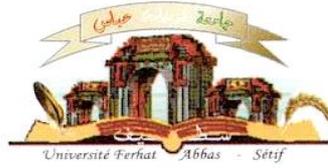


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°...../SNV/2018

**THÈSE**

Présentée par

**ARIECH Mounira**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: MICROBIOLOGIE**

**THÈME**

**Identification des *Archaea* halophiles isolés du Chott El Hodna-  
M'sila, productrices des biomolécules.**

Soutenue publiquement le : 07/01/2018

DEVANT LE JURY

Président	<b>HARZALLAH Daoud</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>GUECHI Abdelhadi</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>DEHIMAT Laid</b>	<b>Pr. UFM Canstantine 1</b>
	<b>KACEM-CHAUCHE Noureddine</b>	<b>Pr. UFM Canstantine 1</b>
	<b>MIHOUBI Ithem</b>	<b>Pr. UFM Canstantine 1</b>
	<b>MEZAACHE Samia</b>	<b>MCA. UFA Sétif 1</b>

*Laboratoire de microbiologie appliquée*

## Remerciements

Ce travail n'aurait jamais vu le jour, sans la volonté du bon **DIEU**, le tout puissant qui m'a offert santé, force, courage, volonté et surtout de la patience pour surmonter les difficultés qui m'ont confronté durant la réalisation de ce travail de thèse .

C'est avec un immense plaisir et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes ayant soutenu et apprécié mon travail.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Professeur **GUECHI Abdelhadi**, pour m'avoir appris à être autonome tout au long de ce travail de recherche, Nonobstant, La version finale de cette thèse a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques précieuses.

Au cours de ces années, il m'a toujours encouragé pour aller plus loin dans mon travail de recherche. Sincèrement, je le remercie pour la confiance et la compréhension qu'il a toujours manifestées à mon égard.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury.

le Professeur **HARZALLAH Daoud** qui a accepté d'en être le président ; les Professeurs **DEHIMAT Laid** , **KACEM-CHAOUICHE Noureddine**, **MIHOUBI Ilhem** et **MEZAACHE Samia** qui font parti de ce jury en tant que des examinateurs.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente « Quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Mes plus profonds remerciements vont à **mes parents** ; tout au long de mon cursus, ils m'ont toujours soutenu, encouragé et aidé. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Un clin d'oeil aux **deux chers frères Walid** et **Bilel** et à mes **chères soeurs Nabila** et **affef**.

L'aboutissement de cette thèse a aussi été encouragé par de nombreuses discussions de tout ordre avec des collègues de disciplines variées ;

Un merci chaleureux aux chers collègues des départements de Microbiologie & Biochimie , des SNV et du TC de l'université Mohamed BOUDIAF de M'sila, qui chacun d'entre eux m'a poussé par une manière ou autre d'être ce que je suis.

Un merci très particulier à mon collègue le **Dr. TOUMATIA Omrane**, maître de conférence en microbiologie à l'université d'alger qui m'a sorti la tête de l'eau plusieurs fois, sans oublier bien sûr les encouragements de mon collègue à l'université de M'sila le **Dr. GUETOUACHE Mourad**. Que DIEU les protège ;

Un merci chaleureux au **Dr. SARI Madani** pour son aide et ses encouragements sans cesse.

Je remercie aussi mes collègues : le **Dr. BENSACI Ettayeb**, le **Dr. NOUIDJEM Yacine** et le **Dr. MIMECHE Fateh** pour leurs encouragements et leurs soutiens, ils m'ont jamais dit, on ne peut pas vous aider.

Un grand merci au personnel des laboratoires de microbiologie et de biochimie de l'Université Mohamed BOUDIAF - M'sila, **sans exception et chacun par son nom**, pour son efficacité et son soutien, notamment le chef des laboratoires **Monsieur SEGHIRI Kamel**, pour son compréhension.

Une pensée très affectueuse au **Dr. Kebbouche-Gana Salima**, pour ses conseils et pour m'avoir orienté au début de cette thèse, vraiment, vous m'avez illuminé le chemin au fond du tunnel.

Mes remerciements vont également aux **Monsieurs BENDJELLOULI Mustapha, ZEROUAL Bourhane** et à **madame BOUDERDOUR Mouna** et tout le personnel ainsi que les chercheurs qui m'ont accueilli avec toute gentillesse et qui ont été très efficaces pour l'obtention des résultats fiables des tests réalisés au centre de recherche en biotechnologie de Constantine ;

Je remercie vivement le **Dr. SPRÖER Cathrin**, le **Dr. VERBARG Susane** et le **Dr. SCHUMANN Peter**, chercheurs au service des microorganismes de DSMZ (Allemagne) pour toutes les facilités accordées pour réaliser des compléments de travaux afin d'identifier les souches actives et pour leurs compétences scientifiques très élevées et ses qualités humaines en échangeant de temps en temps des conversations.

Un merci affectueux aux chers étudiants et étudiantes qui m'ont toujours entouré de l'amour et du respect mutuel

Encore un grand merci à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable.

*Mounira ARIECH*

## Dédicace

Je dédie ce travail à :

✚ Mon père **Mohamed**,

« Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter.

Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal »

✚ Mon adorable **mère Farida**,

« Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour »

✚ Mes très chers frères Walid et Bilal et ma très chère soeur Nabila et affef,

« pour leur disponibilité à tout temps, leur soutien de toutes formes, et leur encouragement incessant »

✚ Ma famille à Biskra spécialement, mon oncle Naceur et ma tante Zahia et leurs enfants ; Ma tante Souhila et sa petite famille.

✚ Mes biens aimés élèves ;

✚ Mes chers étudiants et étudiantes ;

✚ Mes amies et mes collègues de travail ;

✚ Mes enseignants du primaire à l'université.

*Mounira ARIECH*

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	I
LISTE DES ABREVIATIONS.....	VII
INDEX DES FIGURES.....	VIII
INDEX DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	XIII
ملخص.....	XIV
RESUME.....	XV
ABSTRACT.....	XVI

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I. *Archaea* halophiles

I.1. Généralités et caractéristiques spécifiques des <i>Archaea</i> halophiles.....	5
I.2. Stratégies spécifiques des <i>Haloarchaea</i> pour l'adaptation aux stress environnementaux..	12
I.2.1. Faible activité en eau ( $a_w$ ), stress salin et dessiccation.....	12
I.2.2. Formation des sphères dans les inclusions liquides.....	15
I.2.3. Environnements oligotrophiques.....	16
I.2.4. Résistance aux radiations.....	17
I.2.5. Déficience en oxygène.....	18
I.3. Taxonomie de la famille des <i>Halobacteriaceae</i> (jusqu'à Février 2014).....	18
I.4. Nomenclature.....	19
I.5. Phylogénie des <i>Haloarchaea</i> .....	19
I.6. Méthodes de détermination des nouveaux membres de la famille des <i>Halobacteriaceae</i>	20
I.7. Applications biotechnologiques des <i>Haloarchaea</i> .....	22
I.7.1. Enzymes.....	22
I.7.1.1. Glycosidases.....	22
I.7.1.2. Lipases.....	22
I.7.1.3. Protéases.....	23
I.7.2. Archaeosomes et lipides des <i>Haloarchaea</i> .....	23
I.7.3. Production des biosurfactants.....	24
I.7.4. Production des halocines.....	24
I.7.5. Production des biopolymères (PDG), (PHA) et (PHB).....	24

I.7.6. Dégradation des hydrocarbures..... 25

**Chapitre II. Biosurfactants**

II.1. Surfactants..... 26

II.2. Biosurfactants..... 27

II.3. Types des biosurfactants..... 28

II.3.1. Glycolipides..... 29

II.3.2. Lipopeptides et lipoprotéines..... 30

II.3.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres..... 30

II.3.4. Biosurfactants polymériques..... 30

II.3.5. Biosurfactants particuliers..... 32

II.4. Microorganismes producteurs des biosurfactants..... 32

II.5. Rôles physiologiques des biosurfactants dans les microorganismes..... 33

II.6. Avantages des biosurfactants..... 33

II.7. Inconvénients des biosurfactants..... 34

II.8. Facteurs qui influencent la production des biosurfactants..... 34

II.8.1. Source de carbone..... 34

II.8.2. Source d’azote..... 34

II.8.3. Facteurs environnementaux..... 35

II.8.4. Aération et agitation..... 35

II.8.5. Concentration en sel..... 35

II.9. Propriétés fonctionnelles des agents tensio-actifs..... 36

II.10. Applications des biosurfactants..... 38

II.10.1. Applications dans l’environnement..... 38

II.10.2. Application des biosurfactants dans l’agriculture..... 39

II.10.3. Application des biosurfactants dans l’industrie cosmétique..... 41

II.10.4. Application des biosurfactants dans l’industrie des transformations alimentaires..... 41

II.10.5. Biosurfactants comme biopesticide..... 41

II.10.6. Application des biosurfactants en médecine..... 41

II.10.6.1. Activité antimicrobienne..... 41

II.10.6.2. Activité anti-cancéreuse ..... 42

II.10.6.3. Comme agents antiadhésives..... 42

II.10.6.4. Adjuvants immunologiques..... 42

II.10.6.5. Activité antivirale..... 42

II.10.6.6. Autres.....	43
<b>Chapitre III. Matériels et méthodes</b>	
III.1. Coordonées géographiques et description de la zone d'étude.....	45
III.2. Isolement des <i>Haloarchaea</i> .....	46
III.2.1. Prélèvements.....	46
III.2.2. Mise en culture et isolement.....	46
III.2.3. Purification et conservation des isolats.....	46
III.3. Screening des isolats producteurs des biosurfactants.....	46
III.3.1. Test de l'effondrement de la goutte.....	47
III.3.2. Test de dispersion de l'huile.....	47
III.3.3. Test d'emulsification.....	47
III.3.4. Mesure de la tension superficielle.....	48
III.4. Analyse statistique de la corrélation entre les différents tests.....	48
III.5. Détermination des propriétés des biosurfactants.....	48
III.5.1. Localisation des biosurfactants.....	48
III.5.2. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC).....	48
III.5.3. Etude de la relation entre la variation de la densité optique, l'index d'emulsification et la tension superficielle.....	48
III.5.4. Détermination de la stabilité de l'émulsion.....	49
III.6. Optimisation des conditions de production des biosurfactants.....	49
III.6.1. Mesure des paramètres.....	49
III.6.2. Optimisation des conditions physicochimiques.....	50
III.6.2.1. Effet du pH.....	50
III.6.2.2. Effet de la température.....	50
III.6.2.3. Effet de l'agitation.....	50
III.6.2.4. Effet de NaCl (%).....	50
III.6.2.5. Effet de MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (M).....	50
III.6.3. Optimisation des conditions nutritionnelles.....	50
III.6.3.1. Effet de la source de carbone.....	50
III.6.3.2. Effet de la source d'azote.....	51
III.7. Extraction et identification des biosurfactants.....	51
III.7.1. Extraction des biosurfactants.....	51
III.7.2. Identification des biosurfactants.....	51

III.7.2.1. Caractérisation préliminaire des biosurfactants produits par chromatographie sur couches mince (CCM) .....	51
III.7.2.2. Analyse des acides gras par GC-MS.....	52
III.8. Etude de la faisabilité de l'utilisation des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, pour la dépollution des sables contaminées par le pétrole brut .....	53
III.8.1. Polluant organique choisi.....	53
III.8.2. Choix de la nature des sols « les sables des côtes ».....	53
III.8.3. Application des tensioactifs chimiques et des biosurfactants dans l'élimination du Pétrole des sables contaminés après agitation.....	55
III.9. Caractérisation des isolats.....	55
III.9.1. Caractérisation phénotypique.....	55
III.9.2. Caractérisation physiologique.....	55
III.9.2.1. Détermination de la concentration optimale pour la croissance en NaCl.....	56
III.9.2.2. Détermination de la concentration optimale en ions $Mg^{2+}$ .....	56
III.9.2.3. Détermination du pH optimum de croissance.....	56
III.9.2.4. Détermination de la température optimale de croissance.....	56
III.9.3. Tests biochimiques.....	56
III.9.3.1. Métabolisme respiratoire.....	56
III.9.3.1.1. Catalase.....	56
III.9.3.1.2. Oxydase .....	56
III.9.3.1.3. Nitrate réductase.....	57
III.9.3.2. Métabolisme glucidique.....	58
III.9.3.2.1. Test de R.M.V.P. (Etude des différentes voies fermentatives).....	58
III.9.3.2.2. Assimilation des glucides.....	58
III.9.3.2.3. Dégradation de l'amidon.....	58
III.9.3.3. Métabolisme protéique.....	59
III.9.3.3.1. Test de l'utilisation des acides aminés.....	59
III.9.3.3.2. Formation de l'indole.....	59
III.9.3.3.3. Production de l' $H_2S$ .....	59
III.9.3.3.4. Dégradation de la gélatine.....	59
III.9.3.4. Métabolisme lipidique.....	59
III.9.3.5. Sensibilité aux antibiotiques.....	59
III.9.4. Chimiotaxonomie.....	60
III.9.4.1. Extraction des lipides polaires.....	60

III.9.4.2. Analyse des lipides polaires.....	60
III.9.5. Caractérisation génotypique.....	61
III.9.5.1. Extraction de l'ADN génomique.....	61
III.9.5.2. Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S par PCR.....	62
III.9.5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	63
III.9.5.4. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S.....	63
III.9.5.5. Alignement des séquences et étude phylogénétique.....	64

### Chapitre IV. Résultats et discussions

IV.1. Isolement des <i>Haloarchaea</i> .....	65
IV.2. Screening de la production des biosurfactants.....	65
IV.2.1. Test de l'effondrement de la goutte.....	65
IV.2.2. Test de dispersion de l'huile.....	66
IV.2.3. Test de stabilité de l'émulsion.....	67
IV.2.4. Test de la mesure direct de la tension superficielle.....	68
IV.3. Résultats des analyses statistiques de la corrélation entre les différents tests.....	69
IV.4. Détermination des propriétés des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5.....	70
IV.4.1. Localisation des biosurfactants.....	70
IV.4.2. Détermination de la CMC.....	70
IV.4.3. Etude de la relation entre DO, ES%, TS et pH..	72
IV.4.4. Détermination de la stabilité des émulsions.....	74
IV.4.4.1. Effet de pH.....	74
IV.4.4.2. Effet de la température.....	74
IV.4.4.3. Effet de NaCl.....	74
IV.5. Optimisation des conditions de production des biosurfactants.....	75
IV.5.1. Optimisation des paramètres physico-chimiques.....	76
IV.5.1.1. Effet du pH.....	76
IV.5.1.2. Effet de la température.....	76
IV.5.1.3. Effet de l'agitation.....	76
IV.5.1.4. Effet de NaCl.....	76
IV.5.1.5. Effet de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	77
IV.5.2. Optimisation des paramètres nutritionnelles (source de carbone et source d'azote).....	77

IV.5.2.1. Source de carbone.....	77
IV.5.2.2. Source d'azote.....	78
IV.6. Détermination de la nature des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5.....	84
IV.7. Application des biosurfactants dans l'élimination du pétrole adsorbé par le sable.....	89
IV.7.1. Comparaison de l'efficacité de l'élimination du pétrole des sables contaminés par les biosurfactants et les surfactants chimiques.....	91
IV.7.2. Influence du temps de contact sur l'efficacité de l'élimination du pétrole des sables contaminés.....	91
IV.7.3. Comparaison de l'efficacité du mout de fermentation (présence des cellules bactériennes) et les différentes concentrations des biosurfactants.....	91
IV. 8. Etude taxonomique des isolats producteurs des biosurfactants.....	93
IV. 8.1. Caractères morphologiques.....	93
IV. 8.2. Caractères physiologiques des isolats CH2 et CH5.....	94
IV. 8. 2.1. Tolérance à NaCl.....	94
IV. 8. 2.2. Tolérance au Mg <sup>2+</sup> .....	97
IV. 8. 2.3. Tolérance à la température et au pH.....	99
IV. 8.3. Caractères biochimiques.....	102
IV. 8.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	103
IV. 8.5. Chimiotaxinomie : analyse des lipides polaires membranaire.....	105
IV. 8.6. Etude moléculaire.....	107
<b>Conclusion générale</b>	111
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	I-XV
<b>ANNEXES</b>	i- viii
<b>PUBLICATION</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ANOVA</b>	Analysis of variance.
<b>ATCC</b>	American type culture collection.
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool.
<b>CE50</b>	Concentration efficace pour diminuer 50 % de la population testée.
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique.
<b>CNRC-1</b>	Conseil national de recherches Canada-1.
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.
<b>IBM</b>	International Business Machines Corporation.
<b>IMG</b>	Integrated Microbial Genomes.
<b>MEGA</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis.
<b>NCBI.</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NCIMB</b>	National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria.
<b>PhyEco</b>	Phylogenetic and phylogenetic ecology.
<b>PhyML</b>	Phylogenetic maximum likelihood.
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences.

## INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Exemples des milieux hyper salins en Algérie.....	6
<b>Figure 2.</b>	Espèces représentatives de la famille des <i>Halobacteriaceae</i> .....	6
<b>Figure 3.</b>	Cheminement des protons à travers la membrane via la bactériorhodopsine.	7
<b>Figure 4.</b>	Colonies de <i>Halobacterium salinarum</i> (a), cellules de <i>H.Salinarum</i> produisant des vésicules gazeuses (b, c).....	7
<b>Figure 5.</b>	Model schématique de l'enveloppe cellulaire des <i>Archaea</i> halophiles.....	8
<b>Figure 6.</b>	Comparaison des lipides polaires entre les bactéries, les archées et les eucaryotes.....	9
<b>Figure 7.</b>	Structure de l'archéol.....	10
<b>Figure 8.</b>	Structure des lipides polaires (phospholipides et glycolipides), constituants essentiels des membranes plasmiques archéennes.....	10
<b>Figure 9.</b>	Schéma explicatif représentant l'osmoadaptation des <i>Haloarchaea</i> .....	14
<b>Figure 10.</b>	Structure tétramétrique de la HMDH.....	15
<b>Figure 11.</b>	Balayage au microscope électronique d'un bâtonnet (à gauche) et des sphères (à droite) de <i>Halobacterium</i> du CNRC-1.....	16
<b>Figure 12.</b>	Arbre phylogénétique des <i>Haloarchaea</i> .....	21
<b>Figure 13.</b>	(a) Représentation d'une molécule de surfactant avec sa chaîne aliphatique hydrophobe et sa tête polaire hydrophile. (b) Placement des surfactants à une interface eau/air. Les têtes polaires se mettent dans l'eau alors que les queues fuient l'eau.....	26
<b>Figure 14.</b>	Illustration de la région dans laquelle commence la formation de la concentration micellaire critique (CMC).....	27
<b>Figure 15.</b>	Structures biochimiques des biosurfactants les plus produits par les microorganismes.....	31
<b>Figure 16.</b>	Représentation des différentes propriétés fonctionnelles des Biosurfactants..	36
<b>Figure 17.</b>	Mécanisme d'élimination des métaux lourds par les biosurfactants.....	40
<b>Figure 18.</b>	Amélioration du mécanisme de récupération du pétrole par les biosurfactants.....	40
<b>Figure 19.</b>	Localisation géographique du Chott El Hodna et les sites des prélèvements de sol.....	45
<b>Figure 20.</b>	Illustration du procédé de contamination et de lavage des sables.....	55
<b>Figure 21.</b>	Test de dispersion de l'huile.....	67
<b>Figure 22.</b>	Test de stabilité de l'émulsion (ES%).....	68

<b>Figure 23.</b>	Test de mesure de la tension superficielle.....	68
<b>Figure 24.</b>	La tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration du biosurfactant produit par l'isolat CH2.....	71
<b>Figure 25.</b>	La tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration du biosurfactant produit par l'isolat CH5.....	71
<b>Figure 26.</b>	Cinétique de croissance de CH2 sur milieu SG.....	73
<b>Figure 27.</b>	Cinétique de croissance de CH5 sur milieu SG.....	73
<b>Figure 28.</b>	Effet du pH, de la température et de la salinité sur la stabilité des émulsions.....	74
<b>Figure 29.</b>	Effet du pH du milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	79
<b>Figure 30.</b>	Effet de la température d'incubation sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	79
<b>Figure 31.</b>	Effet de l'agitation sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	80
<b>Figure 32.</b>	Effet des différentes concentrations en NaCl (%), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5..	80
<b>Figure 33.</b>	Effet des différentes concentrations en MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O (M), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	81
<b>Figure 34.</b>	Effet des différentes sources de carbone, ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	81
<b>Figure 35.</b>	Effet des différentes concentrations du gasoil (%), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5..	82
<b>Figure 36.</b>	Effet des différentes sources d'azote, ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	82
<b>Figure 37.</b>	Effet des différentes concentrations d'extrait de levure (g/l), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	83
<b>Figure 38.</b>	Chromatogramme présentant la détermination préliminaire de la nature biochimique des biosurfactants produits par les deux isolats CH2 et CH5.....	85
<b>Figure 39.</b>	Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par l'isolat CH2.....	86
<b>Figure 40.</b>	Structures des composés majeurs des biosurfactants produits par l'isolat	

	CH2.....	86
<b>Figure 41.</b>	Structures de quelques composés mineurs d'importance détectés dans les extraits des biosurfactants produits par l'isolat CH2.....	87
<b>Figure 42.</b>	Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par l'isolat CH5.....	88
<b>Figure 43.</b>	Structures des composés majeurs des biosurfactants produits par l'isolat CH5.....	88
<b>Figure 44.</b>	Taux d'élimination du pétrole sous l'action de solutions de biosurfactant produit par l'isolat CH2.....	90
<b>Figure 45.</b>	Taux d'élimination du pétrole sous l'action de solutions de biosurfactant produit par l'isolat CH5.....	90
<b>Figure 46.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH2 pendant 15 jours d'incubation sur le milieu SG à différentes concentrations en NaCl.....	96
<b>Figure 47.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH5 pendant 15 jours d'incubation sur le milieu SG à différentes concentrations en NaCl.....	96
<b>Figure 48.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH2 pendant 15 jours d'incubation sur milieu SG à différentes concentrations en MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	98
<b>Figure 49.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH5 pendant 15 jours d'incubation sur milieu SG à différentes concentrations en MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	98
<b>Figure 50.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH2 sur milieu SG à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.....	100
<b>Figure 51.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH5, sur milieu SG à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.....	100
<b>Figure 52.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH2, sur milieu SG aux différents pH pendant 15 jours d'incubation.....	101
<b>Figure 53.</b>	Cinétique de croissance de l'isolat CH5, sur milieu SG aux différents pH pendant 15 jours d'incubation.....	101
<b>Figure 54.</b>	Chromatogramme des phospholipides de <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511 <sup>T</sup> (1), <i>Haloarcula hispanica</i> DSM 4426 <sup>T</sup> (2), <i>Natrinema pellirubrum</i> NCIMB 786 <sup>T</sup> (3), CH2 (4), CH5 (5).....	106
<b>Figure 55.</b>	Chromatogramme des glycolipides de <i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM5511 <sup>T</sup> (1), <i>Haloarcula hispanica</i> DSM 4426 <sup>T</sup> (2), <i>Natrinema pellirubrum</i> NCIMB 786 <sup>T</sup> (3), CH2 (4), CH5 (5).....	106
<b>Figure 56.</b>	Amplifiats des deux isolats CH2 et CH5.....	108

- Figure 57.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr16S, montrant la relation entre l'isolat CH5 et les souches types des espèces les plus proches des genres *Natrinema* et *Haloterrigena*..... 109

## INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Genres d' <i>Haloarchaea</i> représentant différents habitats.....	5
<b>Tableau 2.</b>	Processus de génération d'énergie utilisées par les halophiles extrêmes.	11
<b>Tableau 3.</b>	Exemple de surfactants ioniques et non-ioniques.....	26
<b>Tableau 4.</b>	Microorganismes producteurs des biosurfactants .....	32
<b>Tableau 5.</b>	Caractéristiques fonctionnelles des agents tensioactifs requises pour diverses applications.....	43
<b>Tableau 6.</b>	Réactifs utilisés comme révélateurs des spots des biosurfactants.....	51
<b>Tableau 7.</b>	Lecture et interprétation du test des nitrates-réductases.....	57
<b>Tableau 8.</b>	Révélateurs chimiques des lipides polaires.....	61
<b>Tableau 9.</b>	Amorces utilisées pour l'amplification par PCR.....	62
<b>Tableau 10.</b>	Mélange réactionnel du PCR.....	62
<b>Tableau 11.</b>	Programme établi pour l'amplification.....	62
<b>Tableau 12.</b>	Amorces utilisées pour le séquençage.....	63
<b>Tableau 13.</b>	Mélange réactionnel de séquençage.....	63
<b>Tableau 14.</b>	Programme établi pour l'amplification par le thermocycleur (Veriti 96 well Thermal cycler).....	63
<b>Tableau 15.</b>	Résultats du test de l'effondrement de la goutte.....	66
<b>Tableau 16.</b>	Corrélation statistique entre les différentes méthodes.....	69
<b>Tableau 17.</b>	Récapitulatif de l'optimisation de la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.....	84
<b>Tableau 18.</b>	Valeurs des Rf obtenues après révélation des plaque de CCM par le vert de bromocrésol.....	85
<b>Tableau 19.</b>	Composition des biosurfactants produits par CH2.....	86
<b>Tableau 20.</b>	Composition des biosurfactants produits par CH5.....	88
<b>Tableau 21.</b>	Caractères morphologiques et culturels des deux isolats étudiés.....	93
<b>Tableau 22.</b>	Caractères physiologiques des deux isolats étudiés.....	94
<b>Tableau 23.</b>	Caractères biochimiques des deux isolats étudiés.....	102
<b>Tableau 24.</b>	Résultats de l'antibiogramme des deux isolats.....	104
<b>Tableau 25.</b>	Profils des lipides polaires membranaires des deux isolats étudiés et des souches de référence utilisées.....	107
<b>Tableau 26.</b>	Résultat du blast de la séquence de l'ADNr16S de l'isolat CH5 avec celles des souches-types des espèces les plus proches des genres <i>Natrinema</i> et <i>Haloterrigena</i> .....	109

## PUBLICATION

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 2015, vol. 14, no 21, p. 1764-1772.

## COMMUNICATIONS

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Identification des archéobactéries hyper halophiles du chott el hodna, M'sila. Les 17<sup>èmes</sup> journées nationales de microbiologie. SETIF-20 et 21 novembre 2011.

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Etude de la diversité des bactéries halophiles du chott el hodna, M'sila. Le 1<sup>er</sup> colloque national sur les zones humides (CNZH1).M'SILA-02 et 03 Février 2013.

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Hydrolytic enzymes of halophilic archaea isolated from chott el hodna m'sila (algeria) and their economic values. TLEMCEN. April -10 et 11, 2013.

**ARIECH, Mounira**. Proteolytic activity from some strains of haloarchaea. Journée des masters et doctoriales. SETIF, 18 juin 2013.

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Assesement of thre screening methods for selecting biosurfactant producing halophilic bacteria. Les 20<sup>ème</sup> journées nationals de microbiologie.JJEL, 12-13 novembre 2014.

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Evaluation of screening methods for biosurfactant producing halophilic bacteria. Le 1<sup>er</sup> colloque international de biotechnologie végétale et microbienne. ORAN, le 2 et 3 Decembre 2014.

**ARIECH, Mounira** et GUECHI, Abdelhadi. Isolation of extremely halophilic bacteria able to produce biosurfactant. The 1st international conference micribiol ecology : towards new challenges. SETIF. 12-14 decembre 2015.

« تشخيص البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة المعزولة من شط الحصنة-المسيلة، والمنتجة للجزيئات الحيوية »

## ملخص

*Haloarchaea* هي بكتيريا أثرية محبة للملوحة توجد ضمن رتبة وعائلة وحيدتين، تدعى *Halobacteriales* و *Halobacteriaceae* على التوالي. تعيش في الأوساط ذات التركيز العالي من الملح (كلورور الصوديوم <math>1.5</math> مول).

حاليا البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، لها أهمية كبيرة بفضل قدرتها على إنتاج المنشطات الحيوية للسطح التي لها تطبيقات هامة في مختلف ميادين الحياة، و ذلك لخصائصها الوظيفية كالحالطية و التخفيض من التوتر السطحي . في هذا العمل قمنا بانتقاء القدرة على إنتاج منشطات حيوية للسطح بواسطة سلالات بكتيرية أثرية محبة للملوحة القصوى معزولة من التربة المالحة لشط الحصنة- المسيلة، باستعمال أربعة اختبارات. جميع النتائج أظهرت أن العزلتين CH2 و CH5 نشطتين وقادرتين على إنتاج منشطات حيوية للسطح خارج الخلية، وذلك في نهاية المرحلة الثابتة من النمو و التي تبدي استقرارا أثناء التغيرات في درجة الحرارة، الأس الهيدروجيني، ودرجة الملوحة. إن التراكيز المذيلة الحرجة للمنشطات الحيوية للسطح، المنتجة من طرف العزلتين CH2 و CH5، تعتبر منتجات جد نشطة تقدر ب :  $CMC_{CH2}=280 \text{ mg/l}$  و  $CMC_{CH5}=80 \text{ mg/l}$ .

كما أظهر تحقيق الشروط الفيزيوكيميائية والغذائية الأمثل لإنتاج المنشطات الحيوية للسطح، ارتفاعا للنسبة المئوية لانخفاض التوتر السطحي للعزلتين، يرافقه انخفاضا للتوتر السطحي للعزلتين وارتفاعا لمردود إنتاج هذه المنشطات الحيوية للسطح. أفضل النتائج كانت:  $TS=20.66\pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$  للعزلة CH2، قيمة مقابلة للنسبة المئوية لانخفاض التوتر السطحي :  $RTS_{CH2}=68.54\pm 0.7\%$  وكذا بالمثل للعزلة CH5، حيث جاءت أفضل النتائج كما يلي :

$RTS_{CH5}=48.52\pm 0.5\%$  ، وهي القيمة التي توافق  $TS_{CH5}=35.67\pm 0.2 \text{ mN.m}^{-1}$ .

إن تشخيص هذه الجزيئات بواسطة تقنية GC-MS خلص أن المنشطات الحيوية للسطح المنتجة من طرف CH2 و CH5 أنها تتكون أساسا من الأحماض الدهنية، كما أنها قادرة على تطهير الرمال الملوثة بالنفط (البترو) بنسبة 100% وذلك باستخدام المعلق البكتيري أو  $CMC$  2 بنسبة 98% .

العزلتين النشطتين للغاية، كانتا محل تصنيف متعدد الأطوار (مورفولوجي، بيوكيميائي، فيزيولوجي، التحليل الكيميائي للجدار الخلوي وتحليل ADNr16S). أثبتت النتائج المحصل عليها أن السلالة CH5، تنتمي إلى مجموعة البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، وأنها متقاربة مع السلالة *Natrinema gari* بنسبة 99.4%.

## الكلمات المفتاحية

البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، المنشطات الحيوية للسطح، إزالة التلوث، مستحلب، انتقاء، التوتر السطحي.

**« Identification des *Archaea* halophiles isolées du Chott El Hodna-M'sila, productrices des biomolécules. »**

**Résumé**

---

Les *Haloarchaea* sont des *Archaea* halophiles, inclus dans un ordre et une famille uniques, nommés *Halobacteriales* et *Halobacteriaceae*, respectivement. Elles survivent dans les milieux à très fortes concentrations en sel ( $\text{NaCl} > 1,5\text{M}$ ).

Actuellement, les *Haloarchaea* présentent un grand intérêt grâce à leur capacité de produire les molécules bioactives telles que les biosurfactants qui ont des applications très importantes dans divers domaines de la vie ; vue les propriétés fonctionnelles de ces molécules, dont les propriétés d'émulsification et la réduction de la tension superficielle.

Dans le présent travail, nous avons effectué un screening de la capacité de produire les biosurfactants par six isolats des bactéries halophiles extrêmes, isolées des sols salins de Chott El Hodna-M'sila, en utilisant quatre tests. Tous les résultats montrent que les isolats CH2 et CH5, sont actifs et capables de produire à la fin de la phase stationnaire de croissance, des biosurfactants extracellulaires, qui demeurent stables aux variations de la température, du pH et de la salinité. Les concentrations micellaires critiques déterminées sont :  $\text{CMC}_{\text{CH2}} = 280 \text{ mg/l}$  et  $\text{CMC}_{\text{CH5}} = 80 \text{ mg/l}$ .

L'optimisation des conditions physico-chimiques et nutritionnelles qui influencent la production des biosurfactants a donné les meilleurs résultats à savoir un  $\% \text{RTS} = 68.54 \pm 0.7\%$  pour l'isolat CH2 ; une valeur qui correspond à une  $\text{TS}_{\text{CH2}} = 20.66 \pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$ . De même pour l'isolat CH5, les meilleurs résultats obtenus sont les suivants :  $\% \text{RTS}_{\text{CH5}} = 48.52 \pm 0.5\%$  ; une valeur qui correspond à une  $\text{TS}_{\text{CH5}} = 35.67 \pm 0.2 \text{ mN.m}^{-1}$ .

L'identification de ces molécules par GC-MS a permis de conclure que les biosurfactants produits par l'isolat CH2 et CH5 sont constitués essentiellement d'acides gras. Ces biosurfactants demeurent capables de décontaminer les sables pollués par le pétrole, en utilisant le moût de fermentation avec un pourcentage d'élimination de 100% ou les biosurfactants à 2 CMC avec un pourcentage d'élimination de 98%.

Les deux isolats fortement actifs ont fait l'objet d'une taxonomie polyphasique (caractérisation morphologique, biochimique, physiologique, chimiotaxonomique et séquençage de l'ADNr16S). Les résultats obtenus ont montré que l'espèce CH5 faisant partie du domaine des *Archaea*, la souche CH5 est rapprochée à l'espèce *Natrinema gari* avec un pourcentage de similarité de 99,4%.

**Mots clés**

*Archaea* halophiles, biosurfactants, dépollution, émulsion, screening, tension superficielle.

« Identification of halophilic *Archaea*, isolated from Chott El Hodna-M'sila, producers of biomolecules. »

### Abstract

---

*Haloarchaea* are halophilic *Archaea*, included within a single order and family, named *Halobacteriales* and *Halobacteriaceae*, respectively. They survive in environments with very high salt concentrations ( $\text{NaCl} > 1,5\text{M}$ ).

Currently, *Haloarchaea* are of great interest due to their ability to produce bioactive molecules such as biosurfactants, which have very important applications in various fields of life. seen the functional properties of these molecules, such as emulsifying property and reducing of superficial tension.

In this work, we carried out a screening to test the ability to produce biosurfactants by six strains of extremely halophilic bacteria, isolated from saline soils of Chott el Hodna-M'sila, using four tests, all results show that isolates CH2 and CH5 are active and able to produce an extracellular biosurfactants, at the end of the stationary phase of growth. These biosurfactants are stable in the face of exposure to extreme temperature changes, pH conditions, and salinity. The critical micelle concentrations are determined:  $\text{CMC}_{\text{CH2}} = 280 \text{ mg/l}$  and  $\text{CMC}_{\text{CH5}} = 80 \text{ mg/l}$ .

The optimization of physicochemical and nutritional conditions influence the production of biosurfactants, they produced the best results ie a % RTS =  $68.54 \pm 0.7$  % for the isolate CH2, a value corresponding to a  $\text{TS}_{\text{CH2}} = 20.66 \pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$ . Similarly for CH5 isolate, which obtained the following best results: % RTS<sub>CH5</sub> =  $48.52 \pm 0.5$ %, a value that corresponds to a  $\text{TS}_{\text{CH5}} = 35,67 \pm 0.2 \text{ mN.m}^{-1}$ .

The identification of these molecules by GC-MS concluded that biosurfactants produced by the isolates CH2 and CH5 consist essentially of fatty acids. These biosurfactants remain able of decontaminating sands polluted by oil, using the bacterial cultures with a percentage of 100 % or 2CMC of biosurfactant with a percentage of 98%.

Both isolates strongly active, were the object of a polyphasic taxonomy (morphological, biochemical, physiological characterization, chimiotaxonomy and sequencing of the 16Sr DNA). The obtained results, showed that the species CH5 being a part of the domain *Archaea*, CH5 is moved closer to the species *Natrinema gari* with a percentage of similarity of 99,4 %.

### Keywords

Halophilic *Archaea*, biosurfactants, depollution, emulsion, screening, surface tension.

