

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

BELAREF Sara et FACI Dounia

Thème

Techniques de criblage des bactéries productrices des biosurfactants et méthodes de caractérisation de ces biomolécules

Soutenu le : 07 /09 / 2020

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. OURADI-IDDIR Linda

MAA.

Univ. de Bouira

Présidente

Mme MOURI-HADIDI Lila

MAB.

Univ. de Bouira

Examinatrice

Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa

MCB.

Univ. de Bouira

Promotrice

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir aidé à réaliser ce travail.

Nous remercions très chaleureusement notre promotrice Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa, Maître de conférences B à l'université de Bouira, qui a accepté de superviser ce travail et surtout qui nous a encouragé, aidé et guidé avec ses précieux conseils et sa disponibilité pour nous avoir dirigé et accomplir ce travail, et sa confiance tout au long de ce travail pour puisse avoir ce jour.

Nos sincères considérations et nos vifs remerciements vont également aux membres du jury: Mme OURADI-IDDIR Linda Maître Assistant A à l'université de Bouira, qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, Mme MOURI-HADIDI Lila Maître Assistant B à l'université de Bouira, pour avoir accepté d'examiner de ce mémoire.

Nous remercions le chef de département de biologie, tous les enseignants de notre spécialité Biotechnologie microbienne qui nous ont enseigné durant le cursus universitaire, et tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Bouira qui ont contribué à notre formation.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci à tous

Dédicaces



De tous mes sentiments je tiens tout d'abord à dédier cet humble travail qui est le fruit qui exprime ma profond amour, respect et reconnaissance à :

Mon bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

A mes très chers parents puisse dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A la personne la plus chère, et la plus douce lequel j'ai vécu les plus beaux moments de ma vie, ma mère qui m'a appris la confiance en moi, qui m'aide tout un long chemin d'étude et me motive pour que j'atteigne ce niveau. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours.

A mon cher papa, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices, et tous les efforts que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

A mon frère et mon fiancé qui sont toujours encouragés à étudier, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je tiens à remercie ma binôme Sara, mon amie Sonia.

Je remercie tout les professeurs du primaire jusqu'à l'enseignement supérieur, et surtout la professeure la plus douce Mme YALAOUI-GUELAL qui nous avons eu le grand plaisir de travailler sous sa direction, et nous avons trouvé auprès d'elle le conseil et le guide qui nous ont reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance, et sans oublier la promotion de biotechnologie microbienne, ma zème famille.

Dounia

Dédicace



Je tiens tout d'abord à remercier le bon dieu de m'avoir aidé à réaliser ce mémoire.

Je dédie ce travail :

A la source de tendresse qui a fait disparaître mes malheurs avec ses prières, qui n'a jamais cessé de m'encourager et de ménager ses efforts pour que j'atteigne ce niveau. Mon paradis ma chère maman.

A vrai sens de la sécurité et de force, qui m'a donné sa pleine confiance et liberté pour réaliser mes rêves à mon cher père.

A mes précieux trésors, mes frères et mes sœurs.

A mon binôme Dounia qui m'a accompagnée tout au long de la réalisation de ce mémoire et pour la durée de notre amitié.

A celle qui m'a appris l'alphabet et écrit avec lui tu es mon modèle, lui qui a un cœur tendre, un esprit intelligent et une morale vertueuse. A mon premier professeur Madame Djillali-Sid Ahmed Djamila.

A celle qui a sacrifié son temps et ses efforts et m'a appris le sens du dévouement au travail, notre étoile brillante Madame Yalaoui-Guellal Drifa. Cela m'accroît l'honneur que j'ai appris de ses mains et elle attribue mon succès, et a chaque professeur qui nous a enseigné et a implanté des principes de bonté et de connaissance dans nos cœurs avant nos esprits. A toute ma famille et mes amis.

Sara

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste d'abréviations

Introduction.....01

Chapitre I : Généralités sur les biosurfactant.....03

I.1. Définition des surfactants.....03

I.2. Définition des biosurfactants.....03

I.3. Origine des biosurfactants03

I.4. Structure des biosurfactants.....03

I.5. Types et classification des biosurfactants.....05

 I. 5. 1. Selon le poids moléculaire.....06

 I. 5. 2. Selon la structure chimique.....06

I.6. Potentialité des biosurfactants.....07

 I. 6.1. Activité superficielle et inter-faciale.....07

 I. 6. 2. Tolérance à la température, au pH et à la force ionique07

 I. 6. 3. Biodégradabilité08

 I. 6. 4. Faible toxicité.....08

 I. 6. 5. Spécificité08

 I. 6. 6. Biocompatibilité et digestibilité08

 I. 6. 7. Disponibilité.....08

 I. 6. 8. La production à grande échelle de biosurfactants.....08

I.7. Applications industrielles des biosurfactants08

 I. 7. 1. Biomédical09

 I. 7. 2. Bioremédiation.....09

 I. 7. 3. Chélation des métaux lourds.....09

 I. 7. 4. Industries alimentaires.....09

 I. 7. 5. Agriculture.....09

Chapitre II : Méthodes de criblage des souches productrices de biosurfactant11

II.1 La production de biosurfactant.....11

 II. 1. 1. Les microorganismes producteurs de biosurfactant11

 II. 1. 2. Mécanisme de production du biosurfactant12

II. 1. 3. Techniques de production des biosurfactants	13
II. 1. 4. Les facteurs affectant la production des biosurfactants	14
II.1. 4. 1. Facteurs nutritionnels.....	14
II.1. 4. 2. Facteurs environnementaux.....	15
II. 2. Isolement de bactéries productrices de biosurfactants	17
II. 2. 1. Technique de mesure la production de biosurfactant	17
II.2. 1. 1. Test d' hydrophobicité de la surface cellulaire.....	18
II.2. 1. 2. Activité hémolytique.....	18
II.2. 1. 3. Tension de surfaces.....	18
II.2. 1. 4. Test de déplacement d'huile.....	19
II.2. 1. 5. Test d'indice d'émulsification (E_{24}).....	20
II. 2. 2. Techniques d'identification des bactéries	20
II.2. 2. 1. Identification morphologique	20
II.2. 2. 2. Identification biochimique	21
II.2. 2. 3. Identification phylogénique.....	24
Chapitre III : Extraction, purification et caractérisation des biosurfactants	27
III.1. Extraction des biosurfactants.....	27
III.1.1. Précipitation acide.....	27
III.1.2 Extraction par solvant	27
III.2. Les différentes techniques de caractérisation des biosurfactants	28
III.2.1. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	28
III.2.2. Identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF	30
III.2.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	33
III.2.4. Caractérisation par GC/MS	35
III.2.5. Caractérisation par LC – MS / MS.....	37
Conclusion	39
Référence bibliographique.....	41
Annexes	51
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Divers biosurfactants produits par des micro-organismes	12
Tableau 2 : Tableau interprétatif des scores de corrélation.....	32
Tableau 3 : Composition des biosurfactants produits par <i>Natrinema</i>	37

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique d'un surfactant.....	04
Figure 02 : Partage des tensioactifs (micelles) entre un milieu gras et un milieu aqueux.....	04
Figure 03 : Différents types de tensioactifs.....	05
Figure 04 : Représentation schématique d'un halo émulsifié de biosurfactant.....	19
Figure 05 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644 (KU680815) au GenBank.....	26
Figure 06.1 : Analyse par CCM du rhamnolipide produit pendant la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR01.....	29
Figure 06.2 : Chromatographie sur couche mince (CCM) du biosurfactant obtenu à partir de <i>Bacillus subtilis</i> CN2.....	30
Figure 07 : Schématisation du principe MALDI TOF (BRUKER).....	31
Figure 08 : Spectre de spectrométrie de masse par (MALDI-TOF) du biosurfactant purifiée obtenu à partir de <i>Bacillus pumilus</i> DSV18	32
Figure 09 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un spectromètre FTIR.....	33
Figure 10 : Spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) du biosurfactant produit par <i>Bacillus circulans</i>	35
Figure 11 : Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par <i>Natrinema</i>	36
Figure 12 : Spectre LC – MS / MS de lipopeptide élue avec un temps de rétention de 0,54 min.....	38

Liste des abréviations

ACN: Acétonitrile.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr 16S: sous-unité 16S de l'ARN ribosomal.

B: *Bacillus*.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BS: Biosurfactant.

C: Carbone.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CTAB : Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide.

C_xH_y : x en carbone et y en hydrogène (formule chimique des hydrocarbures).

E₂₄ : Index d'émulsification après 24heures.

EDTA: Acide éthylène diamine Tétracétique.

FAME : Fatty Acid Methyl Esters.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier transformin frared spectroscopy).

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

He : Hauteur de l'émulsion.

Ht : Hauteur totale.

HCl : Chlorure d'hydrogène.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance (High Pressure Liquid Chromatography).

IR : Infra Rouge.

KBr : Bromure de potassium.

LB : Luria Bertani.

LC-MS/ MS : Spectrométrie de masse en tandem couplée à une analyse par chromatographie liquide.

MALDI-TOF/MS : Spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser assistée par matrice-temps (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry).

MH : Mueller Hinton.

MR-VP : Methyl Red-Voges Proskauer.

MS : Spectrométrie de Masse (Mass Spectrometry).

MSM : Milieu Minimum Salé (Mineral Salt Medium).

N : Azote.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

P. : *Pseudomonas*.

PCR : Reaction de Polymerisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction).

PDA : Phényène Diamine Oxydase (enzyme).

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

TE : Tris-EDTA.

TMS : Tri MéthylSilyle.

TSI: Triple SugarIron.

UPLC : Chromatographie liquide à ultra haute pression (Ultra Performance Liquid Chromatography).

Introduction

Les surfactants sont généralement des tensioactifs d'origine chimique à base de pétrole. La production mondiale actuelle des tensioactifs se chiffre à plus de 03 millions de tonnes par année (Banat *et al.*, 2000).

Ces composés sont considérés comme des agents dangereux pour l'environnement, à cause de leur toxicité et leur fonction non biodégradables.

La préoccupation environnementale croissante concernant les tensioactifs chimiques déclenche l'attention sur des substances alternatives produits par les microorganismes, ce sont les tensioactifs biologiques ou les biosurfactants qui possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, et en raison de leur faible toxicité, et de leur nature biodégradable (Yalaoui-Guellal, 2017).

A cet égard, l'usage des biosurfactants suscite un coût de production important et plus haute (Bognolo, 1999).

La diversité structurelle du biosurfactants (BS) confère une large gamme de propriétés, y compris la capacité à abaisser la tension superficielle et interfaciale des liquides et à former des micelles et des microémulsions entre deux phases différentes (Yalaoui-Guellal, 2017).

Actuellement, de nombreux secteurs industriels ont orienté vers l'emploi des BS en raison de leur biocompatibilité avec le milieu naturel, et qui possèdent des propriétés intéressantes comme émulsifiants, moussage, mouillage, solubilisant (Campos *et al.*, 2013).

De manière générale, plusieurs microorganismes tels que les bactéries, les levures, et les champignons durant leurs croissances sur des substrats hydrophobes renouvelables, différents, et peu coûteux, synthétisent des BS qui dépendent de ces organismes.

Ces composés amphiphiles d'origine microbiennes sont classés selon leurs poids moléculaires, leurs propriétés, et leur mode d'action. Parmi les BS les plus connues les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, etc. (Mouffok *et al.*, 2016).

Dans cette optique, notre travail a été mené pour isoler et identifier les souches bactériennes productrices des biosurfactants d'une part, et de déterminer le profil chimique et biologique de ces biomolécules.

Malheureusement notre travail a été transformé en thème théorique à cause de la situation épidémiologique provoquée par la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) qui tend à

circuler rapidement et évoluer comme en témoignent l'augmentation de l'incidence des cas des personnes contaminées et des mortes dans le monde entier. Pour protéger la santé et empêcher la propagation de cette pandémie, l'Etat algérienne a établi un confinement strict et la fermeture complète des laboratoires universitaires qui nous a privés de faire un thème pratique.

Notre mémoire est structuré en 03 chapitres, le première chapitre représente une description générale sur les biosurfactants (structure, types, classifications...).

Le deuxième chapitre, est réservée à la présentation de la notion de production des biosurfactants, les microorganismes producteurs et déterminer les principaux facteurs qui influences la production de ces biomolécules.

Le dernier chapitre est consacré à la détermination de la méthodologie adoptée pour la caractérisation des biosurfactants par différentes techniques d'analyses comme MALDI TOF-MS, FTIR, GC/MS, CCM...etc.

Enfin, le travail est complété par une conclusion générale, des perspectives, des références bibliographiques et des annexes.

Chapitre I

Chapitre I : Généralités sur les biosurfactants

I-1- Définition des surfactants

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Guergouri, 2010).

Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre les phases fluides (liquides non miscibles) avec différents degrés de polarité et les liaisons hydrogènes telles que les interfaces huile/eau ou air/eau. Ces propriétés rendent les tensioactifs capables de réduire la tension superficielle et interfaciale et de former des microémulsions où les hydrocarbures qui peuvent se solubiliser dans l'eau ou l'eau peut se solubiliser dans les hydrocarbures (Desai et Banat, 1997).

I-2- Définition des biosurfactants

Les biosurfactants (ou surfactant biologique) sont un groupe structurellement diversifié de molécules surfaciales (relatif à la face) ou superficielle synthétisées par des micro-organismes. Ces molécules réduisent les tensions superficielles et interfaciales dans les solutions aqueuses (Figure 01) et les mélanges d'hydrocarbures (Desai et al., 1997 ; Banat et al., 2000).

I-3- Origine des biosurfactants

Une alternative à l'utilisation d'agents tensioactifs chimiques est l'emploi de biosurfactants. Ces molécules comportent les mêmes caractéristiques intéressantes qu'on observe chez les surfactants synthétiques, mais elles sont issues de microorganismes comme des bactéries, les levures ou mêmes des mycètes. Ces microorganismes vont souvent produire un type de biosurfactants qui est propre à leur genre ou même à leur espèce (Dubeau, 2009).

I-4- Structure des biosurfactants

Leur structure est dépend du type de microorganisme, de la nature de substrat, et des conditions de production.

Généralement, la structure des biosurfactants comprend une fraction hydrophile (soluble dans l'eau) composée d'acides aminés ou de peptides, d'anions ou de cations, ou de mono-, di- ou poly-saccharides, et une autre fraction hydrophobe non polaire (soluble dans

l'huile) qui est souvent constituée d'acides gras saturés, insaturés ou hydroxylés, ou composée de peptides amphiphiles ou hydrophobes (Banat, 1995).

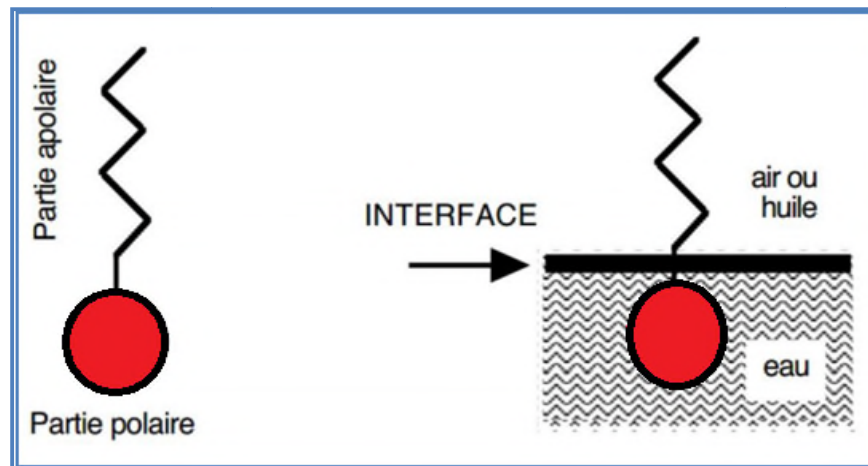


Figure 01 : Représentation schématique d'un surfactant et de son positionnement à l'interface (Hadj, 2013).

