

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mustapha Stambouli de Mascara
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre:

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

DISCIPLINE: BIOLOGIE

SPÉCIALITÉ: MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE ET MOLÉCULAIRE

Par

BENDAHA Mohammed EL-Amine

Intitulé

**Isolement, caractérisation et exploitation des
métabolites microbiens en bioremédiation de
l'environnement**

Soutenu le:.....2016

Devant le jury composé de :

Pr. BENABDELLI K.	Université MUSTAPHA STAMBOULI, Mascara	Président
Pr. SLIMANI M.	Université TAHAR MOULAY, Saida	Examineur
Pr. ABOUNI B.	Université DJILALI LIABES, Sidi-Bel-Abbès	Examineur
Dr. HARIR N.	Université DJILALI LIABES, Sidi-Bel-Abbès	Examinatrice
Pr. MEDDAH B.	Université MUSTAPHA STAMBOULI, Mascara	Encadreur
Pr. TIR TOUIL A.	Université MUSTAPHA STAMBOULI, Mascara	Co-encadreur

2016 – 2017

Remerciements

Mes remerciements les plus sincères, les plus continus s'adressent à ALLAH qui m'a donné la force, le courage et la patience lors de la réalisation de ce travail.

Au Professeur MEDDAH B.

Je tiens à vous remercier très sincèrement de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche et de m'avoir aidé dans ce sujet passionnant mêlant la chimie et la microbiologie. Merci aussi pour la liberté d'initiatives que vous m'avez laissée ainsi que pour vos nombreux encouragements.

Au Professeur TIRTOUIL A.

Ma reconnaissance et ma gratitude s'adresse à vous pour m'avoir donné les possibilités de réaliser cette recherche au sein de votre unité, merci de m'avoir prodigué avec vos conseils judicieux et pour l'attention accordée à cette étude.

Au Professeur BENABDELLI K.

Je vous remercie d'avoir accepté de présider les membres du jury et pour l'honneur que vous me faite.

Aux Professeurs SLIMANI M. et ABOUNI B. et au docteur HARIR N.

Je vous remercie d'avoir gentiment accepté de participer à l'évaluation de cette thèse, conscient du travail que cela représente.

Au Professeur BANAT I.

Je tiens à vous remercier pour votre aide, vos orientations et vos conseils enrichissants.

A BELAOUNI H.A., SELOUANI M., REGUIG O., MOKHTAR M., DJAAFRI T., BENAHMED W.

Je vous remercie pour tout ce que nous avons partagé et tout ce que vous m'avez apporté durant toutes ces années passées.

Que toute personne que j'ai oublié de citer trouve dans ce dernier paragraphe mes sincères reconnaissances et remerciements

BENDAHA Mohammed EL-Amine

Liste des abréviations

\emptyset	:	Diamètre
ADH	:	Arginine dihydrolase
ADI	:	Adipate
ARA	:	Arabinose
CAP	:	Caprate
CF	:	Concentration factor (Facteur de concentration)
CIT	:	Citrate
CMC	:	Concentration micellaire critique
C.O.V	:	Composés organiques volatils
D.O	:	Densité optique
<i>E</i>₂₄	:	Indice d'émulsion
ESC	:	Esculine
GEL	:	Gélatine
GLU	:	Glucose
GNT	:	Gluconate
MAL	:	Maltose
MAN	:	Mannitol
MLT	:	Malate
MNE	:	Mannose
NAG	:	N-acétylglucosamine
NO₃	:	Nitrate
OX	:	Oxydase
PAC	:	Phényl-acétate
PNPG	:	p-nitro-phényl- β -D- galactopyranoside
P.O.P	:	Polluants organiques persistants
rpm	:	Rotation par minute
TRP	:	Tryptophane
Tr/min	:	Tours par minutes

Résumé

Cinquante souches bactériennes ont été isolées à partir de sols contaminés par des hydrocarbures dans le nord-ouest de l'Algérie, et testée pour la production de biosurfactants utilisant le drop collapsing, le déplacement de l'huile, l'activité d'émulsification (E_{24}) et la mesure de l'activité de surface. Les souches S1PS2, S7PS5 et S9PS2 sont les trois meilleurs producteurs et ont été choisis pour optimiser la production (S1PS2: $E_{24} = 56.32 \pm 1.95\%$, $\emptyset = 5.733 \pm 0.35$ cm et $\%_{\text{Reduction}} = 30.17 \pm 0.12$, S7PS5 : $E_{24} = 43.38 \pm 0.07\%$, $\emptyset = 8.3 \pm 0.10$ cm et $\%_{\text{Reduction}} = 31.23 \pm 0.01$, S9PS2 : $E_{24} = 44.27 \pm 0.26\%$, $\emptyset = 8.66 \pm 0.05$ cm et $\%_{\text{Reduction}} = 32.00 \pm 0.13$). Après optimisation, S7PS5 a représenté les valeurs optimale de la production de rhamnolipides et a été sélectionné pour une identification en utilisant le système API 20 NE et le séquençage de l'ADNr 16S qui a permis de relier S7PS5 au genre *Pseudomonas* et a montré 98.84% de similitude avec *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242^T/Z76651 comme l'espèce la plus proche. Un procédé de traitement du sol à l'aide de la technique de flottation comportant un biosurfactant anioniques (rhamnolipides) pour l'extraction des métaux lourds en utilisant du sulfure de sodium (Na_2S) a été étudié. L'analyse par HPLC a montré la présence de L-rhamnosyl- β -hydroxydécanoïl- β -hydroxydécanoate (RL1) et de L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydécanoïl- β -hydroxydécanoate (RL2). L'influence du collecteur (rhamnolipide), du pH de la pulpe, l'activation chimique (sulfuration) et le temps de traitement sur l'efficacité du processus a été étudiée pour récupérer des ions métalliques à partir d'un sol contaminé après un écrasement des particules de taille $> 250 \mu\text{m}$. Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* S7PS5 ont la capacité de diminuer la tension superficielle de l'eau de 72 à 40.06 mN/m, avec une concentration micellaire critique efficace (CMC) de 35 mg/L. Les premiers résultats ont montré qu'une grande proportion de Zn (CF = 9.29) et Cd (CF = 21.2) ont été récupérés dans la mousse à pH = 12. Au stade sulfuration-flottation, le meilleur CF de Zn a été obtenue en utilisant 4 mg/g de Na_2S , mais le CF de Cd ne montre pas de différence significative en présence Na_2S . Une parfaite récupération de Zn et de Cd a été réalisée durant les 5 premières minutes du processus de lavage du sol, au delà de ce temps de flottation (> 5 min), un entraînement mécanique de Zn et Cd est provoqué.

Mots clés

Biosurfactants, émulsification, *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipides.

Abstract

Fifty bacterial strains were isolated from soils contaminated with hydrocarbons in the north west of Algeria, and tested for biosurfactants production using drop collapsing, oil displacement, emulsification activity (E_{24}) and measurement of the surface activity. S1PS2, S7PS5 and S9PS2 strains were the best three producers and were selected to optimize the production (S1PS2: $E_{24} = 56.32 \pm 1.95\%$, $\emptyset = 5.733 \pm 0.35$ cm and $\%_{\text{Reduction}} = 30.17 \pm 0.12$, S7PS5: $E_{24} = 43.38 \pm 0.07\%$, $\emptyset = 8.3 \pm 0.10$ cm and $\%_{\text{Reduction}} = 31.23 \pm 0.01$, S9PS2: $E_{24} = 44.27 \pm 0.26\%$, $\emptyset = 8.66 \pm 0.05$ cm and $\%_{\text{Reduction}} = 32.00 \pm 0.13$). After optimization, S7PS5 shows the optimal of rhamnolipids production and it was selected for an identification using API 20 NE system and 16S rDNA sequencing which allowed the link S7PS5 to the genus *Pseudomonas* and showed 98.84% of similarity with *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242^T/Z76651 as the closest specie. A soil treatment process using froth flotation technique involving anionic biosurfactant (rhamnolipids) extraction heavy metals using Sodium sulfide (Na_2S) was studied. HPLC analysis showed the presence of L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl - β -hydroxydecanoate (RL1) and L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL2). The influence of the collector (rhamnolipid), pulp pH, a chemical activation step (sulfidization) and process time efficiency has been investigated to recover metal ions from a contaminated soil after a crushing of the particle-size fractions > 250 μm . The rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* S7PS5 had the ability to decrease the surface tension of water from 72 to 40.06 mN/m, with an effective critical micelle concentration (CMC) of 35 mg/L. The first results showed that a great proportion of Zn (CF = 9.29) and Cd (CF = 21.2) was recovered in the froth at pH = 12. At the sulfidization-flotation stage, the best CF of Zn was obtained using 4 mg/g of Na_2S but the CF of Cd does not show a significant difference in Na_2S presence. A perfect Zn and Cd removal efficiency was made during the first 5 min of soil washing process, then a longer flotation time (> 5 min) caused mechanical entrainment of Zn and Cd.

Keywords

Biosurfactants, emulsification, *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids.

الملخص

تم عزل خمسين سلالة بكتيرية من التربة الملوثة بالهيدروكربونات في شمال غرب الجزائر، واختبارها لإنتاج البيوسيرفاكتانت باستخدام قطرة الانهيار، التثريد النفطي، النشاط الإستحلابي (E_{24}) وقياس النشاط السطحي. كانت السلالات S1PS2 ، S7PS5 و S9PS2 أفضل ثلاثة منتجين وإختيرت لتحسين الإنتاج (S1PS2 : $E_{24} = 56.32 \pm$ ، $0.12 \pm 30.17 = \text{حد}$ و $0.35 \pm 5.733 = \text{حد}$ ، 1.95% ، $0.07 \pm 43.38 = E_{24} : S7PS5$ ، $0.01 \pm 31.23 = \text{حد}$ و 0.10% ، $0.05 \pm 8.66 = \text{حد}$ و $0.26 \pm 44.27 = E_{24} : S9PS2$ ، $0.13 \pm$). بعد التحسين، أظهرت أنها الأمتل لإنتاج الرامنوليبيدات و تم تحديد هويتها باستخدام النظام API 20 NE و تسلسل الحمض النووي S16 الذي يسمح لل S7PS5 أن تصل إلى الجنس *Pseudomonas* وأظهرت 98.84% من التشابه مع *Pseudomonas aeruginosa* LMG 1242^T/Z76651 كأقرب نوع. تمت دراسة عملية معالجة التربة بتقنية التعويم الزبدي واستخدام بيوسيرفاكتانت انيوني (رامنوليبيدات) من أجل استخراج المعادن الثقيلة باستعمال كبريتيد الصوديوم (Na_2S).

أظهر تحليل HPLC وجود L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL1) و L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL2). تم دراسة تأثير الجامع (رامنوليبيدات)، درجة حموضة اللب، خطوة تفعيل كيميائية (سلفرة) وكفاءة وقت العملية المستغرق لتعافي التربة الملوثة ببيونات المعادن من بعد سحق الجسيمات < 250 ميكرون. كانت الرامنوليبيدات التي تنتجها *P. aeruginosa* S7PS5 القدرة على تقليل التوتر السطحي للماء من 72 إلى 40.06 م ن/م ، مع تركيز فعال حاسم (CMC) 35 مغ/ل. وأظهرت النتائج الأولية أن نسبة كبيرة من الزنك ($\text{CF} = 9.29$) والكادميوم ($\text{CF} = 21.2$) عثر في الزبد في درجة حموضة = 12. في مرحلة السلفرة-التعويم، تم الحصول على أفضل CF من الزنك باستخدام 4 مغ/غ من Na_2S لكن CF الكادميوم لم يظهر اختلاف كبير في وجود Na_2S . وقدم الزنك الكمال، و أفضل إزالة للكادميوم و الزنك تمت خلال 5 دقائق الأولى من عملية غسل التربة، ثم إن التعويم لفترة أطول (< 5 دقائق) يؤدي إلى السحب الميكانيكي للزنك والكادميوم.

الكلمات المفتاحية

البيوسيرفاكتانت ، النشاط الإستحلابي ، *Pseudomonas aeruginosa* ، الرامنوليبيدات .

Table des matières

	Page
Introduction	18
 Chapitre I	
Synthèse bibliographique	
I.1. La bioremédiation.....	21
I.1.1. Les différents types de polluants.....	21
I.1.2. La biodépollution de l'eau.....	22
I.1.3. La biodépollution de l'air.....	22
I.1.4. La biodépollution des sols.....	23
I.2. Les biosurfactants.....	24
I.2.1. Composition et structure chimique.....	25
I.2.2. La concentration micellaire critique (CMC).....	25
I.2.3. Classification et propriétés des biosurfactants.....	26
I.2.3.1. Les biosurfactants de faible poids moléculaire.....	28
I.2.3.1.1. Les Glycolipides	28
I.2.3.1.2. Les acides gras et phospholipides	30
I.2.3.1.3. Les lipopeptides	30
I.2.3.2. Les biosurfactants de haut poids moléculaire.....	31
I.2.4. Applications industrielles des biosurfactants.....	32
I.2.5. Les facteurs influençant la production des biosurfactants par les micro-organismes.....	32
I.3. Biosurfactants et remédiation aux métaux lourds	33
I.3.1. Enlèvement des métaux par flottation	34
I.3.2. Le principe de la flottation en cellule agitée	35
I.4. Les métaux lourds	36
I.4.1. Origine des métaux lourds	37
I.4.1.1. Origine naturelle	37
I.4.1.2. Les sources anthropiques.....	37
I.4.2. Caractéristiques générales des métaux lourds.....	37
I.4.2.1. Le Fer	37
I.4.2.2. Le zinc.....	37
I.4.2.3. Le cuivre.....	38
I.4.2.4. Le nickel	38
I.4.2.5. Le chrome.....	39

Table des matières

	Page
I.4.2.6. Le cadmium.....	39
I.4.2.7. Le plomb.....	40
I.4.2.8. Le manganèse.....	40
I.5. Paramètres intrinsèques au sol influençant le transfert des métaux lourds.....	41
I.5.1. Éléments constitutifs du sol.....	41
I.5.1.1. Les minéraux argileux.....	41
I.5.1.2. Les carbonates	41
I.5.1.3. Les hydr(oxydes) de fer, d'aluminium et de manganèse.....	42
I.5.1.4. La matière organique.....	42
I.5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques.....	42
I.5.2.1. Le pH du sol.....	42
I.5.2.2. La capacité d'échange cationique (CEC).....	43
I.5.2.3. Les conditions d'oxydo-réduction.....	43
I.5.2.4. La force ionique.....	43
I.5.2.5. L'activité microbienne.....	43
 Chapitre II	
Matériel et méthodes	
II.1. Objectifs	45
II.2. Echantillonnage.....	45
II.3. Stratégie de l'isolement	46
II.3.1. Isolement des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
II.3.2. Dépistage des potentiels producteurs de biosurfactants	46
II.3.2.1. Préparation des inoculums	46
II.3.2.2. Inoculation du milieu de culture	46
II.3.2.3. Tests de production des iosurfactants	47
II.3.2.3.1. Épreuve de chute (Drop collapsing).....	47
II.3.2.3.2. Déplacement de l'huile (Oil displacement).....	47
II.3.2.3.3. Activité d'émulsification	48
II.3.2.3.4. Mesure de l'activité de surface	48
II.4. Identification des souches performantes	49
II.4.1. Sélection des souches les plus performantes	49
II.4.2. Milieu de culture et conditions de croissance pour la production de biosurfactants	49

Table des matières

	Page
II.4.2.1. Optimisation de la quantité d'huile d'olive.....	49
II.4.2.2. Optimisation de l'inoculum	49
II.4.2.2.1. Cinétique de croissance.....	49
II.4.2.2.2. Optimisation de la quantité de l'inoculum.....	50
II.4.3. Identification de la souche la plus performante	50
II.4.3.1. Aspect macroscopique des colonies bactériennes	50
II.4.3.2. Observation microscopique à l'état frais.....	50
II.4.3.3. Observation microscopique après fixation (Coloration de Gram).....	51
II.4.3.4. Test de Catalase.....	51
II.4.3.5. Test de l'Oxydase.....	51
II.4.3.6. Identification biochimique par le système API 20 NE.....	52
II.4.3.7. Caractérisation moléculaire et analyse phylogénétique.....	52
II.4.3.7.1. Extraction et amplification par PCR de l'ADNr 16S	52
II.4.3.7.2. Séquençage de l'ADNr 16S	53
II.4.3.7.3. Analyse phylogénétique	53
II.5. Production et purification des biosurfactants	54
II.6. Détermination du pourcentage de rhamnose	54
II.7. Détermination de la concentration micellaire critique	55
II.8. Analyses HPLC	55
II.9. Enlèvement des métaux lourds par flottation en cellule agitée	56
II.9.1. Le sol.....	56
II.9.1.1. Localisation	56
II.9.1.2. Distribution des métaux lourds et caractérisation physico-chimique du sol.....	56
II.9.1.2.1. Analyse granulométrique	56
II.9.1.2.2. Détermination du pHeau	57
II.9.1.2.3. Détermination de la teneur en matière organique	57
II.9.1.2.4. Détermination de la teneur en calcaire total et calcaire actif.....	57
II.9.1.2.5. Détermination des cations échangeables.....	57
II.10. Méthode de flottation.....	58
II.10.1. Préparation du Sol.....	58

Table des matières

	Page
II.10.2. Sorption du biotensioactif.....	58
II.10.3. Procédure du test de flottation.....	59
II.10.4. Effet du pH de la pulpe.....	61
II.10.5. Effet de l'activation chimique de la pulpe.....	61
II.10.6. Influence du temps de flotation.....	61
II.11. Analyses statistique.....	61
Chapitre III	
Résultats et discussions	
III.1. Isolement des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
III.2. Tests de production des biosurfactants	65
III.2.1. Épreuve de chute (Drop collapsing).....	65
III.2.2. Déplacement de l'huile (Oil displacement)	66
III.2.3. Activité d'émulsification.....	69
III.2.4. Mesure de l'activité de surface.....	71
III.3. Sélection des souches les plus performantes	74
III.4. Milieu de culture et conditions de croissance pour la production des biosurfactants	75
III.4.1. Optimisation de la quantité d'huile d'olive.....	75
III.4.2. Optimisation de l'inoculum.....	76
III.4.2.1. Cinétique de croissance.....	76
III.4.2.2. Optimisation de la quantité de l'inoculum.....	77
III.5. Identification de la souche la plus performante.....	77
III.5.1. Identification phénotypique	77
III.5.2. Caractérisation moléculaire et analyse phylogénétique.....	80
III.6. Production et purification des rhamnolipides.....	83
III.6.1. Détermination du pourcentage de rhamnose.....	83
III.6.2. Détermination de la concentration micellaire critique.....	83
III.6.3. Analyses HPLC	84
III.7. Enlèvement des métaux lourds par flottation en cellule agitée.....	85
III.7.1. Caractérisation physico-chimique du sol.....	85
III.7.2. Distribution des métaux lourds dans le sol étudié.....	86
III.7.3. Sorption du biotensioactif.....	87
III.7.4. Méthode de flottation.....	87

Table des matières

	Page
III.7.4.1. Effet du pH de la pulpe	87
III.7.4.2. Effet de l'activation chimique de la pulpe.....	91
III.7.4.3. Influence du temps de flottation.....	93
Conclusion et perspectives.....	96
Références bibliographique.....	99
Annexe.....	118

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Les biosurfactants de haut poids moléculaire	27
Tableau 2: Les biosurfactants de faible poids moléculaire	28
Tableau 3: Les différentes applications des biosurfactants	32
Tableau 4: Origines des prélèvements effectués au niveau de l'ouest algérien	45
Tableau 5: Nombre et codification des souches isolées à partir des sites contaminés	64
Tableau 6: Résultat du test "Drop collapsing" réalisé sur les différentes souches isolées	66
Tableau 7: Résultat du test " Déplacement de l'huile " réalisé sur les différentes souches isolées	67
Tableau 8: Les valeurs d'indices d'émulsion (%), diamètres de la zone claire (cm) et réduction de la tension superficielle (%) pour les souches S1PS2, S7PS5 et S9PS2	74
Tableau 9: Aspect macroscopique et microscopique de la souche S7PS5	78
Tableau 10: Résultat du blast de la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat S7PS5 avec les souches types des espèces du genre <i>Pseudomonas</i>	82
Tableau 11: Caractéristiques physico-chimiques du sol étudié	85
Tableau 12: Concentrations des métaux lourds dans le sol étudié	86

Liste des figures

	Page
Figure 1: Représentation schématique d'une micelle de surfactant	26
Figure 2: La relation entre la concentration en biosurfactant, la tension superficielle et la formation de micelles	26
Figure 3: Structure chimique des rhamnolipides	29
Figure 4: Structure des tréhalolipides	29
Figure 5: Structure de la forme lactone et la forme acide des sophorolpides	30
Figure 6: Structure d'une molécule de surfactine	31
Figure 7: Mécanisme d'action des biosurfactants dans le sol contaminé par des métaux lourds	35
Figure 8: Schéma simplifié de la cellule de flottation de type Denver D1 et du principe de flottation	36
Figure 9: Aspect de la fine couche de pétrole à surface de l'eau	47
Figure 10: Procédure d'observation à l'état frais	51
Figure 11: Schéma de principe du lavage de sol utilisé pour enlever les métaux lourds à partir du sol	58
Figure 12: Montage de la cellule de flottation utilisée pour cette étude	60
Figure 13: Process et instrumentation de l'unité flottation	60
Figure 14: Aspect des isolats bactériens sur gélose au cétrimide sous U.V à 366 nm	63
Figure 15: Déplacement de la couche superficielle de pétrole due à la présence de biosurfactants dans les surnageants des souches testées	66
Figure 16: Comparaison des diamètres des halos claires dus aux biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh.	68
Figure 17: Emulsification de l'huile en présence de biosurfactants dans les surnageants des souches testées	69
Figure 18: Comparaison des indices d'émulsions (E_{24}) dus aux biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh	70
Figure 19: Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité de l'huile en présence de surfactants	71

Liste des figures

	Page
Figure 20: Comparaison des pourcentages de réduction de la tension superficielle dus au biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh.	73
Figure 21: Effet de la quantité de l'huile d'olive sur le pourcentage de réduction de la tension superficielle dus au biosurfactants produits par les souches S7PS5, S9PS2 et S1PS2	75
Figure 22: Cinétiques de croissance des souches S7PS5, S9PS2 et S1PS2 cultivées dans du bouillon nutritif à température ambiante (26 à 30 °C) avec une agitation de 75 tr/min	76
Figure 23: Effet de la quantité d'inoculum sur le pourcentage de réduction de la tension superficielle dus au biosurfactants produits par les souches S7PS5, S9PS2 et S1PS2	77
Figure 24: Coloration de Gram de la souche S7PS5	78
Figure 25: Résultat positif du test oxydase	78
Figure 26: Résultat négatif du test oxydase	78
Figure 27: Aspect de la galerie API 20 NE inoculée par la souche S7PS5 après 24 h d'incubation à 30 °C	79
Figure 28: Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche S7PS5 par le Bacterial Identification Program	79
Figure 29: Séquence de l'ADNr 16S (810 paires de bases) de la souche S7PS5	80
Figure 30: Arbre phylogénétique basé sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S et montrant les relations entre l'isolat S7PS5 et les souches-types de toutes les espèces similaires	81
Figure 31: Droite d'étalonnage utilisée pour le dosage du L-Rhamnose (mg/L)	83
Figure 32: Tension de surface en fonction de la concentration en biosurfactant	84
Figure 33: Chromatogramme HPLC des rhamnolipides produits par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> S7PS5	84
Figure 34: Résultats du dosage des cations échangeables dans le sol étudié	85
Figure 35: Effet du pH sur la flottation du Fe, Mn, Zn, Cd, Co et Cr en présence de rhamnolipides	90

Liste des figures

	Page
Figure 36: Effet du Na_2S sur la flottation du Fe, Mn, Zn, Cd, Co et Cr à $\text{pH} = 12$ en présence de rhamnolipides	92
Figure 37: Les facteurs de concentration de Zn et Cd en fonction du temps de flottation	93
Figure 38: La tension de surface (mN/m) de la pulpe en fonction du temps de flottation	94

Liste des Annexes

	Page
Annexe A	Milieux de culture 118
Annexe B	Procédure d'utilisation de la galerie API 20 NE 119
Annexe C	1. Extraction de l'ADN 122 2. Quantification des rhamnolipides
Annexe D	Diagrammes E-pH du Fe, Mn, Zn, Cd, Co et Cr 123

Introduction

Introduction

L'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement suite à l'accélération du développement économique. Certains de ces polluants contaminent les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison des pratiques agricoles.

Certains microorganismes éliminent plus ou moins rapidement les polluants organiques biodégradables, mais les métaux lourds (cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc...) et les métalloïdes (sélénium et arsenic) persistent dans l'environnement et s'accumulent inévitablement. Ils peuvent migrer vers les eaux de surface ou souterraines ou pénétrer la chaîne alimentaire via les végétaux pour se retrouver dans les animaux et éventuellement dans l'homme. Lorsque le risque pour les écosystèmes et l'homme est très élevé, la dépollution s'impose.

La bioremédiation consiste à utiliser des systèmes biologiques pour réduire le niveau de pollution présents dans l'air, l'eau ou le sol, c'est une option avantageuse pour diminuer la pression exercée sur l'environnement.

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles à activité de surface, produits par un certain nombre de micro-organismes, y compris les bactéries, les levures et les champignons. Cependant, l'avantage le plus important des biosurfactants est leur acceptation écologique. Les biosurfactants sont biodégradables et peuvent être produits à partir de substrats renouvelables (**Fiechter, 1992**).

Les rhamnolipides constituent l'une des classes les plus intéressantes des biosurfactants en raison de leurs caractéristiques avantageuses, c'est les biosurfactants les plus efficace et sont appliqués dans plusieurs industries de bioremédiation (**Banat et al., 2000 ; Providenti et al., 1995**).

Plusieurs sources de carbone peuvent être utilisées par la bactérie dont les matières premières, comme les huiles usées ou des déchets de l'industrie alimentaire (**Soberón-Chávez et al., 2005 ; Banat et al., 2000**) et donnent des rendements plus élevés par rapport à d'autres biosurfactants.

La structure chimique de ce groupe de biosurfactants est composée d'une tête hydrophile qui contient une ou deux molécules de rhamnose, appelé monorhamnolipid et dirhamnolipid, respectivement, et une queue hydrophobe contenant un ou deux acides gras (**Banat et al., 2000**), les rhamnolipides sont principalement produits par *Pseudomonas aeruginosa* (**Wan et al., 2011**).

De nos jours, les récents progrès effectués en matière de réduction du coût de production et la découverte de nouvelles souches productrices laissent entrevoir un avenir prometteur.

La présence de faibles concentrations de métaux lourds dans les sols est connu pour avoir un impact potentiel sur la qualité de l'environnement et la santé humaine par l'intermédiaire de l'eau souterraine, eau de surface, les plantes et les produits agricoles (**Aşçı et al., 2008**). Les biosurfactants possèdent une sélectivité plus élevée que les tensio-actifs synthétiques pour les métaux et les composés organiques (**Mulligan et al., 2001**), une toxicité inférieure, une biodégradabilité supérieure, un pouvoir moussant plus élevée (**Wang et Mulligan, 2004**), plus de tolérance aux pH, aux sels et aux variations de température (**Mulligan, 2005**).

Cette étude consiste en l'exploitation de ces agents tensio-actifs dans une application environnementale comprenant la remédiation d'un sol contaminé par les métaux lourds en utilisant la technique de flottation en cellule agitée.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1. La bioremédiation

L'utilisation intensive et abusive des ressources et le rejet brutal des déchets dans l'environnement contribuent à détériorer notre milieu et à l'apparition de nouveaux risques pour l'équilibre des écosystèmes (air, eau et sol) (**Stravinskaite et Gonzalez, 2012**).

Les processus biologiques utilisés pour décontaminer l'environnement s'avèrent plus économiques que les traitements physico-chimiques induisent d'importantes modifications des propriétés du milieu (**Burton et Stensel, 2003**).

La bioremédiation ou la biodépollution est l'utilisation d'organismes vivants, et plus particulièrement de micro-organismes (champignons, bactéries, microalgues) pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels (**Boopathy, 2000**). Des changements s'opèrent dans le métabolisme énergétique de certaines bactéries en présence de certains facteurs environnementaux (**Kermarrec, 1999**), la biodépollution consiste en l'optimisation de ces facteurs afin d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes pour accélérer la décontamination des sites pollués.

En effet, l'utilisation des micro-organismes offre un potentiel intéressant qui peut être hautement sélectif, ils sont capables aussi de transformer la plupart des polluants inorganiques et organiques (**Sautel, 1991**). La biodépollution consiste en une élimination complète d'un composé avec comme seul rejet des produits simples tels que l'eau, le dioxyde de carbone, le méthane, l'hydrogène, etc. La minéralisation implique que le produit ultime de la biotransformation du substrat est le dioxyde de carbone, cette notion inclut que le polluant est utilisé comme source de carbone (**Pelmont, 1993**).

I.1.1. Les différents types de polluants

Les polluants sont de nature très diverse, ils comprennent une grande variété de composés organiques (les polychlorobiphényles, les hydrocarbures, les dioxines et furannes, les chlorofluocarbones, les phtalates), certains métaux et des gaz (**Amiard, 2011**).

Les métaux lourds sont des composés hautement persistants et non biodégradables, la résistance bactérienne aux ions métalliques (réduction de l'absorption, accumulation, transformation enzymatique) peut entraîner une détoxification du milieu (**Hobman et al.,**

2007 ; Bruins *et al.*, 2000), permettant ainsi la survie des populations sensibles et le maintien de l'intégrité de l'écosystème.