# Introduction

---

## Introduction

---

La découverte par le microbiologiste américain Thomas Brock à la fin des années soixante, des populations microbiennes abondantes, proliférant dans les sources chaudes du parc national de Yellowstone aux Etats-Unis à des températures comprises entre 50°C et 90°C, allait ouvrir la voie à une nouvelle ère passionnante de la microbiologie (Guezennec, 2004 ; Willey et al., 2010). Désormais tous les milieux extrêmes de la planète allaient faire l'objet de nombreuses investigations destinées tant à répertorier les microorganismes capables d'y proliférer, qu'à repousser les limites de la vie sur terre, avec pour nouvelle frontière la présence éventuelle de vie microbienne sur d'autres planètes (Seckbach and Chela-Flores, 2007).

Au cours de cette aventure étalée sur les cinquante dernières années et se poursuivant encore aujourd'hui, ces limites ont sans cesse été repoussées et des microorganismes capables de se développer à des pH, des salinités, des températures et à des niveaux de radiations extrêmes ont été découverts et caractérisés (Guezennec, 2004).

La diversité des milieux et des habitats extrêmes se reflète dans la diversité des microorganismes qui les colonisent. A l'instar de ces habitats, les milieux hypersalins représentent un niche écologique favorable pour la vie des microorganismes halophiles, qui sont adaptés pour vivre dans des concentrations très fortes de sels et sous des pressions osmotiques très élevées, résultants de la forte salinité de leurs environnements (Oren, 2006).

L'exploration de ces écosystèmes a permis la découverte des microorganismes halophiles qui se sont rapidement affichés comme les acteurs principaux de la vie sur des milieux peu propices pour d'autres. Souvent, ces microorganismes appartenant au domaine des *Archaea*, l'un des trois domaines de la vie, avec les *Eukarya* et les *Bacteria*. La découverte des *Archaea* est assez récente car, il a été difficile d'imaginer l'existence d'organismes vivants dans les conditions hostiles (température, salinité, acidité, pression, etc.) (Perry et al, 2004). En réponse à ces conditions, ces microorganismes ont au cours de l'évolution, développé des moyens d'adaptation très variés afin, non seulement de survivre mais également de s'adapter et de proliférer dans des niches écologiques variées (Oren, 2008).

Ainsi, les propriétés singulières de certaines biomolécules produites par ces microorganismes, ont très vite attiré l'attention des opérateurs des biotechnologies. Cette biotechnologie, dite des « extrêmophiles », a pour objectif de rechercher et d'exploiter ce nouveau gisement de ressources naturelles en biomolécules, notamment les enzymes, les biopolymères et les métabolites secondaires. La recherche sur les bactéries des milieux atypiques a déjà prouvé son potentiel notamment avec la découverte d'enzyme thermostable : la Taq-

polymérase, issue d'une *Archaea* hyperthermophile : *Thermophilus aquaticus*, qui a rendu la PCR possible (Willey et al., 2010).

L'intérêt croissant, au cours de ces dernières années, des microorganismes provenant des environnements hypersalins, a abouti à la découverte de plusieurs nouveaux genres et espèces qui appartiennent aux domaines *Bacteria* et *Archaea*.

En effet, les *Archaea* halophiles extrêmes sont un groupe de microorganismes appartenant au domaine des *Archaea*, à l'ordre des *Halobacteriales*, qui contient une seule famille: *Halobacteriaceae* (Ozcan et al., 2006 ; Ozcan et al., 2007). Cette famille est constituée de 47 genres (Oren, 2014a). Les membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont rencontrés dans les lacs hypersalés, la mer morte (Jordanie), les marais salants (Espagne) et dans les grands lacs alcalins extrêmement salés tels que Oued Natron en Egypte et le lac Mgadi au Kenya. Ils sont également fréquents au niveau des sols salins des déserts, des régions arides et semi-arides (Sebkha et Chott qui se trouvent au sud de l'Algérie, la Tunisie et la Turquie) et se développent aussi dans les produits alimentaires conservés par salaison tels que les viandes et les poissons (Oren, 2000 ; Oren, 2002). Ces microorganismes sont bien adaptés à des environnements hypersalins et exigent au moins 1.5 M de NaCl pour leur croissance avec une croissance optimale à des concentrations variant de 3.5 à 4.5 M, et même proches de la saturation en sels (Castillo et al., 2007). Actuellement, la classification taxonomique des *Halobacteriaceae* est principalement basée sur les caractéristiques phénotypiques, la composition de la paroi en lipides polaires, la comparaison des séquences de l'ADNr16S et l'hybridation ADN-ADN (Castillo et al., 2006).

Cependant, les constituants cellulaires et les biomolécules produites par les *Haloarchaea* constituent un modèle particulier de stabilité aux conditions de vie extrêmes (Campbell and Reece, 2004). Cette caractéristique leur confère une qualité supplémentaire pour l'exploitation en biotechnologie, en qualité de production de nouvelles biomolécules actives comme les biosurfactants, qui sont des agents tensioactifs, utilisables dans plusieurs domaines. Elles regroupent une classe de biomolécules amphiphiles, structurellement variées, et communément synthétisées par les microorganismes (bactéries, archées, levures et champignons). Ces agents tensioactifs se localisent préférentiellement à l'interface entre deux milieux fluides ayant différents degrés de polarité. Cette propriété rend les biosurfactants capables de former des émulsions entre le milieu huileux et le milieu aqueux (Rone and Rosenberg, 2001 ; Chen et al., 2007 ; Kebbouche-Gana et al., 2009).

Les biosurfactants sont capables de solubiliser les composés xénobiotiques (polluants issus des activités humaines) améliorant ainsi leur biodégradabilité et de chélater les métaux

lourds (e.g. le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc) permettant ainsi leur élimination des sols contaminés. Récemment, le rôle et les multiples applications des biosurfactants, comme détergents, émulsifiants, agents anti-moussants, et agents de dispersion ; principalement les lipopeptides et les glycolipides (agents antibactériens, antifongiques et antiviraux), ont fait l'objet d'intenses recherches dans le domaine médical et de la thérapie génique (Maier and Soberon-Chavez, 2000 ; Rodrigues *et al.*, 2006a).

Aujourd'hui, les biosurfactants ont donné lieu à de nombreuses applications dans l'industrie du pétrole afin d'extraire le pétrole adsorbé sur la roche du réservoir. Ils peuvent être utilisés efficacement dans de nombreux processus, y compris le transport des hydrocarbures dans les pipelines, le nettoyage des réservoirs de stockage de pétrole, le raffinage et la formulation du produit (Urum and Pekdemir, 2004 ; Mukherjee *et al.*, 2006). Dans le domaine de la protection de l'environnement et la bioremédiation, les biosurfactants (les rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures ; en agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans les formulations d'herbicides et des pesticides. D'autres part, les biosurfactants de structure glycolipidiques peuvent avoir des applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Banat, 2000 ; Urum and Pekdemir, 2004 ; Mukherjee *et al.*, 2006).

Les biosurfactants, de par leur faible toxicité vis-à-vis de l'environnement et de la santé humaine, leur biodégradabilité, leur compatibilité, leur sélectivité pour une classe de polluant ou une espèce pathogène et pour des milieux extrêmes (e. g. variations élevées de températures, de pH et de salinité), possèdent de nombreux avantages par rapport aux surfactants synthétiques. De plus, une concentration micellaire plus faible, une activité moussante plus élevée, et la possibilité d'être synthétisé à partir des ressources renouvelables, la réduction des coûts de production par l'utilisation de procédés de fermentation et la diversité de leurs applications potentielles, rendent ces biomolécules très attractives en termes socio-économiques (Chen *et al.*, 2007 ; Nitscheke and Costa, 2007). Par conséquent, les recherches sur les biosurfactants se sont orientées vers la découverte de nouvelles molécules, l'étude de leur rôle naturel, et l'identification des gènes régulant leur biosynthèse (Satpute *et al.*, 2010). La plupart des tensioactifs utilisés actuellement sont produits par synthèse chimique. Toutefois, l'intérêt des biosurfactants d'origine microbienne a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie.

Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouvelles biomolécules actives d'intérêt à partir de ces microorganismes, le moyen le plus utilisé est le moyen naturel qui consiste à les rechercher à partir des niches écologiques longtemps ignorées et/ou peu étudiées

telles que les écosystèmes marins et littoraux, les zones humides, les lacs salés, les chotts et les sebkhas.

Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'explorer la production des biosurfactants par des archées halophiles, isolées à partir des sols salins de Chott El Hodna-M'sila. Le choix de ce Chott connu par sa richesse floristique et faunistique a été dicté par son importance géographique qu'écologique, ce dernier fait partie des zones humides d'importance internationale comme il fut classé par la convention de Ramsar en 2001 (Boumezbeur, 2002). Ces écosystèmes particuliers constituent des milieux riches en microorganismes et dont la biodiversité revêt une importance majeure. La caractérisation de la biodiversité des populations microbiennes dans ces milieux ne revêt pas uniquement une importance écologique, elle permet également la sélection de souches à potentiel biotechnologique élevé et leur exploitation dans divers domaines.

Dans cette thématique, l'objet de ce travail de thèse a été :

- Isoler des souches d'archées halophiles à partir des sols salins du Chott El Hodna-M'sila ;
- Screening des souches productrices des biosurfactants ;
- Identification des souches actives par des approches culturales et moléculaires ;
- Caractérisation des biosurfactants du point de vue biochimique ;
- Et prouver une utilisation de ces biomolécules.

Pour ce fait, ce manuscrit est organisé en quatre chapitres :

- La première partie, est une synthèse bibliographique subdivisée en deux chapitres, le premier présentant l'essentielle d'information sur les *Archaea* halophiles ; suivie d'un deuxième chapitre donnant un concept sur les biosurfactants ;
- Le troisième chapitre est consacré pour citer le détail des manipulations qu'on a maîtrisées au cours de la réalisation de ce travail ;
- Les résultats obtenus et la discussion font l'objet du quatrième chapitre.

# Chapitre I :

## *Archaea* halophiles

---

### I.1. Généralités et caractéristiques spécifiques des *Archaea* halophiles

Le terme *Haloarchaea* correspond aux membres d'*Archaea* halophiles, aérobies de la famille des *Halobacteriaceae*, de l'ordre des *Halobacteriales* qui sont des halophiles extrêmes par excellence (Dassarma and Arora, 2001 ; Oren, 2006).

Cependant, pas tous les membres des *Archaea* halophiles, appartiennent à l'ordre des *Halobacteriales*, il existe aussi d'autres *Archaea* considérées comme des halophiles, représentées par les membres des deux familles d'*Archaea* méthanogènes : *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae* qui peuvent croître dans des concentrations élevées en sel (Oberwinkler, 2011). Récemment, des études portées sur la biodiversité des microorganismes halophiles des environnements hypersalins d'Espagne et d'Australie ont montré qu'il existait un autre groupe d'*Archaea* halophiles, appelé les *Nanohaloarchaeae*, en raison de la petite taille de leurs cellules sphériques (0,6 µm). Ces *Nanohaloarchaea* ne sont pas étroitement liés à la famille des *Halobacteriaceae* (Hurst, 2016).

Les *Haloarchaea* croissent sur des sources d'énergie ordinaires, mais ont besoin d'importantes concentrations en sel pour leur croissance et ne peuvent se développer qu'à des concentrations élevées en NaCl (3.4-5M). De ce fait, ces microorganismes colonisent les milieux hyper salins comme : les aliments salés (poissons salés), les marais salants, les sols salins et les lacs salés (Figure 1), etc. Ces derniers sont divisés en deux types selon la concentration totale en sels et la composition ionique de chaque type ; le premier est appelé **thalassohalin**, et le second est appelé **athalassohalin** (McGenity et al., 2000; Dassarma and Arora, 2001).

Les milieux thalassohalins contiennent du chlorure de sodium comme étant le sel le plus dominant et un pH généralement proche de la neutralité à légèrement alcalin. Contrairement aux milieux thalassohalins, les ions les plus dominantes dans les milieux athalassohalins sont: le potassium, le magnésium ou le sodium (Litchfield and Gillevet, 2002). Le tableau 1 présente quelques exemples d'*Haloarchaea* et les milieux hyper salins qu'elles colonisent.

**Tableau 1.** Genres d'*Haloarchaea* représentant différents habitats (Chaban et al., 2006).

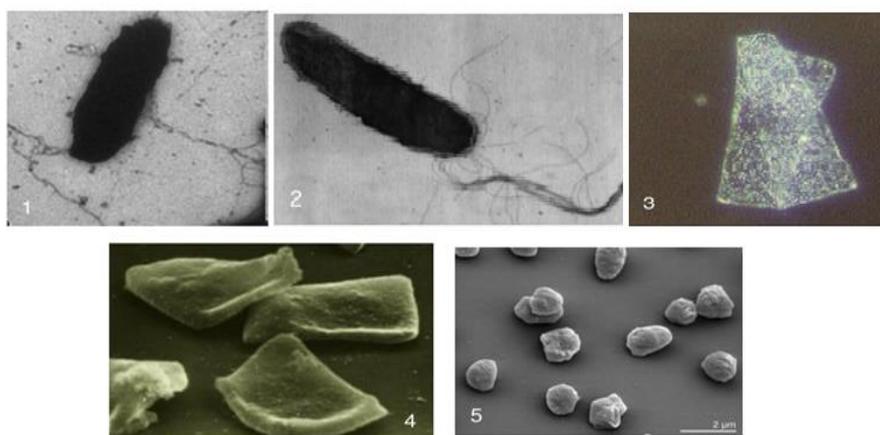
Habitats	Genres représentatifs
Mer morte	<i>Halorubrum, Haloferax</i>
Lac salé alcalin	<i>Haloarcula, Natronomonas, Natronococcus</i>
Lacs salés	<i>Natrinema</i>
Poissons salés	<i>Halobacterium</i>
Dépôts anciens des sels	<i>Haloarcula, Halococcus, Halorubrum</i>
Sols salins	<i>Halorubrum, Haloferax, Haloterrigena</i>
Bassins de sel	<i>Halorubrum, Haloarcula, Halogeometricum</i>



**Figure 1.** Exemples des milieux hyper salins en Algérie. (1) Chott El Hodna (Région de Mcif). (2) Chott Ech chergui. (3) Sebka de Oran. (4) Sols salins.

Les membres de la famille des *Halobacteriaceae* présentent une grande diversité morphologique, incluant : des bâtonnets, des cocci, des cellules pléomorphiques, ainsi que des cellules triangulaires et en carrés (Figure 2).

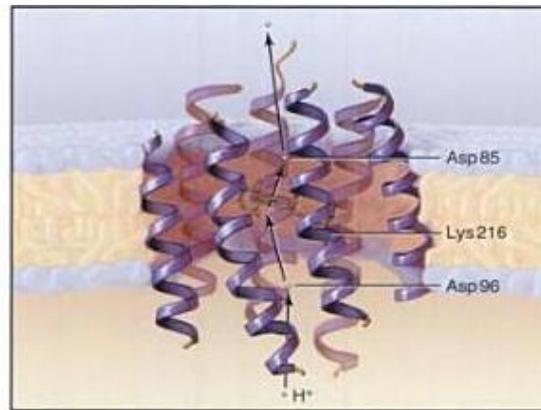
Ces formes sont déterminées par les propriétés de la paroi cellulaire et la membrane plasmique de ces microorganismes. La forme inhabituelle comme celle du triangle et du carré sont possibles parce que les cellules ne possèdent pas une pression de turgescence importante. Donc, ces formes qui ne peuvent pas être possible pour d'autres types de microorganismes sont possibles pour ces halophiles (Oberwinkler, 2011).



**Figure 2.** Espèces représentatives de la famille des *Halobacteriaceae*.

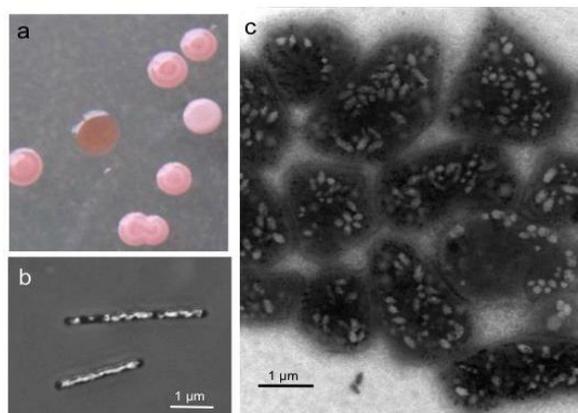
(1) *Natronomonas pharaonis*, (2) *Halobacterium salinarum*, (3) *Haloquadratum walsbyi*, (4) *Haloarcula quadrata*, (5) *Halogeometricum borinquense* (Oberwinkler, 2011).

Les *Haloarchaea* sont pour la plupart aérobies et contiennent des pigments de type caroténoïdes, donc rouges, ce qui donne à leurs colonies des couleurs vives et caractéristiques. Certaines sont anaérobies et photohétérotrophes grâce à la bactériorhodopsine (BR), une pompe à proton spécifique à ce groupe, utilisant la lumière comme source d'énergie. Le gradient de protons généré permet la synthèse d'ATP (Figure 3).



**Figure 3.** Cheminement des protons à travers la membrane via la bactériorhodopsine (Thomas and William, 2004).

Quelques espèces des genres : *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halogeometricum*, *Natrialba*, peuvent dépasser le manque d'oxygène en raison de sa faible solubilité dans les eaux salées, par le développement des vésicules gazeuses (Figure 4), ce qui leur permet de flotter vers l'interface eau-air (Pfeifer, 2015).

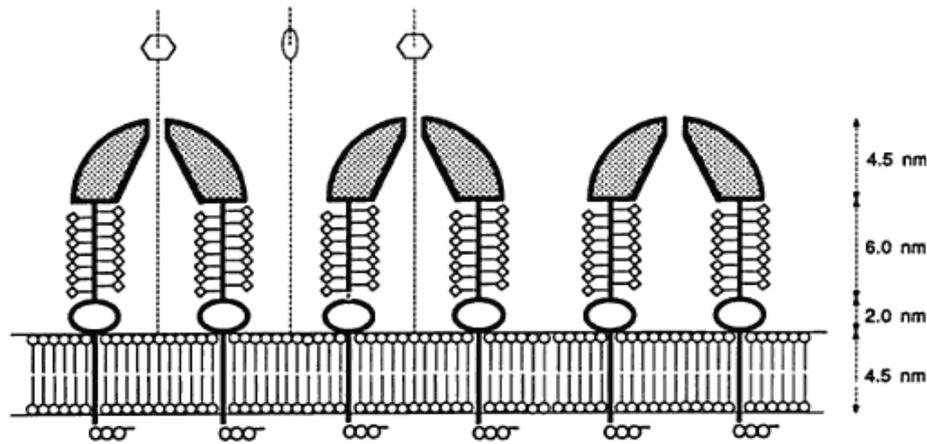


**Figure 4 .** Colonies de *Halobacterium salinarum* (a), cellules de *H. Salinarum* produisant des vésicules gazeuses (b,c) (Pfeifer, 2015).

Les *Archaea* peuvent être Gram positive ou Gram négative. Elles n'ont pas d'acide muramique, ni d'acide D-aminé, constituants du peptidoglycane, les *Archaea* peuvent avoir des parois cellulaires très diverses. Par exemple les *Archaea* halophiles ne possèdent pas une vraie paroi cellulaire rigide. Mais plutôt ce qu'on appelle « S-layer » qui se compose de grandes sous-unités de glycoprotéine qui dépendent d'une forte concentration de sel pour leur stabilité (Figure 5). Quand ces microorganismes sont placés dans une solution hypotonique, leurs cellules seront

lysées. Cette lyse est due à la dénaturation des glycoprotéines plutôt que la pression osmotique (Helmut *et al*, 2010).

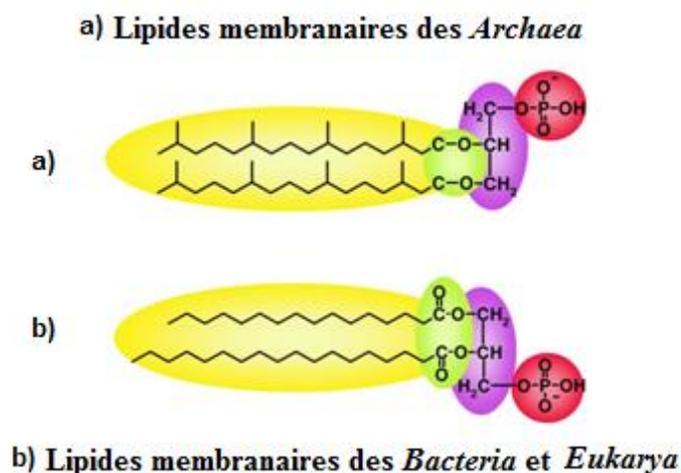
Les exceptions sont les membres des genres : *Halococcus* et *Natronococcus* qui possèdent une paroi cellulaire rigide qui ne dépend pas à la forte concentration en sel pour leur stabilité structurale. En effet, les *Halococcus* possèdent une paroi constituée d'un hétéro polysaccharide, alors que les *Natronococcus* ont une paroi faite d'une répétition de poly (L-glutamine). Aucun membre des *Archaea* halophiles possèdent les composantes classiques de la paroi cellulaire telle que le D-acide aminé et l'acide téchoïque (Helmut *et al*, 2010).



**Figure 5.** Model schématique de l'enveloppe cellulaire des *Archaea* halophiles (Helmut *et al*, 2010).

Les *Archaea* halophiles doivent faire face à des concentrations élevées en sel et pour certains membres alcaliphiles à un pH élevé (pH=11). Pour survivre dans des conditions difficiles, ces organismes doivent maintenir l'intégrité structurale de la cellule, et des mécanismes biochimiques sont mis en œuvre pour soutenir la croissance (Helmut *et al*, 2010).

Les membranes cellulaires inhabituelles des *Haloarchaea* sont adaptées pour résister à des conditions extrêmes. L'une des principales caractéristiques qui distingue les archées des bactéries, est l'abondance des lipides éther qui forment la composante principale des membranes cellulaires des *Archaea*. Quatre propriétés structurales qui caractérisent les différences entre les lipides membranaires des *Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya* sont présentées dans la figure 6 (Oberwinkler, 2011).



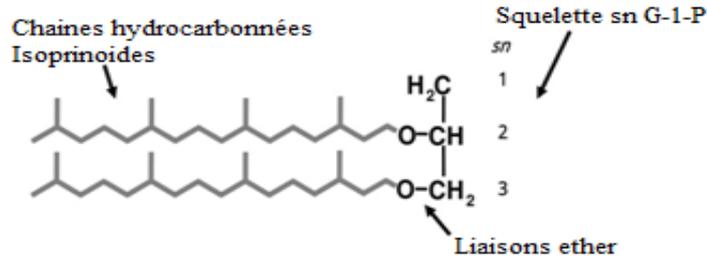
**Figure 6.** Comparaison des lipides polaires entre les archées, les bactéries et les eucaryotes (Oberwinkler, 2011).

- (i) Adaptation des lipides membranaires des *Archaea* à des conditions de vie extrêmes par des liaisons éther entre les groupes des têtes polaires et les queues lipidiques, alors que les bactéries et les eucaryotes utilisent les liaisons ester ;
- (ii) Des chaînes isoprénoides au lieu des acides gras ;
- (iii) Stéréochimie du glycérol opposée de celles des bactéries et des eucaryotes ;
- (iv) Des membranes monocouches uniques chez certaines *Archaea*, plutôt que des doubles couches phospholipidiques chez les bactéries et les eucaryotes (non représentées dans la figure 6).

Les lipides polaires (phospholipides et glycolipides) présentent plus de 90 % des lipides totales des cellules d'*Archaea* halophiles. Ils sont entièrement dérivés de l'archéol ou de son dimère (caldarchaéol). L'archéol (Figure 7) est totalement saturé, c'est un isoprénoïde glycérol diéther, les *Archaea* présentent plusieurs variétés de celui-ci (Oberwinkler, 2011).

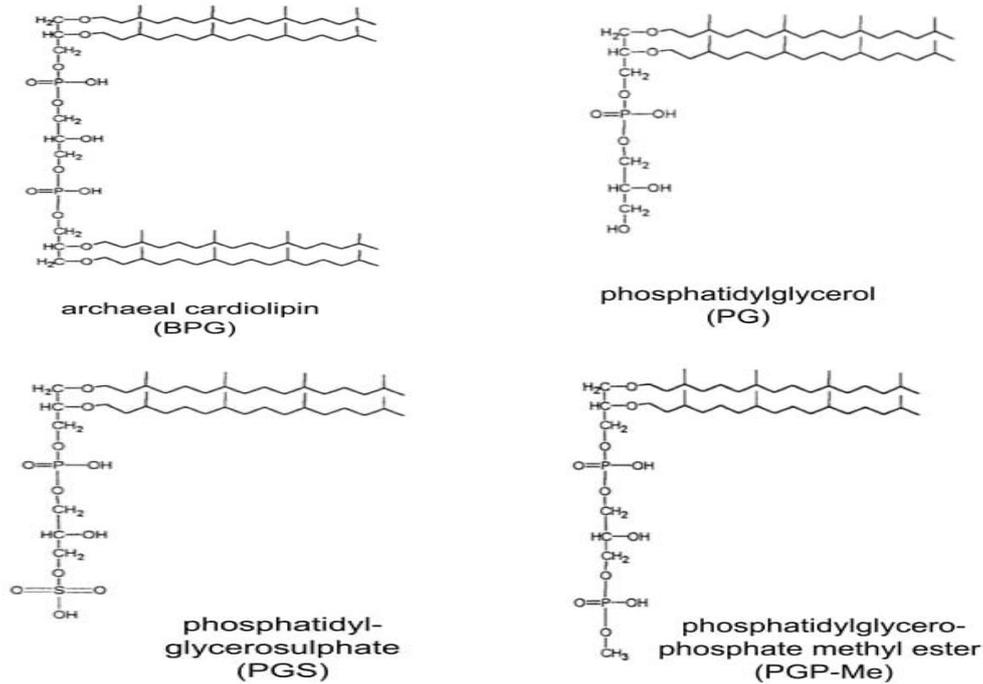
Le noyau lipidique des membranes des *Archaea*, représentent le diphytanylglycérol diéther (modifié par ajout des groupements alkyles comme C20 et C25, etc). Spécifiquement, les membranes de *Halobacterium salinarum* contenant des dérivés d'archaéol avec deux chaînes phytanyl (C20), il existe d'autres constituants isoprénoides tels que squalène (C30), phytoène (C40), menaquinone (C40), et dolichol (C60) (Lattanzio et al., 2002 ; Corcelli et al., 2007).

Toutes les *Archaea* halophiles connues, contenant le dérivé de diéther phosphatidyl glycérol (PG), le méthyl ester de phosphatidyl glycérophosphate (Me-PGP), et biphosphatidyl glycérol (BPG, analogue structurale de la cardiolipine des cellules eucaryotes et des bactéries ; phosphatidyl glycérosulfate (PGS) (Figure 8), qui est présent chez la plupart des *Archaea* neutrophiles comme *Halobacterium salinarum*. Mais tous les *Archaea* alcaliphiles semblent manquer de PGS. Il a également été démontré que ce phospholipide est nécessaire pour le bon fonctionnement du cytochrome C et l'activité de l'oxydase chez *Halorubrum sp.* (Lattanzio et al., 2002 ; Corcelli et al., 2007).

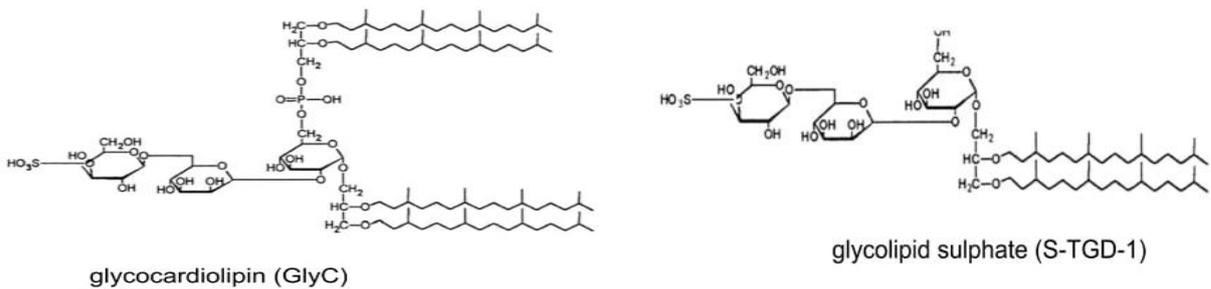


**Figure 7.** Structure de l'archéol (Oberwinkler, 2011).

L'archéol est un double éther du glycérol dont les positions 2 et 3 sont occupées par des résidus phytanyles : un diterpène saturé. L'archéol est un étherlipide homologue des di glycérides chez les archées thermophiles. Les glucides ou les têtes polaires sont fréquemment attachés à la position sn-1 du glycérol.



### Phospholipides



### Glycolipides

**Figure 8.** Structure des lipides polaires (phospholipides et glycolipides), constituants essentiels des membranes plasmiques archéennes (Oberwinkler, 2011).

Les *Haloarchaea* ont développé une large gamme de stratégies de génération d'énergie. Comme les environnements hyper salins sont souvent riches en nutriments organiques, il est plus probable que, sous conditions normales, seul le mode chimioorganotrophique, est utilisé par les

*Haloarchaea*. Cependant, certains ont développé une multitude de processus de génération d'énergie pour la survie dans des conditions changeantes (Tableau 2). La plupart des processus microbiens qui se produisent à des faibles concentrations de sel peut être trouvée jusqu'aux taux considérables de salinités, souvent, jusqu'à saturation en NaCl (Oberwinkler, 2011).

**Tableau 2.** Processus de génération d'énergie utilisées par les halophiles extrêmes (Oberwinkler, 2011).

Processus	Genres représentatifs
<b>Respiration aérobie (Source de carbone)</b>	
Acides aminés	La plupart des genres
Glycérol	<i>Haloarcula, Haloferax</i>
Sucres	<i>Halobacterium, Haloferax, Halorubrum, Natrialba</i>
Hydrocarbures	<i>Halobacterium, Haloferax</i>
<b>Respiration anaérobie (Accepteurs terminaux d'électrons)</b>	
Nitrate	<i>Haloarcula, Haloferax, Halogeometricum</i>
Triméthylamine-N-oxide	<i>Halobacterium, Haloarcula, Haloferax</i>
Diméthylsulfoxyde	<i>Halobacterium, Haloarcula, Haloferax</i>
Fumarate	<i>Halobacterium, Haloferax</i>
<b>Fermentation de l'arginine</b>	<i>Halobacterium</i>
<b>Photosynthèse (bacteriorhodopsine)</b>	<i>Halobacterium</i>

Les principales raisons pour lesquelles ont été créés trois grands domaines (*Archaea*, *Bacteria* et *Eukarya*) sont des raisons phylogénétiques. Il est à noter également qu'il existe des différences majeures au niveau de leurs modes de vie y compris les voies métaboliques et les besoins particuliers (Danson et al., 2007). Cela signifie que les caractéristiques particulières du métabolisme des *Archaea* halophiles ne le font pas seulement mais, représentent les caractéristiques métaboliques ancestrales dans un organisme primitif. En fait, ils illustrent l'adaptation de l'évolution des micro-organismes à survivre dans une variété de différents environnements hostiles (Pétitjean, 2013).

Une caractéristique génomique de ce groupe est la présence de plusieurs chromosomes ou de nombreux méga plasmides pouvant contenir jusqu'à plusieurs centaines de gènes, alors que le génome de la plupart des archées se trouve sur un seul chromosome et, potentiellement, quelques plasmides de petite taille (Pétitjean, 2013).

## I.2. Stratégies spécifiques des *Haloarchaea* pour l'adaptation aux stress environnementaux

### I.2.1. Faible activité en eau ( $a_w$ ), stress salin et dessiccation

Les micro-organismes qui sont exposés à un environnement de faible activité en eau, doivent appliquer des stratégies pour éviter la perte d'eau par osmose. L'activité en eau ( $a_w$ ) représente la quantité d'eau disponible pour l'hydratation des matériaux ; une valeur de 1.0 indique l'eau pure. L'addition de solutés abaisse  $a_w$  à des valeurs inférieures à 1.0. L'activité en eau des lacs salés saturés, par exemple, est de 0.75, ce qui leurs rend des environnements typiques de nombreux halophiles (Becker *et al.*, 2014).

L'intégrité des microorganismes halophiles en milieu salin exige le maintien d'un équilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu environnant (Figure 9). La plupart d'entre eux accumulent essentiellement du chlorure de potassium « KCl » pour les archées, ou des composés organiques de faibles poids moléculaires, dits solutés compatibles pour les bactéries (Stan-lotter and Fren drihan, 2015). Bien que des travaux récents ont montré que certaines *Haloarchaea* peuvent utiliser des solutés compatibles dans certaines situations, et de nombreux organismes halotolérants accumulent transitoirement des niveaux modérés des ions  $K^+$  intracellulaire durant la phase initiale d'osmoadaptation. L'utilisation de tels ou tels mécanisme d'adaptation, reste utile pour distinguer entre les halophiles obligatoires et les halophiles facultatifs (Becker *et al.*, 2014).

Les organismes, accumulant dans leurs cytoplasmes de fortes quantités de sel (principalement le KCl), se soumettent à un nouveau stress cellulaire : le stress salin. Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité des protéines d'organismes non adaptés aux conditions hyper salines : la forte concentration en ion salin va neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité des protéines et rentrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydrolyse, celle-ci précipite (Marty, 2011).

Cependant, les organismes halophiles ne semblent pas connaître ce stress, leurs protéines sont non seulement solubles et fonctionnelles (stables, actives et flexibles) à de telles salinités, mais en plus elles se dénaturent dès que la concentration en KCl diminue en dessous de 1.0 à 2.0 M. Elles sont en ce sens qualifiées de protéines halophiles (Marty, 2011).

Le travail réalisé sur les systèmes protéiques au cours des 15 dernières années a mis en évidence plusieurs caractéristiques générales de l'adaptation moléculaires halophiles via la stratégie de l'accumulation de KCl (Marty, 2011).

Du fait de la présence d'une forte concentration en sel dans le cytoplasme, les protéines halophiles ont nécessairement développé des mécanismes spécifiques pour la rétention de leur conformation native et de leurs activités en milieu saturé en sel.

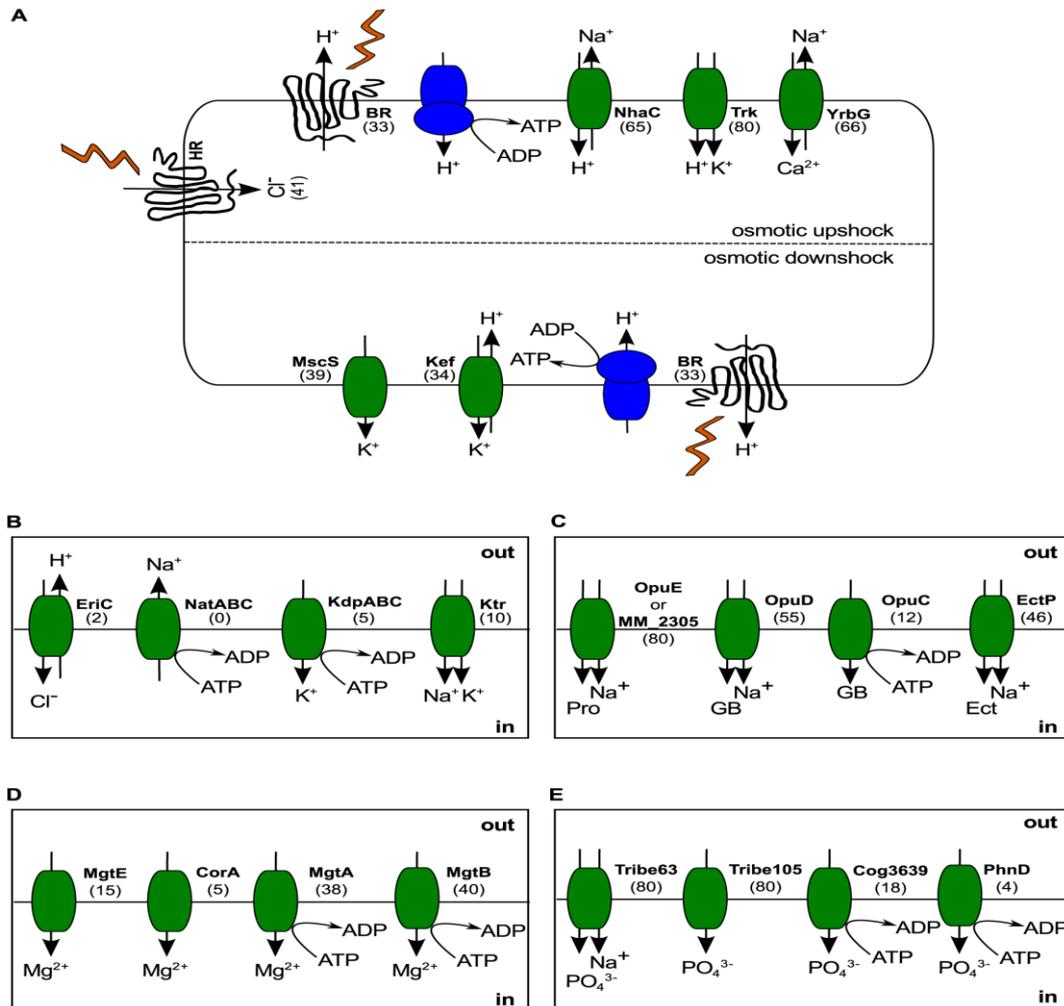
Tout d'abord, l'analyse statistique de 26 séquences de protéines halophiles a montré que la plupart des protéines halophiles (24 sur 26) sont très acides (excès des résidus acides par rapport aux basiques) en comparaison aux protéines non halophiles, avec un potentiel isoélectrique moyen (pI) pour le protéome halophile proche de 5.