En effet, dans les micelles, les parties hydrophobes se regroupent vers le centre, et les portions hydrophiles restent en contact avec l'eau (Figure 02).

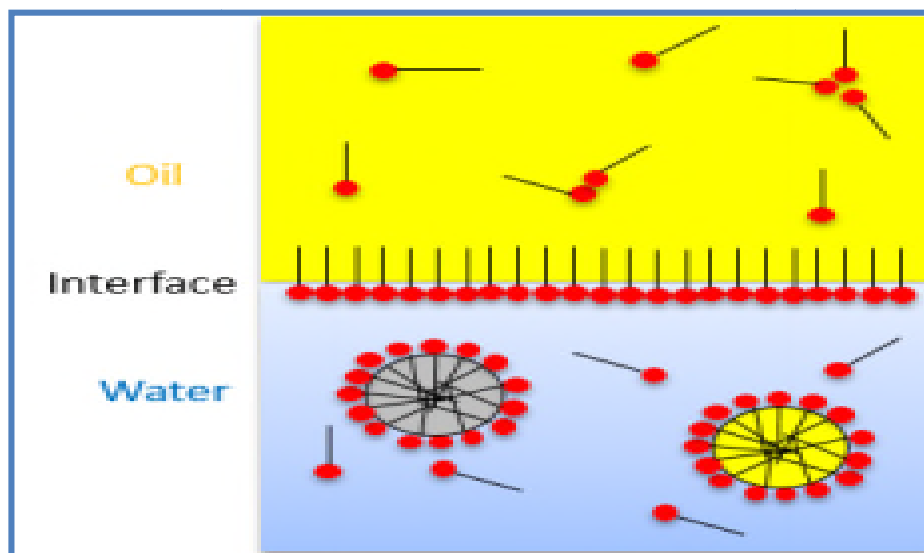


Figure 02 : Partage des tensioactifs (micelles) entre un milieu gras et un milieu aqueux (Hutin, 2019).

I-5- Types et classification des biosurfactants

Les tensioactifs peuvent être classés en fonction de la nature de la charge sur la partie polaire (Figure 03).

* Les tensioactifs anioniques sont chargés négativement.

* Les tensioactifs non ioniques manquent de constituant ionique et la majorité de tous les non-ioniques sont des produits de polymérisation.

* Les tensioactifs cationiques sont caractérisés par un groupe qui est chargé positivement.

*Dernièrement, le tensioactif amphotère (zwitterioniques) a des fragments chargés positivement et négativement dans la même molécule (Pattanathu *et al.*, 2008).

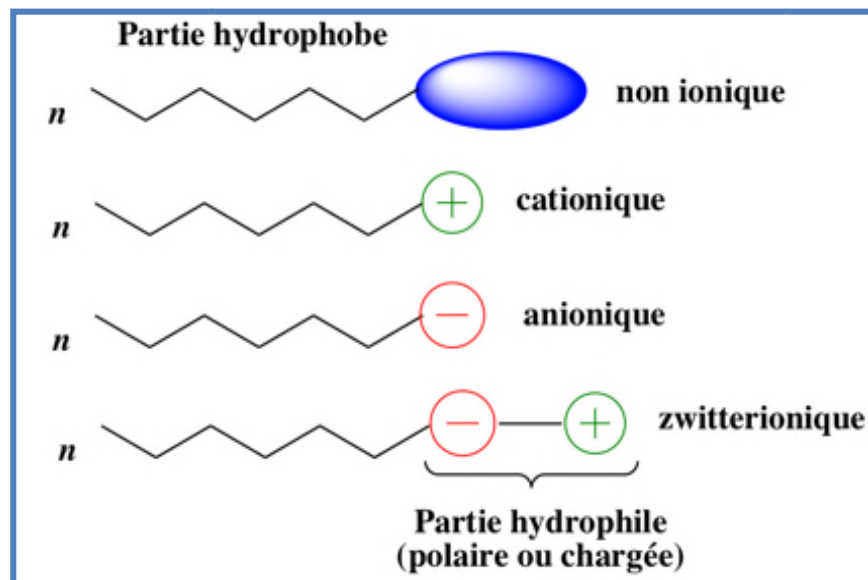


Figure 03: Différents types de tensioactifs (Kara, 2017).

Contrairement aux tensioactifs chimiques, les biosurfactants sont généralement classés principalement par leur composition chimique et leur origine microbienne (Kedidi, 2014). Les biosurfactants couvrent donc une vaste gamme de poids moléculaires (Dubeau, 2009).

D'après Ron et Rosenberg (2002), Banat *et al.* (2010) ont classés les biosurfactants en deux classes.

I-5-1- Selon le poids moléculaire

a. Faible poids moléculaire

Il comprend des molécules ou des composés appelés biosurfactants qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et interfaciale, tels que les glycolipides dans lesquels les glucides sont liés à un acide aliphatique à longue chaîne, lipopeptides, phospholipides.

b. Polymère de Haut poids moléculaire

Ils sont appelés collectivement bio-émulsines ou des bio-émulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces. Ces derniers sont des polymères amphiphiles et polyphiles qui sont généralement plus efficaces dans les émulsions stabilisantes l'huile dans l'eau, tel que les polysaccharides, lipopolysaccharides des protéines ou lipoprotéines (Kappeli et Finnerty, 1979).

I-5-2- Selon la structure chimique

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue Cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres (Wise, 1997).

a. Les glycolipides

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acide aliphatique ou d'acide hydroxyaliphatique. Les bio-émulsifiants glycolipides les plus étudiés sont : les rhamnolipides, les lipides tréhalose et les sophorolipides (Ron et Rosenberg, 2002).

b. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont particulièrement intéressants en raison de leurs activités de surface élevées (Rodrigues et al., 2006) et de leur potentiel antibiotique contre diverses bactéries, algues, champignons et virus. Ceux-ci consistent en un lipide attaché à une chaîne polypeptidique (Vijayakumar et Saravanan, 2015). Parmi ces biosurfactants les plus puissants est la surfactine (lipopeptide cyclique) produit par *Bacillus subtilis*.

c. Les phospholipides

Les phospholipides sont formés de groupement alcool et phosphate et de chaîne lipidique (Wise, 1997). Bien qu'ils soient présents dans les émulsions dans l'huile. Pour chaque micro-organisme, il existe très peu d'exemples de production extracellulaire (Bognolo, 1999).

d. Lipopolysaccharides ou polymériques

Les biosurfactants polymères sont des biosurfactants de haut poids moléculaire ont un squelette de trois ou quatre sucres répétés avec des acides gras attachés aux sucres. Les biosurfactants polymères les mieux étudiés sont les émulsanes. L'émulsane est un émulsifiant extracellulaire soluble dans l'eau produit par les bactéries (Bognolo, 1999).

e. Les lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités de ces tensioactifs lors de leur croissance, par exemple le phosphatidyléthanolamine qui est produit à partir d'*Acinetobacter sp.* et forme des microémulsions dans l'eau (Shoeb et al., 2013).

I-6- Potentialité des biosurfactants

Des recherches ont montré que les biosurfactants sont très importantes dans l'évaluation des performances et la sélection des micro-organismes susceptibles de produire ces agents. Ils présentent de nombreux avantages par rapport aux tensioactifs synthétisés chimiquement (Pattanathu et al., 2008).

Parmi ces avantages (Sobrinho et al., 2013; Santos et al., 2016) nous citons:

I-6-1- Activité superficielle et interfaciale

Les biosurfactants, produisent une tension superficielle plus faible à une concentration plus faible, démontrant une efficacité et une efficacité supérieure à celles des surfactants conventionnels sont des caractéristiques essentielles d'un bon surfactant.

I-6-2- Tolérance à la température, au pH et à la force ionique

Les biosurfactants peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes.

I-6-3- Biodégradabilité

Les biosurfactants sont facilement dégradés par les micro-organismes dans l'eau ou le sol, ce qui les rend appropriés pour les applications de biorestauration et le traitement des déchets.

I-6-4- Faible toxicité

Ces composés permettent leur utilisation dans divers produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

I-6-5- Spécificité

Dans leurs actions, la détoxification des polluants et leurs applications industrielles.

I-6-6- Biocompatibilité et digestibilité

Qui permettent l'application de biosurfactants dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

I-6-7- Disponibilité

Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières peu coûteuses et disponibles en grande quantité ou des déchets industriels. La source de carbone peut provenir d'hydrocarbures, de glucides et/ou de lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres (Mulligan *et al.*, 2014).

I-6-8- La production à grande échelle de biosurfactants

Les BS sont largement utilisés dans presque tous les secteurs de l'industrie moderne (Banat *et al.*, 2000). Ils peuvent également être produits à partir de déchets industriels et de sous-produits, ce qui est particulièrement intéressant pour la production en vrac (par exemple, pour une utilisation dans les technologies liées au pétrole). A cet effet l'économies de production des BS est acceptables (Mulligan *et al.*, 2014).

I-7- Applications industrielles des biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés chimiques très polyvalents et multifonctionnels en raison de leurs structures et propriétés diverses (Campos *et al.*, 2013). Ces biomolécules peuvent être appliqués dans différents processus industriels tels que :

I-7-1- Biomédical

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des biosurfactants dans le domaine médical ont augmenté. En font des molécules pertinentes comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour des applications dans la lutte contre de nombreuses maladies infectieuses, le soin et la santé publique et sans utilisation de drogues synthétiques et de produits chimiques (Rodrigues *et al.*, 2006).

I-7-2- Bioremédiation

La bioremédiation implique l'accélération des processus biodégradables naturels dans les environnements contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds et dans le traitement des eaux usées en améliorant la disponibilité des matériaux (Banat *et al.*, 2000).

I-7-3- Chélation des métaux lourds

Les biosurfactants anioniques ont la capacité à former des complexes avec des métaux (métal-biosurfactant) pour augmenter la tolérance des bactéries aux métaux lourds pour la biorestauration des sols contaminés par des métaux lourds. Ces complexes sont désorbés de la matrice du sol vers la solution du sol en raison de la baisse de la tension interfaciale. Les micelles des biosurfactants peuvent se lier aux métaux qui mobilisent les métaux dans l'eau (Płociniczak *et al.*, 2011).

I-7-4- Industries alimentaires

les biosurfactants sont utilisés comme émulsifiants dans le traitement des matières premières, dans la viande et dans la vinaigrette (Makkar *et al.*, 2002) et comme additifs alimentaires, utilisés aussi dans l'amélioration de la stabilité de la pâte, du volume, de la texture et de la conservation des produits de boulangerie est obtenue par l'ajout de surfactants rhamnolipides (Kosaric, 2015).

I-7-5- L'agriculture

Les biosurfactants peuvent être utilisés pour éliminer les agents pathogènes des plantes et pour augmenter la biodisponibilité des nutriments pour les microbes associés aux plantes bénéfiques. Jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation des zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) (Hultberg *et al.*, 2008). Ils peuvent être

largement appliqués pour améliorer la qualité des sols agricoles par l'assainissement des sols (Dhara *et al.*, 2013).

L'application des biosurfactants est avantageuse dans d'autres domaines comme :

L'industrie du cosmétique dans les procédés de teinture du textile (Guergouri, 2010). Les BS sont utilisés en raison de leurs propriétés respectueuses de la peau, par exemple les sophorolipides de la souche mutante *Candida bombicola* ont de grandes utilisations dans les industries cosmétiques en raison de leurs propriétés anti-radicalaires, de la stimulation du métabolisme des fibroblastes et des propriétés hygroscopiques pour soutenir une physiologie cutanée saine (Bhardwaj *et al.*, 2013).

L'industrie pétrolière est particulièrement utilisée dans la récupération améliorée du pétrole et pour l'incorporation dans des formulations d'huile, et la mobilisation des boues de pétrole des réservoirs de stockage (Banat *et al.*, 2000).

Le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique (Marqués *et al.*, 2009).

Secteur de la détergence : les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents et représentent en moyenne 20% de leur composition (Hadj, 2013).

Chapitre II

Chapitre II : Méthodes de criblage des souches productrices de biosurfactant

II-1- La production de biosurfactant

Les biosurfactants microbiens sont des produits extracellulaires contenant des groupes hydrophiles et hydrophobes capables de réduire la tension superficielle et de faciliter la dégradation des substrats insoluble comme les hydrocarbures (CxHy), l'absorption et l'émulsification / la dispersion. Ils peuvent améliorer la biodisponibilité des hydrocarbures aux cellules microbiennes par augmentation de la surface de contact au niveau de l'hydrocarbure aqueux / interface. Certaines bactéries et levures produisent des biosurfactants ioniques qui émulsifient le substrat CxHy dans le milieu de croissance (Thavasi, 2009; Mulligan et al., 2014).

L'utilisation des déchets et des produits agricoles comme substrats de la production des biosurfactants est largement étudié et appliqué pour baisser les coûts de production et réduire les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...) (Cameotra et Makkar, 2002).

II-1-1- Les microorganismes producteurs de biosurfactant

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les Rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactine à partir de *Bacillus subtilis*, l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* et sophorolipides de *Candida bombicola* sont quelques exemples d'agents tensioactifs microbiens (Marchant et al., 2012; Mokdad, 2015). Quelques biosurfactants issus de différents microorganismes sont rassemblés dans le tableau 01.

Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, en facilitant le transport et la translocation de substrats insolubles à travers les membranes cellulaires (Sandoval et al., 2000). Les bactéries utilisées pour produire de biosurfactants sont en général issus de sols contaminés par des composés insolubles (hydrocarbures). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de sélectionner les souches productrices de biosurfactants et d'optimiser les

paramètres abiotiques influençant la production (sources de carbone et d'azote, température, salinité, pH,...) (Djihed, 2013).

Tableau 01 : Divers biosurfactants produits par des micro-organismes (Desai et Banat, 1997).

Biosurfactants		Microorganismes
Groupes	Classes	
Glycolipide	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Pseudomonas sp.</i>
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		<i>Nocardia erythropolis</i>
		<i>Mycobacterium sp.</i>
	Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i>
		<i>T. apicola</i>
		<i>T. petrophilum</i>
		<i>Ustilago zaeae, U. maydis</i>
	Lipopeptides et lipoprotéines	Peptides-lipides
Serrawettine		<i>Serratia marcescens</i>
Surfactine		<i>B. subtilis</i>
Gramicidines		<i>B. brevis</i>
Lipides neutres et phospholipides	Lipides neutre	<i>N. erythropolis</i>
	Phospholipides	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Acide gras, lipides neutres et phospholipides	Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersane	<i>A. calcoaceticus</i>
	Hydrates de carbone	<i>P. fluorescens</i>
	Protéine-lipide	<i>Debaryomyces polymorphis</i>
Biosurfactants Particuliers	Vésicules et fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>

II-1-2- Mécanisme de production du biosurfactant

Les microorganismes se sont adaptés en termes d'équipements enzymatiques de régulation pour utiliser deux voies métaboliques: les voies des hydrocarbures et des glucides

comme source de carbone et d'énergie pour leurs croissance (Jemil et al., 2018), et impliqué dans la synthèse des fractions hydrophobe (acide gras à long chaîne, hydroxy-acide gras, alkyl- β -hydroxy-acide gras) et des hydrophiles (glucide, acide carboxylique, phosphate, acide amine, cyclopeptide, alcool) puis sont fusionnés pour former une structure amphipathique (Cameotra et Makkar, 1998).

