la concentration à laquelle la tension de surface commence à augmenter et fournit la concentration micellaire critique (CMC), ce qui est spécifique à chaque agent tensioactif. Par conséquent, le degré de dilution nécessaire pour atteindre la CMC permet la quantification de l'agent tensioactif dans la solution (CMD – dilution micellaire critique).

Toutefois, cette méthode souffre de certains inconvénients, car elle est fastidieuse et pas applicable au criblage à haut débit (**ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2011**).

En outre, comme pour tous les tests indirects antérieurs basés sur la tension superficielle, elle sera affectée par la présence de composés tensioactifs autres que les rhamnolipides.

V.2.2. Méthode quantitative

La quantification des rhamnolipides peut être réalisée au moyen de stratégies différentes.

Methodes spectrophotométriques

L'une des méthodes les plus utilisées pour la quantification des rhamnolipides est le test d'orcinol. Il consiste à chauffer les solvants d'extraction obtenus de surnageant de culture en présence d'acide sulfurique et d'orcinol (1,3-dihydroxy-5-méthylbenzene). Le groupe rhamnose de rhamnolipides est hydrolysé et transformé en furfural de méthyle, qui réagit ensuite avec l'orcinol pour produire une couleur bleu-vert qui peut être mesurée par spectrophotométrie à 421 nm (**CHANDRASEKARAN et BEMILLER, 1980 ; KOCH *et al.*, 1991**).

Une courbe standard est préparée avec le rhamnose, ou de préférence avec un mélange rhamnolipides standard pour la quantification. Lorsque le rhamnose est utilisé pour établir la courbe d'étalonnage, un facteur de correction doit être appliqué pour compenser la masse supplémentaire de la partie lipidique des rhamnolipides. **DEZIEL *et al.* (2000)** calculaient un facteur de correction de 2,25. Un problème avec cette approche est que le résultat variera en fonction de la proportion de mono à di-rhamnolipides de la culture à analyser. Une variante du test de l'orcinol utilise anthrone (9,10-dihydro-9-oxoanthracène) au lieu de l'orcinol pour créer un colorant qui peut être quantifiée à 625 nm (**HELBERT et BROWN, 1957 ; HODGE et HOFREITER, 1962**).

La méthode quantitative basée sur l'interaction de bleu de méthylène, le CTAB et rhamnolipids, comme cela est illustré dans l'essai d'agar CTAB, a été décrite récemment. Elle consiste à extraire les rhamnolipides dans du chloroforme auquel on ajoute les deux autres produits chimiques, et le complexe formé est détectée à 638 nm (**PINZON et JU, 2009b**).

V.3. Test phénol - acide sulfurique

Le phénol en présence de l'acide sulfurique peut être utilisé pour le dosage quantitatif des sucres et leurs dérivés méthylés. C'est une méthode colorimétrique proposée par **DUBOIS *et al.* (1956)**.

V.3.1. Protocole utilisé pour réaliser ce test

- Dilution de 0,015 g de biosurfactant extrait dans 2,0 mL d'eau distillée stérilisée ;
- Dilution de cette solution à 1/10;
- 2,0 mL de la solution ont été pris et mis dans un tube à essai propre ;
- 1,0 mL de phénol à 5% ont été ajoutés ;
- 5,0 mL d'acide sulfurique à 98% ont été ajoutés ;
- Agitation du mélange à l'aide d'un vortex ;
- Les tubes sont portés à ébullition pendant 15 min dans de l'eau bouillante au bain marie ;
- la densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde 480 nm.

V.4. Test à la Ninhydrine

Le test à la Ninhydrine est utilisé comme révélateur de composés protéiques et/ou des acides aminés. Pour pouvoir caractériser le(s) biosurfactant(s) produit(s) et pour savoir si il(s) est (sont) de nature protéiques, on a réalisé le test à la Ninhydrine.

V.4.1. Protocole

- Préparer une solution de biosurfactant(s) : 0,015 g de biosurfactant dans 2,0 mL d'eau distillée stérilisée ;
- Ajouter 3 gouttes de la solution de Ninhydrine à 0,5% ;
- Porter les tubes à ébullition au bain marie pendant 4 min, jusqu'à observation du changement de la couleur du mélange.

V.5. Test de croissance des lentilles

Pour voir si le(s) biosurfactant(s) produit(s) a une influence sur la croissance des lentilles, on a réalisé le test de croissance de ces dernières sur boîtes de Pétri on les arrosant avec une solution de biosurfactants dissout dans de l'eau distillée. Et pour cela on a suivi le protocole suivant :

- 50,0 g de sol ont été stérilisé dans l'autoclave à 120°C pendant 20 min ;
- 0,02 g de biosurfactant extrait ont été dissoute dans 50,0 mL d'eau distillée ;
- 30 graines de lentilles ont été bien nettoyé et mise dans une boîte de Pétri et recouvertes de sol, puis arrosée avec la solution du biosurfactant ;
- La croissance a été suivie durant 7 jours pour le biosurfactant et pour le témoin (ne comportant pas de biosurfactant), en mesurant la hauteur des germes obtenus à l'aide d'une règle.

V.6. Analyse par Infra Rouge FTIR**V.6.1. Extraction du biosurfactant**

Les biosurfactants sont extraits en utilisant la méthode de **SILVA *et al.*, (2010)**. Selon le protocole suivant :

- Le biosurfactant est extrait du milieu de culture après élimination des cellules bactériennes par centrifugation à 5000 tr/30 min ;
- Le pH du surnageant est ajusté à 2,0 avec du HCl, et le même volume de chloroforme (CHCl₃)/ méthanol (CH₃OH) (2 :1) est ajouté ;
- Le mélange est vigoureusement agité pendant 15 min permettant la séparation des phases ;
- La phase organique est enlever, et l'opération est répétée deux fois ;
- Le produit est concentré dans la phase organique en utilisant le Rota-vapeur ;
- Le produit visqueux jaunâtre obtenu est dissout dans le méthanol et concentré encore par solvant à 45°C.

V.6.2. L'analyse par infra rouge

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (**FTIR : *Fourier Transformed InfraRed spectroscopy***) est une méthode d'analyse chimique qui est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau à analyser. Elle permet, par la détection de vibrations caractéristique des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des molécules présentent dans le matériau.

L'appareil de mesure est un "spectrophotomètre à transformée de Fourier" (BRUKER, ALPHA). Il projette sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe, ainsi que les intensités de cette absorption (**Figure 22**).



Figure 22: Spectrophotomètre infra-rouge à Transformée de Fourier (BRUKER, ALPHA).

V.6.2.1. Protocole

- Une quantité de 100,0 à 130,0 mg de KBr est pesée ;
- 1,0 à 3,0 mg de notre échantillon à analyser ont été ajouté ;
- Mélanger le tout pour avoir une poudre bien homogène ;
- Mettre cette dernière dans le dispositif de compression pour obtenir un disque plat formé de la poudre ;
- Le disque est porté sur la plaque du spectrophotomètre infra-rouge à transformée de Fourier ;
- Le spectrophotomètre a été ensuite mis sur le blanc ;
- L'échantillon est fait passer au spectrophotomètre ;
- Les résultats sont donnés sous formes de différents spectres chacun correspondant à des longueurs d'ondes différentes (**Figure 23**).

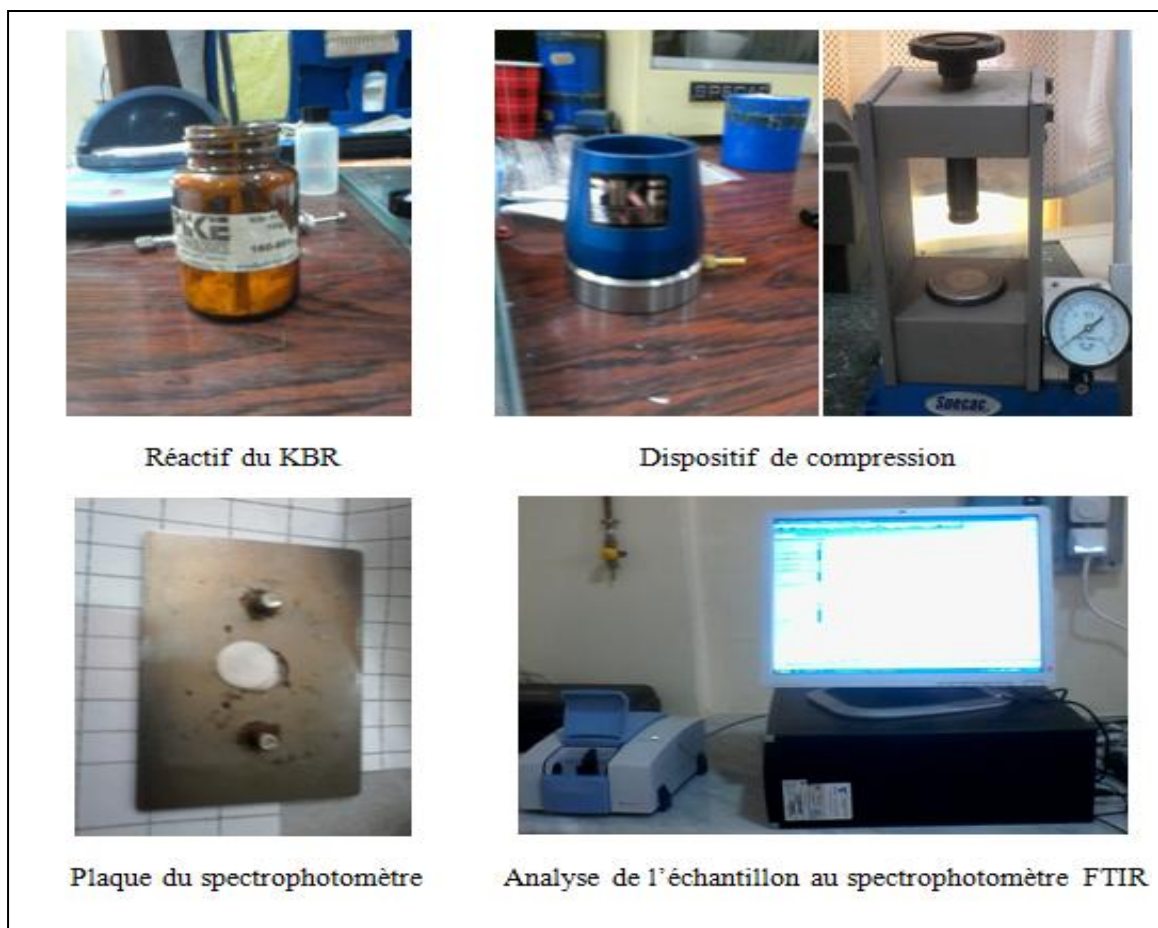


Figure 23: Les différentes étapes de l'analyse FTIR.

Chapitre IV

Résultats et Discussions

I. Etude des caractères microscopiques de la souche

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau X et la Figure 24.

A l'issue de cette coloration, on a distingué des bactéries colorées en rose, elles sont donc Gram négatif, de forme bacillaire. La morphologie microscopique de la souche suggère qu'elle appartient au genre *Pseudomonas* sp. (YIN *et al.*, 2009).

Tableau X: Observation microscopique de la souche.

Critère	Coloration de Gram		
	Arrangement	Forme des cellules	Gram
Souche	Isolés, diplo et amas	Bacilles	Négatif

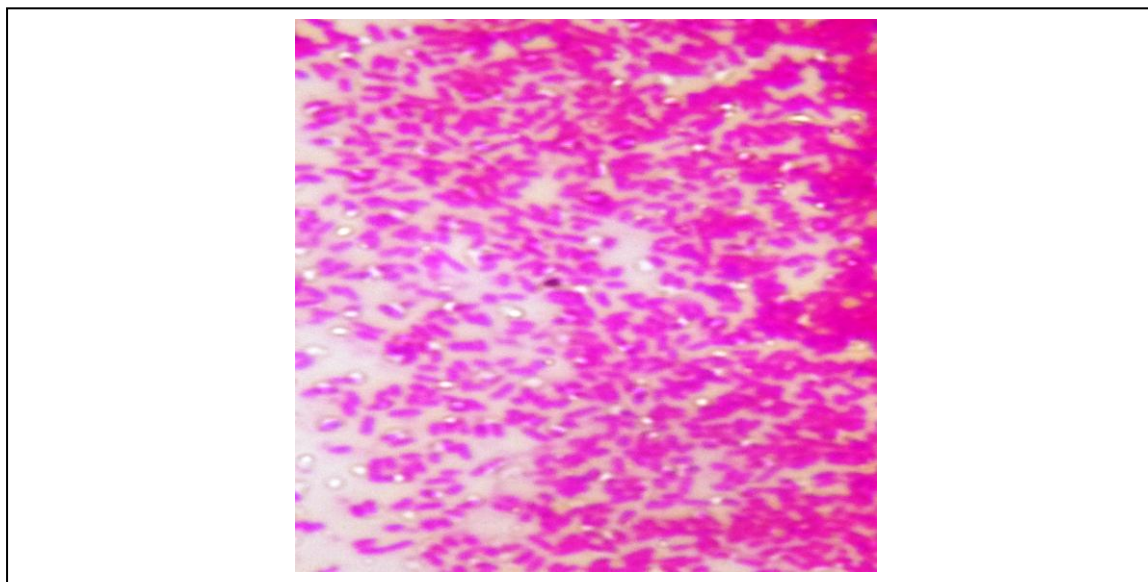


Figure 24: Résultat de la coloration de Gram.

• Etude des caractères macroscopiques de la souche

Forme et taille des colonies	Ondulée et punctiforme
Chromogénèse et opacité des colonies	Jaunâtre et translucide
Élévation des colonies	Convexe
Aspect de la surface et du contour des colonies	Lisse à bord régulier
Consistance et odeur des colonies	Visqueuse avec une odeur désagréable

II. Caractérisation physico-chimique du milieu moût de dattes

Les résultats de la caractérisation physico-chimique du milieu moût de dattes sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XI: Résultats de la caractérisation physico-chimique.

	Densité	Taux de matière sèche (TMS) (%)	Taux de cendre (%)
Moyenne	1,006±0,0000	13,509±0,3811	0,017±0,0007

La densité du milieu est estimée à 1,006 pour un volume de 100,0 mL du milieu, Le taux de matière sèche (TMS) pour le milieu est estimé à 13,509% ± 0,3811 et le taux de cendre est estimé à 0,017% ± 0,0007.

II.1. Mesure du pH du milieu moût de dattes

La mesure du pH pour le milieu nous a permis d'obtenir les résultats ci-dessous :

Tableau XII : Mesure du pH du milieu moût de dattes

pH	Avant ajustement	Après ajustement
Moyenne	5,385±0,0636	6,81±0,3818

III. Cinétiques de croissance de la souche bactérienne et de production de biosurfactants sur le milieu moût de dattes

Les cinétiques de croissance de la souche et de production de biosurfactants sur le milieu moût de dattes, ont été réalisées en mesurant la densité optique (DO) toutes les 24 heures à une longueur d'onde de 600 nm et l'index d'émulsification E_{24} durant 5 jours de culture.

Ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées dans la Figure 25.

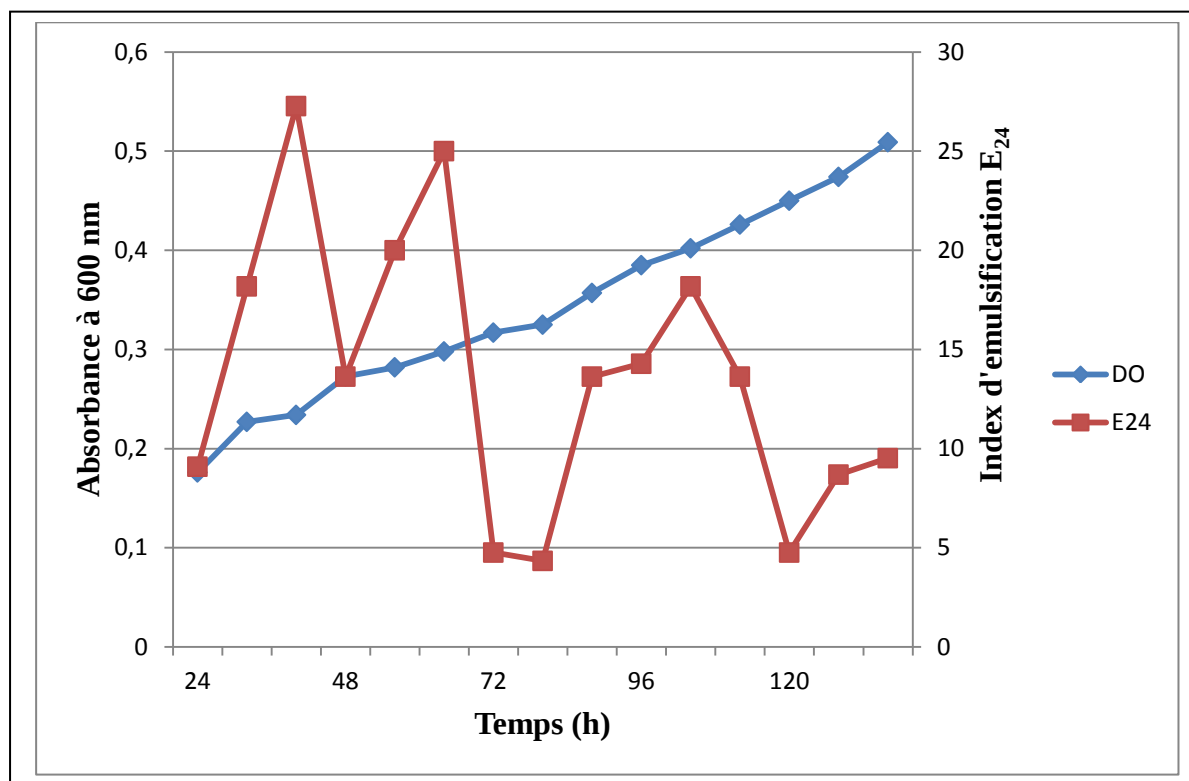


Figure 25 : Cinétique de croissance de la souche *Pseudomonas* sp. sur le milieu moût de dattes.

D'après la Figure 25, la courbe obtenue est une courbe typique d'une croissance microbienne, caractérisée par l'absence de phase de latence et par une longue phase exponentielle ($\mu = 0,00258 \text{ h}^{-1}$). Plusieurs auteurs ont observés le même comportement avec différents microorganismes (**ROCHA et al., 2007**).

Il existe plusieurs microorganismes capables de produire des biosurfactants, les espèces les plus importantes sont celles appartenant au genre *Pseudomonas* produisant des rhamnolipides.

Ce test a pour but l'estimation de la production des biosurfactants par la souche. La variation de l'index d'émulsification (E_{24}) en fonction du temps est rapportée dans la Figure 25. La souche bactérienne a la capacité d'émulsionner le gazoil. On remarque une production fluctuante du biosurfactant par la souche étudiée.

Par ailleurs, L'augmentation de l'index d'émulsification est proportionnelle à la concentration microbienne au bout des première 60 heures. Il atteint des valeurs qui fluctuent entre 27,27%, 25,00%, 13,63%, 18,18%. Des résultats similaires ont été rapportés par **BENINCASA et ACCORSINI, (2009)** et **LOVAGLIO et al, (2011)** en étudiant la production de biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa*. Ils ont obtenu des index d'émulsification de 50% et 58% respectivement.

Rappelons que les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains microorganismes. Leur nature, tout comme leur pouvoir tensioactif, sont fortement dépendants du type de microorganisme concerné (**ROSSIGNOL, 2007**).

Plusieurs travaux ont indiqués que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont la capacité de réduire la tension superficielle à des valeurs minimales et peuvent émulsionner et stabiliser les émulsions de différents types d'hydrocarbures et des huiles comme le pétrole brut, kérosène, n-alcanes, les composés aromatiques, l'huile d'olive et les huiles minérales et le diesel (**PATEL et DESAI, 1997 ; BENINCASA et al., 2004 ; WEI et al., 2005**).

D'après la Figure 25, la production maximale du biosurfactant est achevée au début de la phase exponentielle au bout de 24 à 48 heures de fermentation.

Comme indiqué précédemment, il existe une relation entre l'augmentation de la biomasse, et la production de biosurfactant par notre souche, ceci peut être expliqué par la phase prolongée de la croissance microbienne (**DAS et al., 2009**). Ce qui confirme que la production de biosurfactants s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, et qui suggère qu'il est produit comme métabolite primaire (**AMIRIYAN et al., 2004**). La croissance bactérienne associée à la production de biosurfactant pourrait faciliter l'adhérence des cellules bactériennes aux molécules de substrats hydrophobes et les métaboliser (**BARATHI et VASUDEVAN, 2001**).

Les microorganismes qui dégradent les hydrocarbures produisent des substances tensioactives et certaines d'entre eux, permettent la stabilité de l'huile ou les phases hydrophobes dans l'émulsion. Ces microorganismes peuvent être divisés en deux catégories, une qui produit les biosurfactants à faible poids moléculaire mais habituellement ne font pas des émulsions stables, et l'autre qui produit des biosurfactants qui agissent principalement en tant que stabilisateurs d'émulsions sans affecter la tension superficielle (**SILVA et al., 2010**).

D'après les résultats obtenus, notre souche *Pseudomonas* sp. peut être incluse dans la deuxième catégorie puisque son biosurfactant produit stabilise les émulsions de gasoil.

Après incubation de 5 jours, le biosurfactant a été extrait à partir du milieu de production par précipitation acide. Notre souche *Pseudomonas* sp. a pu produire 5,946 g de biosurfactant par litre de milieu de moût de dattes.

Dans leurs travaux, **WU et al. (2008)** ont pu produire par *Pseudomonas aeruginosa* 3,70 g/L et 2,63 g/L de biosurfactant en utilisant l'huile d'olive et l'huile de soja comme source de carbone respectivement. Par ailleurs, **COSTA et al. (2006)**, **RAHMAN et al. (2002)** et **HABA et al. (2000)**, signalent la production de 2,9 g/L de biosurfactant en présence de l'huile de buriti, de l'huile de carthame et de l'huile de friture respectivement par la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

On se basant sur nos résultats obtenus, on peut déduire que le milieu moût de dattes utilisé ici comme seule source de carbone est un substrat approprié pour la croissance et la production de biosurfactant, car ce dernier a été produit en quantité assez importante (5,946 g/L) avec un index d'émulsification de 27,27%.

SANTOS et al. (2010) ont indiqué que l'utilisation des huiles végétales comme seule source de carbone ont un grand potentiel comme substrat dans la production de biosurfactant par la souche de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, l'utilisation de l'huile de tournesol comme seul source de carbone par *Pseudomonas aeruginosa* a permis de produire un biosurfactant dont l'index d'émulsion est de 51% (**SIFOUR et al., 2007**). **ROBERT et al. (1989)**, ont également pu produire un biosurfactant par *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 en utilisant l'huile d'olive, avec un index d'émulsification de 49%.

IV. Dosage des protéines et des sucres réducteurs

IV.1. Dosage des sucres réducteurs

Le glucose et le fructose sont dosés grâce à leurs propriétés réductrices en milieu alcalin et à chaud, vis-à-vis de l'acide 3-5 dinitrosalicylique (3-5 DNS), par méthode colorimétrique.

La courbe étalon des sucres réducteurs tracé est montrée dans l'annexe V.

La concentration en sucres réducteurs pour le milieu moût de dattes est de $1,052 \pm 0,0005$ mg/mL.

IV.2. Dosage des protéines

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectrophotométrique utilisée pour déterminer la concentration des protéines en solution. Il s'agit en fait d'un dosage colorimétrique au bleu de Coomassie, selon la couleur de l'échantillon, l'absorbance va changée et il sera possible de déterminer la concentration de l'échantillon en comparant ces derniers avec des échantillons standardisés.

La courbe étalon des protéines tracé est montrée dans l'annexe V.

La concentration en protéines pour le milieu de culture est de $4,355 \pm 0,1204$ mg/mL.

Les résultats mentionnés ci-dessus, montrent que le moût de dattes présente une concentration de $1,052 \pm 0,0005$ mg/mL en sucres réducteurs. **OULD EL HADJ *et al.* (2006) ; CHAIRA *et al.* (2007)** ont enregistré respectivement des teneurs de 16,64% et 17% de sucres totaux pour les rebuts de la même variété. Comme il est à signaler aussi, que d'autres auteurs dont **AÇOURENE et TAMA, (2001) ; BELAIDI et BARKA, (2009)**, ont analysé le moût extrait des rebuts de la même variété, et obtenu une teneur de 9,13% en sucres réducteurs.

La concentration en sucres réducteurs de $1,052 \pm 0,0005$ mg/mL de ce moût, fait de ce dernier un milieu riche en sucres indispensables au développement de divers microorganismes à intérêt industriel utilisés en fermentation pour la valorisation de ces rebuts, et permet de mettre sur le marché local et international une nouvelle génération de produits à haute valeur ajoutée, tels que la levure boulangère, l'éthanol et l'acide citrique (**OULD EL HADJ *et al.*, 2006 ; BOULAL *et al.*, 2010 ; AÇOURENE *et al.*, 2011**).

Comme mentionné plus haut, le moût de dattes étudié présente une concentration de $4,355 \pm 0,1204$ mg/mL en protéines. **AL HOOTI *et al.* (1997)** ; **KHALIL *et al.* (2002)** et **BESBES *et al.* (2009)** signalent que la teneur en protéines des dattes est faible et ne dépasse pas généralement les 3%. D'après les résultats de ces auteurs, on conclut que le moût de dattes est pauvre en azote, qui reste un élément indispensable pour le développement des bactéries. En conséquence l'utilisation du milieu moût de dattes comme milieu de culture nécessite l'ajout d'une source azotée.

V. Test d'antibiogramme

Les résultats du test d'antibiogramme pour les différentes souches sont regroupés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats du test d'antibiogramme pour le milieu moût de dattes

Souches	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>sp</i>	<i>Klebsiella</i> <i>sp</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 43300
Diamètre d'inhibition pour la solution mère (cm)	0,80±0,0000	—	—	—	—
Diamètre d'inhibition de la dilution 1/2 (cm)	—	0,75±0,0707	—	0,65±0,0707	—
Diamètre d'inhibition de la dilution 1/5 (cm)	—	—	—	—	—
Diamètre d'inhibition de la dilution 1/10 (cm)	—	—	—	—	—

(—) : Absence d'inhibition

Le biosurfactant produit à partir de la culture de *Pseudomonas* sp. a montré une activité antimicrobienne contre les trois bactéries photogènes *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *E. coli* ATCC 25922.

Les zones d'inhibition obtenue pour le biosurfactant de *Pseudomonas* sp. étaient de 0,80cm±0,0000 ; 0,75±0,0707 ; 0,65±0,0707 avec *E. coli*, *Staphylococcus* sp, *E. coli* ATCC 25922 respectivement. Et pour les autres souches *Klebsiella* sp, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 le résultat était négatif (absence d'inhibition).

Plusieurs études ont rapporté un effet similaire exercé par des biosurfactants sur diverses souches pathogènes. Ainsi, l'effet antimicrobien des biosurfactants a été rapporté dans plusieurs études telle celle **FERHAT et al. (2011)** dans laquelle *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1544 et *Staphylococcus aureus* ATCC 9144 ont été inhibées par les agents tensioactifs produits par *Brevibacterium* 7G et *Ochrobactrum* 1C.

D'autres biosurfactants comme des lipopeptides produits par *Bacillus licheniformis* BAS50 (**YAKIMOV et al., 1995**), des glycolipides élaborés par *Streptococcus thermophilus* A (**RODRIGUES et al., 2006**), et des glycolipides synthétisés par *Tsukamurella* sp (**LANGER et al., 2006**) présentent aussi une activité antibactérienne.

VI. Test de la croissance des lentilles

Le test de croissance des lentilles en présence de biosurfactant montre des résultats très intéressants. En effet, la hauteur moyenne des plantes pour l'essai atteint 12,0 cm±0,2645 après une semaine de culture, alors que celle observée chez le témoin n'est que de 3,666 cm±1,5275 après la même période de culture (**Figures 26 et 27**).

Ce résultat montre que les lentilles semblent utiliser le biosurfactant comme élément stimulateur de leur croissance, ce qui nous laisse supposer que le biosurfactant agirait comme un solubilisant des matières minérales (tel que le Fer, le Soufre, le Phosphate, le Cuivre, etc.) dont la plante a besoin pour sa croissance.

Différents agents stimulateurs de la croissance des plantes ont été décrits. Les sidérophores, par exemples, sont produits par de nombreux microorganismes, ils servent de pourvoyeur de Fer pour les plantes, et ce, grâce à leur propriété chélatrices des ions Fe³⁺ (**NEILANDS et LEONG, 1986**).

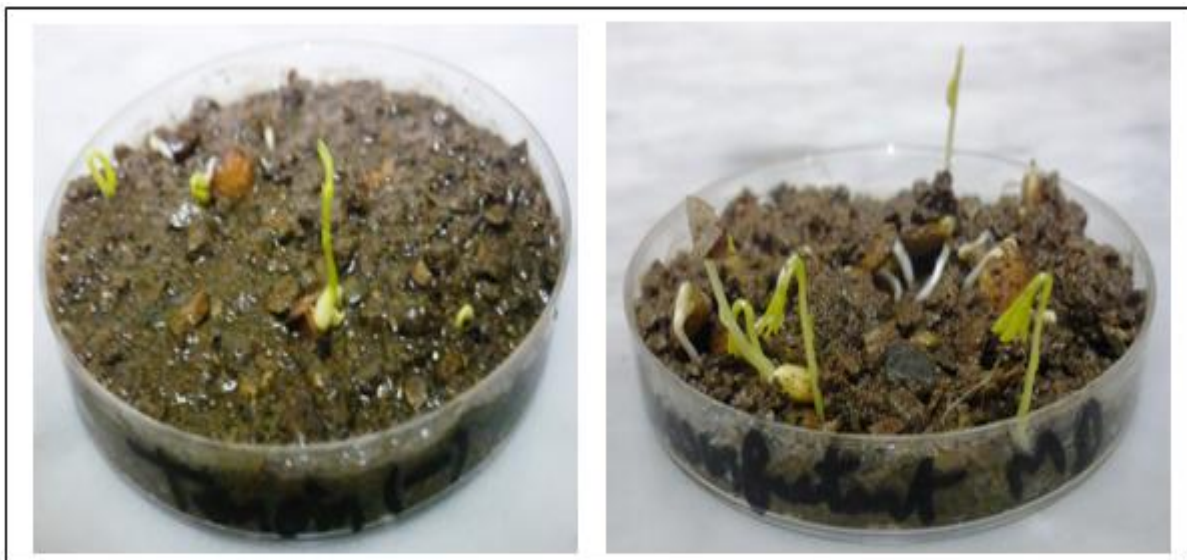


Figure 26 : Résultat du test de croissance du témoin négatif et du milieu contenant le biosurfactant après 1 jour de croissance.