Les structures cristallines de plusieurs protéines halophiles ont montré des surfaces riches en résidus d'acides aminés riches en résidus acides (Figure 10). L'utilisation de résidus d'acides aminés chargés négativement conduit à une organisation des ions salins en réseau à la surface des protéines, qui renforce à la fois les interactions faibles particules-particules (répulsion) et les interactions protéines-solvant. La sélection d'une surface acide est donc nécessaire pour maintenir la solubilité des protéines dans un environnement contenant des concentrations élevées en sels. De plus, de nombreuses protéines halophiles ont des sites de liaisons aux ions, souvent à l'interface de sous-unité. La formation de ponts salins avec d'autres résidus va permettre d'augmenter la stabilité des protéines (Marty, 2011).

Il a aussi été démontré qu'une hydrophobicité relativement faible à la surface des protéines ainsi que dans les parties enfouies (coeur de la protéine) était une autre forme d'adaptation aux conditions salines. En réduisant l'hydrophobicité de la surface externe de la protéine, l'attraction hydrophobe protéine-protéine est également diminuée. Ainsi, la réduction des résidus chargés positivement (principalement la lysine) permet d'améliorer la solubilité des protéines en augmentant la charge négative de la surface (déjà forte grâce aux résidus acides). La diminution de la surface hydrophobe enfouie entre les monomères est de plus susceptible de favoriser une plus grande flexibilité des sous unités. Pour l'enzyme malate déshydrogénase halophile, cette dernière caractéristique augmente la flexibilité des sous unités actives, lui permettant de garder une activité enzymatique correcte (Marty, 2011).

Enfin, au niveau structure secondaire des protéines halophiles (par rapport aux protéines non halophiles), il y a une plus grande tendance à la formation de structure de type pelote statique (random coil) et une faible tendance à la forme de structure de type hélicoïdales (hélices et feuilletts). Un pourcentage plus élevé de la structure de type hélice, permet une augmentation globale de la rigidité de la protéine, par conséquent une diminution du pourcentage de structure de type hélice chez les protéines halophiles rend probablement plus souples ces protéines (Marty, 2011).

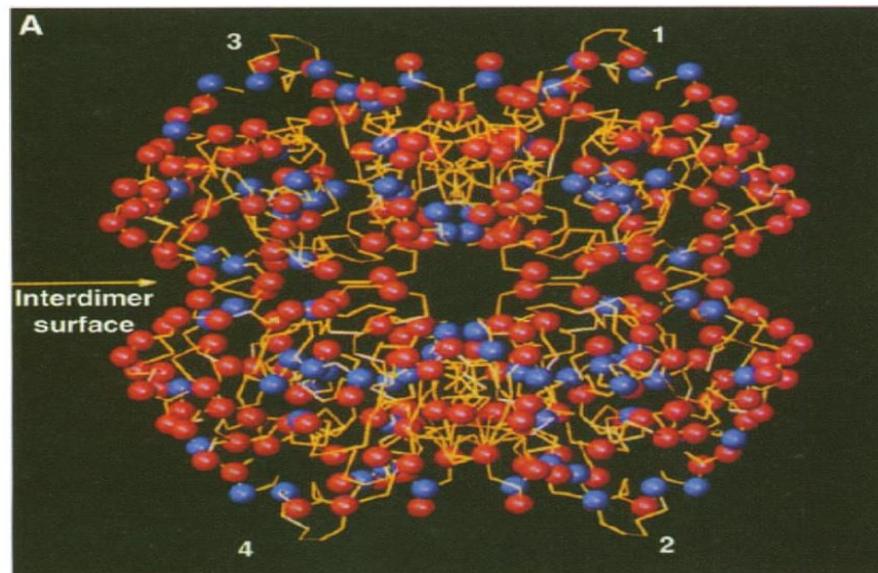
*Haloquadratum walsbyi* est vraiment inhabituelle parce qu'elle présente des cellules de forme plate parfaitement carrée. Elle contient de l'halomucine, une très grande protéine constituée de 9159 acides aminés, et sa séquence et l'organisation de domaine sont similaire à celles des mucines animales, qui sont connues pour la protéger divers tissus contre la dessiccation. En raison du fait qu'elles sont fortement glycosylées et sulfatées, on pense pour former une capsule riche en eau autour des cellules et pour protéger contre les conditions de dessèchement ou de l'activité en eau extrêmement faible. Un rôle supplémentaire de l'halomucine pourrait être une barrière contre les phages (Stan-lotter and Fren drihan, 2015).



**Figure 9.** Schéma explicatif représentant l'osmoadaptation des *Haloarchaea* (Becker et al., 2014).

- (A) Modèle généralisé pour l'osmoadaptation des *Haloarchaea*. Durant un choc hyperosmotique, le potassium est importé par des symports de type **Trk H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>** et le sodium est expulsé, en utilisant une combinaison de deux antiports de types **NhaC H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>** et **YrbG Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup>**. Durant un choc hypoosmotique, l'excès de potassium est éliminé par combinaison de l'antiports **Kef H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>** et des canaux mécanosensibles non spécifiques **MscS**.

- (B) Le transport des ions ce n'est pas une stratégie codée généralement que par les *Haloarchaea*. L'exportation de  $\text{Na}^+$  et l'importation de  $\text{K}^+$  à l'aide des transporteurs ABC (**NatABC** et **KdpABC**) peuvent être moins énergétiquement efficaces que les systèmes de transport secondaires. L'utilisation des symports **Ktr**  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  pour l'absorption de potassium se traduit par accumulation excessive de sodium.
- (C) Le système de transport des solutés compatibles. Les symports (**OpuE** et **MM\_2305**) sont omniprésents dans les *Haloarchaea*. L'absorption de la glycine bêtaïne est médié par le symport **OpuD** avec le  $\text{Na}^+$ , ou rarement, par l'intermédiaire du transporteur de type ABC **OpuC**. Le symporteur **CFUectoïne**/ $\text{Na}^+$  est également très répondeur. Pour les systèmes de transport avec plusieurs substrats, un composé représentatif est montré.
- (D) L'absorption du magnésium est médiée par transport primaire active **MgtA/B** ou plus rarement, par diffusion facilitée **MgTe/CorA**.
- (E) L'accumulation du potassium est possible, via à la fois le transport secondaire actif (**Tribe63**) et la diffusion facilitée (**Tribe105**). Certaines espèces possèdent également des transporteurs de potassium dépendant de l'ATP de type (**Cog3639/PhnD**). Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre d'espèce d'*Haloarchaea* possédant le gène transporteur parmi les 80 souches étudiées. **BR** : Bactériorhodopsine, **HR** : Halorhodopsine, **GB** : Glycine bêtaïne, **Pro** : Proline, **Ect** : Ectoïne. **Kef**, **Ktr** et **Trk** représentent chacun une classe de transporteur, plutôt qu'un seul homologue. **Tribe63** et **Tribe105** se réfèrent aux familles des protéines.

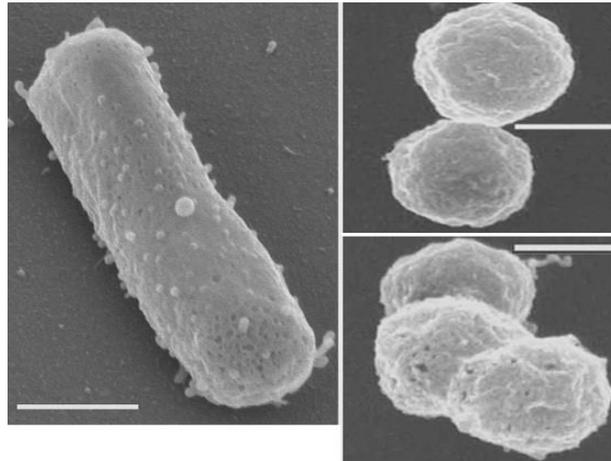


**Figure 10.** Structure tétra métrique de la HMDH : les acides aminés acides sont représentés en rouge et les basiques en bleu (Marty, 2011). Les nombres 1 à 4 désigne les différentes sous-unités de la protéine

### I.2.2. Formation des sphères dans les inclusions liquides

Les inclusions fluides sont de petites cavités à l'intérieur des minéraux. Ces cavités ont une taille de moins d'un micromètre à plusieurs centaines de micromètres. Elles contiennent des micro-volumes du fluide présent dans la roche à un moment donné de son évolution. Ils sont présents naturellement dans les halites et ont été considérés comme des habitats possibles pour les microorganismes halophiles (Marty, 2011; Stan-lotter and Fren drihan, 2015).

Une souche d'*Halobacterium salinarum* a été isolée à partir d'un cristal d'halite âgé de 97,000 ans. Les cellules d'une morphologie en forme de bâtonnet, ont été converties en petites formes arrondies à l'intérieure des inclusions des fluides, comme il est représenté dans la [figure 11](#). La formation des sphères est apparemment une réponse à une faible activité en eau externe ( $a_w$ ) de plusieurs espèces d'*Haloarchaea*. Une caractérisation biochimique initiale a montré que les sphères contiennent une teneur d'environ 50 fois plus moins d'ATP, par rapport aux bâtonnets. Il semble probable que la diminution du rapport surface –volume fait partie de la stratégie de survie à long terme ([Marty, 2011](#); [Stan-lotter and Frendrihan, 2015](#)).



**Figure 11.** Balayage au microscope électronique d'un bâtonnet (à gauche) et des sphères (à droite) de *Halobacterium* du CNRC-1 ([Stan-lotter and Frendrihan, 2015](#)).

Les sphères ont été formées à l'intérieure des inclusions fluides des halites cultivé au laboratoire et ont été obtenues après la dissolution des cristaux de sels.

### I.2.3. Environnements oligotrophiques

Oligotrophes sont des organismes qui peuvent vivre dans des environnements pauvres en éléments nutritifs. Ils se développent lentement et ont de faibles taux de métabolisme, qui conduisent à une faible densité de population. Les oligotrophes se produisent dans des sédiments profonds océaniques, les grottes, les glaciers, des environnements souterrains profonds, les eaux océaniques et les sols lessivés. La concentration du carbone organique totale dans ces environnements est de l'ordre de quelques milligrammes par litre ([Stan-lotter and Frendrihan, 2015](#)).

L'adaptation à la limitation des nutriments par de nombreux micro-organismes oligotrophiques consiste à augmenter le rapport de la surface au volume de la cellule, ce qui augmente la capacité d'absorption des nutriments par rapport au volume cellulaire. De cette manière, la capacité de l'organisme à récupérer des substrats générateurs d'énergie disponibles sera augmenté ([Stan-lotter and Frendrihan, 2015](#)).

*Haloquadratum walsbyi* gère l'augmentation de la surface d'une manière un peu différente, à savoir par un aplatissement très élevé. Les bactéries marines sont connues pour croître sur l'ADN externe dissous, en l'utilisant comme source de carbone, d'azote et du phosphore. Récemment, il a été montré que *Haloferax volcanii* utilise l'ADN externe comme source d'éléments nutritifs et, en fin de compte, l'ADN même interne en tant que source de phosphate (Stan-lotter and Frendrihan, 2015).

#### I.2.4. Résistance aux radiations

Une remarquable résistance aux rayonnements ionisants a été rapportée pour *Halobacterium salinarum*, qui a montré une valeur de D10 de 5 KGy (Dose physique correspondant à 10% de survie ou la dose qui réduit la survie d'une population à 90%, exprimée en Gy) ; une valeur d'un ordre de grandeur similaire de celle de l'*Archaea Thermococcus gammatolerans* (6 KGy) et de la bactérie *Deinococcus radiodurans* (12 KGy). Deux mutants d'irradiation dérivés de *H.salinarum* présentent des valeurs de D10 proches de celle de *D.radiodurans* (Stan-lotter and Frendrihan, 2015).

Généralement, la dessiccation et l'irradiation provoquent des cassures au niveau des doubles brins de la molécule d'ADN. En effet, une explication de la résistance à ces conditions a été établie ; la présence de plusieurs chromosomes est à l'origine de la régénération des fragments épars à partir des fragments intacts.

Une protéine, Ral (tucHOG0456) de *Halobacterium* de CNRC-1, a été proposé pour fonctionner dans la réparation des cassures de l'ADN double brin et de la tolérance à la dessiccation et aux rayonnements et un faible nombre de « cible » UV dans leurs génomes (thymines) (Stan-lotter and Frendrihan, 2015).

En effet, la plupart des archées halophiles sont colorées en rouge-orange. Cette couleur est due à l'incorporation des caroténoïdes dans leurs membranes cellulaires.

Ces molécules (antioxydants) contribuent à la photoprotection, permettant aux cellules de vivre dans un environnement avec d'intenses radiations d'UV. Certaines espèces ont aussi une couleur pourpre, dans ces cas-là la membrane incorpore de la bactériorhodopsine (chromo protéine pourpre) ou d'autres rhodopsine-chromo-protéines.

L'exposition à la lumière UV est nécessaire pour l'activation de la bactériorhodopsine. Le rôle de cette protéine est de créer un gradient de proton entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire afin de synthétiser de l'ATP. Certaines espèces d'archées comme *Halobacterium sp.*, pour utiliser au mieux la quantité d'UV du milieu produisent aussi des vésicules de gaz. Cette technique leur permet de flotter à la surface de la colonne d'eau où la lumière (UV) et l'oxygène sont facilement accessibles afin d'activer au mieux leur système de production d'énergie (Marty,2011; Pfeifer, 2015).

### I.2.5. Déficience en oxygène

La solubilité de l'oxygène moléculaire est fortement réduite à des concentrations élevées en sel. Les *Haloarchaea* ont développé une stratégie pour s'adapter à ces conditions. Certains halophiles comme *Halobacterium salinarum*, sont capables de former des vésicules de gaz qui diminuent la densité cellulaire, leur permettant de monter vers l'interface saumure-air (Pfeifer et al., 2002).

En effet, les vésicules de gaz sont des accessoires de flottation microbiens intracellulaires qui se composent principalement d'une protéine GvpA. Ils fournissent aux cellules une flottabilité vers la surface où la présence de l'oxygène et de la lumière est favorable pour leur croissance (Pfeifer et al., 2002).

Outre la possession des vésicules de gaz, ces microorganismes ont développé aussi d'autres stratégies d'adaptation aux milieux pauvres en oxygène O<sub>2</sub>. En raison de la présence de la protéine rétinale « la bactériorhodopsine BR », ces microorganismes peuvent utiliser la lumière directement pour conduire les processus bioénergétiques (métabolisme photoorganotrophique).

Les BR peuvent être prévues pour être particulièrement très importantes, dans les habitats stressants dans lesquels la lumière intense est combinée avec la déficience de l'oxygène ; une situation que les *Haloarchaea* peuvent rencontrer pendant des jours ensoleillés dans des saumures saturées en sel. Plusieurs études ont montré que les BR ne sont produits que lorsque le taux de croissance est faible. De plus, le taux bas de l'oxygène joue un rôle de stimulateur de production des BR (Pfeifer et al., 2002).

Même dans des conditions totalement anaérobies, il a été démontré que *Halobacterium salinarum* peut se développer en utilisant un métabolisme phototrophe. Généralement, les *Haloarchaea* peuvent utiliser un nombre de composés alternatifs comme un accepteur final d'électrons pour la respiration comme : le nitrate, le diméthylsulfoxyde, le triméthylamine N-oxyle, le fumarate, le soufre et les thiosulfates (Pfeifer et al., 2002).

### I.3. Taxonomie de la famille des *Halobacteriaceae* (jusqu'au Février 2014)

Les *Halobacteriaceae* sont considérées comme un excellent groupe pour montrer comment, la classification des microorganismes a changé au cours du temps suite aux changements des concepts taxonomiques qui conduisent au développement de nouvelles méthodes d'identification (Oren, 2014).

La famille des *Halobacteriaceae* est la seule reconnue dans l'Ordre des *Halobacteriales* qui appartient à la classe *Halobacteria* et le phylum *Euryarchaeota*. Cette famille est constituée de 47 genres et 165 espèces. Quelques genres ont un grand nombre d'espèces (*Halorubrum* : 25 ; *Haloferax* : 12; *Haloarcularia* : 10), mais la plupart d'entre eux ne renferme que quelques espèces seulement (Oren, 2014).

#### I.4. Nomenclature

L'existence de trois domaines a créé une ambiguïté en ce qui concerne la terminologie utilisée pour désigner les microorganismes halophiles y compris les bactéries et les archées comme étant tous des *Halobacteria*, pour faire la distinction entre les deux groupes, DasSarma and DasSarma, (2008) ont proposé de réserver la nomenclature des *Halobacteria* que pour les bactéries halophiles appartenant au domaine « *Bacteria* » et de créer la nomenclature *Haloarchaea* pour les membres halophiles appartenant au domaine « *Archaea* ».

En plus, au niveau de la taxonomie, l'ordre des *Halobacteriales* doit prendre la nomenclature *Haloarchaeales*, et la famille des *Halobacteriaceae* deviendra *Haloarchaeaceae*. Finalement, le genre *Halobacterium* sera mieux nommé *Haloarchaeum* pour refléter son appartenance au groupe des *Archaea* que le groupe des bactéries (DasSarma and DasSarma, 2008).

#### I.5. Phylogénie des *Haloarchaea*

Des études phylogénétiques précédentes ont décrit deux majeurs clades d'*Haloarchaea* et plusieurs groupes plus petits avec des relations mal définies avec ces clades. Une mise à jour des travaux antérieurs, basée sur une phylogénie construite en utilisant un ensemble concaténé de 40 gènes fortement conservés. Les clades précédemment décrits sont étendus comme suit : une espèce est considérée comme appartenant au même clade, si un membre du genre où elle a été affectée déjà, fait partie de ce clade et ce genre ne soit pas ni paraphylétique ni polyphylétique, en incluant aussi toute espèce qui peut se grouper avec ce clade avec un support d'au moins 75% de parenté (Becker et al., 2014).

Grâce à ce processus pour la détermination des relations entre les clades, la résolution de la phylogénie des marqueurs multiples est accrue, ce qui a permis d'assigner *Halovivax* au clade 1. En se basant sur le même processus, un troisième clade a été créé et qui comprend les genres : *Halobacterium*, *Natronomonas*, *Halorhabdus*, *Halosimplex*, *Halomicrobium* et le genre *Haloarcula* (Figure 12).

Des études précédentes ont fait la remarque sur la relation mal résolue entre les genres *Haloterrigena* et *Natrinema*, qui ont été initialement désignés sur la base de la composition des lipides de leurs parois et l'hybridation ADN-ADN. Bien que Tindall, (2003), suggère que les difficultés d'affectation au niveau des genres de certaines espèces de *Haloterrigena* et *Natrinema*, soient simplement le résultat d'une erreur expérimentale (y compris les données erronées d'hybridation ADN-ADN) (Becker et al., 2014).

Les résultats suggèrent que ces genres, tels que définis actuellement, sont en fait polyphylétiques. Les espèces appartenant à ces genres doivent donc être réaffectées en utilisant des indicateurs phylogénétiques modernes (Becker et al., 2014).

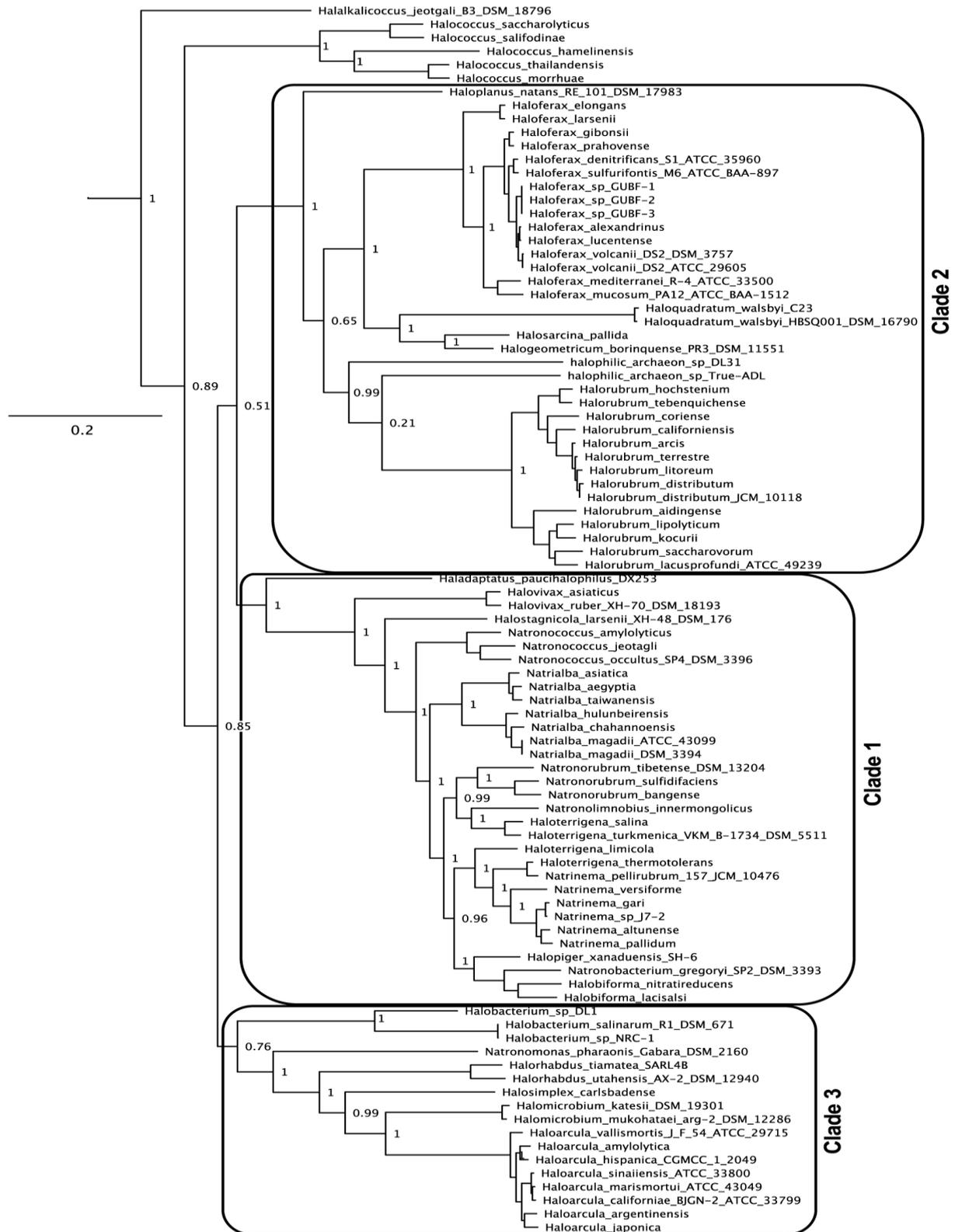
La phylogénie multi-marqueurs a également contribué à la résolution d'autres paraphylie et polyphilie au niveau des genres apparentés. Ceux-ci comprennent les genres *Natronorubrum* et *Halobiforma*, qui semblent être non-monophyletique, quand il y a une considérable similitude au niveau de *rpoB* ADN ou les protéines (Becker et al., 2014).

#### **I.6. Méthodes de détermination des nouveaux membres de la famille des *Halobacteriaceae***

Conformément à la recommandation 30b du code international de nomenclature des bactéries qui appelle à l'élaboration des normes minimales pour la description de nouvelles espèces. Oren et al., (1997), ont proposé des normes minimales pour la description des nouveaux taxons dans l'ordre des *Halobacteriales*.

Les normes minimales incluent des informations sur les caractéristiques suivantes : morphologie cellulaire, mobilité, pigmentation, exigence en sels pour éviter la lyse cellulaire, optimum de croissance sur des concentrations différentes en NaCl et MgCl<sub>2</sub>, détermination de l'optimum de croissance à différentes valeurs de pH et de température ; croissance anaérobie en présence de nitrate ou de l'arginine ; la production d'acide à partir d'une gamme de substrats carbonés, l'aptitude à croître sur des sources de carbone et d'azote simples, tests de l'oxydase et de la catalase, l'hydrolyse de l'amidon, de la caséine, et du Tween 80 ; sensibilité aux antibiotiques, et l'analyse des lipides polaires.

La description d'un nouveau taxon devrait être compatible avec la phylogénie, qui est généralement fondée sur les informations des séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S, ainsi que les données de l'hybridation ADN-ADN dans le cas d'une description des nouvelles espèces. Cette proposition a été approuvée par les membres du sous-comité de la taxonomie des *Halobacteriaceae* du comité international de la systématique en bactériologie (Oren et al., 1997).



**Figure 12.** Arbre phylogénétique des *Haloarchaea*.

Phylogénie multi-marqueurs incluant 80 génomes et d'autres génomes d'*Haloarchaea*, recueillies auprès IMG. L'arbre déraciné a été construit à partir d'un alignement concaténé de 40 marqueurs PhyEco utilisant PhyML. Le dossier complet de l'arbre peut être consulté par Dataset S19. Les cases noires représentent les clades haloarchéenne comme décrit dans le paragraphe. Les racines des arbres de *Methanocella* (non représentées) (Becker *et al.*, 2014).

## I.7. Applications biotechnologiques des *Haloarchaea*

Outre leur rôle dans les environnements hyper salins, ce groupe de procaryotes a un intérêt considérable en raison de leurs potentiels d'utilisation dans diverses applications biotechnologiques et industrielles (Rothschild and Mancinelli, 2001).

Cependant, certains métabolites, tels que certaines protéines, enzymes extracellulaires, des substances osmotiquement actives (solutés compatibles), exopolysaccharides et des lipides spéciaux ont des applications potentielles dans l'industrie (Schiraldi, 2002). En effet, les *Archaea* halophiles semblent être une très bonne source de diverses biomolécules et peuvent ouvrir les portes vers la valorisation et le développement de nouveaux produits qui peuvent résister à des conditions hostiles à cause de leurs propriétés uniques (Rothschild and Mancinelli, 2001).

### I.7.1. Enzymes

Les enzymes tels que les amylases, amyloglucosidases, protéases et lipases qui fonctionnent à une forte concentration saline, peuvent être utiles dans des processus biotechnologiques exigeant une concentration élevée en sels pour la dégradation des macromolécules (Fukushima et al., 2005).

#### I.7.1.1. Glycosidases

La production des *exo*-enzymes tels que les amylases et les amyloglucosidases qui fonctionnent à une forte concentration saline, peut être utile dans des processus biotechnologiques exigeant une concentration élevée en sels pour la dégradation des macromolécules glucidiques. L'exemple de l'espèce *Haloferax mediterranei* qui sécrète  $\alpha$ -amylase lorsqu'elle est cultivée sur l'acétate d'ammonium comme source de carbone et d'azote. Cette amylase a une masse moléculaire d'environ 58 kDa avec une activité maximale à 3 M de NaCl. La température optimale est comprise entre 50 et 60°C, mais contrairement aux amylases décrites jusqu'à présent, cette amylase garde 65% de son activité maximale à 80°C avec un pH optimal entre 7 et 8 (Carol, 2011).

#### I.7.1.2. Lipases

L'isolement et la caractérisation des lipases stables à des concentrations élevées en sel, provenant des bactéries halophiles, font l'objet d'un intérêt croissant. La disponibilité de ces enzymes faciliterait les procédés industriels qui requièrent une activité puissante à une forte concentration en sel et sous une basse activité en eau (Guzman et al., 2008).

Les lipases peuvent être des phospholipases, c.-à-d., elles hydrolysent le groupement phosphate à partir des phospholipides, où ils peuvent être actifs contre l'un des acides gras sur les phospholipides ou les triglycérides.

Bhatnagar et al., (2005), ont fait le screening de l'activité lipolytique (activité contre le p-nitrophényl butyrate et le p-nitrophényl palmitate) d'une collection des souches Algériennes.

La plupart des 35 souches testées, a montré une activité contre les deux substrats et 12%, ont montré une activité contre l'huile d'olive. Ces auteurs ont choisi l'espèce *Natronococcus sp.*, une *Archaea* halophile alcaliphile pour une étude approfondie, l'activité enzymatique est trouvée à une concentration de 3M de NaCl avec une température de 40°C. des études ultérieures ont montré que l'activité optimale est trouvée à 4M de NaCl, et il n'y a pas une activité en absence de sel. Cette lipase est thermostable lorsqu'elle est incubée à 50°C pendant 60 minutes, mais seulement 50 % de l'activité enzymatique est conservée lorsque l'enzyme est incubée à 80°C, pendant 76 min. Cette lipase de *Natronococcus sp.* hydrolyse l'huile d'olive et contient dans son site actif la serine. Ces enzymes peuvent être utilisées dans la production des produits chimiques spéciales. Cependant, à ce jour, il n'y a pas d'applications industrielles connues pour l'une de ces enzymes (Guzman et al., 2008).

### I.7.1.3. Protéases

Les protéases microbiennes sont l'une des classes d'enzymes les plus intensivement étudiées et largement appliquées dans les processus industriels. Elles sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets (Ayad, 2011).

Les protéases qui ont été produites par *Halobacterium spp.*, *Haloferax mediteranei*, *Natrialba asiatica*, *Natrialba magadii*, *Natronococcus occultus* et *Natronococcus pharaonis*, ont été purifiées et caractérisées. Par exemple ; la sérine-protéase d'*Halobacterium salinarum* était la première hydrolase extracellulaire identifiée à partir d'une *Archaea* extrêmement halophiles, elle nécessite 4M de NaCl pour une activité catalytique et une stabilité optimale avec un rendement allant jusqu'à 76% dans un milieu dont l'activité en eau ( $a_w$ ) est faible (Stuti and meenu, 2015).

### I.7.2. Archaeosomes et lipides des *Haloarchaea*

Les lipides membranaires des *Haloarchaea*, sont distinctement différentes de celles des bactéries par le type de la liaison éther entre le glycérol et le groupement d'hydrocarbures de nature isoprénoides. Ainsi, les groupements de glycérol sont chélatés par des groupements phosphates. Ces qualités inhabituelles permettent de les utiliser comme des archaeosomes (liposomes obtenus avec les membranes lipidiques à partir des cellules d'*Archaea*).

Ces archaeosomes présentent plus de stabilité à des conditions différentes (stress oxydatifs, température basse ou élevée, pH acide ou alcalin, l'action des phospholipases et des sels biliaires) par rapport aux liposomes classiques (Enache et al., 2015).

Les lipides tels que le di-éther de glycérol peut trouver une application comme un additif alimentaire, servir d'un remplaçant gras pauvre en calories (Enache et al., 2015).

### I.7.3. Production des biosurfactants

Certaines espèces d'*Haloarchaea*, sont capables de produire des agents tensio-actifs dits, biosurfactants, hautement stables dans des conditions extrêmes de pH, de température et de salinité. Ces biomolécules peuvent être utilisés dans plusieurs domaines (pétroliers, pharmaceutiques, alimentaires, agronomiques et dans la bioremédiation des sols) (Carol, 2011 ; Kebbouche-Gana et Gana, 2014).

### I.7.4. Production des halocines

La diversité biologique du milieu marin, en particulier, offre un énorme champ d'application pour la découverte de nouveaux produits naturels, dont plusieurs sont des cibles potentielles pour les développements biomédicaux. Les extrémophiles ont été reconnus comme des sources précieuses de nouveaux bioproduits et cela pourrait bien inclure les agents antimicrobiens (Fiedler et al., 2005).

Les halocines sont des protéines bactériocines-like ou peptides produits par de nombreuses espèces des *Halobacteriaceae* ; *Haloferax mediterranii* et *Haloferax gibbonsi*, qui agissent contre des microorganismes phylogénétiquement proches et qui colonisent la même niche écologique (Platas et al., 2002 ; Yun et al, 2003). Ces substances ont une large application, notamment dans la conservation des produits alimentaires par salaison (viande, poisson, etc.) (Oren, 1999).

### I.7.5. Production des biopolymères (PDG), (PHA) et (PHB)

Ces polymères sont des hétéropolysaccharides qui se composent essentiellement du mannose, mais comprennent aussi du glucose, galactose, des sucres non identifiés, des acides aminés, de l'acide uronique et des sulfates. Anton et al., (1988) ont également rapporté les propriétés rhéologiques montrant une plasticité et une viscosité élevée à faibles concentrations. Bien qu'elle soit connue pour produire dans le domaine *Bacteria*, le poly- $\gamma$ -D-glutamate (PDG) extracellulaire n'est pas couramment produit par les *Haloarchaea*. Cependant, le PDG est produit par *Natrialba aegyptiaca* S40. Sa production est dépendante de la croissance sur un milieu de culture contenant 20% (p/v) de NaCl et la concentration maximale a eu lieu après 90 h de sa croissance. Il en résulte 470 mg/l de PDG (Ventosa and Nieto, 1998).

Le premier rapport qui prouve la production des polyhydroxyalcanoates (PHA) par les *Haloarchaea* par Fernandez-castillo et al., (1986). Lorsqu'ils ont noté que les deux espèces *Haloferax mediteranei* et *Haloferax volcanii*, peuvent produire jusqu'à 3 à 8 g/l d'un hétéropolysaccharide acide avec une haute viscosité aux concentrations relativement basses et résistant aux conditions extrêmes (concentrations élevées en sel, pH et T). La structure de ce polymère a été récemment élucidée (Ventosa and Nieto, 1998).

Ils produisent aussi, le polyhydroxybutrate (PHB) à 17 et 7% en poids sec, respectivement. Ils ont également montré que la concentration en sel fait une différence, en influençant la quantité du PHB produite avec une production maximale de 35 à 38 % du poids sec, survenant à des concentrations de 15 à 20% de sel. Des concentrations plus élevées de sel diminuent ces taux de moitié (Ventosa and Nieto, 1998).

Parmi les inconvénients qui limitent l'utilisation des bio polymères par les *Haloarchaea* est le coût relativement élevé du milieu de culture des organismes producteurs des PHA, ce dernier est utilisé principalement pour la production de plastiques biodégradables.

En effet de tels polymères peuvent être employés pour modifier les propriétés rhéologiques des systèmes aqueux, pour la stabilisation de la viscosité en tant que des agents d'épaississement, de gélification et d'émulsification et peuvent trouver des applications dans la récupération assistée du pétrole par les micro-organismes (Ventosa and Nieto, 1998).

#### **I.7.6. Dégradation des hydrocarbures**

Plusieurs expériences ont été réalisées dans lesquelles les *Haloarchaea* ont été testés pour leurs capacités de dégrader les polluants. La plupart d'entre elles ont été menées sous forme de cultures mixtes sauf pour le travail de Bertnard *et al.*, (1990) et d'Emerson *et al.*, (1994) et pour la dégradation des hydrocarbures.