Les aspects des voies de biosynthèse et la régulation génétique de biosurfactants sont caractérisés par la bonne connaissance de ces voies et de la dépendance au substrat qui améliorerait la structure et les caractéristiques des biosurfactants grâce à une approche de génie métabolique et génétique (Desai et Banat, 1997). Donc, la régulation se fait soit par leur effet sur la solubilisation des substrats hydrocarbonés non polaires, soit par une production accrue de substrats hydrosolubles (polaires). Dans certains cas, la synthèse de BS est régulée par le pH et la température (Muligan et al., 2014).

Les souches les plus étudiées sont *P. aeruginosa*, la biosynthèse des rhamnolipides par ces souches se produit pendant la phase de croissance exponentielle tardive et stationnaire dans des conditions de limitation d'azote ou du fer, à l'intermédiaire d'une rhamnosyltransférase, RhlAB, qui catalyse le transfert du rhamnose du TDP-rhamnose au 13-hydroxydécanoyl. Le 13-hydroxydécanoate a récemment été décrit et un gène régulateur (rhlR) codant pour un transcriptionnel activateur, RhlR a été montré pour réguler positivement la biosynthèse des rhamnolipides (Cameotra et Makkar, 1998; Das et al., 2008).

II-1-3- Techniques de production des biosurfactants (milieux de culture utilisés et type de fermentation)

Pour produire des biosurfactants BS, une combinaison de diverses techniques a été utilisée (Zhang et al., 2012). Tout d'abord la préparation de milieu de culture liquide à base de sels minéraux, milieu minimum (Annexe 01).

Les souches bactériennes ont été isolées et criblés pour la production des biosurfactants. On applique le processus de la fermentation du type batch par l'utilisation de milieu minimum minéral (MSM) de production de biosurfactant, qui a été ajusté à pH 7 et passé par l'autoclave à 121 ° C pendant 20 min (Lee et al., 2018).

La production de biosurfactants a été réalisée dans des erlenmeyers ou des flacons (capacité de 2 Litres), contenant 500 ml de milieu de production MSM qui a été complété par 2% de glucose et 0,1 g/l d'extrait de levure. Le milieu de culture a été inoculé avec 1%

d'inoculum de 24 h. Les flacons ont été maintenus à moins de 150 tr/min d'agitation orbitale à 30 ° C pendant 7 jours. Par la suite les moûts de fermentation ont été centrifugés (12 000 g, à 4 °C pendant 20 min). Le biosurfactant a été extrait du surnageant par l'un des méthodes d'extraction des biosurfactants. Le précipité, représente le biosurfactant, a été lyophilisé, conservé (Yalaoui-Guellal *et al.*, 2017).

II-1-4- Les facteurs affectant la production des biosurfactants

Mulligan et collaborateurs (Mulligan *et al.*, 2014), ont précisé que certain nombre d'études ont indiqué que le type et le rendement du biosurfactant est influencé par le type de milieu (source de carbone et autres nutriments) et les conditions de croissance (température, agitation, pH, etc.), donc l'optimisation de la production des biosurfactants affectant par déverse facteurs nutritionnels et facteurs environnementaux comme suivant :

II-1-4-1- Facteurs nutritionnels

Sources de carbone, d'azote et de phosphate, ions métalliques et autres additifs utilisés dans la formulation du milieu jouent un rôle crucial dans la production et le rendement des biosurfactants (Mouafo *et al.*, 2018).

a. Source de carbone

La nature de la source de carbone joue un rôle important dans la croissance et la production de biosurfactants par les micro-organismes et varie d'une espèce à l'autre. La source de carbone influence la synthèse du biosurfactant par induction ou répression, la production de biosurfactants a été déclenchée lorsque tout le carbone soluble a été consommé et lorsque des hydrocarbures non miscibles à l'eau étaient disponibles dans le milieu (Banat, 1995).

Par exemple chez les espèces de *Pseudomonas*, la production de rhamnolipides est régulée par présence de n- alcanes dans le milieu, alors que l'espèce *P. aeruginosa* la production est plus élevée et les taux ont été atteints lors de la croissance sur de l'huile végétale par rapport à l'hydrocarbure liquide (hexane). Il est également la production de rhamnolipides était meilleure sous les conditions de dénitrification avec des substrats de carbone, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique, le glycérol et le glucose. Elles étaient exemptes de problèmes tels que le moussage et limitation de la respiration (Kosaric et Sukan, 2000).

En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes et le rendement de biosurfactant a augmenté même après que les cultures bactériennes ont atteint la phase stationnaire de croissance (Cameotra et Makkar, 1998).

b. Sources d'azote

Différentes sources d'azote organique et inorganique ont été utilisées dans la production de biosurfactants par des micro-organismes. Dans les processus fermentaires, le rapport C/N affecte l'accumulation de métabolites. Lorsque les niveaux d'azote faible les rapports C/N élevés limitent la croissance bactérienne et favorisant le métabolisme cellulaire vers la production de métabolites. Un excès d'azote conduit à la synthèse de matériel cellulaire et limite l'accumulation de produits (Santos, 2013).

Mulligan et Gibbs (2004), rapportent que *P. aeruginosa* utilise des nitrates, de l'ammonium et des acides aminés comme sources d'azote. Les nitrates sont d'abord réduits en nitrite puis en ammonium. L'ammonium est assimilé soit par le glutamate déshydrogénase pour former le glutamate, soit par la glutamine synthétase pour former la glutamine. L'assimilation du nitrate est plus lente et simule la limitation de l'azote, ce qui est favorable à la production de rhamnolipides.

c. Effet d'autres facteurs / sources

L'influence de divers nutriments ou suppléments nutritionnels sur la production de biosurfactant ne peut être exclue. La croissance et la production de biosurfactants sont affectées considérablement par la quantité de phosphate, de fer, de manganèse, de calcium et d'oligo-éléments dans le milieu (Priya et Usharani, 2009). En outre, le rendement de la production de biosurfactants est fortement amélioré ou inhibé par l'ajout des antibiotiques tels que la pénicilline ou le chloramphénicol (Kosaric et Sukan, 2000).

II-1-4-2- Facteurs environnementaux

Il existe de nombreux rapports scientifiques où les effets individuels de la disponibilité en du pH, la température, oxygène, agitation et de la salinité sur la production de biosurfactants ont été examinées (Płociniczak et al., 2011).

a. Le pH

Le pH est également un facteur environnemental important et influe sur la stabilité et la solubilité des métabolites (Lee et al., 2018). Généralement, le milieu acido-basique est défavorable lorsque la productivité des BS chez les souches de *P. aeruginosa* produisent des rendements biosurfactants maximaux dans une large gamme de pH entre 6,0 et 6,5 et la productivité devient chute rapidement à des pH inférieurs ou supérieurs. A des pH variant de 6,5 à 8,0 les souches comme *Norcardiacory bacteroides* ne sont pas affectées (Kosaric, 2015).

b. La température

L'activité d'émulsification et la tension superficielle du biosurfactants qui produit par les souches thermophiles tout au long de la plage de température supérieures à 40°C est restées constantes après autoclavage à 120° C pendant 20 min (Santos, 2013).

c. L'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production de BS à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance, l'étude des effets synergiques sur *Lactobacillus pentosus* a reflété l'interdépendance de ces facteurs. Dans le cas de *B. subtilis* C9, un rendement trois fois plus élevé en lipopeptides a été observé dans des conditions limitées en oxygène par rapport à des conditions suffisantes en oxygène (Kosaric et Sukan, 2000).

d. L'agitation

Pour les souches bactérienne, l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induite une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. Par contre chez les levures l'effet inverse est observé (Edwarde et al., 1991).

e. La concentration en sels

La concentration en sels influences la production de certaines BS, cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectant pas certaine BS, bien qu'il soit observé une légère diminution sur la concentration micellaire critique. Par exemple, chez les bactéries halophiles telles que les *Halomonas sp.* BS4, *B. subtilis* BBK-1 à la concentration 8% de

NaCl et le pH 6–8 sont produit fonctionnaient mieux trois types de lipopeptides représenté au bacillomycine L, plipastatine et surfactine (Kosaric, 2015).

II-2- Isolement de bactéries productrices de biosurfactants

Pour l'isolement des bactéries productrices de biosurfactant, le protocole suivant doit être réalisé (Yalaoui-Guellal, 2018):

- Tout d'abord, la préparation de solution mère en dissolvant 10 g de l'échantillon à étudier (soit des sédiments de sol contaminée ou autre) dans 90 ml d'eau physiologique saline stérile (NaCl à 1%).
- Agitation de la solution pendant 1-2 h et le repos 1h est nécessaire.
- Ensuite, l'incubation à 30 °C sous agitation à 180 tours/min des flacons contient 5 ml de surnageant et de 45 ml du milieu MSM et 1% d'hydrocarbure à tester (soit de diesel, du pétrole, de kérosène ou d'autre) qui utilisée comme une source de carbone pendant 10 jour.
- Puis, l'enrichissement de 5 ml de chaque culture dans un milieu frais correspondant et incubé dans les mêmes conditions (cette étape est répétée quatre fois).
- A la fin, l'ensemencement sur gélose MSM additionné avec d'hydrocarbure à tester (soit de diesel, du pétrole, de kérosène ou d'autre) et l'incubation des boites à 30 °C pendant une semaine.
- Le plus important est la conservation des colonies bactériennes pures et représentatives sur des géloses nutritives et dans des géloses nutritives inclinées.
- Pour évaluer le criblage de ces souches, il faut prendre d'une seul colonie de chaque isolat et inclure dans 50 ml de MSM stérile additionné de 1% de pétrole et 1% de glucose dans des Erlenmeyer de 250 ml, puis incubé à 30 °C et 180 tr/min pendant 7 jours et centrifugée (12000 g à 4 °C pendant 20 min).

Des techniques facile, rapide et fiable sont nécessaires pour la mesure productivité de biosurfactant à partir de suspension de ces souches bactérienne (Yalaoui-Guellal, 2018).

II-2-1- Technique de mesure de la production de biosurfactant

La mesure production de biosurfactant est estimée par le test d'hydrophobicité, l'activité hémolytique, tension de surfaces, test de déplacement d'huile (Djihed, 2013).

II-2-1-1- Test d'hydrophobicité de la surface cellulaire

Une hydrophobicité cellulaire élevée permet aux micro-organismes d'entrer directement en contact avec les gouttes d'huile et les hydrocarbures solides tandis que l'hydrophobicité cellulaire faible permet leur adhésion aux micelles ou aux huiles émulsionnées (Płociniczak *et al.*, 2011). D'après Satpute *et al.* (2017), Le protocole de ce test a été préparé comme suivant :

- Tous d'abord par le lavage de suspension bactérienne par le tampon phosphate 50 mM (pH 7,0) deux fois et en utilisant le même tampon jusqu'à absorption A600 (Absorption à 600 nm) de 0,5, puis l'agitation au vortex de 3 ml de cette suspension sont avec 0,5 ml des hydrocarbures pendant 3 min et laissées à décanter pendant 10 min pour que la phase d'hydrocarbure monte complètement.
- Ensuite, le transfert de la phase aqueuse dans une cuve de 1 ml pour mesurer A600.
- Généralement, il existe une corrélation directe entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire et la production de BS. La diminution de A600 de la phase aqueuse est prise comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H %), qui est calculée comme suit:

$$\mathbf{H \% = (A_0 - A) / A_0 \times 100}$$

Où A₀ et A sont les absorptions à 600 nm, A600, avant et après mélange avec des hydrocarbures respectivement (Satpute, 2008).

II-2-1-2- Activité hémolytique

Un test hémolytique a été effectué pour le criblage de bactéries produisant du BS. Des colonies isolées ont été inoculées à la surface de plaques de gélose au sang, qui ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 24 à 48 h, dans le cas de la présence d'une zone claire de halo autour des colonies, il est considéré comme un résultat significative d'activité hémolytique de la culture bactérienne (Yalaoui-Guellal, 2017 ; Lee *et al.*, 2018).

II-2-1-3- Tension de surfaces

Le criblage des souches productrices des biosurfactant repose sur la mesure de tension superficielle de milieu de croissance, un bon biosurfactant entraîne une réduction minimale de la tension superficielle (Mulligan *et al.*, 2014). D'après Tabatabaee (2005), La préculture des souches de bactérie a été préparée au bouillon nutritives NB dans 1 ml d'inocula ont été

ajoutés à 100 ml de MSM et 1% de source d'hydrocarbures (d'huile filtrée). Puis l'incubation des mélanges avec les échantillons témoins à 30°C sur un agitateur à 150 tr/ min pendant 3 jours. L'optimisation de l'effet du pH et des températures sur la tension superficielle a été réalisé en changeant le pH (4,2-9,2) du milieu de Minimal Cooper (pH = 7,2) et en changeant les températures (25-50 °C), à l'aide d'un tensiomètre KRUSS F6 t la tension surfacique a été mesurée (Tabatabaee, 2005).

II-2-1-4- Test de déplacement d'huile

Ce test est défini comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants facile à réaliser, simple, sensible et reproductible est basé sur la caractéristique des biosurfactants à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau (Satpute et al., 2008 ; Yalaoui-Guellal, 2018). Les protocoles ont été préparés comme suivant (Satpute et al., 2008 ; 2017) :

- Sur des boîtes de Pétri, 50 ml d'eau distillée a été versée puis l'ajoute 100 µl d'huile brute à la surface de l'eau.
- Ensuite, 10 µl des surnageant de culture ont été introduit sur la surface de l'huile brute.
- Une colonie entourée d'un halo émulsifié est considérée comme positive pour la production de BS (Figure 04).

Les solutions contenant plusieurs BS sont incapable de former des gouttes stables et par la suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues des BS vont conserver la forme déposé sur la surface huileuse (Satpute et al., 2017).

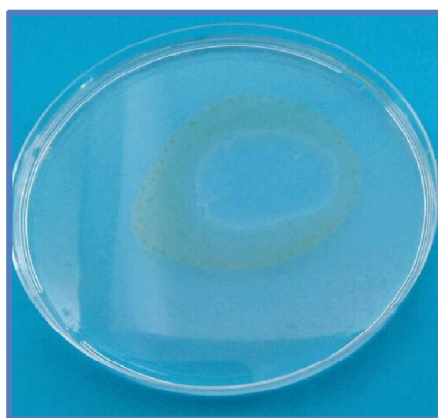


Figure 04 : Représentation schématique d'un halo émulsifié de biosurfactant (Selmoun et Benkhebcheche, 2016).