Figure 27 : Résultat du test de croissance du témoin négatif et du milieu contenant le biosurfactant après 7 jours de croissance.

VII. Mesure du *foaming* (mousse)

Les résultats du test de *foaming* obtenus montrent un rapport de $35,983\% \pm 2,9502$.



Figure 28: Mesure de la mousse pour le milieu de culture.

RICHARDSON (2009) a réalisé un test du *foaming* avec les rhamnolipides et les dilipides et il a démontré en réalisant ce test dans son étude que les dilipides produisent significativement moins de mousse que les rhamnolipides. Cette caractéristique peut avoir un intérêt quant à une production et des applications à l'échelle industrielle.

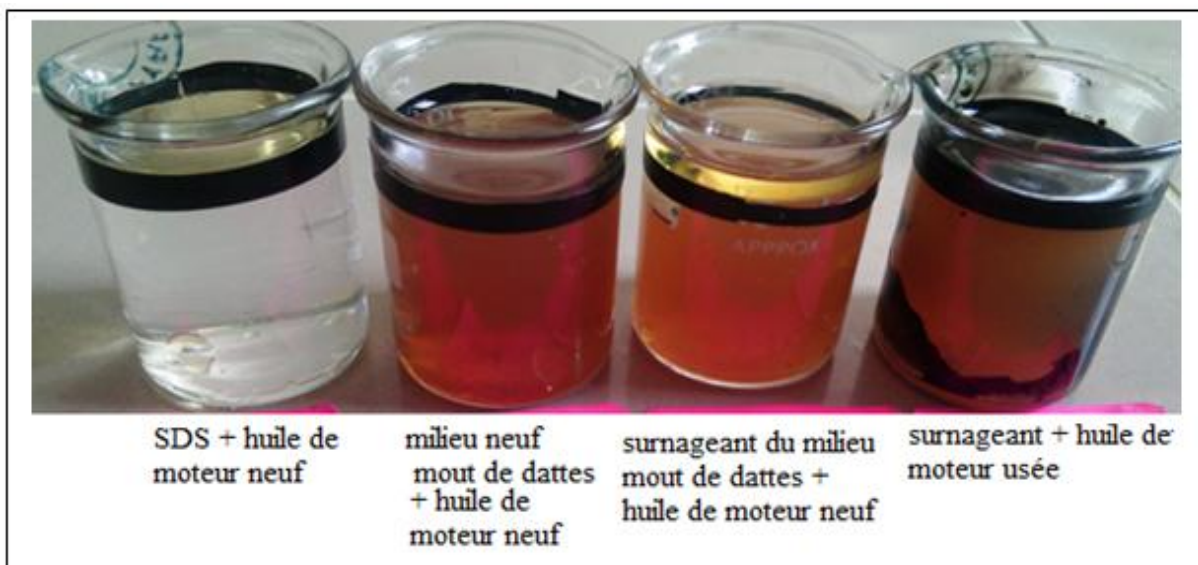
VIII. Test de l'activité nettoyante du biosurfactant

Figure 29: Résultats de l'activité nettoyante des béchers.

Tableau XIV: Résultats de l'activité nettoyante du biosurfactant

Milieux	Rapport Hn/Ht x100 (%)
SDS + huile de moteur neuf	80,0
Milieu neuf + huile de moteur neuf	40,0
Surnageant + huile de moteur neuf	100,0
Surnageant + huile de moteur usée	62,0

Hn : Hauteur nettoyée, Ht : Hauteur totale.

Dans cette étude on a obtenu des résultats de nettoyage des béchers de 40%, 62%, 80% et 100%, pour le SDS en milieu neuf, l'huile de moteur usée en présence du surnageant, l'huile de moteur neuf en milieu neuf et l'huile de moteur neuf avec le surnageant respectivement. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de **SILVA *et al.* (2014)** dans leur étude sur l'application de biosurfactants dans le test de nettoyage de contaminant hydrophobe, ils ont montré que le potentiel du biosurfactant isolé pour le nettoyage d'un solide contaminé par une couche d'huile a été considéré comme satisfaisant, avec un taux de retrait de 80% par rapport aux parois du bécher.

Cependant, le taux d'enlèvement avec le milieu de fermentation a été de 100%. Ils ont constaté que cette différence peut être attribuée à la faible solubilité du biosurfactant isolé dans l'eau.

IX.Effet de la température sur le biosurfactant produit

Afin de voir si la température influence les propriétés émulsifiantes du biosurfactant produit, on a réalisé le test de l'effet de température, et ce en mesurant l'index d'émulsification E_{24} pour le milieu neuf moût de dattes (témoin) et pour le milieu de culture après les avoirs soumis à différentes valeurs de température de 4°C, 26°C (température ambiante), 50°C, et 120°C.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 30 et le Tableau XV.



Figure 30 : Photo représentant les résultats du test E_{24} pour les différentes valeurs de températures testées.

Tableau XV: Effet de la température sur le biosurfactant produit.

Température (°C)	E_{24} du milieu de culture (%)
4°	$4,77 \pm 0,3252$
26°	$11,79 \pm 10,2530$
50°	$13,85 \pm 6,1235$
120°	$22,22 \pm 0,7000$

Les températures testées semblent avoir un effet sur la stabilité des émulsions formées. En effet, il semblerait qu'à basse température (4°C), la valeur du E_{24} (4,77%) est significativement inférieure à celle (22,22%) observée à température élevée (120°C).

Selon **BANAT (2000)**, les biosurfactants produits par la plupart des microorganismes deviennent instables dans les conditions physico-chimiques extrêmes à savoir les variations de la température, pH, ou la présence de forte concentration de solvant, qui peuvent avoir un effet déstabilisant sur les émulsions formées. Et dans notre étude, on a pu obtenir un résultat similaire.

X. Effet du pH sur le biosurfactant produit

Afin de voir si le pH influence les propriétés émulsifiantes du biosurfactant produit, on a réalisé le test de l'effet de pH, et ce en mesurant l'index d'émulsification E_{24} pour le milieu neuf moût de dattes (témoin) et pour le milieu de culture après les avoirs soumis à des différents pH (pH = 2, pH = 6, pH = 10, pH = 14).

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 31 et dans le Tableau XVI.

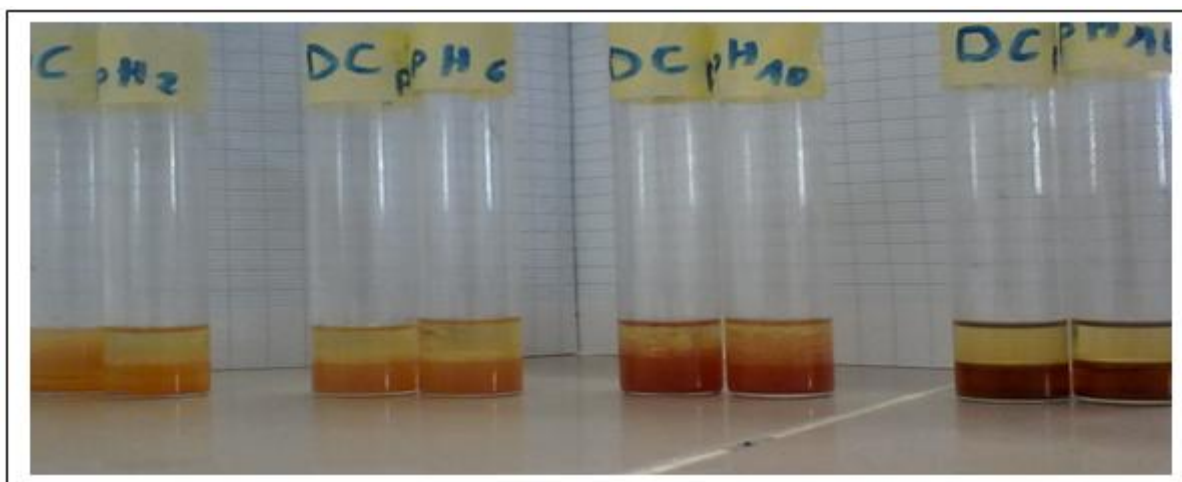


Figure 31 : Photo représentant les résultats du test E_{24} pour les différentes valeurs de pH testées.

Tableau XVI: Effet du pH sur le biosurfactant produit.

pH	E_{24} du milieu de culture (%)
2,04±0,0141	51,54±19,0282
6,01±0,0070	27,11±4,6881
9,98±0,0070	44,36±4,8931
13,84±0,0141	8,89±0,2828

Les pH testés semblent avoir un effet sur les propriétés émulsifiantes du biosurfactant étudié. En tenant compte des écarts-types, il faut juste souligner la faible valeur du E_{24} observée à pH très alcalin et donc l'effet négatif sur les propriétés émulsifiante du biosurfactant étudié.

Ces résultats corroborent ceux précédemment rapportés pour les rhamnolipides par les auteurs **PRIYA et USHARANI, (2009)**. Ils ont montré une production maximale de rhamnolipides à pH acide (pH 5) et neutre (pH 7) en utilisant *Pseudomonas aeruginosa*.

XI. Test de la gélose au sang

L'hémolyse du sang est utilisée pour le criblage préliminaire des microorganismes pour leur capacité à produire des biosurfactants (**VANDANA et KIRAN PETER, 2014**).

Dans notre étude l'interprétation de ce test pour le milieu moût de dattes nous a donné le résultat (–) : absence d'hémolyse (**Figure 32**).

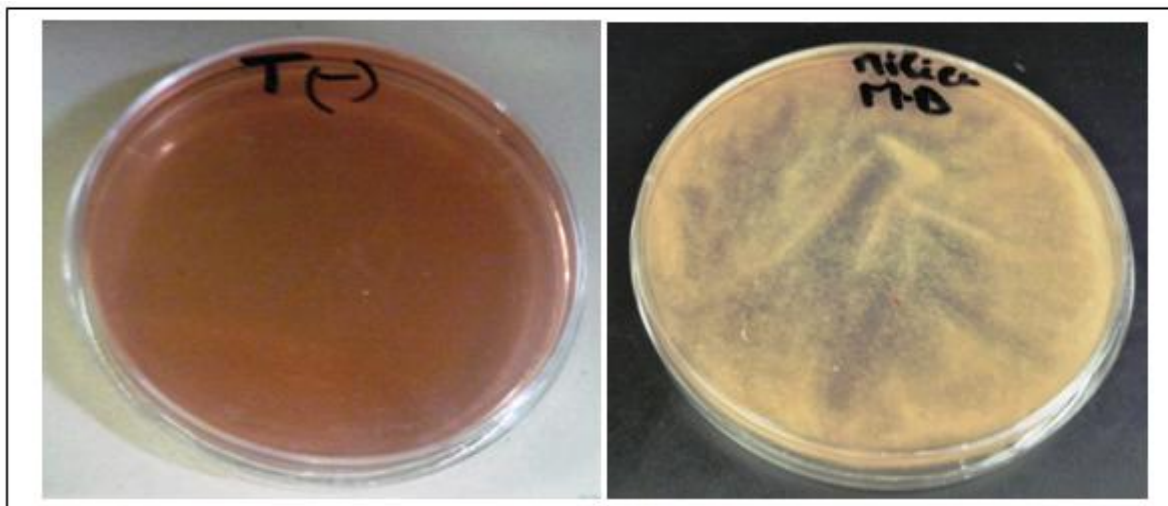


Figure 32 : Test de la gélose au sang pour le biosurfactant.

Le test de la gélose au sang dans cette étude s'est révélé négatif. Une étude similaire a été réalisée par **ANANDRAJ et THIVAKARAN, (2010)**, dans laquelle *Pseudomonas* a été criblée pour la production d'une activité tensioactive sur milieu gélose au sang et qui a montré une hémolyse.

De nombreuses études ont porté sur l'utilisation du test de l'hémolyse de sang pour la mise en évidence de la production de biotensioactifs par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (**NICHOLLS et al., 2000 ; SATPUTE et al., 2008 ; ANANDRAJ et THIVAKARAN, 2010 ; SAMANTA et COLL, 2012 et SNEHA et al., 2012**). Une autre étude avec des souches de *Lactobacillus* ont montré une hémolyse complète alors que pour d'autres souches de la même espèce, aucune activité hémolytique n'a été observée (**RODRIGUES et al., 2005**).

Le test d'hémolyse du sang est utilisé pour le criblage préliminaire de la capacité des microorganismes à produire des biosurfactants. Par conséquent, ces microorganismes qui montrent une hémolyse positive du sang sont considérés comme producteurs potentiels de biosurfactants. L'essai prédit également l'activité de surface des microorganismes produisant les biosurfactants.

XII. Test phénol-acide sulfurique

Le test de la réaction phénol-acide sulfurique permet de distinguer la nature chimique des biosurfactants appartenant au groupe des glycolipides.

Nous avons réalisé ce test en utilisant le biosurfactant pure extrait du milieu de culture moût de dattes, pour lequel on a ajouté 1 mL de phénol et 5 mL d'acide sulfurique.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 33.



Figure 33: Test phénol-acide sulfurique pour le milieu de culture moût de dattes.

La densité optique est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde 480 nm.

Les résultats montrent un changement de couleur du milieu ainsi qu'une absorbance à 480 nm de $1,779 \pm 0,0017$, ce qui nous laisse dire que le biosurfactant produit comporte une partie glycosidique, suggérant une nature glycolipidique.

XIII. Test à la Ninhydrine

Le test de la réaction à la Ninhydrine permet de distinguer la nature chimique des biosurfactants appartenant au groupe des lipopeptides.

Les résultats obtenus pour ce test sont représentés dans la Figure ci-dessous :



Figure 34 : Test à la Ninhydrine pour le milieu de culture moût de dattes.

Le test à la Ninhydrine n'indique aucun changement de couleur du milieu ce qui nous laisse dire que le biosurfactant n'est pas de nature lipopeptidique.