D'autres études importantes ont été effectuées par Woolard and Irvine, (1995) et Kargi and Uygur, (1996) pour l'assainissement des eaux usées salines ; par kulicheveskya *et al.*, (1992) pour l'oxydation des hydrocarbures, et le brevet délivré pour Patzelt *et al.*, (1998) pour une partielle décomposition des hydrocarbures halogénés. La dégradation des hydrocarbures par les archées halophiles peut s'avérer utile dans la bioremédiation des fuites de pétrole (Litchweld, 2011).

# **Chapitre II :**

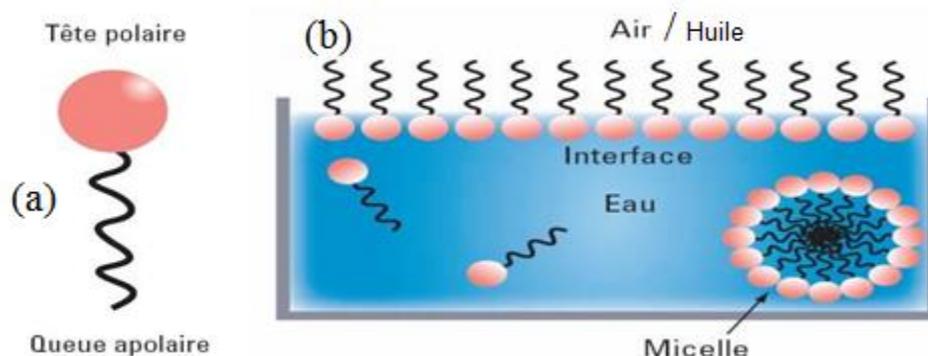
## **Biosurfactants**

---

## II.1. Surfactants

Encore appelés tensio-actifs, les surfactants (diminutif de « surface active agents ») sont des composés chimiques qui abaissent la tension superficielle entre deux surfaces (par exemple une phase huileuse et une phase aqueuse). Ils permettent de mélanger deux phases non miscibles et donc de fabriquer les émulsions comme la vinaigrette ou les mousses. Ils sont omniprésents dans notre quotidien. Détergents, cosmétique, agroalimentaire, santé, leurs applications sont aussi nombreuses que diverses et variées (Briandet *et al.*, 2012; Le roux, 2015).

Les surfactants sont généralement des composés de masses molaires relativement élevées ( $M > 200$  g/mol) ; ils sont amphiphiles, c'est à dire qu'ils comportent deux zones distinctes d'affinités chimiques très différentes ; ils se composent à la fois d'une région hydrophile et d'une autre hydrophobe (Figure 13(a)), d'où leur tendance à s'adsorber aux interfaces, créant ainsi une monocouche tapissant l'interface (eau/air ou eau/ huile par exemple), comme illustrée sur la figure 13(b), où l'on entend par « huile » tout solvant organique apolaire.



**Figure 13.** (a) Représentation d'une molécule de surfactant avec sa chaîne aliphatique hydrophobe et sa tête polaire hydrophile. (b) Placement des surfactants à une interface eau/air. Les têtes polaires se mettent dans l'eau alors que les queues fuient l'eau.

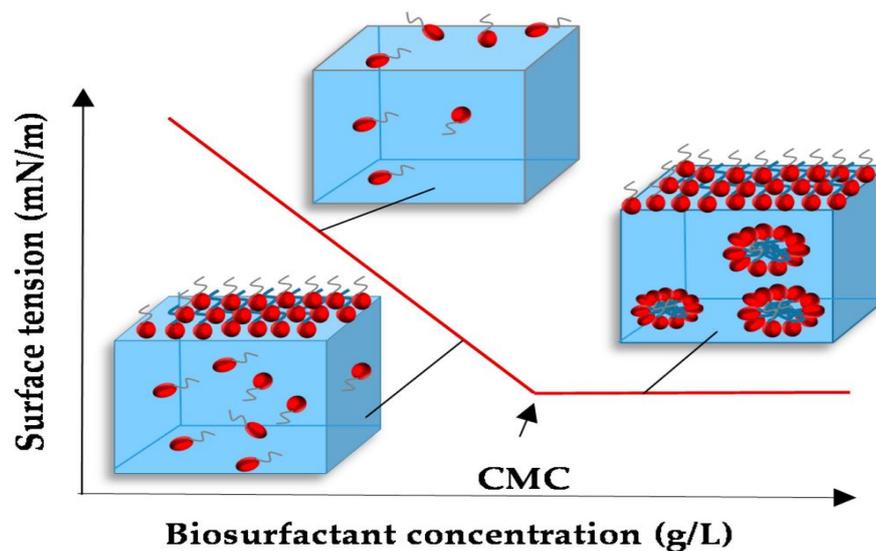
La partie hydrophobe est souvent une chaîne aliphatique, appelée queue, et la partie hydrophile (tête polaire) peut être ionique (anionique ou cationique) ou formé de quelques unités neutres mais solubles dans l'eau. Quelques exemples sont donnés dans le tableau 3 (Le Grand-Piteira, 2006).

**Tableau 3.** Exemples de surfactants ioniques et non-ioniques (Le Grand-Piteira, 2006).

Non	Nom développé	Formule semidéveloppé	Nature
SDS	Dodécylsulfate de sodium	$(C_{12}H_{25} - O - SO_3^-, Na^+)$	Anionique
$C_n$ TAB	Bromures d'alkyltriméthyl ammonium	$(C_nH_{2n+1} - N^+ - (CH_3)_3, Br^-)$	Cationique
$C_nE_m$	Polyoxyéthylène alkyl éthers	$(C_nH_{2n+1} - O - CH_2 - CH_{2m} - OH)$	Non-ionique

L'interposition des molécules de surfactants entre les deux milieux modifie leurs interactions directes et généralement abaisse la tension superficielle grâce à l'affinité des surfactants pour chacun des deux fluides. Si par exemple, on cherche à éliminer une tâche de graisse avec de l'eau additionnée de surfactants, les queues aliphatiques viennent se placer dans la tâche d'huile, laissant à la surface leurs têtes hydrophiles. L'élimination de la tâche d'huile, maintenant soluble dans l'eau, est alors facilitée (Le Grand-Piteira, 2006). Les détergents des lessives sont des exemples de surfactants utilisés pour détacher les salissures des vêtements (Briandet et al., 2012).

Les tensio-actifs sont classés en deux catégories : les solubles dans l'eau et les insolubles. Les insolubles ne présentent aucune affinité pour l'eau et vont tout faire pour rester à l'interface. Dans le cas d'un tensioactif soluble dans l'eau, la tension de surface eau/air diminue lorsque la concentration du tensioactif dans l'eau augmente. Puis au-delà d'une certaine concentration en tensioactif dans l'eau, appelée concentration micellaire critique (désigné par l'abréviation CMC), la tension superficielle reste constante : l'interface est alors saturée en molécules tensioactives et les molécules en solution forment des agrégats appelés micelles (Figure 14) (Emanuel, 2003; Le roux, 2015, Santos et al., 2016).



**Figure 14.** Illustration de la région dans laquelle commence la formation de la concentration micellaire critique (CMC) (Santos et al., 2016).

## II.2. Biosurfactants

Les biosurfactants (BS) regroupent une classe de molécules tensioactives, structurellement variées, et communément synthétisées par les microorganismes (bactéries, levures, champignons, et archées halophiles) (Rone and Rosenberg, 2001 ; Chen et al., 2007 ; kebbouche-Gana et al., 2009). Les BS sont des biomolécules amphiphiles, possèdent à la fois une fraction hydrophile et une autre hydrophobe. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés,

peptides ou de polysaccharides ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou insaturés (Rodrigues *et al.*, 2006a). Parmi les différents biosurfactants décrits, on trouve des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides (Meylheuc *et al.*, 2001).

Tout comme leurs homologues de synthèse chimique, ils peuvent avoir des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes ou encore dispersantes, mais également des propriétés plus spécifiques (i.e. propriétés antibiotiques), elles jouent aussi un rôle dans la solubilisation des substrats hydrophobes (Meylheuc *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2006a).

Certaines de ces propriétés peuvent, de plus, être conservées dans des conditions extrêmes d'utilisation telles que : pH acide, température élevée, etc. Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, ils sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que : l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie ou encore la cosmétologie et devraient rapidement trouver leur place dans de nouveaux secteurs d'applications comme les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou encore le domaine médical (Meylheuc *et al.*, 2001; Precott *et al.*, 2003).

Les biosurfactants d'origine microbienne, les plus largement utilisés sont les glycolipides. Ces composés possèdent des régions hydrophiles et hydrophobes distinctes. La structure et les caractéristiques du biosurfactant dépendent des conditions de croissance et de la source de carbone utilisée. On obtient souvent de bons rendements avec des substrats insolubles. Ces biosurfactants sont d'excellents agents dispersants ; ils ont été employés lors de la marée noire de l'*Exxon Valdez* (Precott *et al.*, 2003). Par comparaison aux surfactants de synthèse, les biosurfactants ont fait l'objet d'un intérêt croissant du fait qu'ils ont l'avantage d'être non toxiques et eux-mêmes biodégradables (Briandet *et al.*, 2012).

### II.3. Types des biosurfactants

Les biosurfactants d'origine microbienne, sont classés selon la composition chimique et le microorganisme producteur. Les biosurfactants ont été divisés en deux classes :

- Les biosurfactants à faible poids moléculaire qui sont efficaces dans l'abaissement de la tension interfaciale. Cette classe comprend : les glycolipides, les lipopeptides, les lipoprotéines, les acides gras, les lipides neutres et les phospholipides.
- Les biosurfactants à poids moléculaire élevé qui sont très efficaces comme des agents émulsifiants et des stabilisateurs. Ces biosurfactants regroupent les biosurfactants polymériques et les biosurfactants particuliers (Nitschek and Costa, 2007).

La plupart des biosurfactants issus de diverses sources microbiennes sont soit anionique ou neutre et la fraction hydrophobe est basée sur une longue chaîne d'acides gras ou dérivés

d'acides gras, tandis que la portion hydrophile peut être un glucide, un acide aminé, un acide phosphorique ou un peptide cyclique (Nitschek and Costa, 2007). Bodour *et al.*, (2004) ont décrit une nouvelle classe de biosurfactants, nommée les flavolipides, produite par *Flavobacterium sp.*, isolé du sol. Le nouveau tensioactif a montré une forte activité de surface et une grande capacité d'émulsification, en plus, il présente une fraction polaire constituée d'acide citrique.

Les biosurfactants incluent les classes majeures suivantes : les glycolipides, les lipopeptides, les lipoprotéines, les acides gras, les phospholipides et lipides neutres, les surfactants polymériques et les biosurfactants particuliers (Alizadeh and Choobari, 2013). Quelques structures de biosurfactants les plus couramment produits par les microorganismes, sont présentées dans la figure 15.

### II.3.1. Glycolipides

Les biosurfactants les plus connus sont les glycolipides. Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acide aliphatique ou hydroxylaliphatique. Parmi les glycolipides, les mieux connus sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (Alizadeh and Choobari, 2013).

#### ▪ Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont constitués du rhamnose lié à une ou deux molécules d'acide  $\beta$ -hydroxydecanoïque. La production du rhamnose, a été décrite pour la première fois chez *Pseudomonas aeruginosa* par Javis and Johnson, (1949) (Alizadeh and Choobari, 2013).

#### ▪ Tréhalolipides

Plusieurs types structuraux de biosurfactants microbiens de type tréhalolipide ont été signalés. Le disaccharide tréhalose lié à C-6 et C-6' de l'acide mycolique, associé à la plupart des espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. Les acides mycoliques sont branchés en position  $\alpha$  avec les  $\beta$ -hydroxydes des acides gras. Les tréhalolipides provenant de différents microorganismes, diffèrent par la taille et la structure de l'acide mycolique, le nombre d'atomes de carbone et le degré d'insaturation. Les tréhalolipides produits par *Rhodococcus erythropolis* sont largement étudiés (Alizadeh and Choobari, 2013).

#### ▪ Sophorolipides

Les sophorolipides, sont produites principalement par les levures telles que *Torulopsis bombicola* et *Torulopsis petrophillum*. Les sophorolipides sont constituées d'un hydrate de carbone, le sophorosedimérique lié à une longue chaîne d'acide gras hydroxylé. Ces agents tensioactifs biologiques sont un mélange d'au moins 6 à 9 sophorosides hydrophobes différents (Alizadeh and Choobari, 2013).

### II.3.2. Lipopeptides et lipoprotéines

Un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris des antibiotiques décapeptidiques comme la gramicidine et des antibiotiques lipopetidiques (les polymyxines) produites par *Bacillus brevis* et *B. polymyxa*, respectivement. La surfactine, c'est une lipopeptide cyclique, produite par *Bacillus subtilis* ATCC21332, est l'un des biosurfactants les plus puissants. *Bacillus licheniformis* produit plusieurs biosurfactants qui agissent en synergie et présentent une stabilité élevée vis-à-vis la température, le pH et la salinité. Yakimov et al., (1995) ont montré la production d'un nouvel agent tensioactif-lipopetidique, la lichenysine A par *B. Licheniformis* (Alizadeh and Choobari, 2013).

### II.3.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

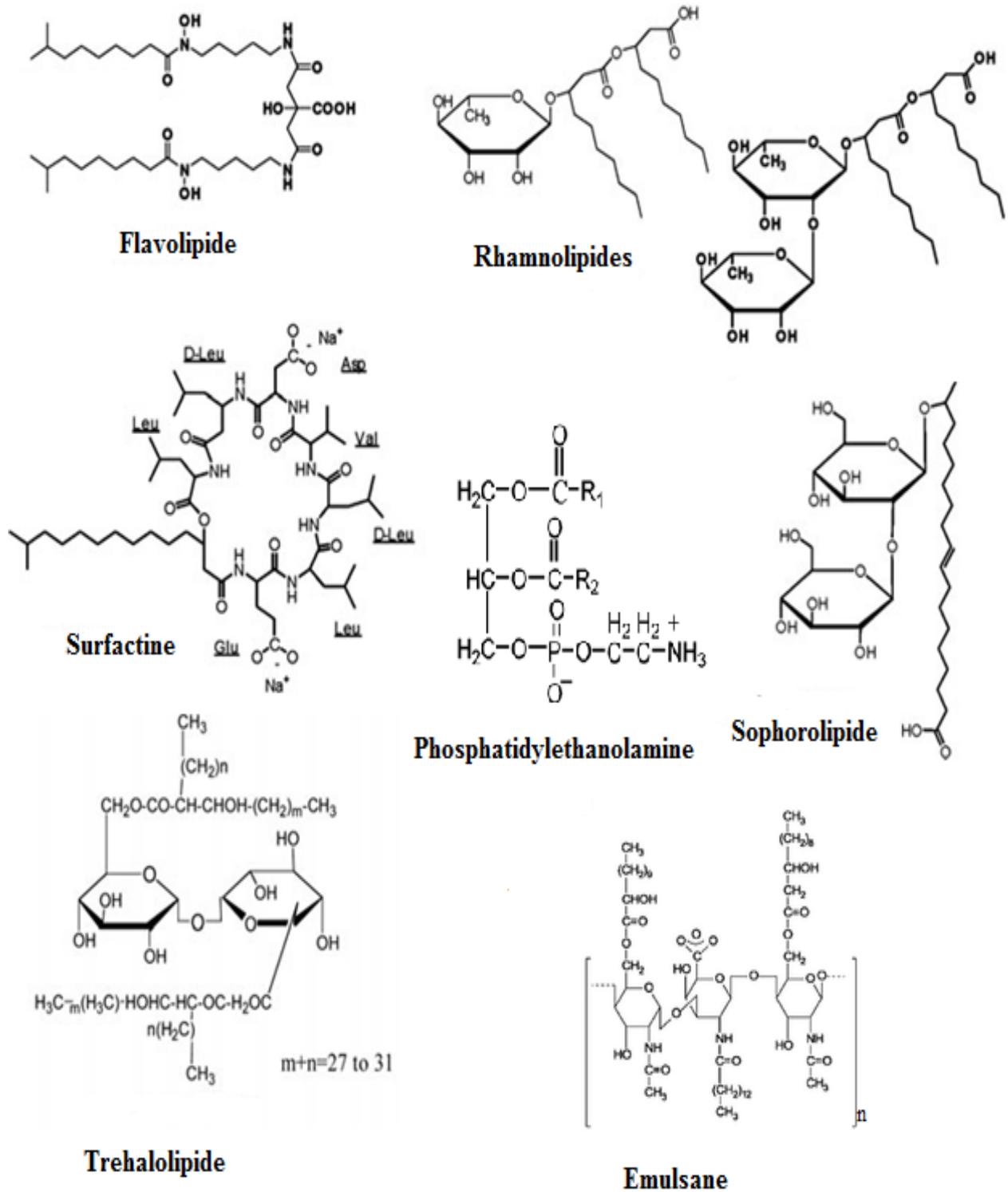
Plusieurs bactéries et levures, produisent des grandes quantités d'acides gras et d'agents tensioactifs phospholipidiques pendant leur croissance sur les n-alcanes. Le phosphatidyléthanol amine, produit par *R. erythropolis*, cultivé sur des n-alcanes, a provoqué un abaissement de la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane, au moins de 1mN/m à une concentration (CMC) de 30mg/l (Alizadeh and Choobari, 2013).

### II.3.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymériques, les mieux étudiés sont: émulsane, liposane, mannoprotéine et d'autre complexes constitués de protéines et de polysaccharides.

L'alsane est un biosurfactant constitué d'une alanine anionique contenant un hétéropolysaccharide protéique avec une masse moléculaire d'environ 1 MDa, produit par *Acinetobacter radioresistens* KA-53. Le composant de polysaccharide de l'alsane est inhabituel parce qu'il contient l'alanine lié par des liaisons covalentes. Le composant protéique de l'alsane semble jouer un rôle important dans la structure et l'activité du complexe (Alizadeh and Choobari, 2013).

La liposane est un émulsifiant soluble dans l'eau extracellulaire produite par *Candida lipolytica*. Elle est constituée de 83% de glucides et de 17% de protéines. La portion hydrates de carbone est un hétéropolysaccharide comprenant de glucose, galactose, galactosamine et l'acide galacturonique (Alizadeh and Choobari, 2013).



**Figure 15.** Structures biochimiques des biosurfactants les plus couramment produits par les microorganismes (Palashpriya *et al.*, 2010; Fakruddin, 2012).

### II.3.5. Biosurfactants particuliers

Des biosurfactants résultants de la séparation des particules extracellulaires des membranes vésiculaires pour former des microémulsions. Ces biosurfactants ont une influence sur l'absorption d'alcane dans les cellules microbiennes.

*Acinetobacter spp* H01-N tendent à produire des vésicules de 20 à 50 nm, composées des protéines et des phospholipides (riches en phasphatidyléthanoline). Les propriétés tensioactives puissantes de ces vésicules sont évidentes d'après l'observation qui montre qu'elles sont capables de générer des microémulsions optiquement claires (Alizadeh and Choobari, 2013; Santos et al., 2016).

### II.4. Microorganismes producteurs des biosurfactants

Les biosurfactants sont produits par une variété des microorganismes principalement, les bactéries, les champignons, les levures et les archées. Ces biomolécules sont diversifiées de point de vue nature et composition chimique (Tableau 4) (Nitschek and Costa, 2007 ; Kebbouche-Gana et al., 2009).

**Tableau 4.** Microorganismes producteurs des biosurfactants (Nitschek and Costa, 2007 ; Santos et al., 2016).

Classes des biosurfactants	Microorganisme producteur
<b>Glycolipides</b>	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tréhaloses lipides	<i>Rhodococcus erithropolis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>
Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>
Mannosylerythritol lipides	<i>Candida antarctica</i>
<b>Lipopeptides</b>	
Surfactine/ Iturine/ Fengycine	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lichensine	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettine	<i>Serratia marcescens</i>
Phospholipides	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
<b>Acides gras/ Lipides neutres</b>	
Acide corynomicolique	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
<b>Biosurfactants polymériques</b>	
Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasane	<i>Acinetobacter radioresstens</i>

Liposane	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanane	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Biosurfactants particuliers</b>	
Vesicules	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
Paroi des cellules microbiennes	<i>Cyanobacteria</i>

### II.5. Rôles physiologiques des biosurfactants dans les microorganismes

Le rôle physiologique principal des biosurfactants est de permettre aux microorganismes à croître sur des substrats non miscibles à l'eau en réduisant la tension superficielle à la fin de la phase de croissance, rendant ainsi le substrat plus facilement disponible pour l'absorption et le métabolisme, quoique les mécanismes moléculaires liés à l'assimilation et le métabolisme de ces substrats ne soient pas toujours claires et ne sont pas bien compris (Briandet *et al.*, 2012).

Un autre rôle physiologique des biosurfactants est leurs activités antimicrobiennes vers des microorganismes divers. Généralement, plusieurs agents tensioactifs inhibent des microorganismes taxonomiquement différents. De plus, les biosurfactants ont été démontré pour être impliqués dans l'adhésion cellulaire (formation des biofilms) qui confèrent plus de stabilité dans des conditions environnementales hostiles et dans la virulence et la désorption cellulaire lorsque les organismes ont besoin de trouver de nouveaux habitats pour la survie (Alain, 2012).

### II.6. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants ont beaucoup d'avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement, certains d'entre eux sont :

- **Biodégradabilité :** Les tensio-actifs biologiques sont facilement dégradables par les microorganismes (Mohan *et al.*, 2006).
- **Faible toxicité:** Les tensio-actifs chimiques montrent une toxicité élevée que celle des biosurfactants et des valeurs de CE50 plus élevées (concentration efficace pour diminuer 50 % de la population testée) (Krishnaswamy, 2008).
- **Disponibilité de la matière première:** Les biosurfactants peuvent être produits à partir des matières premières de très bon marché qui sont disponibles en grandes quantités. La source de carbone peut provenir des hydrates de carbone, des hydrocarbures, des glucides et/ou des lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres (kosaric, 2001).
- **Tolérance aux variations des facteurs physiques:** Beaucoup de biosurfactants ne sont pas affectés par des facteurs exogènes comme la température, le pH et les forces ioniques. La lichensyne produite par la souche *Bacillus licheniformis* n'a pas été affectée

par une plage de température (jusqu'à 50°C), de pH (de 4-9) et des salinités (jusqu'à 50g/l pour NaCl et 25g/l pour Ca<sup>2+</sup>) (Krishnaswamy, 2008).

- **Abaissement de la tension superficielle et interfaciale:** Mulligan, (2005) a déclaré qu'un bon agent tensioactif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN.m<sup>-1</sup> et la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane de 40 à 1 mN.m<sup>-1</sup>; la surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN.m<sup>-1</sup> et la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à une valeur inférieure à 1 mN.m<sup>-1</sup> (Krishnaswamy, 2008).
- **Autres avantages:** Biocompatibilité et la digestibilité qui permettent leurs applications dans des produits cosmétiques, pharmaceutiques et comme des additifs alimentaires (kosaric, 2001).

### II.7. Inconvénients des biosurfactants

Les biosurfactants ont beaucoup d'avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement. Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation (Bognolo, 1999). Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques (Vandyke et al., 1991 ; Fiechter, 1992).

### II.8. Facteurs qui influencent la production des biosurfactants

La composition et l'activité émulsifiante des biosurfactants ne dépendent pas seulement de la souche productrice, mais également des conditions de culture y compris la nature des sources de carbone et d'azote, ainsi que la rapport C: N ; les paramètres physico-chimiques tels que la température, l'aération et les cations divalents. Cependant, le pH influence non seulement la quantité de biosurfactant produite, mais aussi, la qualité du polymère synthétisé (Fakrudin, 2012).

#### II.8.1. Source de carbone

La qualité et la quantité des biosurfactants produits sont affectées et influencées par la nature du substrat carboné. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose et le glycérol, ont été rapporté comme des bons substrats pour la production des biosurfactants (Fakrudin, 2012).

#### II.8.2. Source d'azote

L'azote est important dans le milieu utilisé pour la production des biosurfactants, car il est essentiel pour la croissance microbienne, comme les protéines et les enzymes de synthèse en dépendent.

Des variétés des sources d'azote ont été utilisées pour la production de tels agents tensioactifs biologiques, sous forme de peptones, d'urée, des extraits de levure, des sulfates d'ammonium, nitrates, nitrates de sodium, les extraits de viandes et de malt.

Bien que l'extrait de levure soit la source d'azote la plus utilisée pour la production des biosurfactants. Il est utilisé avec des concentrations bien déterminées qui dépend du microorganisme et du milieu de culture utilisé.

Les sels d'ammonium et l'urée sont des sources préférées d'azote, pour la production des biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus*, tandis que les nitrates sont considérés des substrats de choix pour une production maximale des biosurfactants par *Pseudomonas aerogenosa* (Fakrudin, 2012).

### II.8.3. Facteurs environnementaux

Ils sont extrêmement importants pour le rendement et les caractéristiques des biosurfactants. L'obtention de grandes quantités des biosurfactants, nécessitent l'optimisation du bioprocédé, puisque le produit peut être affecté par des changements de la température, du pH, de l'aération et des vitesses d'agitation.

La plupart des productions des biosurfactants sont effectuées à des températures de 25 à 30°C. L'effet du pH sur la production des biosurfactants a été étudié par Zinjarde and Pant, (2002) qui ont déclaré que la meilleure production a eu lieu lorsque le pH était de 8.0 (pH naturel de l'eau de mer) (Fakrudin, 2012).

### II.8.4. Aération et agitation

L'aération et l'agitation sont des facteurs très importants qui influencent la production des biosurfactants, comme toutes les deux facilitent le transfert de l'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Elles peuvent également être liées à la fonction physiologique de l'émulsification. Il a été suggéré que la production des bioémulsifiants peut améliorer la solubilisation des substrats insolubles dans l'eau et par conséquent de faciliter le transport des éléments nutritifs aux microorganismes. Adamczak and Bednarski, (2000), ont observé que la meilleure valeur de la production des biosurfactants est de 45,5 g/l, a été obtenue lorsque le débit d'écoulement d'air était 1 vvm et la concentration d'oxygène dissoute a été maintenue à 50 % de la saturation (Fakrudin, 2012).

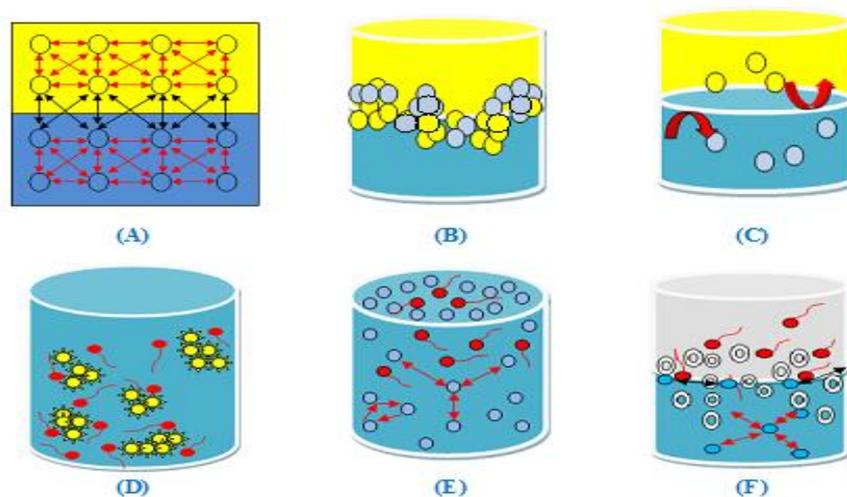
### II.8.5. Concentration en sel

La concentration en sel du milieu de culture a un effet sur la production des biosurfactants, comme les activités cellulaires des micro-organismes sont affectées par la concentration en sel. Néanmoins, des observations opposées ont été remarquées pour quelques

produits de biosurfactants qui n'ont pas été affectés par des concentrations allant jusqu'à 10% (poids/volume), bien que des réductions légères de CMC ont été détectées (Fakrudin, 2012).

### II.9. Propriétés fonctionnelles des agents tensio-actifs

La position, la nature et la taille des groupes fonctionnels hydrophiles et hydrophobes, déterminent par conséquent l'application pratique des agents tensio-actifs dans diverses applications industrielles liées aux détergents, la récupération pétrolière, la cosmétique, l'industrie agro-alimentaire, les produits pharmaceutiques, etc. (Satpute et al., 2010).



(A) Tension superficielle et interfaciale.  
(D) Adsorbant.

(B) Emulsifiant.  
(E) Mouillant.

(C) Dispersant.  
(F) Moussant.

● Phase huileuse.

● Phase aqueuse.

● Molécule d'un agent tensioactif.

⊙ Bulles d'air.

☀ Agrégation des particules insolubles en suspension.

↔ Tension superficielle (TSF).

↔ Tension interfaciale (TIF).

**Figure 16.** Représentation des différentes propriétés fonctionnelles des Biosurfactants.

(Les figures 16.A à 16.F ont été adaptées aux informations citées dans la référence : Satpute et al., 2010).

Ces molécules présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines. Cependant, elles sont capables de réduire les tensions superficielles (TSF) et interfaciales (TIF) qui sont des propriétés très importantes de l'agent tensio-actif (Figure 16.A). En effet, la TSF de l'eau est de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  et lorsque l'agent tensioactif est ajouté, cette valeur sera réduite (Satpute et al., 2010).

Les agents tensioactifs peuvent aussi induire la formation d'émulsion sous forme de gouttelettes microscopiques, conduisant à un mélange des deux liquides non-miscibles (Figure 16.B). Après certains temps, ces surfactants peuvent séparer ces deux phases non-miscibles. Ainsi, les micelles formées, se désémulsifient et montent puis se réunissent (Figure 16.C) et conduisant à la séparation des deux phases (Satpute et al., 2010).

Les tensioactifs améliorent la solubilisation des matériaux insolubles, à forte concentration du tensioactifs, les structures micellaires sont formées. Cependant, des molécules insolubles sont encapsulées dans des structures micellaires et mis en solution abondamment. Cette propriété est importante pour former des substances insolubles dans l'eau dans des solutions aqueuses, ou de substances solubles dans l'eau dans des solvants organiques. Les biosurfactants sont plus efficaces que les surfactants synthétiques pour solubiliser un mélange de composés complexes dans une solution aqueuse. [Perfumo et al., \(2009\)](#) ont rapporté sur les rôles des biosurfactants dans l'accès aux substrats hydrophobes. [Wong et al., \(2004\)](#) ont également rapporté la même observation sur les effets des agents tensioactifs synthétiques que biologiques.

La capacité à s'adsorber sur des substrats hydrophobes ([Figure 16.D](#)), permettant aux surfactants à améliorer le rétablissement du pétrole. De ce fait, l'adsorption facilite une forte interaction des molécules de l'agent tensioactifs avec la roche qu'avec le pétrole, ce qui augmente la récupération du pétrole. Le meilleur exemple qui reflète l'adsorption des agents tensioactifs, est le tensio-actif pulmonaire. Le mélange des lipides et des protéines de l'agent tensioactif, présent à l'interface air/alvéolaire des poumons, diminue la TSF à des valeurs très faibles, ce qui facilite la respiration et évite l'effondrement alvéolaire ([Satpute et al., 2010](#)).

La propriété de mouillage d'un tensio-actif est un facteur très important permettant la diffusion et la pénétration d'une substance qui abaisse la tension superficielle, lorsqu'elle est ajoutée à un liquide ([Figure 16.E](#)). Elle réduit les forces d'attraction entre les molécules semblables, et augmente l'attraction aux surfaces ([Satpute et al., 2010](#)).

De plus, les surfactants se concentrent à l'interface gaz/liquide, conduisant à la formation des bulles à travers le liquide et sur l'interface résultant de la formation de mousse ([Figure 16.F](#)). La surfactine présente une excellente propriété moussante par rapport au dodécylsulfate de sodium (SDS) ([Satpute et al., 2010](#)).

Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et leur auto-assemblage en micelles est cruciale pour plusieurs processus industriels tels que la détergence et la dispersion ; où ces agents tensioactifs réduisent l'attraction entre des particules similaires. Cette propriété des agents tensioactifs conserve les particules insolubles en suspension, en empêchant l'aggrégation des particules insolubles, les uns avec les autres. Cette propriété entraîne également la désorption des molécules hydrophobes des surfaces des roches, améliorant la mobilité et la récupération du pétrole, trouvant ainsi, une des applications dans la pétrochimie ([Satpute et al., 2010](#)).

En raison de la viscosité élevée du pétrole brut, il résiste à l'écoulement et devient très difficile pour le transport. Le lourd pétrole brute (densité élevée) contient de l'azote, de l'oxygène, des composés de soufre et de lourds polluants métalliques. De telle viscosité des

huiles lourdes est réduite en utilisant des tensioactifs pour augmenter la mobilité et faciliter le transport (Satpute et al., 2010).

Les agents tensioactifs, sont utilisés aussi dans des applications intéressantes de rétention des micropolluants et d'inhibition de la corrosion. Généralement, les inhibiteurs de corrosion, sont des matériaux qui protègent contre l'usure des surfaces des appareils. Le silicate de sodium est un inhibiteur de corrosion qui est couramment utilisé dans les détergents et la fabrication du savon pour la blanchisserie, les produits pour lave-vaisselle pour éviter les dépôts solides qui causent la corrosion. Li and Mu, (2005) ont étudié un tensioactif non ionique (Tween 40) et ont rapporté une inhibition des niveaux satisfaisants de corrosion de l'acier laminé à froid dans l'acide sulfurique de 0.5 à 7.0 M, détecté par perte de poids et par la méthode de polarisation potentiodynamique (Satpute et al., 2010).

Autre propriété est ajoutée aux agents tensioactifs ; la floculation qui est un processus, où les gouttelettes d'émulsion se collent pour former un groupe qui peut être rompu par l'action mécanique, rétablissant l'émulsion à sa forme originale. La micro-électrophorèse et le test de microscopie optique, sont utilisés pour évaluer la floculation. Un travail intéressant sur la floculation des particules fines de fluorine par la bactérie *Corynebacterium xerosis* a été décrit par Haas et al., (1999). Les cellules de *C. xerosis* adhèrent aux surfaces du fluorite et promeuvent l'accumulation des particules pour réaliser une floculation de haute qualité (Satpute et al., 2010).

En fin, les surfactants sont des molécules stables aux variations de température, de pH et de NaCl. En effet, la lichenysine obtenue de *Bacillus licheniformis* JF-2 est stable à différentes valeurs de température allant jusqu'à 50°C, et aux pH de 4.5 à 9.0 et 5% de NaCl et 2.5% de Ca<sup>2+</sup>. De même, le biosurfactant de nature lipopetidique de *B. subtilis* sont stables à 121°C/20min, et même après 6 mois a été jugé stable à -18°C. La tension superficielle de ce lipopeptide reste assez stable aux variations de pH de 5 à 11 et à une concentration en NaCl de 20 % (Satpute et al., 2010).

## II.10. Applications des biosurfactants

Grâce aux performances des propriétés fonctionnelles des biosurfactants, ils ont donné de nombreuses applications dans différents domaines (industrie, santé, cosmétique, environnement, etc.). Le tableau 5 présente un résumé des utilisations des biosurfactants dans différents domaines. Les principales applications biotechnologiques sont détaillées ci-dessous :

### II.10.1. Applications dans l'environnement

De nombreux surfactants utilisés dans des buts commerciaux sont produits par synthèse chimique, mais les biosurfactants suscitent actuellement de plus en plus d'intérêt, car ils

trouvent des applications particulièrement importantes dans le domaine de l'environnement, où l'on exige des substances biodégradables et non toxiques.