II-2-1-5- Test d'indice d'émulsification (E_{24})

D'après [Bezza et Chirwa \(2015\)](#), l'activité d'émulsification a été mesurée par l'addition des volumes identiques l'hydrocarbure (huile brute) et la suspension bactérienne dans un tube à essai à bouchon à vis et agitée en vortex à grande vitesse pendant 2 min à température ambiante puis incubés à 25°C pendant 24 h. L'activité d'émulsification estimée par l'indice d'émulsification (E_{24}) qui définit comme étant le rapport de la hauteur mesurée de la couche d'émulsion divisée par la hauteur totale du mélange et en la multipliant par 100, l'équation suivante a été exprimée en pourcentage :

$$E_{24} = \frac{He(\text{mm})}{Ht(\text{mm})} \times 100$$

Où : He : c'est la hauteur de l'émulsion, et Ht : c'est la hauteur totale.

Une comparaison entre les émulsions formées par les isolats et à ceux qui sont formés par une solution de 0,35 % (p/v) d'un tensioactif synthétique (Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) doit être réalisé ([Yalaoui-Guellal, 2018](#)).

La capacité de maintenir au moins 50 % du volume initial de l'émulsion après 24 h de sa formation est considéré comme un critère cité pour confirmer la production des biosurfactants ([Nasr et al., 2009](#)).

II-2-2- Techniques d'identification des bactéries

II-2-2-1- Identification morphologique

L'incubation des colonies pures sur le milieu LB solide subisse une description macromorphologique de la souche (forme, relief, taille de la colonie, aspect de surface, des contours, transparence, consistance et couleur) s'effectue visuellement. Les caractéristiques micromorphologiques (forme de la cellule, mode de regroupement, présence de spores et mobilité) sont directement observées à l'état frais au microscope optique (G×40 et avec G×100 à immersion a été utilisée). Après dépôt d'une goutte d'une culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, entre lame et lamelle, ou bien déterminer par la coloration de Gram ([Singleton, 1999](#)).

Pour la mobilité de la souche, un test confirmatif de la mobilité est réalisé sur des tubes Mannitol-Mobilité agar par une piqûre centrale de la souche sur ce milieu à l'aide d'une pipette Pasteur. Puis l'incubation à la température optimale (30 °C) pendant 24 h, afin de

permettre à la bactérie de synthétiser les flagelles nécessaires à son déplacement. Si les bactéries sont mobiles, elles se disperseront à partir de la piqûre d'ensemencement créant un trouble dans le milieu sous forme d'arbre, sinon la bactérie est immobile (Hentati, 2018).

Pour la coloration de Gram, une goutte de culture de la souche bactérienne en phase exponentielle de croissance est étalée sur une lame propre et fixée par passage par une flamme d'un bec Bunsen. Par la suite, la lame recouverte avec du violet de Gentiane pendant une minute. Une étape de lavage avec de l'eau de robinet est nécessaire avant l'ajout de la solution d'iode (lugol). L'action de l'iode dure une minute et puis une étape de décoloration par rinçage de la lame avec l'alcool 20 à 50 secondes. La dernière étape est la coloration des cytoplasmes incolores avec la fuchsine pendant une minute. La lame est ensuite séchée à l'air sec avant l'observation au microscope. En effet, Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rose (Dussault, 1955).

II-2-2-2- Identification biochimique

Les isolats bactériens ont été identifiés grâce à différents tests biochimiques classiques parmi lesquels : la production d'oxydase, test de catalase, rouge de méthyle, test de Vogues Proskauer (MR-VP), l'utilisation de citrate, test de liquéfaction de gélatine, test TSI (Tri Sugar Iron), fermentation de glucides, test de production d'indole et la sensibilité aux antibiotiques (Yalaoui-Guellal, 2017).

a. Test de l'oxydase

Le test d'oxydase permet de mettre en évidence l'enzyme phényène diamine oxydase (PDA) des bactéries, on dépose sur une lame propre et sèche un disque de papier filtre ordinaire (disques oxydases) et on l'imbibe avec de la réactive oxydase N-diméthyl paraphénylène diamine, une colonie sur milieu LB solide y est déposée avec une pipette Pasteur. L'apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, indique que le test est positif et la bactérie possède le cytochrome oxydase. Dans le cas contraire (pas de coloration) le test est négatif et la bactérie ne possède pas l'enzyme (Singleton, 1999).

b. Test de catalase

Le catalase est une enzyme présente chez les bactéries aérobies strictes et les bactéries anaérobies facultatives. Une goutte de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) H_2O_2 est déposée sur une lame propre, puis, elle est mise en contact avec une colonie isolée sur milieu LB solide, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée.

La présence de la catalase se traduit par l'apparition des bulles qui indiquent la dégradation de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Par contre, l'absence des bulles indique que la bactérie ne possède pas l'enzyme (Kannika, 2003).

c. Test de rouge de méthyle (RM)

Sur le milieu R.M.V.P (Annexe 01), 0.1ml de la culture a étéensemencé. Après une période l'incubation à 37°C pendant 7 jours, on ajoute dans le milieu 5 gouttes de la solution du rouge de méthyle (Annexe 02). Le développement d'une coloration rouge ($\text{pH} \leq 5$) indique un résultat positif (RM +) (Marchal et Bourdon, 1982).

d. Test de Voges-Proskauer (VP)

De la même culture préparée pour le test RM, 1ml de culture a été transférée dans un tube à essai stérile, puis on ajoute successivement 0.6 ml de la solution A et 0.2 ml de la solution B (Annexe 02). Le tube est agité doucement pour exposer le milieu à l'oxygène atmosphérique puis le laisser intact. L'apparition de la coloration rouge après 15min mais pas plus d'une heure après l'ajout du réactif indique que le résultat est positif (Marchal et Bourdon, 1982).

e. Dégradation de la gélatine

La souche à tester estensemencée dans un tube à essai contenant un milieu à base de la gélatine (Annexe 01). La gélatine inoculée est incubée à 37 °C pendant 7 jours. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par la liquéfaction du milieu après autoclavage des boites à une température de 4 °C pendant 20 à 30 min (Kannika, 2003).

f. Utilisation de citrate

Le milieu Simmons au citrate estensemencé en stries sur pente puis incubé à 28 °C pendant 24 h. L'utilisation des citrates se traduit par un changement de couleur du vert au bleu (Ali, 2011).

g. Test TSI

Ce test permet de vérifier l'utilisation du glucose et du lactose par la souche étudiée. Le milieu TSI estensemencé par piqûre centrale du culot et en stries au niveau de la pente. Puis incubé à 28 °C pendant 24 h, la production d'H₂S à partir des acides aminés soufrés est révélée par un noircissement au niveau de l'inoculation.

Si la couleur du culot vire au jaune, le test du glucose est positif et si le culot reste rouge, le test est négatif. Si la pente vire au jaune, le test lactose est dit positif (Ali, 2011).

h. Assimilation des glucides

Pour tester l'assimilation des glucides par les bactéries étudiées, 20 µl de la suspension bactérienne a été transféré aux puits d'une microplaque stérile, contenant chacun un volume de 50µl du milieu de culture au rouge de phénol (Annexe 02) et 30 µl d'une solution de substrat (D-lactose, D-fructose, D-galactose, D-xylose, L'arabinose, D-mannitol, D-glucose) à tester après avoir la préparée avec une concentration de 0.1% et la stériliser par filtration sur membrane de (0.22µm). La lecture se fait après incubation à 37° C pendant 48h (Kannika, 2003).

i. Formation de l'indole

Certaines souches bactériennes sont désaminées puis hydrolysée le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du para-diméthyl-amino-benzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge, pour cela un volume de 0.1ml de l'inoculum a étéensemencée dans un milieu de culture à base de tryptone (Annexe 01) et incubée à 37°C pendant 7 jours. L'apparition d'un anneau rouge en surface après avoir ajouté quelques gouttes du réactif de Kovacs (Annexe 02) indique un résultat positif (Kannika, 2003).

j. Production de sulfure d'hydrogène l'H₂S

Les souches bactériennes sontensemencées par pique centrale dans un tube à essai contenant un milieu à l'acétate de plomb (Annexe 02), en plus des stries sur toute la surface de la pente ont été faites. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 7 jours. Une coloration brunâtre est apparue le long de la pique et sur toute la surface de la pente indique un résultat positif (Kannika, 2003).

k. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques de souches isolées a été testée sur sept antibiotiques de famille différente par une technique de diffusion sur milieu gélosé Mueller Hinton (MH) (Annexe 01). Une suspension bactérienne, est étalée sur la surface du milieu de culture par écouvillonnage, les disques d'antibiotiques sont positionnés de manière équidistante, puis les boîtes sont conservées pendant 1 à 2 h. La lecture et l'interprétation des résultats se font après

incubation à 37°C pendant 48h en mesurant le diamètre de la zone translucide autour de chaque disque (Bauer *et al.*, 1966, Yalaoui-Guellal, 2018).

II-2-2-3- Identification phylogénique

L'analyse phylogénétique des souches isolées est réalisée par comparaison de la séquence du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) avec les séquences déposées dans la banque de gènes (GenBank). Plusieurs étapes sont nécessaires pour cette étude phylogénétique (Hentati, 2018).

a. Extraction de l'ADN génomique

D'après Gevers *et collaborateurs* (2001), l'extraction de l'ADN génomique se fait par les étapes suivant :

-La centrifugation de 10 ml de la culture bactérienne en phase exponentielle de croissance à 12000 rpm pendant 5 min.

-Le culot est dissous dans 487 µl du tampon Tris-EDTA (TE) et 40 µl de lysozyme a une concentration de 20 mg/ml (pour détruire les parois cellulaires), puis incubée à 37°C pendant 1 h.

-Ajouter par la suite 30 µl de Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS 10%) et 5 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Le mélange est incubé 1 h à 50 °C.

-Puis mélanger 100 µl du NaCl (5 M) avec 800 µl CTAB/NaCl (10% de Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide (CTAB) dans une solution NaCl (0,7 M), et incubé 10 min à 65°C.

-Afin de séparer l'ADN des protéines, on mélange vigoureusement 750 µl du chloroforme/alcool isoamylique dans les proportions 24:1 (v/v), et on centrifuge à 14000 rpm pendant 5 min. Le surnageant obtenu est transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. L'ajout de 300 µl de phénol et de 300 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24:1 (v/v)) est suivi d'une centrifugation 5 min à 14000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube.

-Pour précipiter l'ADN, on ajoute 600 µl d'isopropanol froid et on incube les tubes dans la glace pendant 30 min. Après la centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min, le culot obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%. Après avoir recentrifugé, le culot est séché sous vide pour enlever toute trace d'alcool.

Pour dégrader les ARNs, le culot obtenu est resuspendu dans 200 µl de tampon TE (Tris-EDTA) contenant 1 µl RNase (20 mg/ml) et le tube est incubé pendant 1 h à 37 °C.

-Ensuite on rajoute des volumes identiques (300 µl) de phénol et chloroforme/alcool isoamylique et on centrifuge à 14000 rpm pendant 5 min.

-Le surnageant obtenu est précipité avec 600 µl d'isopropanol. Après incubation dans la glace pendant 30 min, on effectue la centrifugation.

-Le culot obtenu est suspendu dans 20 µl d'eau stérile et l'ADN génomique extrait est conservé à -20 °C (Hentati, 2018).

b. Electrophorèse de l'ADN

Afin d'analyser l'ADN génomique extrait, on réalise l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (m/v) dans le tampon TAE 1X (4,84 g de Tris base, 1,14 ml d'acide acétique glacial et 0,74 g d'EDTA-Na₂ par litre d'eau) contenant 4 µl/25 ml de bromure d'éthidium (BET).

Le marqueur de taille utilisé est lambda Hind III dont la taille de bandes varie de 1000 pb à environ 23000 pb. Cette étape permet d'optimiser les dilutions à réaliser de l'ADN génomique pour amplifier le gène de l'ARN ribosomal 16S (Hentati, 2018).

c. Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) du gène codant pour l'ARNr 16 S

Le gène codant pour l'ARNr 16S de la souche performante a été amplifié par la réaction en chaîne par polymérase (PCR), en utilisant un système de PCR Stratagene (gradient Robocycler 96) avec de l'ADN polymérase GoTaq. Les deux amorces universelles Fd1 et Rd1 (Fd1, 5' 'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Rd1, 5'-AAGGAGG-TGATCCAGCC-3 ') ont été utilisées pour obtenir un produit de PCR de taille suffisante en pb (Winker et Woese, 1991).

Un fragment d'environ 1500 pb du gène de l'ARNr 16S a été amplifié à partir de l'ADN génomique de la souche, cloné dans le vecteur pGEM-T Easy et séquencé sur les deux brins pour établir un support supplémentaire afin d'identifier la souche. Les positions de la séquence et l'ambiguïté de l'alignement ont été omises dans une première étape. Les recherches de similitude entre la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S et les séquences

disponibles dans la banque de séquences d'ADNs (GenBank) se font par l'intermédiaire du programme BLAST disponible sur le site NCBI (Singleton, 2001).

L'arbre phylogénétique, ou dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche étudiée est générée en utilisant le logiciel Mega version. La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche performante est déposée dans les bases de données des nucléotides : GenBank/DDBJ/EMBL (Tamura *et al.*, 2011).

L'arbre phylogénétique de la souche SdK644 (Figure 05) sous le numéro d'accèsion (KU680815) au GenBank indique que cette souche est plus étroitement associée aux membres de l'espèce *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, avec une similarité de séquence de 97,5% avec la souche ATCC 49840^T (Zenati, 2018).