Les polluants organiques persistants (POP) sont des composés organiques rejetées dans l'environnement par diverses activités anthropiques et qui résistent à la dégradation photolytique, biologique et chimique. Ils ont des effets néfastes sur la santé des écosystèmes, des espèces sauvages et des gens, les procédés de dépollution par voie biologique basés sur la biotransformation microbienne des polluants s'adresse aujourd'hui à la plupart de ces composés et prend de plus en plus d'importance (Navacharoen et Vangnai, 2011; Wang *et al.*, 2012).

I.1.2. La biodépollution de l'eau

Les substances polluantes de l'eau sont celles qui la rendent impropre à la consommation ou qui dégradent certaines de ses propriétés (Bliefert et Perraud, 2001). L'activité humaine (industries, agriculture, décharges...) est la principale origine de la pollution de l'eau et se manifeste principalement dans les eaux de surface.

L'épuration naturelle ou auto-épuration est un processus relativement lent qui permet à un écosystème de réduire ou de supprimer les polluants contenus dans l'eau. Elle résulte de phénomènes physico-chimiques naturels (filtration, adsorption, oxydation, décantation) et/ou de l'action d'organismes vivant dans l'eau (bactéries, algues, champignons) qui consomment cette pollution (Zgheib, 2009).

Le lagunage est un procédé biologique de traitement des eaux usées qui consiste à laisser l'eau se reposer dans des bassins ouverts peu profonds de 1 à 5 m de profondeur pendant une durée variant de 30 à 60 jours, impliquant un large éventail de micro-organismes (essentiellement des algues et des bactéries). Les mécanismes épuratoires et les micro-organismes qui y participent sont fondamentalement les mêmes que ceux responsables du phénomène d'autoépuration des lacs et des rivières (Pearson, 2005).

I.1.3. La biodépollution de l'air

La pollution atmosphérique peut être définie par la présence de polluants (gazeux ou particules) dans l'atmosphère ou de la variation importante dans la proportion de ses composants, pouvant provoquer des effets nocifs sur l'environnement et la santé (Arquès, 1998).

Les grands indicateurs actuels de la pollution de l'air sont le monoxyde de carbone (CO) issu de la combustion incomplète des combustibles fossiles (charbons, fuels, ...) (**Lide, 2008**), les dioxydes de soufre (SO₂) produits naturellement par les volcans et par différents procédés industriels comme les industries métallurgiques et les raffineries de pétrole (**Pascal, 2009**), les oxydes d'azote (NO_x) résultant de l'oxydation de l'azote de l'air par l'oxygène à température élevée (**Arquès, 1998**). Les composés organiques volatils (COV) ou particulaires sont des composés organiques pouvant facilement se trouver sous forme gazeuse dans l'atmosphère dont les principales sources sont le transport automobile, les stations de raffinage et l'évaporation de solvants organiques (**Liu et al., 2012**).

Le traitement biologique des COV consiste à mettre en contact l'effluent gazeux pollué avec des micro-organismes en suspension dans un liquide. Les micro-organismes vont utiliser les composés organiques volatils comme substrat et les dégrader en une biomasse composée d'eau, de produits minéraux et de CO₂, cette méthode peut s'avérer très efficace (rendement de dégradation supérieur à 90 %). L'utilisation des biofiltres ou les micro-organismes sont introduits dans des dispositifs remplis de matériaux naturels (compost, tourbe) ou synthétiques (polypropylène, vermiculite, mousse de polyuréthane) avec un contrôle strict de la température, de l'humidité, du pH et de l'alimentation en oxygène, constitue une voie utilisée aujourd'hui pour la dégradation des COV (**Schnelle et Brown, 2001; Parvulescu et al., 2012**).

I.1.4. La biodépollution des sols

Le sol est le principal réservoir de polluants organiques persistants comme les POP (**Axelman et Broman, 2001**), les HAP (**Juhasz et Naidu, 2000**), les composés de dioxines et furanes (**Duarte-Davidson et al., 1996**) ou les métaux lourds (**Desbordes, 2001**).

Les micro-organismes jouent un rôle important dans la dégradation directe ou indirecte et dans l'immobilisation des polluants du sol, ainsi que de la remobilisation des molécules toxiques ou indésirables (**Migrain et al., 1993**).

La biotransformation microbienne est une biodégradation incomplète permettant de transformer un composé toxique en métabolites organiques inoffensifs (**Kaufmann, 2004**) contrairement à la minéralisation qui est une biodégradation oxydative complète des molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (**Alexander, 1994**).

La bioaccumulation correspond à l'augmentation de la concentration d'une substance dans un organisme vivant, même si elle lui est toxique et n'a aucun rôle métabolique (**Ramade, 2000**).

Tous les micro-organismes vivants sont capables, à divers degrés, d'accumuler des substances toxiques, la bioaccumulation est estimée par le facteur de bioconcentration (BCF) qui est le rapport de la concentration dans l'organisme vivant sur la concentration dans le milieu (**Pichard et al., 2005**).

I.2. Les biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe structurellement divers de substances tensio-actives produites par les micro-organismes. Ces composés sont appelés agents de surface, molécules amphiphiles, agents tensio-actifs. Le terme le plus couramment utilisé : SURFACTANT provient de l'acronyme anglais SURFace ACTive ageNTS (**Al-Arajil et al., 2007**). Tous les biosurfactants sont amphiphiles (**Prommachan, 2002**), ils se composent de deux parties: partie hydrophile polaire et partie hydrophobe non polaire (**Maier, 2003**). Le groupement hydrophile est constitué de mono, oligo ou polysaccharides, des peptides ou des protéines et un fragment hydrophobe qui contient généralement des acides gras saturés, insaturés, et hydroxylés ou des alcools gras (**Lang, 2002**). En présence d'un surfactant synthétique ou naturel, la tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m (**Christofi et al., 2002**).

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaire produits en particulier les espèces de *Pseudomonas* (**Abouseoud et al., 2007**; **Soberon-Chavez et al., 2005**; **Thanomsub et al., 2006**). Les biosurfactants sont des métabolites microbiens qui peuvent être excrétés dans les médias extracellulaires ou incorporés principalement dans la paroi cellulaire facilitant ainsi la diffusion d'un substrat hydrophobes dans la cellule (**Al-Arajil et al., 2007**), les concentrations (ou rendements) obtenus dans les fermentations en utilisant *P. aeruginosa* sont à présent nettement supérieurs à ceux des autres espèces (**Pinzon-Gamez, 2009**).

I.2.1. Composition et structure chimique

Les molécules tensioactives comportent deux parties de polarités différentes, une partie polaire possédante une affinité pour l'eau de nature anionique, cationique ou neutre, par contre la partie apolaire possède une affinité pour les huiles constituée d'une chaîne carbonée aliphatique (**West et Harwell, 1992**).

Les tensioactifs anioniques libèrent une charge négative (anion) en solution aqueuse et possèdent une tendance hydrophile plus marquée, ce sont les agents tensioactifs les plus utilisés sur l'échelle industrielle, les tensioactifs cationiques quant à eux comportent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse et ce sont le plus souvent des sels d'ammonium quaternaire (sels d'alkyltriméthylammonium, sels d'alkylbenzyl diméthylammonium) (**Perraud, 2009**).

Les tensioactifs zwitterioniques contiennent à la fois des groupements acides et basiques et se comportent comme surfactant anioniques ou cationique suivant le pH du milieu où ils se trouvent, ils se neutralisent au pH isoélectrique et sont parfois classés comme non ioniques. Les bétaines et les sulfobétaines sont les composés tensioactifs zwitterioniques les plus répandus (**Perraud, 2009**).

L'hydrophilie des tensioactifs non ioniques est apportée par des groupements fonctionnels non chargés de nature alcool, éther, ester ou amide et contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. En raison de la faible contribution hydrophile de ces fonctions, les composés tensioactifs non ioniques sont le plus souvent polyfonctionnels (**Perraud, 2009**).

I.2.2. La concentration micellaire critique (CMC)

La CMC d'un agent de surface est la concentration au-dessus de laquelle des micelles se forment, c'est la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle les molécules dispersées se rassemblent spontanément pour former des micelles (**Pore, 1992**). Lorsque les portions hydrophobes sont incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, ils créent une forte augmentation de l'énergie libre du système, une façon à abaisser cette énergie est d'isoler la partie hydrophobe de l'eau par adsorption sur des matrices organiques ou par formation des micelles (**Haigh, 1996**). Les parties hydrophobes dans les micelles se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles externes restent en contact avec l'eau (**Fig. 1**).

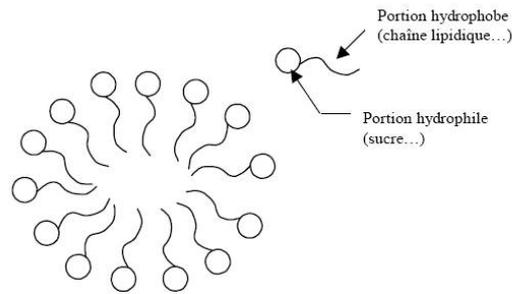


Fig. 1 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant (Shinoda et Fontell, 1995).

À des concentrations supérieures à la CMC, les molécules de biosurfactants s'associent pour former des micelles (Fig. 2). La formation de micelles permet de réduire la tension superficielle et interfaciale et d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des composés organiques hydrophobes (Whang *et al.*, 2008).

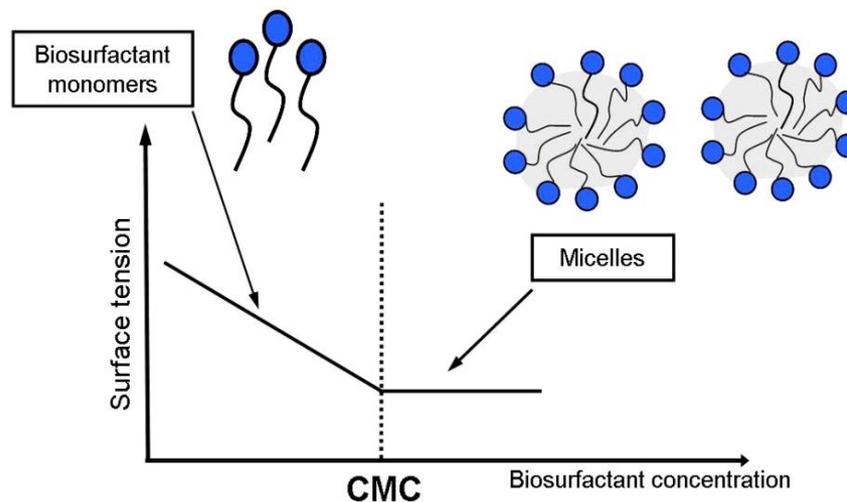


Fig. 2 : La relation entre la concentration en biosurfactant, la tension superficielle et la formation de micelles (Whang *et al.*, 2008).

1.2.3. Classification et propriétés des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, le poids moléculaire, les propriétés physico-chimiques, le mode d'action et l'origine microbienne. Basé sur le poids moléculaire, ils sont divisés en biosurfactants de faible masse moléculaire comprenant les phospholipides, les glycolipides et les lipopeptides, et en biosurfactants de haute masse moléculaire contenant des polysaccharides amphipathiques, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges complexes de ces biopolymères.

Les biosurfactants de haut poids moléculaire sont plus efficaces pour stabiliser des émulsions d'huile dans l'eau, alors que biosurfactants de faible poids moléculaire sont

efficaces dans la réduction des tensions de surfaces et des tensions interfaciales (Rosenberg et Ron, 1999 ; Calvo *et al.*, 2009). Des exemples d'agents tensioactifs biologiques et leurs producteurs sont représentés dans le Tab. 1 et 2.

Les biosurfactants s'accumulent à l'interface entre deux fluides non miscibles, ou entre un liquide et un solide. En réduisant la tension de la surface (liquide-air) et l'interface (liquide-liquide), ils réduisent les forces de répulsion entre deux phases dissemblables et permettent à ces deux phases de se mélanger et d'interagir plus facilement (Banat *et al.*, 2000).

Tab. 1: Les biosurfactants de haut poids moléculaire.

Biosurfactant	Micro-organismes producteurs	Références
RAG-1 emulsan	<i>A. calcoaceticus</i> RAG-1	Rosenberg <i>et al.</i> , 1979a
Emulsan BD4	<i>A. calcoaceticus</i> BD413	Kaplan et Rosenberg, 1982
Alasan	<i>A. radioresistens</i> KA53	Navon-Venezia <i>et al.</i> , 1995
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i> A2	Rosenberg, 1993
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>	Kaeppli <i>et al.</i> , 1984
Liposan	<i>C. lipolytica</i>	Cirigliano et Carman, 1984
Emulsan 378	<i>P. fluorescens</i>	Persson <i>et al.</i> , 1988
Acetyl hetero polysaccharide	<i>S. paucimobilis</i>	Ashtaputre et Shah, 1995
Polysaccharides Sulfatés	<i>H. eurihalinia</i>	Calvo <i>et al.</i> , 1998
PM-factor	<i>P. marginalis</i>	Burd et Ward, 1996

Tab. 2: Les biosurfactants de faible poids moléculaire.

Biosurfactant	Micro-organisms producteurs	Références
Rhamnolipids	<i>P. aeruginosa</i>	Rendell <i>et al.</i> , 1990
	<i>P. fluorescens</i>	Abouseoud <i>et al.</i> , 2007
Trehalose lipids	<i>Pseudomonas spp.</i>	Parra <i>et al.</i> , 1989
	<i>R. erythropolis</i>	Ristau et Wagner, 1983
Sophorolipids	<i>Arthrobacter sp.</i>	Li <i>et al.</i> , 1984
	<i>Mycobacterium sp.</i>	Cooper <i>et al.</i> , 1989
	<i>T. bombicola (yeast)</i>	Inoue et Itoh, 1982
Viscosine	<i>P. fluorescens</i>	Neu et Poralla, 1990
Surfactine	<i>B. subtilis</i>	Arima <i>et al.</i> , 1968
Gramicidine S	<i>B. brevis</i>	Katz et Demain, 1977
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1965
Serrawettine	<i>S. marcescens</i>	Matsuyama <i>et al.</i> , 1991
Phospholipids	<i>Acinetobacter spp.</i>	Kaeppli et Finnerty, 1980
	<i>T. thiooxidans</i>	Beebe et Umbreit, 1971
Acides gras	La plus part des M.O	MacDonald <i>et al.</i> , 1981

I.2.3.1. Les biosurfactants de faible poids moléculaire

I.2.3.1.1. Les Glycolipides

Les rhamnolipides, les trehalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés, ce sont généralement des disaccharides acylés par des acides gras à longue chaîne (**Fig. 3, 4 et 5**). Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques (**Healy *et al.*, 1996**).

Les rhamnolipides sont des lipides extracellulaires produits par les bactéries du genre *Pseudomonas* (**Abouseoud *et al.*, 2007**), ces biotensioactifs contiennent une ou deux unités de rhamnose liés à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque (**Fig. 3**).

Ce sont des détergentes très puissantes et sont produits commercialement comme agents d'assainissement des sols et de lutte contre la pollution marine par les hydrocarbures, ils sont aussi bien connus pour leurs capacité à se lier à des substrats ayant un faible degré de solubilité dans l'eau tel que les polluants hydrophobes (Wan *et al.*, 2011).

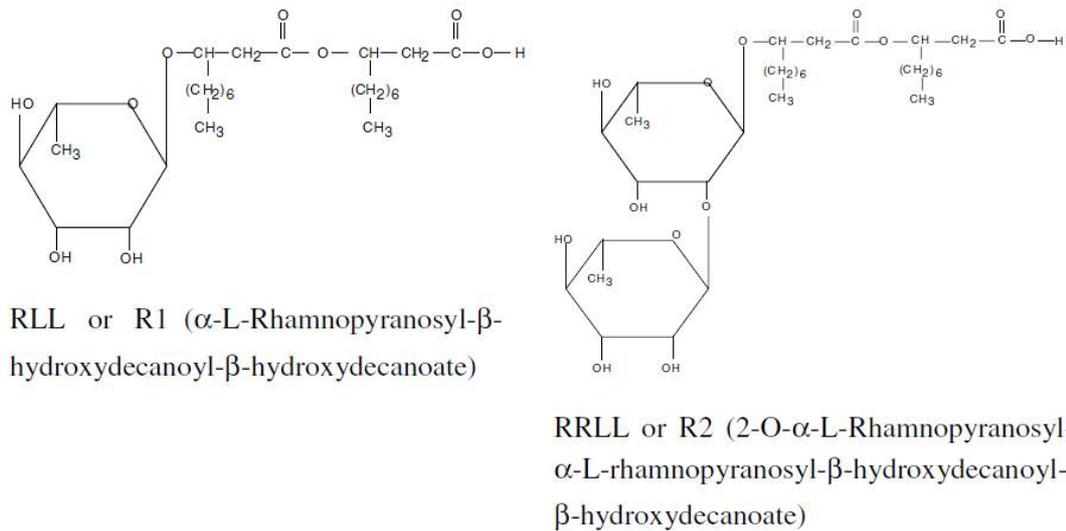


Fig. 3 : Structure chimique des rhamnolipides (Urum et Pekdemir, 2004).

Les tréhalolipides microbiens sont connus pour être de puissants tensioactifs, le disaccharide tréhalose est lié en C6 et C6' à l'acide mycolique (Fig. 4) est l'élément de base d'un certain nombre de glycolipides de la paroi cellulaire des mycobactéries et des corynébactéries (Muthusamy *et al.*, 2008). L'enveloppe cellulaire des espèces de *Rhodococcus* contient également des lipides tréhalose sulfatés et sont surtout produits en présence d'hydrocarbures (Kim *et al.*, 1990).

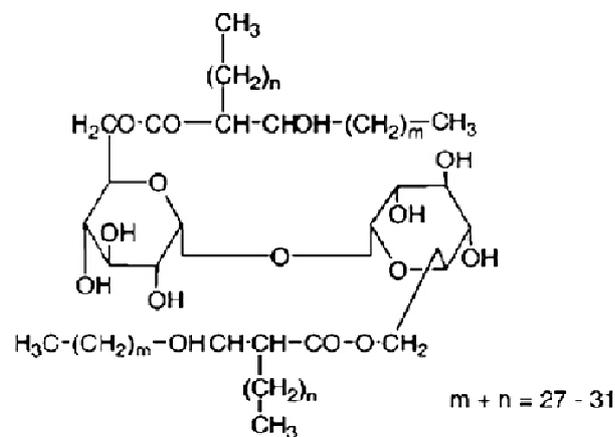


Fig. 4 : Structure des tréhalolipides (Muthusamy *et al.*, 2008).

Les sophorolipides ou sophorosides sont des glycolipides extracellulaire sécrétés par certaines espèces de levures telle que *Candida bombicola*, ils contiennent une longue chaîne d'acide gras supplémenté de deux unité de glucose (β -1,2) (**Fig. 5**) (**Muthusamy et al., 2008**). Les sophorolipides sont considérés comme moyen de défense contre les micro-organismes concurrents et peuvent servir au stockage du carbone extracellulaire (**Huldborg et al., 2008**).

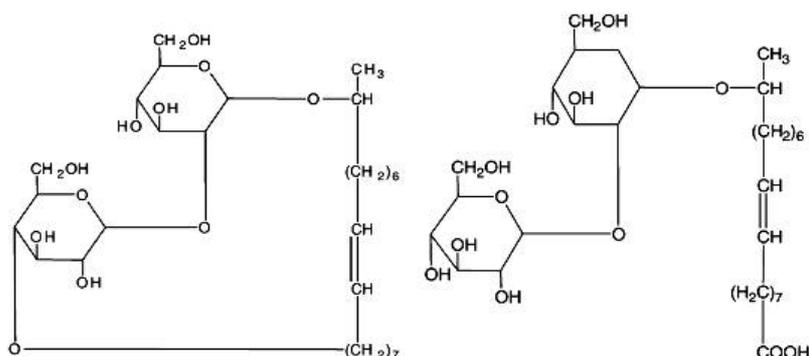


Fig. 5 : Structure de la forme lactone et la forme acide des sophorolipides (**Muthusamy et al., 2008**).

I.2.3.1.2. Les acides gras et les phospholipides

Les acides gras considérés comme tensioactif résultent de l'oxydation microbienne des alcanes (**Rehm et Reiff, 1981**). Les acides gras saturés les plus actifs sont dans la gamme C-12 à C-14. En plus de la chaîne linéaire d'acides gras, les micro-organismes produisent des acides gras complexes tels que les acides corynomycoliques contenant des groupes hydroxyle et des branches d'alkyle, ce sont des tensioactifs puissants (**MacDonald et al., 1981**).

Les phospholipides sont des lipides contenant un groupe acide phosphorique, ce sont les constituants essentiels des membranes microbiennes, en milieu aqueux, de telles molécules amphiphiles tendent à s'organiser de telle sorte que seule leur tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau, ce qui aboutit typiquement à des structures en micelle ou en bicouche lipidique (**Healy et al., 1996**).

I.2.3.1.3. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont constituées d'un cycle peptidique lié à une chaîne d'acide gras, ce sont des molécules amphiphiles dont la partie peptidique est soluble dans l'eau et leur partie lipidique est soluble dans l'huile, plusieurs antibiotiques de nature

lipopeptidique montrent de puissantes propriétés de surface (Peypoux *et al.*, 1999 ; Kell *et al.*, 2007). La surfactine produite par *Bacillus subtilis* est un lipopeptide cyclique formé d'un peptide de 7 acides aminés lié à un acide gras β -hydroxylé linéaire ou ramifié contenant de 13 à 15 atomes de carbone (Fig. 6) (Chtoui *et al.*, 2011). La surfactine présente de nombreuses activités biologiques et semble être appliquée dans plusieurs domaines de pétrochimie, agroalimentaire, agriculture, industrie pharmaceutique et cosmétique (Banat *et al.*, 2000 ; Deleu *et al.*, 2005 ; Sovadogo *et al.*, 2004). Ils ont des rôles très diversifiés pour la croissance des bactéries et qui dépendent de la niche écologique dans laquelle elles se trouvent (Ron et Rosenberg, 2001).

Des bactéries du genre streptomyces produisent un peptide hydrophobe extracellulaire appelé streptofactine constituée d'un mélange de peptides qui jouent un rôle important dans le développement des *Streptomyces* et permettant la construction des hyphes aériens en abaissant la tension superficielle de l'eau entourant les biofilms (Richter *et al.*, 1998).

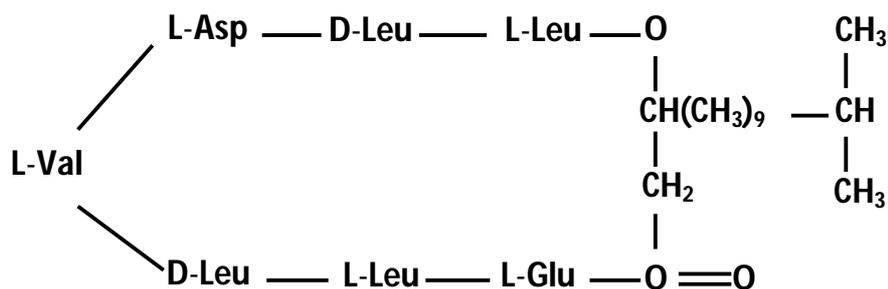


Fig. 6 : Structure d'une molécule de surfactine (Dworkin *et al.*, 2001).

I.2.3.2. Les biosurfactants de haut poids moléculaire

Les biosurfactants les plus étudiés de cette catégorie sont les bioémulsans produits par *Acinetobacter* (Rosenberg et Ron, 1998) et l'émulsan produit par la souche RAG-1 (Perfumo *et al.*, 2010), ce sont des polymères extracellulaires constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides, de lipoprotéines ou de mélanges complexes de biopolymères. *Acinetobacter radioresistens* KA35 produit un bioémulsifiant de haute masse moléculaire appelé alasan de 1MDa, qui est un complexe constitué de polysaccharides et de protéines qui peut être soit sécrété, soit attaché à la paroi cellulaire (Toren *et al.*, 2002). Emulsan peut également se trouver fixé à la surface bactérienne formant des minicapsules et permet l'attachement des cellules aux interfaces hydrophobes,

ce tensioactif ne peut émulsionner les hydrocarbures purs, mais tous les mélanges qui contiennent un mélange approprié d'un composé aliphatiques et aromatique sont émulsionnées efficacement (**Perfumo et al., 2010**).

I.2.4. Applications industrielles des biosurfactants

Les structures chimiques et les différentes propriétés de surface des biosurfactants ainsi que leurs résistance aux conditions extrêmes, rend difficile la généralisation du rôle naturel des biotensioactifs (**Banat et al., 2000**) et fournit des avantages potentiels pour l'exploitation commerciale (**Tab. 3**).

Tab. 3: Les différentes applications des biosurfactants (**Banat et al., 2000**).

Domaine d'application	Fonction
Cosmétiques, peintures	Emulsifiant et dispersant
Pharmaceutique, articles de toilette	Solubilisant et micro-émulsions
Pharmaceutique, industrie textile, peinture	Agent mouillant et pénétrant
Nettoyants ménagers, produits de l'agriculture ou de haute technologie	Détergent
Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais	Agent moussant
Peintures	Agent épaississant
Séparation des mélanges goudron/pétrole ou goudron/eau	Dispersant
Récupération assistée de pétrole	Récupération de ressources

I.2.5. Les facteurs influençant la production des biosurfactants par les micro-organismes

Les micro-organismes qui produisent les biosurfactants sont en général issues de milieux contaminés par des molécules hydrophobes (**Mulligan et al., 2001**). Le rôle physiologique des biotensioactifs est de permettre le développement sur des substrats

insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible au micro-organismes (**Mata-Sandoval et al., 2000**).

La source de carbone influence considérablement la production des biosurfactants, cependant les rendements semblent être très élevés lorsqu'il s'agit des substrats insolubles (**Cameotra et Makkar, 1998; Abouseoud et al., 2007**). La synthèse peut aussi être stimulée en présence d'une quantité limitée d'azote dans le milieu de culture (**Lang et Wullbrandt, 1999**), la production est maximale pour des rapports C/N variant de 16/1 à 18/1.

Le pH, la disponibilité de l'oxygène et les concentrations limitantes en ions magnésium, calcium, potassium et sodium, peuvent également affecter la production à travers leurs effets sur la croissance et l'activité cellulaire (**Champion et al., 1995**).

Certains micro-organismes sont influencés par le type d'agitation du milieu de culture lors de la production des biosurfactants. Pour les bactéries, l'augmentation de la vitesse d'agitation implique un faible rendement. L'effet inverse est obtenu lorsqu'il s'agit des levures (**Desai et Banat, 1997**).

I.3. Biosurfactants et remédiation aux métaux lourds

Il existe de nombreuses techniques utilisées pour nettoyer les sols contaminés par des métaux lourds. Les méthodes biologiques sont des processus qui utilisent les plantes (phytoremédiation) ou des micro-organismes (bioremédiation) pour éliminer les métaux du sol (**Pacwa-Płociniczak et al., 2011**).

Les méthodes de lavage ou de rinçage sont impliquées dans l'assainissement des sols contaminés par les métaux. La première technique utilisée est une technique *ex situ* où le sol est excavé et mis dans une colonne de verre et lavé par une solution biosurfactants. Le rinçage est une technologie de traitement *in situ* du sol qui implique l'utilisation de tuyaux de drain et de tranchées pour introduire et récupérer la solution de biosurfactants à partir du sol (**Herman et al., 1995**). Les biosurfactants peuvent être appliqués à un sol contaminé dans un grand mélangeur de ciment où le complexe biosurfactant-métal est évacuée et où le sol est récupéré en arrière, le complexe biosurfactant-métal est par la suite traitée pour précipiter. La liaison formée entre le métal et le tensioactif est si forte que l'eau de rinçage traversant le sol élimine le complexe métal-agent de surface à partir de la matrice du sol (**Pacwa-Płociniczak et al., 2011**).

I.3.1. Enlèvement des métaux par flottation

La flottation est une méthode éprouvée pour concentrer sélectivement les minerais métalliques (Fuerstunau, 2007). Dans le domaine environnemental, la flottation peut s'intégrer dans un schéma de traitement de type lavage de sol afin de concentrer les métaux. Elle peut être utilisée en combinaison avec d'autres techniques en fonction des caractéristiques de la matrice à traiter et des métaux concernés. La flottation est un outil potentiellement intéressant à explorer pour récupérer les métaux des sols pollués (Aşçı *et al.*, 2008).

L'utilisation des biosurfactants présente des avantages incontestables, car les souches bactériennes capables de produire des composés tensioactifs n'ont pas besoin d'avoir la capacité de survie dans le sol contaminé par des métaux lourds. Cependant, utiliser les biosurfactants seuls, nécessite l'addition continue de nouvelles portions de ces composés (Mulligan et Gibbs, 2004).

L'utilité de ces biotensioactifs pour la bioremédiation des sols contaminés par les métaux lourds est principalement basée sur leur capacité à former des complexes avec des métaux. Les biosurfactants anioniques créent des complexes avec les métaux, ces liens sont plus forts que les liens du métal avec du sol et les complexes métal-biosurfactant sont désorbés de la matrice du sol en raison de l'abaissement de la tension interfaciale. Les ions métalliques peuvent également être enlevés de la surface du sol par les micelles du biosurfactant (Singh et Cameotra, 2004 ; Aşçı *et al.*, 2008). Les groupes de tête polaires de micelles peuvent se lier aux métaux qui mobilisent dans l'eau (Fig. 7).