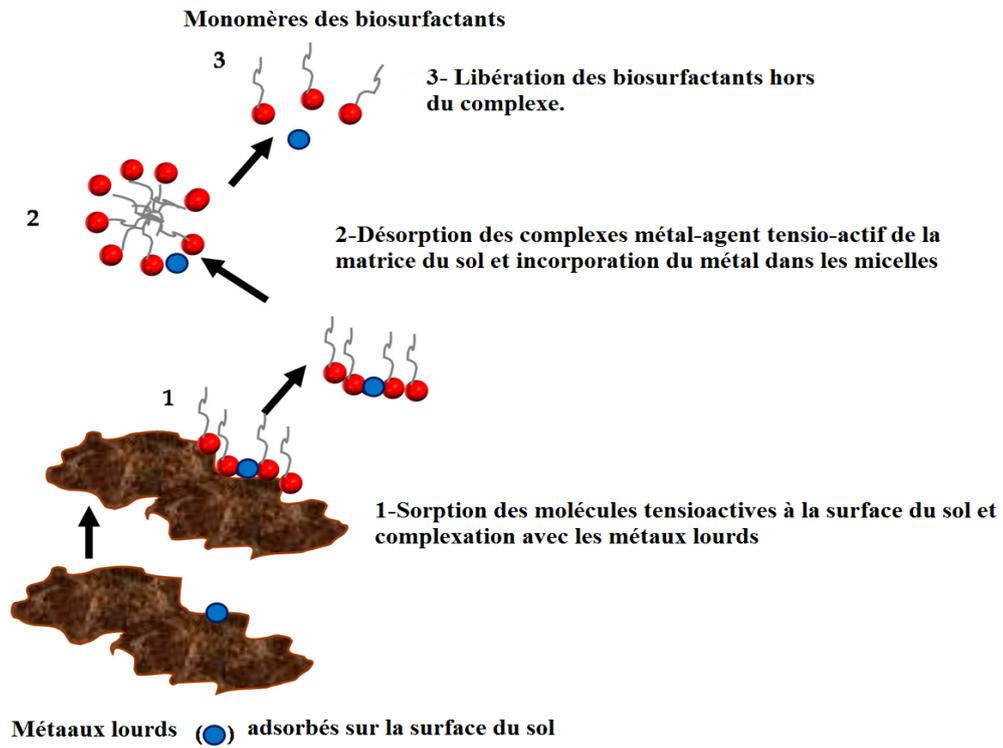
On emploie les biosurfactants aussi bien pour solubiliser que pour émulsifier, augmenter le caractère détergent, mouiller et disperser les phases. Ces propriétés sont particulièrement importantes pour la bioremédiation et l'élimination des métaux lourds (Figure 17) la dispersion des nappes de pétrole (Figure 18) et dans l'industrie pétrolière, particulièrement dans l'amélioration de la récupération assistée et le transport du pétrole dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole (Santos *et al.*, 2016).

### II.10.2. Application des biosurfactants dans l'agriculture

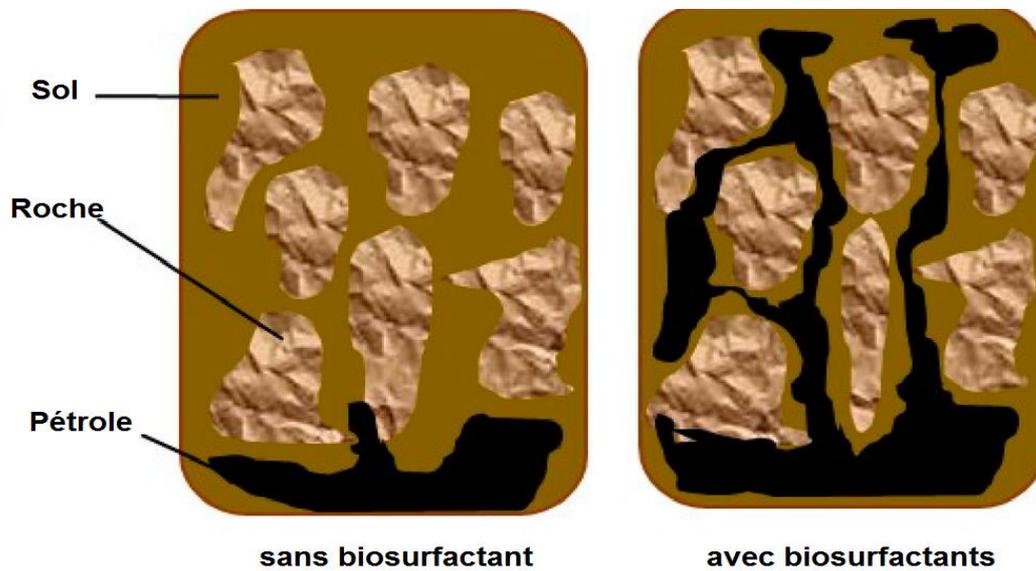
Une façon d'améliorer la solubilité des composés chimiques présentant un risque biologique, tels que les PAH est d'appliquer des tensioactifs comme agents mobilisateurs. Cela augmente la solubilité apparente des polluants organiques hydrophobes (POH). En plus, les tensioactifs aident les microbes à s'adsorber aux particules du sols occupées par des polluants, diminuant ainsi la longueur de chemin de diffusion entre le site d'adsorption et le site de la bioassimilation par les micro-organismes (Makkar and Rockne, 2003).

Ainsi, dans l'agriculture, les tensioactifs sont utilisés pour l'hydrophilisation des lourds sols pour obtenir une meilleure mouillabilité et réaliser même la distribution des engrais dans le sol. Ils empêchent également l'agglutination de certains engrais pendant le stockage et favorisent la diffusion et la pénétration des substances toxiques dans les pesticides (Makkar and Rockne, 2003).

Le biosurfactant de type rhamnolipide, produit principalement par le genre *Pseudomonas* est connu pour une activité antimicrobienne puissante. En outre, on ne prévoit aucun effet indésirable sur des humains ou l'environnement est, attendu à l'exposition globale au rhamnolipide. Les fengycines sont également signalés à posséder une activité antifongique et donc peuvent être utilisés dans la lutte biologique contre les maladies des plantes (Kachholz and Schlingmann, 1987).



**Figure 17.** Mécanisme d'élimination des métaux lourds par les biosurfactants (Santos *et al.*, 2016).



**Figure 18.** Amélioration du mécanisme de récupération du pétrole par les biosurfactants (Santos *et al.*, 2016).

### II.10.3. Application des biosurfactants dans l'industrie cosmétique

Dans l'industrie cosmétique, en raison de leurs capacités d'émulsification, de formation de la mousse, de rétention de l'eau, de mouillage, de leurs effets sur la viscosité et sur la cohérence du produit ; les biosurfactants ont été proposés pour remplacer les tensioactifs synthétisés chimiquement. Ces tensioactifs sont utilisés comme des émulsifiants, des agents moussants, des agents de solubilisation, des agents mouillants, des nettoyeurs, des agents antimicrobiens, des médiateurs de l'action enzymatique, dans les insectifuges, les antiacides, les produits de bain, les produits de protection contre les acnés, les produits antipelliculaires, les solutions de nettoyage des lentilles, les produits pour bébé, le mascara, le rouge à lèvres, le dentifrice, le nettoyeur pour la dentine, etc. Pour ne citer que quelques-uns ([Gharaei-Fathabad, 2011](#)).

### II.10.4. Application des biosurfactants dans l'industrie des transformations alimentaires

Les biosurfactants ont été utilisés dans diverses transformations alimentaires, mais ils jouent généralement un rôle comme un ingrédient de formulation alimentaire et un agent antiadhésif. En tant qu'ingrédient alimentaire, ils favorisent la formation et la stabilisation des émulsions en raison de leurs capacités à diminuer les tensions superficielles et interfaciales. Ils sont également, utilisés pour contrôler l'agglomération des globules gras, de stabiliser les systèmes aérés, améliorer la texture et durée de vie des produits contenant l'amidon, de modifier les propriétés rhéologiques de la pâte du blé, améliorer la texture des produits alimentaire à base de matière grasse ([krishnaswamy et al., 2008](#)).

### II.10.5. Biosurfactants comme biopesticide

La stratégie conventionnelle du contrôle des arthropodes implique l'application des produits chimiques à large spectre d'action et des pesticides, qui produisent souvent des effets indésirables. En outre, l'émergence des populations d'insectes résistantes aux pesticides ainsi que le prix élevé des nouveaux pesticides chimiques ont stimulé la recherche de nouveaux outils écologiques de contrôle vectoriels. Les biosurfactants de nature lipopeptidique produits par plusieurs bactéries, exposent une activité insecticide contre la mouche du vinaigre ; *Drosophila melanogaster* et sont donc prometteurs pour être utilisés comme biopesticide ([Mulligan, 2005](#)).

### II.10.6. Application des biosurfactants en médecine

[Mukherjee et al., \(2006\)](#) ont élucidé sur des multitudes d'applications des biosurfactants en médecine qu'elle comprend :

#### II.10.6.1. Activité antimicrobienne

Les diverses structures des biosurfactants leur confèrent la possibilité de présenter une performance polyvalente. Par leur structure, les biosurfactants induisent la perméabilité de la

membrane cellulaire portant un effet similaire qu'un détergent (Zhao *et al.*, 2010). Gharaei-Fathabad, (2011) montre que plusieurs biosurfactants ont une forte activité antibactérienne, antifongique et antivirale ; ces tensio-actifs jouent le rôle aussi d'un agent anti adhésive à des agents pathogènes ce qui les rend utiles pour le traitement de nombreuses maladies, ainsi que son utilisation comme un agent thérapeutique et probiotique. Un bon exemple est le biosurfactant produit par *Bacillus circulans* qui avait une activité antimicrobienne puissante contre les bactéries à Gram positif et les agents pathogènes à Gram négatif.

#### II.10.6.2. Activité anti-cancéreuse

Certains glycolipides microbiens extracellulaires ont un effet antiprolifératif sur les cellules PC12, en interrompant l'activité de l'acétylcholinestérase ce qui bloque le cycle cellulaire à la phase G1 de croissance et induisent la distinction des cellules de la leucémie de la lignée cellulaire, ce qui prépare le terrain pour l'utilisation de ces glycolipides comme des nouveaux réactifs pour le traitement des cellules cancéreuses (Krishnaswamy *et al.*, 2008).

#### II.10.6.3. Comme agents antiadhésifs

Les biosurfactants ont été trouvés à inhiber l'adhérence des organismes pathogènes à des surfaces solides ce qui empêche la formation des biofilms qui causent les infections et les contaminations des objets et des surfaces. Krishnaswamy *et al.*, (2008) ont rapporté que le prétraitement d'un caoutchouc en silicone avec un biosurfactant produit par *Streptococcus thermophilus*, inhibe l'adhérence de 85% de *Candida albicans* et l'application des biosurfactants produits par *Lactobacillus fermentum* et *L. acidophilus* sur du verre, réduit 77% le nombre de cellules adhérentes d'*Enterococcus faecalis* uropathogènes.

#### II.10.6.4. Adjuvants immunologiques

Les lipopeptides bactériens constituent, des adjuvants immunologiques puissants, non toxiques et non pyrogénique lorsqu'ils sont mélangés avec des antigènes classiques ; une amélioration de l'immunité humorale humaine, les BS sont utilisés comme des immunomodulateurs (Gharaei-Fathabad, 2011).

#### II.10.6.5. Activité antivirale

L'effet antiviral contre le virus de l'immunodéficience humaine sur les leucocytes par les biosurfactants a été cité dans la littérature (Krishnaswamy *et al.*, 2008). Le biosurfactant sophorolipides produit par *Candida bombicola* et ses analogues structuraux tels que l'ester diacétate d'éthyle sophorolipide est l'agent spermicide et virucide le plus puissant, il est à signaler également que cette substance a une activité virucide similaire au nonoxynol-9 contre les spermies humains (Krishnaswamy *et al.*, 2008).

## II.10.6.6. Autres

Il a été rapporté dans la littérature que la déficience du surfactant pulmonaire (un complexe des protéines et des phospholipides) est responsable de l'échec de la respiration chez les nourrissons nés prématurément. Cependant, l'isolement de gènes qui codent ces biomolécules et les cloner dans les bactéries pour une production par fermentation, rend possible son application médicale (Krishnaswamy *et al.*, 2008 ; Le roux, 2015).

**Tableau 5.** Caractéristiques fonctionnelles des agents tensioactifs requises pour diverses applications (Santos *et al.*, 2016).

Domaines	Applications	Propriétés fonctionnelles
<b>Environnement</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioremédiation ;</li> <li>• Opérations de nettoyage des déversements de pétrole ;</li> <li>• Remédiation et rinçage des sols.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Émulsification, dispersion et solubilisation des huiles ;</li> <li>• Abaissement de la tension interfaciale ;</li> <li>• Mouillage, étalement, détergence, et moussage ;</li> <li>• Inhibition de la corrosion des huiles de carburant et des équipements ;</li> <li>• Rinçage du sol.</li> </ul>
<b>Pétrole</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récupération améliorée du pétrole ;</li> <li>• Désémulsification.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Émulsification, dispersion et solubilisation des huiles ;</li> <li>• Abaissement de la tension interfaciale ;</li> <li>• Désémulsification des émulsions de pétrole ;</li> <li>• Réduction de la viscosité ;</li> <li>• Mouillage, étalement et expansion des surfaces solides ;</li> <li>• Détergence ;</li> <li>• Inhibition de la corrosion des huiles combustibles et des équipements.</li> </ul>
<b>Exploitation minière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opérations de nettoyage des métaux lourds ;</li> <li>• Assainissement des sols ;</li> <li>• Flottation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mouillage et moussage,</li> <li>• Collectionneurs des agents moussants,</li> <li>• Enlèvement des métaux et ions des solutions aqueuses,</li> <li>• Séquestration des métaux lourds,</li> <li>• Étalement,</li> <li>• Inhibition de la corrosion des huiles.</li> </ul>
<b>Nettoyage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détergents de lavage.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détergents et désinfectants pour les lessives ;</li> <li>• Mouillage ;</li> <li>• Diffusion ;</li> <li>• Inhibition de la corrosion.</li> </ul>
<b>Alimentation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Émulsification ;</li> <li>• Désémulsification ;</li> <li>• Ingrédient fonctionnel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilisation des huiles aromatisées ;</li> <li>• Contrôle de cohérence ;</li> <li>• Emulsification ;</li> <li>• Agent mouillant ;</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epan dage ;</li> <li>• Détergent ;</li> <li>• Moussant ;</li> <li>• Epaississant.</li> </ul>
<b>Médecine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbiologie ;</li> <li>• Médicaments ;</li> <li>• Thérapie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agents antiadhésifs ;</li> <li>• Agents antifongiques ;</li> <li>• Agents antibactériens ;</li> <li>• Agents antiviraux ;</li> <li>• Vaccins ;</li> <li>• Thérapie génique ;</li> <li>• Molécules immuno-modulatrices.</li> </ul>
<b>Agriculture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocontrôle ;</li> <li>• Engrais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mouillage et dispersion ;</li> <li>• Suspension de pesticides en poudre et engrais,</li> <li>• Emulsification des solutions de pesticides,</li> <li>• Facilite les mécanismes de biocontrôle des agents pathogènes des plantes</li> <li>• Élimination et la biodisponibilité accrue des nutriments pour les microbes associés aux plantes bénéfiques.</li> </ul>
<b>Cosmétiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Santé et produits de beauté.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Émulsification ;</li> <li>• Moussage ;</li> <li>• Solubilisation ;</li> <li>• Mouillage ;</li> <li>• Nettoyants ;</li> <li>• Agents antimicrobiens ;</li> <li>• Médiateurs de l'action de l'enzyme.</li> </ul>
<b>Textile</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préparation des fibres ;</li> <li>• Teinture et impression ;</li> <li>• Finition des textiles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mouillage ;</li> <li>• Pénétration ;</li> <li>• Solubilisation ;</li> <li>• Emulsification ;</li> <li>• Détergent ;</li> <li>• Formulations ;</li> <li>• Ramollissement.</li> </ul>
<b>Nanotechnologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synthèse des nanoparticules.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Émulsification ;</li> <li>• Stabilisation.</li> </ul>

# **Chapitre III :**

## **Matériels et méthodes**

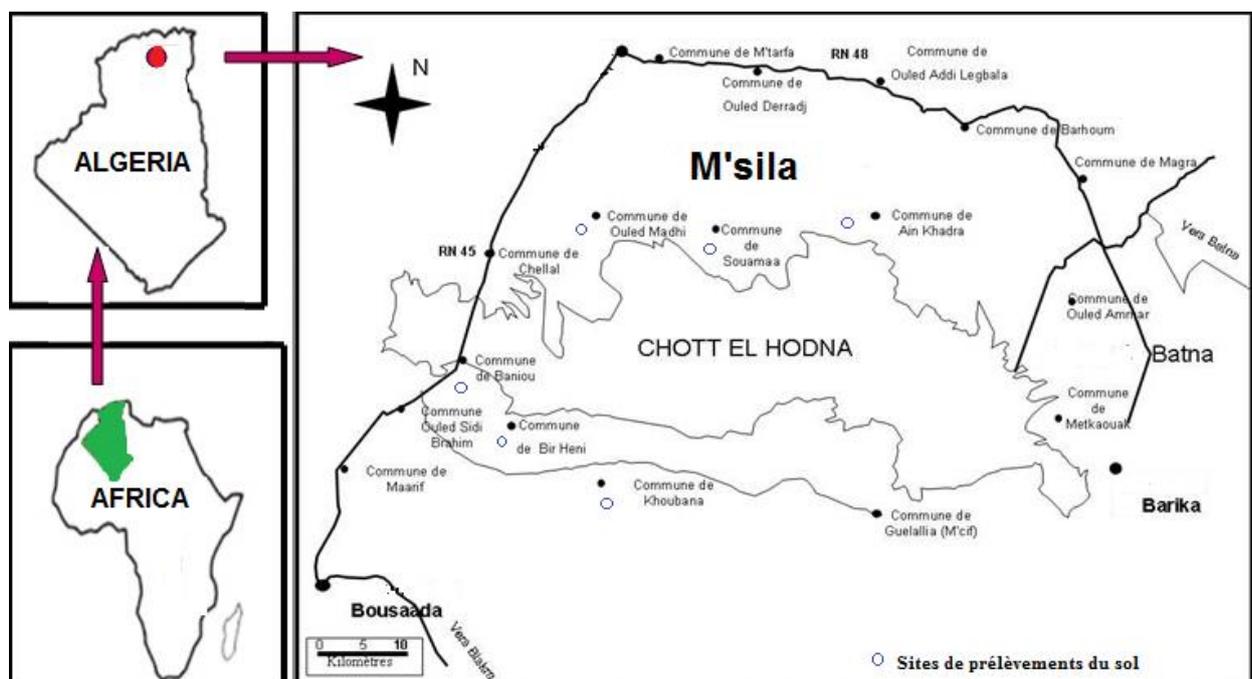
---

### III.1. Coordonnées géographiques et description de la zone d'étude

Chott El Hodna est un lac salé endoréique du Nord-Est de l'Algérie (Lat.  $35^{\circ} 18' / 35^{\circ} 32'$ , Long.  $4^{\circ} 15' / 5^{\circ} 05'$ ) (Figure 19). Ce Chott fait partie d'une série de Chotts qui se sont développés là où convergent les eaux provenant de l'Atlas Saharien au Sud et l'Atlas Tellien au Nord. Paysage végétal des hautes plaines steppiques, il fait partie du point de vue phytogéographique du domaine Maghrébin steppique (Boumezbeur, 2002).

Son bassin d'une superficie de 362 000 ha, situé à l'extrême Est des hauts plateaux orientés Nord- Ouest, Est- Ouest, Sud- Est, qui s'étend sur 220 Km de long et 90 Km de large, il est coincé entre deux formations montagneuses atteignant 1 800 à 1 900 m d'altitude au Nord et 600 à 900 m au Sud. C'est hydrologiquement un bassin fermé de 26 000 Km<sup>2</sup> (Boumezbeur, 2002).

La cuvette du Hodna, d'une superficie de 8 500 Km<sup>2</sup>, qui sert de niveau de base aux oueds du bassin, occupés en son milieu de bas-fond plat une superficie de 1 100 Km<sup>2</sup>, C'est cela que l'on appelle « Chott-El-Hodna » situé à 400 m d'altitude maximale, 390 m d'altitude minimale et 392 m d'altitude en moyenne (Boumezbeur, 2002). C'est une surface d'épandage des crues, où l'eau est salée. Il s'étend sur 77 Km de long et 19 Km de large. Sa surface inondée, quoique variable ne dépasse jamais 80 000 ha. Son alimentation est assurée par au moins 22 cours d'eau principaux, auxquels il faut ajouter des sources d'eau douce. Il se met en eau uniquement en hiver, sec et salé en été des croutes de sel couvrent toute son étendue, à cause d'une forte évaporation, il devient régulièrement un désert de sel (Boumezbeur, 2002).



**Figure 19.** Localisation géographique du Chott El Hodna et les sites des prélèvements de sol (Bensaci *et al.*, 2008).

## III.2. Isolement des *Haloarchaea*

### III.2.1. Prélèvements

L'échantillonnage est une phase essentielle puisque de sa bonne réalisation va dépendre la fiabilité des résultats. En effet, six échantillons du sols salins provenant des communes de : Bir Henni, Ouled Madhi, Beniou, Souamaa, Khoubana et Ain Khadra, ayant des textures pédologiques différentes et des taux de salinité différents, ont été prélevés en mai et juin 2013. Cependant, les prélèvements sont pratiqués à la spatule, en prenant les précautions d'usage de désinfection des outils (flambage à l'alcool éthylique à 90°) pour éviter tout risque de contamination des échantillons qui ont été recueillis dans des sacs en plastique stériles.

### III.2.2. Mise en culture et isolement

La démarche suivie pour l'isolement des *Haloarchaea* est celle de [Ozcan et al., \(2006\)](#), il est assuré par un enrichissement préalable, où 10 g de sol sont introduits dans 90 ml du milieu Sehgal-Gibbons (SG) liquide ([Cf. annexe](#)), contenu dans un erlenmeyer de 250 ml. Le mélange est ensuite mis en agitation pendant 30 minutes pour obtenir une bonne dilacération des particules et incubé à 37°C pendant 15 jours. Puis, une série de dilution est effectuée, où 100 µl des dilutions 10<sup>-1</sup> jusqu'à 10<sup>-3</sup>, sont ensemencés en surface sur le milieu de culture solide SG. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 15 à 20 jours dans des sacs en plastique, afin d'éviter la dessiccation rapide du milieu de culture et la cristallisation de ses sels.

### III.2.3. Purification et conservation des isolats

Les isolats sont d'abord purifiés par des repiquages successifs des colonies bien séparées et macroscopiquement distinctes, sur le milieu de culture solide SG. Une fois purifiés, chaque isolat est désigné par un numéro de code, qui est constitué des deux lettres CH, suivi d'un numéro d'ordre. La conservation des microorganismes ainsi désignés se fait par plusieurs méthodes selon le but. Généralement, on a réalisé deux techniques de conservation, l'une a pour but une conservation à courte durée, elle consiste le plus souvent à effectuer des repiquages sur des pentes de gélose avec une conservation à 4°C, et la culture sera repiquée chaque 03 à 06 mois. Cependant, la deuxième technique a pour but une conservation à long terme, où les isolats purifiés, sont transférés dans des microtubes Eppendorf stériles de 1.5 ml, contenant du glycérol à 20%, la conservation est faite à -10°C.

## III.3. Screening des isolats producteurs des biosurfactants

Pour faire le screening, six isolats (CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6) ont été choisis, provenant de chacun des sites de prélèvement. Les isolats producteurs des biosurfactants ont été sélectionnées en utilisant les quatre méthodes suivantes : test de l'effondrement de la goutte « Drop collapse assay », test de dispersion de l'huile « Oil spreading assay », test de stabilité de

l'émulsion (ES%) « Emulsion stability », mesure de la tension superficielle « Surface tension measurement ». Les expériences ont été effectuées en trois répétitions.

### III.3.1. Test de l'effondrement de la goutte

Ce test repose sur la déstabilisation d'une gouttelette de l'huile par les agents tensioactifs. Il consiste à utiliser une microplaque à 96 puits, Chacun contenant 100µl d'une phase huileuse. Cependant, les huiles qui ont été testées sont : huile de tournesol, huile d'olive, huile minérale, huile de voiture et le gasoil. Ces huiles ont été équilibrées pendant une heure à température ambiante. 10µl de la culture de chacun des isolats à tester est ajouté aux puits, l'observation est faite après 1 min à l'aide d'une loupe binoculaire. Si le liquide ne contient pas des agents tensioactifs (biosurfactants), les molécules d'eau polaires repoussent de la surface hydrophobe et la goutte reste stable. Si le liquide contient les agents tensioactifs, la goutte se propage parce que la force ou la tension interfaciale entre la phase aqueuse et la phase huileuse est réduite. Les résultats ont été interprétés comme suit : de « + » à « ++++ » correspondant à la diffusion partielle ou totale sur la surface de l'huile. Les gouttes qui ont donné une forme arrondie ont été marquées comme « - » indiquant l'absence de la production des biosurfactants (Youssef *et al.*, 2004 ; Plaza *et al.*, 2006; Loganathan *et al.*, 2010).

### III.3.2. Test de dispersion de l'huile

Dans le test de dispersion de l'huile, 50 ml de l'eau de mer synthétique a été ajouté à la surface d'une boîte de Pétri en verre de (90 × 15 mm) de dimension, plus d'un volume de 20µl de pétrole brut ou de l'huile minérale, faisant une couche mince sur la surface de l'eau. 10µl de la culture a été ajouté sur la surface de l'huile (Morikawa *et al.*, 2000), les essais ont été réalisés en raison de trois répétitions pour chaque échantillon (Rodrigues *et al.*, 2006b).

### III.3.3. Test d'émulsification

Ce test consiste à mélanger 2 ml de la culture avec 2 ml de gasoil dans un tube à essai (15×125 mm). Le mélange a été agité pendant 4 minutes et laissé au repos. Le volume d'émulsion (EV%) et la stabilité de l'émulsion (ES%) ont été mesurés comme suit :

$$EV\% = \frac{\text{Hauteur de l'émulsion (mm)} \times \text{surface (mm}^2\text{)}}{\text{Volume du liquide total (mm}^3\text{)}} \times 100$$

$$ES\% = \frac{EV\% \text{ à temps } 24h}{EV\% \text{ à temps } 0h} \times 100$$

Les émulsions formées par les cultures bactériennes ont été comparés à ceux qui sont formés par une solution de 1% d'un tensioactif synthétique (SDS) comme un contrôle positif et par le milieu de culture stérile comme un témoin négatif (Kebbouche-Gana *et al.*, 2009). Un critère cité pour confirmer la production des biosurfactants, est la capacité de maintenir au moins 50% du volume initial de l'émulsion après 24h de sa formation (Nasr *et al.*, 2009).

### III.3.4. Mesure de la tension superficielle

Les mesures de la tension superficielle des surnageants exempts des cellules bactériennes, ont été déterminés en utilisant un tensiomètre (TD1C LAUDA). Les valeurs rapportées sont la moyenne de trois mesures. Des prélèvements de 50 ml ont été recueillis à des intervalles de temps de 24h et centrifugés à ( $10\,000 \times g$  pendant 25 min) à température ambiante. Le critère utilisé pour la sélection des isolats producteurs des biosurfactants est la réduction de la tension superficielle du milieu au cours du temps en dessous de  $40 \text{ mN.m}^{-1}$  (Ainon *et al.*, 2013).

### III.4. Analyse statistique de la corrélation entre les différents tests

Un test général de corrélation des rangs, selon Spearman, a été mené pour déterminer la corrélation entre les quatre méthodes utilisées pour le screening des souches productrices des biosurfactants. Ce coefficient de corrélation de Spearman,  $r_s$ , variaient entre -1 (corrélation fortement négative) à +1 (corrélation fortement positive) (Robert, 1995).

### III.5. Détermination des propriétés des biosurfactants

#### III.5.1. Localisation des biosurfactants

Pour déterminer si les biosurfactants produits par les isolats actifs sont intra ou extracellulaires, 20 ml d'un moût de fermentation de 7 jours est filtré via une membrane de  $0.45\mu\text{m}$ , qui a pour but, la séparation des cellules du milieu de culture. Le test d'emulsification est réalisé en utilisant un volume de 4 ml du filtrat et 4 ml de la culture cellulaire (Sadouk *et al.*, 2008).

#### III.5.2. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

La tension superficielle des biosurfactants a été mesurée par la technique de DU-NOUY ring à température ambiante. La concentration où les micelles commencent à se former est la CMC. Lors de la CMC, une variation brusque de la tension superficielle a été observée. La CMC a été déterminée en traçant la courbe de la tension superficielle en fonction de la concentration en biosurfactants (Abhijit *et al.*, 2012).

#### III.5.3. Etude de la relation entre la variation de la densité optique, l'index d'emulsification et la tension superficielle

Dans cette étude, la cinétique de production des biosurfactants a été suivie par mesure de la tension superficielle et par calcul de l'index d'emulsification E24%. L'évolution de la biomasse et du pH, a été évaluée par mesure de la densité optique en utilisant le spectrophotomètre à 600 nm et par le pH-mètre respectivement. Des prélèvements ponctuels sont effectués en cours de la fermentation, toutes les 24 h, dans des conditions aseptiques à partir des fioles en agitation. Le volume prélevé dépend du type d'analyse à effectuer ; dans le cas de la mesure de la tension superficielle, le volume prélevé s'était 10 ml.

Ce suivi permettra de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées de croissance. Les évolutions de la production des biosurfactants, de la croissance et du pH sont suivies pendant 11 jours, sur le milieu de culture SG liquide (pH initial : 7.2).

#### III.5.4. Détermination de la stabilité de l'émulsion

Il consiste à évaluer la stabilité des émulsions formées après 24h de sa formation sous certaines conditions (pH , température et salinité).

Le pH des émulsions formées est réajusté chacune à différentes valeurs de pH (3, 5, 7, 9 et 11). Le mélange est agité à l'aide d'un vortex pendant 4 minutes. L'index d'émulsification est calculé pour chaque essai.

Afin d'observer l'effet de la température sur la stabilité des émulsions formées, celles-ci sont soumises aux températures suivantes : 4, 25, 45 et 50°C, pendant 30 minutes puis refroidis à température ambiante. Par la suite, la stabilité des émulsions a été étudiée par calcul de l'indice d'émulsification après 24h, aussi bien après l'exposition de l'émulsion à différentes concentrations en NaCl (0%, 8%, 15% et 25%) (Khopade *et al.*, 2012).

#### III.6. Optimisation des conditions de production des biosurfactants

Une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir des souches sélectionnées peut être réalisée à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production. Il y a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires biologiquement actifs. Le rendement des composés bioactifs est généralement augmenté suite à l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, etc) et physiques (température, pH, aération, etc.) pour la croissance microbienne (Smaoui, 2010). Pour toutes les expériences ci-dessous, une procédure standard a été utilisé (Ainon *et al.*, 2013) :

- ✓ 10 % (v/v) de l'inoculum a étéensemencé, dans des fioles de 250 ml, contenant 50 ml du milieu de culture SG. La culture est mise en agitation de 120 trs/min pendant 13 jours. Le contrôle négatif dans ce test était le SG stérile.

##### III.6.1. Mesure des paramètres

Pour les deux paramètres physico-chimiques et nutritionnels, après 13 jours d'incubation, la culture est centrifugée à 8000×g à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant a été recueilli et la tension superficielle a été lue à l'aide d'un tensiomètre, les résultats ont été exprimés par mN.m<sup>-1</sup>. La tension superficielle produite par les biosurfactants a également été exprimée en pourcentage de réduction de la tension superficielle, calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ de réduction de la tension superficielle} = \frac{\gamma_m - \gamma_c}{\gamma_m} \times 100$$

Où :  $\gamma_m$  est la tension superficielle du contrôle (milieu sans inoculation)

Et :  $\gamma_c$  est la tension superficielle du surnageant de la culture (Ainon *et al.*, 2013).

### III.6.2. Optimisation des conditions physicochimiques

La production des biosurfactants peut être influencée par les conditions de culture comme la température, le pH, les vitesses d'agitation et le taux de salinité (NaCl et MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

#### III.6.2.1. Effet du pH

Le pH est un facteur important, il peut limiter ou favoriser la production des biosurfactants. Pour cela, nous avons testé plusieurs valeurs de pH : 6, 6.5, 7, 7.5 et 8 (la température d'incubation est de 37°C sous agitation de 120trs/min).

#### III.6.2.2. Effet de la température

Afin de déterminer la température optimale pour la synthèse du biosurfactant, on se propose de tester les températures suivantes: 27, 30, 37, 40 et 45°C (pH optimisé et sous agitation de 120 trs/min)

#### III.6.2.3. Effet de l'agitation

L'agitation a pour but d'assurer le transfert de masse entre les trois phases: liquide, constituée du milieu de culture ; solide (les cellules) ; et gazeuse. De ce fait, nous avons testé trois vitesses d'agitation : 50, 100 et 150 trs/min (température et pH optimisés).

#### III.6.2.4. Effet d'NaCl (%)

Différentes concentrations en NaCl, ont été testées (8%, 15%, 20%, 25% et 30%), les valeurs optimisés de la température, du pH, de l'agitation sont prises en considération.

#### III.6.2.5. Effet de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (M)

Différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ont été testées (0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.2 M et 0.3M), les valeurs optimisés de la température, du pH, de l'agitation et de la concentration en NaCl, sont prises en considération.

### III.6.3. Optimisation des conditions nutritionnelles

#### III.6.3.1. Effet de la source de carbone

Des cultures sont réalisées sur milieu SG liquide, en présence des sources de carbone : de monosaccharide (glucose), de disaccharide (lactose), de polymère (amidon) et d'acide organique (citrate de sodium). Chaque substrat est utilisé séparément comme seule source de carbone en raison de 4 g/l. En plus, le gazoil et le glycérol à une concentration de 4 % (v/v) . Le substrat induisant le meilleur taux de production sera testé à différentes concentrations. Les glucides ont été stérilisés par filtration sur membrane millipore de (0.45µm) et ajoutés aseptiquement au milieu de culture.

### III.6.3.2. Effet de la source d'azote

L'étude de l'effet des différentes sources d'azote sur la production des biosurfactants est effectuée par des cultures sur milieux SG liquide, en présence de diverses sources d'azote en raison de 7g/l en nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), en sulfate d'ammonium ( $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ), en extrait de levure et en urée ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) séparément. Le substrat induisant le meilleur taux de production sera testé à différentes concentrations.

## III.7. Extraction et identification des biosurfactants

### III.7.1. Extraction des biosurfactants

L'extraction des biosurfactants à partir des cultures des isolats producteurs, a été réalisée selon le protocole de [Vater et al., \(2002\)](#). Les étapes de l'extraction sont les suivantes :

- Un volume de 1000 ml de la culture, après optimisation des conditions physico-chimiques et nutritionnelles de croissance et de production des biosurfactants, est centrifugé à (13,000g /15 min/4°C).
- Le surnageant est acidifié par l'HCl (jusqu'à un pH 2.0) et laissé précipité à 4°C/12h ; puis, centrifugé à (13.000g/15 min/4°C).
- L'extraction des biosurfactants est faite en ajoutant le méthanol au culot, avec agitation pendant 2h.
- Le mélange est en suite filtré et évaporé.

### III.7.2. Identification des biosurfactants

#### III.7.2.1. Caractérisation préliminaire des biosurfactants produits par chromatographie sur couches mince (CCM)

On a procédé à une caractérisation préliminaire des biosurfactants par une chromatographie d'adsorption sur couche mince. Les biosurfactants ont été séparés sur un gel de silice F<sub>254</sub>. La phase mobile, est un mélange constitué de : chloroforme/ méthanol/ eau [80: 15: 2, *v/v/v*]. Pour la lecture de la plaque, quatre réactifs de révélation ([Tableau 6](#)) ont été utilisés pour déterminer la nature des biosurfactants selon le protocole de [Wang et al., \(2014\)](#).

**Tableau 6.** Réactifs utilisés comme révélateurs des spots des biosurfactants.

Révélateur	Composition	Nature du révélat
Réactif 1	Phénol + Acide sulfurique	Glycolipides
Réactif 2	0.2% de Ninhydrine	Lipopeptides
Réactif 3	Chlorure de cobalt + Acétone	Phospholipides
Réactif 4	Vert de bromocrésol	Lipides et les acides organiques

### III.7.2.2. Analyse des acides gras par GC-MS

Les lipopeptides et les biosurfactants de poids moléculaire élevé varient considérablement dans la partie lipidique, par conséquent, l'analyse de ce composant fournit des informations structurales détaillées pour l'identification des structures des acides gras. Le procédé implique le clivage hydrolytique de la liaison entre les hydrates de carbone ou d'un peptide /protéine de la partie biosurfactant et les parties lipidiques. La dérivatisation ultérieure des chaînes des acides gras en esters méthyliques d'acide gras (EMAG) et éventuellement la conversion des dérivés de triméthylsilyle (TMS) facilite l'analyse par GC ou GC-MS (Figure 21) (Vater *et al.*, 2002).