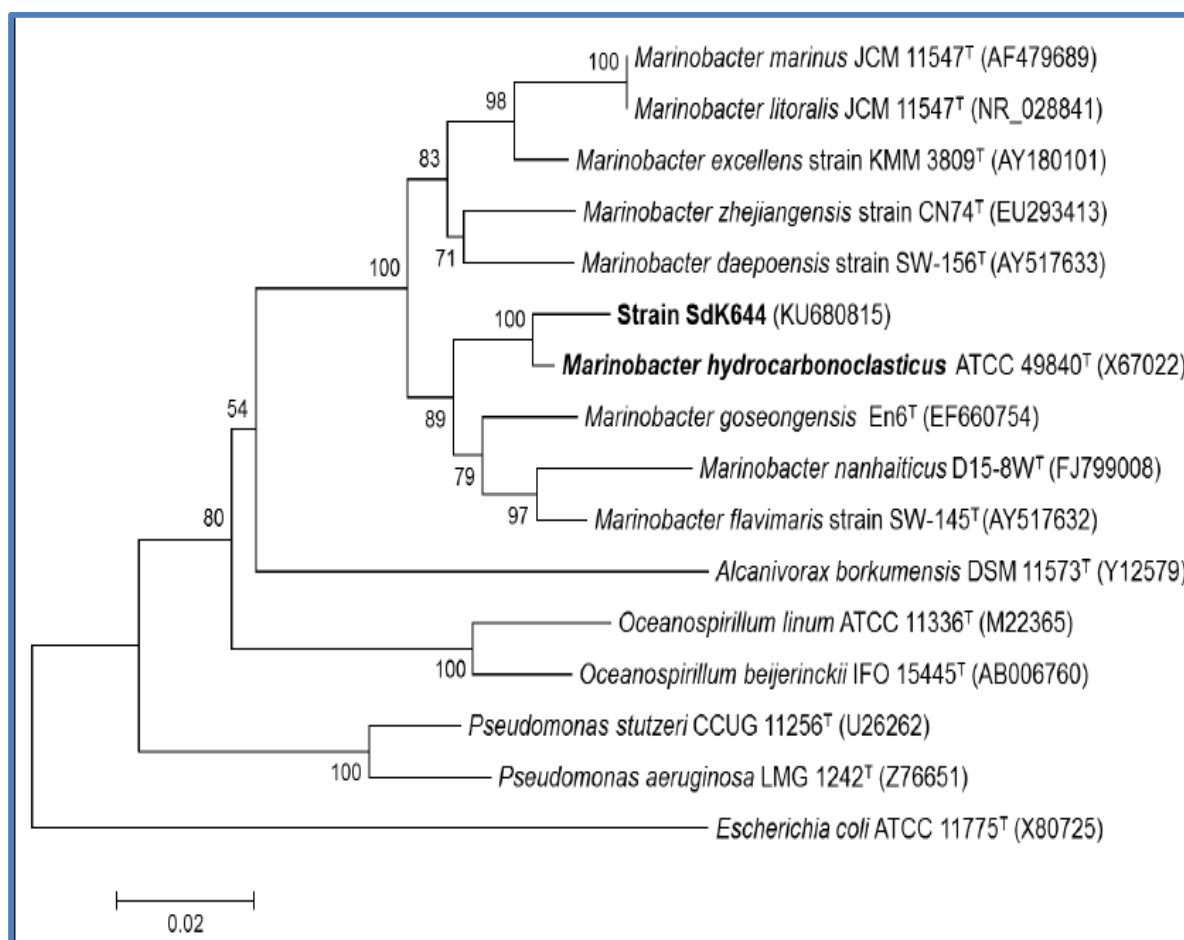


Figure 05 : Arbre phylogénétique de la souche SdK644(KU680815) au GenBank (Zenati, 2018).

Chapitre III

Chapitre III : Extraction, purification et caractérisation des biosurfactants

III-1- Extraction des biosurfactants

L'extraction des biosurfactants du milieu de croissance se fait après la détection de la production des BS en utilisant des différentes techniques citées dans le chapitre précédent. Il est d'abord nécessaire de faire procéder d'une centrifugation pour séparer la biomasse bactérienne. Deux techniques sont principalement utilisées : l'extraction par solvants chloroforme/méthanol, butanol ou acétate d'éthyle, et l'extraction par précipitation acide (Djebbar et Sahel, 2018).

III-1-1- Précipitation acide

Lorsque les conditions d'incubations sont atteintes 7 jours (Zang et al., 2012), le surnageant qui contient des cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation (10 000 tr/min à 4 °C pendant 20 min). Après cela, le biosurfactant a été précipité à partir de surnageant par l'HCl 6 N, en ajustant le pH de 2,0 à 3,0, et en le gardant à 4 °C pendant 24 h. Ensuite, la couche organique a été recueillie par centrifugation à 10 000 tr/min à 4 °C pendant 20 min (Pereira, 2013 ; Yalaoui-Guellal et al., 2017).

Cette extraction par précipitation permettant de récupérer des substances à activité de surface, et souvent utilisée pour le cas de surfactine synthétisée par *Bacillus subtilis* et la pseudosurfactine synthétisée par *B. licheniformis* (Boudoune et al., 2018).

III-1-2- Extraction par solvant

L'extraction du biosurfactants par solvants a été effectuée par la méthode décrite par Chandran et al. (2010) et Pereira et al. (2013). Le bouillon de culture a été centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 min à 4 °C. Le mélange chloroforme/méthanol (2//1, v/v) a été ajouté au surnageant pour avoir un rapport final chloroforme/méthanol/eau de 8/4/3 (v/v/v). Les solvants ont été éliminés par évaporation rotative et le résidu résultant obtenu était un biosurfactant brut (Pereira et al., 2013).

Ce produit final est lyophilisé, conservé à une température ambiante, et pesés pour la quantification et la mesure des propriétés tensioactives. Le poids du biosurfactant est exprimé en grammes par litre (poids sec) (Yalaoui-Guellal et al., 2017).

Il est possible d'extraire les glycolipides comme précipités ou cristaux à partir du surnageant d'une culture de *Pseudomonas aeruginosa* par addition d'acide suivie d'une incubation à basse température.

Récemment, les glycolipides produits par une population microbienne mixte et les rhamnolipides formés par *P. aeruginosa* et *Candida lipolytica* ont été isolés par acidification du surnageant de la culture puis une extraction aux solvants organiques (Boudoune et al., 2018).

III-2- Les différentes techniques de caractérisation des biosurfactants

La purification et la caractérisation des BS doit être réalisée selon leur charge ionique, leur solubilité et leur localisation (intracellulaire, extracellulaire, ou lié aux cellules), d'après les techniques suivant : MALDI-TOF/MS, CCM, FTIR, LC-MS/MS, GC-MS (Eddouaouda, 2012).

III-2-1- Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

La méthode CCM (Chromatographie sur Couche Mince) est réalisée, dans un but d'analyse des composés des surnageant des milieux de fermentation (Slimani et al., 2018), elle permet d'évaluer et détecter les caractéristiques chimiques du biosurfactant dans des bouillons de culture ainsi que c'est une technique qualitative qui permet de confirmer la pureté du biosurfactant.

D'après Janek et al. (2013), Laabei et al. (2014) et Noparat et al. (2014), les échantillons chromatographiés ou des extraits de biosurfactants ont été dissoutes en utilisant une phase mobile de chloroforme / méthanol / acide acétique ($\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{CH}_3\text{COOH}$), qui ont été séparés sur des plaques de gel de silice 60 dans un rapport (65/15/2, v/v/v) comme système de solvant pour la détection des glucolipide (Janek et al., 2013), et dans un autre système : chloroforme-méthanol-eau ($\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$) par un rapport de (65/15/1, v/v/v) pour révéler les lipopeptides (Yalaoui-Guellal, 2017).

Les taches résultantes sur la CCM ont été visualisées (front de solvant est d'environ 1 cm de haut de la plaque), les plaques ont été retirées et laissées sécher à l'air sous la hotte. Les taches ont été révélées par pulvérisation avec : a) d'eau distillée pour la détection des composés hydrophiles, b) la solution de ninhydrine (Annexe 02) pour la détection de composés avec des groupes amines libres pour le système de lipopeptides, c) et la solution

d'Anthrone (Annexe 02) pour la détection des fragments de sucre pour le système de glycolipides. Les traitements a, b et c ont été visualisés après chauffage à 110 °C pendant 5-20 min (Yalaoui-Guellal, 2017).

▪ **Exemple 01**

Les résultats de la chromatographie sur couche mince suggèrent que les produits tensioactifs de *P. aeruginosa* MR01 contiennent du rhamnolipide (Figure 06.1). Les produits de *P. aeruginosa* MR01 ont deux taches. Un spot majeur avec une valeur Rf de 0,31 et un second avec un Rf valeur de 0,73. La tache inférieure provient des structures di-rhamnolipides, tandis que la tache supérieure provient de molécules de mono-rhamnolipides (Lotfabad et al., 2010).

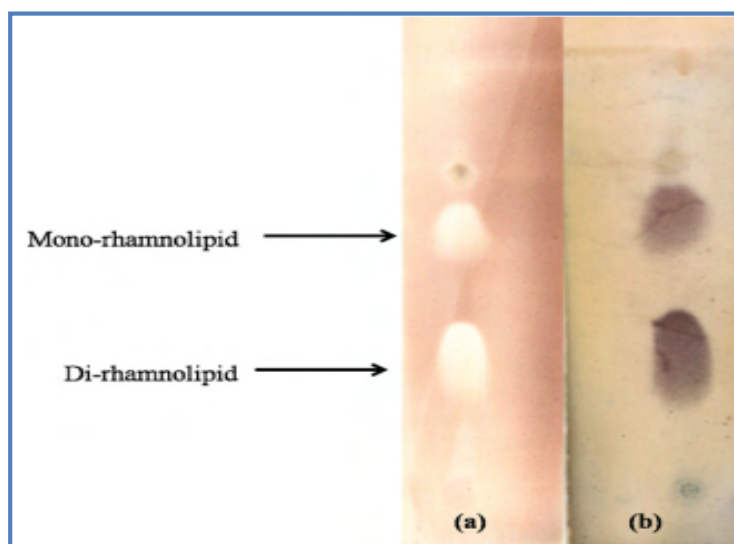


Figure 06.1 : Analyse par CCM du rhamnolipide produit pendant la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* MR01 sur un milieu MS contenant du glucose comme seule source de carbone (12 g / l); (a) avec un réactif à la solution d'iode (Annexe 02) et (b) avec un réactif Molish (Annexe 02) (Lotfabad et al., 2010).

▪ **Exemple 02**

La caractérisation par chromatographie sur couche mince a révélé une tache rose avec une valeur Rf de 0,62 lors de la pulvérisation de réactif à la ninhydrine, indiquant la présence d'acides aminés. Le résultat ci-dessous (Figure 06.2) a confirmé la nature lipopeptidique du biosurfactant (Bezza et chirwa, 2015).

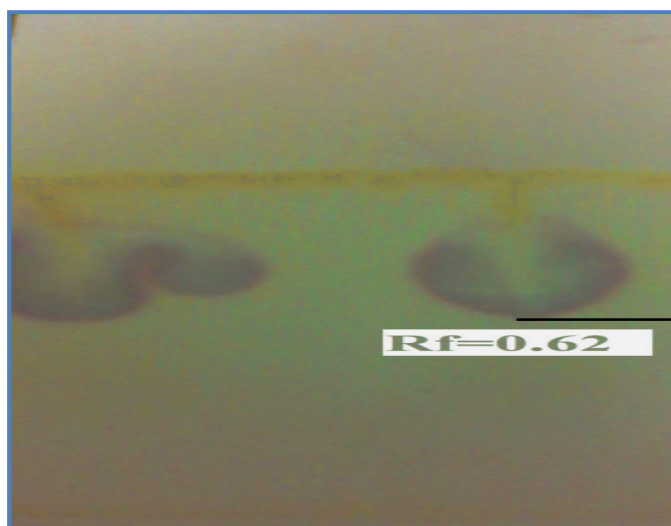


Figure 06.2: Chromatographie sur couche mince (CCM) du biosurfactant obtenu à partir de *B. subtilis* CN2 après traitement à la ninhydrine (Annexe 02) a révélé une tache rose avec une valeur Rf de 0,62 indiquant la présence d'acides aminés. Des chromatogrammes ont été développés avec du chloroforme/ méthanol/ eau (65/15/4, v/v/v) (Bezza et Chirwa, 2015).

III-2-2- Identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF

Plus récemment, les techniques d'ionisation douce conviennent aux diagnostics rapides et à haut débit à faible coût et peut être considérée comme une alternative aux systèmes d'identification biochimiques et moléculaires conventionnels meilleures dans un laboratoire microbiologique pour l'identification de routine rapide de divers micro-organismes tels que : les bactéries, les anaérobies, et des levures (Van-Veen et al., 2010).

Au cours de la dernière décennie, la spectrométrie de masse (MS) à temps de vol (TOF) à désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est devenue l'un des outils polyvalents les plus puissants pour relancer l'analyse des biopolymères (les sucres, les acides nucléiques et les protéines) et créer des nouvelles opportunités (Nielen, 1999; Jurinke et al., 2004). Le principe se base sur l'obtention de pics caractéristiques (spectres) par ionisation de l'échantillon ciblée (le biosurfactant) par un rayon laser. A partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche puis cohère entre les deux spectres (Yalaoui-Guellal, 2017; Descy et al., 2010).

La caractérisation peut être réalisée par la technologie MALDI-TOF en quelques minutes, et ne nécessite qu'une petite quantité de biosurfactant purifié qui a été repéré sur la position de la puce d'ancrage sur une plaque de désorption / ionisation laser assistée par

matrice (MALDI), et une goutte de matrice ajoutée à la tache d'échantillon (Van-Veen *et al.*, 2010 ; Nocon, 2013 ; Sharma *et al.*, 2015). En outre, la matrice était une solution saturée d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dans l'eau et 0,3 mg/ml d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans l'acétone / éthanol (2 /1, v/v). Un standard peptidique a également été repéré pour un étalonnage externe. Les taches ont été laissées à température ambiante pour sécher et analysées sur le spectromètre de masse (Sharma *et al.*, 2015).

Les composés ionisés issus de l'échantillon cible (le biosurfactant) vont être accélérés par un champ électrique dans une colonne, avant de pénétrer dans un tube de vol, libre de tout champ permettant de séparer les molécules selon leur rapport masse/charge (m/z). L'intensité des pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre spécifique d'un biosurfactant qui a été créé par le passage des ions (Figure 07) (Yalaoui-Guellal, 2017; Sharma *et al.*, 2015).

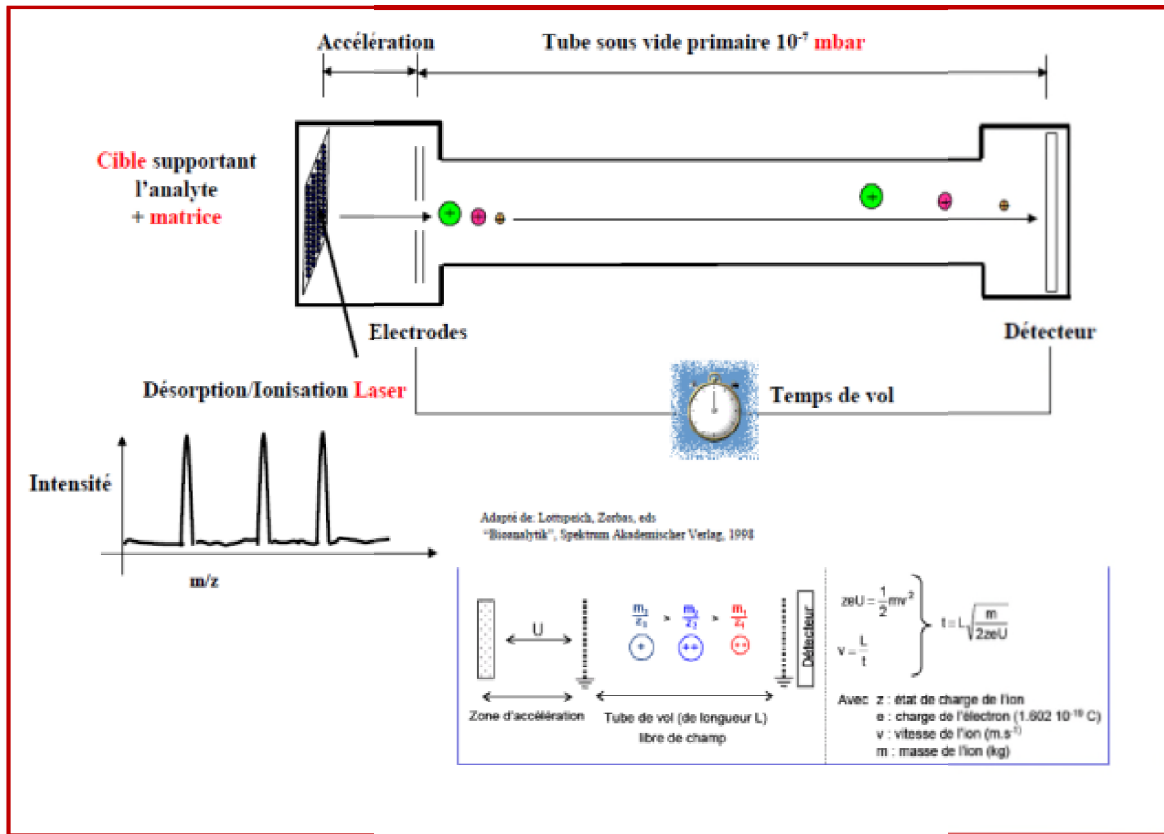


Figure 07: Schématisation du principe MALDI-TOF (Nocon, 2013).