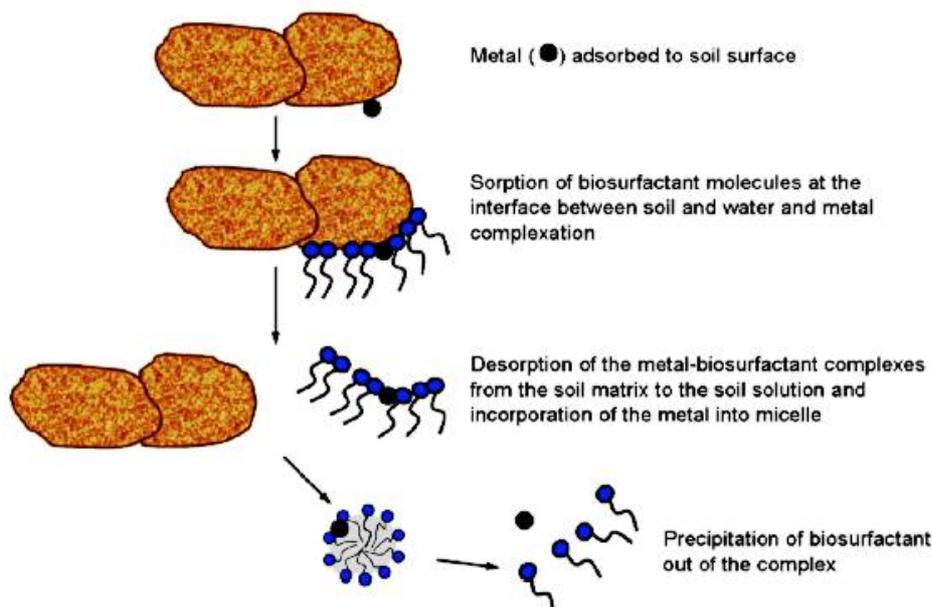


Fig. 7 : Mécanisme d'action des biosurfactants dans le sol contaminé par des métaux lourds (Mulligan, 2005).

I.3.2. Le principe de la flottation en cellule agitée

Le principe consiste à séparer sélectivement les particules sur la base de leurs propriétés physicochimiques de surface. La flottation propose de séparer les métaux, lesquelles sont le plus souvent rendues hydrophobes par l'adsorption en surface des molécules d'agents chimiques tensioactifs, appelés collecteurs. Les particules hydrophobes sont transportées par des bulles d'air injectées dans la pulpe (Mélange de sol et d'eau) en suspension, tandis que les particules peu hydrophobes restent dans la pulpe (**Fig. 8**). En conséquence, et si la dimension de la bulle le permet, les particules collectées sont concentrées dans une mousse qui surnage en surface. La mousse peut ensuite être récoltée par raclage. Généralement, les sulfures (plus hydrophobes) sont plus faciles à flotter que les sulfates, les oxydes, et les carbonates (**Bouchard, 2001**).

Cependant, le processus de séparation sélectif des particules hydrophobes n'est pas le seul mécanisme de transport des particules qui intervient dans la cellule de flottation. En plus des propriétés de surface, les conditions hydrodynamiques dues à l'agitation de la pulpe jouent un rôle majeur dans la séparation. En conséquence, la flottation des particules dépend donc de la probabilité : de la collision entre les particules et les bulles, des processus d'attachement et de détachement du couple particule-bulle (taille des bulles, vitesse d'ascension, stabilité de la mousse, etc.). Il est reconnu que dans les cellules agitées

mécaniquement, les particules fines (généralement $< 20 \mu\text{m}$) sont prioritairement collectées dans la mousse par l'intermédiaire d'un phénomène d'entraînement dans la couche d'eau inter bulles, et ce, indépendamment de leur différence d'hydrophobicité (Cilek et Yilmazer, 2003; Koh et Schwarz, 2007; Vanthuyne et Maes, 2007).

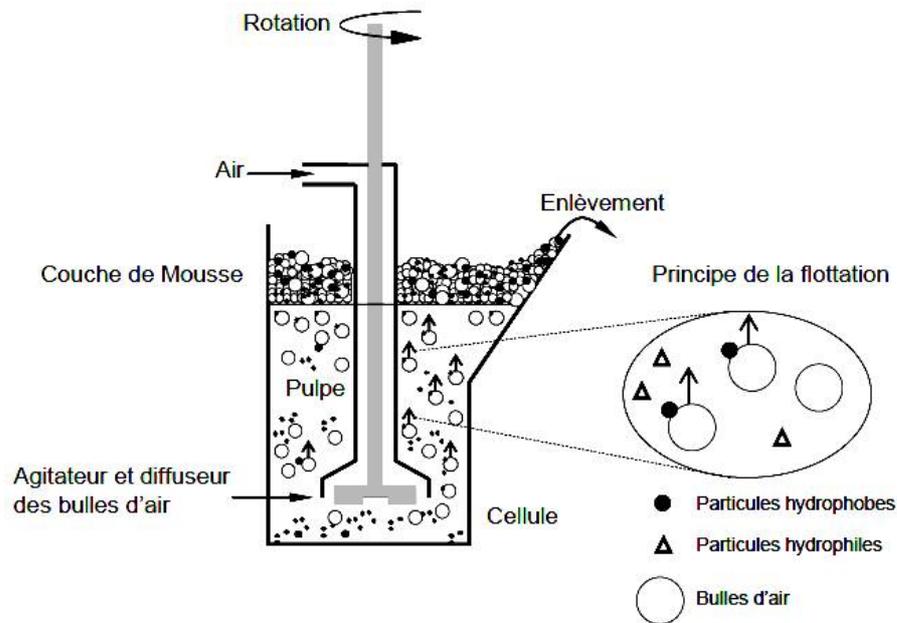


Fig. 8 : Schéma simplifié de la cellule de flottation de type Denver D1 et du principe de flottation (Dermont, 2008).

L'entraînement hydraulique des particules fines contribue à réduire la sélectivité globale de la séparation. En résumé, dans le cas des systèmes de flottation en cellule agitée, la récupération résultera de la combinaison du vrai processus de flottation (sélectif) et de l'entraînement des particules fines (non sélectif).

I.4. Les métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (65 éléments) dont la masse volumique dépassent 5 g/cm^3 (Adriano, 2001). Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires (Loué, 1993), le zinc (Zn) est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets néfastes sur les organismes vivants même à faible concentration et n'ont aucun effet bénéfique connu pour l'environnement. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), du cadmium (Cd) (**Baker et Walker, 1989**).

I.4.1. Origine des métaux lourds

I.4.1.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches et sont libérés lors de l'altération de celles-ci (**Bourellier et Berthelin, 1998**). Toutefois, les différentes activités humaines contribuent également à augmenter leur quantité.

I.4.1.2. Les sources anthropiques

Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle (**Baize, 1997 ; Robert et Juste, 1999**).

I.4.2. Caractéristiques générales des métaux lourds

I.4.2.1. Le Fer

Le fer est un élément chimique, de symbole Fe et de numéro atomique 26. C'est un des oligo-éléments qu'on retrouve dans les aliments, essentiel pour l'homme (et les autres organismes) notamment dans la composition de l'hémoglobine du sang qui permet aux globules rouges la fixation et le transport de l'oxygène dans le corps humain. Au niveau de la membrane mitochondriale interne, l'excès en fer active la réduction ferrique par la réductase ferrique qui, en présence d'oxygène transforme le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Ce qui entraîne l'arrêt de la chaîne des cytochromes et paralyse la production d'ATP en aérobiose (**Haguenoer et Furon, 1982**). Il en résulte un important déficit de production d'énergie.

I.4.2.2. Le zinc

Le zinc est un élément chimique, de symbole Zn et de numéro atomique 30. Il zinc est toxique pour la microflore des rivières, les huîtres, les alevins et les poissons eux mêmes. Il fait l'objet d'un phénomène d'accumulation dans les chaînes alimentaires (poissons et surtout coquillages) (**Chappuis, 1991**).

Zn est un oligo-élément participe aux échanges oxygène-gaz carbonique par les globules rouges. L'apport de cet élément diminue significativement la survenue de certaines infections (essentiellement pneumonie et diarrhée) (**Black, 2003**).

Le zinc est toxique pour la microflore des rivières, les huîtres, les alevins et les poissons eux mêmes. Il fait l'objet d'un phénomène d'accumulation dans les chaînes alimentaires (poissons et surtout coquillages) (**Chappuis, 1991**), dans les poissons la dose létale est comprise entre 0,5 et 5 mg/L en Zn (**Moore et Ramamoorthy, 1984**). Entre 150 et 650 mg, le Zn est toxique chez l'homme (**Emsley, 1991**). Les troubles physiologiques humains causés par ce type d'intoxications vont comprendre des nausées et des troubles du système gastro-intestinal, et seront suivis de complications respiratoire ainsi que par des affections cutanées (**Yong et al., 1993**).

I.4.2.3. Le cuivre

Le cuivre est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. C'est un cofacteur essentiel de la synthèse d'un grand nombre de protéines impliquées dans les réactions d'oxydoréduction, liant ou activant de l'oxygène moléculaire (**Favier, 1990**).

La toxicité du cuivre est relativement faible. A forte dose le cuivre devient toxique, d'où son usage en viticulture (comme fongicide), du fait qu'il a une affinité particulière pour l'azote des peptides, ce qui entraîne l'inactivation des enzymes contaminées. Chez l'homme la pathologie du cuivre est soit hypercuprémie comme dans le cas des maladies génétiques de Wilson (accumulation de cuivre dans le foie) soit hypocuprémie comme dans le cas des maladies de Menkes (carence de cuivre) (**Chappuis, 1991**).

I.4.2.4. Le nickel

Le nickel est un élément chimique, de symbole Ni et de numéro atomique 28. Les concentrations toxiques de Ni dans les plantes se traduisent par un ralentissement de croissance des racines et par une diminution du nombre de grains, une inhibition de l'activité cellulaire générale avec diminution de la chlorophylle et modifications du taux des macromolécules (diminution des protéines et augmentation des glucides) ce qui implique une réduction significative de la production du maïs (**Pugh et al., 2002**).

Le nickel est considéré comme un élément cancérigène (des fosses nasales, des poumons et de larynx) (**Lauwerys et al., 1982**). Même par contact externe, les sels de nickel peuvent entraîner des eczémas (**Goudot-Perrot, 1983**).

I.4.2.5. Le chrome

Le chrome est un élément chimique de symbole Cr et de numéro atomique 24. Le chrome métal est biologiquement inerte et sans effets toxiques pour l'Homme. Les composés trivalents (Cr III) n'ont pas une toxicité bien établie, cette forme de Cr est plus stable et faiblement absorbée. Les composés hexavalent (Cr VI) du chrome sont responsables des effets toxiques associés (**Douglas et Lee, 1972**).

Les effets cytotoxiques des composés du chrome (CaCrO_4 , NaCrO_4 , ..) altèrent les moyens de défense du poumon (**Wataha et al., 1994**). Le chrome hexavalent est le second allergène après le nickel.

Les premiers cas de cancer dus aux dérivés du chrome ont été observés en Écosse en 1890 chez les ouvriers de la peinture, et en 1911, en Allemagne chez les travailleurs de la galvanoplastie par le chrome. Les résultats de nombreuses études épidémiologiques et les descriptions des cas isolés permettent de conclure que les composés trivalents ne sont pas cancérigènes. Par contre, ceux moyennement solubles du chrome hexavalent sont des mutagènes (**Wataha et al., 1994**).

I.4.2.6. Le cadmium

Le cadmium est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48. Il entre dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures) et sert à la fabrication de certaines batteries d'accumulateurs. Mais ses principales utilisations sont celles de ces composés qui concernent les revêtements anticorrosion (appliqué sur l'acier par cadmiage, le cadmium protège contre la corrosion, en particulier saline) ou encore la fabrication de pigments de couleurs (jaune et rouge). Il exerce aussi une action concurrente à celle du Ca^{2+} et du Ba^{2+} sur les systèmes enzymatiques de la contraction musculaire, compétition vis-à-vis du Fe^{2+} et du Cu^{2+} comme cofacteur des monoamine oxydases et de ce fait, il diminue l'activité de ces systèmes enzymatiques, il inhibe la β -oxydation des acides gras et l'activité de l'ARN polymérase, il provoque notamment des problèmes rénaux et l'augmentation de la tension (**Plumlee et Ziegler,**

2003). Les effets toxiques du Cd ne le sont pas seulement pour l'homme, mais aussi pour les végétaux et les animaux (Blanusa *et al.*, 2005).

I.4.2.7. Le plomb

Le plomb est un élément chimique de la famille des cristallogènes, de symbole Pb et de numéro atomique 82. Très facile à fondre et à mettre en forme, il a notamment été utilisé pour la plomberie, le plomb avec l'arsenic et l'antimoine sont utilisés encore dans la fabrication de munitions de guerre ou de chasse et dans l'industrie du verre et il est d'une grande utilité pour construire des protections pour atténuer les rayons γ et les rayons X. Les batteries au plomb et les accumulateurs électriques sont devenus la principale utilisation du plomb. Le plomb peut être absorbé dans le sang et déposé dans les os et les autres tissus (Cotran *et al.*, 2005).

L'exposition chronique peut entraîner chez l'enfant une déficience de son développement intellectuel, des problèmes de comportement, une altération de la fonction auditive et une perturbation de la croissance. Les symptômes précoces peuvent comporter une fatigue persistante, de l'irritabilité, une perte d'appétit, de l'anémie, des maux d'estomac, un champ d'attention réduit, de l'insomnie, de la constipation et des maux de tête. Les effets à long terme chez les adultes comprennent une hausse de la pression artérielle, de l'anémie, des problèmes rénaux et éventuellement une déficience spermatique (Plumlee et Ziegler, 2003).

Pendant la grossesse, le plomb qui passe de la mère au fœtus peut entraîner de très sérieux problèmes pour le fœtus (Goyer, 1990).

I.4.2.8. Le manganèse

Le manganèse est un élément chimique, de symbole Mn et de numéro atomique 25. Près de 90 % de la production de manganèse est utilisée pour la préparation d'alliages, principalement d'aciers Mn^{2+} est souvent en compétition avec Mg^{2+} dans les systèmes biologiques (Pugh *et al.*, 2002). L'inhalation est beaucoup plus dangereuse parce qu'elle génère des pneumonies, et si l'exposition est permanente, il peut causer des problèmes neurologiques (Plumlee et Ziegler, 2003).

I.5. Paramètres intrinsèques au sol influençant le transfert des métaux lourds

Vidal et al. (2009) a souligné que la capacité de sorption des sols est généralement influencée par de nombreux paramètres, entre autres le pH et les sites de sorption des différents constituants du sol, tels que les carbonates, les phosphates, la matière organique, les silicates et les (hydr)oxydes. Dans les sols minéraux, la présence des argiles, les hydr(oxydes) de Fe et Mn contrôlent également la sorption des espèces métalliques, bien qu'une les fortes teneurs en carbonates et en matière organique puisse jouer aussi un rôle important (Sipos *et al.*, 2008).

I.5.1. Éléments constitutifs du sol

I.5.1.1. Les minéraux argileux

Les argiles sont des adsorbants importants pour les métaux lourds avec une surface spécifique importante, des charges négatives et des groupements de surface réactifs, leur conférant une capacité d'échange cationique (CEC) élevée (Heidmann *et al.*, 2005). Ils peuvent donc former avec les métaux des liaisons covalentes et électrostatiques (Sigg *et al.*, 2000).

I.5.1.2. Les carbonates

La présence des carbonates rend le sol alcalin, favorisant ainsi la sorption des ions métalliques (Martin-Garin *et al.*, 2003). Leurs équilibres de dissolution sont fortement contrôlés par le pH et la pression partielle du CO₂ dans le sol. Une diminution du pH et une augmentation de la pression partielle du CO₂ favorisent ainsi une dissolution accrue des carbonates, ce qui permet donc le relargage des métaux lourds leur étant associés (Dube, 2001). Par exemple, le cadmium peut précipiter sous forme d'otavite (CdCO₃) à forte concentration (Butcher *et al.*, 1996). Le plomb a tendance à précipité rapidement à des concentrations relativement faibles sous forme de cérusite (PbCO₃), d'hydrocérusite [Pb₃(CO₃)₂(OH)₂], d'oxydes ou d'hydroxydes de plomb [PbO, Pb(OH)₂] (Song *et al.*, 1999).

I.5.1.3. Les hydr(oxydes) de fer, d'aluminium et de manganèse

Les hydr(oxydes) de fer, d'aluminium et de manganèse présents sous forme amorphe ou cristalline dans les sols jouent un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques en raison de leur faible solubilité et peuvent être soit des échangeurs d'anions, ou cations, soit des espèces neutres en fonction du pH (Chatain, 2004). Ils représentent une phase de rétention privilégiée pour beaucoup de métaux (Perrono, 1999).

I.5.1.4. La matière organique

En raison des sites d'adsorption qu'elle possède et parce qu'elle modifie les propriétés chimiques générales du sol, la matière organique peut être un paramètre de contrôle de la disponibilité et de la mobilité des métaux lourds (Larmet, 2007). Dans les sols, 25 % à 95 % de la capacité d'échange cationique est attribuée à la matière organique (Sparks, 1995). La forte affinité des composants organiques du sol pour les métaux lourds est principalement due à la présence de nombreux groupements réactifs (carboxyles : -COOH, alcools ; -OH, etc...) susceptibles de former des complexes avec les ions métalliques (Yong *et al.*, 1992).

I.5.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques

I.5.2.1. Le pH du sol

Le pH joue un rôle important dans la mobilité des ions métalliques, car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (McLaughlin *et al.*, 2000). La diminution du pH du sol entraîne également une diminution de la sorption des ions métalliques car ils sont plus mobiles en conditions acides (Larmet, 2007). A faible pH, les groupes fonctionnels deviennent chargés positivement, réduisant ainsi les interactions avec les métaux. Ils sont en effet préférentiellement associés à d'autres cations, en particulier les protons (Sastre *et al.*, 2006 ; Larmet, 2007).

L'augmentation du pH favorise la fixation des cations dans le sol (Alloway, 1995) et entraîne l'accroissement de la dissociation des groupes fonctionnels, en particulier les carboxyles et les phosphates, ce qui augmente la stabilité des complexes métalliques (Schulin *et al.*, 1995).

I.5.2.2. La capacité d'échange cationique (CEC)

La capacité d'échange cationique représente la quantité d'ions susceptibles d'être retenus par échange sur un solide en présence d'un excès d'ions échangeurs en solution (**Remy et Orsini, 1976**). Dans les sols alcalins, les échanges que l'on rencontre le plus souvent, font intervenir Ca^{2+} ou Mg^{2+} (**Marcos, 2001**). En effet, plus la valence d'un cation est élevée, plus le cation peut être facilement adsorbé.

I.5.2.3. Les conditions d'oxydo-réduction

Les conditions d'oxydo-réduction peuvent influencer la mobilité d'un élément par changement du degré d'oxydation de l'élément se liant pour former un complexe ou par dissolution de phases porteuses de l'élément de trace (exemple : Les oxydes de fer) (**Blanchard, 2000**). Le pH est influencé par les conditions oxydo-réductrices de la solution du sol car les conditions réductrices entraînent une augmentation du pH alors que les conditions oxydantes le diminuent (**Alloway, 1995**).

I.5.2.4. La force ionique

La force ionique joue un rôle important dans la mobilité des métaux lourds (**Larmet, 2007**). Elle est conditionnée par la teneur en sels dissous dans le sol : anions (nitrates, bicarbonates, chlorures, sulfates) et cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH^+). La présence d'une forte teneur en sels tend en effet à diminuer la capacité d'adsorption du métal dans le sol en favorisant la formation de complexes et par la compétition entre eux pour les sites d'adsorption sur les différents complexes (**Sastre et al., 2006**).

I.5.2.5. L'activité microbienne

Les micro-organismes agissent sur la mobilité des éléments de traces métalliques soit par leur solubilisation dans la phase liquide, soit à leur précipitation (**Chatain, 2004**). La solubilisation peut se faire par dissolution d'une phase porteuse d'un élément, tandis que l'insolubilisation peut résulter de la formation de sulfures métalliques insolubles par l'action de bactéries sulfato-réductrices (**Blanchard, 2000**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Objectifs

Les principaux objectifs de cette étude consistent à l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* potentiellement productrices de rhamnolipides et l'évaluation de l'influence du collecteur (anionique), du pH de la pulpe, l'activation chimique (sulfuration) et le temps de traitement sur l'efficacité du processus de remédiation au métaux lourds qui contaminent le sol en utilisant la technique de flottation en cellule agitée.

II.2. Echantillonnage

Les échantillons de sol ont été prélevés à partir de sites pollués par des hydrocarbures et des métaux lourds au niveau des stations d'essence, stations d'épurations et eaux de mer de cinq wilayas de l'ouest algérien (**Tab. 4**).

Tab. 4: Origines des prélèvements effectués au niveau de l'ouest algérien.

Site de prélèvement	Latitude Longitude
Site 1 : Ville d'Oran	
Station d'épuration D'Elkarma : Eau du dernier bassin de décantation.	35°36'29.86"N 0°35'5.66"O
Port d'Arzew : Eau de mer dans laquelle sont déversées les eaux d'égouts de la zone industrielle.	35°51'37.08"N 0°18'22.96"O
Site 2 : Ville de Mascara.	
Station d'essence : Sol contaminé se situant près des réservoirs et des pompes de distribution d'essence et de gasoil.	35°22'44.31"N 0°7'2.93"E
Station d'épuration : Eau du dernier bassin de décantation.	35°16'0.70"N 0°8'53.05"E
Site 3 : Ville de Sidi Belabess.	
Station d'essence : Sol contaminé se situant près des réservoirs et des pompes de distribution d'essence et de gasoil.	35°11'49.22"N 0°38'4.55"O
Station d'épuration : Eau du dernier bassin de décantation.	35°13'28.46"N 0°36'21.77"O
Site 4 : Ville de Saida.	
Station d'essence : Sol contaminé se situant près des réservoirs et des pompes de distribution d'essence et de gasoil.	34°49'9.16"N 0°9'23.03"E
Station d'épuration : Eau du dernier bassin de décantation.	34°52'19.57"N 0°8'47.70"E
Site 5 : Ville d'Elbayadh.	
Station d'essence : Sol contaminé se situant près des réservoirs et des pompes de distribution d'essence et de gasoil.	33°41'24.11"N 1°1'16.22"E
Oued : Eau de l'oued dans laquelle sont déversées les eaux d'égouts de la ville.	33°41'15.11"N 1°0'56.50"E

II.3. Stratégie de l'isolement

II.3.1. Isolement des *Pseudomonas aeruginosa*

L'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* a débuté par un enrichissement, les échantillons environnementaux ont été inoculés à raison de 1 g de sol ou 1 ml d'eau dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif. Les tubes inoculés ont été incubés à 42 °C pendant 24 h. 0,1 ml de tube d'enrichissement ont été étalés sur gélose au cétrimide (**Annexe A**) et incubées à 42 °C pendant 24 h.

Les colonies productrices du pigment bleu-vert (Pyocianine) ou jaune-vert (Pyoverdine) révélées sous UV à 366 nm ont été repiquées et purifiées trois fois sur gélose au cétrimide à 42 °C pendant 24 h par stries d'épuisement jusqu'à obtention de colonies homogènes. Une coloration de Gram est effectuée après chaque purification.

Une fois la purification terminée chaque isolat est conservé sur gélose nutritive (**Annexe A**) inclinée à + 4 °C.

II.3.2. Dépistage des potentiels producteurs de biosurfactants

II.3.2.1. Préparation des inoculums

A partir des boîtes de Pétri, des suspensions bactériennes sont préparées pour chaque isolat dans du bouillon nutritif pendant 24 h, leurs D.O sont mesurées à 600 nm et ajustées à 0,5 Mc. Farland (L'absorption à 600 nm se situe entre 0,08 et 0,10) afin de les mettre dans les mêmes conditions de biomasse initiale pour pouvoir sélectionner les plus performants par la suite.

II.3.2.2. Inoculation du milieu de culture

Afin de maximiser la production de biosurfactants, les différents isolats ont été cultivées dans du bouillon nutritif (**Pornsunthorntawee et al., 2008**) supplémenté de 2 % d'huile d'olive comme meilleur substrat carboné (**Abouseoud et al., 2007**).

Chaque Erlen-meyer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon contenant 2 % d'huile d'olive estensemencé par 1 ml de l'inoculum préparé au préalable et mis sous agitation à 75 tr/min à température ambiante pendant 48 h, les biosurfactants sont récupérés dans le surnageant après centrifugation à 9000 g pendant 15 min.

II.3.2.3. Tests de production des biosurfactants

II.3.2.3.1. Épreuve de chute (Drop collapsing)

Le dépistage de la production des biosurfactants a été réalisé en utilisant le test d'effondrement décrit par Jain *et al.* (1991). Une goutte du surnageant de chaque isolat a été placée à la surface d'une lame en verre couverte d'une fine couche d'huile. La forme de goutte sur la surface de l'huile est observée après 1 min. Le surnageant de la culture qui aboutit à l'effondrement de la goutte est indiqué comme résultat positif et les gouttes qui restent en perles sont marquées comme résultat négatifs et sont comparées avec de l'eau distillée comme contrôle.

II.3.2.3.2. Déplacement de l'huile (Oil displacement)

15 μL de pétrole brut sont placés à la surface de 40 ml d'eau distillée mises dans une boîte de Pétri, un volume de 10 μL du surnageant de chaque culture a été légèrement déposé à la surface de la pellicule d'huile. Le diamètre de l'halo clair visualisé sous la lumière visible est mesuré au bout de 30 s (Morikawa *et al.*, 1993).



Fig. 9: Aspect de la fine couche de pétrole à surface de l'eau.

II.3.2.3.3. Activité d'émulsification

L'activité d'émulsification a été réalisée en utilisant de l'huile de soja (Paraszkiewicz *et al.*, 1992). 4 ml d'huile sont ajoutées à 4 ml de surnageant, dans une proportion de 1:1, le mélange est vortexé énergiquement pendant 2 min. Après 24 h d'incubation, la hauteur de la couche d'émulsion a été mesurée.

L'indice d'émulsification (E_{24}) est estimé comme suit :

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} \times 100$$

E_{24} : Activité d'émulsification après 24 h.

H_{EL} : Hauteur de la couche d'émulsion.

H_S : Hauteur de la colonne liquide total.

II.3.2.3.4. Mesure de l'activité de surface

Pour étudier l'activité de surface des biosurfactants produits par les différentes souches isolées, les surnageants issues de chaque échantillon ont été mesurées pour la tension de surface à l'aide d'un tensiomètre selon la technique de l'anneau de Du Nouy décrite par Zajic et Seffens, (1984). La mesure de la tension de surface a été réalisée à température ambiante après avoir trempé l'anneau de platine dans la solution pendant un certain temps afin d'atteindre les conditions d'équilibre. Pour la calibration de l'instrument, la tension superficielle de l'eau pure a été mesurée en premier. La mesure est répétée au moins trois fois, et une valeur moyenne est utilisée pour exprimer l'activité de surface de chaque échantillon.

L'activité de surface des biosurfactants produits est exprimée en pourcentage de réduction de la tension superficielle selon l'équation suivante:

$$\% \text{ reduction de la surface tension} = \frac{(y_m - y_c)}{y_m} \times 100$$

y_m : Tension superficielle du milieu tel qu'il est préparée.

y_c : Tension superficielle du milieu de culture centrifugé.

II.4. Identification des souches performantes

II.4.1. Sélection des souches les plus performantes

La sélection des trois souches les plus performantes a été réalisée en comparant les diamètres de déplacement de l'huile (cm), les indices d'émulsions (E_{24}) et les pourcentages de réduction de la tension superficielle pour chaque bactérie.

II.4.2. Milieu de culture et conditions de croissance pour la production de biosurfactants

II.4.2.1. Optimisation de la quantité d'huile d'olive

Le milieu de culture utilisé pour la production de biosurfactants par les souches les plus performantes a été optimisé en variant la quantité d'huile d'olive de 1 à 5 % dans le bouillon de culture. Puis le milieu de culture a été incubé à température ambiante dans un agitateur à secouage à 75 tr/min. Après 48 h d'incubation, les bactéries sont éliminées par centrifugation à 9000 g pendant 15 min, les mesures des pourcentages de réduction de la tension superficielle sont effectués pour chaque concentration d'huile d'olive.

La quantité optimale de d'huile d'olive pour la production de biosurfactants est utilisée pour la suite de l'optimisation.

II.4.2.2. Optimisation de l'inoculum

II.4.2.2.1. Cinétique de croissance

Sous un premier temps, une pré-culture pour chaque souche a été effectuée dans du bouillon nutritif et incubée à 30 °C. Après 24 h d'incubation, une loop fool de chaque culture est utilisée pour inoculer un Erlenmeyer contenant 100 ml de bouillon nutritif, chaque Erlenmeyer est incubé dans un agitateur à secouage à 75 tr/min et température ambiante. La croissance microbienne a été étudiée en fonction du temps de culture en mesurant l'absorbance du milieu de culture après chaque 2 h à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre à UV.

A partir du graphique tracé de la concentration microbienne en fonction du temps, le meilleur temps de culture pour la préparation de l'inoculum a été déterminé.

II.4.2.2. Optimisation de la quantité de l'inoculum

Afin de trouver la quantité appropriée d'inoculum pour la production de rhamnolipides, un inoculum de chaque souche a été préparé en utilisant le meilleur temps de culture obtenu au préalable en variant la quantité de l'inoculum de 1 à 5 %, et transféré dans 100 ml de milieu de culture contenant la quantité optimale de l'huile d'olive. Après cela, la culture est incubée à température ambiante dans un agitateur à secouage à 75 tr/min. Après 48 h d'incubation, les mesures des pourcentages de réduction de la tension superficielle sont effectués pour chaque concentration d'inoculum utilisée.

La quantité optimale de d'inoculum pour la production de biosurfactants est utilisée pour la suite de l'optimisation.

II.4.3. Identification de la souche la plus performante

La bactérie retenue a fait l'objet d'une identification phénotypique basée sur les caractères microscopiques, macroscopiques, biochimiques et moléculaires.