Le biosurfactant produit par notre souche *Pseudomonas* sp. peut être considéré comme étant de nature rhamnolipidiques puisque les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour produire des biosurfactants glycolipidiques contenant le rhamnose et les acides gras qui sont nommés les rhamnolipides (**GUNTHER et al., 2005**). Leurs compositions chimiques et activité émulsifiante dépendent non seulement de la souche productrice, mais aussi des conditions de culture et des paramètres physiques (température, aération, agitation et pH), ainsi que la nature des sources de carbone et d'azote qui influencent la quantité et la qualité du biosurfactant produit (**CALVO et al., 2009**).

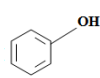
XIV. Caractérisation structurale du biosurfactant par Infra Rouge**XIV.1. Première approche dans l'analyse d'un spectre IR****Un groupe carbonyle est-il présent ?**

Les groupes C=O donnent une absorption intense dans la région $1820-1600\text{ cm}^{-1}$. La bande est souvent la plus intense du spectre. Sa largeur est moyenne. Vous ne pouvez pas la rater.

Si un groupe C=O est présent

- **ACIDES (COOH)** : Si OH est aussi présent. La bande OH est très large $3400-2400\text{ cm}^{-1}$ (elle recouvre les C-H).
- **AMIDES (O=C-NHR)** monosubstituée sur l'azote ou **(O=C-NH₂)** non substituée sur l'azote : vérifiez qu'il y a une ou 2 bandes N-H dans la zone 3500 cm^{-1} (intensité moyenne à forte).
- **ESTERS (O=C-O-R)** : vérifiez la présence C-O (absorption intense vers 1000 à 1300 cm^{-1}).
- **ANHYDRIDES (O=C-O-C=O)** : si 2 absorptions C=O vers 1760 et 1810 cm^{-1} .
- **ALDEHYDES (O=C-H)** : vérifiez la présence C-H aldéhyde: 2 bandes d'intensité moyenne vers 2750 et 2850 cm^{-1} .
- **CETONES (O=C-R)** : si les cinq choix précédents sont éliminés.

Si un groupe C=O est absent

- **ALCOOLS (-C-OH) et PHENOLS** () : recherchez bande O-H large dans la zone $3300-3600\text{ cm}^{-1}$; confirmé par la présence d'une bande C-O entre 1000 et 1300 cm^{-1} .
- **AMINES primaires (RNH₂) et secondaires (RNHR')** : vérifiez l'absorption N-H (intensité moyenne) vers 3500 cm^{-1} .
- **ETHERS (C-O-C)** : recherchez la présence de la bande C-O (et l'absence O-H) vers 1000 à 1300 cm^{-1} .
- **Double liaisons et (ou) noyau aromatique**
 - **ALCENE** : absorption assez faible vers 1650 cm^{-1} . On confirme l'existence C=C en consultant la région des =C-H au delà de 3000 cm^{-1} .
 - **AROMATIQUE** : absorption d'intensité moyenne à forte dans la région 1450 à 1650 cm^{-1} . On confirme l'existence C=C en consultant la région des =C-H au delà de 3000 cm^{-1} .

- **Triples liaisons**
 - **NITRILES ($C\equiv N$)** : absorption d'intensité moyenne, pic très fin vers 2250 cm^{-1} .
 - **ALCYNES ($-C\equiv C-$)** : absorption fine d'intensité faible vers 2150 cm^{-1} . Pour alcynes vraies, recherchez aussi si C-H est présent vers 3300 cm^{-1} : bande assez intense et assez fine.
- **Fonction "NITRO"** : NO_2 présente 2 bandes fortes vers 1500 à 1600 cm^{-1} et 1300 à 1390 cm^{-1} .
- **Hydrocarbures saturés**
 - Si aucune des informations ci-dessus n'a été observée.
 - Si les absorptions principales sont situées dans la région des C-H en dessous de 3000 cm^{-1} .
 - Si le spectre est très simple, seulement des absorptions vers 1450 , 1375 et peut-être 720 cm^{-1} .

XIV.2. Résultats de l'analyse Infra Rouge de Transformée de Fourier

Le spectre de rhamnolipides de *Pseudomonas* sp. est représenté sur la Figure 35.

Les zones entre 500 - 4000 cm^{-1} ont montrées le O-H (alcool) une vibration d'élongation à $3418,09\text{ cm}^{-1}$, le C-H vibration d'élongation à $2933,19\text{ cm}^{-1}$, le C=O vibration d'élongation entre 1500 - 2000 cm^{-1} , le C=C vibration d'élongation à $1638,67\text{ cm}^{-1}$, le CH_2 vibration de déformation à 1450 cm^{-1} , le O-H (acide) vibration de déformation à $1418,25\text{ cm}^{-1}$, le C-O vibration d'élongation à $1263,21\text{ cm}^{-1}$, le spectre montre également les vibrations d'élongation à $1134,17\text{ cm}^{-1}$, $1106,09\text{ cm}^{-1}$, $1055,45\text{ cm}^{-1}$ typique pour le groupe C-O, et une vibration de déformation des groupes $\text{CH}=\text{CH}$ à $927,07\text{ cm}^{-1}$. Ces résultats sont en bon accord avec un spectre IR des rhamnolipides.

Le biosurfactant produit par notre souche *Pseudomonas* sp. peut être considéré comme étant de nature rhamnolipidique puisque les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour produire des biosurfactants glycolipidiques contenant le rhamnose et les acides gras qui sont nommés les rhamnolipides (GUNTHER *et al.*, 2005). Leur composition chimique et activité émulsifiante dépendent non seulement de la souche productrice, mais aussi des conditions de culture et des paramètres physiques (température, aération, agitation et pH), ainsi que la nature des sources de carbone et d'azote qui influencent la quantité et la qualité du biosurfactant produit (CALVO *et al.*, 2009).

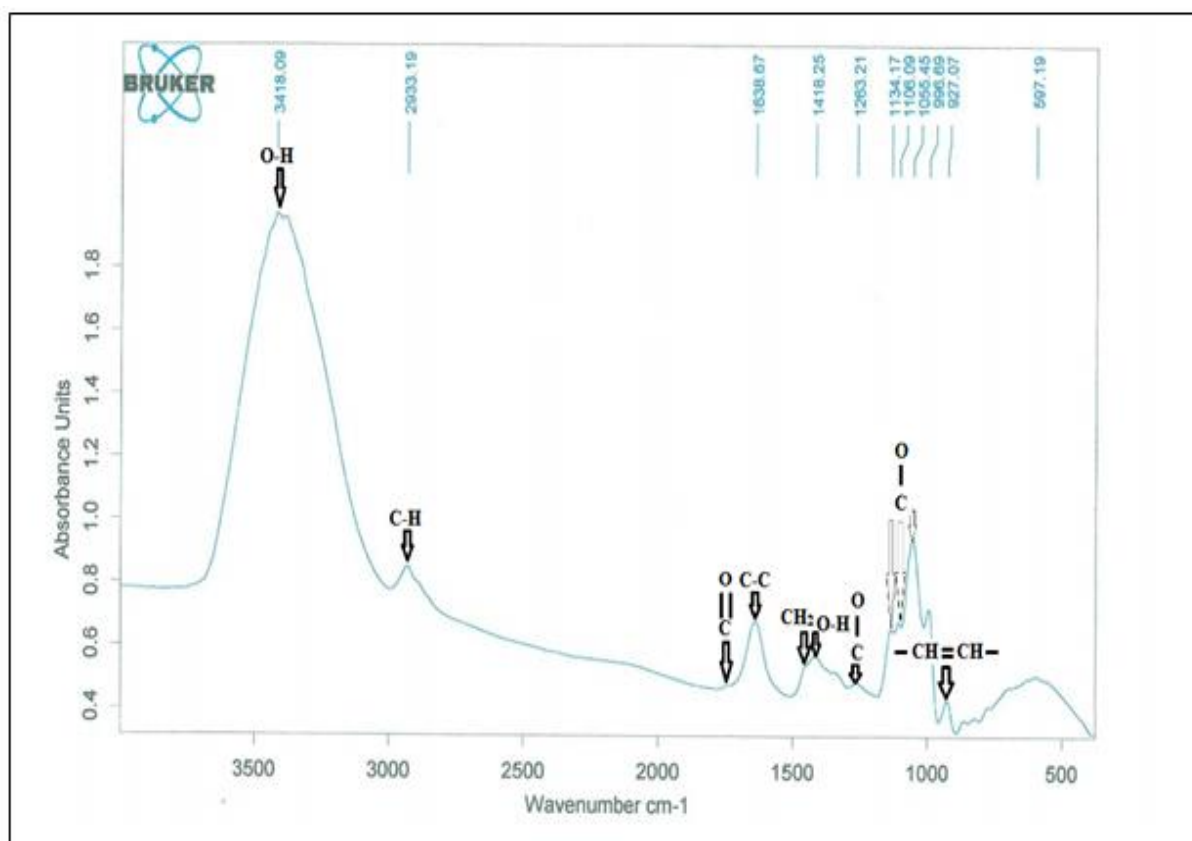


Figure 35: Le spectre IR du biosurfactant produit.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail est la caractérisation préliminaire de biosurfactant(s) secrété(s) par *Pseudomonas* sp. et l'évaluation de deux effets : antibactérien et stimulateur de croissance.

La souche bactérienne décrite dans notre étude est *Pseudomonas* sp. produisant un biosurfactant appartenant à la classe des glycolipides, le rhamnolipide. Solubilisant le gasoil, et améliorant la croissance. Ces propriétés rendent son utilisation possible dans le traitement des sols contaminés par les polluants tel que le gasoil, ainsi qu'à l'échelle agricole.

Dans un premier temps, la culture de *Pseudomonas* sp. en présence du milieu moût de dattes utilisé comme substrat a permis la production d'une quantité importante de biosurfactant (5,946 g / L du milieu) ayant un bon index d'émulsification (27,27%).

La caractérisation du biosurfactant produit a été mise en évidence par plusieurs tests physico-chimiques, indiquant ainsi sa nature chimique et ces propriétés émulsifiante, moussante, ainsi que l'effet antibactérien et l'effet stimulateur de croissance.

Ce biosurfactant présente une activité antibactérienne vis-à-vis de certaines souches pathogènes, ainsi qu'un effet stimulateur de la croissance des lentilles (*Lens culinaris*).

Les résultats de l'effet de pH et de température indiquent que ces derniers semblent avoir un effet sur la stabilité des émulsions formées, vu qu'à des températures basses l'index d'émulsification diminué (4,77%) et à des températures plus élevées il augmenté (22,22%), inversement pour les résultats du pH, vu qu'à des pH acides les valeurs du E_{24} augmentées (51,54%) et à pH alcalin elles diminuées (8,89%).

Le test de l'activité nettoyante montre aussi que le potentiel du biosurfactant pour le nettoyage d'un béccher contaminé par une couche d'huile a été considéré comme satisfaisant avec un taux de retrait de 100% pour une huile de moteur neuf et de 62% pour une huile de moteur usée.

Les résultats de l'analyse infrarouge suggèrent que les biosurfactant(s) produit(s) par la souche testée serait (ent) de nature rhamnolipidique.

Au terme de notre étude, nous tenons à signaler que les résultats de la caractérisation restent préliminaires. Il est nécessaire d'approfondir l'étude afin de confirmer les résultats obtenus.

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

- La réduction du coût de production du biosurfactant en testant d'autres substrats à faibles valeurs marchandes (huile de friture, huile de vidange, fractions pétrolières, etc.).
- L'étude de son activité antibactérienne contre d'autres souches microbiennes pathogènes notamment fongiques.
- il est souhaitable d'exploiter la production de biosurfactant dans des bioréacteurs afin d'améliorer les rendements de production.
- Identification moléculaire de la souche testée par la méthode ARNr 16S.

Références Bibliographiques

A.

1. ABALOS A., PINAZO A., INFANTE M.R., CASALS M., GARCIA F. et MANRESA A., (2001). Physiochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir*, 17 (5): 1367-1371.
2. ABDEL-MAWGOUD A., LEPINE F., DEZIEL E., (2011). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5): 1323-36.
3. ABDUL A.A. et GIBSON T.L., (1991). Laboratory studies of surfactant-enhanced washing of biphenyl from sandy material, *Environment Science Technology*, 25 (4): 665-671.
4. ABOUSEOUD M., MAACHI R., AMRANE A., BOUDERGUA S., NABI A., (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223: 143-151.
5. ACHOUAK W., SUTRA L., HEULIN T., MEYER J.M., FROMIN N., DEGRAEVE S., CHRISTEN R et GARDAN L., (2000). *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 50: 9-18.
6. AÇOURENE S. and AMMOUCHE A., (2011). Optimization of etanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, DOI 10.1007/s10295-011-1070-0, pp.1-8.
7. AÇOURENE S., BUELGUEDJ M., TAMA M. et TALEB B., (2001). Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des Ziban. *Revue Recherche Agronomique*, N° 8, Ed. INRAA, pp.19-39.
8. AL HOOTI S., SIDHU J.S., QABAZARD H., (1997). Physicochemical characteristics of five date fruit cultivars grown in the United Arab Emirates, *Journal of Plants Foods for Human Nutrition*, Vol. 50, pp. 101-113.
9. AL-TAHHAN R.A., SANDRIN T.R., BODOUR A.A. and MAIER R.M., (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface proprieties and interaction with hydrophobic substrates, *Applied Environment Microbiology*, 66: 3262-3268.

10. **AMANI H., (2015).** Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micro model, *Journal Petroleum Science Engineering*, 128: 212-219.
11. **AMANI H., SARRAFZADEH M.H., HAGHIGHI M., MEHRNIA M.R., (2010).** Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, *Journal of petroleum Science and Engineering*, Vol.75, pp.209-214.
12. **AMIRIYAN A., ASSADI M.M. et SAGGADIAN V.A., (2004).** Bioemulsan production by Iranian oil reservoirs microorganisms, *Iranian Journal Environment Health Science Engineering*, 2: 28-35.
13. **ANANDRA B. et THIVAKARAN P., (2010).** Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil, *Bioscience Technology*, 1(3): 120-126.
14. **ANZAI Y., KIM H., PARK J.Y., WAKABAYASHI H., OYAIZU H., (2000).** Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence, *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 50(4): 1563-1589.
15. **ARINO S., MARCHAL R. et VANDECASTELLE J.P., (1996).** Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by *Pseudomonas* species, *Applied Microbiology Biotechnology*, 45: 162-168.
16. **ARINO S., MARCHAL R. et VANDECASTEELE J.-P., (1998).** Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community, *Journal Application Microbiology*, 84, 769-776.
17. **AUGUESTIJN D.C., JESSUP R.E., RAOP S.C. et WOOD A.L., (1994).** Remediation of contaminated soils by solvent flushing. *Journal Environment*, 120 (1): 41-57.
- B.**
18. **BAI G., BRUSSEAU M.L. et MILLER R.M., (1997).** Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil, *Journal Contamination Hydrology*, 25: 157-170.
19. **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 by biosurfactant, *Journal Contamination Hydrology*, 30: 265-279.
20. **BANAT I., FRANZETTI A., GANDOLFI I., BESTETTI G., MARTINOTTI M., FRACCHIA L., (2010).** Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2): 427-44.