Le logiciel BRUKER MALDI-TOF BIOTYPER compare les résultats des spectres obtenus avec les spectres de références de la base de données qui apparaissent sous la forme d'un score de corrélation. Cette analyse nécessite plusieurs spectres. Un exemple sur les

niveaux de confiance pour les identifications des souches par MALDI-TOF/MS est représenté dans ce tableau suivant (tableau 02) (Nocon, 2013).

Tableau 02 : Tableau interprétatif des scores de corrélation.

Score	Description
2,300 ... 3,000	Forte probabilité d'identification à l'espèce
2,000 ... 2,299	Identification du genre sécurisée, identification probable à l'espèce
1,700 ... 1,999	Identification probable au genre
0,000 ... 1,699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification

La figure ci-dessous (Figure 08) montre les affectations des pics obtenus à partir de MALDI-TOF/MS. Les données obtenues à partir de MALDI-TOF/MS du biosurfactant purifié ont montré des groupes de pics bien résolus à des valeurs m/z 1000-1096. Les pics de masse à m/z 1047,6, 1030,5, 1044,6 et 1058,6 ont indiqué un lipopeptide avec un mélange d'analogues structuraux. La spectrométrie de masse a confirmé les isomères de la surfactine et de l'iturine dans des fractions purifiées. Le pic de masse à 1044,60 a été attribué à une isoforme de surfactine contenant un acide gras β -hydroxy avec une chaîne de 14 atomes de carbone, (Sharma *et al.*, 2015).

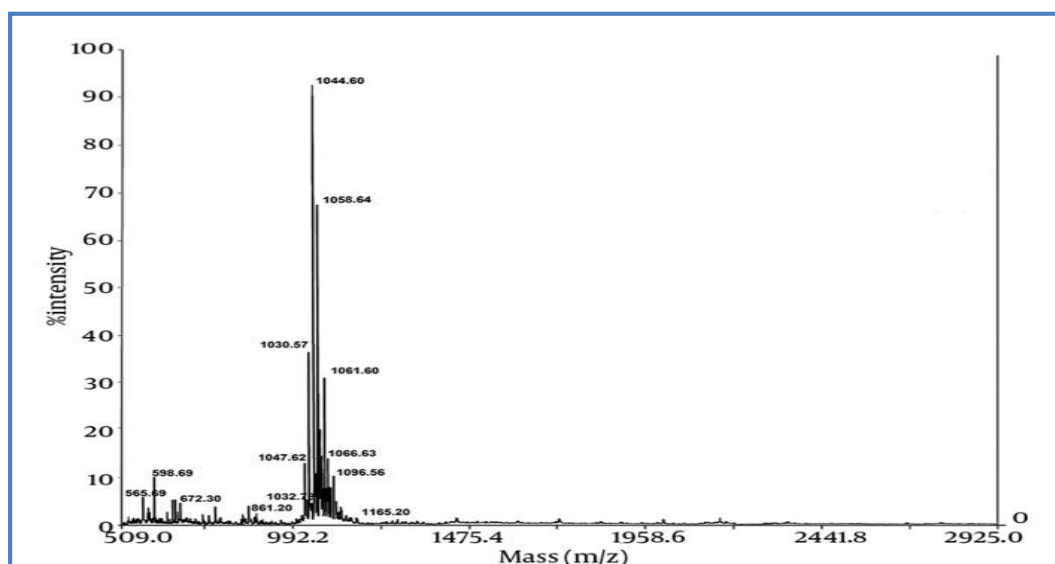


Figure 08 : Spectre de spectrométrie de masse par ionisation par désorption laser assistée par matrice-temps de vol (MALDI-TOF) du biosurfactant purifié obtenu à partir de *Bacillus pumilus* DSVP18 (Sharma *et al.*, 2015).

II-2-3- Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge d'absorption est une technique spectroscopique sensible et plus fiable, utilisée dans plusieurs domaines d'application, notamment en biologie. Elle permet via une observation directe des fréquences caractéristiques des modes de vibration d'une molécule irradiées par une onde électromagnétique de fréquence comprise dans le domaine de l'infrarouge de longueur d'onde sondée est comprise entre $2.5\mu\text{m}$ et $25\mu\text{m}$ (Hellal, 2014).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour la détection et l'analyse des groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présentes dans la fraction biologiquement active du biosurfactant et ainsi de déterminer sa nature chimique (Das *et al.*, 2008).

Le principe général d'un spectromètre FTIR est proportionnellement simple. La lumière polychromatique provenant d'une source traverse un interféromètre où elle est convertie en un faisceau dont l'énergie est modulée en fonction du temps. Cette modulation est caractéristique du spectre de fréquences initial de la source. Après absorption par l'échantillon, le signal détecté se présente sous la forme d'un interférogramme correspondant à chaque coordonnée de vibration. En dernière étape, cet interférogramme est converti numériquement en un spectre de fréquences par application de la transformée de Fourier (Figure 09) (Hellal, 2014).

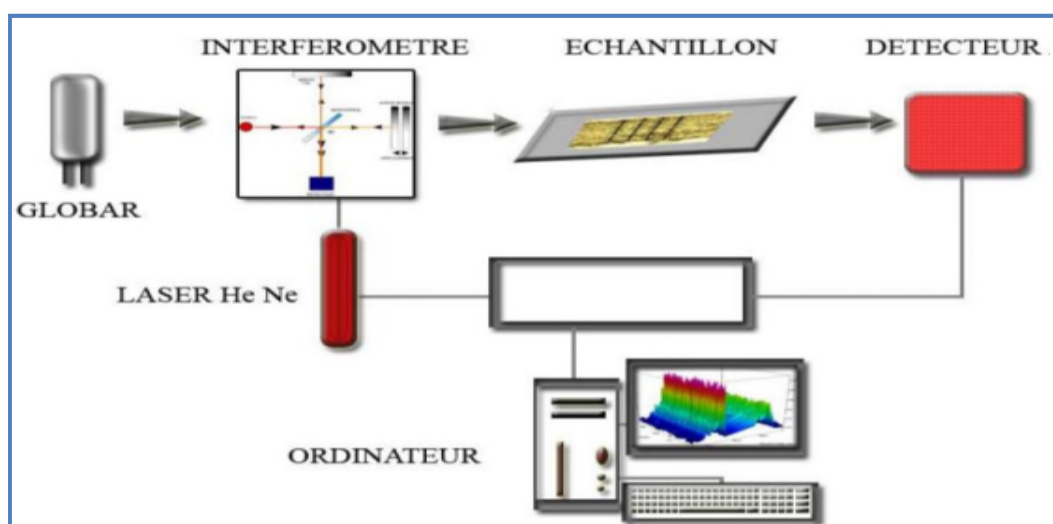


Figure 09 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un spectromètre FTIR (Hellal, 2014).

L'analyse FTIR KBr a été réalisée en utilisant un spectromètre avec un échantillon de biosurfactants dispersé dans les pastilles de KBr, puis lyophilisée par la fraction active. Le BS brute a été broyée dans environ 80 mg de KBr de qualité spectrale. Ensuite, pressée en pastilles sous la pression à l'aide d'une presse hydraulique. Avant les mesures spectrales, et pendant environ une heure, le spectromètre a été purgé avec de l'azote sec pour éliminer les traces de dioxyde de carbone (Yalaoui-Guellal, 2017).

Les mesures spectrales ont été effectuées en mode absorbance. Les spectres ont été normalement acquis avec une résolution donnant des traces IR sur une gamme des nombres d'ondes de 400 à 4 000 cm^{-1} (Das et al., 2008). Cette technique de FTIR utilisé également pour détecter le spectre d'un biosurfactant lipopeptidique standard, et la surfactine qui sont obtenue en parallèle et qui sont aussi comparés afin de confirmer la nature chimique de la fraction de biosurfactant actif.

Comme présenté sur la figure 10, Le schéma d'absorption infrarouge a révélé la présence de groupes peptidiques et carboxyliques qui indiquaient leur nature lipopeptidique. En comparant avec un échantillon standard de surfactine (Sigma), la présence de groupes fonctionnels (amide, peptidique et aliphatique) a été révélée, confirmant ainsi le caractère lipopeptidique du biosurfactant (Bezza et Chirwa, 2015).

Une large absorbance avec des nombres d'ondes allant approximativement de 3500 cm^{-1} à 3200 cm^{-1} ayant ses maxima à 3305 cm^{-1} a été observée. L'absorbance dans cette région est due aux vibrations d'étirement C–H et aux vibrations d'étirement N–H et est une caractéristique des composés contenant du carbone avec des groupes amino. Une absorbance dans cette région signifie également la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire (Das et al., 2008).

Deux autres pics d'absorbance nets sont observés à 2960 et 2927 cm^{-1} indiquant la présence d'une liaison C–CH₃ ou de longues chaînes alkyle. Le pic d'absorbance le plus élevé du spectre a été observé à 1656 cm^{-1} . L'absorbance dans cette région signifie la présence d'un groupe peptidique dans la molécule. À côté de ce pic se trouvait un autre pic de haute intensité à 1545 cm^{-1} . L'absorbance dans ces régions est due à la présence de liaisons C=O et est due aux vibrations d'étirement C=O. D'autres pics significatifs observés à 1459 et 1403 cm^{-1} correspondent aux vibrations de flexion C–H et sont fréquents dans les composés à

chaînes alkyle. Les pics à 1238 et 1118 cm^{-1} sont probablement dus aux vibrations C–O –C dans les esters (Das et al., 2008).

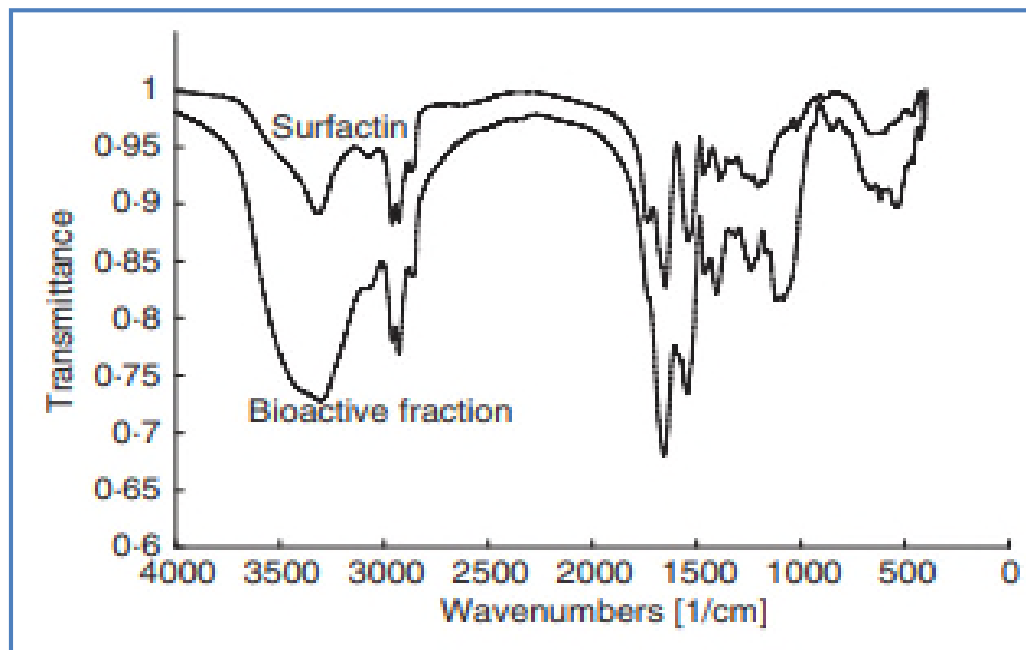


Figure 10: Spectres infrarouges à transformée de Fourier (FTIR) de la fraction bioactive purifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du biosurfactant produit par *Bacillus circulans* marin chevauché avec les spectres FTIR de la surfactine standard (Sigma Chemicals) (Das et al., 2008).

III--2-4- Caractérisation par GC/MS

La Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est la méthode la plus sensible pour l'identification et la quantification des lipopeptides et les biosurfactants à poids moléculaire élevées. Par conséquent, l'analyse de la fraction lipidique de BS est cruciale pour l'élucidation structurale détaillée pour l'identification des structures d'acides gras. Le processus implique le clivage hydrolytique du lien entre l'hydrate de carbone ou partie peptide/protéine de la BS et les parties lipidiques. L'analyse par GC/MS est facilitée par la dérivation ultérieure des chaînes d'acides gras résultantes en esters méthyliques d'acides gras (FAME) et la conversion supplémentaire en dérivés triméthylsilyle (TMS) (Smyth, 2010).

D'après Vater et al. (2002), Les analyses GC/MS peuvent être effectuées en utilisant une variété de colonnes telles que la colonne capillaire DB-23 ou supelco omegawax (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) (30 M 0,25 mm 0,25 mm id), Cette analyse fait sous réserve les

conditions analytiques suivant : température de l'injecteur 250 °C, maintenir pendant 1 min, puis rampe à 40 °C par minute à 250 °C et maintenir pendant 25 minutes. Les paramètres de la spectrométrie de masse : L'impact électronique à 70 eV avec une plage de balayage 50-650 m/z et d'un volume d'injection de 1 ml. Le temps de rétention de FAME augmente avec la longueur de la chaîne et le degré de séparation, selon le protocole suivant:

Tout d'abord, on ajoute 5 mg de glycolipide purifié et sécher à 0,95 ml de méthanol et 0,05 ml d'acide sulfurique dans un tube scellé et chauffez à 90 °C pendant 15 h. Puis, les solvants sont évaporées et l'extraire le résidu avec 1 ml d'hexane. Ensuite, fait un lavage avec 1 ml d'eau et évaporer l'hexane pour obtenir un extrait contenant le FAME. Après, on ajoute 0,5 ml de TMSI (N-triméthylsilylimidazole) à 5 à 10 mg des esters méthyliques des acides gras (FAME), pour préparer des dérivés d'éther TMS. Finalement, la solution doit chauffer à 60 °C pendant 10 à 15 min (Yakimov *et al.*, 1995).

L'analyse GC/MS de la composition des biosurfactants produit par l'isolat de la souche *Natrinema* (Figure 11) permet la détermination structurale des acides gras qu'ils sont constitués majoritairement d'un noyau benzène avec un pourcentage de 50 %, ce qui lui confère une propriété d'un solvant organique puissant (Ariech, 2018).

En plus, ces biosurfactants sont constitués aussi d'un mélange d'acide (tableau 03), tel que l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide linoléique (Ariech, 2018).