II.4.3.1. Aspect macroscopique des colonies bactériennes

Sous une loupe binoculaire, nous avons noté l'aspect des colonies bactériennes : couleur, taille des colonies, contour, opacité et diffusion du pigment.

II.4.3.2. Observation microscopique à l'état frais

L'observation à l'état frais permet de définir la morphologie des cellules bactériennes, leur mode d'association et leur mobilité. La procédure d'observation (**Fig. 10**) s'effectuât comme suit (**Harley–Prescott, 2002**):

1. Avec un cure-dent, la propagation d'un petit anneau de vaseline autour de la cavité d'une lame de dépression. Ne pas utiliser trop de vaseline.
2. La suspension bactérienne est préparée et mise dans le centre de la lamelle.
3. La lame de dépression est retournée, avec la cavité vers le bas afin que la goutte la lamelle s'écrase dans le centre. Appuyer légèrement pour former un joint.
4. La lame est ensuite mise sur sa position inverse.
5. La lame est visionnée en utilisant l'huile d'immersion au grossissement $\times 100$ afin d'observer les bactéries.

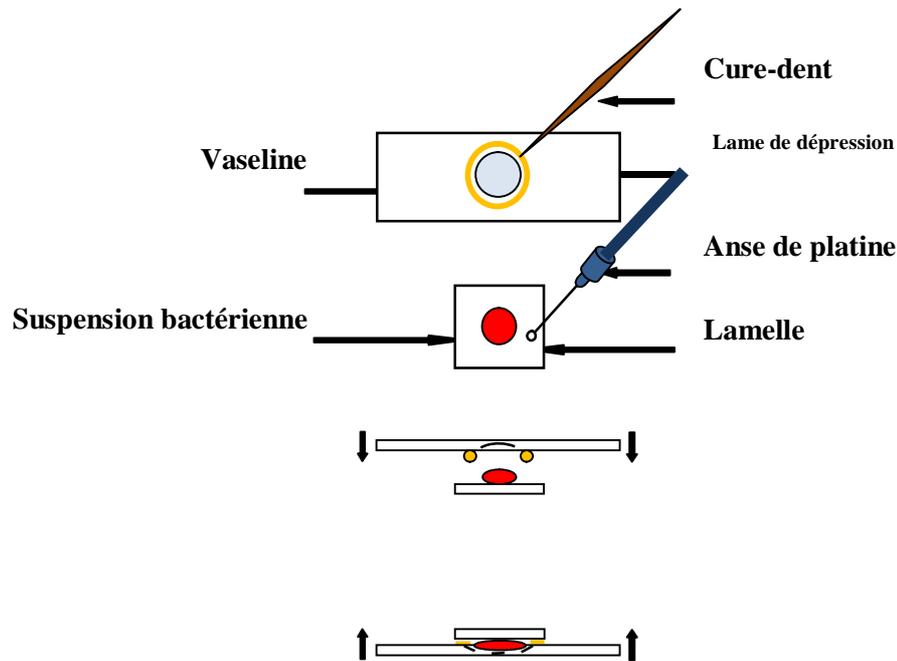


Fig. 10: Procédure d'observation à l'état frais (Harley–Prescott, 2002).

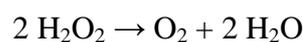
II.4.3.3. Observation microscopique après fixation (Coloration de Gram)

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Ainsi, on peut distinguer les bactéries à Gram positif, dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane, des bactéries à Gram négatif, composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire.

Les cellules bactériennes qui prennent la coloration rose sont dites bactéries à Gram négatif et celles ayant prises la coloration violette sont dites bactéries à Gram positif.

II.4.3.4. Test de Catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



L'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène en présence de la catalase se matérialise instantanément par une production de bulles d'air.

II.4.3.5. Test de l'Oxydase

Les oxydases jouent un rôle important dans le fonctionnement du système de transport des électrons lors de la respiration aérobie.

La capacité des bactéries à produire le cytochrome oxydase est déterminée par l'oxydation de la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé).

II.4.3.6. Identification biochimique par le système API 20 NE

Le système API 20 NE (Biomerieux, France) est une méthode rapide d'identification fréquemment utilisé, basée sur la dégradation des substrats biochimiques. Cette méthode convient d'identifier les bacilles Gram-négatif au niveau des espèces en évaluant le profil de 21 différentes réactions biochimiques.

Ces tests ont été effectués selon les instructions du fabricant Biomerieux, France (**Annexe B**) et les résultats ont été interprétés avec le logiciel Bacterial Identification Program (**Bryant, 2004**).

II.4.3.7. Caractérisation moléculaire et analyse phylogénétique

II.4.3.7.1. Extraction et amplification par PCR de l'ADNr 16S

La souche S7PS5 a été cultivée à 30 °C pendant 24 h sous agitation (250 rpm) dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de TSB (**Annexe A**). L'ADN a été extrait selon la méthode décrite par Liu *et al.* (2000). La méthode détaillée de l'extraction de l'ADN est donnée en annexe C.

L'ADNr 16S est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant un kit Invitrogen et les deux amorces : 10-30F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA-3') et 1500R : (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3').

Un volume réactionnel de 50 µl est préparé en mélangeant : 5 µl du Tampon de PCR 10 x (Tris- HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 9,0 à 25 °C), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP, 100 pM de chaque amorce, 2 µl de la solution d'ADN et 1,25 U de Taq polymérase.

L'ADNr 16S a été amplifié dans un thermocycleur (De type Stratagene Robo Cycler Gradient 96) selon le profil suivant: Dénaturation de l'ADN à 98 °C pendant 3 min, suivie de 30 cycles de 94 °C pendant 1 min, un anelage d'amorce à 52 °C pendant 1 min et une extension d'amorce à 72 °C pendant 2 min.

Après amplification, le mélange réactionnel est maintenu à 72 °C pendant 10 min et refroidit ensuite à 4 °C.

L'amplification obtenue est visualisée sur gel d'agarose préparé comme suit : 240 mg d'agarose (DNA grade, Euromedex) dilués dans 30 ml de tampon TAE 1X (Tris Acétate EDTA; Euromedex), le tout est ensuite porté à ébullition pour dissoudre l'agarose puis 10 µl de BET à 10 mg/ml sont ajoutés dans la solution d'agarose.

Le gel est coulé sur la plaque d'électrophorèse et les puits sont formés en positionnant un peigne sur le gel en surfusion, afin de permettre le dépôt des échantillons. Une fois le gel solide, l'échantillon d'ADN est additionné de tampon de charge contenant 0,25 % de bleu de bromophénol servant de marqueur de mobilité et 40 % (w/v) de saccharose dissout dans de l'eau puis déposé dans des puits immergé dans le tampon. Un marqueur de taille de 1 Kb DNA-Ladder est utilisé. L'électrophorèse a duré 30 min, à 50 V, à température ambiante. Après migration des échantillons, le gel est déposé sur un transilluminateur (table UV) et les bandes d'ADN sont alors visibles grâce au bromure d'éthidium (BET) qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques et donne une fluorescence sous UV à 254 nm.

II.4.3.7.2. Séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage de l'ADN amplifié a été réalisé par Beckman Coulter Genomics (United Kingdom) en utilisant un séquenceur automatique et le même couple d'amorces que lors de la PCR.

II.4.3.7.3. Analyse phylogénétique

L'identification phylogénétique des voisins (neighbors) a été d'abord réalisée par le programme BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) en comparant l'ADNr 16S de la souche S7PS5 avec les séquences homologues d'espèces de référence répertoriées dans les banques de données contenant des souches-type (Avec des noms procaryotes valides et publiés), et des représentants de phylotypes incultivés (Kim *et al.*, 2012).

Les meilleures séquences avec les meilleurs scores sont sélectionnés pour le calcul de la « pairwise sequence similarity » (similarité de séquence par pair) en utilisant l'algorithme d'alignement global (Myer et Miller, 1988) implanté au niveau du serveur EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim *et al.*, 2012), qui est un outil

informatique en ligne destiné à l'identification des procaryotes sur la base de séquences des gènes d'ARNr 16S. Les analyses phylogénétiques et l'évolution moléculaire ont été réalisées en utilisant un logiciel inclus dans la version 6.0 du progiciel MEGA (**Tamura et al., 2013**).

La séquence de l'ADNr 16S de la souche S7PS5 a été alignée à par le programme « ClustalW » (**Thompson et al., 1994**), les 15 taxons correspondants aux séquences nucléotidiques les plus proches ont été récupérées à partir des résultats du Blast sous EZ Taxon-e (Fichiers en format FASTA).

Le calcul des matrices des distances d'évolution et l'algorithme du "Neighbor-Joining" ont été générés comme décrit par Jukes et Cantor (1969) et l'arbre phylogénétique a été établi en utilisant le procédé de Saitou et Nei (1987) qui a permis la construction de la topologie de l'arbre évaluée par le test bootstrap (**Felsenstein, 1985**).

II.5. Production et purification des biosurfactants

Afin de produire le biosurfactant par le micro-organisme sélectionné, la concentration optimale de l'inoculum en phase exponentielle est transférée dans le bouillon de culture contenant le montant optimum de l'huile d'olive. La culture est ensuite incubée à température ambiante dans un agitateur à secouage à 75 tr/min dans des conditions aérobies pendant 48 h.

Le surnageant de culture recueilli a été d'abord centrifugé à 9000 g pendant 15 min pour éliminer les cellules de *P. aeruginosa*. Les rhamnolipides ont ensuite été précipités par acidification à pH = 2 avec de l'HCl 1 N. Le précipité a été récupéré après centrifugation à 9000 g pendant 20 min et extrait ensuite avec de l'acétate d'éthyle à température ambiante (**Wei et al., 2005**). La phase organique a par la suite été transférée dans un ballon à fond rond, relié à un évaporateur rotatif (RE300 Stuart), ce qui permet de chasser le solvant et d'avoir un bon rendement en rhamnolipides de couleur miel visqueux (**Chen et al., 2005**).

II.6. Détermination du pourcentage de rhamnose

Le dosage des rhamnolipides est réalisé par l'intermédiaire de la mesure du rhamnose par spectrophotométrie UV selon la méthode décrite par Candrasekaran et Bemiller, 1980 (**Annexe C**). Le biotensioactif est constitué d'un mélange de plusieurs molécules de rhamnolipides. Par conséquent, la détermination de la concentration en

rhamnose dans la solution permettra de suivre la concentration en tensioactif lors des différentes expériences. Pour cela, nous avons réalisé une droite d'étalonnage, élaborée à partir de L-Rhamnose qui relie la masse de rhamnose en solution avec leur absorbance.

II.7. Détermination de la concentration micellaire critique

Les solutions tensioactives ont été préparées dans de l'eau ultra pure (EUP) à partir de la solution mère.

Le pH est ajusté à 7 par ajout de NaOH 0,5 et/ou 0,1 mol/L, les solutions ont été filtrées sur membrane en fibre de verre GF/D Whatman de porosité 2,7 μm , puis sur membrane en nitrate de cellulose Whatman de porosité 0,45 μm pour éliminer d'éventuelles particules insolubles qui représentent moins de 0,5 %. Durant l'étape de filtration, seule une perte négligeable de biotensioactif a été notée. Une solution mère à 1 g/L a été préparée, cette solution est conservée à 4 °C pendant au maximum 4 jours. Les solutions filles sont obtenues par dilutions successives et leur pH est ajusté à 7 juste avant utilisation.

La détermination de la CMC est obtenue en traçant graphiquement la courbe représentant la tension de surface avec l'anneau de DuNouy en fonction de la concentration en tensioactif. La courbe obtenue présente une pente décroissante jusqu'à la CMC puis devient constante par la suite.

II.8. Analyses HPLC

Les analyses HPLC des rhamnolipides qui sont produits ont été réalisées sur un système Shimadzu (proéminence i. LC-2030C 3D) équipée d'une colonne Ascentis express C18 (15 cm x 4.6 mm) id emballé avec particules partiellement poreuses de 2.7 μm (Supelco, Bellefonte, PA, ETATS-UNIS). La phase mobile binaire consistait en eau/acide acétique (solvant A) et du méthanol/acide acétique (solvant B), dans un mode à gradient linéaire: 5% de B; 10 min, 40% de B; 30 min, 70% de B; 60 min, 100% de B; 65 min, 100% de B; 67 min, 2% de B. Le débit de la phase mobile était de 0.7 ml/min.

Les rhamnolipides purs Rha-C10-C10 et Rha-Rha-C10-C10 ont été utilisés avec l'échantillon d'essai.

II.9. Enlèvement des métaux lourds par flottation en cellule agitée

II.9.1. Le sol

II.9.1.1. Localisation

Pour cette étude, l'échantillon de sol utilisé est prélevé de Sidi Bel Abbés (Algérie) au niveau de l'usine des tracteurs (SONACOM).

Cet échantillon de sol a subi une dissociation des agrégats afin d'obtenir des particules élémentaires et un séchage à 105 °C, il a ensuite été homogénéisé et conservé à l'abri de la lumière.

II.9.1.2. Distribution des métaux lourds et caractérisation physico-chimique du sol

La concentration totale de chacun des éléments métallique (Fe, Mn, Zn, Cu, Cd, Co, Cr, Ni et Pb) a été mesurée après une décomposition complète par digestion acide à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique (SAA) de type Perkin-Elmer modèle AA300 au niveau d'un laboratoire certifié, à savoir le "Labo Bio Qual" de Blida, en Algérie, où le contrôle de la qualité de la méthode analytique est assuré.

La caractérisation physico-chimique du sol a été réalisée à partir des techniques normalisées AFNOR (1994). Ces analyses ont été faites au niveau de l'Institut National de Recherche Agronomique, Station INRAA Lamtar de Sidi Bel Abbés, Algérie.

II.9.1.2.1. Analyse granulométrique

La granulométrie permet de déterminer le pourcentage des particules minérales en différenciant les argiles ($< 2 \mu\text{m}$), des limons ($2 \mu\text{m} < d < 50 \mu\text{m}$) et des sables ($50 \mu\text{m} < d < 2 \text{mm}$), les sables sont séparées par tamisage.

Les teneurs en argiles, limons fins et limons grossiers ont été déterminées en appliquant la technique décrite dans la norme NF P 94-057 (AFNOR, 1994) faisant appel à l'utilisation de pipette de Robinson, après agitation homogénéisante de 10 g sol dans une allonge pleine d'eau ou la sédimentation s'effectue sous la seule action de la gravité. Les prélèvements sont effectués et suite à l'évaporation de l'eau de l'aliquote, le poids des particules inférieures aux seuils de grosseur est déterminé.

II.9.1.2.2. Détermination du pH_{eau}

Le pH_{eau} du sol est mesuré par un pH-mètre (Inolab) selon la norme AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994) par la mesure du pH de la suspension de sol dans l'eau (2/5) après 1 h d'agitation suivie d'une décantation.

II.9.1.2.3. Détermination de la teneur en matière organique

La teneur en carbone organique est déterminée selon le protocole décrit par Ausili (1998). Cette méthode consiste à calciner l'échantillon de sol (0,25 g) à 450 °C, durant 3 h, la perte de poids retenue est attribuée à la matière organique.

II.9.1.2.4. Détermination de la teneur en calcaire total et calcaire actif

Afin de déterminer la teneur en calcaire total, l'échantillon de sol est mis en contact avec un acide fort (HCL) qui dissout le calcaire en milieu fermé. L'attaque du calcaire (CaCO_3 : carbonate de calcium) se traduit par un dégagement gazeux de CO_2 dont le volume est mesuré ($\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Cette méthode d'analyse courante est décrite dans la norme internationale NF ISO 10693.

Le calcaire actif est la fraction du calcaire total susceptible de se dissoudre facilement et rapidement dans la solution du sol, l'échantillon de sol est mis en solution avec de l'oxalate d'ammonium qui attaque une fraction du calcaire total seulement. Le calcium extrait est ensuite dosé. Cette méthode d'analyse est exposée dans la norme AFNOR NF X31-106.

II.9.1.2.5. Détermination des cations échangeables

Cette méthode permet de déterminer la quantité de cations (Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+) extractibles d'un sol par l'acétate d'ammonium molaire à $\text{pH} = 7$ selon la norme AFNOR X 31-108 (AFNOR, 1994).

L'extraction est réalisée sur 5 g de sol traités par 100 mL de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (1 mol/L), sous agitation et pendant 1 h. Après centrifugation, le surnageant est filtré (Membrane de porosité 0,45 μm) puis analysé par spectrométrie d'absorption atomique pour déterminer les teneurs en ions.

II.10. Méthode de flottation

II.10.1. Préparation du sol

La taille des particules du sol contaminé a été réduite à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir un sol avec une gamme granulométrique comprise entre 0 et 250 μm (Dermont *et al.*, 2006). Le but est de fournir une distribution granulométrique appropriée pour la technique de flottation et d'augmenter le degré de libération des métaux. La réduction de la taille des particules a été faite en combinant plusieurs étapes de tamisage successif et de broyage (Dermont, 2008).

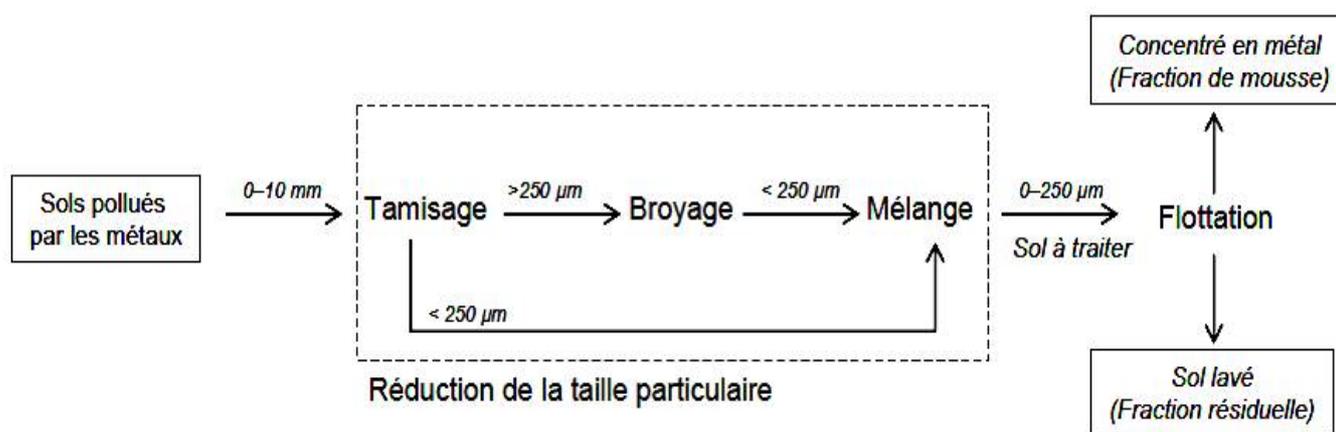


Fig. 11: Schéma de principe du lavage de sol utilisé pour enlever les métaux lourds à partir du sol (Dermont *et al.*, 2010).

II.10.2. Sorption du biotensioactif

L'efficacité d'un tensioactif peut être diminuée s'il se sorbe au sol. Nous avons choisi pour cette étude un biotensioactif anionique qui se sorbe moins au sol (West et Harwell, 1992).

L'expérience de sorption est réalisée dans un Erlenmeyer de 250 ml à raison de 10 % de sol dans de l'eau distillée pendant 24 h. La concentration en biotensioactif choisie est celle de la CMC.

La fraction de tensioactif fixé au sol est obtenue par le calcul suivant :

$$\% \text{ Adsorbé} = \frac{C_0 - C_r}{C_0} \times 100$$

C_0 : Concentration initiale en biotensioactif (mg/L).

C_r : Concentration résiduelle en biotensioactif (mg/L).

II.10.3. Procédure du test de flottation

Les expériences ont été réalisées dans une cellule de flottation de laboratoire qui a été équipé d'un moteur d'agitation mécanique de type Ultra-Turrax T25 (**Fig. 12**). Le principe de séparation est basé sur l'affinité des surfaces hydrophobes des particules pour les bulles d'air injectées dans la suspension de sol. La surface de minerais métalliques désirés est souvent rendue hydrophobe par l'utilisation de agent tensio-actif (collecteur) (**Dermont *et al.*, 2010**). Afin d'obtenir 10 % de solides dans la pulpe (**Dermont *et al.*, 2010**), cette dernière a été préparée pour chaque essai en mélangeant 50 g de sol avec 500 ml d'eau distillée dans la cellule de flottation. Le pH de la pulpe a été contrôlé et ajusté avec une solution de NaOH ou de HCL, l'agent moussant a été ajouté à la dernière minute de l'étape de conditionnement et la soupape à air est ouverte, le procédé est ensuite mis en marche pendant 10 min avec l'agent collecteur à une vitesse d'agitation de 8000 tours par minute. La couche de mousse est éliminée en continu au cours du processus de flottation à l'aide d'une pompe à vide. L'arbre du rotor et les parois de la cellule ont été lavées avec une solution de composition similaire à celle de la pulpe pour retourner les minéraux adhérent afin de maintenir un niveau constant dans la pulpe. Après achèvement de l'étape de flottation, la fraction flottante (De mousse) a été filtrée et les concentrations ainsi que les facteurs de concentration (CF) du Cr, Mn, Cd, Fe, Co, et Zn ont été déterminées pour chaque fraction de flottation.

Le facteur de concentration (CF) de chaque élément est déterminé selon l'équation donnée par Dermont *et al.* (2010):

$$\text{Element CF} = \frac{[\text{Elément}]_{\text{mousse}}}{[\text{Elément}]_{\text{Alimentation}}}$$

Avec :

$[\text{Elément}]_{\text{mousse}}$: Concentration de l'élément dans la mousse.

$[\text{Elément}]_{\text{Alimentation}}$: Concentration de l'élément dans le sol d'alimentation.

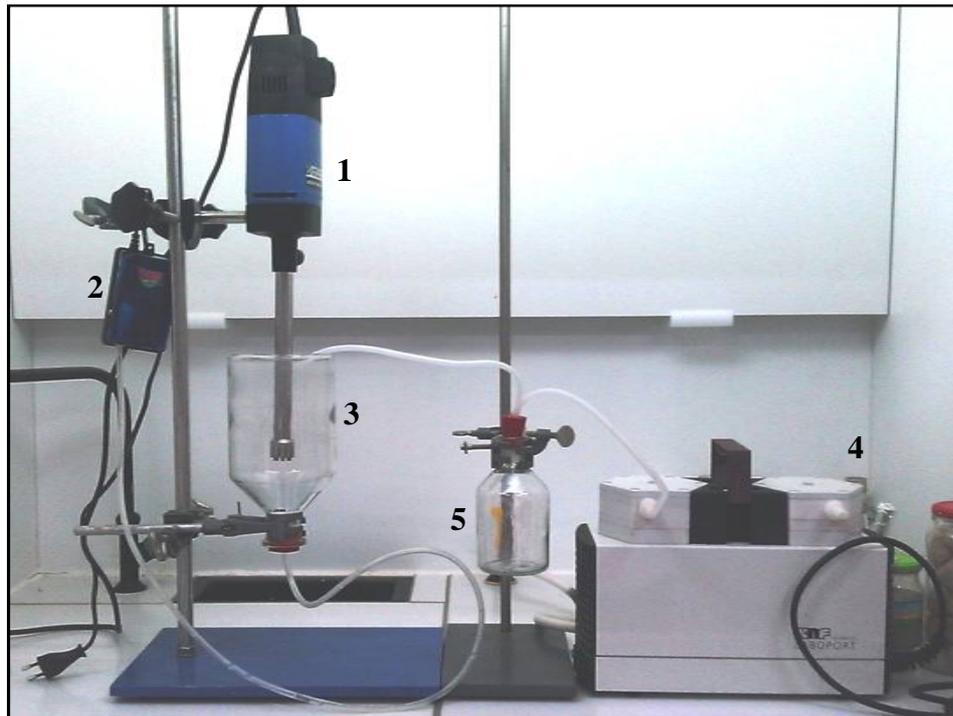


Fig. 12: Montage de la cellule de flottation utilisée pour cette étude. 1. Agitateur mécanique, 2. Pompe à air, 3. Cellule de flottation, 4. Pompe à vide, 5. Réservoir de récolte de la mousse.

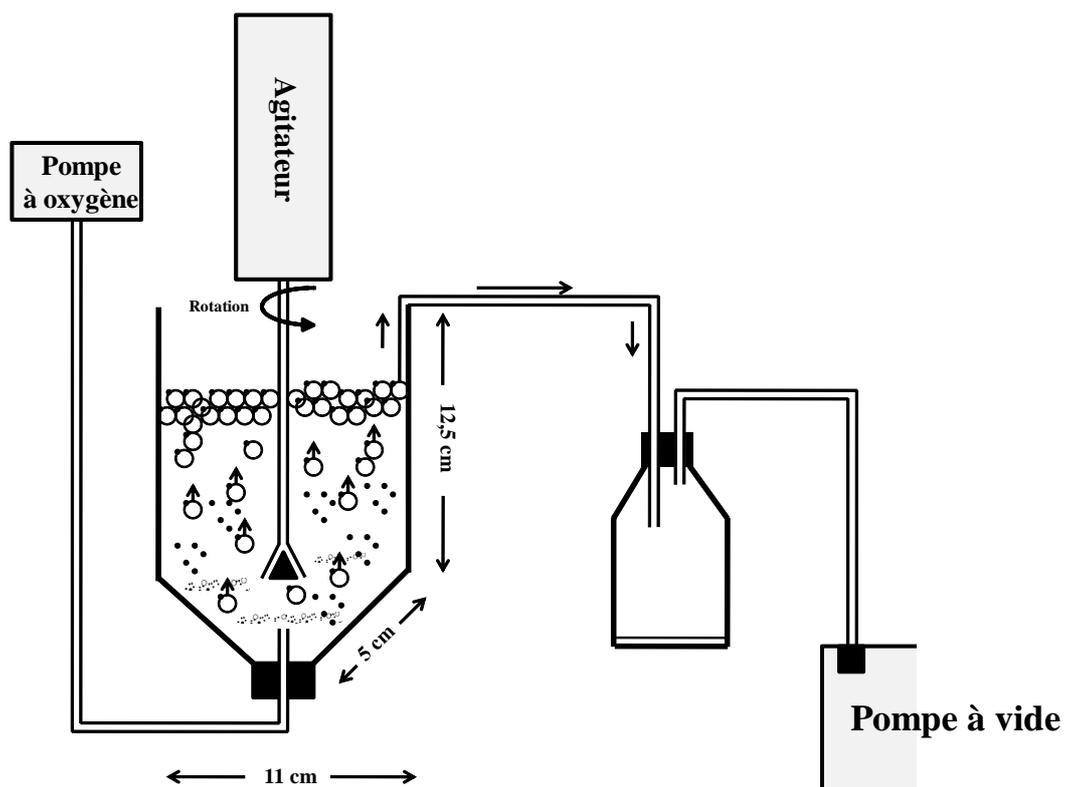


Fig. 13: Process et instrumentation de l'unité flottation.

II.10.4. Effet du pH de la pulpe

Le pH de la pulpe influe considérablement sur la mobilisation des métaux lourds en présence d'agents de surface (**Dermont *et al.*, 2010**), les différents pH utilisés lors de cette étude sont 8, 9, 10, 11 et 12.

II.10.5. Effet de l'activation chimique de la pulpe

L'effet de l'activation de la pulpe par sulfuration a également été testé. L'étape de sulfuration supplémentaire a été effectuée sur les 10 % de sol contenu dans la cellule pendant 20 minutes à température ambiante (**Dermont *et al.*, 2010**). Le sulfure de sodium (Na_2S) est généralement utilisé comme agent de sulfuration (**Herrera-Urbina *et al.*, 1999**; **Rashchi *et al.*, 2005**). Trois concentrations ont été testées de Na_2S (2, 3 et 4 mg/g). L'activation par le Na_2S est sensée modifier les surfaces des particules afin de les rendre plus disposé à l'action du tensio-actif.

II.10.6. Influence du temps de flottation

Le temps de flottation a été évalué en mesurant le facteur de concentration (CF) et l'activité de surface des rhamnolipides dans la pulpe (10 % de sol) pour le Zn et le Cd à quatre différents temps : 2.5, 5, 7.5 et 10 minutes.

II.11. Analyses statistique

Toutes les expériences données sont exprimées en termes de moyennes arithmétiques obtenues à partir d'au moins trois répétitions et les analyses statistique ont été effectuées en utilisant le logiciel XLSTAT, la version 2014.3 .01 (Adinosoft).

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Isolement des *Pseudomonas aeruginosa*

Suite à l'enrichissement, chaque isolat est repiqué sur gélose au cétrimide qui est un milieu favorisant la pigmentation et la fluorescence des bactéries, il s'agit du milieu King A additionné d'acide nalidixique et de bromure de tétradonium (Cétrimide) qui inhibent la croissance des bactéries Gram (+), laissant ainsi l'avantage aux *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie caractérisée par la production de deux pigments : La pyocyanine (Pigment bleu vert) et la pyoverdine (Pigment jaune vert) (Dworkin *et al.*, 2006).

Sur la gélose au cétrimide, deux types de fluorescences sont observées sous UV à 366 nm (Fig. 14), il s'agit de la pyocyanine (Pigment bleu vert) et la pyoverdine (Pigment jaune vert).

50 souches possédant des pigments fluorescents ont été isolées (Tab. 5), purifiées et conservées dans du bouillon glycérolé.