21. **BANAT I.M., (1995).** Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation: *a review*, *Bioresource Technology*, 51: 1-12.
22. **BANAT I. M, MAKKAR R.S., CAMEOTRA S.S., (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, 53(5) :495-508.
23. **BANAT I., SAMARAH N., MURAD M., HORNE R., et BENERJEE S., (1991).** Biosurfactant production and use in oil tank clean-up., *World Journal Microbiology Biotechnology*, 7: 80-84.
24. **BANAT M., MAKKAR R.S. et CAMEOTRA S.S., (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants, *Applied Microbiology Biotechnology*, 53 :495-508.
25. **BARATHI S., VASUDEVAN N, (2001).** Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environmental International*, 26: 413-416.
26. **BATTLE S.E., RELLO J. and HAUSSEER A.R., (2009).** Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Literature*, 290: 70-78.
27. **BEHRENDT U., ULRICH A., SCHUMANN P., MEYER J-M and SPROER C., (2007).** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphère of grasses, *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 57(5): 979-985.
28. **BELAIDI M. et BARKA I., (2009).** Activité α -amylasique d'*Aspergillus niger* et *Candida guilliermondii* cultivées dans un milieu à base de rebuts de dattes. *Mémoire d'Ingénieur*. INATAA. Constantine, p.76.
29. **BELL-PERKINS L.J., et LYNCH J.M., (2002).** Rhizosphere microbiology., In G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada., p. 2713-2728.
30. **BENERJEE S., (1991).** Biosurfactant for desludging crude fuel oil storage tank. *Chemical industry digests*. 4; pp. 75-78.
31. **BENINCASA M., ABALOS A., OLIVEIRA I. et MANRESA., (2004).** Chemical structure, surface properties, and biological activities of the biosurfactant produced by *pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. *Antonio van Leeuwenhoek*, 85: 1-8.
32. **BENINCASA M. et ACCORSINI F.R., (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as substrate. *Bioresource Technology*, 99: 3843-3849.

33. **BENT MOHAMED A. et SIDI BABA A.M., (2007).** Manuel de travaux pratiques de Microbiologie, BG2., p. 22.
34. **BERGSTROÏM S., THEORELL H., et DAVID H., (1946).** On a metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea*, pyolopic acid active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Ark Ken Mineral Geology*, 23:1-12.
35. **BESBES S., DRIRA L., BLECKER K., DEROANNE C. et HAMADI A., (2009).** Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera L.*): compositional, functional and sensory characteristics of date jam, *Journal of Food Chemistry*, Vol. (112), pp. 406-411.
36. **BETTAHAR M., SCHAFER G. et BAVIERE M., (1999).** An optimized surfactant formulation for the remediation of diesel oil polluted sandy aquifers, *Environmental Science Technology*, 33 (8): 1269-1273.
37. **BODOUR A.A., DREES K.P., MAIER R.M., (2003).** Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Applied Environment Microbiology*, 69: 3280-3287.
38. **BODOUR A.A., GERRERO-BARAJAS C., MAIER M., (2004).** Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *Applied And Environment Microbiology*, 10: (6), 1114-20.
39. **BOGNOLO G., (1999).** Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, *colloids and surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152 (1-2): 41-52.
40. **BORDI C. et BENTZMANN S., (2011).** Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge, *Annals of Intensive Care*, 1: 19, 10.1186/2110-5820-1-19.
41. **BORDOLOI N.K et KONWAR B.K., (2008).** Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions, *colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 63(1): 73-82.
42. **BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X. et GARDAN L., (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomy*, 20: 51-63.
43. **BOUCHEZ-NAITALI M., RAKATOZAFY H., MARCHAL R., LEVEAU J.-Y. et VANDECASTEELE J.-P., (1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake., *Journal Application microbiology.*, 86, 421-428.

44. **BOUCHEZ-NAITALI M. and VANDECASTEELE J.P., (2008).** Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane, The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 24(9) : 1901-1907.
45. **BOULAL A., BENALI B., MOULAI M. et TOUZI A., (2010).** Transformation des déchets de dates de la région d'Adrar en bioéthanol. *Revue des Energies Renouvelables* Vol. 13(3), pp. 455-463.
46. **BOULAL A., BENBRAHIM Z., BENALI B. et LADJEL S., (2013).** Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud – Ouest de l'Algérie. *Revue des Energies Renouvelables*, Vol. 16 N°3 (2013) 539 – 550.
47. **BOZAL N., MONTES M.J. and MERCADE E., (2007).** *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 57: 2609-2612.
48. **BURGER M.M., GLASER L. et BURTON R.M., (1963).** The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*., *Journal Biology Chemistry*., 238, 2595-2602.
- C.
49. **CALVO C., MANZANERA M., SILVA-CASTRO G. A., UAD I., GONZALEZ-LOPEZ., (2009).** Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects, *Science Total Environment*, 407, 3634-3640.
50. **CAMEOTRA S.S. and BOLLAG J.M., (2003).** Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Critical Review Environment Science Technology*, 30: 111-126.
51. **CAMEOTRA S.S. and MAKKAR R.S., (1998).** Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Applied Microbiology Biotechnology*, 50: 520-529.
52. **CAMEOTRA S.S. and MAKKAR R.S., (2004).** Recent application of biosurfactant as biological and immunological molecules. *Current Opinion Microbiology*, 7, 262-266
53. **CAMERON R.D., COOPER D.G. et NEUFFELD R.J., (1988).** The manoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 1420-1425.
54. **CAMPOS-GARCIA J., CARO A.D., NAJERA R., MILLER-MAIER R.M., AL-TAHHAN R.A. et SOBERON-CHAVEZ G., (1998).** The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG

gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis, *Journal Bacteriology*, 180, 4442-4451.

55. CAMPOS J.M., STAMFORD T.L.M., SARUBBO L.A., LUNA J.M., RUFINO R.D., BANAT I.M., (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Programme*, 29: 1097-1108.

56. CEDOU C., (2013). Mobilisation des lentilles de flottant (HC) par biolavage, *GTS, Intersol*, p. 5.

57. CHAIRA N., FERCHIICHI A., MRABET A. et SGHAIROUN M., (2007). Chemical composition of the flesh and the pit of date palm fruit and radical scavenging activity of their extracts. *Journal of Pakistan journal of Biological Science*, Vol. 10(13), pp. 2202-2207.

58. CHANDRASEKARAN E.V. et BEMILLER J.N., (1980). *Constituent analysis of glucosaminoglycans*. New York, Academic Press, Inc.

59. 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. *Journal Environmental Qual*, 24: 19-28.

60. CHEMANI C., (2001). Isolement et identification de souches bactériennes productrices de biosurfactants à partir de réservoirs pétroliers. P. 28-29.

61. CHEN S.Y., WEI Y.H., CHANG J.S., (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2., *Applied microbiology Biotechnology*, 76: 67-74.

62. CHRISTOFI N. and IVSHINA I.B., (2002). A review: microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 915-929.

63. COCHET N., (2000). Selection of antibacterial and biosurfactant-producing strains.

64. COLWELL R.R., CITARELLA R.V. and RYMAN I., (1965). Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic *Pseudomonad.*, *Journal Bacteriology*, 90: 1148-1149.

65. COLWELL R.R. and MANDEL M., (1964). Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*, 87:1412-1422.

66. COOPER D.G., et GOLDENBERG B.G., (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Applied Environment Microbiology*, 53(2): 224-229.

67. COSTA S.G., NITSCHKE M., HADDAD R., EBERLIN M.N., CONTIERO J., (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Production Biochemical*, 41 : 483-488.

D.

68. DANIELS C.J., HOFMAN J.D., MACWILLIAMS J.G., DOOLITTLE W.F., WOESE C.R., LUEHRSEN K.R. et FOX G.E., (1999). Sequence of 5S ribosomal RNA gene regions and their products in the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Molecular Gene Genetics*, 198: 270-274.

69. DANYELLE K.F., RAQUEL D., JULIANA M., VALDEMIR A., LEONIE A., (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 31(2).

70. DAS N. and CHANDRAN P., (2011). "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview", *Biotechnology Research International*.

71. DAS P., MUKHERJEE S. et SEM R., (2009). Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium, *Bioresource Technology*, 100: 1015-1019.

72. DAVEY M.E., CAIAZZA N.C., O'TOOLE G.A., (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal Bacteriology*, 185: (3), 1027-1036.

73. DEKIMPE V. et DEZIEL E., (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155: 712-723.

74. DESAI J.D. et BANAT I.M., (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential, *microbiology and molecular biology reviews*, 61 (1): 47-64.

75. 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. *Applied Microbiology Biotechnology*, 46: 638-646.

76. DEZIEL E., COMEAU Y. et VILLEMUR R., (1999). Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation*, 10, 219-233.

77. DEZIEL E., GOPALAN S., TAMPAKAKI A.P., LEPINE F., PADFIELD K.E., SAUCIER M., (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are

modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular Microbiology*, 55(4): 998-1014.

78. DEZIEL E., LEPINE F., MILOT S. and VILLEMUR R., (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1485, 145-152.

79. DEZIEL E., LEPINE F., MILOT S. & VILLEMUR R., (2003). RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids, *Microbiology* 149, 2005-2013.

80. DEZIEL E., PAQUETTE G., VILLEMUR R., LEPINE F. et BISAILLON J.-G., (1996), Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons, *Applied Environmental Microbiology*, 62 (6): 1908-1912.

81. DJOUAD M.E., (2012). Caractérisation des différentes aptitudes des souches de la flore tellurique et marine du genre *Rhodococcus* isolées de sites contaminés.

82. DIGGLE S.P., WINZER K., CHHABRA S.R., WORRALL K.E., CAMARA M., WILLIAMS P., (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the on-set of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology*, 50(1): 29-43.

83. DUBEAU D., (2009). Etude de la production de rhamnolipides par *Burkholderia*. INRS-Institut Armand-Frappier. Université du Québec, p 12.

84. DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chemistry*, 28: 350-356.

85. DWARAKANATH V., KOSTARELOS K., POPE G.A., SHOTTS D. et WADE W.H., (1999), Anionic surfactant remediation of soil columns contaminated by nonaqueous phase liquids, *Journal Contamination Hydrology*, 38 (4): 465-488.

E.

86. EDWARDS D.A., ADEEL Z. et LUTHY R.G., (1994). Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system, *Environment Science Technology*, 28 (8): 1550-1560.

87. EDWARDS D.A., LUTHY R.G. et LIU Z., (1991). Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, *Environment Science Technology*, 25 (1): 127-133.

88. EDWARDS J.R. et HAYASHI J.A., (1965). Structure of rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*, *Architect Biochemistry Biophysics*, 111: 415-421.

89. EDWARDS K.R., LEPO J.E. et LEWIS M.A., (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species, *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1309-1316.

90. EL-AMINE BENDAHA M., MEBREK S., NAIMI M., TIFRIT A., BELAOUNI H.A et al., (2012). Isolation and comparison of Rhamnolipids Production in *Pseudomonas aeruginosa* P.B:2 and *Pseudomonas fluorescens* P.V:10, *Open Access Scientific Reports*, 1: 544.

91. ESPINOSA-URGEL M., (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid Channels in biofilms. *Journal Bacteriology*, 185: (3), 699-700.

92. EUZEBY J.P., (2008). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.

F.

93. FERHAT S., MNIF S., BADIS A., EDDOUAOUA K., ALOUAOUI R., BOUCHERIT A., MHIRI N., MOULAI-MOSTEFA N., SAYADI S., (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1182-1188.

94. FIECHTER A., (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application, *Tibtech*, 10: 3-12.

95. FILLOUX A. et VALLET I., (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Medicine Science* 19, 77-83.

96. FUJITA K., AKINO T. et YOSHIOKA H., (1988). Characteristics of the heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection Immunity*, 56, 1385-1387.

G.

97. GABET S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p. 177.

98. GARDAN L., BELLA P., MEYER J.M., CHRISTEN R., ROTT P., ACHOUAK W. and SAMSON R., (2002). *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and

Pseudomonas palleroniana sp. nov., isolated from rice. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 52: 2065-2074.

99. GOZINI O., PLAZA A., DI PALMA L., LOBO M.C., (2010). Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipid, *Journal Applied Electrochemistry*, 40: 1239-1248.

100. GRIFFEN W.C. (1949). Classification of surface-active agents by 'HLB', *Journal Social Cosmetic Chemistry*, 1: 311.

101. GUDINA E.J., RODRIGUES A.I., ALVES E., DOMINGUES M.R., TEIXEIRA J.A., RODRIGUES L.R., (2015). Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation, *Bioresource Technology*, 177:87-93.

102. GUERRA-SANTOS., (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied Environment Microbiology*, 48, 301-305.

103. GUERRA-SANTOS L.H., KAPPELI O. et FIECHTER A., (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied Environment Microbiology*, 48, 301-305.

104. GUERRA-SANTOS L.H., et KAPPELIO. et FIECHTERA A., (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and Environmental factors. *Applied Microbiology Biotechnology*, 24: 443-448.

105. GUNTHER N.W.IV., NUNEZ A., FETT W. et SOLAIMAN D.K.Y., (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium. *Applied Environment Microbiology*, 71 (5): 2288-2293.

H.

106. HAAS D et KEEL C., (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. *Annu Revue Phytopathology*, 41:117-153.

107. HABA E., ESPUNY M.J., BUSQUETS M., MANRESA A., (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 379-387.

- 108. HABA E., PINAZO A., JAUREGUI O., ESPUNY M.J., INFANTE M.R. et MANRESA A., (2003).** Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (3): 316-322.
- 109. 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.
- 110. HARVEY S., ELASHVILI I., VALDES J.J., KAMELY D. et CHAKARABARTY A.M., (1990).** Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology*, 8, 228-230.
- 111. HASTIE A., HINGLEY S.T., HIGGINS M.L., KUEPPERS F. & SHRYOCK T., (1986).** Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* inactivates mammalian tracheal ciliary axonemes. *Cellular Motility Cytoskeleton*, 6, 502-509.
- 112. HAUSER G. et KARNOVSKY M.L., (1957).** Rhamnose and rhamnolipide biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Biology Chemistry*, 224, 91-105.
- 113. HAUSER G. et KARNOVSKY M.L., (1958).** Studies on the biosynthesis of L-rhamnose. *Journal Biology Chemistry*, 233: 287-291.
- 114. HEALY M.G., DEVINE C.M. et MURPHY R., (1996).** Microbial production of biosurfactant. *Resources conservation and Recycling*, 18: 41-57.
- 115. HELBERT J.R. et BROWN K.D., (1957).** Color reaction of anthrone with monosaccharide mixtures and oligo- polysaccharide containing hexuronic acids. *Anal Chemistry*, 29: 1464-1466.
- 116. HERMAN D.C., ARTIOLA J.F. et MILLER R.M., (1995).** Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant, *Environmental Science Technology*, 29 (9): 2280-2285.
- 117. HERRY J.M., MEYLHEUC T. et BELLON-FONTAINE M.N., (2001).** Les biosurfactants, des Biomolécules à forte potentialité d'application, *Journal Sciences des aliments*, Vol.21, No.6, p. 591-649.
- 118. HEURLIER K., WILLIAMS F., HEEB S., DORMOND C., PESSI G., SINGERD., (2004).** Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal Bacteriology*, 186(10): 2936-45.