Les analyses GC-MS peuvent être réalisées en utilisant une variété de colonnes telles que DB-23 colonne capillaire ou Supelcoomegawax (Sigma-Aldrich, Dorset, Royaume-Uni) (30M-0.25mm - 0.25mm id). Conditions analytiques qui ont été utilisées sont :

- La température de l'injection 250°C.
- Commencer le programme de four à 50°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 70eV avec une plage de balayage 50-650 m/z et d'un volume d'injection de 1 ml.
- Le temps de rétention de l'ester méthylique d'acide gras (EMAG), augmentent avec la longueur de la chaîne et le degré de séparation.

Le traitement de l'échantillon à analyser par la GC/MS a été fait selon le protocole expérimental suivant :

- On ajoute une solution constituée de .95 ml de méthanol et 0.05 ml d'acide sulfurique à 5 mg des biosurfactants purifiés et séchés ;
- Le mélange est chauffé à 90°C pendant 15h, puis évaporé ;
- L'extraction des résidus est faite avec 1 ml d'hexane ;
- Les résidus ont été lavés avec 1 ml d'eau ;
- L'évaporation de l'hexane ;
- Les esters méthyliques des acides gras (EMAG) sont obtenus ;
- On ajoute 0.5 ml de TMSI (N-triméthylsylimidazole) à 5-10 mg des EMAG ;
- La solution est chauffée à 60 °C pendant 10 à 15 min (Vater *et al.*, 2002) .

### III.8. Etude de la faisabilité de l'utilisation des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, pour la dépollution des sables contaminées par le pétrole brut

#### III.8.1. Polluant organique choisi

Notre étude a été réalisée sur le pétrole brut provenant d'un champ de gisement pétrolier à Hassi Messaoud ; une commune située au milieu du Sahara algérien à 86 Km au Sud-Est de Ouargla ; à 800 Km au Sud-Est de la capitale Alger.

Cependant, le pétrole est le résultat de la lente dégradation bactériologique d'organismes aquatiques végétaux et animaux qui il y a des dizaines, voire des centaines de millions d'années, ont proliféré dans les mers et se sont accumulés en couches sédimentaires. Le pétrole s'accumule dans des roches poreuses au-dessus d'une couche imperméable. Il se présente sous forme d'une huile minérale plus ou moins fluide, visqueuse, combustible ; formé principalement d'hydrocarbures de couleur claire à foncée et de densité de 0.8 à 0.95 ([Amiard, 2011](#)).

Le choix de ce produit comme un polluant dans ce travail, s'est effectué sur la base de plusieurs critères :

- Leurs propriétés physico-chimiques,
- Il est considéré comme un précurseur des autres polluants chimiques comme le Gasoil, l'huile de moteur, les HAP.....etc.
- Leurs présences dans un grand nombre de cas des pollutions du sol.
- Leur disponibilité en Algérie comme étant un pays producteur en plus exportateur et qui s'intéresse par le problème de dépollution des sols de ces hydrocarbures.

#### III.8.2. Choix de la nature de sols « les sables des côtes »

Les sables collectés des côtes de l'Est algérien, plus précisément de la wilaya de Annaba, ont été utilisés dans ce test pour examiner la capacité des biosurfactants, produits par les isolats CH2 et CH5 de retirer le pétrole des sables contaminés par ces hydrocarbures brutes qu'on trouve le plus souvent dans les régions où se focalisent les activités de transport maritime pétrolier.

L'importance et la persistance de la contamination par les hydrocarbures dans la zone intertidale dépendent dans une large mesure de la géomorphologie et des caractéristiques des sédiments côtiers. Cependant, les côtes rocheuses escarpées et exposées ont tendance à dévier l'énergie de la houle et à empêcher les hydrocarbures flottants d'atteindre le littoral. Les effets à long terme sur les écosystèmes sont probablement minimales dans ces régions, où les hydrocarbures ne persistent pas et où les plantes et les animaux peuvent se rétablir un peu de temps ([Organisation Maritime Internationale, 2005](#)).

Sur les plages de sable fin, les hydrocarbures ont tendance à rester à la surface, d'où ils peuvent être enlevés. Cependant, dans certain cas, les hydrocarbures échoués sur des plages de sables ont parfois recouverts de sable et risquent d'émerger de nouveau sous l'action conjuguée du vent et des marées. Sur les plages de galets, de gravier ou même de sable grossier. Ils risquent de pénétrer avec la nappe aquifère des marées jusque dans les substrats rocheux ([Organisation Maritime Internationale, 2005](#)).

### III.8.3. Application des tensioactifs chimiques et des biosurfactants dans l'élimination du Pétrole des sables contaminés après agitation

L'enlèvement du pétrole des sables contaminés, a été testé après saturation de 50 g des sables avec 10% du pétrole brut, comme il est décrit par [Luna et al., \(2013\)](#). L'échantillon contaminé a été placé dans un erlenmeyer de 500 ml, à lequel sont ajoutés 100 ml de biosurfactant concentré (bouillon exempt de cellule après fermentation), plus des biosurfactants à des concentrations de ½ de CMC, de la CMC et deux fois la CMC. En plus d'un surfactant chimique a été ajouté (SDS), avec agitation à 150 tours par minute pendant 5, 10, 20 et 1440 min soit (24h). On le laisse au repos pendant 24h à 28°C ([Figure 20](#)), le contenu entier a été ensuite centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes. Le contrôle négatif a été effectué en utilisant de l'eau distillée et le milieu de culture SG stérile dans les mêmes conditions. La quantité de l'huile résidant dans le sable après l'impact des biosurfactants a été déterminé par gravimétrie comme étant la quantité de matériau après l'extraction avec de l'hexane et le pourcentage d'élimination de l'huile a été calculée en utilisant l'équation suivante :

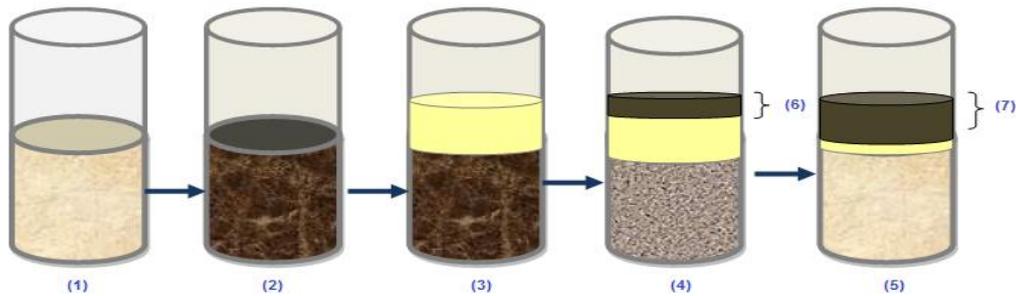
$$\text{Pourcentage du Pétrole brut retiré (\%)} = \frac{(O_b - O_a)}{O_i} \times 100$$

Où  $O_b$  est le poids total du sable contaminé (g) avant le lavage ;  $O_a$  est le poids total des échantillons de sables contaminé (g) après le lavage et  $O_i$  est le poids de l'huile de départ. Pour une meilleure comparaison entre les performances des biosurfactants et des tensioactifs commerciaux, on a répété le procédure en utilisant le SDS ([Luna et al., 2013](#)).

Dans le cas des biosurfactants, extraits à partir des bactéries halophiles extrêmes comme CH2 et CH5, les résultats de la détermination du pétrole résiduel dans le sable par extraction par le solvant, seront falsifiées, puisqu'après extraction les concentrations élevées en sels du milieu de culture, vont se cristallisés après évaporation, ce qui rend le poids du pétrole résiduel non réel, et très élevés. Donc, il suffit de prendre en considération les volumes du pétrole, comme il est indiqué dans la relation suivante :

$$\text{Le pourcentage d'élimination du pétrole brut (\%)} = \frac{V_r}{V_i} \times 100$$

Où  $V_r$  est le volume retiré du pétrole à partir du sable en (ml). Le  $V_i$  est le volume initial du pétrole en (ml), utilisé pour la contamination des sables au niveau de la saturation.



**Figure 20.** Illustration du procédé de contamination et de lavage des sables.

Des sables propres (1) ont été contaminés avec le pétrole brut (2) et qui ont subi des traitements avec des biosurfactants et/ou des surfactants chimiques (contrôle positif) ou milieu stérile (contrôle négatif) (3). Le mélange a été agité pendant 24 heures (4) et on le laisse reposer pendant une nuit (5). (6) récupération partielle du pétrole (7) récupération du pétrole après 24h de repos.

### III.9. Caractérisation des isolats

#### III.9.1. Caractérisation phénotypique

- Les caractères morphologiques des colonies (taille, forme, couleur, relief, contour, transparence, et consistance) sont déterminés sur milieu de culture solide SG.
- Les caractères culturaux (turbidité, formation d'une pellicule et dépôt) sont déterminés sur milieu de culture liquide SG.
- La morphologie et l'arrangement cellulaire sont déterminés par coloration de Gram modifiée par [Dussault, \(1955\)](#)
- L'arrangement cellulaire et la mobilité ont été déterminés par observation au microscope optique à l'état frais ([Makhdoumi-Kakhki et al., 2012](#)).

#### III.9.2. Caractérisation physiologique

L'influence des facteurs physico-chimiques (tolérance au pH, température et différentes concentrations en NaCl et MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O) est déterminée en variant l'un des paramètres alors que les trois autres sont maintenus constants. Après ensemencement, la densité optique est mesurée chaque trois jours avec un spectrophotomètre (UV mini-1240 SHIMADZU), à une longueur d'onde de 600 nm, pour évaluer la croissance, pendant 15 jours ([Makhdoumi-Kakhki et al., 2012](#)).

##### III.9.2.1. Détermination de la concentration optimale pour la croissance en NaCl

Pour le test de tolérance à une gamme de concentration en NaCl, ces concentrations sont modifiées (0% 8% 15% 20% 25% et 32%) en dépit du pH est réglé à 7.2 et la température d'incubation à 37°C ([Kannika, 2003](#)).

### III.9.2.2. Détermination de la concentration optimale en ions $Mg^{2+}$

Les souches sont inoculées dans le milieu de culture liquide SG à différentes concentrations en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0M, 0.005M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M et 1M), dans des erlenmeyers de 100 ml. Les autres conditions physico-chimiques, sont fixées à  $pH=7.2$ ,  $T = 37^\circ C$  (Kannika, 2003).

### III.9.2.3. Détermination du pH optimum de croissance

Pour réaliser ce test, le pH du bouillon est modifié (3, 5, 6, 7, 8, 9 et 11), alors que la température et la concentration en sels ont été fixé à  $37^\circ C$  et à 250 g/l (Kannika, 2003).

### III.9.2.4. Détermination de la température optimale de croissance

Pour le test de tolérance aux températures, seulement la température d'incubation est modifiée (4, 25, 37, 45 et  $50^\circ C$ ), alors que le pH et la concentration en NaCl ont été fixé à 7.2 et à 250 g/l (Kannika, 2003).

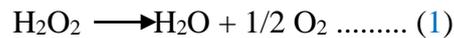
## III.9.3. Tests biochimiques

Une variété des tests biochimiques a été effectuée conformément aux procédures standards de la détermination bactériologique et selon les protocoles expérimentaux appliqués par Kannika, (2003).

### III.9.3.1. Métabolisme respiratoire

#### III.9.3.1.1. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage (1).



Ce test peut être réalisé :

Sur lame, en dispersant une colonie dans une goutte d'eau oxygénée à 3% ; ou directement sur le milieu de culture, en déposant une goutte de l' $H_2O_2$  sur la colonie à tester. La présence de la catalase se traduit par le dégagement immédiat des bulles d'oxygène (Kannika, 2003).

#### III.9.3.1.2. Oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme de certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes. Le test de l'oxydase est fondé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré en violet, l'indophénol.

L'acide ascorbique, incorporé dans le réactif « Oxydase Reagent », agit en tant qu'agent réducteur pour limiter l'auto-oxydation du réactif et améliorer la stabilité du réactif.

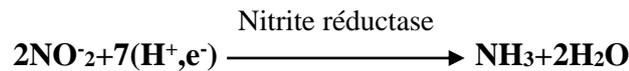
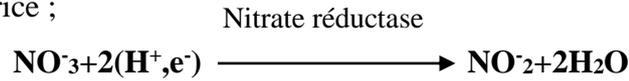
Le test consiste à transférer un volume de 1 ml de la culture dans un tube en verre stérile, puis on ajoute un disque d'oxydase. L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de

violet à pourpre indique un test positif. Des réactions tardives ou l'absence de couleur indique un résultat négatif (Kannika, 2003).

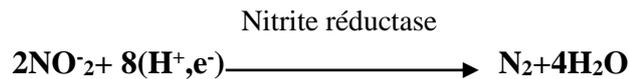
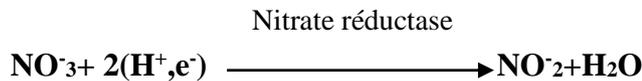
### III.9.3.1.3. Nitrate réductase

Certaines bactéries ont la capacité de réduire les nitrates. Elles peuvent soit seulement assimiler les nitrates soit les assimiler et les respirer suivants deux types de réactions :

- Une réaction assimilatrice sous la dépendance d'une nitratase de type B (NRB) ou nitrate réductase assimilatrice ;



- Une respiration nitrate s'effectuant en anaérobiose sous la dépendance d'une nitrate réductase de type A (NRA) ou nitrate réductase dissimulatrice.



- Dans la pratique, le type de nitrate réductase n'est pas déterminé ; on met en évidence la réduction des nitrates en recherchant les nitrites formés en utilisant le Réactif de Griess-Ilosvay : (Nitrate 1+ Nitrate 2) (Cf. annexe). Elle est complétée par l'épreuve de Zo-Bell (ajout de poudre de zinc) pour certaines bactéries, qui réduisent les nitrates au-delà du « stade nitrites ». Cependant, 0.1 ml de l'inoculum, a étéensemencé dans un milieu nitraté (Cf. annexe) et incubé à 37°C pendant 48 heures à 1 semaine, jusqu'à ce qu'un trouble reflétant la croissance soit apparu. Puis 1 ml du réactif Nitrate 1 est ajouté au milieu, suivi de 1 ml de réactif Nitrate 2. La lecture et l'interprétation des résultats se font comme il est indiqué dans le tableau 7, (Kannika, 2003).

**Tableau 7.** Lecture et interprétation du test des nitrates-réductases.

Coloration de la pente du milieu	Produit formé	Resultats
<b>Rouge</b> (Après une minute environ)	<b>NO<sub>2</sub></b>	<b>NR<sup>+</sup></b>
<b>Incolore</b> Rajouter un peu de poudre de zinc dans le tube de culture laisser sédimenter sans agiter, observer après 1 à 2 minutes.	<b>Coloration rose au voisinage de la poudre de zinc :</b> Présence de NO <sub>2</sub> , par réduction chimique des nitrates en nitrites par le zinc.	<b>NR<sup>-</sup></b>
	<b>Incolore :</b> Nitrates complètement réduits au-delà du « stade des nitrites » en N <sub>2</sub> ; présence de bulles gazeuses dans la culture témoignant de la réduction des nitrates en azote gazeux N <sub>2</sub> .	

### III.9.3.2. Métabolisme glucidique

#### III.9.3.2.1. Test de R.M.V.P. (Etude des différentes voies fermentatives)

Ce test permet d'effectuer une différenciation entre la fermentation des acides mixte (réaction au rouge de méthyle: RM) et l'acétoïne ou butylène glycolique ou butanediol, (réaction Voges Proskauer: VP). Ces deux réactions ont un intérêt différent, mais elles sont effectuées sur le même milieu et le plus souvent, se vérifiant mutuellement, une souche à RM<sup>+</sup> est habituellement VP<sup>-</sup> et vice versa (Kannika, 2003).

- **Test de rouge de méthyle (RM)**

0.1ml de la culture a été ensemencé dans le milieu R.M.V.P (Cf. annexe). Après une période d'incubation de 7 jours à 37°C, on ajoute dans le milieu 5 gouttes de la solution du rouge de méthyle (Cf. annexe). Le développement d'une coloration rouge (pH ≤ 5) indique un résultat positif (RM<sup>+</sup>).

- **Test de Voges-Proskauer**

De la même culture préparée pour le test RM, 1ml est 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 (Cf. annexe). Le tube est agité doucement pour exposer le milieu à l'oxygène atmosphérique puis le laisser intact. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une coloration rouge durant les 15 minutes ou plus mais pas plus d'une heure après l'ajout du réactif.

#### III.9.3.2.2. Assimilation des glucide

Pour tester l'assimilation des glucides par les bactéries étudiées, des volumes de la suspension bactérienne de 20µl ont été transférés aux puits d'une microplaque stérile, contenant chacun un volume de 50µl du milieu de culture au rouge de phénol (Cf. annexe) et 30µl d'une solution de substrat à tester après avoir la préparé 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. Les substrats testés sont : D-lactose, D-fructose, D-galactose, D-xylose, L-arabinose, D-mannitol, D-glucose (Kannika, 2003).

#### III.9.3.2.3. Dégradation de l'amidon

Un ensemencement par étalement des deux souches à étudier est fait sur un milieu de culture solide à base d'amidon (Cf. annexe). L'incubation est faite à 37°C pendant 7 jours, ensuite les boîtes sont inondées par une solution d'iode (Cf. annexe). L'apparition de la couleur bleu de la gélose autour des colonies, indique un résultat négatif (pas d'hydrolyse d'amidon), par contre l'apparition d'une zone claire autour des colonies indique un résultat positif (hydrolyse de l'amidon) (Kannika, 2003).

### III.9.3.3. Métabolisme protéique

#### III.9.3.3.1. Test de l'utilisation des acides aminés

Pour le test de la dégradation des acides aminés (L-tyrosine, L-leucine, Glycine et L-proline) la méthode utilisée est la même utilisée pour l'assimilation des sucres, mais la concentration des acides aminés est ajustée à 0.1% (Kannika, 2003).

#### III.9.3.3.2. Formation de l'indole

Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent 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 (Cf. annexe) et incubée à 37°C pendant 7 jours. Pour l'interprétation des résultats, on ajoute 1 ml du réactif de kovacs (Cf. annexe). Le développement d'une coloration rouge vif à la surface puis dans la culture indique un résultat positif (Kannika, 2003).

#### III.9.3.3.3. Production de l'H<sub>2</sub>S

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

#### III.9.3.3.4. Dégradation de la gélatine

La souche à tester estensemencée dans un tube à essai contenant un milieu à base de la gélatine (Cf. annexe). La gélatine inoculé est incubée à 37°C pendant 7 jours. L'hydrolyse de la gélatine est indiquée par la liquéfaction du milieu après avoir remis les boites à une température de 4°C pendant 20 à 30 minutes (Kannika, 2003).

### III.9.3.4. Métabolisme lipidique

- **Dégradation du tween 80**

Le test est réalisé sur milieu de culture SG solide, contenant le Tween 80, comme un substrat lipidique. Un résultat positif est détecté par l'apparition d'une opacification autour des colonies (Kannika, 2003).

### III.9.3.5. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été testée sur un milieu Muller-Hinton II agar (modifié) (Cf. annexe) avec des disques d'antibiotiques par la méthode de Bauer et al., (1966). Les antibiotiques testés sont : la pénicilline (P6µg), l'ampicilline(AM 10µg), la novobiocine (NV 5µg), la bacitracine (B130µg), la rifampicine (RD30µg), l'anisomycine, la néomycine et le chloromphicol (C30µg). Une suspension bactérienne, est étalée sur la surface du milieu de

culture, les disques sont positionnés de manière équidistante, la lecture et l'interprétation des résultats se font après incubation à 37°C pendant 14 jours.

### III.9.4. Chimiotaxonomie

#### III.9.4.1. Extraction des lipides polaires

Les lipides polaires des souches à caractériser sont extraits selon le protocole suivants :

- Un volume de 20 ml de la culture a été centrifugé à 12 000 g pendant 15 min à 4°C ;
- Le culot est récupéré, puis on ajoute 1 ml d'eau distillée ;
- Un volume de 3.75 ml du mélange de méthanol : chloroforme (2 :1, v :v), est agité pendant 4 heures ;
- Le mélange est centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min, en suite un culot et un surnageant « 1 » sont récupérés séparément ;
- Un volume de 4.75 ml d'une solution constituée de méthanol-chloroforme-eau (2 :1 :0.8, v :v :v) est ajouté au culot ;
- Le mélange est centrifugé à 35 000 rpm pendant 10 min, en suite un culot et un surnageant « 2 » sont récupérés séparément ;
- Une solution de chloroforme/eau (2.5 :2.5, v : v) est ajoutée au surnageant « 1 » plus surnageant « 2 » ;
- Le mélange est centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min, et 0.5 ml de benzène ;
- Récupération de la phase chloroforme qui contient la fraction lipidique ;
- Concentration et évaporation au rotavapeur ;
- Dépôt sur plaque de gel de silice ([Hezayen et al., 2001](#); [Tindall et al., 2007](#); [Hwang et al., 2013](#)).

#### III.9.4.2. Analyse des lipides polaires

Les lipides polaires sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur gel de silice en couche mince. La première séparation est développée dans un système solvant constitué de : chloroforme : méthanol : eau (65 : 25 : 4, v/v/v) et la deuxième séparation est faite par le système solvant : chloroforme : méthanol : acide acétique : eau (80 : 12 : 15 : 4, v/v/v/v).

Après migration, la plaque a été chauffée puis révélée par pulvérisation des révélateurs chimiques ([Tableau 8](#)).

**Tableau 8.** Révélateurs chimiques des lipides polaires (Tindall, 1990 ; Ihara *et al.*, 1997; Hezayen *et al.*, 2001; Tindall *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2013 ).

Lipides totaux et groupes fonctionnels	Révélateur (Cf. annexe)	Couleur
<b>Lipides totaux</b>	Acide dodecamolybdophosphorique. Un chauffage à 150°C pendant 10 min.	Vert foncé
<b>Glycolipides</b>	$\alpha$ -naphthol en (methanol : eau) (1 : 1) + (acide sulfurique : ethanol) (1 : 1). Un chauffage de 120°C pendant 5 à 10 min.	Bleu foncé et les autres lipides en jaune orangé
<b>Phospholipides</b>	Réactif de Zinzadze de Dittmer & Lester (1964).	Bleu
<b>Aides aminés libres (aminolipide)</b>	Réactif de la ninhydrine Un chauffage à 105°C pendant 10 minutes.	Pourpre
<b>Aldéhydes des glucopyranose</b>	Acide periodique de Schiff.	Violet
<b>Amonium quaternaire (phosphatidylcholine)</b>	Réactif de Dragendorff.	Rouge-orangé / Brun-orangé

### III.9.5. Caractérisation génotypique

#### III.9.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Les isolats dont on veut extraire l'ADN sontensemencées en stries espacées sur boîtes de pétri contenant le milieu de culture SG. L'ADN est extrait selon la méthode de Liu *et al.*, (2000). Le protocole détaillé suivi pour l'extraction et la purification de l'ADN en utilisant le Kits (MasterPure™ Gram Positive DNA purification (Epicentre® Biotechnologies, Germany) est comme suit :

- Des colonies bactériennes ont été transférées dans des tubes eppendorf stériles de 1.5 ml ;
- Un volume de 500  $\mu$ l d'une solution de lyse composée de : Tris-HCl (pH 8.0) : 400 mM ; EDTA (pH 8.0) : 60 mM ; NaCl : 150 mM ; SDS : 1% est ajouté aux tubes eppendorf ;
- Les tubes sont agités pendant 10 min à température ambiante ;
- Une solution de 150  $\mu$ l composée de : 60 ml d'acétate de potassium 5M ; 11.5  $\mu$ l d'acide acétique glacial ; 28.5  $\mu$ l d'eau distillée (pH final : 4.8), est ajoutée ;
- Les tubes sont agités par le vortex, puis centrifugés à 10 000 g pendant 1 min ;
- Le surnageant est récupéré dans un autre tube eppendorf ;
- Les tubes sont centrifugés à 10 000 g pendant 1 min et le surnageant est récupéré dans un autre tube eppendorf de nouveau ;
- Un volume égal d'isopropanol est ajouté au tube d'eppendorf ;

- Les tubes sont centrifugés à 10 000 g pendant 2 min ;
- Le surnageant est éliminé, puis l'ADN est lavé avec 300 µl d'éthanol à 70% ;
- La solution d'ADN est centrifugé à 10 000 g pendant 1 min, puis le surnageant est éliminé ;
- Le culot (l'ADN) est séché à l'air ;
- Le culot est suspendu dans 50 µl d'eau bi distillée stérile ;

### III.9.5.2. Amplification du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S par PCR

Il s'agit d'une amplification élective d'une séquence d'ADN double brin, effectuée in vitro par extension itérative de deux amorces (Tableau 9) :

**Tableau 9.** Amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

<b>ArcF</b>	<b>5' TCCGGTTGATCCTGCC 3'</b>
<b>1500RA</b>	<b>5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'</b>

Les réactions PCR sont réalisées dans un volume total de 19.8 µl contenant le tampon de réaction qui contient 10mM de chaque désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de chaque amorce, 5U de la Taq polymérase et 5µl de l'échantillon d'ADN.

Dans le témoin négatif, les 5µl d'ADN sont remplacés par 5µl d'H<sub>2</sub>O stérile (Tableau 10)

**Tableau 10.** Mélange réactionnel du PCR.

Réactifs	Volume (µl)
Tampon 10X	2
dNTPs (1mM)	4
ArcF (0.5µg/µl)	0,2
1500RA (0.5µg/µl)	0,2
TaqPolymerase (5U/µl)	0,2
H <sub>2</sub> O	12,5
ADN (30 ng/µl)	1
Volume total	19,8

Les microtubes sont ensuite placés dans un thermocycleur (Prkin Elmer, Model 480) ; les amplifications sont réalisées selon le programme mentionné dans le tableau 11 :

**Tableau 11.** Programme établi pour l'amplification.

Etapes	T°C	Temps	PCR (27 cycles)
Dénaturation préliminaire	94°C	3min	
Dénaturation	94°C	1min	
Hybridation	55°C	1:30 min	
Elongation	72°C	2min	
Elongation finale	72°C	5min	Refroidissement à 4°C

### III.9.5.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse en utilisant l'analyseur génétique (3500xL, Applied Biosystems) pendant 1 h, sur gel d'agarose à 0.8 % en tampon TAE 1X (Tris acétate-EDTA, Euromedex), additionné de 0.5µg/ml de bromure d'éthidium (BET) et en présence d'un marqueur de taille 1Kb de DNA Ladder (Prommega). Après migration, le gel est examiné sous lumière ultraviolette (UV) pour repérer les bandes amplifiées (bandes ~1500 paires de bases).

### III.9.5.4. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

Le séquençage de l'ADN a été effectué par la méthode de terminaison en chaîne en utilisant des didésoxyribonucléotides dont chacun est marqué par un fluorophore spécifique. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou « big dyeterminators ». Les amplifiats obtenus par PCR ont été séquencés, en utilisant le kit de réaction BigDye® Cycle Sequencing Ready Terminator (v 1.1, Perkin Elmer Applied Biosystems). Les amorces suivantes sont utilisées pour le séquençage (Tableau 12) :

**Tableau 12.** Amorces utilisées pour le séquençage.

530RA	5'ACCGCGGCGGCTGCCACCGG3'
1100RA	5'GGGTCTCGCTCGTTRCC3'
900FA	5'AGGAATTGGCGGGGGAGCAC3'

➤ **Préparation des conditions réactionnelles de séquençage**

Un mélange réactionnel typique a été préparé avec des proportions bien déterminées, comme il est indiqué dans le **tableau 13** :

**Tableau 13.** Mélange réactionnel de séquençage.

Réactifs	Quantités en (µl)
Amplifiats (10-40 ng d'ADN produits de PCR)	1µl
Amorces (3.2 pmol)	1,3µl
Tampon de séquençage BigDye terminator v 1,1	1µl
Réactifs de séquençage BigDye (ddNTP, dNTP, enzymes) (5X)	2µl
Eau bidistillée	q.s.p 4,75µl
Volume total	10,0

Trente cycles d'amplification dans le thermocycleur, ont été réalisés dont le programme de température est répertorié dans le **tableau 14**.

**Tableau 14.** Programme établi pour l'amplification par le thermocycleur (Veriti 96 well Thermal cycler)

Etape	Température	Durée
Dénaturation initiale	96°C	1 minute
Dénaturation	96°C	10 secondes
Hybridation	50°C	10 secondes
Elongation	60°C	4 minutes
Conservation	4°C	

➤ **Purification des produits de la réaction de séquençage**

Pour la purification de la réaction de séquençage, on utilise le Kit BigDay X Terminator (Applied Biosystems), constitué de deux réactifs (Solution SAM et X Terminator). Après réaction de séquençage, on centrifuge la plaque pendant 1 minute à 1000 rpm puis on ajoute 45µl de la solution SAM (tampon) et 10µl du réactif X terminator, suite à une période d'agitation continue de 30 min à 1800 rpm, le X terminator capte les ddNTPs non incorporés. Une seconde centrifugation de 2 min à 1000 rpm est nécessaire pour finaliser la préparation de la plaque pour le séquençage.

➤ **Lecture des séquences sur analyseur génétique (automate d'électrophorèse seize capillaire : ABI 3130xl)**

Les divers fragments à séquencer sont d'abord séparé selon leur taille par électrophorèse capillaire. La répartition a lieu sous l'action d'un courant électrique dans un automate d'électrophorèse à 16 capillaire ABI 3130xl, en utilisant le logiciel data collection (v 3.0, Applied biosystems).

### III.9.5.5. Alignement des séquences et étude phylogénétique

Une fois la séquence déterminée, elle sera traitée informatiquement grâce au programme **MEGA 7.0** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis program, version 7) (Kumar et al., 2016) pour extraire la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr16S). Dans ce traitement, la séquence anti-sens est inversée puis alignée avec la séquence sens ; les deux séquences sont ensuite fusionnées à l'extrémité 3' pour la première et 5' pour la deuxième pour avoir une seule séquence d'ADNr 16S, de 1400 à 1500 pb (selon la qualité et la longueur des séquences initiales).

Les séquences d'ADNr16S ainsi déterminées sont comparées, grâce au **BLAST**, aux séquences homologues d'espèces de référence répertoriées dans la banque génomique NCBI.

Cette comparaison a été faite par le biais de serveur EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> ; Kim et al., 2012) qui regroupe les séquences de toutes les souches types validées des bactéries.

La séquence de la souche CH5 est alignée avec les séquences de références par l'outil CLUSTAL W, puis l'ensemble des données alignées est utilisé pour l'analyse phylogénétique avec le logiciel MEGA 7.0. Les matrices des distances d'évolution sont générées comme décrit par Jukes and Cantor, (1969). Les algorithmes de construction des topologies des arbres phylogénétiques sont celles de la méthode de neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987). La validation statistique des lien phylogénétiques établis est effectuée par le test du Bootstrap dont les valeurs sont basées sur le résultats de 1000 analyses (Felsenstein, 1985).

# **Chapitre IV :**

## **Résultats et discussions**

---

### IV.1. Isolement des *Haloarchaea*

L'isolement des *Haloarchaea* a été effectué sur le milieu Sehgal-Gibbons (SG), ajusté à un pH de 7.2, avec incubation à 37°C pendant 15 jours. Ce milieu s'est révélé être très intéressant pour l'isolement et la sélection des *Archaea* halophiles, à partir de six prélèvements de sol salins, diversifiés de point de vue texture et salinité (Ariech, 2011). L'isolement abouti à l'obtention de 30 isolats après un repiquage successif de leurs colonies.

Sur gélose, les six isolats (CH1, CH2, CH3, CH4, CH5 et CH6) qui ont été retenus pour le screening de la production des biosurfactants se présentent sous forme des colonies de petite taille, convexes, régulières, translucides, puis colorées au fur et à mesure de l'élaboration des caroténoïdes, et parfois blanchâtres. Ces colonies se présentent aussi avec un aspect gluant, due à la présence éventuelle des composés glycolipidiques ou glycoprotéiques, c'est pour cette raison qu'ils ont été choisis pour le screening des souches actives, vue que les biomolécules recherchées peuvent être de cette nature biochimique.

### IV.2. Screening de la production des biosurfactants

Le dépistage de la production des biosurfactants par les six isolats a été réalisé, en utilisant les techniques suivantes par ordre chronologique : test de l'effondrement de la goutte ; test de dispersion de l'huile ; test de stabilité de l'émulsion (ES%) et la mesure de la tension superficielle.

Les résultats obtenus à partir des tests de screening sont mentionnés dans le [tableau 15](#) et les [figures 25, 26](#) et [27](#). Le choix de ces techniques parmi des dizaines des techniques existantes, a été fait en se basant sur leurs avantages dont la simplicité, le faible coût, l'implantation rapide et l'utilisation d'un équipement relativement commun et qui est accessible dans presque tous les laboratoires de microbiologie. Outre, des contraintes qui ont été rencontrés comme la non disponibilité et la sensibilité du tensiomètre utilisé pour la mesure de la tension superficielle.

#### IV.2 .1. Test de l'effondrement de la goutte

Jain *et al.*, (1991) ont suggéré que l'utilisation de la méthode de l'effondrement de la goutte est fiable et facile à mettre en œuvre car, elle ne nécessite qu'un petit volume (5 à 10µl) de la culture ou de la solution de surfactant utilisée pour l'évaluation de leur pouvoir tensioactif. De plus, elle peut être réalisée dans une microplaque, de ce fait la lecture des résultats est faite par observation à l'œil nu (Turgul and Cansunar, 2005). Ce test est appliqué et cité plusieurs fois pour des fins de screening dans plusieurs travaux (Bodour *et al.*, 2003 ; Batista *et al.*, 2006 ; Plaza *et al.*, 2006).

**Tableau 15.** Résultats du test de l'effondrement de la goutte.

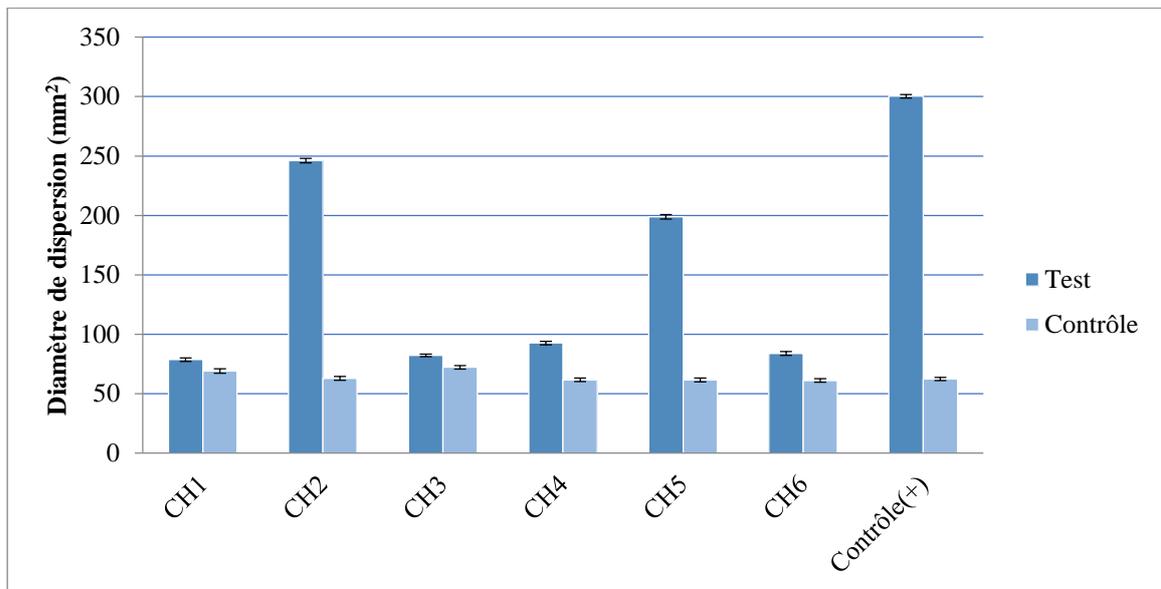
Des gouttes plates avec un système de notation allant de (+) à (+++++) correspondant à un étalement partiel jusqu'à un étalement complet sur la surface de l'huile. Des gouttes arrondies ont été marquées comme résultat négatif (-) indiquant l'absence de la production des biosurfactants. Le milieu SG stérile est utilisé comme un contrôle négatif (-) et une solution de SDS à 1% est utilisée comme un témoin positif (+++++).