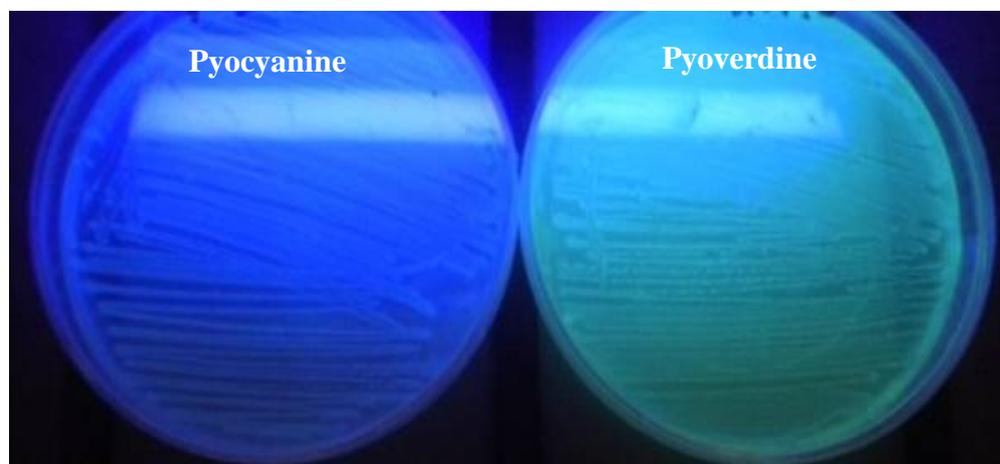


Fig. 14: Aspect des isolats bactériens sur gélose au cétrimide sous U.V à 366 nm.

Tab. 5: Nombre et codification des souches isolées à partir des sites contaminés

Site de prélèvement	Isolat
Site 1 : Ville d'Oran.	
Station d'épuration d'Elkarma	S5PS1, S5PS2, S5PS3, S5PS4, S5PS5
Port d'Arzew	S6PS1, S6PS2, S6PS3, S6PS4, S6PS5
Site 2 : Ville de Mascara.	
Station d'essence	S1PS1, S1PS2, S1PS3, S1PS4, S1PS5
Station d'épuration	S2PS1, S2PS2, S2PS3, S2PS4, S2PS5
Site 3 : Ville de Sidi Belabess.	
Station d'essence	S3PS1, S3PS2, S3PS3, S3PS4, S3PS5
Station d'épuration	S4PS1, S4PS2, S4PS3, S4PS4, S4PS5
Site 4 : Ville de Saida.	
Station d'essence	S7PS1, S7PS2, S7PS3, S7PS4, S7PS5
Station d'épuration	S8PS1, S8PS2, S8PS3, S8PS4, S8PS5
Site 5 : Ville d'Elbayadh.	
Station d'essence	S9PS1, S9PS2, S9PS3, S9PS4, S9PS5
Oued	S10PS1, S10PS2, S10PS3, S10PS4, S10PS5

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif pour les bactéries du genre *Pseudomonas*, la formule du milieu de base constitue une modification du milieu King A, c'est un milieu qui favorise la production de pyocyanine et pyoverdine. En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans le but d'avoir un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*.

En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955. Goto et Enomoto (1970) ont montré que l'addition d'acide nalidixique avec diminution de la concentration en cétrimide permettait une

meilleure récupération des *Pseudomonas*, l'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles à cet agent antibactérien (Jawetz *et al.*, 1973).

Cinquante souches bactériennes ont été isolées à partir de sols et eaux contaminés par des hydrocarbures et des métaux lourds dans le nord-ouest algérien et testées pour la production de biosurfactants dans du bouillon nutritif supplémenté par de l'huile d'olive.

Toutes les souches isolées sont caractérisées par la production de pigments fluorescents. Le chlorure de magnésium et de sulfate de potassium favorisent la production de pyocyanine et le glycérol constitue une source d'énergie qui accélère la production (King *et al.*, 1954). Lorsque les *Pseudomonas* fluorescentes sont cultivées dans des conditions limitantes en fer, ils produisent des sidérophores de couleur jaune-verte, fluorescents, appelé pyoverdines (Meyer et Abdallah, 1978).

Le bouillon nutritif est un milieu de culture très riche en composés azotés (Ronald, 2005) additionné d'huile d'olive comme meilleur substrat carboné (Abouseoud *et al.*, 2007) permettent une meilleure production de biosurfactants, les substrats insolubles aboutissent au meilleur rendement de rhamnolipides (Desai et Banat, 1997; Cameotra et Makkar, 1998) que les substrats solubles, de plus les bactéries du genre *Pseudomonas* sont productrices de lipase ce qui facilite l'assimilation de la fraction d'acides gras contenues dans l'huile d'olive (Abouseoud *et al.*, 2007).

III.2. Tests de production des biosurfactants

III.2.1. Épreuve de chute (Drop collapsing)

Une goutte d'eau appliquée sur une surface hydrophobe, en l'absence d'agents de surface formera une perle car les molécules polaires de l'eau sont repoussées de la surface hydrophobe. En revanche, si la goutte d'eau contient des agents de surface, cette dernière chute et s'étale sur la lame (Bodour et Miller-Maier, 1998). Les résultats présentés dans le tableau 6 montrent la présence de biosurfactants dans tous les échantillons testés.

Tab. 6: Résultat du test "Drop collapsing" réalisé sur les différentes souches isolées

Souche	Drop collapsing								
S5PS1	+	S1PS1	+	S3PS1	+	S7PS1	+	S9PS1	+
S5PS2	+	S1PS2	+	S3PS2	+	S7PS2	+	S9PS2	+
S5PS3	+	S1PS3	+	S3PS3	+	S7PS3	+	S9PS3	+
S5PS4	+	S1PS4	+	S3PS4	+	S7PS4	+	S9PS4	+
S5PS5	+	S1PS5	+	S3PS5	+	S7PS5	+	S9PS5	+
S6PS1	+	S2PS1	+	S4PS1	+	S8PS1	+	S10PS1	+
S6PS2	+	S2PS2	+	S4PS2	+	S8PS2	+	S10PS2	+
S6PS3	+	S2PS3	+	S4PS3	+	S8PS3	+	S10PS3	+
S6PS4	+	S2PS4	+	S4PS4	+	S8PS4	+	S10PS4	+
S6PS5	+	S2PS5	+	S4PS5	+	S8PS5	+	S10PS5	+

Lors du test « Drop collapsing », en présence de biosurfactants, la force ou la tension interfaciale entre la goutte d'eau et la surface hydrophobe est réduite, ce qui entraîne la propagation de la goutte d'eau sur la surface hydrophobe (**Bodour et Miller-Maier, 1998**).

III.2.2. Déplacement de l'huile (Oil displacement)

Le déplacement de l'huile est strictement lié à la présence de biosurfactants dans le surnageant des bactéries testées (**Rodrigues et al., 2006**), le diamètre de déplacement varie selon la quantité de biosurfactants présente dans le surnageant de chaque échantillon (**Fig. 15**). Toutes les souches testées ont montré un résultat positif (**Tab. 7**) pour le déplacement de l'huile mais à des diamètres différents.

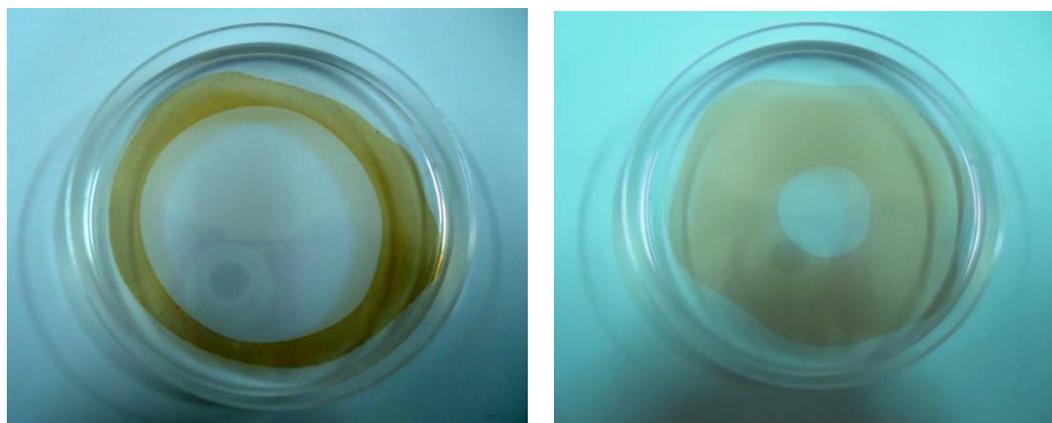


Fig. 15: Déplacement de la couche superficielle de pétrole due à la présence de biosurfactants dans les surnageants des souches testées.

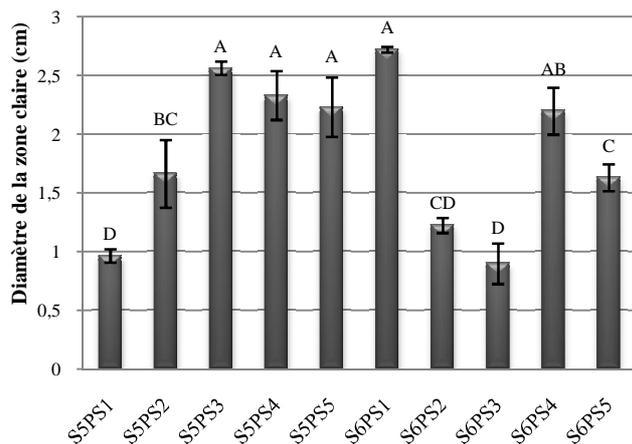
Tab. 7: Résultat du test " Déplacement de l'huile " réalisé sur les différentes souches isolées

Souche	Déplacement de l'huile								
S5PS1	+	S1PS1	+	S3PS1	+	S7PS1	+	S9PS1	+
S5PS2	+	S1PS2	+	S3PS2	+	S7PS2	+	S9PS2	+
S5PS3	+	S1PS3	+	S3PS3	+	S7PS3	+	S9PS3	+
S5PS4	+	S1PS4	+	S3PS4	+	S7PS4	+	S9PS4	+
S5PS5	+	S1PS5	+	S3PS5	+	S7PS5	+	S9PS5	+
S6PS1	+	S2PS1	+	S4PS1	+	S8PS1	+	S10PS1	+
S6PS2	+	S2PS2	+	S4PS2	+	S8PS2	+	S10PS2	+
S6PS3	+	S2PS3	+	S4PS3	+	S8PS3	+	S10PS3	+
S6PS4	+	S2PS4	+	S4PS4	+	S8PS4	+	S10PS4	+
S6PS5	+	S2PS5	+	S4PS5	+	S8PS5	+	S10PS5	+

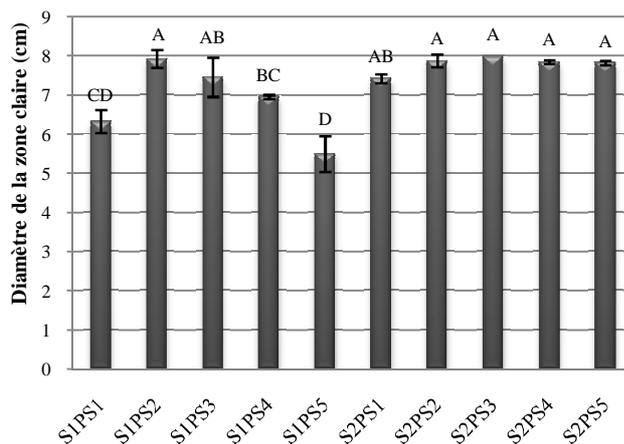
Les diamètres des halos clairs dus au biosurfactants issues des différentes souches isolées à partir du site 1 (**Fig. 16 A**) varient de 0,9 (S6PS3) à 2,72 cm (S6PS1) et ceux du site 3 (**Fig. 16 C**) varient de 5,27 (S4PS4) à 7,52 cm (S4PS3), l'activité de déplacement est un peu moins marquée car les produits issus des différents isolats ne permettent une bonne compétition avec l'huile en raison des faibles concentrations en biosurfactants présents dans les divers surnageants.

Néanmoins, les résultats obtenus sont meilleurs au niveau du site 2 (**Fig. 16 B**) ou les diamètres des zones varient de 5,5 (S1PS5) à 8 cm (S2PS3) ainsi que les sites 4 (**Fig. 16 D**) qui varient de 5,73 (S8PS2) à 8,3 cm (S7PS5) et le site 5 (**Fig. 16 E**) qui varient de 5,93 (S10PS4) à 8,66 cm (S9PS2). Ces résultats montrent que les souches isolées à partir de ces trois wilayas (Mascara, Saida et Elbayadh) sont les plus efficaces et produisent des concentrations en biosurfactants qui sont plus élevées que celles produites par les souches isolées à partir des sites 1 et 3.

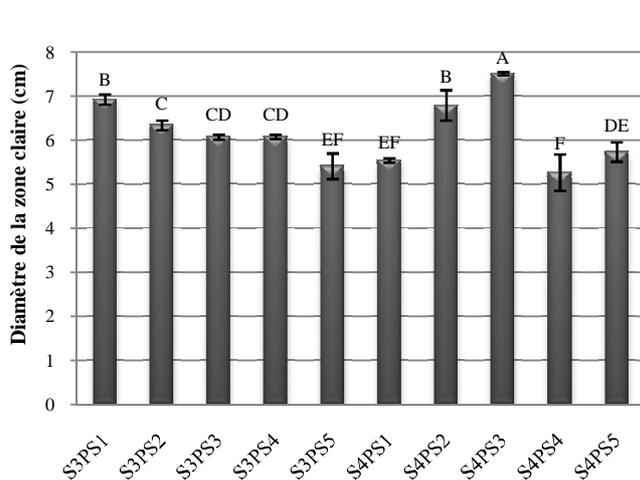
Les molécules de l'agent de surface dispersées sur la boîte de Pétri contenant de l'eau et une fine couche de pétrole s'adsorbent à la surface de l'eau (**Laurier et al., 2003**) car elles possèdent deux polarités différentes et sont moins denses que l'eau ce qui fait qu'elles remontent à la surface.



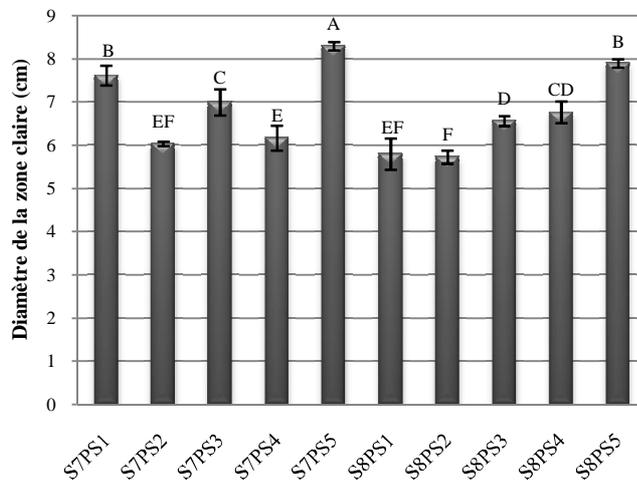
A : Site 1 (Ville d'Oran)



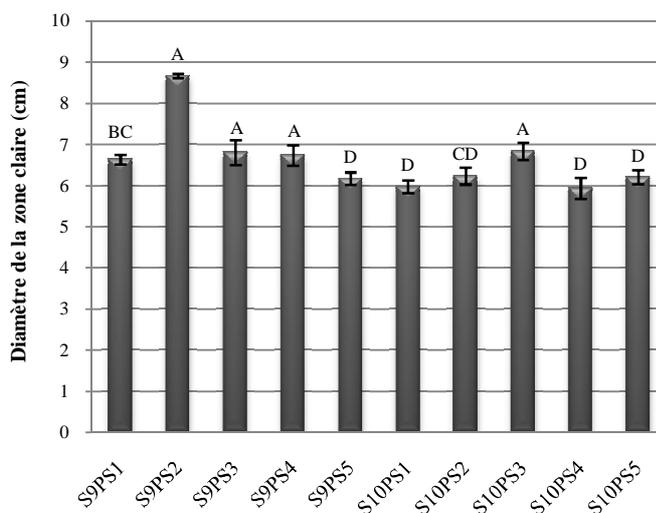
B : Site 2 (Ville de Mascara)



C : Site 3 (Ville de Sidi Belabess)



D : Site 4 (Ville de Saida)



E : Site 5 (Ville d'Elbayadh)

Fig. 16: Comparaison des diamètres des halos claire dus au biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, cela est déterminé par l'Analyse de la Variance (ANOVA) ($P < 0.05$).

Les micelles du biotensioactif par rapport à l'huile possèdent une plus grande affinité pour l'eau et donc elles vont rentrer en compétition avec cette dernière pour l'occupation de la surface, si le volume de l'huile était supérieur à celui du biosurfactant, ce dernier s'adsorbent à l'interface eau/huile (Laurier *et al.*, 2003) mais vu que le volume de l'huile est très petit, les molécules hydrophobes du pétrole vont se déplacer laissant la surface aux molécules de biosurfactants.

III.2.3. Activité d'émulsification

Les tensioactifs jouent un rôle très important dans la solubilisation des molécules hydrophobes en les piégeant dans la pseudo-phase hydrophobe formée par les micelles, permettant ainsi d'augmenter leur solubilité apparente (Bai *et al.*, 1998). L'indice E_{24} permet une estimation quantitative du taux d'émulsification par les différents isolats.

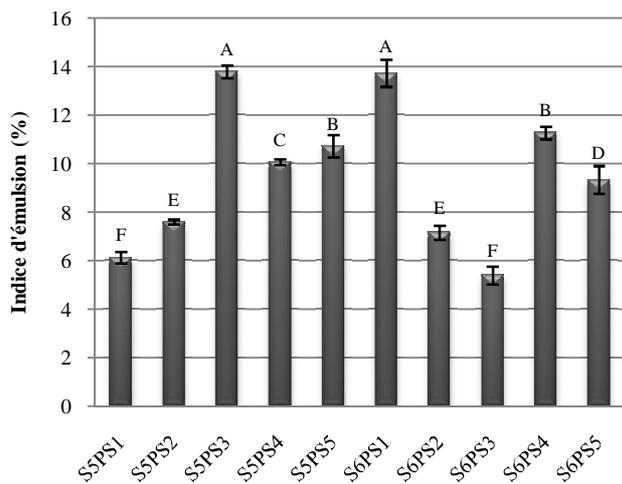
Témoin



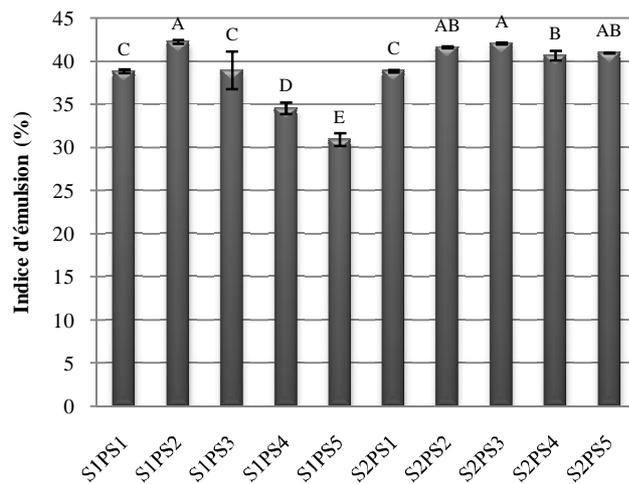
Fig. 17: Emulsification de l'huile en présence de biosurfactants dans les surnageants des souches testées.

Les différents microorganismes isolés peuvent tous solubiliser l'huile et former une pseudo-phase hydrophobe mais les indices d'émulsion (E_{24}) varient d'une bactérie à une autre selon le taux de production de biosurfactants.

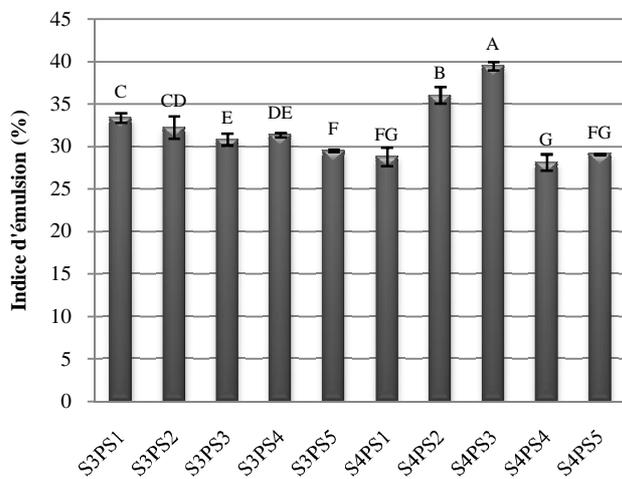
Bien que les indices d'émulsions (E_{24}) dus au surnageants issus des souches isolées à partir du site 1 (Fig. 18 A) varient de 5,4 (S6PS3) à 13,8 % (S6PS3), ces résultats sont insuffisants comparés à ceux obtenus par les isolats des autres sites.



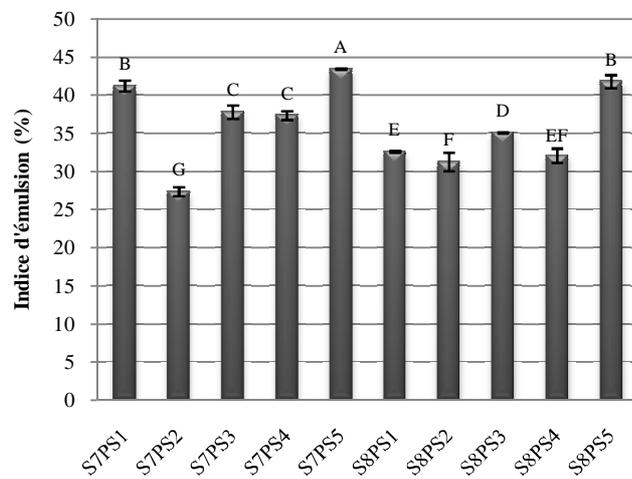
A : Site 1 (Ville d'Oran)



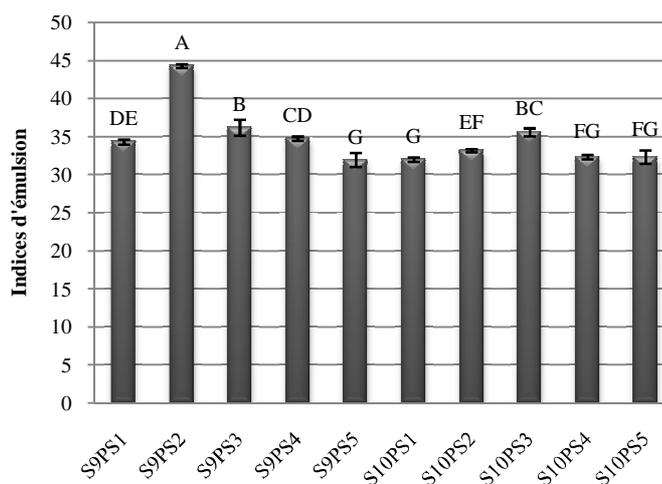
B : Site 2 (Ville de Mascara)



C : Site 3 (Ville de Sidi Belabess)



D : Site 4 (Ville de Saida)



E : Site 5 (Ville d'Elbayadh)

Fig. 18: Comparaison des indices d'émulsions (E_{24}) dus au biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, cela est déterminé par l'Analyse de la Variance (ANOVA) ($P < 0.05$).

Les indices d'émulsions (E_{24}) des souches du site 2 (**Fig. 18 B**) varient de 30,93 (S1PS5) à 42,26 % (S1PS2), ceux du site 3 (**Fig. 18 C**) varient de 28,10 (S4PS4) à 39,43 % (S4PS3).

Les meilleurs taux d'émulsions sont obtenus avec les souches S7PS5 dont $E_{24} = 43,38$ % isolée à partir du site 4 (**Fig. 18 D**) et S9PS2 du site 5 (**Fig. 18 E**) dont $E_{24} = 44,27$ %.

Les micelles se forment lorsque les portions hydrophobes, incapables de former des liaisons hydrogène en phase aqueuse, elles s'unissent et se dirigent vers le centre laissant les portions hydrophiles vers l'extérieur. L'agitation fournit par le vortex a permis d'isoler les molécules hydrophobes de l'huile (**Fig. 19**) et de les piéger à l'intérieur des micelles (**Haigh, 1996**).

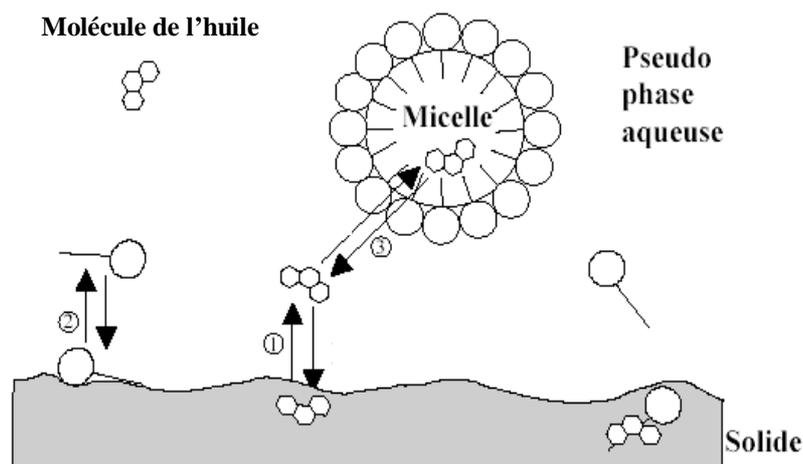


Fig. 19: Représentation schématique des processus contrôlant la solubilité de l'huile en présence de surfactants (**Edward et al. 1994**).

III.2.4. Mesure de l'activité de surface

Les bactéries produisent des tensioactifs capables de réduire les tensions interfaciales entre une ou deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide (**Fiechter, 1992 ; Banat et al., 2000**). La tension superficielle des surnageants des différentes cultures a été mesurée en fonction de la concentration en biosurfactants excrétés dans le but de comparer les activités de surface de tous les isolats. Les différentes figures montrent le tracé de la tension de surface par rapport à la concentration en biosurfactant.

Les valeurs de tension de surface dus au biosurfactants des souches isolées à partir du site 1 varient de 50,09 (S6PS1) à 50,47 mN/m (S5PS1). D'autre part, les pourcentages de réduction de la tension superficielle (**Fig. 20 A**) sont très variés (de 3,35 à 10,11 %). Selon les pourcentages enregistrés, les 2 candidats les plus performants (selon un ordre décroissant) sont les suivants:

S6PS1, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 10,11 %.

S5PS3, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 10,00 %.

Pour le site 2, la tension de surface varie de 30,95 (S1PS2) à 40,19 mN/m (S1PS5) et les pourcentages de réduction de la tension superficielle (**Fig. 20 B**) vont de 26 jusqu'à 30,17 %. Les 2 candidats les plus performants sont les suivants:

S1PS2, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 30,17 %.

S2PS3, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 29,76 %.

Les tensions de surface obtenues grâce aux souches isolées à partir du site 3 sont comprises entre 40,89 (S4PS1) et 40,07 mN/m (S4PS3) et les pourcentages de réduction de la tension superficielle (**Fig. 20 C**) varient de 20,47 à 28,11 %. En fonction des pourcentages enregistrés, les 2 candidats les plus performants sont les suivants:

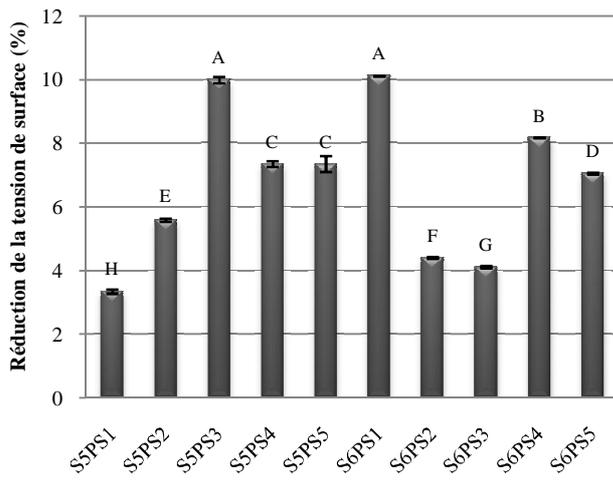
S4PS3, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 28,11 %.

S4PS2, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 23,82 %.

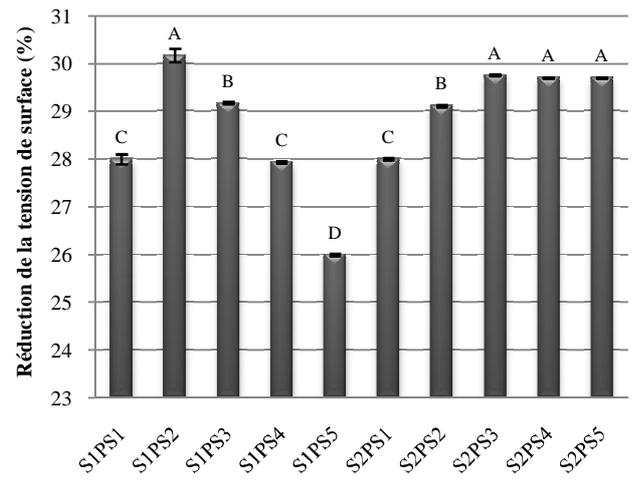
Les valeurs de tension de surface des isolats du site 4 varient de 30,89 (S7PS5) à 40,42 mN/m (S8PS2) et les pourcentages de réduction de la tension superficielle (**Fig. 20 D**) sont très variés (de 22 à 31,23 %). Selon les pourcentages enregistrés, les 2 candidats les plus performants sont les suivants:

S7PS5, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 31,23 %.