119. HISATSUKA K., NAKAHARA T., SANO N. and YAMADA K., (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations, *Agriculture Biology Chemistry*, 35: 686-692.

120. HODGE J.E. et HOFREITER B.T., (1962). In: **WHISTLER R.L., WOLFROM M.L.** (eds). Methods in carbohydrate chemistry. *Academic press*, New York, p 380.

121. HOFTE M. et ALTIER N., (2010). Fluorescent *Pseudomonas* as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Resource Microbiology*, 161: 464-471.

122. HOLLOWAY B.W., (1992). *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *pseudomonas*, molecular biology and biotechnology (**GALLI E., SILVER S., WITHOLT B., eds**), *American Social Microbiology*, Washington, DC, 1-8.

123. HOLMBERG K., (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159.

124. HOLMBERG K., (2002). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159

I.

125. 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.

126. ITOH S. et SUZUKI T., (1972). Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agronomy Biology Chemistry*, 36, 2233-2235.

J.

127. JAIN D K., COLLINS-THOMPSON D.L., LEE H. et TREVORS J.T., (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 13: 271-279.

128. JAVRVIS F.G. et JOHSON M.J., (1949). A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal American Oil Chemistry Society*, 71: 4124-4126.

129. JEAN-LUC WERTZ., (2012). Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants. Note de synthèse, document ValBiom-Gembloux Agroalimentaire Biologie Technologie. P. 9.

130. JENSEN V., LONS D., ZAOUI C., BREDENBRUCH F., MEISSNER A., DIETERICH., (2007). RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Journal Bacteriology*, 188(24): 8601-6.

131. JEONG H.S., LIM D.J., HWANG S.H., HA S.D., KONG J.Y., (2004). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized in polyvinyl alcohol beads, *Biotechnology Letter*, 26(1): 35-9.

132. JOHNSON J.L. and ORDAL E.J., (1968). Disoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. *Journal Bacteriology*, 95:893-900.

K.

133.KADALI K.K., SIMONS K.L., SKUZA P.P., MOORE R.B., BALL A.S., (2012). A complementary approach to identifying and accessing the remediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria. *Journal Microbiology Methodes*, 88: 348-355.

134.KAEPPELI O et GUERRA SANTOS L., (1986). Process for the production of rhamnolipids, Patent no US 4628030 A.

135.KARICKHOFF S.W., BROWN D.S. et SCOTT T.A., (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Resources*, 13: 241-248.

136. KASKATEPE B. and YILDIZ S., GUMUSTAS M., OZKAN S.A., (2016). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* in kefir and fish meal. *Braz. Journal Microbiology*, 46(3) : 855-859.

137. KERSTERS K., VANDAMME P., POT B., GILLIS M., DE VOS P., SWINGS J., (1996). Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach To Bacterial Systematics, *Microbiological Reviews*, Vol. 60, No. 2, p. 407–438.

138. KHALIL S., HULTBERG M., BERGSTRAND K.J., ALSANIUS B., (2002). Characterization of Biosurfactant-Producing Strains of Fluorescent *Pseudomonads* In A Soilless Cultivation Systematics, *Journal Antonie Van Leewenhoek*, Vol. 94, p. 329-334.

139. KHEMILI S., (2008). Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des Biomolécules produites. p 62.

140. KITAMOTO D., ISODA H., NAKAHARA T., (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94, 187-201.

- 141. 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.
- 142. KOWNATZKI R., TUMMLER B. & DORING G., (1987).** Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1, 1026-1027.
- 143. KUMAR M., LEON V., DE SISTO MATERANO A., ILZINS O.A., LUIS L., (2008).** Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 24 (7): 1047-1057.
- L.**
- 144. LAHOUSINE V., (1999).** Dégradation des hydrocarbures par les bactéries isolées des eaux superficielles du bassin parisien. CRECEP RES N° 92 Ecol 6.
- 145. LANG S. et WULLBRANDT D., (1999).** Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51: 22-3
- 146. LARPENT J.P., (2000).** « Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Les principaux groupes bactériens ». *Edition Techniques et Documentation*. pp 28.
- 147. LAURILA M.A., (1985).** Biosurfactants production by mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse. Doctorat. Department of biotechnology, Swiss Federal Institute of technology Zurich, Switzerland, pp 1-10 (p117).
- 148. LEPINE F., DÉZIEL E., MILOT S. et VILLEMUR R., (2002).** LC/MS detection of the 3-(3-hydroxy-alkanoyloxy)-alkanoic acid precursors of rhamnolipids in *pseudomonas aeruginosa* cultures. *Journal Mass Spectral*, Soumis.
- 149. LEQUETTE Y. et GREENBERG E.P., (2005).** Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms, *Journal Bacteriology*, **187**, 37–44 (2005).
- 150. LIU M., YUAN Y., ZHUANG L., ZHOU S., NI J., (2008).** Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. Strain MFC03 under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 10.1016/j.biortech.10.003.
- 151. 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.

- 152. MAKKAR R.S. et CAMEOTRA S.S., (2002).** An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Application Microbiology Biotechnology*, 58: 428-434.
- 153. MARCOU L., (1992).** Les applications des agents de surfaces. Phénomènes d'interfaces. Agents de surfaces : principe et mode d'action. pp : 325-336.
- 154. MATA-SANDOVAL J.C., KARNS J., TORRENTS A., (2001).** Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous and soil slurries. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49 : 3296-3303.
- 155. MANAIA C.M. and MOORE E.R., (2002).** *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant species of the genus *pseudomonas sensu stricto*. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 52: 2203-2209.
- 156. MARCOU L., (1989).** Les applications des agents de surface. Dans les phénomènes d'interfaces : Agents de surface : principe et mode d'action. pp. 350.
- 157. MATA-SANDOVAL J.C., KARNS J. et TORRENTS A., (2000).** Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environmental Science Technology*, 34 (23): 4923-4930.
- 158. MCCRAY J.E., MAIER R.M. et BRUSSEAU M.L., (2001).** Biosurfactant-enhanced solubilization of NAPL mixture, *Journal Contamination Hydrology*, 48: 45-68.
- 159. MCKNIGHT S.L., IGLEWSKI B.H., PESCI E., (2000).** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal Bacteriology*, 182(10):2702-8.
- 160. MEDINA G., JUAREZ K., VALDERRAMA B., SOBERON-CHAVEZ G., (2003a).** Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the RhlAB promoter. *Journal Bacteriology*, 185(20): 5976-83.
- 161. MEDINA G., JUAREZ K., SOBERO'N-CHA'VEZ G., (2003b).** The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone. *Journal Bacteriology* 185: 377–380.
- 162. MERCADE M.E. et MANRESA M.A., (1994).** The use of agro industrial by-products for biosurfactant production, *J.A.O.C.S.*, 71 (1): 61-64.

- 163. MILLER R.M., ZHANG Y., (1995).** Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Application Environmental Microbiology*, 61: 2247–2251.
- 164. MIMOUNI N., (1995).** Sélection des souches bactériennes productrices de biosurfactants à partir de sols contaminés par les hydrocarbures. Rapport d'avancement N° 1, pp 1-25.
- 165. MINT EL MOUKHTAR S., (2010).** Etude des réponses physiologique et métabolique de dix variétés de riz (*Oryza sativa* L.) aux premiers stades de développement vis-à-vis du stress salin. Faculté des sciences et techniques *département de chimie*, p 39.
- 166. MOHAMMED A.A., (1997).** Study on biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganism(s) (Ph.D. thesis), Botany Dept. Faculty of Girls, for Arts, Science and Education, Ain shams University.
- 167. MOORE E.R.B., TINDALL B.J., MARTINS DOS SANTOS V.A.P., PIEPER D.H., RAMOS J.L. et PALLERONI N.J., (2006).** Non médical: *Pseudomonas*, p.646-703. In M. DWORKIN S., FALKOW E., ROSENBERG K., SCHLEIFER H., et STACKEBRANDT E. (ed.), Prokaryotes, Springer, USA.
- 168. MORIKAWA M., HIRATA Y., IMANAKA T., (2000).** A study on the structure-function relationship of the Lipopeptide biosurfactants. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1488:211-218.
- 169. MULLIGAN C.N., YOUNG R.N. et GIBBS B.F., (2001).** Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Engineering Geology*, 60: 371-380.
- 170. MULLIGAN C.N., (2005).** Environmental applications for biosurfactants. *Environment Pollution*, 133: 183-198.
- 171. MULLIGAN C.N., (2009).** Recent advanced in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion Colloid Interface Science.*, 14: 372-378.
- 172. MUNSCH P., ALTATOSSAVA T., MARTTINEN N., MEYER J M., CHTISTEN R and GARDAN L., (2002).** *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal Systematic Evolution Microbiology.*, 52:1973-1983.
- N.
- 173. NANGANURU H.Y et KORROPATI N., (2012).** Studies on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas putida*. *International Journal of Research in Computer Science*, 2(4): 19-21.

174. NEILANDS J.B. et LEONG S.A., (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annal Revue Plant Physiology*, 37, pp. 187-208.

175. NEINDRE B.L., (1993). Tensions superficielles et interfaces. Techniques de l'ingénieur. Traités constantes physico-chimiques. 475 : 2-12.

176. NEU T.R., (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiology Revue*. 60 : (1), 151-166.

177. NICHOLLS T.M., MORGAN A.S. and MORRIS A.J., (2000). Noscomial blood stream infection in Auckland Healthcare hospitals, *New Zealand Medical Journal*, 113, 96-98.

178. NISHIMORI E., KITA-TSUKAMOTO K and WAKABAYASHI H., (2000). *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial hemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*, *international Journal Systematic Evolution Microbiology*, 50:83-89.

O.

179. OBAYORI O.S., ILORI M.O., ADEBUSOYE S.A., OYETIBO G.O., OMOTAYO A.E., AMUND O.O., (2009). Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1, *World Journal Microbiology Biotechnology*, 25: 1615-1623.

180. OCHSNER U., FIECHTER A. et REISER J., (1994a). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal Biology Chemistry*, 269 (31): 19787-19795.

181. OCHSNER U.A. et REISER J., (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Production National Academic Science USA*, 92, 6424-6428.

182. OCHSNER U.A., KOCH A.K., FIECHTER A. et REISER J., (1994b). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal Bacteriology*, 176, 2044-2054.

183. OLIVEIRA F.J.S., VAZQUEZ L., CAMPOS N.P., FRANCA F.P., (2009). Production of rhamnolipids by *pseudomonas alcaligenes* strain. *Processus Biochemistry*, 44(4): 383-389.

184. ONWOSI C.O et ODIBO F.J.C., (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil, *World Journal Microbiology Biotechnology*, 28:937-942.

185. OULD EL HADJ M.D., BITOUR Z. et SIBOUKEUR O., (2006). Etude de la production de levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivée sur moût de rebuts de dattes. *Courrier du savoir*-N°07, pp.13-18.

P.

186. PACWA-PLOCINICZAK M., PLAZA G.A, POLIWODA A., PIOTROWSKA-SEGET Z., (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science Pollution R*, 21(15): 9385-9395.

187. 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.

188. PALLERONI N.J., (2005). Genus I. *Pseudomonas*. In: **BRENNER D.J., KRIEG N.R., STALLEY J.T.** (Eds), *BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology*. Part B: The Proteobacteria. Springer, New York, pp. 323-379.

189. PALLERONI N.J., (2008). The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: CORNELIS. P. (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1-18.

190. PALLERONI N.J., (1984). GENUS I. *Pseudomonas* **MIGULA 1894.** In: **KRIEG N.R., HOLT J.G.,** (Eds.), *BERGEY'S MANUAL of Systematic Bacteriology*, vol. I. WILLIAMS and WILKINS CO, Baltimore, USA, pp. 141–171.

191. PALLERONI N.J. et BRADBURY J.F., (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (**HUGH 1980**) **SWINGS et al. 1983.** *International Journal Systematic Bacteriology.*, 43: 606-609.

192. PALLERONI N.J., KUNISAWA R., CONTOPOULOU R. and DOUDOROFF M., (1973). Nucleic acid homologies in the genus *pseudomonas*. *International Journal Systematic Bacteriology.* 23: 333-339.

193. PAMP S.J. et TOLKER-NIELSEN T., (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology*, 189: 2531-2539.

194. PARRA J.L., GUINEA J., MANRESA M.A., ROBERT M., MERCADE 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.

- 195. PATEL R.M. et DESAI A.J., (1997).** Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *Journal Basic Microbiology*, 37: 281-286.
- 196. PEIX A., RIVAS R., MATEOS P.F., MARTINEZ-MOLINA E., RODRIGUEZ-BARRUECO C. and VELAZQUEZ E., (2003).** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 53: 2067-2072.
- 197. PEIX A., RIVAS R., SANTA-REGINA I., MATEOS P.F., MARTINEZ-MOLINA E., RODRIGUEZ-BARRUECO C. and VELAZQUEZ E., (2004).** *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate solubilizing bacterium isolated from rhizosphere of grasses, *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 54: 847-850.
- 198. PEIX A., RAMIREZ-BAHENA M.H. and VALAZQUEZ E., (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*, *Infection Genetics Evolution*, 9: 1132-1147.
- 199. PENNELL K.D., ABRIOLA L.M. et WEBER W.J., (1993).** Surfactant enhancement solubilization of residual dodecane in soil columns. 1 – Experimental Investigation. *Environmental Science Technology*, 27 (12): 2332-2340.
- 200. PESSEREAU C., (2016).** Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale. Archives-ouvertes. p 42.
- 201. PEYPOUX F., BONMATIN J.M. et WALLACH J., (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin, mini review, *Applied Microbiology Biotechnology*. 51. pp: 553-563.
- 202. PIMIENTA A.L.R., DÍAZ M.M.P., CARVAJAL S.F.G., GROSSO V.J.L., (1997).** Production of biosurfactants (rhamnolipids) by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Colombian sludges, *CT&F- Ciencia, Tecnología y Futuro*, 1997; 1(3): 95-108.
- 203. PINZON N.M. et JU L.K., (2009b).** Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Application. Microbiology. Biotechnology.*, 82:975–981.
- 204. PORE J., (1992).** *Emulsions, microémulsions, émulsions multiples*, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, p 270.
- 205. PRIETO L.M., MICHELON M., BURKERT J.F.M., KALIL S. J., BURKERT C. A.V., (2008).** The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere*, 71(9): 1781-1785.

206. PRUTHI V., CAMEOTRA S.S., (2000). Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. *Journal of Surfactants and Detergents*, 3, 533–537.

207. PRIYA T., USHARANI G., (2009). Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Botany Research International*, 2 (4): 284-287.

208. PUSKAROVA A., BUČKOVÁ M., CHOVANOVÁ K., HARICHOVÁ J., KARELOVÁ E., GODOČIKOVÁ J., POLEK B., FERIANC P., (2013). Diversity and PAH growth abilities of bacterial strains isolated from a contaminated soil in Slovakia. *Biologia*, 4: 587–591.