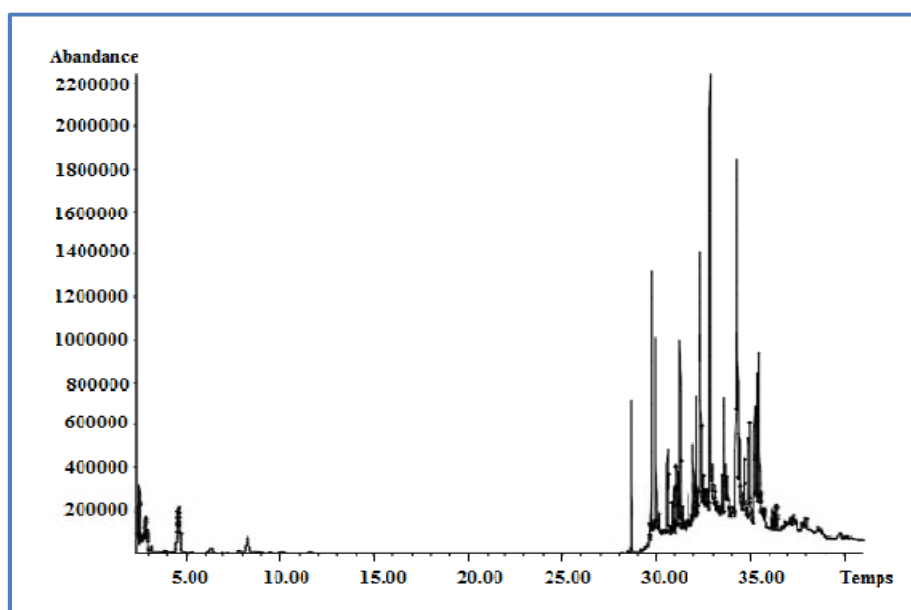


Figure 11 : Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par *Natrinema* (Ariech, 2018).

Tableau 03 : Composition des biosurfactants produits par *Natrinema* (Ariech, 2018).

O.P.	T.R.	P (%)	Composés	PM (g/mol)
1	2.32	50.17%	Toluène (benzène méthyle)	92,14
32	31.93	1.662%	Acide palmitique	256,42
43	32.77	16.52%	Acide linoléique	280,44
44	32.88	1.044%	Acide stéarique	284,47

Où : O.P. : Ordre des pics. T.R. : temps de rétention. P (%) : Pourcentage du composé.

III-2-5- Caractérisation par LC–MS/MS

Analyse par la spectrométrie de masse en tandem couplée à une analyse par chromatographie liquide (LC–MS/MS) permet d'identifier et de quantifier avec précision le composante d'un mélange de la fraction chromatographie sur colonne chloroforme-méthanol (65/35, v/v) (Bezza et Chirwa, 2015).

Les échantillons sont ionisés sous vide dans la région source d'après la solubilisation des BS purs dans une solution de 50% d'acétonitrile (ACN) puis l'étape de centrifugation et de filtration a été impliqué (Eddouaouda, 2012).

Selon Eddouaouda. (2012) ; Bezza et Chirwa. (2015), le principe de cette technique est basée sur la séparation efficace des particules chargées en fonction de leur rapport masse/charge. Cette séparation a été réalisée sur colonne C18 (150 mm × 2,1 mm, taille de particule 5µm) d'un système UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Waters Acquity couplé à un spectromètre de masse Waters Synapt G2, qui étalonnée dans les modes de résolution des ions positifs et négatifs sur la plage de masse de 100–2000, en utilisant typiquement des grappes de formiate de sodium Na(HCOO) dans des conditions suivant : 0,5 s de temps de balayage, 30 V de tension conique, 2,8 kV de tension capillaire, 100 °C de température source; 300 °C de température de désolvatation; 100 l/h de gaz conique; 500 l/h de gaz de désolvatation. L'injection de 5µl de volume d'échantillons dans la colonne C18 et de débit de 250 ml/min, puis l'implication d'une étape isocratique 25% (v/v) d'ACN, puis l'implication d'une élution par gradient linéaire à 50% d'ACN pendant 30 min et à 90% d'ACN pendant 15 min (Muligan et al., 2014).

Un lavage de 500 l/h colonne est nécessaire pendant 0,1 min. Finalement, il doit rééquilibrée à 25% d'ACN pendant 30 min. la lyophilisation des fractions collectées se fait

directement et les lyophilisats sont conservés à -20 °C (Eddouaouda, 2012 ; Bezza et al., 2015).

D'après Bezza et Chirwa. (2015), l'étude de la tensioactif lipopeptide produit par *Panibacillus* CN5 peut être, éventuellement composé de 7 acides aminés Cys-Gly-Ala-Gly-Ile-Asn-Leu couplé à une fraction d'acide gras pentatriacontanoïque ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{33}\text{-COOH}$) qui obtenues sous formes des pics lorsque analysées par la méthode (LC-MS/MS) (figure 12).

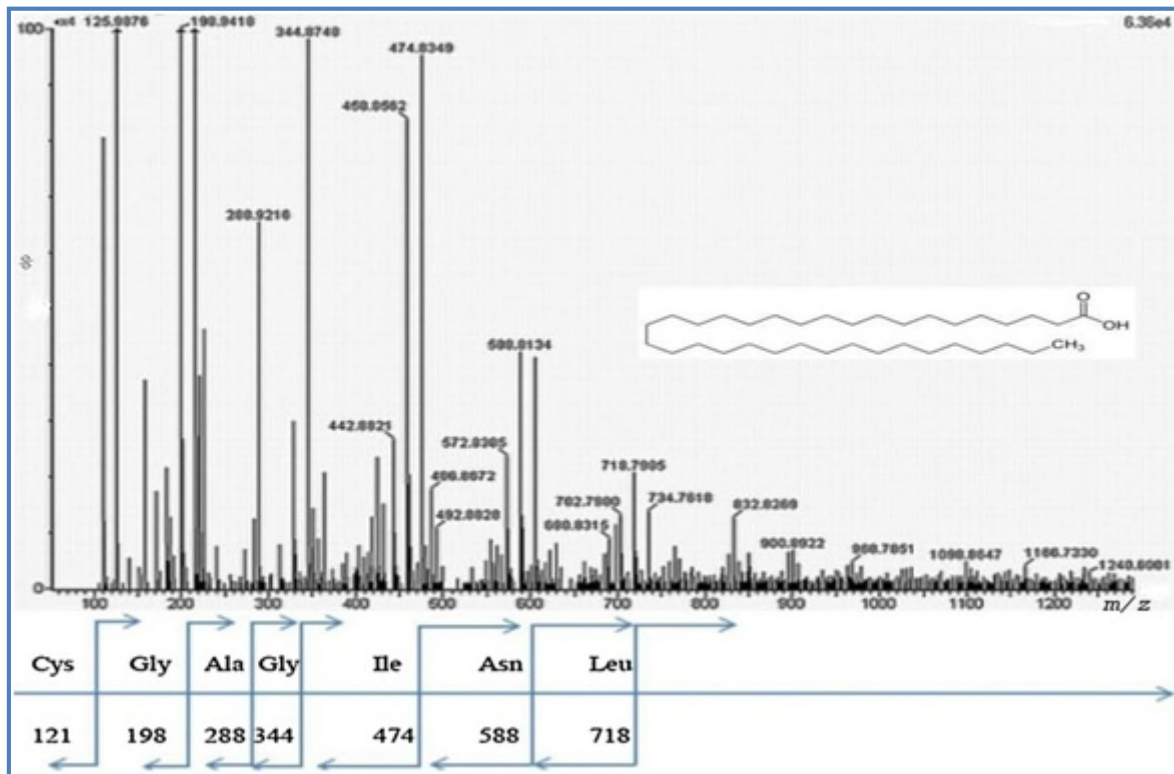


Figure 12: Spectre LC-MS/MS de lipopeptide élue avec un temps de rétention de 0,54 min (Bezza et Chirwa, 2015).

Conclusion

Cette étude est un travail de synthèse de différents travaux de recherche sur les biosurfactants qui deviennent une alternative des surfactants chimique grâce à leurs avantages biotechnologiques, environnementaux et industriels.

Dans un premier temps, il est important d'avoir une idée concernant l'isolement des bactéries dégradantes des hydrocarbures par la technique d'enrichissement en milieu minéral salé (MSM). Différentes techniques sont utilisées pour le criblage des souches productrices des biosurfactants tels que : le test d'hémolyse, le test de déplacement d'huile et l'activité d'émulsification (E_{24}).

L'approche phénotypique des souches bactériennes est indispensable dans la production du biosurfactant, qui reste limiter par le principe de dégradation qui fourni, aux bactéries non exigeantes et cultivables, tous les éléments nécessaires pour la mise en culture et le développement en présence d'une substance huileuse comme seule source de carbone.

Pour mieux comprendre la relation biosurfactants-souches, l'extraction des biosurfactants par les méthodes de précipitation acide et les méthodes d'extraction par solvants organiques à donné une opportunité pour approfondir les études sur les biosurfactant.

A cet effet, plusieurs techniques ont été exploité pour la caractérisation des biosurfactants bruts comme la technique de MALDI-TOF/MS, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et les différentes techniques de chromatographie tels que la LS-MS/MS, la GC/MS et la chromatographie sur couche mince (CCM).

A la lumière de cette étude, il est souhaitable de compléter cette étude par des expérimentations et des approches plus approfondies, plusieurs perspectives peuvent être dégagées à savoir :

- L'étude des propriétés physicochimiques des biosurfactants produit pour mieux connaitre leur nature, leur structure... etc.

- Réaliser des expériences par des substrats à faible coût comme l'huile de vidange, l'huile de friture ...etc., pour l'optimisation des paramètres de production des biosurfactants et des procédés de fermentation par des expériences adéquats pourraient être envisagées.

- Une approche moléculaire qui réalise des analyses qualitatives des souches isolées aiderait à déterminer le gène codant la production des biosurfactants pour les manipuler génétiquement et augmenter leur production.

- Enfin, il est souhaitable d'étudier d'autres paramètres de l'environnement (température, pH...etc.), et exploiter la production de biosurfactants dans des bioréacteurs à grande échelle dans la perspective d'améliorer les rendements de production en utilisant divers matières moins coûteux.

Références Bibliographiques

-A-

- Ali A. (2011).** Essai de réhabilitation d'un sol contaminé par les hydrocarbures à l'aide de tensioactifs obtenus par voie biologique. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Thèse de Magistère en Sciences Agronomiques : Sciences du sol. 99p.
- Ariech M. (2018).** Identification des *Archaea* halophiles isolés du Chott El Hodna-M'sila, productrices des biomolécules. Thèse de doctorat : Microbiologie. Université de Ferhat Abbas Sétif 1.114p.

-B-

- Banat I. M. (1995).** Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*. 51: 1-12.
- Banat I. M., Makkar R.S. et Cameotra S. S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
- Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J. et Marchant R. (2010).** Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87: 427–444.
- Bauer A.W, Serries J.C, Turck M., et Kirby W.M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am. J. Clin. Path.* 45: 493- 496.
- Bezza F.A. et Chirwa E.M.N. (2015).** Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. *Process Safety and Environmental Protection*. 9(8): 354–364.
- Bezza F.A., Mervyn Beukes M. et Chirwa E.M.N. (2015).** Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation, *Process Biochem.* 50(11): 1911-1922.
- Bhardwaj G., Cameotra S.S. et Chopra K.H. (2013).** Biosurfactants from Fungi. A Review. *J Pet Environ Biotechno.* 4(6): 1-6.

Bognolo G. (1999). Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons, Colloids and Surfaces. A: Physico-Chemical and Engineering Aspects. 152 (1-2): 41-52.

Boudoune M. R. et Boualem Y. (2018). Etude de la production de biosurfactants par des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire Master : Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri Constantine. 51p.

-C-

Cameotra S.S. et Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, Applied Microbiology and Biotechnology. 50(5): 520-529.

Cameotra S.S. et Makkar R.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 428-434.

Campos J.M., Stamford T.L.M., Sarubbo. L.A., Luna J.M., Rufino R.D. et Banat I.M. (2013). Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. Biotechnol. Prog. 29:1097-1108.

Castellazzi P. (2011). Répartition et comportement d'un surfactant amphotérique utilisé dans un procédé de décontamination de sols pollués par du plomb et des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire de master : Ingénieur environnement. Université du Québec. 125p.

Chandran P. et Das N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. International Journal of Engineering Science and Technology. 2(12): 6942-6953.

-D-

Das P., Mukherjee S. et Sen R. (2008). Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 25:1, 165-186.

Desai J. D. et Banat I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. and mol. Biol. Reviews. 61(1): 47-64.

Dhara P.S. et S.S. Cameotra. (2013). Biosurfactants in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 97:1005–1016.

Djebbar Y. et Sahel H. (2018). Optimisation de la production d'un biosurfactant issu d'une souche bactérienne isolée localement. Mémoire de Master. Université de Blida 1. 36p.

Djihed A. (2013). Criblage des souches productrices des biosurfactants. Mémoire de Master 2 : Pharmacie industrielle. Université de Saad Dahlab de Blida. 56p.

Dubeau D. (2009). Etude de la production de rhamnolipides par *Burkholderia*. Mémoire de master : Microbiologie appliqué. Université de Québec. 110-124p.

Dussault H.P. (1995). An Improved Technique For Staining Red *Halophilic Bacteria*. J.Bacteriol. 70(4): 484-485.

-E-

Eddouaouda K. (2012). Etude de potentiel biodégradatif de souches isolées de sol de Hassi Messoud contaminate par du pétrole : criblage, biodégradation de HAP et production de biosurfactant. Thèse de doctorat : chimie industrielle. Université de Blida. 209p.

Edwards D.A., Luthy R.G. et Liu Z. (1991). Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micellar nonionic surfactant solution, Environ.Sci.Technol. 25(1): 127-133.

-G-

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

Gevers D., Huys G. et Swings J. (2007). Bacterial diversity of East cultivated wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. Microb Ecol. 54 :452-459.

Guergouri I. (2010). Caractérisation des bactéries isolées de sols contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et productrices des biosurfactants. Mémoire de

Magistère en Microbiologie : Ecologie Microbienne. Université Mentouri de Constantine. 70-74p.

-H-

Hadj M.A. (2013). Etude des propriétés thermodynamique d'un surfactant. Mémoire de Master en chimie : chimie Macromoléculaire. Université Abou-Bakr Belkaid Tlemcen. 68p.

Hentati D. (2018). Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Thèse de doctorat : Biotechnologie et Microbiologie. Université de Montpellier. 322p.

Hultberg M., Bergstrand K.J., Khalil S. et Alsanis B. (2008). Characterisation of biosurfactant-producing strains of fluorescent *pseudomonads* in a soilless cultivation system. J. Antonie Van Leeuwenhoek. 94: 329-334.

-J-

Janek T., Lukaszewicz M. et Krasowska A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 110: 379-386.

Jemil N., Hmidet N., Ben Ayed H. et Nasri M. (2018). Physicochemical characterization of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides and their applications in enhancing diesel oil biodegradation. Process Safety and Environmental Protection. 117: 399-407.

-K-

Kannika C. (2003). Diversity of halophilic bacteria in saline soil at nong bo reservoir, Mahasarakham Province, Thailand. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Environmental Biology Suranaree. University of Technology. 20-56.