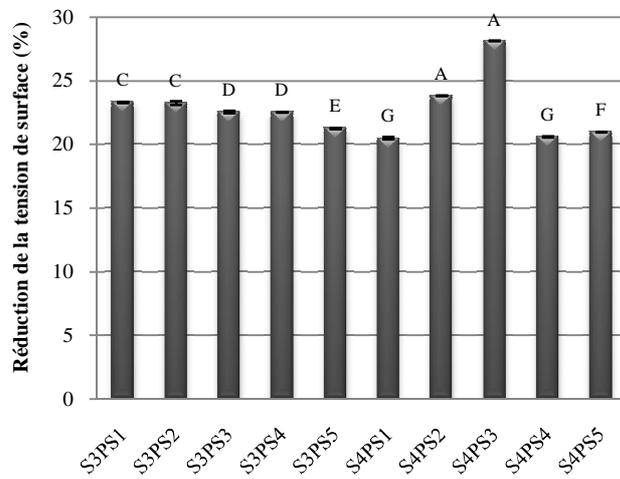
S7PS1, avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle égale à 29,35 %.



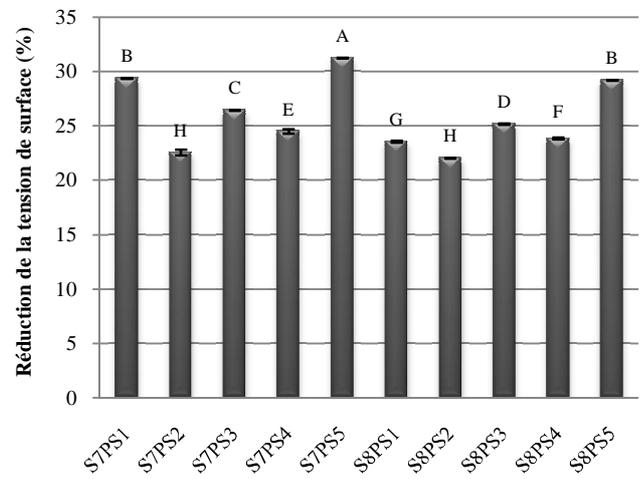
A : Site 1 (Ville d'Oran)



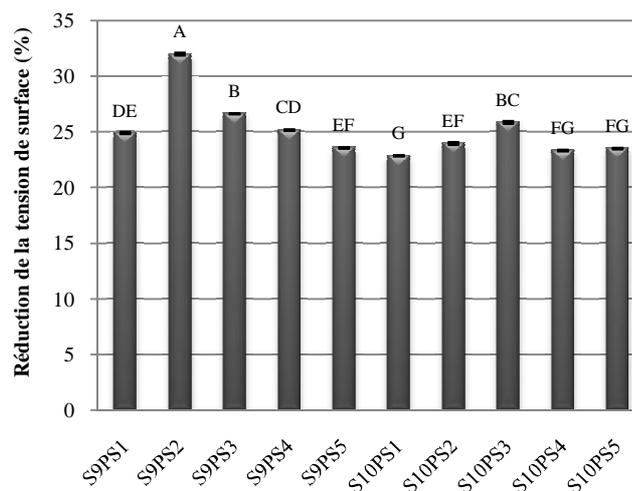
B : Site 2 (Ville de Mascara)



C : Site 3 (Ville de Sidi Belabess)



D : Site 4 (Ville de Saida)



E : Site 5 (Ville d'Elbayadh)

Fig. 20: Comparaison des pourcentages de réduction de la tension superficielle dus au biosurfactants des souches isolées à partir des 5 sites : Ville d'Oran, Ville de Mascara, Ville de Sidi Belabess, Ville de Saida et Ville d'Elbayadh. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, cela est déterminé par l'Analyse de la Variance (ANOVA) ($P < 0.05$).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La bioremédiation exploite à la fois la diversité génétique et la versatilité métabolique des micro-organismes. L'importance des problèmes de l'environnement et plus spécifiquement des catastrophes résultant des activités humaines nous a fait prendre conscience des dangers liés aux pollutions et des risques que les activités industrielles font peser sur la population et le milieu naturel.

La remobilisation des métaux lourds présents dans un sol contaminé a été faite en utilisant un tensioactif d'origine biologique issu de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5 isolée à partir d'une eau contaminée par des métaux lourds et des hydrocarbures au niveau de la wilaya de Saida.

La première partie de l'étude s'est intéressée à l'isolement des souches de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose au cétrimide et aux tests de production des biosurfactants en utilisant les techniques de Drop collapsing, déplacement de l'huile, l'activité d'émulsification et la mesure de la tension superficielle afin de sélectionner le microorganisme le plus performant.

La seconde partie de l'étude a permis d'évaluer l'efficacité du biotensioactif à remobiliser les métaux lourds par flottation et les principaux paramètres chimiques influençant le processus de séparation. La flottation a permis d'enlever suffisamment de métaux pour abaisser la concentration dans le sol.

Parmi les technologies éprouvées dans le traitement des minerais, la flottation est une alternative intéressante à explorer afin d'extraire les métaux des matrices environnementales. Les expériences à l'échelle du laboratoire ont permis de déterminer l'efficacité de cette technologie en intégrant les problématiques spécifiques aux sols à traiter.

Un certain nombre de perspectives s'offrent à ce travail, il serait intéressant d'utiliser des techniques telles que la microscopie électronique pour caractériser les solides et l'association des métaux lourds avec les particules du sol. L'âge de la contamination devrait être pris en compte pour évaluer l'efficacité des solutions tensioactives, la mobilité des polluants pouvant diminuer fortement avec le temps de contact entre le polluant et le sol.

La bonne compréhension des mécanismes de mobilisation des métaux lourds à partir de sols pollués et l'optimisation de la technique ainsi que le rendement de la décontamination par l'évaluation des différents paramètres influençant cette dernière permettra d'appréhender les potentialités d'utilisation de biotensioactif dans le cadre de la réhabilitation des sites pollués.

Les micro-organismes permettent l'élimination d'un nombre important de composés mais des connaissances approfondies sur l'écologie, la physiologie et la flexibilité génétique de ces micro-organismes sont nécessaires pour mettre en place des processus de bioremédiation qui soient efficace.

Références bibliographique

Références bibliographique

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.

Adriano D.C., 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York. 43.

AFNOR., 1994. Qualité des sols, Recueil des normes françaises. AFNOR Edition.

Al-Arajil L., Abd Rahman R.N., Basri Z. R, Salleh M. A.B., 2007. Minireview: Microbial Surfactant. (*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, (15)3 : 99–105.

Alexander M., 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).

Ramade R., 2000. Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), 58–365.

Alloway B.J., 1995. Soil processes and the behavior of heavy metals. *In*: Alloway B.J. (Editors), Heavy Metals in Soils. New York, NY: Blackie Academic and Professional Publication, 368.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, (25)17: 3389–402.

Amiard J.C., 2011. Les risques chimiques environnementaux- Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes, Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris.

Arima K., Kahinuma A., Tamura G., 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31: 488–494.

Arqués P., 1998. Pollution de l'air : causes, conséquences, solutions.- Aix-en-Provence, Edisud. 100–207.

Aşçı Y., Nurbaş M., Açıkel Y.S., 2008. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. *J. Hazd. Mater.*, 154: 663–673.

Ashtaputre A. A., Shah A.K., 1995. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 219–222.

ATSDR., 2001. Toxicological Profiles for cobalt. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA: U.S department of Health and Human Services, Public Health Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>.

Atzél B., Szoboszlay S., Mikuska Z., Kriszt B., 2008. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 211: 143–155.

Bai G., Brusseau M.L., Miller R.M., 1998. Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *J Contam Hydrol.*, 30: 265–279.

Baize D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions, Paris, 408.

Baker A.J.M., Walker P.L., 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida, 155–178.

Banat I.M., 1995. Biosurfactants production and possible uses enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review., *Bioresource Technology.*, 51: 1–12.

Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 495–508.

Beebe J.L., Umbreit W.W., 1971. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Baceteriol.*, 108: 612–515.

Belsky I., Gutnick D. L., Rosenberg E., 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier bound fatty acids. *FEBS Lett.*, 101:175–178.

Black R.E., 2003. Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *Journal of Nutrition.*, 133.

Blanchard C., 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse de Doctorat. Lyon: INSA de Lyon, 241.

Blanusa M., Varnai V. M., Piasek M., Kostial K., 2005. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects, *Current Medicinal Chemistry.*, (12) 23: 2771–2794.

Bodour A.A., Miller-Maier R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods.*, 32: 273– 280.

Boopathy R., 2000. Bioremediation of explosives contaminated soils. *Int Biodeter Biodeg.*, 46 : 29–36.

Bouchard S., 2001. Traitement du minerai. Flottation. - Méthodes physiques, Les éditions Le Griffon d'argile, Montreal, Canada.

Bourrelier P.H., Berthelin J., 1998. Contamination des sols par les éléments traces: Les risques et leur gestion. CR. Acc Sci, 42. Ed. Lavoisier, Paris.

Bourg A.C.M., 1983. Modélisation du comportement des métaux traces à l'interface solide - liquide dans les systèmes aquatiques, *Thèse de doctorat*, Université Bordeaux 1. France, 171.

Bourg, A.C.M., 1988. Metal in aquatic and terrestrial systems: sorption, speciation, and mobilisation. In: W. Salmons, U. Forstener (éditeur.), *Chemistry and biology of solid waste*, Springer Verlag, New York. 3–30.

Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol and Environ Safety.*, 45 : 198–207.

Bryant T.N., 2004. PIBWin -- software for probabilistic identification. *J Appl Microbiol.*, 97: 1326–1327.

Burd G., Ward O. P., 1996. Physicochemical properties of PM-factor, a surface-active agent

produced by *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.*, 42: 243–252.

Burton G., Stensel F.L., 2003. *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, 4th ed, McGraw-Hill, New York.

Butcher B., Hinz C., Gfeller M., Flühler H., 1996. Cadmium transport in an unsaturated stony subsoil monolith. *Soil Science Society of America Journal.*, 60: 716–721.

Calvo C., Martinez-Checa F., Mota A., Bejar V., Quesada E., 1998. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity on the *Halomonas eurihalina*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 205–209.

Calvo C., Manzanera M., Silva-Castro G.A., Uad I., González-López J., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. *Sci. Total Environ.*, 407: 3634–3640.

Cameotra S.S., Makkar R.S., 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 520–529.

Candrasekaran E.V., Bemiller J.N., 1980. Constituent Analyses of Glycosamino-glycans. In: *Methods in carbohydrate chemistry*. (Whistler, R.L. ed.), Academic Press Inc., New York. 89–96.

Champion J.T., Gilkey J.C., Lamparski H., Retterer J., Miller R.M., 1995. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane, *J. Environ. Qual.*, 24 : 19-28.

Chappuis P., 1991. *Les oligoéléments en médecine et biologie*. Lavoisier Tee & Doc Palis.

Chatain V., 2004. *Caractérisation de la mobilisation potentielle de l'arsenic et d'autres constituants inorganiques présents dans les sols issus d'un site minier aurifère*. Thèse de Doctorat. Lyon: INSA de Lyon, 189.

Chen C.C., Riadi L., Suh S.J., Ohman D.E., Ju L.K., 2005. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation, *J. Biotechnol.*, 117: 1–10.

- Christofi N., Ivshina I.B., 2002. microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 915–929.
- Chtioui O., 2011. Production sélective de lipopeptides par *Bacillus*.,Dissertation, University of Lille 1. 53–170.
- Cirigliano M. C., Carman G. M. 1984. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *App. Environ. Microbiol.*, 50: 846–850.
- Cilek E.C, Yilmazer B.Z., 2003. Effects of hydrodynamic parameters on entrainment and flotation performance. *Minerals Engineering.*, 16: 745–56.
- Cooper D. G., Liss S. N., Longay R., Zajic J. E., 1989. Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. *J. Ferment Technology.*, 59: 97–101.
- Cornell R.M., Schwertmann U., 1996. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, Wiley-VCH, New York.
- Cotran R.S.S., Kumar V., Fanto N., 2005. Pathological basis of diseases by Robbins and Cotran. Elsevier Saunders.
- David R.L., 2008. *Handbook of chemistry and physics*, Boca Raton, CRC, 89e éd., 2736.
- Dermont G., 2008. Sols pollués par les métaux lourds résultant de l'enfouissement de déchets industriels (Montréal, Canada): Géochimie, spéciation des métaux, et décontamination par flottation. *Thèse de doctorat*, Université du Québec. Canada. 28.
- Dermont G., Bergeron M., Richer-Lafleche M., Mercier G., 2008. Heavy metal removal from contaminated soils by froth flotation: Part 1. Influence of chemical factors. *Science of the Total Environment*, in press.
- Dermont G., Bergeron M., Richer-Lafleche M., Mercier G., 2010. Remediation of metal-contaminated urban soil using flotation technique. *Science of the Total Environment.*, 408: 1199–1211.
- Desai J. D., Banat I. M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 60: 47–64.

Dube A., Zbytniewski R., Kowalkowski T., Cukrowska E., Buszewski B., 2001. Adsorption and Migration of Heavy Metals in Soil. *Pol. J. Environ. Stud.*, 10(1):1–10.

Deleu M., Paquot M., Nylander T., 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface – implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.*, 283: 358–365

Douglas H., Lee K., 1972. *Metallic contaminants and human health*. Academic press New York and London.

Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E., 2001. *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Third Edition, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. *Springer Science+Business Media, Singapore.*, 654–655.

Edwards D. A., Adeel Z., Luthy R.G., 1994. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (8):1550–1560.

Emsley J., 1991. *The elements*. Oxford University Press-Clarendon Press, New York, 264.
Environmental Programme: Chemicals, U.N., 2002. Regionally based assessment of persistent toxic substances: North America regional report, United Nations Organization, Geneva.

Favier A., 1990. *Le métabolisme du cuivre*, voir Chappuis 1991.

Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution.*, 39: 783–791.

Finnerty W.R., 1994. Biosurfactants in environmental biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5: 291–295.

Fuerstenau M.C., 2007. Froth flotation: a century of innovation. *Littleton, USA: Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (SME)*. 891.

González Muñoz M.P., Navarro R., Saucedo I., Avila M., Prádanos P., Palacio L., Martínez F., Martín, Hernández A., 2006. Hydrofluoric treatment for improved performance of a nanofiltration membrane. *Desalination.*, 191: 273–278.

- Goto S., Enomoto S., 1970. Nalidixic acid cetrinide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol.*, 14(1): 65–72.
- Goudot-perrot A., 1983. Les métaux des mécanismes de la vie. Maloine s.a éditeur-Paris.
- Goyer R.A., 1990. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect.*, 86: 177–181.
- Grau A., Gomez Fernandez J. C., Peypoux F., Ortiz A., 1999. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 14: 307–319.
- Haguenoer J.M., Furon D., 1982. Toxicologies et hygiène industrielles, Techniques et documentation, Paris.
- 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.
- Harley–Prescott, 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition. *The McGraw–Hill* 13–14.
- Hauser G., Karnovsky M.L., 1954. Studies on the production of glycolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 68: 645–654.
- Healy M.G., Devine C.M., Murphy R., 1996. Microbial production of biosurfactants, *Resour. Conserv. Recycl.*, 18: 41–57.
- Heidmann S.K., Schuh M., Leismann O., Heeger S., Lehner C.F., 2005. Incorporation of constitutive centromere proteins during anaphase. *A. Dros. Res. Conf.*, 46: 90.
- Herman D.C., Artiola J.F., Miller R.M., 1995. Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2280–2285.
- Herrera-Urbina R., Sotillo F.J., Fuerstenau D.W., 1999. Effect of sodium sulfide additions on the pulp potential and amyl xanthate flotation of cerussite and galena. *Int. J. Miner. Process.*, 55: 157–170.
- Hobman J. L., Brown N. L., 1997. Bacterial mercury-resistance genes. In *Metal Ions in Biological Systems*, Edited by H. Sigel & A. Sigel. New York: Marcel Dekker, 527–568.

- Inoue S., Itoh S., 1982. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants in alkane fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 4: 308–312.
- Jain D.K., Thompson D.L.C., Lee H., Trevors J.T., 1991. A drop collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, 13: 271–279.
- Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A., 1954. Microbiologie médicale, *Laval University Press, Canada*, 130–131.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.
- Jukes T.H., C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. *In*: Munro HN (Ed).
- Kaeppli O., Finnerty W. R., 1980. Characteristics of hexadecane partition by the growth medium of *Acinetobacter* sp. *Biotechnol. Bioeng.*, 22:495–501.
- Kaeppli O., Walther P., Mueller M., Fiechter A., 1984. Structure of cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Arch. Microbiol.*, 138: 279–282.
- Kaplan N., Rosenberg E., 1982. Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 1335–1341.
- Katz E., Demain A.L., 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41: 449–458.
- Kaufmann k., 2004. Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
- Kermarrec C., 1999. Bilan et transformations de l'azote en élevage intensif de porcs sur litière, phd thesis, université de rennes 1: 185.
- Kim J.S., Powalla M., Lang S., Wagner F., Lunsdorf H., Wray V., 1990. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. *J. Biotechnol.*, 13: 257–266.

- Kim O. S., Cho Y-J. , Lee k., Yoon S-H. , Kim M. , N H.a, Park S-C., Jeon Y.S. , Lee J-H. , Yi H., Won S. , Chun J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 62: 716–721.
- Koh P.T.L, Schwarz M.P., 2007. CFD model of a self-aerating flotation cell. *International Journal of Mineral Processing.*, 85: 16–24.
- Kretschmer A., Bock H., Wagner F. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkane. *Appl. Environ. Microbiol.* (1982) 44: 864–870.
- Lang S., Wullbrandt D., 1999. Rhamnose lipids biosynthesis – Microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 : 22–32.
- Lang S., 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*,7 : 12–20.
- Larmet H., 2007. Mobilisation et transfert de Zn, Cd, Cu et des colloïdes bactériens dans les bassins d'infiltration d'eaux pluviales : Influence des conditions hydrodynamiques. École doctorale Terre Univers Environnement. Grenoble: Université Joseph Fourier - Grenoble I, 362.
- Laurier L., Schramm E., Stasiuk N., Marangoni D.G., 2003. Surfactants and their applications . *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C.*, 99: 3–48.
- Lauwerys R., 1982. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. Masson Paris.
- Lee I., 2015. Interaction between fine particles and colloidal gas aphrons (CGA), thesis, McGill University Montreal, Canada.
- Li Z. Y., Lang S., Wagner F., Witte L., Wray V., 1984. Formation and identification of interfacial-active glycolipids from resting microbial cells of *Arthrobacter* sp. and potential use in tertiary oil recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 610–617.
- Liu Y., Dorigo W.A., Parinussa R.M., de Jeu R.A.M., Wagner W., McCabe M.F., Evans J.P., van Dijk A.I.J.M., 2012. Trend-preserving blending of passive and active microwave soil moisture retrievals, *Remote Sens. Environ.*, 123 : 280–297.

Losi M.E., Amrhein C., Frankenberger W.T., 1994. Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol.*, 136 : 91–121.

Loué A., 1993. Oligo-éléments en agriculture. Ed. Nathan (ed), 45–177.

Lowbury E.J.L., Collins A.G., 1955. The use of a new cetrinide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* 8: 47.

Liu D., Coloe S., Baird R., Pedersen J., 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clinical Microbiol.* 38:471.

Mata-sandoval J.C, Karns J., Torrents A., 2000. Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci. Technol.*, 23 : 4923–4930.

MacDonald C.R., Cooper D.G., Zajic J.E., 1981. Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 117–123.

Marcos L., 2001. Etude expérimentale et Modélisation du transfert du Zinc et du Plomb dans les milieux sableux modelés. Thèse de Doctorat. Nantes: Ecole Polytechnique de l'université de Nantes, 299.

Martin-Garin A., Van Cappellen P., Charlet L., 2003. Aqueous cadmium uptake by calcite: a stirred flow-through reactor study. *Geochim Cosmochim Acta.*, 69: 2763–2774.

Matsuyama T., Sogawa M., Yano I., 1991. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1186–1188.

McLaughlin M.J., Zarcinas B.A., Stevens D.P., Cook N., 2000. Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 31, n° 11-14, 1661-1700.

Meyer J.M., Abdallah M.A., 1978. The florescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* Biosynthesis, purification and physical-chemical properties. *J. Gen. Microbiol.*, 107: 319-328.

Migrain I., Green G. A., Monteil H., 1993. Degradation of atrazine in laboratory microcosms: isolation and identification of the biodegrading bacteria. *Environmental Toxicological and Chemistry.*, 12: 1627–1637.

- Miller-Maier R.M., Bodour A.A., 1998. Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms, *J. Microbiol. Method.*, 32: 273–280.
- Moore J.W., Ramamoorthy S., 1984. *Metals in Water, Sediment and Soil Systems*. Springer-Verlag, New York, 125.
- Morikawa M., Daido H., Takao T., Murata S., Shimonishi Y., Imanaka T., 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.*, 175: 6459–6466.
- Mulligan C.N., Gibbs B.F., 2004. Types, production and applications of biosurfactants. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.*, 1: 31–55.
- Mulligan C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, 133: 183–198.
- Musy A., Soutter M., 1991. *Physique du sol*. Lausanne: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Collection Gérer l'environnement, 348.
- Muthusamy K., S.Gopalakrishnan, Kochupappy Ravi T., Sivachidambaram P., 2008. Biosurfactants: Properties. *Commercial production and application current science.*, 6: 25.
- Myer E.W., Miller W., 1988. Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci.*, 4: 11–7.
- Navacharoen A., Vangnai A. S., 2011. Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent-tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65 : 818–826.
- Navon-Venezia S., Zosim Z., Gottlieb A., Legmann R., Carmeli S., Ron E. Z., Rosenberg E., 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3240–3244.
- Neu T. R., Poralla K., 1990. Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 521– 525.
- Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S., 2011. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 633-654.

Palleroni N.J., 1984. Genus I. *Pseudomonas*. In: N. R. Kreig and J. G. Holt (Eds.) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, MA., 141–199.

Paraszkiwicz K., Kanwal A., Dlugonski J., 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol.*, 92: 287–294.

Parra J. L., Guinea J., Manresa M. R., Mercade M. E., Comelles F., Bosch M. P., 1989. Chemical characterization and physico-chemical behaviour of biosurfactants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 66: 141–145.

Parvulescu V. I., Magureanu M., Lukes P., 2012. Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids, WILEY-VCH Verlag GmbH, ISBN: 978–3–527–33006–5.

Pelmont J., 1993. *Bactéries et environnement*, Presses universitaires de Grenoble.

Perfumo A., Rancich I., Banat IM., 2010. Possibilities and challenges for biosurfactants uses in petroleum industry, In: *Biosurfactants, BIOSURFACTANTS Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology*, Sen R Ed., Landes Bioscience, Austin, TX, Volume: 672: 135–145.

Perraud C., 2009. Evaluation des procédés d'application d'un Biosurfactant sur des pâtes de ciment. Mémoire d'ingénieur, rapport de PFE. *INSA de Strasbourg– Specialite genie civil.*, 9–11.

Perrono P., 1999. Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole. Mémoire D.U.E.S.S., D.E.P. Amiens: Université de Picardie, Amiens, Extrait disponible sur : <http://www.u-picardie.fr/beauchamp/duce/perrono/perrono.htm>.

Persson A., Oesterberg E., Dostalek M., 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: Growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 1–4.

Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 553–563.

Pichard A., Bisson M., Bureau J., Dujardin R., Lacroix G., Lefevre J. P., Oberson- Geneste D., Strub M. P. & Tissot S., 2005. 2,4-dichlorophénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N° 3-1. I N E R I S (France), 1–35.

Pinzon-Gamez M., 2009. Rhamnolipid biosurfactant production from glycerol: new methods of analysis and improved denitrifying fermentation, Dissertation, University of Akron, 46–120.

Plumlee G.S., Ziegler T.L., 2003. The medical geochemistry of dusts, soils, and other earth materials. In: Treatise on Geochemistry. Volume 9. Lollar BS (ed) Elsevier, 263–310.

Pore J., 1992. Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, *Editions Techniques et Industries des Corps Gras.*, 270.

Pornsunthorntawee O., Arttaweeporn N., Paisanjit S., Somboonthanate P., Abe M., Rujiravanit R., Chavadej S., 2008. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal.*, 42: 172–179.

Prommachan O., 2002. Production And Application Of Biosurfactant From *Bacillus* MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thailand, 70.

Pugh R. E., Dick D. G., Fredeen A. L., 2002. Heavy metal (Pb, Zn, Cd, Fe and Cu) contents of plant foliage near the Anvil Range lead/zinc mine, Faro, Yukon Territory, *J. Ecotoxi. Environ. Safety.*, 52: 273–279.

Rao S.R., Leja J., 2004. Surface chemistry of froth flotation vol. 2. New York: Kluwer Academic Publishers. 744.

Rashchi F., Dashti A., Arabpour-Yazdi M., Abdizadeh H., 2005. Anglesite flotation: a study for lead recovery from zinc leach residue. *Miner Eng.*, 18: 205–12.

Rehm H., Reiff I., 1981. Mechanisms and Occurrence of Microbial Oxidation of Long-Chain Alkanes. Springer Berlin, Heidelberg.

Remy J.C., Orsini L., 1976. Utilisation du chlorure de cobaltihexammine pour la détermination simultanée de la capacité d'échange et des bases échangeables des sols. *Science du sol.*, 4: 269–275.

Rendell N.B., Taylor G.W., Somerville M., Todd H., Wilson R., Cole J., 1990. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1045: 189–193.

Richter M., Willey M., Suessmuth R., Jung G., Fiedler H.P., 1998. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tue 901/8c. *FEMS Microbiol. Lett.*, 163 (2): 165–171.

Robert M., Juste C., 1999. Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: CRIN.

Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Van der Mei H.C., Oliveira R., 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 49: 79–86.

Ron E.Z., Rosenberg E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, 3: 229–236.

Ronald M., 2005. Handbook of Media for Environmental Microbiology ; second edition, *Taylor & Francis Group . New Work.*, 430.

Rosenberg E., Perry A., Gibson D.T., Gutnick D., 1979a. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 409–413.

Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D.L., 1979b. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37: 02–408.

Rosenberg, E., Rubinovitz C., Gottlieb A., Rosenhak S., Ron E.Z., 1988a. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Microbiol. Appl. Environ.*, 54: 317–322.

Rosenberg, E., Rubinovitz C., Legmann R., Ron E.Z., 1988b. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 323–326.

Rosenberg E., Schwartz Z., Tenenbaum A., Rubinovitz C., Legmann R., Ron E.Z., 1989. A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersan in grinding limestone and making paper. *J. Dispersion. Sci. Technol.*, 10: 241–250.

Rosenberg E., 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbon: new markets. *Trends Biotechnol.*, 11: 419–424.

Rosenberg E., Ron E.Z., 1998. Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*. Kaplan DLBiopolymers from Renewable Resources. *Springer-Verlag. Berlin.*, 281–291.

Rosenberg E., Ron E.Z., 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 154–162.

Ristau E., Wagner F. 1983. Formation of novel anionic trehalose-tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. *Biotechnol. Lett.*, 5: 95–100.

Saitou N, Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, 4: 406–425.

Sastre J., Rauret G., Vidal M., 2006. Effect of the cationic composition of sorption solution on the quantification of sorption-desorption parameters of heavy metals in soils. *Environmental pollution.*, (140) 2: 322–339.

Sautel G., 1991. Biofixation du cadmium par la bacterie *Pseudomonas putida.*, centre de l'environnement industriel, Université d'Aix-Marseille 1, Marseille, France.

Schnelle K.B., Brown C.A., 2001. Air pollution control technology handbook, CRC PRESS, ISBN 0-8493-9588.

Schäfer U., 2004. Manganèse. In: *Elements and their Compounds in the Environment*. Eds. Merian, Anke, Ihnat et Stoepler. 2ème édition, Wiley-VCH Weinheim (D). Vol2, Metals and their Compounds, 901–930.

Schramm L.L, Stasiuk E.N, Marangon D.G., 2003. Surfactants and their applications. *Annu Rep Prog Chem Sect C.*, 99: 3–48.

Schulin R., Geiger G., Furrer G., 1995. Heavy metals retention by soil organic matter under changing environmental conditions. In: Salomons W., Stigliani W. M. Biogeodynamics of pollutants in soils and sediments, 53–85.

Shinoda K., Fontell K., 1995. Ionic surfactants capable of being used in hard water, *Advances in Colloid and Interface Science.*, 54: 55–75.

Sigg L., Behra P., Stumm W., 2000. Chimie des milieux aquatiques – Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, *Dunod*, Paris, 547.

Sipos P., Németh T., Kovács Kis V., Mohai I., 2008. Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. – *Chemosphere.*, 73: 461–469.

Singh P., Cameotra S.S., 2004. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319: 291–297.

Soberon-Chavez G., 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol.*, 180: 4442–4451.

Song Y., Wilson M. J., Moon H.-S., Bacon J. R., Bain D. C., 1999. Chemical and mineralogical forms of lead, zinc and cadmium in particule size fractions of some waste, sediments and soils in Korea. *Applied Geochemistry.*, 14: 621-633.

Sovadogo O., Lee K., Oishi K., 2004. In fuel cells, ed : VLADIMIR S. BAGOTSKY, *Electrochem. Commun.*, 6: 105.

Sparks D. L., 1995. Environmental soil chemistry. New York: Academic Press, 267.

Suzuki T., Hayashi K., Fujikawa K., Tsukamoto K., 1965. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E1 with colistin A and polymyxin E2 with colistin B. *J. Biol. Chem.*, 57: 226–227.

Syldatk C., Wagner F., 1987. Production of biosurfactants. *Surfactant Science Series, Biosurfactants Biotechnol.*, 89–120.

Takeno N., 2005. Atlas of Eh-pH diagrams, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Research Center for Deep Geological Environments, Geological Survey, Japan, 60–280.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *BMolecular Biology and Evolution.*, 30: 2725–2729.