R.

209. RAHIM R. OCHSNER U.A., OLVERA C., GRANINGER M., MESSNER P., LAM J.S, et la., (2001). Cloning and functional characterization of the *pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40(3): 708-18.

210. RAHMAN K.S., BANA I., TAHIRA J., THAYUMANAVAN T., LAKSHMANAPERUMALSAMY P., (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*, 81:25-32.

211. RAHMAN K.S.M., RAHMAN T.J., LAKSHMANAPERUMALSAMY P., MARCHANT R., BANAT I.M., (2003). The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons, *Acta Biotechnology*, 23: 335-345.

212. RASHEDI H., ASSADI M.M., BONAKDARPOUR B., (2005). Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. *International Environmental Science Technology*, 2: 59-62.

213. REHM B.H.A., KRUGER N. et STEINBUCHER A., (1998). A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. *Journal Biology Chemistry*, 273, 22044-24051.

214. REILING H.E., THANEI-WYSS U., GUERRA-SANTOS L.H., HIRT R., KÄPPELIO O. et FIECHTER A., (1986). Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5): 985-989.

- 215. REIS R.S., PACHECO G.J., PEREIRA A.G., FREIRE D.M.G., (2013).** Biosurfactants: production and applications. In **CHAMY R., ROSENKRANZ F, editors.** *Biodegradation-life of science*. P.31-61.
- 216. RICHARDSON S.H. (2009).** Genetics and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzyme in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73 (4): 622-638, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06795.x.
- 217. ROBERT M. MERCADE M.E., BOSCH M.P., PARA J., ESPINY M.J., MANRESA M.A., GUINEA J., (1989).** Effect of the carbon source on biosurfactant production on *Pseudomonas aeruginosa* 44T1, *Biotechnology Letters*, 11: 871-874.
- 218. ROCHA M.V.P., SOUZA M.C.M., BENEDICTO S.C.L., BEZERRA M.S., MACEDO G.R., SAAVEDRA PINTO G.A., et GONCALVES L.R.B., (2007).** Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136-140.
- 219. RODRIGUES L., MOLDES A., TEIXEIRA J., OLIVEIRA R., (2005).** Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains, *Journal Biochemical Engineering*, 28: 109-116.
- 220. RODRIGUES L., BANAT I.M., TEIXEIRA J., OLIVEIRA R., (2006).** Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal Antimicrobial Chemoter*, 57: 609-618.
- 221. ROMANENKO L.A., UCHINO M., TEBO B.M., TANAKA N., FROLOVA G.M. and MIKHAILOV V.V., (2008).** *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *International. Journal Systematic Evolution Microbiology*, 58: 706-710.
- 222. RON E.Z. et ROSENBERG E., (2002).** Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3: 249-252.
- 223. ROSENBERG E. et RON E.Z., (1999).** High- and low- molecular- mass microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, 52: 154-162.
- 224. ROSSIGNOL G., (2007).** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : activité hémolytique et variation phénotypique. Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Rouen. Discipline : Biologie. Spécialité : microbiologie, pp : 2.

S.

225. SAIKIA R.R., DEKA S., DEKA M., BANAT I.M., (2012). Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Anal Microbiology*, Vol.62, pp.753-763.
226. SAINI H.S., BARRAGAN-HUERTA B.E., LEBRON-PALER A., PEMBERTON J.E., VAQUEZ R.R., BURNS A.M., MARRON M.T., SELIGA C.J., GUNATILAKA A.A.L. et MAIER R.M., (2008). Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* Strain M9-3 and its Physicochemical and Biological Properties. *Journal of Natural Products* 71 (6): 1011-1015.
227. SAHOO S., DATTA S., BISWAS D., (2011). Optimization of culture condition for biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* OCD1, JASR 2: 32-36.
228. SANTA ANNA L.M., SEBASTIAN G.V., PEREIRA J.N., ALVES T.L.M., MENEZES E.P., FREIRE D.M.G., (2001). Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Applied Biochemistry and Biotechnology- part A, Enzyme Engineering and Biotechnology*.
229. SANTOS S.C.D., FERNANDEZ L.G., ROSSI-ALVA J.C., et ROQUE M.R.A., (2010). Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. *African journal of Biotechnology*, 9(35): 5704-5711.
230. SAMANTA P., PAL A., MANDAL C., SINHA A., LALEE M., DAS S., KALTY and MITRA D., (2012). Estimation of biosurfactant Activity of an Alkaline Protease producing bacteria isolated from Municipal Solid Waste, *Central European Journal of Experimental Biology*, 1 (1): 26-35.
231. SATPUTE S.K., BHAWSAR B.D., DHAKEPHALKAR P.K., CHOPADE B.A., (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal Marine Science*, 37 (3): 243-250.
232. SHINODA K. et FONTELL K., (1995). Ionic surfactants capable of being used in hard water. *Advances in Colloid and Interface Science*, 54: 55-75.
233. SIFOUR M., AL-JILAWI M.H. et AZIZ J.M., (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan. Journal Biology Science*, 10(8): 1331-1335.
234. SINGER M.E., FENNERTY W.R., BOLDEN P. et KING A.D., (1983). Microbial processus in the recovery of heavy petroleum. In proceeding 1982 international conference on microbial enhancement of oil recovery: 94-101. DONALDSON E. C & CLARK (ed) Bartlesville. *Energy Technology Center*, Bartlesville Oklahoma.

- 235. SILVA S.N. R.L., FARIAS C.B.B., RUFINO R.D., LUNA J.M. et SARUBBO L.A., (2010).** Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 79: 174-183.
- 236. SILVA-PITONDO A., MARTINS V.V., FERNANDES A.F.T., STEHLING E.G., (2014).** High level of resistance to Aztreonam and Ticarcillin in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil of different crops in Brazil. *Science of Total Environment*, 473-474: 155-158, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.021.
- 237. SINGH A., VAN HAMME J.D. et WARD O.P., (2007).** Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25 (1): 99-121.
- 238. SNEHA K.S., PADMAPRIYA B. and RAJESHWARI T., (2012).** Isolation and screening of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* using soya bean oil as substrate, *International Journal of Advance Pharmaceutical and Biological Archives*, 3 (2), 321-325.
- 239. SOBERON-CHAVEZ G., LEPIE F., DEZIEL E., (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 68 : 718-725.
- 240. SOLTANI M., (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. *Thèse de doctorat de l'université Paris 6, spécialité chimie analytique*, p. 284.
- 241. SOMASUNDARAN P. et KRISHNAKUMAR S., (1997).** Adsorption of surfactants and polymers at the solid-liquid interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, 123-124: 491-513.
- 242. SPIERS A.J., BUCKLING A. & RAINEY P., (2000).** The causes of *pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 2345-2350.
- 243. SPOECKNER S., WRAY V., NIMTZ M. et LANG S., (1999).** Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51: 33-39.
- 244. STACKEBRANDT E., LUDWIG W., WEIZENEGGER M., DORN S., MCGILL T.J., FOX G.E., WOESE C.R. and SCHUBERT W., SCHLEIFER K.H., (1987).** Comparative 16S rRNA Oligonucleotide Analyses and Murein Types of Round Spore Forming Bacilli and non spore Forming Relatives, *Journal Genetics Microbiology*, 133: 2523-2529.
- 245. STANIER R.Y., PALLERONI N.J. and DOUDOROFF M., (1960).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *Journal Genetic Microbiology*, 43: 159-271.

246. STRAUBE W.L., NESTLER C.C., HANSEN L.D., RINGLEBERG D., PRITCHARD P.H., JONES-MEEHAN J., (2003). Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through land farming with biostimulation and bio-augmentation. *Acta Biotechnology*, 23 : 179-196.

247. SYLDATK C., LANG S., MATULOVIC U., WAGNER F., (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874, *Z. Naturforsch C.*, 40 (1-2): 61.

T.

248. TABKA G., 2014. Cosmétique, Développement de produits cosmétiques, ISBST. PP 96-97.

249. TAMAOKA J., HA D-M. and KOMAGATA K., (1987). Reclassification of *pseudomonas acidovorans* den **DOOREN de JONG 1926** and *Pseudomonas testosteroni* **MARCUS and TALALAY 1956** as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosterone* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*, *International Journal Systematic Bacteriology*, 37: 52-59.

250. THANGAMANI S. et SHREVE G.S., (1994). Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems, *Environment Science Technology*, 28: (12), 1993-2000.

251. THANOMSUB B., PUMEECHOCKCHAI W., LIMTRAKUL A., ARUNRATTIYAKORN P., PETCHLEELAHA W., NITODA T et KANZAKI H., (2006). Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk waste.

252. THOMA S., LARPENT J.F. et LARPENT J.M., (1970). Microbiologie pratique. Ed. Hermat, Paris, pp : 2-5.

253. TULEVA B.K., IVANOV G.R. et CHRISTOVA N.E., (2002). Biosurfactant Production by a New *Pseudomonas putida* Strain. *Z Naturforsch* 57 c (3-4): 356-360.

V.

254. VANDANA P. et KIRAN PETER J., (2014). Production, partial purification and characterization of biosurfactant produced by *pseudomonas fluorescens.*, *International Journal of Advanced Technology in Engineering and Science*. Volume No.02, Issue No. 07, 2348 – 7550.

255. VAN DYKE M.I., LEE H et TREVORS J.T., (1991). Applications of microbial surfactants, *Biotechnology Advances*, 9 : 241-252.

256. 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. *Contamination Journal Microbiology*, 39: 1071-1078.

257. VASILEVA-TONKOVA E., GALABOVA D., STOIMENOVA E. et LALCHEV Z., (2006). Production and Properties of Biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 Growing on Hexadecane. *Z Naturforsch* 61 c: 553-559.

258. VELA A.I., GUTIERREZ M.C., FALSEN E., ROLLAN E., SIMARRO I., GARCIA P., DOMINGUEZ L., VENTOSA A. and FERNANDEZ-GARAYZABAL J.F., (2006). *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 56: 2671–2676.

259. VIPULANANDAN C. et REN X., (2000). Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (7): 629-634.

260. VISCA P., IMPERI F. and LAMONT I.L., (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiology*, 15: 22-30.

W.

261. WALKER J.D., et COLWEL R.R., (1974). Hydrocarbon degradation at ambient and in situ Pressure. *Applied Microbiology*, 28, 982-986.

262. WANA J., CHAIA L., LUA W., LIN Y., ZHANG S., (2011). Remediation of hexachlorobenzene contaminated soils by rhamnolipid enhanced soil washing coupled with activated carbon selective adsorption. *Journal Hazard Mater*, 189: 458-464.

263. WANG X., GON L., LIANG S., HAN X., ZHU C., LI Y., (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* 4,433-443.

264. 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(2):146-54.

265. WEN S.P., MCLAUGHLIN M.J., KIRBY J.K., (2009). Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil. Biology and Biochemistry*, 41 (10) : 2214-2221.

266. **WERTZ J-L., (2012).** Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants, *Document ValBiom-Gembloux Agronomie-Biologie Technologie.*, pp 9-10.
267. **WEST C.C. et HARWELL J.H., (1992).** Surfactants and subsurfacereemediation, *Environmental Science Technology*, 36 (12) : 2324-2330.
268. **WHANG L.M., LIU P.W.G., MA C.C., CHENG S.S., (2008).** Applications of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, *Journal Hazard Mater*, 151 (1): 155-63.
269. **WILLEMS A., BUSSE J., GOOR M., POT B., FALSEN E., JANTZEN E., HOSE B., GILLIS M., KERSTERS K., AULING G. and DE LEY J., (1989).** *Hydrogenophaga* a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov.(formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleroni* (formerly *Pseudomonas palleroni*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava*) and "*Pseudomonas carboxydoflava*", and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*). *International Journal Systematic Bacteriology*, 39: 319-333.
270. **WILLEMS A., FALSEN E., POT B., JANTZEN E., .HOSTE B., VANDAMME P., GILLIS M., KERSTERS K. and DE LEY J., (1990).** *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas delafieldii*, FALSEN. E (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International Journal Systeme Bacteriology*, 40:384-398.
271. **WILLEMS A., GOOR M., THIELEMANS S., GILLIS M., KERSTERS K. and DE LEY J., (1992).** Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae* subsp. Nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *Catleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *International Journal Systematic Bacteriology*, 42: 107-119.
272. **WITTGENS A., TISO T., ARNDT T.T., WENK P., HEMMERICH J., MULLER C, et al., (2011).** Growth independent rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, *Journal Hazard Master*, 151(1):155-63.
273. **WOESE C.R., STACKEBRANDT E., WEISBURG W.G., PASTER B.J., MADIGAN M.T., FOWLER V.J., HAHN C.M., BLANZ P., GUPTA R., NEALSON K.H. and FOX G.E., (1984).** The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic Applied Microbiology*, 5:315-326.
274. **WU J.Y., YE H K.L., LU W.B., LIN C.L. and CHANG J.S., (2008).** Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EMI isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*, 99, 1157.

Y.

275. **YABUUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T., ARAKAWA M., (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov., and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (**PALLERONI and HOLMES, 1981**) comb. nov. *Microbiology Immunology*, 36: 1251-1275.
276. **YABUUCHI E., KOSAKO Y., YANO I., HOTTA H. and NISHIUCHI Y., (1995).** Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov., Proposal of *Ralstonia pickettii* (**RALSTON, PALLERONI and DOUDOROFF 1973**) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (**SMITH 1896**) comb. nov. *Ralstonia eutropha* (**DAVIS 1969**) comb. nov. *Microbiology Immunology*, 39: 897-904.
277. **YADAV S., JOSHI S., BHARUCHA C., JHA S. NERURKAR A and DESSAI A.J., (2008).** Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, Vol 99, pp 195-199.
278. **YAKIMOV M.M., TIMMIS K.N., WRAY V. and FREDRICKSON H.L., (1995).** Characterization of a new Lipopeptide surfactant produced by thermo tolerant and halo tolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3276.
279. **YIN H., QIANG J., JIA Y., YE J., PENG H., QIN H., ZHANG N. et HE B., (2009).** Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. 44: 302-308.

Z.

280. **ZAIIKA L.L., (1988).** "Spices and Herbs – Their Antimicrobial Activity and Its Determination" *Journal of Food Safety*, 9-2: (97-118).
281. **ZAJIC J.E et DONALDSON E.C., (1985).** Microbial biosurfactants In: *Microbs and recovery*. Vol. 1; pp 19-30.
282. **ZAJIC J.E. et MAHOMEDY A.Y., (1984).** Biosurfactants intermediate in the biosynthesis of Amphipathic molecule in microbs. Chapter six in *Petroleum microbiology*. Ed. Ronald N. *Atlas*. pp: 221-281.
283. **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.

284. ZHANG Y., MAIER W.J. et MILLER R.M., (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution. Bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Science Technology*, 31, 2211-2217.

285. ZHANG L., GOWARDMAN J. and RICKARD C.M., (2011). Impact of microbial attachment intravascular catheter-related infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38,9-15.