Isolats	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6	Contrôle (+)	Contrôle (-)
<b>Huile de tournesol</b>	++	+++	+	++	+++	+	+++++	-
<b>Huile d'olive</b>	+	+++	+	++	+++	+	+++++	-
<b>Huile minérale</b>	+	+++++	-	+	+++++	++	+++++	-
<b>Huile de moteur</b>	+	+++	-	+	+++	++	+++++	-
<b>Gasoil</b>	+	+++++	+	+	+++++	+	+++++	-

Les résultats de notre expérience indiquent que les deux isolats CH2 et CH5 se montrent positifs, il y avait une très bonne activité par rapport au contrôle positif (SDS à 1%). Alors que les autres isolats, présentent des résultats négatifs à plus ou moins positifs (CH1, CH3, CH4 et CH6) ; en prenant en considération le degré de l'effondrement de la goutte visuellement et la nature de la phase huileuse. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le gasoil et avec l'huile minérale qu'avec l'huile d'olive, l'huile de tournesol et l'huile de moteur. Dans cette expérience, on a utilisé la culture bactérienne comme source de biosurfactants. Pour les isolats qui produisent des biosurfactants extracellulaires, il y a avait une bonne activité observée. Ce résultat inclut les souches microbiennes ayant une hydrophobicité cellulaire élevée, mais pas une production des biosurfactant. Les résultats obtenus dans ce test étaient similaires aux résultats rapportés par [Kebbouche-Gana et al., \(2009\)](#). Les souches avec plus de deux réponses positives ont été considérées comme productrices des biosurfactants. Pour un meilleur screening, les six isolats ont été exposés à d'autres tests confirmatifs.

#### IV.2.2. Test de dispersion de l'huile

Les résultats du test de dispersion de l'huile étaient en concordance avec les résultats de l'effondrement de la goutte. Cependant, les souches qui présentent des résultats positifs dans ce dernier test, étaient aussi positifs pour le test de dispersion de l'huile. Ces résultats ont confirmé la capacité de production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5 ([Figure 21](#)).



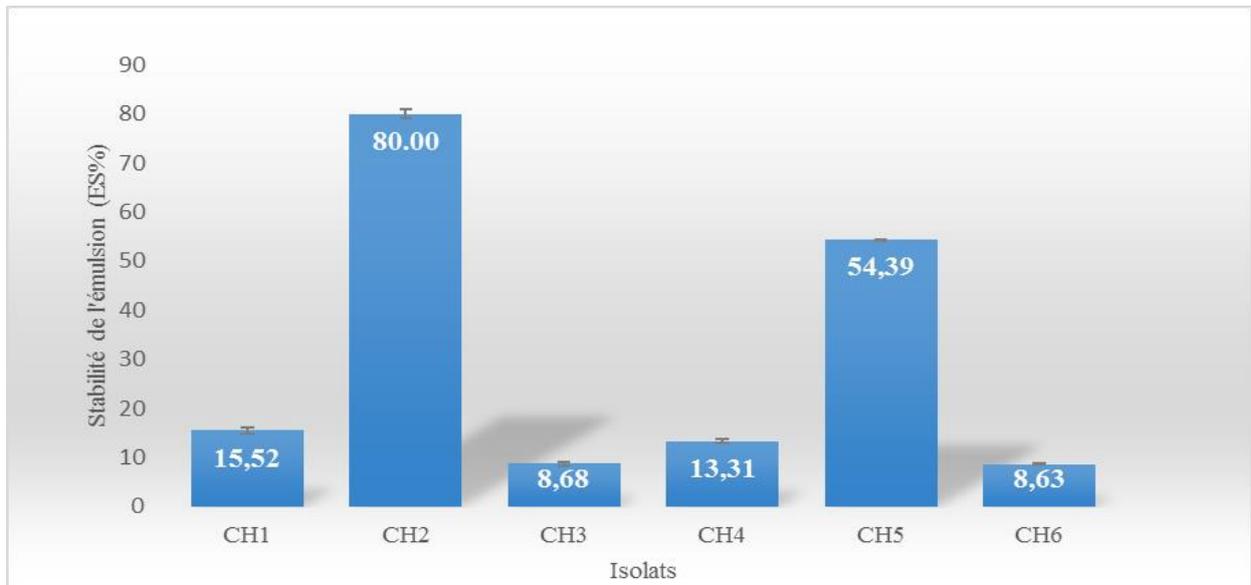
**Figure 21.** Test de dispersion de l'huile.

Morikawa *et al.*, (2000) ont signalé que la surface de la zone de déplacement de l'huile sur la phase aqueuse est proportionnelle à la concentration des biosurfactants. Toutefois, dans ce test, il n'y avait pas une estimation de la concentration des biosurfactants par rapport à l'activité de dispersion de l'huile, mais il s'agit d'un test de présomption pour vérifier la présence ou l'absence de biosurfactant produits par les six souches. D'après la [figure 21](#), on peut considérer que les isolats CH2 et CH5, ont une activité dispersante proche de celle du contrôle positif (SDS à 1%), alors que les autres isolats : CH1, CH3, CH4 et CH6 ne sont pas actifs. Des résultats similaires pour le test de l'effondrement de la goutte et le test de dispersion de l'huile ont été rapporté par Youssef *et al.*, (2004). Cependant, ces résultats suggèrent que la technique de dispersion de l'huile est plus sensible que la méthode de l'effondrement de la goutte pour la détection des biotensioactifs.

#### IV.2.3. Test de stabilité de l'émulsion

Selon Willusen and Karlson, (1997) le critère utilisé pour sélectionner les microorganismes producteurs des biosurfactants est la capacité de maintenir au moins 50% du volume initial de l'émulsion après 24h de sa formation. Les résultats observés dans ce test, révèlent que parmi les six isolats testés, les souches CH2 et CH5 ont montré une stabilité relative de l'émulsion formé avec un  $ES\% = 80 \pm 1.0\%$  et  $ES\% = 54.39 \pm 0.2\%$ , respectivement ([Figure22](#)).

L'évaluation de la capacité d'émulsification est une méthode de dépistage simple appropriée pour un screening préliminaire. Par conséquent, ce procédé donne juste une indication sur la présence des biosurfactants. De ce fait, ce test est cité plusieurs fois dans des travaux précédents ([Chen et al., 2007\).](#)



**Figure 22.** Test de la stabilité de l'émulsion (ES%).

#### IV.2.4. Test de la mesure direct de la tension superficielle

Selon [Bodour and Maier, \(1998\)](#), le critère utilisé pour la sélection des microorganismes producteurs des biosurfactants est la capacité de réduire la tension superficielle au-dessous de  $40 \text{ mN.m}^{-1}$ . La mesure de la tension superficielle des bouillons exempts des cultures cellulaires, a révélé que parmi les six souches testées que les surnageants des deux isolats CH2 et CH5 ont montré une forte réduction de la tension superficielle jusqu'aux  $23.7 \pm 0.5$  et  $38.1 \pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivement ([Figure 23](#)). Nous avons observé aussi que les isolats les plus actifs sont les mêmes qui sont détectés par les trois tests précédents. La mesure directe de la tension superficielle des surnageants des cultures est une méthode reproductible pour la sélection des microorganismes producteurs des biosurfactants ([Lin, 1996](#) ; [Thavasi et al., 2011](#)).



**Figure 23.** Test de mesure de la tension superficielle.

### IV.3. Résultats des analyses statistiques de la corrélation entre les différents tests

Le [tableau 16](#) présente les variations du coefficient de corrélation entre les quatre méthodes utilisées pour détecter la production des biosurfactants, le rho de Spearman, ( $r_s = -0.987$ ) révèle une forte corrélation négative entre le test de la stabilité de l'émulsion et le test de la mesure de la tension superficielle. Une corrélation négative plus faible ( $r_s = -0.971$ ) a été détectée entre le test de dispersion de l'huile et le test de la mesure de la tension superficielle. Cependant, il y avait une faible corrélation négative ( $r_s = -0.807$ ) entre la méthode de l'effondrement de la goutte et la tension superficielle. Le test de dispersion de l'huile et le test de la stabilité de l'émulsion sont très fortement corrélés avec un rho ( $r_s = 0.991$ ). Cependant, des faibles corrélations positives ( $r_s = 0.864$ ) et ( $r_s = 0.288$ ) ont été observées entre la technique de l'effondrement de la goutte et le test de dispersion de l'huile et entre le test de l'effondrement de la goutte et le test de la stabilité de l'émulsion.

**Tableau 16.** Corrélation statistique entre les différentes méthodes.

Coefficient de corrélation de Spearman ( $r_s$ )				
Test	EG	DH	SE	MTS
Effondrement de la goutte (EG)	1			
Dispersion de l'huile (DH)	0.864	1		
Stabilité de l'émulsion (SE)	0.822	0.991	1	
Mesure de la tension superficielle (MTS)	-0.807	-0.971	-0.987	1

L'intérêt croissant aux biosurfactants a mené au développement d'une multitude de méthodes pour le screening des souches productrices des biosurfactants. Une combinaison des différentes méthodes est appropriée pour un dépistage réussi. Dans la présente étude les deux isolats CH2 et CH5 qui ont été isolés à partir des sols salins de Chott El Hodna–M'sila (Algérie), ont montré une bonne capacité à produire les biosurfactants, en réduisant la tension superficielle au-dessous de  $40 \text{ mN.m}^{-1}$  avec une stabilité de l'émulsion supérieure à 50%, ce qui les rends des nouveaux candidats potentiels pour la production des biosurfactants.

CH2 et CH5 fortement actifs ont été retenus pour des études ultérieures portant sur la détermination des propriétés des biosurfactants produits et de leur pouvoir de dépollution ainsi que la taxonomie des souches productrices.

#### IV.4. Détermination des propriétés des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5

##### IV.4.1. Localisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules intra ou extracellulaires ou attachées à la surface des cellules. C'est pour cette raison qu'on a essayé de savoir la localisation des biosurfactants produits par les deux isolats CH2 et CH5.

Le test d'émulsification (ES%) calculé pour le moût de fermentation a donné un bon résultat par rapport à celui du filtrat. Il est, respectivement, de  $80.00 \pm 1.0\%$  et  $61.16 \pm 1.4\%$ , pour l'isolat CH2 et de  $54.39 \pm 0.2\%$  et  $50.83 \pm 1.2\%$ , pour l'isolat CH5. Cela nous amène à dire que les biosurfactants produit par CH2 et CH5 sont des produits extracellulaires ou attachés aux cellules ; ce qui facilite leur extraction.

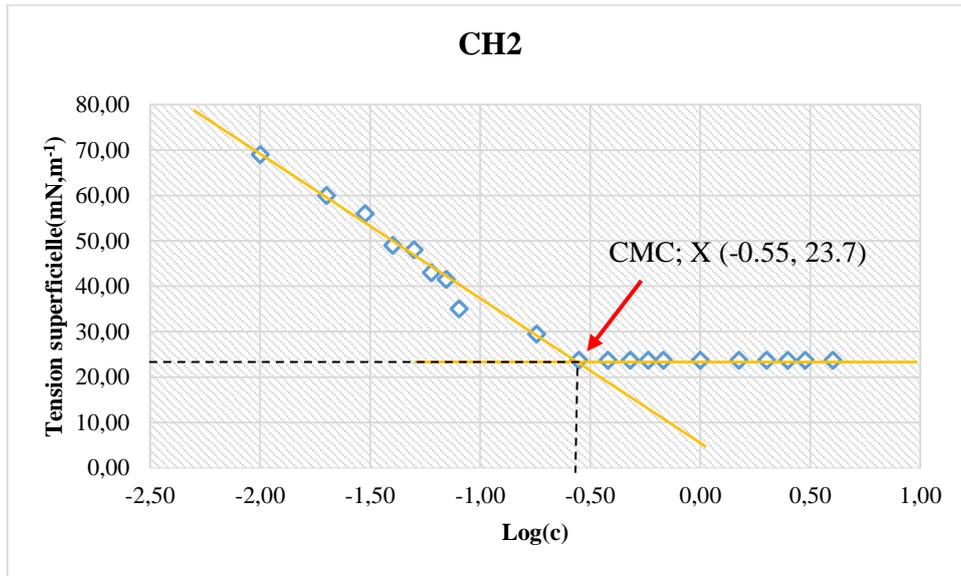
##### IV.4.2. Détermination de la CMC

La concentration micellaire critique (CMC) est une grandeur physique essentielle qui est une caractéristique propre de tout tensioactif ayant une structure bien définie et dépend des structures des parties hydrophiles et hydrophobes (Lodish *et al.*, 2005; Dauvergne, 2010).

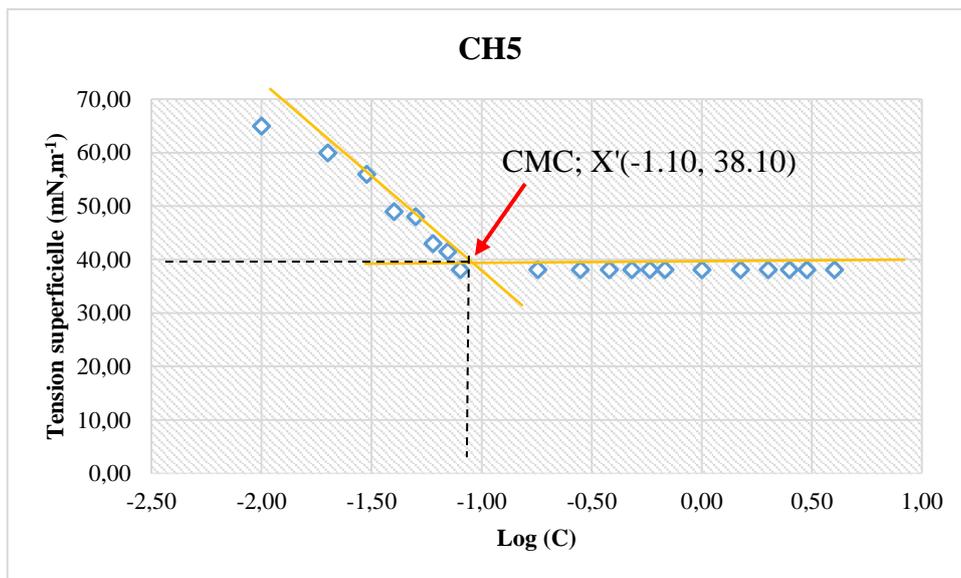
La détermination des CMC des biosurfactants produits par les deux isolats CH2 et CH5, consiste à mesurer la tension superficielle à différentes concentrations du biosurfactant à étudier, en réalisant des dilutions successives de la solution. On a ensuite tracé la courbe de variation de la tension superficielle en fonction du logarithme décimal de la concentration du tensioactif en solution (Figures 24 et 25 ).

D'après la figure 24, la CMC des biosurfactants produits par l'isolat CH2 est représentée par le point X (-0.55, 23.7) ce qui correspond à une  $TS=23.7 \text{ mN.m}^{-1}$  et une  $CMC=280 \text{ mg/l}$ , et comme il est indiqué dans la figure 25, la CMC des biosurfactants produits par l'isolat CH5 est représentée par le point X' (-1.10, 38.10) qui correspond à une  $TS=38.10 \text{ mN.m}^{-1}$  et une  $CMC=80 \text{ mg/l}$ .

Donc, les CMC des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, sont plus faibles par rapport aux CMC des agents tensioactifs synthétique comme le SDS avec une  $CMC= 2100 \text{ mg/l}$  (Amani, 2015). Ce résultat, est tout à fait similaire à celui rapporté par Desai and Banat, (1997) ; qui ont déclaré que les CMC des biosurfactants est d'environ 10 à 40 fois plus faibles que les CMC des agents tensioactifs chimiques, sachant que moins d'agents tensioactifs est nécessaire pour l'obtention d'une diminution maximale de la tension superficielle.



**Figure 24.** La tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration du biosurfactant produit par l'isolat CH2.



**Figure 25.** La tension superficielle en fonction du logarithme de la concentration du biosurfactant produit par l'isolat CH5.

#### IV.4.3. Etude de la relation entre DO, ES%, TS et pH

La cinétique de croissance des deux isolats CH2 et CH5, sur milieu de culture liquide SG a été suivie en mesurant la densité optique en fonction du temps:  $DO=f(t)$ ; ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées dans les figures 26 et 27.

Pour les deux isolats étudiés, les phases de latences observées sont courtes. D'après ces graphes, nous pouvons observer que la concentration microbienne augmente dès le 1<sup>er</sup> jour de fermentation jusqu'à atteindre des valeurs maximales au bout de 4<sup>ème</sup> jour pour les deux isolats. Cette concentration microbienne se stabilise au-delà du 8<sup>ème</sup> jour.

Les courtes phases de latence démontrent une adaptation plus ou moins rapide des isolats étudiés à la source de carbone utilisée (Akmousi, 2009). Par ailleurs, l'augmentation de la biomasse microbienne correspondrait à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution de substrat suffit aux besoins métaboliques des souches. Ainsi la stabilisation de la concentration microbienne au-delà de 7<sup>ème</sup> jours, montre que le niveau des exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution de substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante, c'est donc la phase stationnaire (Rocha et al., 2007).

D'après les figures 26 et 27, on remarque que l'augmentation de la densité cellulaire est accompagnée par une augmentation de l'index d'emulsification. Elle atteint sa valeur maximale au bout du 10<sup>ème</sup> jour. L'allure des courbes est expliquée par une production maximale des biosurfactants à la fin de la phase stationnaire de croissance des isolats CH2 et CH5, c'est la phase où les bactéries se dirigent vers la production des métabolites secondaires.

Par ailleurs, on observe une courbe décroissante de la tension superficielle du milieu, ce qui démontre une activité tensio-active des biosurfactants dans les moûts de fermentation pour les deux isolats CH2 et CH5. De ce fait, la tension superficielle chute, jusqu'à des valeurs minimales au bout du 10<sup>ème</sup> jour.

En ce qui concerne la courbe de variation du pH. Celle-ci montre que ce dernier reste plus ou moins constant au cours du temps de fermentation. Ces biomolécules ne semblent pas influencer le pH du milieu de culture.

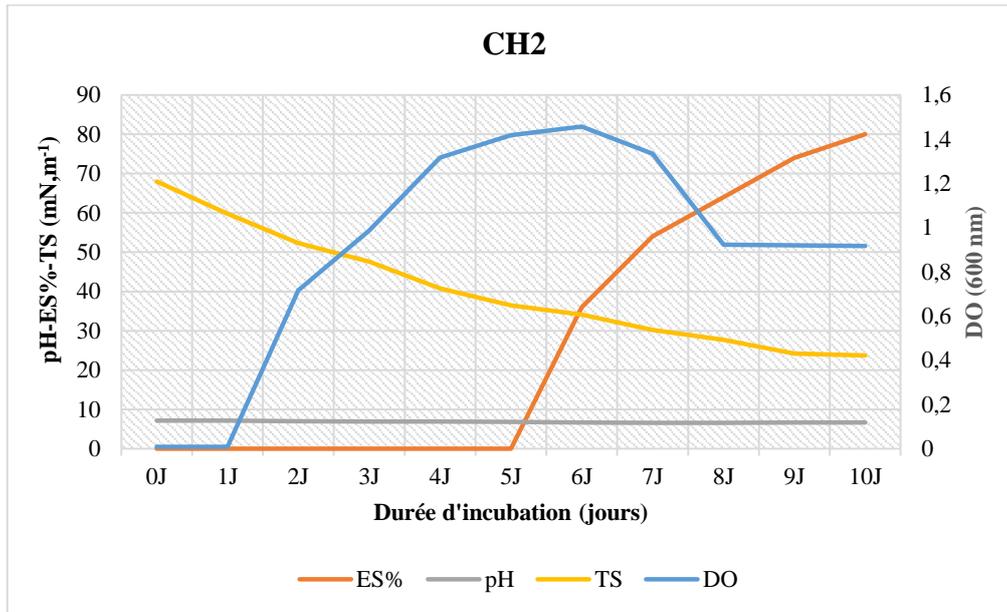


Figure 26. Cinétique de croissance de CH2 sur milieu SG.

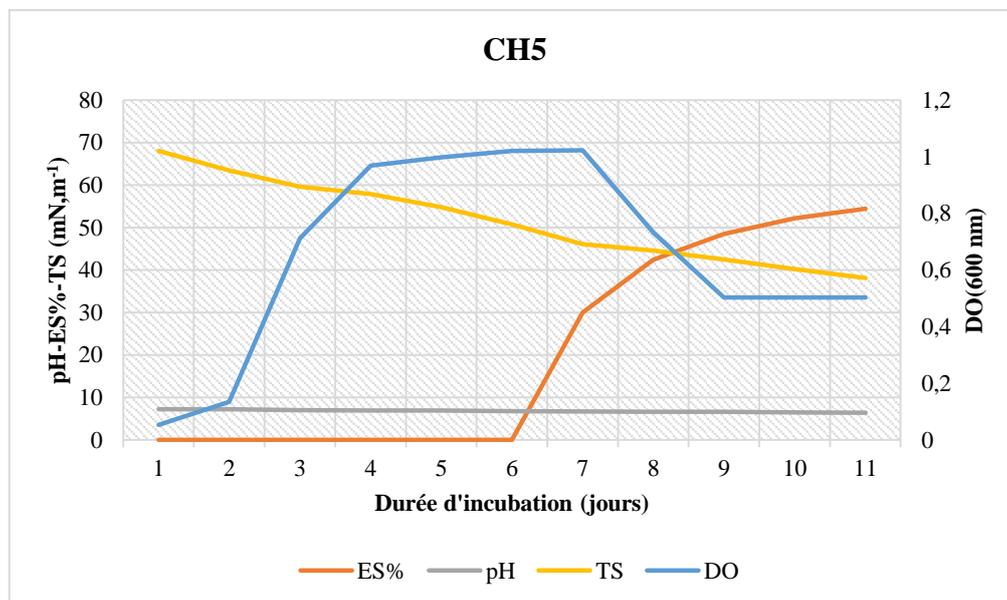


Figure 27. Cinétique de croissance de CH5 sur milieu SG.



calculés demeurent supérieurs à 50% pour toutes les concentrations avec des valeurs optimales à 15% pour CH2 et à 25% pour CH5.

L'étude des propriétés des biosurfactants produits par les deux isolats CH2 et CH5, a montré que ces isolats sont capables de produire ces biomolécules à la fin de la phase stationnaire de croissance. Donc, elles sont considérées comme des métabolites secondaires. Les résultats obtenus montrent aussi que ces biosurfactants sont extracellulaires ou attachés aux cellules ce qui facilite leur extraction, de plus ils demeurent assez stables aux variations de la température, du pH et de la salinité.

Ainsi, les concentrations micellaires critiques (CMC) ont été déterminées, les résultats obtenus sont  $CMC_{CH2}=280$  mg/l et  $CMC_{CH5}=80$  mg/l, ces résultats correspondent aux concentrations en biosurfactants dans le milieu au dessus de lesquelles des micelles se forment spontanément, ces concentrations sont plus faibles par rapport aux CMC des agents tensioactifs chimiques.

#### **IV.5. Optimisation des conditions de production des biosurfactants**

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Cependant, les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, l'optimisation de la composition du milieu de culture (source de carbone, source d'azote, etc.) et les conditions physico-chimiques de la culture (température, pH, agitation, sels minéraux, etc.), induisent les capacités métaboliques de l'organisme producteur et par conséquent augmente la biosynthèse de ces biomolécules. En effet, Il y'a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires biologiquement actifs (Smaoui, 2010).

Dans cette étude, nous avons testé l'effet du pH, de la température, de l'agitation et des concentrations différentes en NaCl et en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , ainsi que les facteurs nutritionnels comme la source de carbone et la source d'azote sur la capacité des deux isolats CH2 et CH5 de produire les biosurfactants, afin d'optimiser les conditions nécessaires à l'aboutissement d'un rendement de production maximal de ces biomolécules. En utilisant comme milieu de base, le milieu de culture SG. Les facteurs physico-chimiques de la culture ont été optimisés en premier lieu. Une fois leurs valeurs sont déterminées, les facteurs nutritionnels sont étudiés. Les moyennes des résultats obtenus ont été analysés statistiquement, en utilisant le logiciels SPSS (IBM SPSS Statistics 21). Les moyennes ont été comparés par ANOVA suivi d'un test de Tukey pour indiquer s'il existe des différences significatives entre les variables d'un paramètre. Les résultats ont été considérés comme significatifs lorsque  $p < 0.05$ . Les lettres a, b, c, d et e indiquent les degrés de différences significatives.

### IV.5.1. Optimisation des paramètres physico-chimiques

#### IV.5.1.1. Effet du pH

L'intervalle du pH testé, allant de 6 à 8, pour les deux isolats CH2 et CH5 qui demeurent capables de produire les biosurfactants à ces valeurs. Mais, la production optimale a été observée aux pH de 7 et 7.5 pour les isolats CH2 et CH5, respectivement. Bien que les analyses statistiques aient montré qu'il n'y a pas des différences significatives entre la production des biosurfactants aux valeurs de 6.5 à 7.5 pour l'isolat CH2. Le pH optimum choisi comme le meilleur pH pour la production des biosurfactants est le pH 7, où on observe le plus fort pourcentage de réduction de la tension superficielle ( $\%RTS = 68.82 \pm 1.05\%$ ) avec la tension superficielle la plus basse,  $TS = 21.2 \pm 0.05 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figure 29). En ce qui concerne, l'isolat CH5, le meilleur pH pour la production des biosurfactants est de 7.5 avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle ;  $\%RTS = 45.88 \pm 0.9\%$  et une  $TS = 36.8 \pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figure 29).

#### IV.5.1.2. Effet de la température

L'isolat CH2 cultivé dans le milieu de culture SG à pH 7.0, produit un taux maximum des biosurfactants, à température de  $37^{\circ}\text{C}$ , avec le plus haut pourcentage de réduction de la tension superficielle  $\%RTS = 70.4 \pm 1.32\%$  et la plus basse tension superficielle  $TS = 20.1 \pm 0.05 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figure 30). L'isolat CH5, a été cultivé dans un pH de 7.5, la température optimale était  $45^{\circ}\text{C}$ , tout en produisant la plus faible tension de surface,  $TS = 35.4 \pm 0.01 \text{ mN.m}^{-1}$ , avec le plus fort pourcentage de réduction de la tension superficielle ( $\%RTS = 47.94 \pm 0.7\%$ ) (Figure 30).

#### IV.5.1.3. Effet de l'agitation

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production des métabolites secondaires. La meilleure production est obtenue à une agitation de 150 rpm. Pour les deux isolats CH2 et CH5, avec les plus forts pourcentages de réduction de la tension superficielle ( $\%RTS_{CH2} = 66.30 \pm 0.7\%$  et  $\%RTS_{CH5} = 45.44 \pm 0.9\%$ ) et les plus faibles tensions superficielles ( $TS_{CH2} = 22.3 \pm 0.02 \text{ mN.m}^{-1}$  et  $TS_{CH5} = 37.1 \pm 0.01 \text{ mN/m}^{-1}$ ). Pour des agitations faibles de l'ordre de 50 et 100 rpm, la production de biomolécules est faible (Figure 31).

#### IV.5.1.4. Effet de NaCl

Les cellules des halophiles extrêmes ont une exigence pour l'ion  $\text{Na}^+$ , et plusieurs travaux ont montré l'importance de cet ion dans le maintien de l'intégrité pariétale et dans le processus de transport, de même l'absence de ce dernier ne peut être palliée par l'addition de LiCl ou KCl (Kharroub, 2007). En effet, pour savoir si le NaCl affecte la production des biosurfactants, des concentrations en NaCl, ont été ajoutées aux milieux de cultures SG à savoir : 8%, 15%, 20%, 25% et 32%. Les résultats montrent que l'isolat CH2 produit le maximum des biosurfactants à

une concentration de 8% de NaCl, avec un  $\%RTS_{CH2} = 65.14 \pm 0.6 \%$  et une  $TS_{CH2} = 23.7 \pm 0.2 \text{ mN/m}^{-1}$  % (Figures 32). Mais en ce qui concerne l'isolat CH5, bien qu'il n'existe pas une différence significative entre la production des biosurfactants à une concentration de 20 % ou à 25% de NaCl, la meilleure concentration utile pour la production des biosurfactants est à 25% avec un  $RTS_{CH5} = 52.79 \pm 0.8 \%$  et une  $TS_{CH5} = 32.1 \pm 0.03 \text{ mN/m}^{-1}$  (Figures 32).

#### IV.5.1.5. Effet de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Le magnésium est nécessaire pour les halophiles extrêmes, car il intervient dans la stabilisation des molécules fortement acides (enzymes et protéines), comme il a été suggéré par certains auteurs (Madern, 2000).

L'isolat CH2, présente une faible exigence en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  de l'ordre de 0.005 M, tout en produisant le meilleur rendement en biosurfactant, reflété par la plus basse tension superficielle  $TS_{CH2} = 21.6 \pm 0.2 \text{ mN/m}^{-1}$  avec un  $\%RTS_{CH2} = 68.23 \pm 0.8 \%$  (Figures 33).

D'après la figure 33, la concentration en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  utilisée par l'isolat CH5 pour la production des bisurfactants, était 0.1 M, tout en réduisant la tension superficielle à une valeur  $TS_{CH5} = 36.2 \pm 0.1 \text{ mN/m}^{-1}$  avec un  $\%RTS_{CH5} = 46.76 \pm 0.5 \%$ .

### IV.5.2. Optimisation des paramètres nutritionnelles (source de carbone et source d'azote)

#### IV.5.2.1. Source de carbone

La capacité des isolats CH2 et CH5 d'utiliser différents types de sources de carbone pour la production des biosurfactants a été testée avec la concentration de 4% (v/v) pour le gasoil et le glycérol et avec une concentration de 4g/l (p/v) pour les substrats suivants : le glucose, le lactose, l'amidon et le citrate de sodium.

Parmi les sources de carbone testées, on a constaté que l'assimilation du gasoil comme source de carbone par les isolats CH2 et CH5, a permis d'engendrer les tensions superficielles les plus basses avec  $TS_{CH2} = 20.5 \pm 0.2 \text{ mN/m}^{-1}$  et  $TS_{CH5} = 34.1 \pm 0.05 \text{ mN/m}^{-1}$ , avec des pourcentages de réduction de la tension superficielle de  $\% RTS_{CH2} = 69.85 \pm 0.5 \%$  et  $\% RTS_{CH5} = 65.14 \pm 0.6 \%$ , respectivement, suivi par le citrate de sodium avec des tensions superficielles de  $TS_{CH2} = 23.70 \pm 0.5 \text{ mN/m}^{-1}$  et  $TS_{CH5} = 38.12 \pm 0.02 \text{ mN/m}^{-1}$ , et des pourcentages de réduction de la TS de  $\% RTS_{CH2} = 65.14 \pm 0.6 \%$  et  $\% RTS_{CH5} = 43.93 \pm 0.4 \%$ , respectivement. Bien qu'il n'y eût pas de différence significative entre le gasoil et le citrate de sodium comme source de carbone, le gasoil a été choisi comme source de carbone optimale car il a produit le plus fort pourcentage de réduction de la tension superficielle (Figure 34).

A différentes concentrations de gasoil, CH2 et CH5 ont effectué les plus hauts pourcentages de réduction de la tension superficielle de ( $\% RTS_{CH2} = 70.29 \pm 0.6 \%$  et  $\% RTS_{CH5} = 50.29 \pm 0.7 \%$ ) respectivement, avec une concentration de 5% (v/v) du gasoil (Figure 35). Avec les plus basses TS ( $TS_{CH2} = 20.2 \pm 0.05 \text{ mN/m}^{-1}$  et  $TS_{CH5} = 33.8 \pm 0.02 \text{ mN/m}^{-1}$ ).

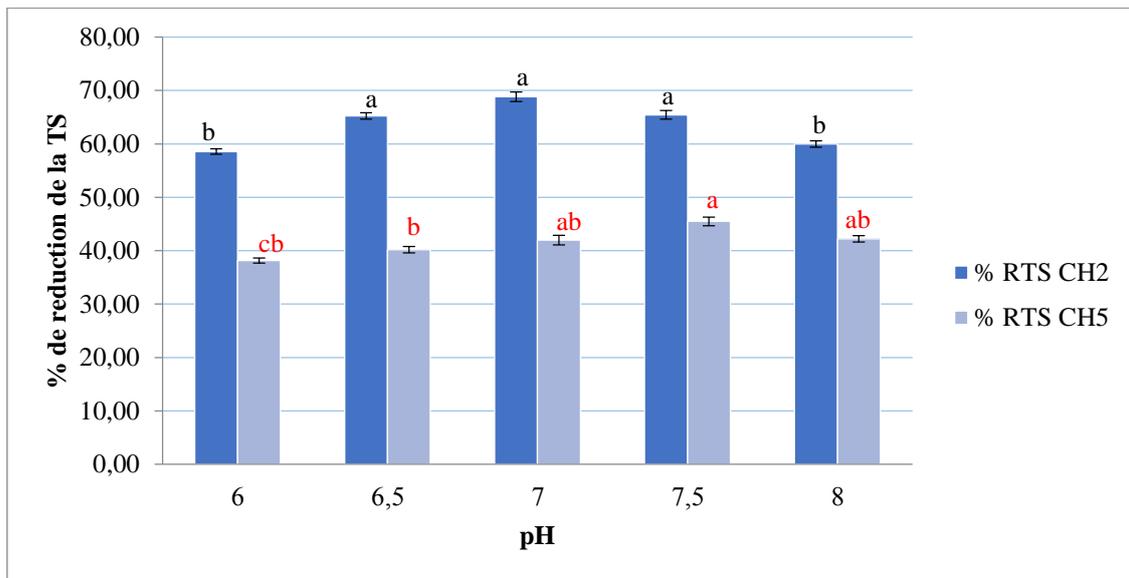
Cependant, l'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les concentrations de 4 % à 6 % du gasoil pour les deux isolats CH2 et CH5.

#### IV.5.2.2. Source d'Azote

En ce qui concerne l'effet de la source d'azote sur la capacité de produire les biosurfactants, les isolats CH2 et CH5 ont été cultivées dans le milieu de culture SG, mais à chaque expérience, une source d'azote a été testée. Les différentes sources d'azote qui ont été testées sont : le nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ), le sulfate d'ammonium ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), l'urée ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), et l'extrait de levure avec une concentration de 7g/l (p/v).

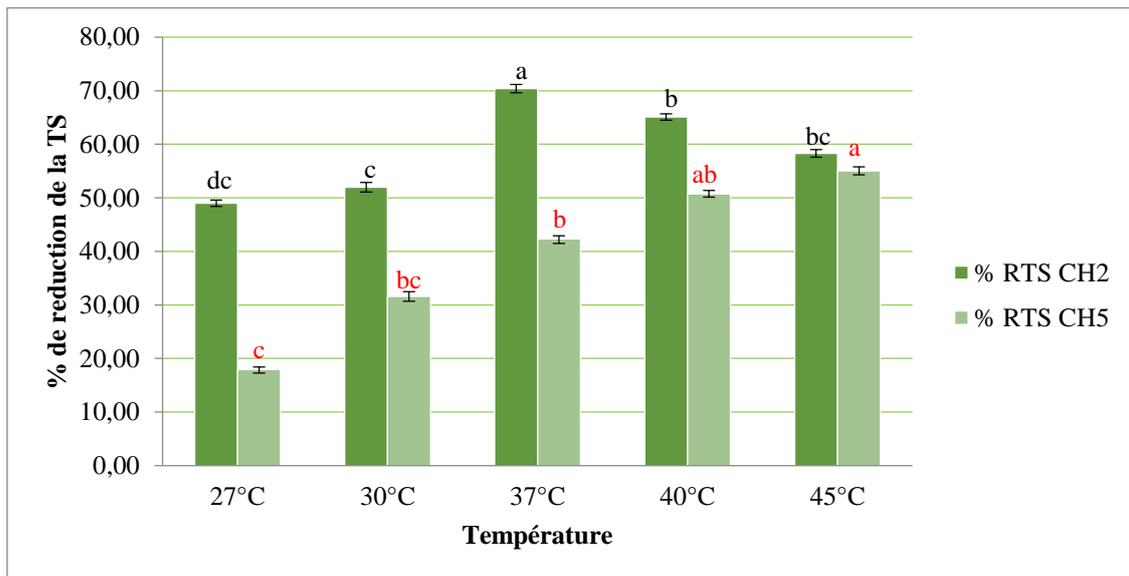
Parmi les sources d'azote testées, on a constaté que l'assimilation de l'extrait de levure comme source d'azote par les isolats CH2 et CH5, a permis d'engendrer les tensions superficielles les plus basses ( $\text{TS}_{\text{CH2}} = 20.2 \pm 0.1 \text{ mN/m}^{-1}$  et  $\text{TS}_{\text{CH5}} = 33.9 \pm 0.3 \text{ mN/m}^{-1}$ ), avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle de ( $\% \text{RTS}_{\text{CH2}} = 70.66 \pm 0.4 \%$  et  $\% \text{RTS}_{\text{CH5}} = 50.44 \pm 0.6\%$ ) respectivement, suivi par le sulfate d'ammonium. Bien qu'il n'y eût pas de différence significative entre l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium comme source d'azote pour l'isolat CH5 avec un pourcentage de réduction de la tension superficielle :  $\% \text{RTS}_{\text{CH5}} = 50.44 \pm 0.6\%$  pour l'extrait de levure et de,  $\% \text{RTS}_{\text{CH5}} = 49.45 \pm 0.2\%$  pour le sulfate d'ammonium, le gasoil a été choisi comme source de carbone optimale car il a produit la plus forte réduction en pourcentage de la tension superficielle (Figure 36)

Lorsque les isolats CH2 et CH5 sont cultivés à différentes concentrations d'extrait de levure, ils ont produit les plus hauts pourcentages de réduction de la tension superficielle de ( $\% \text{RTS}_{\text{CH2}} = 70.66 \pm 0.4 \%$  et  $\% \text{RTS}_{\text{CH5}} = 50.44 \pm 0.6\%$ ) respectivement, avec une concentration de 9 g d'extrait de levure pour l'isolat CH2 et de 8g pour l'isolat CH5. Quoiqu'il n'y a pas des différences significatives statistiquement, entre les concentrations 7, 8, 9 et 10 g/l pour l'isolat CH2 et entre 5, 6, 7, 8, 9 et 10 g/l pour l'isolat CH5 (Figure 37).