Thanomsub B., Pumeechockchai W., Limtrakul A., Arunrattiyakorn P., Petchleelaha W., Nitoda T., and Kanzaki H., 2006. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. *Bioresource Technology*, (98) 5: 1149–1153.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673–4680.

Toren A., Orr E., Paitan Y., Ron E.Z., Rosenberg E., 2002. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *J Bacteriol* in press.

Urum K., Pekdemir T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. // *Chemosphere*., 57: 1139–1150.

Vanhuynne M, Maes A., 2002. The removal of heavy metals from contaminated soil by a combination of sulfidisation and flotation. *Sci Total Environ.*, 290: 69–80.

Vanhuynne M, Maes A., 2007. The removal of heavy metals from dredged sediments by mechanical Denver flotation: The contribution of true flotation and entrainment. *Land Contamination and Reclamation.*, 15: 15–30.

Venghaus T., Werther J., 1998. Flotation of a zinc-contaminated soil. *Adv Environ Res.*, 2: 77–91.

Venghaus T., Werther J., 2006. Flotation of a zinc-contaminated soil. *Adv Environ Res.*, 2: 77–91.

Vidal N., Rage J.-C., Couloux A., Hedges S.B., 2009. Snakes (Serpentes). In: Hedges S.B., Kumar S. (Eds.), *The Timetree of Life*. Oxford University Press, New York, 390–397.

Wan C.Y., Bazen L., Baars R., Libenson A., Zipse L., Zuk J., 2011. Auditory-Motor Mapping Training as an Intervention to Facilitate Speech Output in Non-Verbal Children with Autism: A Proof of Concept Study. *PLoS ONE* 6(9): e25505. doi:10.1371/journal.pone.0025505

Wang J, Liu G. F., Lu H., Jin R. F., Zhou J. T., Lei T. M., 2012. Biodegradation of Acid Orange and its auto-oxidative decolorization product in membrane-aerated biofilm reactor. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 67: 73–77.

Wataha J.C., Hanks C.T., Sun Z., 1994. Effect of Cell Line on in Vitro Metal Ion Cytotoxicity. *Dent Mater.*, 10: 156–61.

Wei Y.H., Chou C.L., Chang J.S., 2005. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochem. Eng.J.*, 27: 146–154.

West C.C., Harwell J.H., 1992. Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.*, 12: 2324–2330.

Whang L.M., Liu P.W.G., Ma C.C., Cheng S.S., 2008. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.*, 151: 155–163.

Who, 2005. Manganese and its compounds: environmental aspects. *Concise International Chemical Assessment Document – CICAD*, World Health Organization, Genève (CH).

Wong C.S.C, Li X., Thornton I., 2006. Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environ Pollut.*, 142: 1–16.

Yong R.N., Mohamed A.M.O., Warkentin B.P., 1992. Principles of contaminant in soils. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 327.

Yong R.N., Mohamed A.M.O., Warkentin B.P., 1993. Principles of Contaminant Transport in Soils. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 327.

Zajic J.E., Seffens W., 1984. Biosurfactants. *CRC Critical Reviews in Biotechnology.*, 1(2): 87–107.

Zgheib S., 2009. Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire, Ecole nationale des ponts et chaussées, Thèse de doctorat, Paris, France. 20–24.

Annexes

Milieux de culture**1. Gélose au Cétrimide** (Composition par litre)

Peptone de gélatine	16,0 g
Peptone de caséine	10,0 g
Bromure de tétradonium (cétrimide)	0,2 g
Acide nalidixique	15 mg
Sulfate de potassium	10,0 g
Chlorure de magnésium	1,4 g
Agar	10,0 g
pH = 7,1	

2. Gélose nutritive

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
pH = 7,4	

3. TSB (Bouillon Tryptone Soja) (Composition par litre)

Peptone	20 g
Glucose	2,5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
pH = 7,4	

Procédure d'utilisation de la galerie API 20 NE

1. Principe

La galerie API 20 NE est constituée de 20 microtubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

2. Technique

2.3. Préparation de la galerie

Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

2.4. Préparation de l'inoculum

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

2.5. Inoculation de la galerie

Remplir les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente. Eviter la formation de bulles.

Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium. Homogénéiser.

Remplir les tubes et cupules des tests **GLU** à **PAC**.

Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests **GLU**, **ADH**, **URE**.

Incuber 24 heures à 30°C.

3. Lecture

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (**Tab. 12**).

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs : voir tableau de résultats.

4. Identification

Elle s'effectue avec un logiciel d'identification (**Bacterial Identification Program**).

Tab. 13: Tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20 NE

Tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			Négatif	Positif
NO₃	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			Incolore	Rose-rouge
TRP	Tryptophane	Formation d'indole	TRP / 3-5 mn	
			Incolore	Goutte rouge
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	Hydrolyse	Jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gélatine	Hydrolyse	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-β-D- galactopyranoside	-	Incolore	Jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétylglucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citrate			
PAC	Phényl-acétate			
OX	Tetraméthyl-phenylène diamine	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

1. Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été faite selon les étapes qui suivent:

- Dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL, mettre 500 μ L de la solution de lyse composée de:

Tris-HCl [pH 8,0]: 400 mM.

EDTA [pH 8,0]: 60 mM.

NaCl: 150 mM.

Sulfate de sodium dodecyl: 1%.

- Ajouter une petite quantité de colonies bactériennes et laisser pendant 10 min à température ambiante.

- Ajouter 150 μ L d'une solution composée de 60 mL d'acétate de potassium 5 M, 11,5 μ L d'acide acétique glacial et 28,5 μ L d'eau distillée (Le pH final de cette solution est de 4,8).

- Vortexer brièvement, centrifuger à 10000 g pendant 1 min, transférer le surnageant dans un autre tube Eppendorf, centrifuger à 10000 g et retransférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf.

- Ajouter un volume égal d'isopropanol et mélanger le tube brièvement par inversion, puis centrifuger à 10000 g pendant 2 min et éliminer le surnageant.

- Laver l'ADN avec 300 μ L d'éthanol à 70 %, centrifuger à 10 000 g pendant 1 min, éliminer le surnageant et sécher le culot (l'ADN) à l'air; suspendre de nouveau le culot dans 50 μ L d'eau bidistillée stérile.

2. Quantification des rhamnolipides

Les rhamnolipides ont été quantifiés par la détermination spectro-photométrique des sucres avec l'orcinol (**Candrsekaran et Bemiller 1980**). Les rhamnolipides ont été purifiés d'abord en séparant les cellules du surnageant par centrifugation (10.000 g/min). Le surnageant a ensuite été extrait avec du chloroforme et l'éthanol. L'échantillon de rhamnolipide de 0,5mL a été extrait par 1mL de chloroforme: l'éthanol (2:1, v/v). La phase organique est évaporée à sec puis additionnée de 0,5 mL de H₂O. À chaque 0,1 ml de l'échantillon avec la dilution convenable, 0,9 ml d'une solution contenant 0,19 % orcinol (dans 53 % de H₂SO₄) a été ajouté. Après un chauffage pendant 30 min à 80 °C, les échantillons ont été refroidis à la température ambiante et la mesure de la D.O est effectuée à 421 nm. La concentration en rhamnolipides est calculée à partir de la courbe standard préparée avec L-rhamnose (10-50 mg/L) et exprimé en équivalent rhamnose.

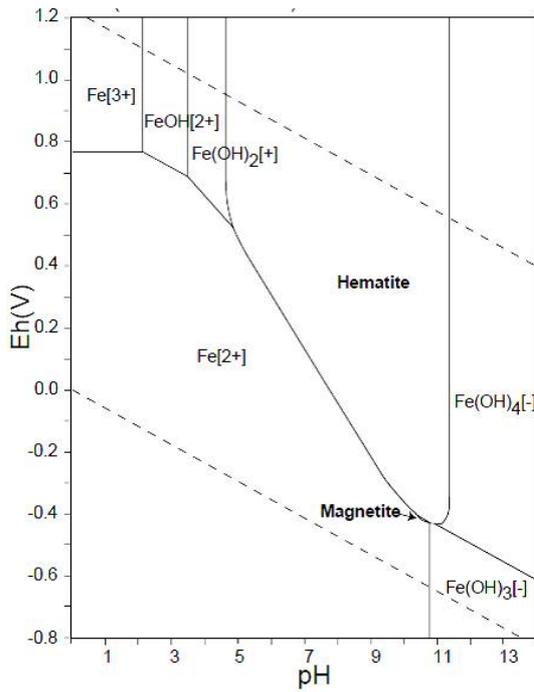


Fig. 39 : Diagramme E-pH du Fe (Takeno, 2005).

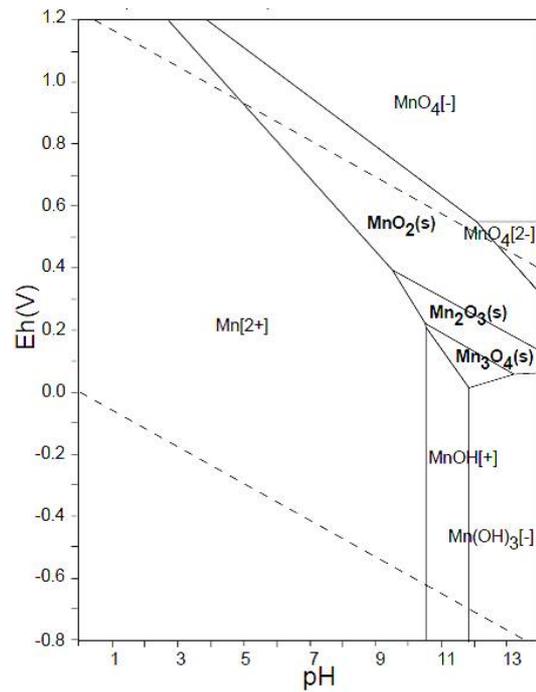


Fig. 40: Diagramme E-pH du Mn (Takeno, 2005).

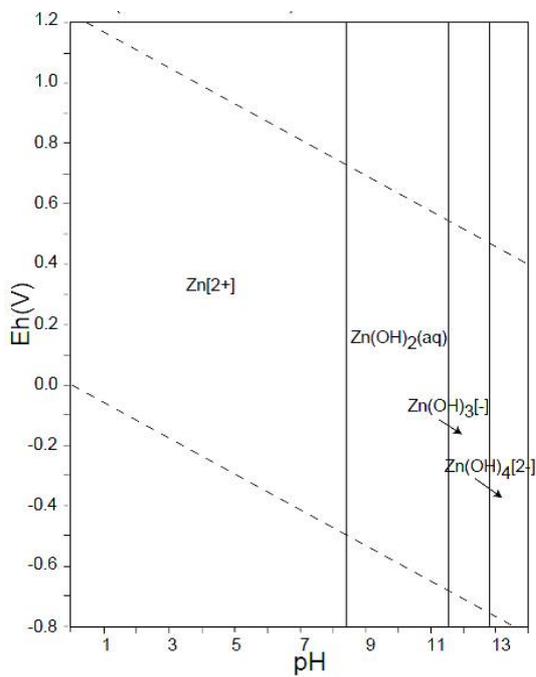


Fig. 41: Diagramme E-pH du Zn (Takeno, 2005).

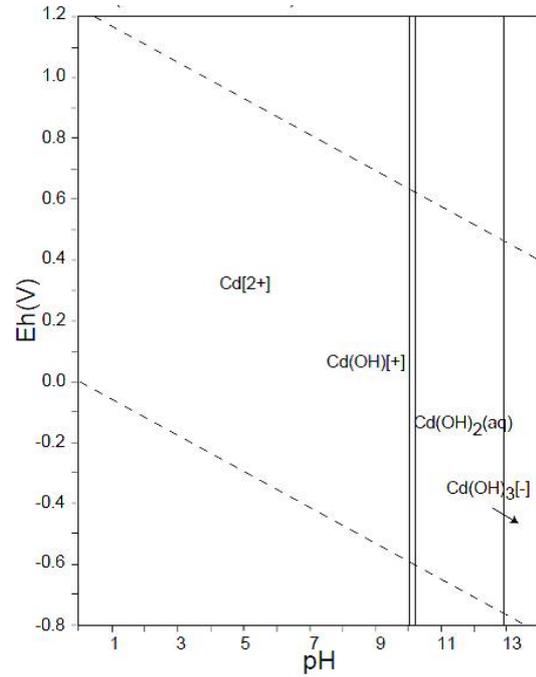


Fig.42 : Diagramme E-pH du Cd (Takeno, 2005).

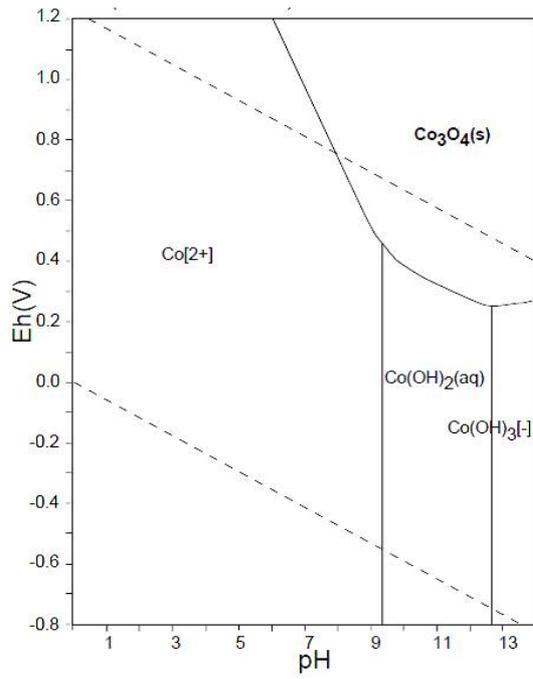


Fig. 43: Diagramme E-pH du Co (Takeno, 2005).

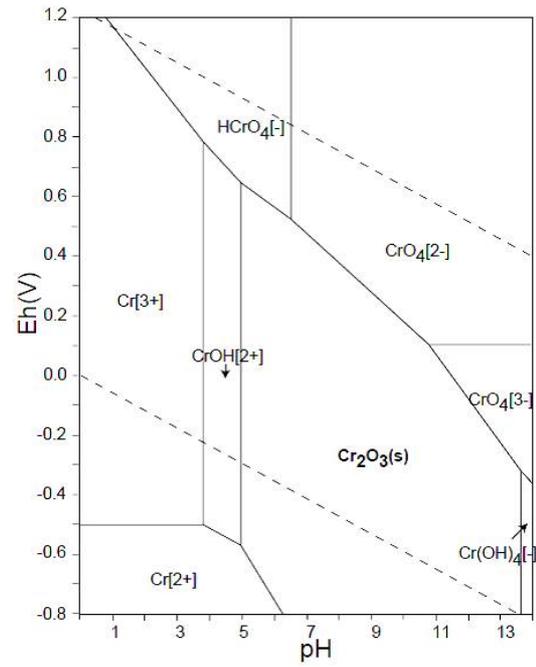


Fig. 44: Diagramme E-pH du Cr (Takeno, 2005).

**REMOVAL OF ZINC AND CADMIUM IONS FROM CONTAMINATED SOILS
WITH RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT PRODUCED BY *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* S7PS5**

M. E-A. BENDAHA^{1*}, B. MEDDAH¹, H. A. BELAOUNI², M. MOKHTAR³ and A. TIRTOUIL¹

¹Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire (LBGMSS),
University of MASCARA, Algeria

²Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ENS KOUBA, Algeria

³Laboratory of Beneficial Microorganisms, Functional Food and Health (LMBAFS),
University of MOSTAGANEM, Algeria

Received: 04 June 2016 / Accepted: 20 August 2016 / Published online: 01 September 2016

ABSTRACT

A soil treatment process using froth flotation technique involving anionic biosurfactant (rhamnolipids) using Sodium sulfide was studied. The supernatant produced by the strain *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5 was tested for biosurfactants production, HPLC analysis showed the presence of L-rhamnosyl- β - hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL1) and L-rhamnosyl L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β - hydroxydecanoate (RL2). The influence of the collector (rhamnolipid), pulp pH, a chemical activation step (sulfidization) and process time on metal removal efficiency has been investigated to recover Zn and Cd ions from a contaminated soil. An effective CMC of 35 mg/L was obtained. A perfect Zn and Cd removal efficiency was made at pH = 12 and 4 mg/g of Na₂S during the first 5 min of soil washing process, then a longer flotation time (> 5 min) caused mechanical entrainment of Zn and Cd.

Keywords: Biosurfactants, flotation, *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids, soil washing.

Author Correspondence, e-mail: biodaha@live.com

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas>.



1. INTRODUCTION

The presence of low concentrations of heavy metals in the soils are known to have potential impact on environmental quality and human health *via* ground water, surface water, plants and agricultural products [1].

Soil composition, clay mineralogy, permeability, pH, cation exchange capacity, particle size and other factors such as the presence of competing ligands, the ionic strength of the soil and the simultaneous presence of competing metals and contaminants significantly affect sorption–desorption processes and leaching potential through a soil profile [2, 3].

Cadmium (Cd) and zinc (Zn) have a great interest because of their high toxicity and mobility in soil and as metals in the contaminated sites are not degraded, they must be either immobilized or removed [1].

Biosurfactants over synthetic surfactants include higher selectivity for metals and organic compounds [4], lower toxicity, higher biodegradability, higher foaming [5], better environmental compability, less expensive, more tolerant to pH, salt, and temperature variation [6].

Rhamnolipids are mostly produced by *Pseudomonas aeruginosa*, which are composed of one or two rhamnose molecules as a hydrophilic portion, and up to three molecules of hydroxy fatty acids (C8–C14) as a hydrophobic portion [7]. These surfactants have been studied in various environmental applications and are applied to the removal of Zn and Cd [1].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling site

The soil used for the washing tests was collected from Sidi Bel Abbess (Algeria) at the agricultural engines factory (SONACOM) (depth of 15 -100 cm). The soil samples were dried at 105 °C and sieved (< 2 mm) according to AFNOR X 31-101 standard [8], then homogenized and kept away from light.

2.2. Rhamnolipids production and purification

The used rhamnolipids were produced by *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5 (Figure 1) (GenBank accession no. **KR349493**) isolated by Bendaha et al. [9] after a culture of 22 h at

room temperature in the following media: 100 ml of nutrient broth, 1 % of olive oil with 1 % of inoculum with shaking at 75 rpm/min [9]. Biosurfactants are recuperated in the supernatant after centrifugation at 9000 g for 15 min [10].

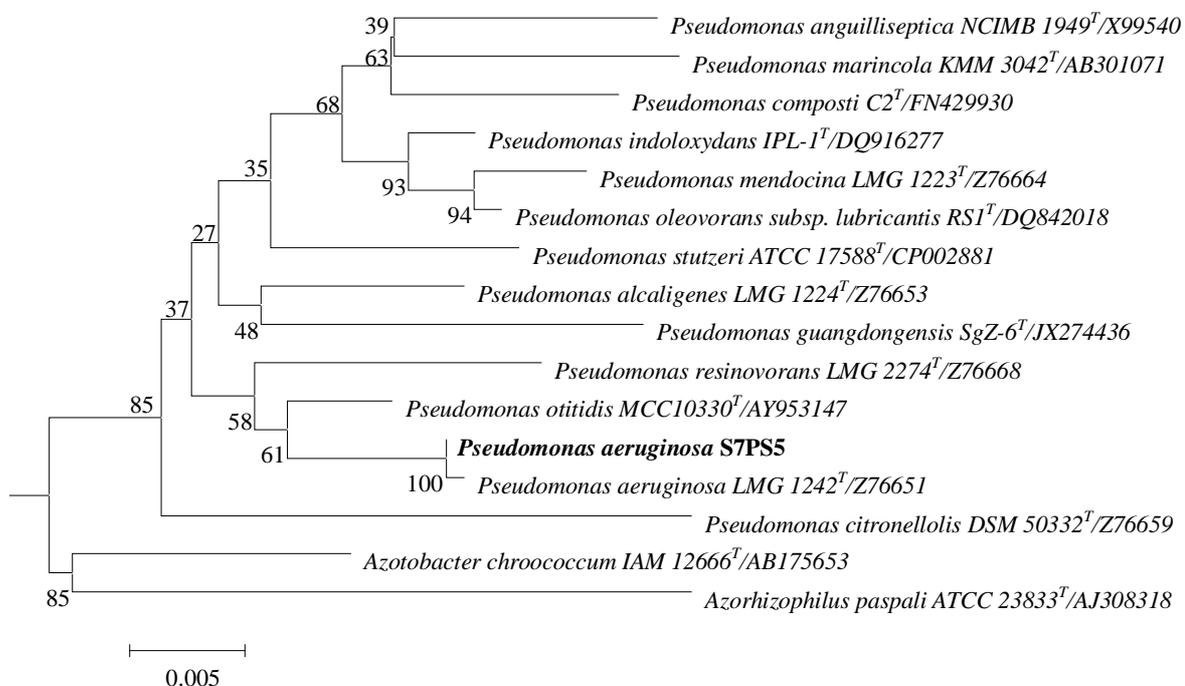


Fig. 1. Phylogenetic tree based on sequence analysis of 16S rDNA and showing the relationships between *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5 and the other similar species. Note: The numbers at the nodes indicate "bootstrap" levels (As a percentage of 1000 re-sampling). The bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position [9]

2.3. Biosurfactants producing tests

The drop collapsing was conducted using the test of collapse described by Jain et al. [11], supernatant of the culture that led to the collapse of the drop is shown as a positive result, and the drops remaining with the beads are marked as negative results [9].

15 μ L of crude oil are placed on the surface of 40 ml of sterile distilled water for the oil displacement test, then; 10 μ L of supernatant was slightly put on the oil film surface. After 30 s, diameter of the clear halo is measured under visible light [12].

For the emulsification activity was done according to Paraszkievicz et al. [13]. The emulsification index (E_{24}) was estimated after 24 h, as follows:

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} \times 100$$

H_{EL} : Height of emulsion layer, H_S : Height of total liquid column.

The surface tension measurement was carried out according to the Du Nouy ring method described by Zajic et al. [14] and the surface activity is expressed as a reduction percentage of the surface tension reduction by the following equation:

$$\% \text{ surface tension reduction} = \frac{(y_m - y_c)}{y_m} \times 100$$

y_m is the surface tension of the medium as prepared, y_c is the surface tension of the supernatant.

2.4. Rhamnolipids purification

Supernatant was collected after centrifugation at 9000 g for 15 min, rhamnolipids were then precipitated by acidification at pH = 2 using 1 N HCl [10]. A second centrifugation was done at 9000 g for 20 min and the precipitate was extracted with ethyl acetate at room temperature [10]. The organic phase was transferred to a round bottom flask connected to a rotary evaporator (RE300 Stuart), allowing to remove solvent from viscous honey-colored rhamnolipid product [15]. The crude biosurfactant was purified and kept at 4 °C for 24 h.

2.5. Measurement of critical micelle concentration (CMC)

Biosurfactants solutions were prepared in ultra-pure water from a solution of rhamnolipids of 1 g/L with pH adjusted to 7 prior to use. The CMC determination was done by plotting the surface tension versus concentration of biosurfactant in the solution, with a curve having a downward slope to the CMC then becomes constant [16].

2.6. HPLC analysis

HPLC analyses of the rhamnolipids compounds were performed on a Shimadzu-system (Prominence i. LC-2030C 3D) equipped with Ascentis Express C18 column (15 cm X 4.6 mm) id packed with 2.7 μ m partially porous particles (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The binary mobile phase consisted of water/acetic acid (solvent A) and methanol/acetic acid (solvent B), in a linear gradient mode: 0 min, 5 % B; 10 min, 40 % B; 30 min, 70 % B; 60 min, 100 % B; 65 min, 100 % B; 67 min, 2 % B. The mobile phase flow rate was 0.7 ml/min.

Pure rhamnolipids Rha C10-C10 and Rha-Rha C10-C10 were used with the testing sample.

2.7. Soil preparation

The soil washing process used in this work was designed as described by Dermont et al. [17] in order to increase the degree of liberation of metal mineral phases (Figure 2). To obtain a soil with a particle-size range of 0–250 μm , a procedure combining successive sieving and crushing/grinding steps was done [18].

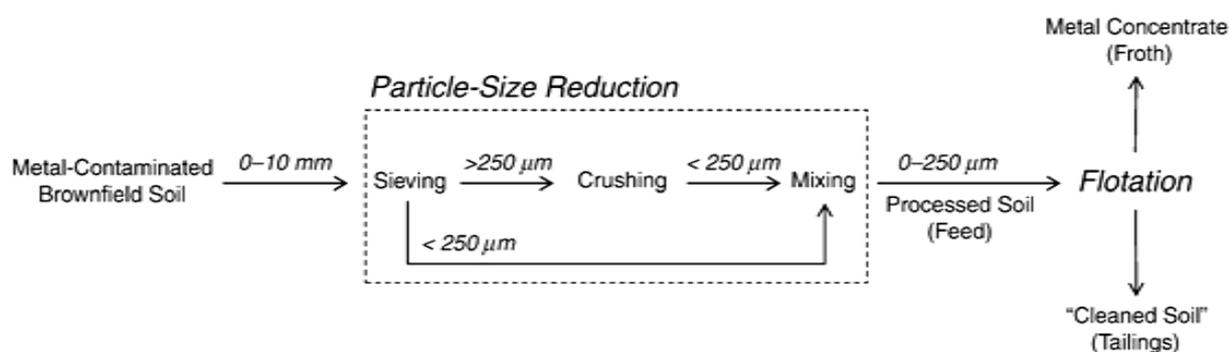


Fig. 2. The schematic soil washing process [17]

2.8. Rhamnolipids sorption

Rhamnolipids are anionic biosurfactants that have less sorbance in soil [19].

For soil washing process, an effective CMC must be used, because in case a surfactant is sorbed in the soil, its effectiveness can be reduced.

Sorption experiment was carried out in a 250 ml Erlenmeyer flask with 10 % of soil in distilled water for 24 h. Selected biosurfactant concentration was the same as the CMC.

The surfactant fraction attached to soil is obtained by the following formula:

$$\text{Adsorbed \%} = \frac{C_0 - C_r}{C_0} \times 100$$

With:

C_0 : Initiale concentration of rhamnolipids (mg/L).

C_r : Residual concentration of rhamnolipids (mg/L).

2.9. Metals distribution and physico-chemical characterization of the soil

The total concentration of each element (Fe, Mn, Zn, Cu, Cd, Co, Cr, Ni and Pb) was measured after a complete decomposition by mixed acid digestion using an atomic absorption spectrophotometer (AAS) Perkin–Elmer model AA300, in a certified laboratory, namely the

"Labo Bio Qual" of Blida, Algeria, where the quality control of the analytical method is ensured.

The physicochemical characterization of soil was conducted using AFNOR standard techniques [8]. These analyzes were conducted at the *National Institute of Agricultural Research of Algeria* (INRAA), Lamtar's Station, Sidi Bel Abbess, Algeria.

2.10. Flotation method

The flotation cell used in this study was developed in the *Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologique et Sécurité Sanitaire* (LBGMSS), University of Mascara, Algeria.

The pulp pH influences the mobilization of heavy metals in surfactants presence [17], the different pH values used in this study are 8, 9, 10, 11 and 12.

The experiences were realized using a laboratory flotation cell (Figure 3) with a mechanical agitator motor (Ultra-Turrax T25). Separation principle is based on the affinity of hydrophobic surfaces of particles for injected air bubbles in the soil suspension. The collector is a surfactant agent that attaches on the mineral surface (*via* physical adsorption or chemisorption) in order to produce a hydrophobic surface or to enhance the hydrophobic character of the mineral phase to be floated [17]. To have 10 % of solids in the pulp [17], 50 g of soil (0–250 μm) were mixed with the appropriate amount of distilled water in the flotation cell. The frothing agent (rhamnolipid) was added in the last minute of the conditioning step. The pulp was then conditioned for 10 min with the collector agent in the flotation cell with an agitation speed of 8000 rpm. After the conditioning step, the air valve was opened and flotation test was conducted for the given duration. The froth layer was continuously removed during the flotation process using a vacuum pump and collected in glass containers. After completion of the flotation stage, the various produced fractions were filtered and the concentration factor (CF) of Zn and Cd were calculated using the equation given by Dermont et al. [17]:

$$\text{Element CF} = \frac{[\text{Element}]_{\text{Froth}}}{[\text{Element}]_{\text{Feed}}}$$

With:

$[\text{Element}]_{\text{Froth}}$: Concentration of element in froth.

$[\text{Element}]_{\text{Feed}}$: Concentration of element in feed.

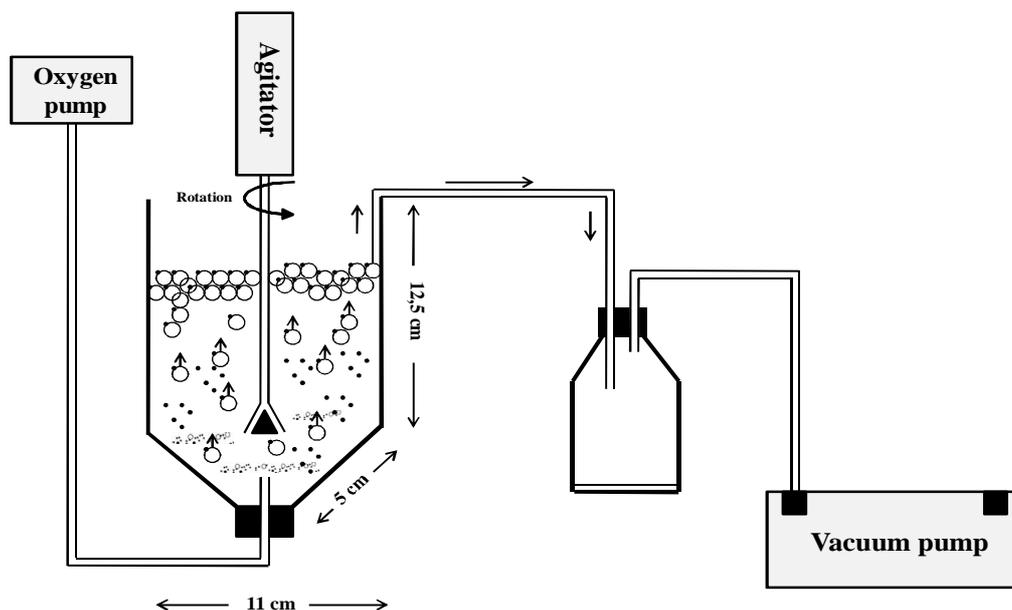


Fig. 3. Process and instrumentation diagram of the flotation unit

2.11. Influence of the chemical activation of the pulp

The effect of chemical activation of the pulp was tested by sulfidization with sodium sulfide (Na_2S) which is generally used as a sulfurizing agent [20, 21]. The sulfidization step was performed on 10 % of soil contained in the cell for 20 minutes at room temperature [17].