Kappeli O. et Finnerty W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol. 140: 707-712.

Kedidi A. (2014). Effets de salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence du gasoil. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah, Ouargla. 38p.

Kosaric N. et Sukan F.V. (2000). Biosurfactants. Encyclopedia Microbiol. 2e éd. 1: 618–635.

Kosaric N. et Sukan F.V. (2015). Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. 1st Edition. International Standard Book Number-13 : 978-1-4665-9670-2. 389p.

-L-

Laabei M., Jamieson W.D., Lewis S.E., Diggle S.P. et Kenkins T.A. (2014). A new assay for rhamnolipid detection- important virulence factors for *Pseudomonas aeruginosa*. Applied microbiology and biotechnology. 98(16): 7199-7209.

Lee D.W., Lee H., Kwon B., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S. et Kim J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. Environmental Pollution. 241- 254-264.

Lotfabada T.B., Abassi H., Ahmadkhanhac R., Roostaazada R., Masoomi F., Zahiri H. S., Ahmadianb G., Vali H. et Noghabi K.A. (2010). Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 81, 397–405.

-M-

Marchal N. et Bourdon J.L., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. 2^e èd. Doin, Paris. 482p.

Marchant R. et Banat. I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology. 30(11): 558-565.

Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A. et Espuny M.J. (2009). The Physicochemical Properties and Chemical Composition of

Trehalose Lipids Produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. Chem. Phys. Lip. 158: 110–117.

Mata-Sandoval J.C, Karns J. et Torpents A. (2000). The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. Rev.Int. Contam.Ambient. 16(4) : 193-203.

Mokdad K. (2015). Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants isolées localement optimisation de la production et caractérisation de biosurfactants en vue d'une application en agroalimentaire. Mémoire de Master en sciences agronomiques : Nutrition et transformation des aliments. Université de Blida. 1. 94 p.

Mulligan C.N., et Gibbs B.F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. Proceedings of the Indian National Science Academy Part B. 70(1): 31–56.

Mulligan C.N., Sharma S.K. et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants: research trends and applications. CRC press. 321p.

Mouafo T.H., Mbawala A., Ndjouenkeu R. (2018). Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants Production by Three Strains of *Lactobacillus spp.* Hindawi BioMed Research International. 15p.

Mouffok M., MESLI A., Abdelmalek I. et Gontier E. (2016). Effect of the formulation parameters on the encapsulation efficiency and release behavior of p-aminobenzoic acid-loaded ethylcellulose microspheres. J. Serb. Chem. Soc. 81 (10) 1183–1198 p.

-N-

Nasr S., Soudi M.R., Mehrnia M.R. et Sarrafzadeh M.H. (2009). Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp.* isolated from petroleum contaminated soil. Iran. J. Microbiol. 2(1) : 54-61.

Nocon C. (2013). Evaluation des performances du spectromètre de masse MALDI TOF Microflex LT Bruker comparées à celles du spectromètre Vitek MS Biomérieux et démarche d'accréditation. Thèse de Doctorat. Université du droit et de la sante – Lille. 148p.

Noparat P., Maneerat S. et Saimmai A. (2014). Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(3): 865-877.

-P-

Pattanathu K.S. et Gakpe E. (2008). Production, characterization and applications of biosurfactans - review. *Biotechnology*, 7(2):360-370.

Pereira J.F.B., Gudiña E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J.A., Coutinho J.A.P. et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*. 111: 259–268.

Plociniczak P.M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z. et Cameotra S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12 : 633-654.

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

-R-

Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J. et Oliveira R. (2006). Biosurfactants: Potential Applications In Medicine, *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 57(4): 609-618.

Ron E.Z. et Rosenberg E. (2002). Biosurfactants and oil remediation, *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 249-252.

Ronald M. (1997). Handbook of microbiological media. 2e éd. ATLAS CRC.

-S-

Sandoval J.C., Karns J. et Torrents A. (2000). Effet of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environ.Sci.Technol.* 34(23): 4923-4930.

- Santos D.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A. et Sarubbo L.A. (2013).** Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 105: 43–50.
- Santos D.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A. et Sarubbo L.A. (2016).** Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 401.
- Satpute S.K., Bhawsar B.D., Dhakephalkar P.K. et Chopade B.A. (2008).** Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*. 37: 243-250.
- Satpute S.K., Plaza G.A. et Banpurkar A.G. (2017).** Biosurfactants production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. 1 (25) : 46-54 p.
- Selmoun M. et Benkhebeche D.E. (2016).** Contribution à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures dans les boues de forage par des bactéries productrices de biosurfactants. Mémoire de Master : Ecologie Microbienne. Université des Frères Mentouri Constantine. 46 p.
- Sharma D., Ansari M.J., Gupta S., Alghandi A., Pruthi P. et Pruthi V. (2015).** Structural Characterization and Antimicrobial Activity of a Biosurfactant Obtained From *Bacillus pumilus* DSVP18 Grown on Potato Peels. *Jurdishapur journal of microbiology*. 8(9): 21257.
- Shoeb E., Akhlaq F., Badar U., Akhter J. et Imtiaz S. (2013).** Classification and industrial applications of biosurfactants. *Academic Research International*. 4(3): 243.
- Singleton D.R. (1999).** Bactériologie, Edition Duonod 4^{ème} édition. Paris. 415 p.
- Singleton D.R., Furlong M.A., Rathbun S.L. et Whitman W.B. (2001).** Quantitative comparaisons of 16S RNA gene sequence libraries from environnementale sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4374-4376.
- Slimani A. et Taleb N. (2018).** Isolement des Souches Productrices des Biosurfactants. Mémoire de Master : Microbiologie appliqué. Université de Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent. 66p.

Smyth T.J.P., Perfumo A., Mclean S., Marchant R. et Banat I.M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springe. 3688-3704

Sobrinho H.B.S., Luna J.M., Rufino R.D., Porto A.L.F. et Sarubbo L.A. (2013). Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications. In Recent Developements in Biotechnology, 1st éd. Studium Press LLC: Houston, TX, USA. 11: 1-29.

-T-

Tabatabaee A., Mazaheri A.M., Noohi A.A. et Sajadian V.A. (2005). Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. Iranian J Env Health Sci Eng, 2(1): 6-12.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumer S., (2011). Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731–2739.

Thavasi R., Subramanyam V.R.M., Nambaru J. S., Balasubramanian T. et Banat I.M. (2009). Biosurfactant Production by *Azotobacter chroococcum* Isolated from the Marine Environment. Mar Biotechno. 11: 551–556.

-V-

Van-Veen S. Q., Claas E. C. J. et Kuijper E. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of clinical microbiology. 48(3): 900-907.

Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N. et Cameotra S.S. (2002). Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. Appl. Environ. Microbiol. 68: 6210-6219.

Vijayakumar S. et Saravanan V. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. Res. J. Microbiol. 10 (5): 181-192.

-W-

Winker S. et Woese C.R. (1991). A definition of the domains *Archae*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA. *Characteristics Systematic and Applied Microbiology*. 14(4): 305- 310.

Wise D.L. (1997). *Global environmental biotechnology*. 1st Edition. Elsevier Science. 66. 791p.

-Y-

Yakimov M.M., Timmis K.N., Wray V. et Fredrickson H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1706–1713.

Yalaoui-Guellal D. (2017). Production des biosurfactants par des souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments du bassin versant de la Soummam de Bejaia, Algérie. Thèse de doctorat : Microbiologie. Université A. Mira-Bejaia. 126p.

Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat I. M. et Madani K. (2018). Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 37(1): 189-195.

-Z-

Zenati B. (2018). Étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole. Thèse de doctorat : Chimie Industrielle. Saad Dahlab Blida1. 186 p.

Zhang X., Xu D., Zhu C., Lundaa T. et Scherr K.E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*. 209 : 138–146.4.

Annexes

Annexe 01 : Les milieux de culture

Tous les ingrédients sont additionnés d'eau distillée (q.s.p 1000 ml), et bien mélangées et chauffées doucement jusqu'à la dissolution puis le pH est ajusté. Ces milieux sont stériles à 120°C pendant 20 minutes. Pour solidifiées les milieux de cultures, il suffit d'ajouter l'agar agar à une quantité suffisante (Ronald, 1997).

➤ **R.M.V.P. (Rouge de Méthyl + Voges Prokauer)(g/l)**

Peptone.....	5,0g
Glucose.....	5,0g
Di-potassium phosphate.....	5,0g
NaCl.....	200g
pH=7.5 ± 0.2 à 25°C	

➤ **Milieu à base de la gélatine (g/l)**

Gélatine.....	240g
Extrait de viande.....	3,0g
Peptone.....	5,0g
NaCl.....	200g
pH=6.8 ± 0.2 à 25°C	

➤ **Milieu Mueller-Hinton II (g/l)**

Hydrolysate de caséine.....	17,5g
Extrait de viande.....	2,0g
Amidon.....	1,5g
NaCl.....	200g
Agar.....	17,0g
pH=7.3 ± 0.2 à 25°C	

➤ **Tryptone (g/l)**

Tryptone.....	15,0g
Agar.....	15,0g
Peptone papainique de soja.....	5,0g
Chlorure de sodium.....	5,0g
pH=7.3 ± 0.2	

➤ **Milieu Salé Minéral (MSM)**

NaCl.....	30g
KH ₂ PO ₄	2,0g
NH ₄ NO ₃	1,0g
Na ₂ HPO ₄	3,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,7g
Solution de traces d'éléments.....	1,0ml
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH = 7,2 ± 0,2	

➤ **Solution de traces d'éléments minéraux**

ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	10mg
CuSO ₄ .H ₂ O.....	0,50mg
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,50mg
CaCl ₂	20mg
FeCl ₃	30mg
Eau distillée qsp.....	1000ml

Annexe 02 : Les réactifs➤ **Réactif de l'anthrone**

Anthrone.....	0,125mg
H ₂ SO ₄	63ml
Eau distillée	25ml

➤ **Réactif de ninhydrine**

Ninhydrine.....	0,35g
Acétone	100ml

➤ **Rouge de phénol 0.02%**

Rouge de phénol.....	2,00g
Ethanol.....	500ml
Eau distillée.....	1000ml

➤ **Kovacs**

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde.....	50,0g
Acide chlorhydrique.....	250g
Pentanol I.....	750ml

➤ **Molish**

Naphtol.....	0,25g
Ethanol à 0.95.....	50ml
H ₂ SO ₄ à 20%	50ml

➤ **Rouge de méthyl**

Rouge de méthyl.....	0,1g
Ethanol 95%.....	300ml
Eau distillée.....	500ml

➤ **Voges-Proskauer A**

α-naphtol.....	10,0g
Ethanol à 0.95.....	100ml

➤ **Voges-Proskauer B**

KOH.....	20,0g
Ethanol à 0.95.....	100ml

➤ **Acétate de plomb**

Anhydre.....	3,25g
Trihydrate.....	2,55g
Décahydrate.....	1,69g
Eau distillée qsp.....	1000ml

➤ **Solution d'iode**

Iode.....	10g
Iodure de potassium.....	20g
Eau distillée qsp.....	1000ml

Résumé : Dans le cadre de cette étude, nous avons traité les informations sur les biosurfactants qui sont considérés comme un alternatif biologique des surfactants chimiques grâce à leurs propriétés biotechnologiques, environnementales et industrielles. L'isolement des souches bactériennes productrices des biosurfactants est souvent réalisé par la technique d'enrichissement sur le milieu minéral salé (MSM). La mesure de la production des biosurfactants est effectuée par plusieurs méthodes telles que le test d'hémolyse, la méthode d'étalement d'huile, le test d'hydrophobicité, la mesure de la tension de surface et de l'indice d'émulsification (E_{24}). L'optimisation de la production des biosurfactants dépend des facteurs environnementaux (la régulation de pH et la température...), des conditions exigées de fermentation, et la disponibilité des nutriments qui estiment l'amélioration de ces biomolécules. Des méthodes quantitatives et qualitatives sont utilisées avec un détail approprié pour l'extraction des biosurfactants par solvants ou par précipitations acide. À cet effet, l'identification est assemblée pour la caractérisation en utilisant des techniques d'analyses avancées comme la technique de MALDI-TOF/MS, la chromatographie sur couche mince (CCM), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et la spectrométrie de masse en tandem couplée à une analyse par chromatographie liquide (LC – MS/MS).

Mots clés : Biosurfactants, Test d'hémolyse, Indice d'émulsification, Techniques de caractérisation.

Abstract: in the framework of this study, we have treated the information on biosurfactants which are considered as a biological alternative to chemical surfactants for the benefit to their biotechnological, environmental and industrial properties. Isolation of bacterial strains producing biosurfactants is often achieved by enrichment technique on the salt mineral medium (MSM). The measurement of the production of biosurfactants is investigated by several methods such as the hemolysis test, the oil spreading method, the hydrophobicity test, the measurement of the surface tension and the emulsification index (E_{24}). The optimization of biosurfactants production is dependent on environmental factors (pH and temperature regulation ...), the required fermentation conditions, and the availability of nutrients which estimate the improvement of these biomolecules. Quantitative and qualitative methods are used with appropriate detail for the extraction of biosurfactants by solvents or by acid precipitation. For this purpose, the identification is assembled for characterization using advanced analytical techniques such as MALDI-TOF /MS technique, thin layer chromatography (TLC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), chromatography in gas phase coupled with mass spectrometry (GC /MS) and tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography analysis (LC - MS /MS).

Keywords: Biosurfactants, Hemolysis test, Emulsification index, Characterization techniques.

ملخص : في إطار هذه الدراسة ، تناولنا معلومات عن المواد الحيوية الخافضة للتوتر السطحي (Biosurfactants) والتي تعتبر بديلاً بيولوجياً للمواد الخافضة للتوتر السطحي الكيميائية بفضل خصائصها التقنية الحيوية والبيئية والصناعية. غالباً ما يتم عزل السلالات البكتيرية التي تنتج مواد خافضة للتوتر السطحي بواسطة تقنية التخصيب بوسط الملح المعدني (MSM). يتم قياس إنتاج المواد الخافضة للتوتر الحيوي بعدة طرق مثل اختبار انحلال الدم، وطريقة نشر الزيت، واختبار مقاومة الماء، وقياس التوتر السطحي، ومؤشر الاستحلاب (E_{24}). يعتمد تحسين إنتاج الفاعل بالسطح الحيوي على العوامل البيئية (تنظيم درجة الحموضة ودرجة الحرارة ...)، وظروف التخمير المطلوبة، وتوافر العناصر الغذائية التي تقدر تحسين هذه الجزيئات الحيوية. الطرق الكمية والنوعية التي يتم تنفيذها مع التفاصيل المناسبة لاستخراج المواد الخافضة للتوتر السطحي بالمذيبات أو عن طريق الترسيب الحمضي. لهذا الغرض، يتم تجميع التعريف للتوصيف باستخدام تقنيات تحليلية متقدمة مثل تقنية MALDI-TOF / MS، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه (FTIR)، كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب مطياف الكتلة (GC / MS) وقياس الطيف الكتلي الترادفي إلى جانب التحليل الكروماتوغرافي السائل (LC - MS / MS).

الكلمات المفتاحية : المواد الحيوية، اختبار انحلال الدم، مؤشر الاستحلاب، تقنية التوصيف.