286. ZHU K. and ROCK C.O., (2008). RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology*, 190 (9): 3147-3154.

Références électroniques

Liens 1

<http://www.icis.com/Articles/2011/05/09/9457923/developement-and-demand-for-sugar-based-surfactants-are-on-the.html>.

Liens 2

<http://www.chemurope.com/en/news/136583/global-report-on-the-surfactants-market.html>.

Liens 3

<http://www.chemurope.com/en/news/136583/global-report-on-the-surfactants-market.html>.

Liens 4

<http://www.chemurope.com/en/news/136583/global-report-on-the-surfactants-market.html>.

Liens 5

<http://www.chemurope.com/en/news/136583/global-report-on-the-surfactants-market.html>.

Lien 6

<http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>.

Liens 7

www.pseudomonas.com.

Annexes

Annexe I

Le Bouillon cœur cerveau (BHIB)

Milieu polyvalent riche.

Composition

- Protéose-peptone : 10,0 g
- Infusion de cœur de bœuf : 5,0 g
- Glucose : 2,0 g
- Chlorure de sodium : 5,0 g
- Hydrogénophosphate de sodium : 2,5 g
- pH = 7,4

Préparation

- 37,0 g / litre. Stérilisation classique.

Le bouillon nutritif (milieu liquide) (BN)

Composition

- Extrait de levure : 4,0 g ;
- Tryptone : 5,0 g ;
- Glucose : 50,0 g ;
- Dihydrogénophosphate de potassium : 0,55 g ;
- Chlorure de potassium : 0,425 g ;
- Chlorure de calcium : 0,125 g ;
- Chlorure ferrique 0,0025 g ;
- Sulfate de manganèse : 0,0025 g ;
- Vert de bromocresol : 0,022 g ;
- pH = 5,5 ± 0.2

Préparation

- Dissoudre 60,2 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et repartir. Stériliser 15 min à 121°C à l'autoclave.
- Le pH peut être ajusté à 6,5 par addition d'une solution à 1% de bicarbonate de sodium.

Annexe II

La gélose nutritive

Milieu d'isolement non sélectif pour contrôler la pureté d'une souche ou pour purifier la souche bactérienne si elle est contaminée.

Composition

- Extrait de viande : 1,0 g/l ;
- Extrait de levure : 2,5 g/l ;
- Peptone : 5,0 g/l ;
- Chlorure de sodium : 5,0 g/l ;
- Agar : 15,0 g/l ;
- pH = 7,0

Préparation

- 28g/l (stérilisation à l'autoclave).

Le milieu Mueller-Hinton (MH)

Gélose riche pour la réalisation de l'antibiogramme standard.

Composition

- Infusion de viande de bœuf: 300,0 ml
- Peptone de caséine : 17,5g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 17,0 g
- pH = 7,4

Préparation

- 38,0 g/l homogénéisé puis chauffer en agitant, il faut porter à ébullition pendant environ 1 min. Stérilisation à l'autoclave durant 15min à 121,1°C.

Annexe III

L'eau physiologique

C'est une solution physiologique isotonique au sang (présente la même osmolarité).

Composition

- Eau distillée : 1000,0 ml ;
- Chlorure de sodium (NaCl) : 9,0 g.

Préparation

- 9,0 g/l (0,9%) (m/V) de NaCl. Stérilisation à l'autoclave pendant 15 min à 120,0°C.

La gélose au sang

Gélose rouge vif contenant des globules rouges (souvent du sang de mouton). Peu sélective, permet d'apprécier l'hémolyse qu'effectuent certaines bactéries.

Composition

- Gélose nutritive ;
- Sang de mouton.

Préparation

- Faire fondre de la gélose nutritive;
- Refroidir à 50-55°C et maintenir à cette température dans le bain marie, ajouter du sang de mouton ;
- Bien mélanger avant de couler le milieu;
- Couler le milieu en boîte de pétri et laisser reposer.
- Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastique à 2-8°C pendant une semaine au plus.

Annexe IV

Dénombrement de la souche

- Quelques colonies des boîtes ensemencées ont été prise, sous la zone stérile et à l'aide d'une anse à boucle stérilisée ;
- lesquelles en été mises dans des tubes stériles contenant de l'eau physiologique stérile ;
- après agitation du tube pour homogénéisation, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING- MANAGMENT CO. LTD. (UK) - VIS-7220G) à une longueur d'onde de 600 nm ;
- Une fois l'absorbance souhaité a été atteinte ($DO = 0,090$), des différentes dilutions à partir de la solution mère ont été réalisées et ceci en étant toujours dans la zone stérile.
- Les différentes dilutions ont été ensemencées à l'aide d'une micropipette, sur boîtes de Pétri préalablement coulées avec de la gélose nutritive ;
- Enfin les boîtes de Pétri ont été mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. Le jour suivant les boîtes ont été dénombrées à l'aide d'un décanteur.

Annexe V

Courbe étalon des sucres réducteurs

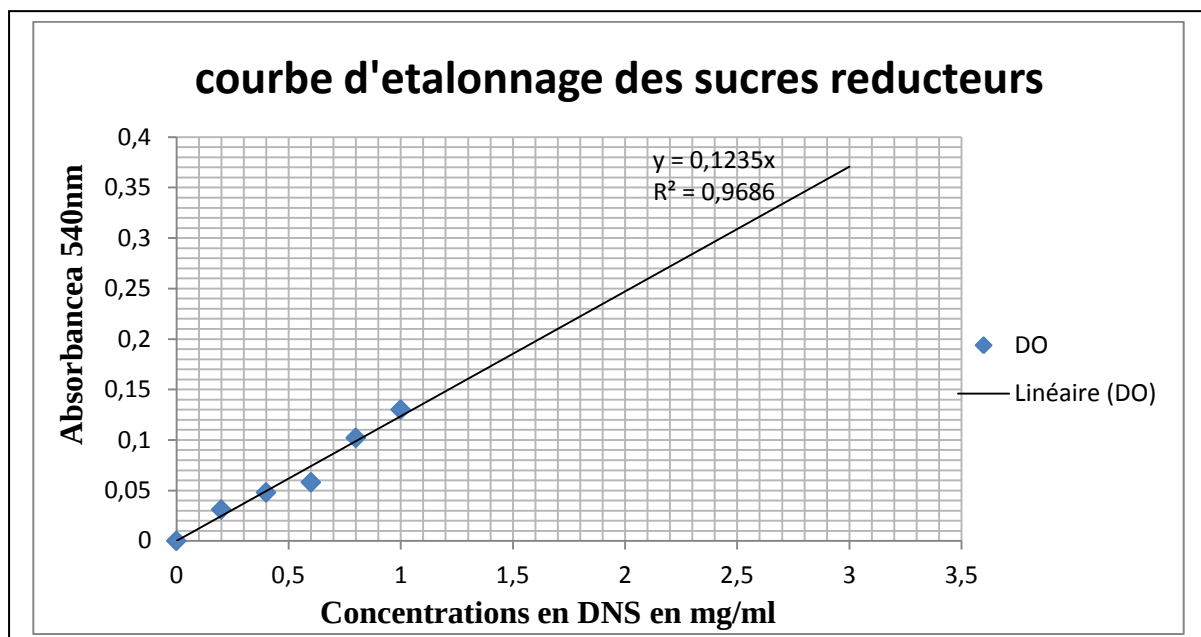


Figure : Courbe étalon des sucres réducteurs.

Courbe étalon des protéines

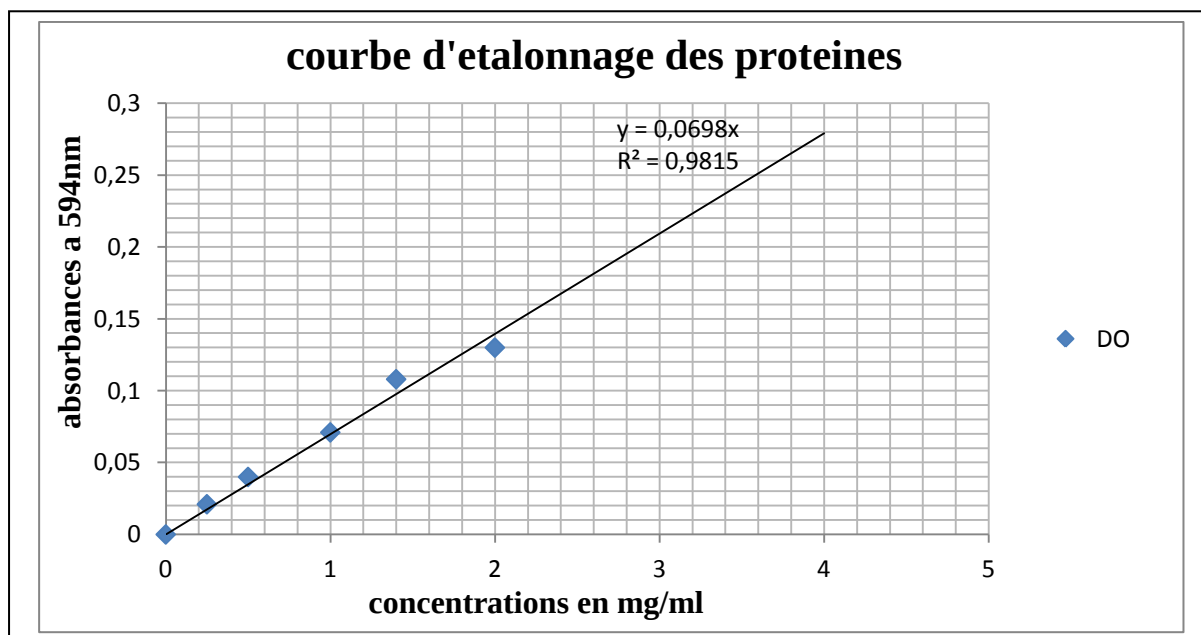
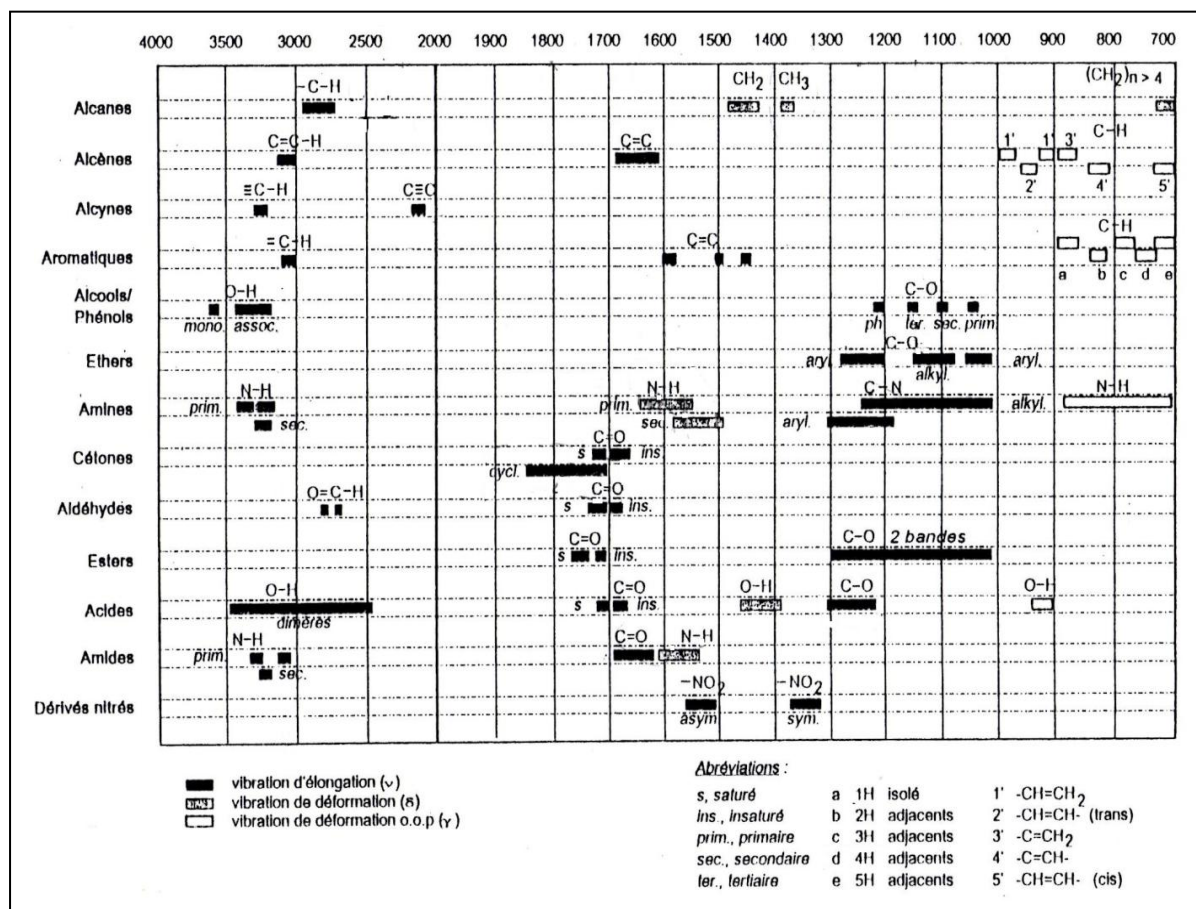


Figure : Courbe étalon des proteines.

Annexe VI



Corrélation dans le moyen infrarouge entre structure et $\bar{\nu}$ de vibration (cm^{-1})

Résumé

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

L'objectif de notre étude est la caractérisation préliminaire de biosurfactant(s) secrété(s) par *Pseudomonas* sp. et l'évaluation de deux effets (l'effet antibactérien et l'effet stimulateur de croissance). La souche étudiée a été cultivée sur milieu moût de dattes pendant cinq jours, durant lesquels les cinétiques de croissance et de production de biosurfactant ont été suivies.

Après l'extraction du biosurfactant du milieu de culture, plusieurs tests ont été réalisés afin de caractériser ce dernier.

La caractérisation structurale par Infra rouge à Transformée de Fourier a indiquée que le biosurfactant obtenu peut appartenir à la classe des rhamnolipides de nature glycolipidique.

Mot clés : biosurfactants, glycolipidique, index d'emulsification, Infra rouge, *Pseudomonas* sp, Rhamnolipides.

Abstract

Biosurfactants is amphiphilic molecule constituted by a polar hydrophilic part and by a not polar hydrophobic part. Generally, the polar hydrophilic grouping is constituted by amino acids, peptides or of polysaccharides (mono or di); the hydrophobic grouping is constituted by saturated or not saturated fatty acids.

The objective of our study is the preliminary characterization of biosurfactant(s) secreted by *Pseudomonas* sp. and the evaluation of two effects (the antibacterial effect and the stimulating effect of growth). The studies stump was cultivated on middle must of dates during five days, in the course of which the kinetics of growth and production of biosurfactant were followed.

After the extraction of the biosurfactant of the middle of culture, several tests were realized to characterize the latter. The structural characterization by Infrared in Transformed by Fourier indicated that the obtained biosurfactant can belong to the class of the rhamnolipids of glycolipidic nature.

Keywords: biosurfactants, glycolipidic, index of emulsification, Infrared, *Pseudomonas* sp, Rhamnolipids.