Three concentrations of Na_2S were tested: 2, 3 and 4 mg/g. The activation by HS^- ions modifies the particle surfaces to make them more disposed to the biosurfactant action.

2.12. Influence of flotation time

Flotation time was assessed by measuring the concentration factor (CF) and the surface activity of rhamnolipids in the pulp (10 % of soil) of Zn and Cd at four different times: 2.5, 5, 7.5, and 10 min.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Biosurfactants producing tests

The drop collapsing test show biosurfactants presence in the tested supernatant, interfacial tension between water droplet and hydrophobic surface is reduced resulting in the spread of

the water drop on hydrophobic surface [22]. Clear halo diameter, E_{24} (%) and reduction of the surface tension (%) results are presented in figure 4.

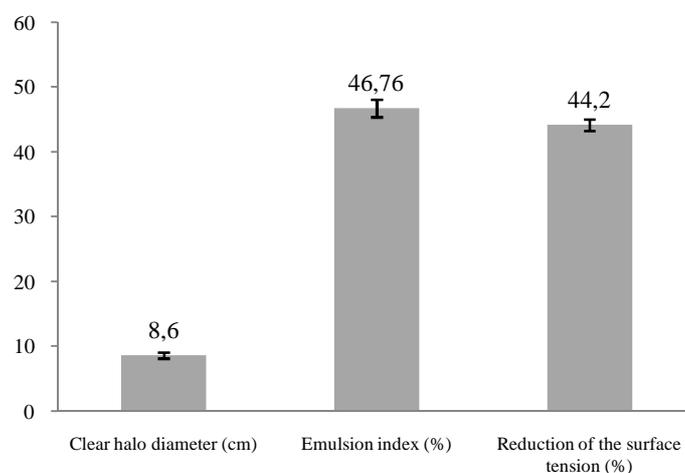


Fig. 4. Biosurfactants producing tests (oil displacement, emulsion index E_{24} and reduction of the surface tension) for *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5

Biosurfactants have less density than water and two different polarities, so they float to the surface for the oil displacement test and will be in competition with the latter to the surface occupation [9].

Micelles are formed when hydrophobic portions unable to form hydrogen bonds in aqueous phase, unite and move towards the center leaving the hydrophilic portions outward, oil molecules were trapped in a pseudohydrophobic phase formed by micelles caused by biosurfactants which increase the solubility of hydrophobic compounds [23].

Surface tension of the supernatants was measured function to the concentration of biosurfactants excreted in order to have the surface activity of *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5. Surface tension of the nutrient broth (5.66 mN/m) is rapidly decreased because of the high biosurfactants.

3.2. Critical micelle concentration (CMC)

Figure 5 represents the surface tension in function of biosurfactant concentration. The surface tension decreases exponentially until reaching a minimum of 40.06 mN/m, for a biosurfactant concentration greater than or equal to 35 mg/L. The CMC value is consistent with the reported values (27 - 54 mg/L) for rhamnolipid [24].

For the CMC, rhamnolipids concentration from which the surface tension value begins to be stable is 35 mg/L.

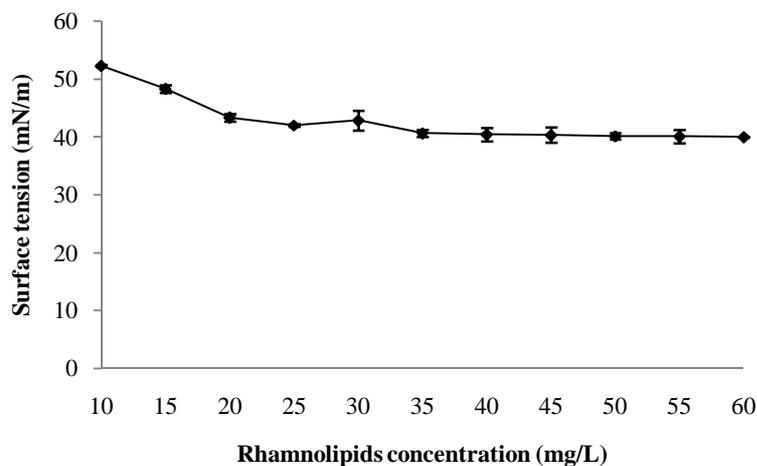


Fig. 5. Surface tension vs. concentrations of rhamnolipids

3.3. HPLC analysis

After HPLC and comparison with the standards (Figure 6), the two major detected rhamnolipids correspond to monorhamnolipid (Rha C10-C10) and dirhamnolipid (Rha-Rha C10-C10). As reported by Wei et al. [10] and Maier and Soberon-Chavez (2000) [25], L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL1) and L-rhamnosyl L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (RL2) are the two most types of rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* species.

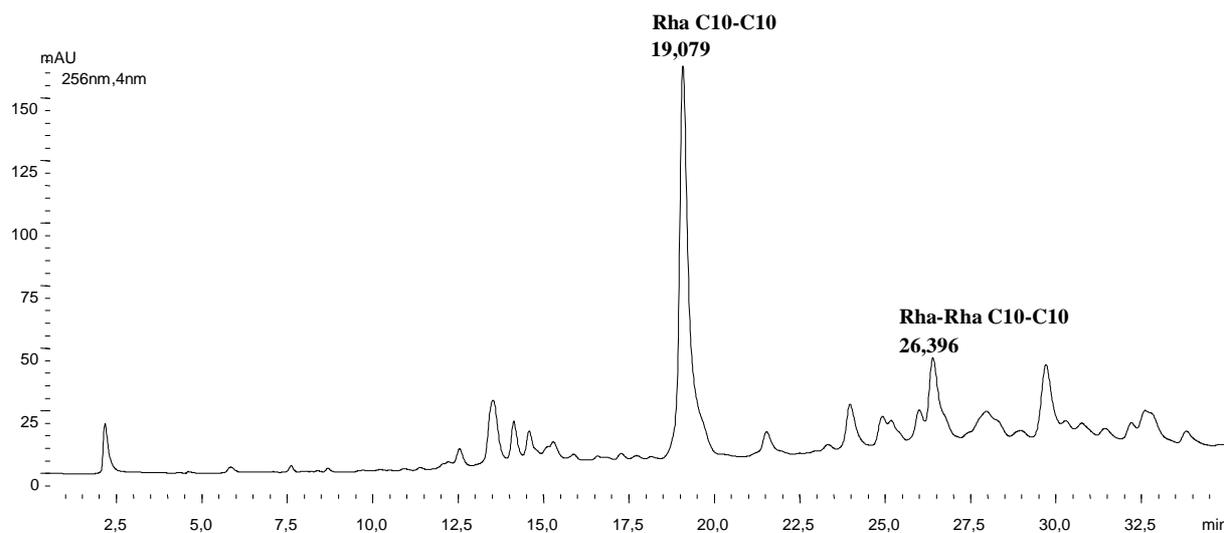


Fig. 6. HPLC chromatogram of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5

3.4. Rhamnolipids sorption

The effective CMC is slightly greater than that obtained CMC because once the biosurfactant brought into contact with soil, the surfactant adsorbs to the matrix and thus becomes less effective, the monomers will tend to sorb to soil rather than to form micelles. The surfactant sorbed fraction after 24 h was 14.28 %. In fact, loss of biosurfactant was estimated to be 5 mg/L during the study period, the adsorption was carried out at a rhamnolipids concentration equal to 35 mg/L which corresponds to the biosurfactant CMC from which micelles are formed and therefore the effective CMC is 40 mg/L.

3.5. Metals distribution and physico-chemical characterization of the soil

The characteristics of the used soil are summarized in table 1. Concentrations of Cu, Ni and Pb are undetectable by AAS because of their scarce presence, Cd ions presents 0.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and Zn with 4.02 mg/kg presents the highest metal concentration level in this soil.

The pH value shows that it is a neutral soil. Particle size analysis shows that the predominant fraction is slit (40 %), sand and clay are 30 % for each fraction. The soil is classified as sandy clay loam as the textural triangle [26]. This allows to better assess of mechanisms involved in geochemical distribution of heavy metals such as adsorption on the surface of clay minerals, precipitation with carbonate or complexations with organic matter.

The dosage of the exchangeable cations led to highlight the predominance of calcium

(86.85 %), indicating that the soil tends to be neutral or alkaline, which is verified by measuring the pH (7.16).

Clays are silicates which have a laminated structure (phyllosilicates), or fibrous (such as sepiolite or palygorskite). There are three main families of clay which are classified by the number of tetrahedral and octahedral layers that make up their sheets. The interstices between the layers may contain water molecules or ions. Clay minerals have large surface areas and large cation exchange capacity. The clays can therefore retain a significant amount of heavy metals by adsorption. Carbonate dissolution plays an important role in controlling the soil pH. A high carbonate content raises the soil pH. Carbonates may incorporate metal cations in their crystal lattice [27].

Table 1. General characteristics of the studied soil

Parameters	Range
<i>Major mineral elements (mg/kg)</i>	
Fe	0.65
Mn	1.07
Zn	4.02
Cu	< 0.05
<i>Minor mineral elements ($\mu\text{g}/\text{kg}$)</i>	
Cd	0.83
Co	0.71
Cr	0.7
Ni	< 0.01
Pb	< 0.01
<i>Other parameters (%)</i>	
Soil pH	7.16
Total carbon	2.46
Total limestone	22.4
Active limestone	17.5
Silt (%)	40
Clay	30
Sand	30
<i>Exchangeable cations (Meq/100 g)</i>	
Ca ⁺²	31.72
Mg ⁺²	3.48
Na ⁺²	1.1
K ⁺²	0.22

The surface hydroxyl groups can be formed by hydration, this allows the adsorption of metal cations [28]. Being good adsorbents, oxides and hydroxides metal in soils also play an important role in the retention of metal ions. The amount of adsorbed ions strongly depends on the pH of the medium.

3.6. Influence of the pulp pH

Washing soil by flotation was studied for the removal of Zn and Cd from polluted soil after grinding size fractions greater than 250 μm . This mechanical preparation allow the treatment of all contaminated fractions of any size, by obtaining an appropriate particle size for the flotation process and increase liberation degree of mineral float's phases [29].

The collector is a surfactant (rhamnolipid) which attached the surfaces of minerals (by physical adsorption or chemo-sorption) and produce a hydrophobic surface or enhance the hydrophobicity of the mineral phase to allow its flotation. The choice of using an anionic biosurfactant (rhamnolipids) is based on the results achieved by Aşçı et al. [1] and Dermont et al. [17] who shown that the use of an anionic surfactant gives better rate of metal removal. The anionic biosurfactant such as rhamnolipid carries a negative charge, so when the molecule encounters a cationic metal such as Zn or Cd that carries a positive charge, an ionic bond is formed. This bond is stronger than the metal's bond with the soil [30].

Flotation tests were carried out at alkaline pH as the collectors improved better stability at high pH [31].

Figure 7 shows Zn remediation by flotation using rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5, characterized by proportional change of CF of Zn depending on its concentration in the foam which was 8.06 (CF) at pH = 8 and which increased by 15.26 % (CF = 9.29) at pH = 12. A proportional change of CF of Cd depending on its concentration in the foam which was 7.56 (CF) at pH = 8 and which increased by 180.42 % (CF = 21.2) at pH = 12 (Figure 8).

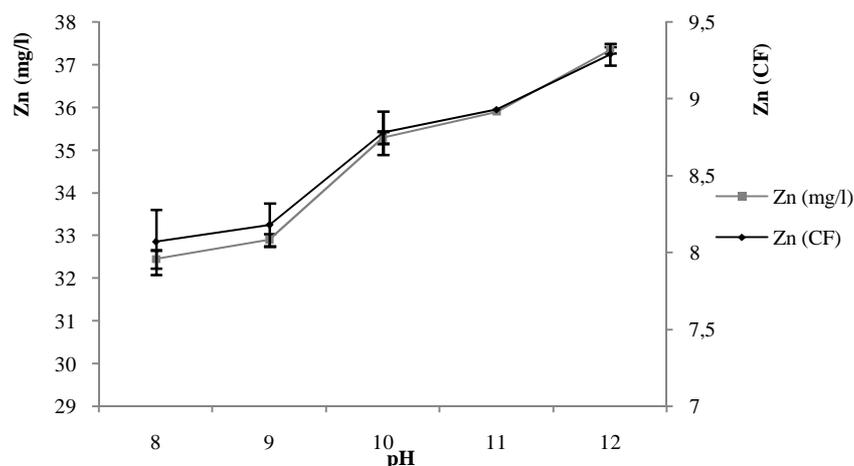


Fig. 7. Influence of the pulp pH on Zn flotation using rhamnolipids

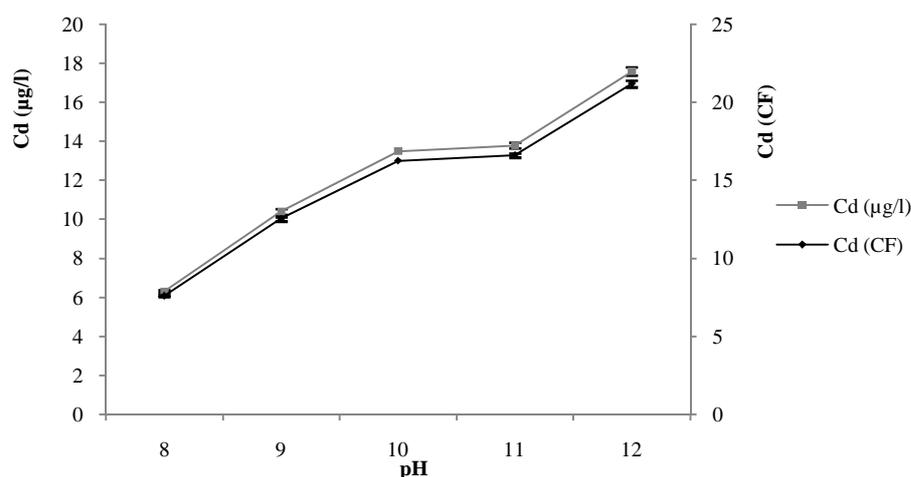


Fig. 8. Influence of the pulp pH on Cd flotation using rhamnolipids

The effect of pH (8 to 12) of the pulp was evaluated using 40 g/L of rhamnolipids, showing its influence on the flotation process. Thus, an important mobilization rate of Zn and Cd was observed which increases with increasing pH from 8 to 12. The results of mobilization rate according to the increase of pH (8 to 12) obtained in this study join those obtained by Dermont et al. [17] with a higher Zn and Cd recovery at pH 8–11.

3.7. Influence of sulfidization step

The base-oxide minerals (or oxidized minerals) like zinc and Cd are more difficult to float, than their sulfide mineral form [32, 21]. Sulfidizing agents such as Na_2S are frequently used

to produce a sulfide surface. The combination of sulfidization and flotation has been investigated for soil washing applications, because of the heterogeneity of mineralogical forms of metal contaminants in the contaminated soil [17].

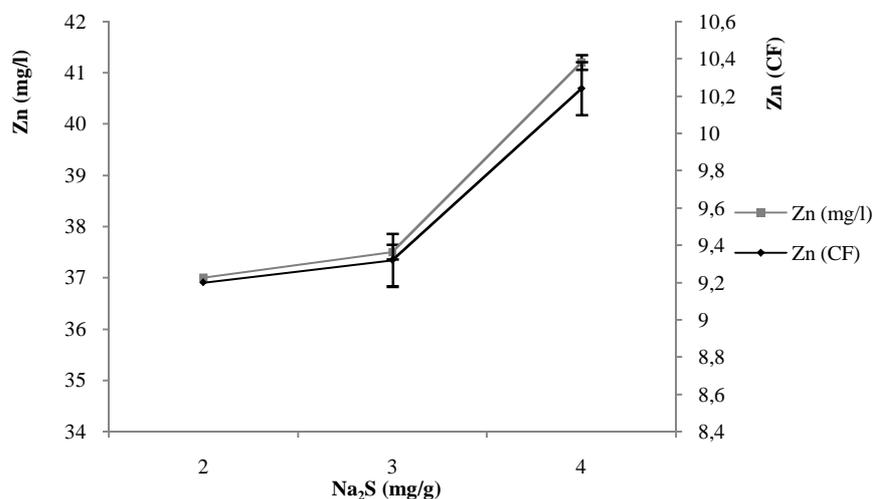


Fig. 9. Na₂S effect on Zn flotation at pH = 12 in rhmanolipids presence

As shown in figure 9, the pre-treatment by sulfidization (Na₂S) increased Zn remediation, and the proportional CF of Zn depending on the concentration of Zn in the foam shows a mobilization rate of Zn which increases with the elevation of Na₂S concentration (2 to 4 mg/g), which was 9.2 (CF) at [Na₂S] = 2 mg/g and increased by 11.30 % (maximum CF = 10.24) at [Na₂S] = 4 mg/g. These experimental results could be mainly explained by Zn presence in sulfide forms (ZnS).

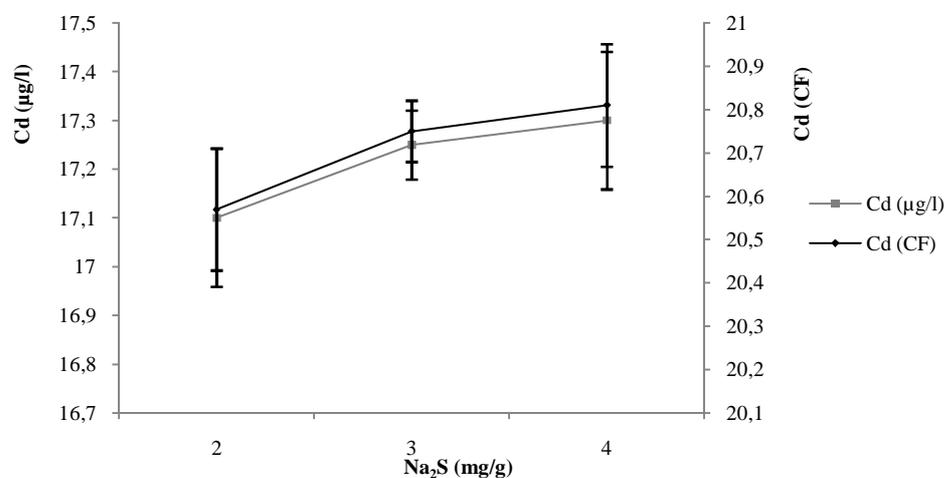


Fig. 10. Na₂S effect on Cd flotation at pH = 12 in rhmanolipids presence

The addition of a sulfidization step did not cause a significant change in Cd recovery (Figure 10). Na_2S addition seems theoretically attractive, but in practice it suffers from several disadvantages: the different oxide minerals respond differently to sulfidization [33, 34]. Furthermore, the metal removal efficiency using a sulfidization step is low, compared to flotation process, this without chemical activation [35, 36].

3.8. Influence of flotation time

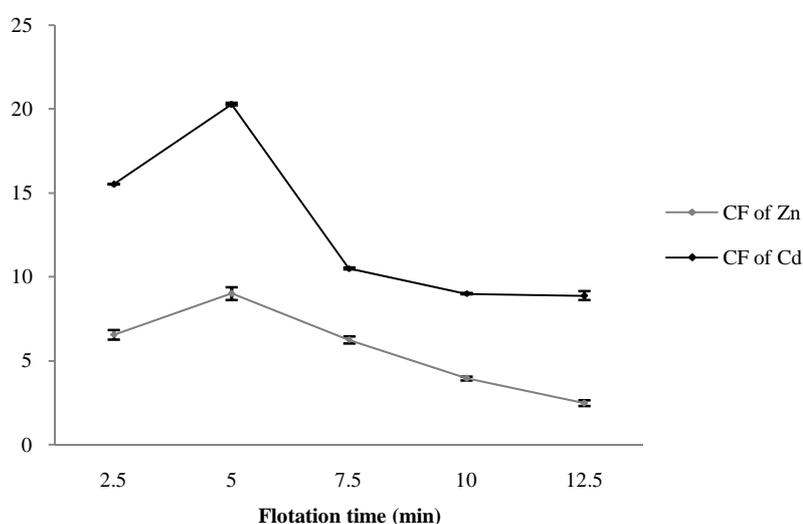


Fig. 11. Concentration factors of Zn and Cd vs. flotation time. Flotation parameters: 40 mg/L of rhamnolipids, 4 mg/g of Na_2S and pH 12

Figure 11 shows that the concentration factor of Zn and Cd increased until 5 min since the beginning of the flotation, with a raise from 6.54 to 9 between 2.5 min and 5 min (an increment of 37.61 %). For the last period (5–12.5 min), CF of Zn decreased from 9 to 2.46 (a loss of 72.66 %).

A raise from 15.54 to 20.3 of the CF of Cd was observed between 2.5 min and 5 min (an increment of 30.63 %). For the last period (5–12.5 min) (Figure 11), the CF of Cd decreased from 20.3 to 8.88 (a loss of 56.25 %).

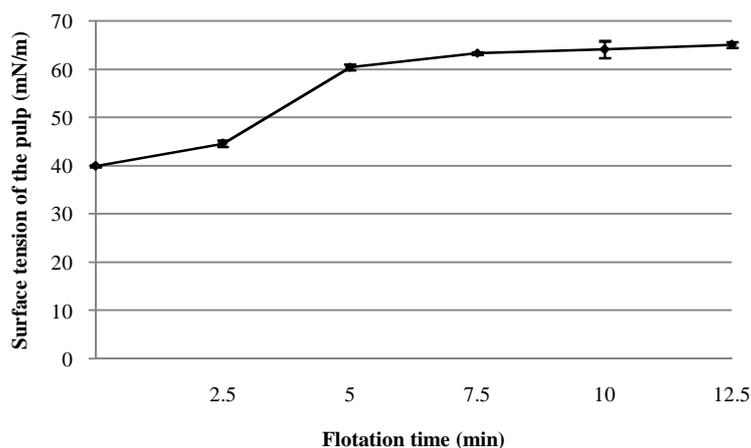


Fig. 12. Surface tension (mN/m) of the pulp vs. flotation time

Figure 12 illustrates an increase of the surface tension of pulp from T_0 to 5 min (40 to 60.46 mN/m) followed by a constant surface tension for the flotation time above 5 min, which can be explained by rhamnolipids loss (movement from the pulp to the froth), thus Zn and Cd recovery from the contaminated soil by flotation (after 5 min) seems to be entirely due to mechanical entrainment, which is also reliable with Vanthuyne and Maes [36] and et al. findings [17].

4. CONCLUSIONS

The efficiency of Zn and Cd ions removal by rhamnolipids from soil systems will depend largely on the soil texture, structure, clay content and cations exchange capacity. Soil-washing technology provides rhamnolipids as a reliable solution for the remediation of heavy metal impacted soils. During this study, the chemical activation and the pH of the pulp significantly influenced the Zn ions recovery. However, the chemical activation does not caused significant Cd recovery. Effectiveness of this batch operation using rhamnolipids is strongly affected by the flotation time. In conclusion, the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5 were a kind of preferable surface-active substance, having potential application in bioremediation of various soil contaminants.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this paper thank Mr. SELOUANI M.M. (Biology department, faculty of

science, University of Sidi Bel Abbess, Algeria) and Mr. REGUIG O. (Biology department, faculty of science, University of Relizane, Algeria) for their critical support and precious help.

6. REFERENCES

- [1] Aşçı Y, Nurbaş M, Sağ Açikel Y. A comparative study for the sorption of Cd (II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd (II) using rhamnolipid biosurfactant. J. Hazard. Materials, 2008, 154, 663–673.
- [2] Alumaa P, Steinnes E, Kırso U, Petersell V. Heavy metal sorption by different estonian soil types at low equilibrium solution concentrations. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem, 2001, 50, 104–115.
- [3] Markiewicz-Patkowska J, Hursthouse A, Przybyła-Kij H. The interaction of heavy metals with urban soils: sorption behavior of Cd, Cu, Cr, Pb and Zn with a typical mixed brownfield deposit. Environ. Int, 2005, 31, 513–521.
- [4] Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. Eng. Geol, 2001, 60, 193–207.
- [5] Wang S, Mulligan C N. An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. Chemosphere, 2004, 57, 1079–1089.
- [6] Mulligan C N. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut, 2005, 133, 183–198.
- [7] Wan J, Chai L, Lu X, Lin Y, Zhang S. Remediation of hexachlorobenzene contaminated soils by rhamnolipid enhanced soil washing coupled with activated carbon selective adsorption. J. Hazard. Materials, 2011, 189, 458–464.
- [8] AFNOR. Qualité des sols, Recueil des normes françaises. AFNOR Edition, 1994, 250.
- [9] Bendaha M E-A, Meddah B, Belaouni H A, Tirtouil A. Isolation and biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* S7PS5. J. Chem. Pharm. Res, 2015, 7, (10), 413–422.
- [10] Wei Y H, Chou C L, Chang J S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. Biochem. Eng. J, 2005, 27, 146–154.

-
- [11] Jain D K, Thompson D L C, Lee H, Trevors J T. A drop collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J. Microbiol. Meth*, 1991, 13, 271–279.
- [12] Morikawa M, Daido H, Takao T, Murata S, Imanaka T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol*, 1993, 175, 6459–6466.
- [13] Paraszkievicz K, Kanwal A, Długonski J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J. Biotechnol*, 2002, 92, 287–29.
- [14] Zajic J E, Seffens W. Biosurfactants. *C.R.C. Crit. Rev. Biotechnol*, 1984, 1, (2), 87–107.
- [15] Chen C C, Riadi L, Suh S J, Ohman D E, Ju LK. Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation. *J. Biotechnol*, 2005, 117, 1–10.
- [16] Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, Zhang N, He B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil containing waste water. *Process Biochem*, 2009, 44, 302–308.
- [17] Dermont G, Bergeron M, Richer-Lafèche M, Mercier G. Remediation of metal-contaminated urban soil using flotation technique. *Sci. of Total Envir*, 2010, 408, 1199–1211.
- [18] Dermont G. Sols pollués par les métaux lourds résultant de l'enfouissement de déchets industriels (Montréal, Canada), Géochimie, spéciation des métaux, et décontamination par flottation, Dissertation. University of Quebec, Canada, 2008.
- [19] West C C, Harwell J H. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol*, 1992, 36, (12), 2324–2330.
- [20] Herrera-Urbina R, Sotillo F J, Fuerstenau D W. Effect of sodium sulfide additions on the pulp potential and amyl xanthate flotation of cerussite and galena. *Int. J. Miner. Process*, 1999, 55, 157–170.
- [21] Rashchi F, Dashti A, Arabpour-Yazdi M, Abdizadeh H. Anglesite flotation: a study for lead recovery from zinc leach residue. *Miner. Eng*, 2005, 18, 205–12.
- [22] Candrasekaran E V, Bemiller J N. Constituent analyses of glycosamino-glycans, In: methods in carbohydrate chemistry. New York: Academic Press, 1980.

-
- [23] Bai G, Brusseau M L, Miller R M. Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilization and mobilization of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *J. Contam. Hydrol.*, 1998, 30, 265–279.
- [24] Miller-Maier R M, Bodour A A. Application of a modified dropcollapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Method*, 1998, 32, 273–280.
- [25] Maier R M, Soberon-Chavez G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54, 625–633.
- [26] Baize D. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Paris : INRA Editions, 1997, 408.
- [27] Bourg C M. Metal in aquatic and terrestrial systems: sorption, speciation and mobilisation. In *Chemistry and biology of solid waste*, Springer, New York, USA, 1988.
- [28] Bourg, C M. Modélisation du comportement des métaux traces à l'interface solide-liquide dans les systèmes aquatiques, dissertation. University of Bordeaux 1, France. 1983.
- [29] Bouchard, S. Traitement du minerai: Flottation. In *Méthodes physiques, le Griffon d'argile*, ISBN 2-89443-156-2. Canada, Montreal, 2001.
- [30] Frazer L. Innovations, lipid lather removes metals. *Environ. Health Perspect*, 2000, 108, 320–323.
- [31] Fuerstenau C. Froth flotation: a century of innovation, Society for Mining, Metallurgy, and Exploration (SME), Littleton, USA, 2007.
- [32] Rao S R, Leja J. Surface chemistry of froth flotation. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004.
- [33] Shen W Z, Fornasiero D, Ralston J. Flotation of sphalerite and pyrite in the presence of sodium sulfite. *Int. J. Miner. Process*, 2001, 63, 17–28.
- [34] Newell A J H, Skinner W M, Bradshaw D J. Restoring the floatability of oxidised sulfides using sulfidisation. *Int. J. Miner. Process*, 2007, 84, 108–17.
- [35] Venghaus T, Werther J. Flotation of a zinc-contaminated soil. *Adv. Environ. Res*, 1998, 2, 77–91.
- [36] Vanthuyne M, Maes A. The removal of heavy metals from contaminated soil by a

combination of sulfidisation and flotation. *Sci. Total. Environ*, 2002, 290, 69–80.