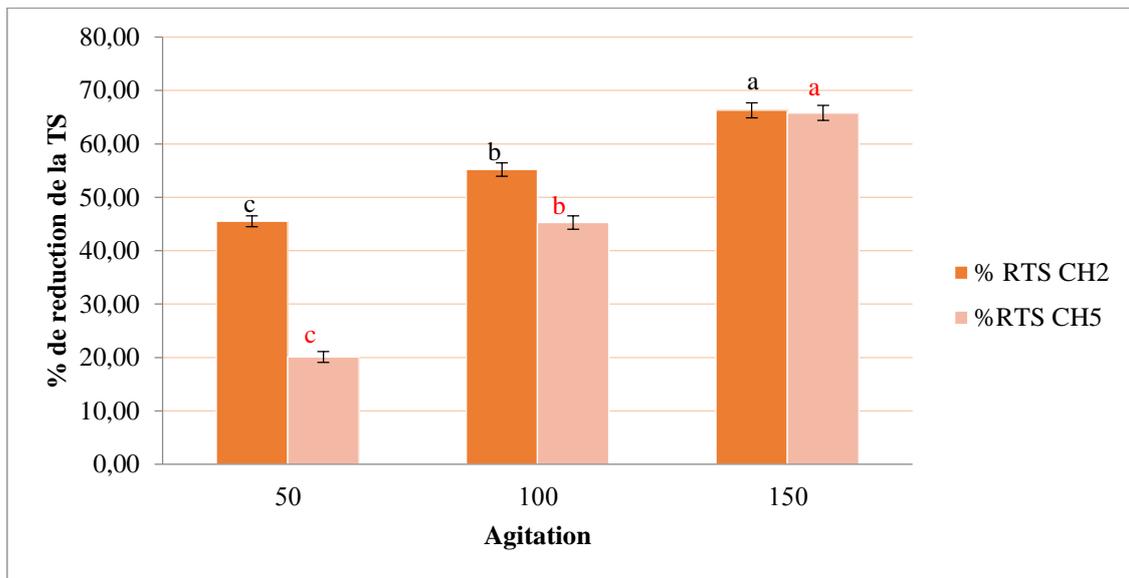
**Figure 29.** Effet du pH du milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : NaCl (250 g/l), agitation de (120 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : NaCl (250 g/l), agitation de (120 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre le rendement des différentes valeurs de pH ( $p < 0.05$ ).

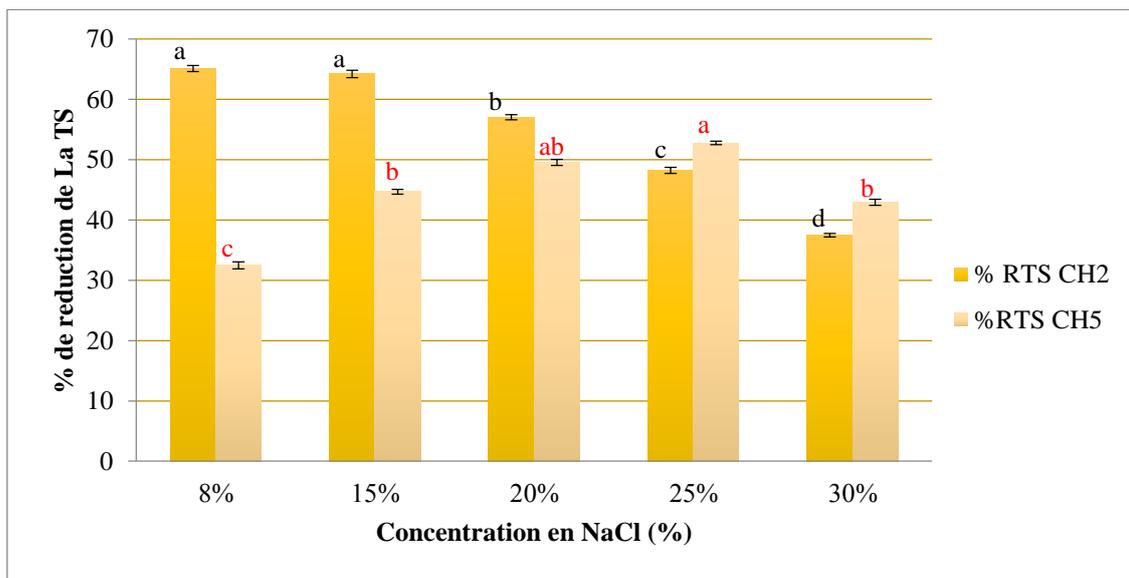


**Figure 30.** Effet de la température d'incubation sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

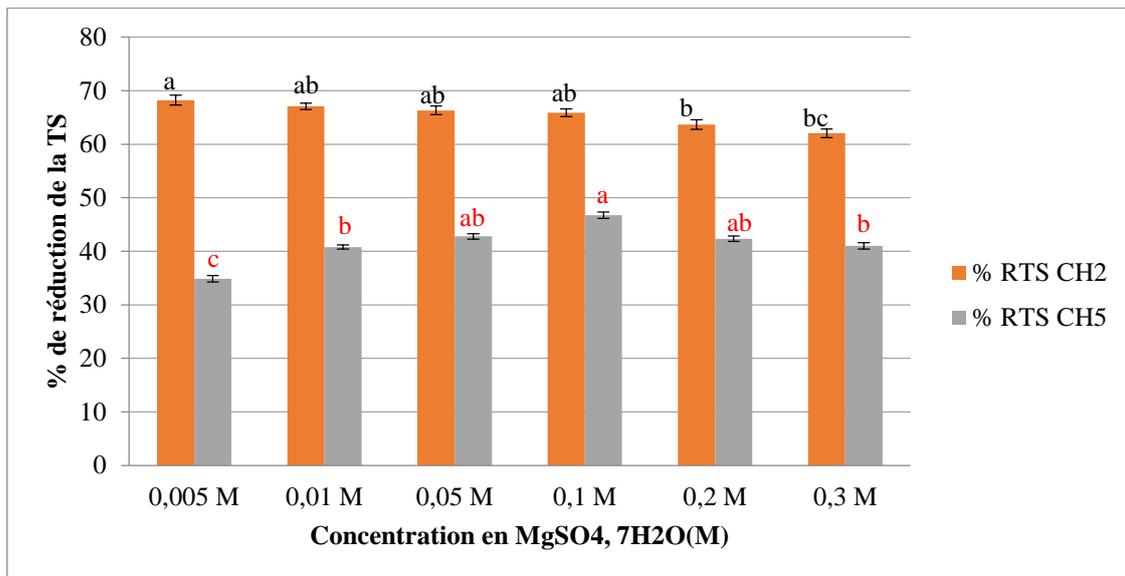
Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : pH (7), agitation de (120 rpm) et NaCl (250 g/l) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : pH (7.5), agitation de (120 rpm) et NaCl (250 g/l) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre le rendement des différentes valeurs de T° ( $p < 0.05$ ).



**Figure 31.** Effet de l'agitation sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : pH (7), T (37°C) et NaCl (250 g/l) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : pH (7.5), T (45°C) et NaCl (250 g/l) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre le rendement des différentes valeurs d'agitation ( $p < 0.05$ ).

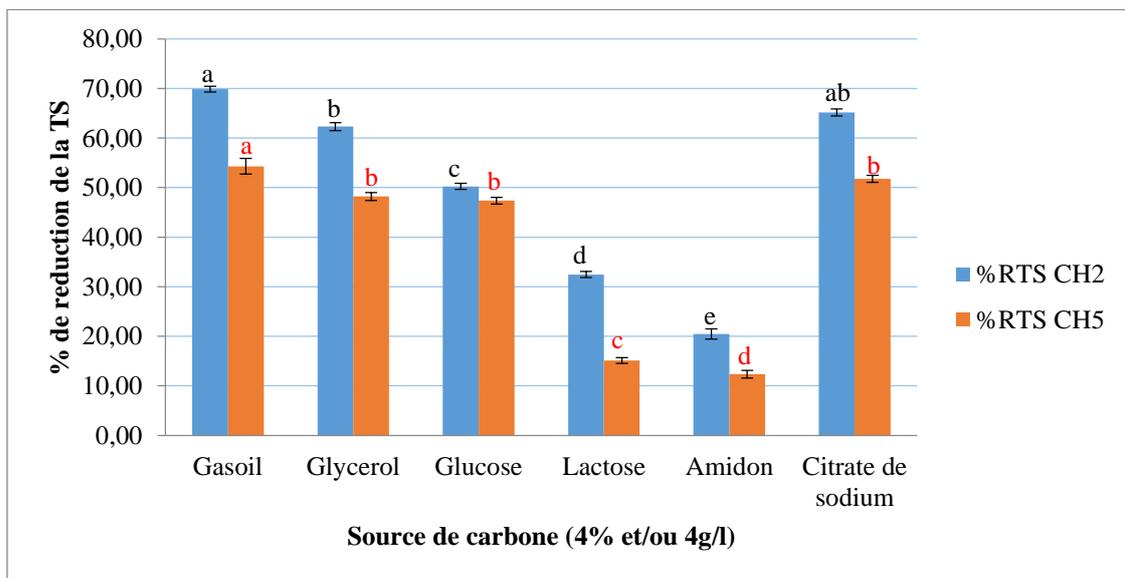


**Figure 32.** Effet des différentes concentrations en NaCl (%), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : pH (7), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre le rendement des différentes concentrations en NaCl ( $p < 0.05$ ).



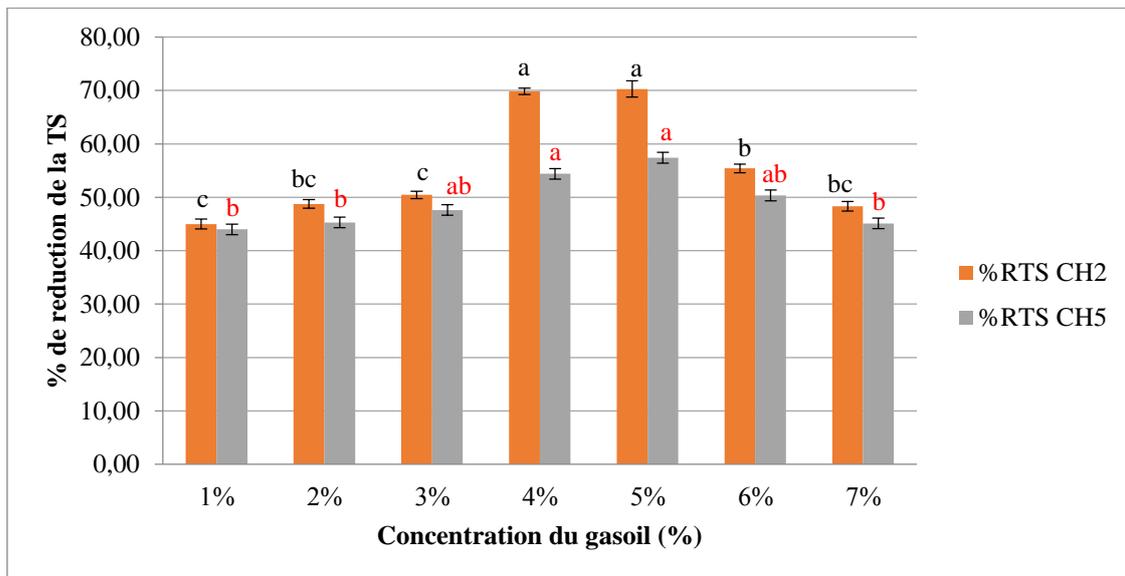
**Figure 33.** Effet des différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (M), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : NaCl (8%), pH (7), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : NaCl (25%), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre le rendement des différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O ( $p < 0.05$ ).



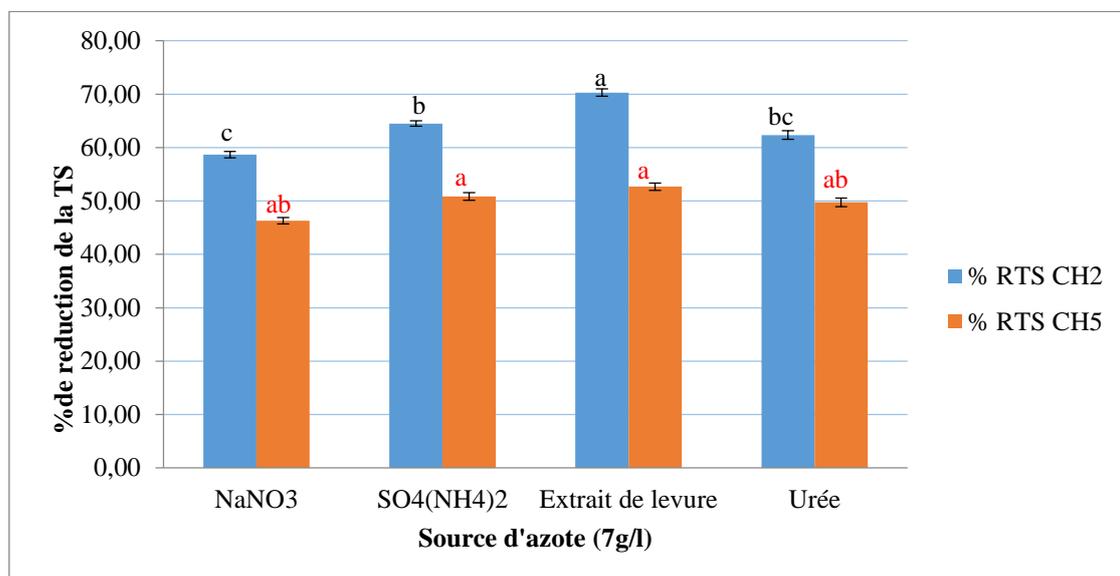
**Figure 34.** Effet des différentes sources de carbone, ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : NaCl (8%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.005 M), pH (7), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : NaCl (25%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.1 M), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre les différentes sources de carbone ( $p < 0.05$ ).



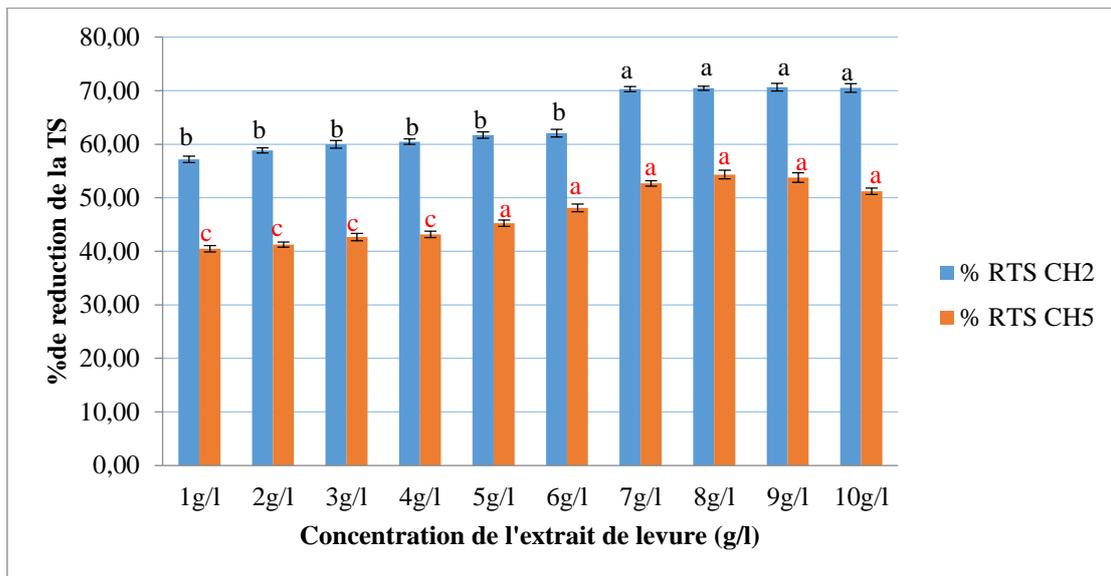
**Figure 35.** Effet des différentes concentrations du gasoil (%), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : NaCl (8%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.005 M), pH (7), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : NaCl (25%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.1 M), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre les différentes concentrations du gasoil ( $p < 0.05$ ).



**Figure 36.** Effet des différentes sources d'azote, ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : gasoil (5%), NaCl (8%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.005 M), pH (7), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : gasoil (5%), NaCl (25%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.1 M), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13 jours d'incubation. Les lettres représentent les différences significatives entre les différentes sources d'azote ( $p < 0.05$ ).



**Figure 37.** Effet des différentes concentrations d'extrait de levure (g/l), ajoutées au milieu de culture SG sur la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Les conditions expérimentales pour l'isolat CH2 sont : gasoil (5%), NaCl (8%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.005 M), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (37°C) pendant 13 jours d'incubation. Les conditions expérimentales pour l'isolat CH5 sont : gasoil (5%), NaCl (25%), MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (0.1 M), pH (7.5), agitation de (150 rpm) et température de (45°C) pendant 13. Les lettres représentent les différences significatives entre les différentes concentrations d'extrait de levure ( $p < 0.05$ ).

Après avoir optimiser les conditions de production des biosurfactants, incluant les facteurs physico-chimiques (température, pH, agitation, NaCl et MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O) et les facteurs nutritionnels (source de carbone et source d'azote) ; une fermentation d'un volume de 1 litre de milieu de culture a été lancée dans des conditions optimisées pour chaque isolat comme il est indiqué dans le [tableau 17](#), dont le but d'atteindre et de récupérer la plus grande quantité possible des biosurfactants. Après 15 jours d'incubation, on a procédé à une extraction des biosurfactants selon le protocole d'extraction mentionné précédemment. L'extrait est récupéré puis concentré avec une évaporation complète. La quantité des biosurfactants qui a été produite par les isolats CH2 et CH5, a été pesée en utilisant la balance analytique. Le rendement optimal est estimé de 17,32 g.l<sup>-1</sup> et de 19,65 g.l<sup>-1</sup> pour les deux isolats respectivement.

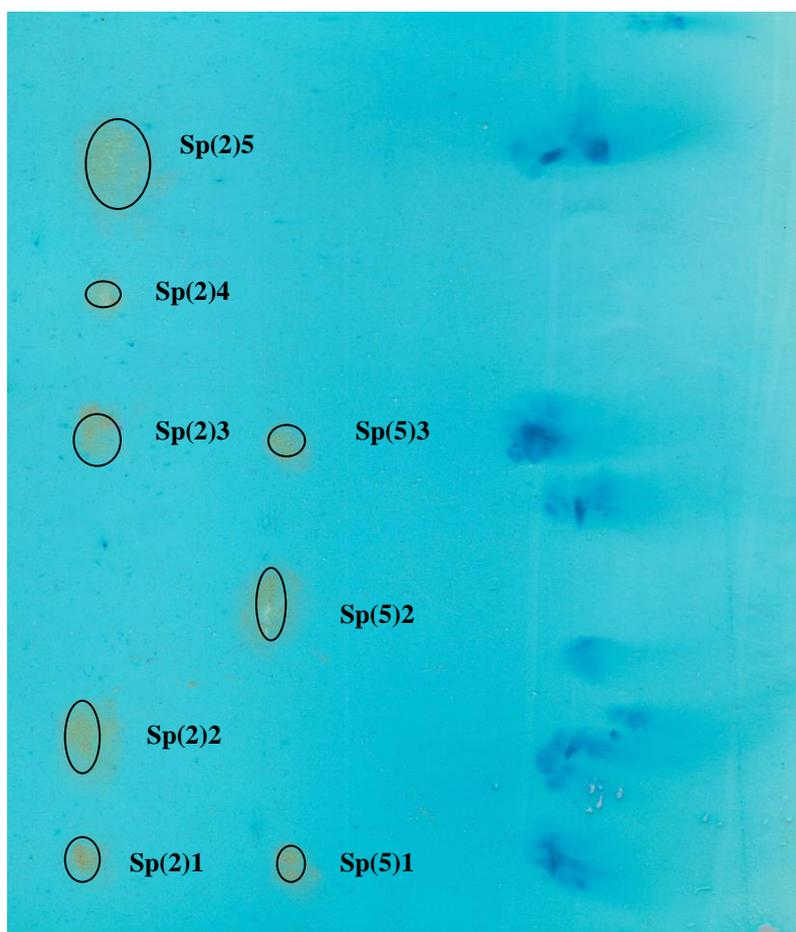
**Tableau 17.** Récapitulatif de l'optimisation de la production des biosurfactants par les isolats CH2 et CH5.

Conditions de la culture	Conditions de culture (Avant optimisation)	Conditions de culture (Après optimisation) CH2	Conditions de culture (Après optimisation) CH5
Sels minéraux	NaCl = 250g/l MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O = 20g/l FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> = 0.0023g/l	NaCl = 80g/l MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O = 0.005M FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O = 0.0023g/l	NaCl = 250g/l MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O = 0.1 M FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O = 0.0023g/l
Source de carbone	Citrate de Na = 3g/l	Gasoil = 5%	Gasoil = 5%
Source d'azote	E.L.= 8.5g/l	E.L. = 8.0 g/l	E.L. = 9g/l
pH	7.2	7.0	7.5
Agitation	120 rpm	150 rpm	150 rpm
Température (°C)	37°C	37°C	45°C
TS	TS <sub>CH2</sub> = 23.7 mN.m <sup>-1</sup> TS <sub>CH5</sub> = 38.1 mN.m <sup>-1</sup>	TS <sub>CH2</sub> = 20. 66±0.1 mN.m <sup>-1</sup>	TS <sub>CH5</sub> = 35.73±0.2 mN.m <sup>-1</sup>
%RTS	%RTS <sub>CH2</sub> = 65.14 % %RTS <sub>CH5</sub> = 43.97 %	%RTS <sub>CH2</sub> = 68.54±0.7 %	%RTS <sub>CH5</sub> = 48.52±0.5 %

E.L. : Extrait de levure. %RTS : Pourcentage de réduction de la tension superficielle. TS : tension superficielle.

#### IV.6. Détermination de la nature des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5

Après migration des biosurfactants et révélation, en utilisant des révélateurs spécifiques (Cf. matériels et méthodes) pour la détermination des groupements fonctionnelles des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres et des acides organiques. Le révélateur à base de vert de bromocrésol, a donné des spots bien déterminés sur la plaque de CCM (Figure 38), montrant de ce fait, que ces biosurfactants sont constitués essentiellement de lipides neutres ou des acides organique et que les biosurfactants produits par CH2 sont constitués de cinq composés différents alors que CH5 sont constitués de trois. Les valeurs des Rf des spots révélés (Tableau 18) a indiqué que les deux biosurfactants, ont deux composés lipidiques similaires dont les Rf sont : Sp(2)1= Sp(5)1=0.16 et Sp(2)3= Sp(5)3=0.65.



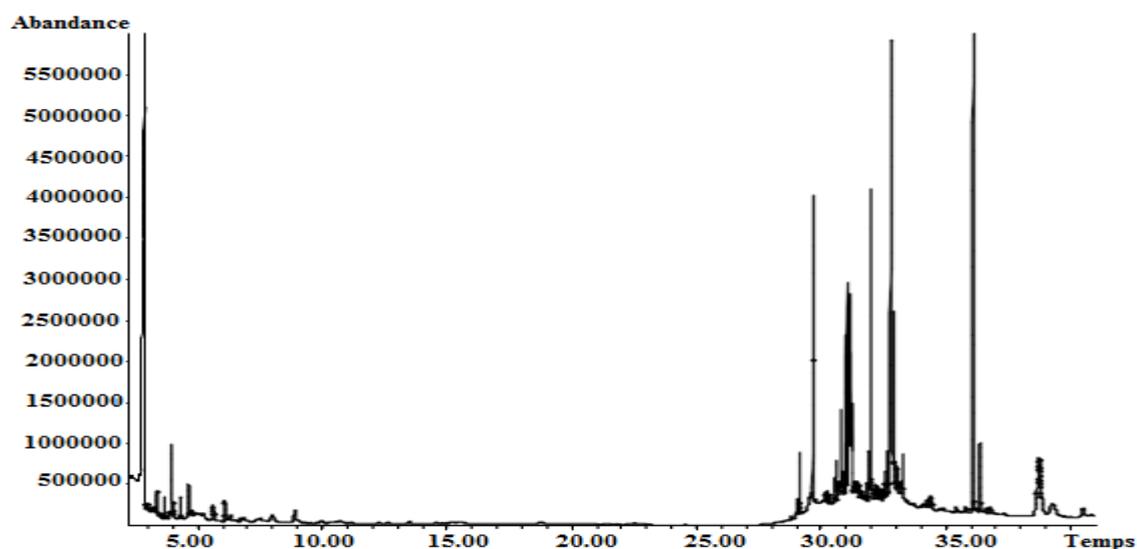
**Figure 38.** Chromatogramme présentant la détermination préliminaire de la nature biochimique des biosurfactants produits par les deux isolats CH2 et CH5.

La migration est faite par le système solvant : chloroforme/méthanol/ eau (80 :15 :2, v/v/v). Le réactif 4 à base de vert de bromocrésol pour la détermination des lipides et des acides organiques est utilisé pour la révélation de la plaque.

**Tableau 18.** Valeurs des Rf obtenues après révélation des plaques de CCM par le vert de bromocrésol.

	CH2					CH5		
	Sp(2)1	Sp(2)2	Sp(2)3	Sp(2)4	Sp(2)5	Sp(5)1	Sp(5)2	Sp(5)3
Rf	0.16	0.29	0.65	0.80	0.95	0.16	0.45	0.65

Pour confirmer ces résultats, les extraits des biosurfactants ont subi une caractérisation approfondie, menant sur la détermination structurale de la composition biochimique de ces biomolécules, par la GC-MS. Les résultats obtenus sont mentionnés dans les [tableaux 19](#) et [20](#) ; ces informations sont tirés à partir des chromatogrammes de la [figure 39](#) pour l'isolat CH2 et de la [figure 42](#) pour l'isolat CH5.

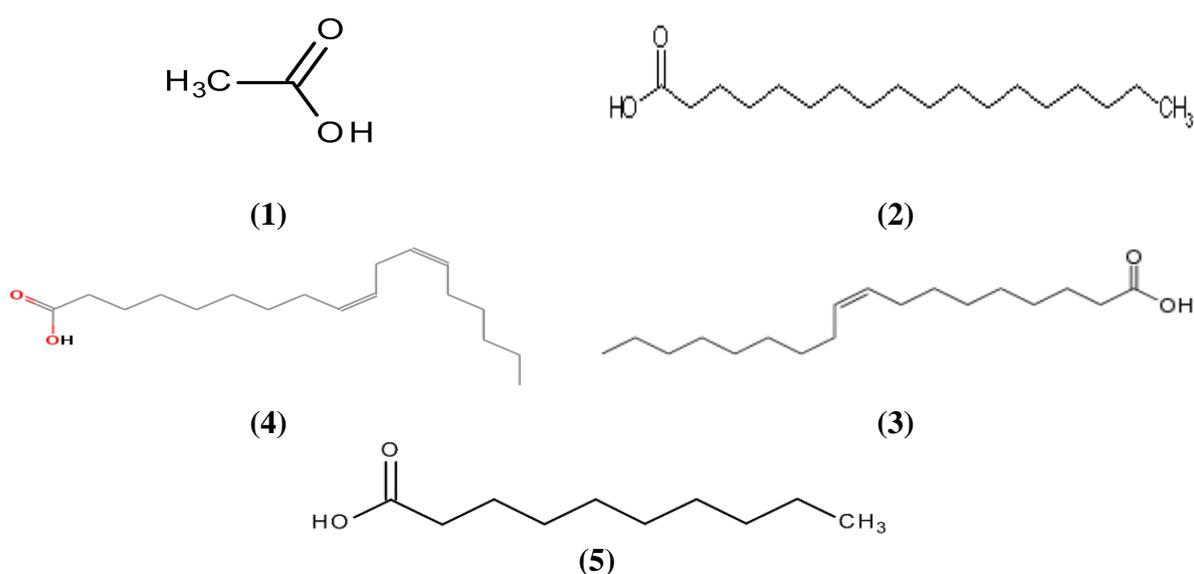


**Figure 39.** Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par l'isolat CH2.

**Tableau 19.** Composition des biosurfactants produits par CH2.

O.P.	T.R.	P (%)	Composés	PM (g/mol)	N.S
1	02.89	20.19%	<b>Acide éthanoïque (Acide acétique)</b>	60,052	(1)
66	31.98	03.93%	<b>Acide Héxadécanoïque (acide palmitique)</b>	256,42	(2)
73	32.81	12.77%	<b>Acide cis-9-octadécamonoénoïque (acide oléique)</b>	282,46	(3)
74	32.90	02.73%	<b>Acide octadécanoïque (acide stéarique)</b>	284,47	(4)
84	36.09	09.82%	<b>Acide décandéioïque (acide caprique)</b>	172,26	(5)

**O.P. :** Ordre des pics. **T.R. :** Temps de rétention. **P (%) :** Pourcentage du composé. **PM :** Poids moléculaire. **N.S :** Numéro de structure .

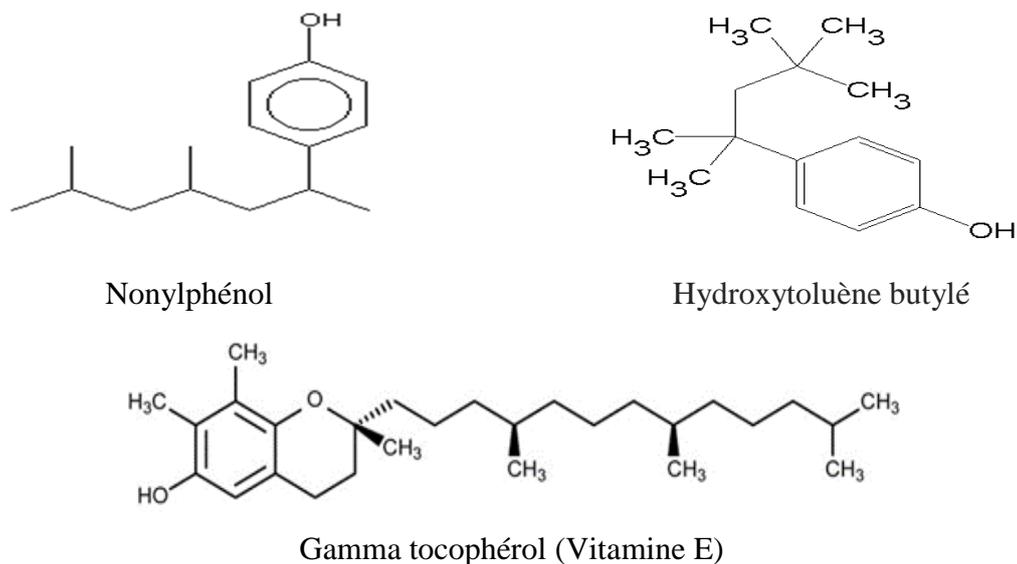


**Figure 40.** Structures des composés majeurs des biosurfactants produits par l'isolat CH2.

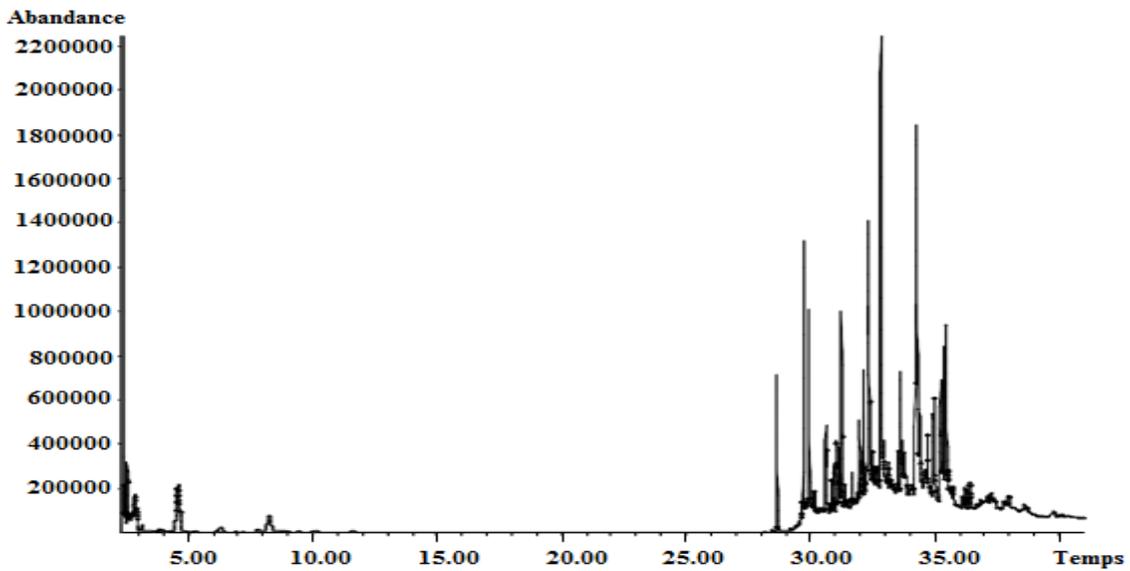
D'après le [tableau 19](#), on peut constater que les biosurfactants produits par l'isolat CH2 sont constitués d'un mélange d'acides gras saturés et insaturés qui sont : l'acide oléique C<sub>18:1</sub>, l'acide palmitique C<sub>16:0</sub>, l'acide stéarique C<sub>18:0</sub>, l'acide caprique C<sub>10:0</sub> et dont l'acide gras majoritaire est l'acide acétique avec une proportion de 20.19 % ; il s'agit d'un acide gras à courte chaîne C<sub>1:0</sub> ([Papillon, 1999](#)). Les structures de ces acides gras sont illustrées dans la [figure 40](#). En effet, l'acide stéarique est utilisé comme un émulsifiant et stabilisant en industrie agro-alimentaire E570 ( ou stéarate de magnésium E5720), l'acide oléique C<sub>18:1</sub> est utilisé pour la fabrication des savonnettes.

En plus, l'isolat CH2 est capable de produire le gamma tocophérol ; une structure parmi les huit structures naturelles de la vitamine E ([Figure 41](#)), ce qui est considéré comme une propriété supplémentaire de l'isolat CH2, qui devra être prise en considération pour l'exploiter ultérieurement, dans d'autres travaux de recherches. En effet, en industrie agro-alimentaire, les tocophérols sont autorisés à titre d'additif alimentaire (antioxydants), qu'ils soient naturels ou synthétiques. On les utilise également en pharmacotechnie pour les mêmes propriétés, souvent en synergie avec l'acide ascorbique ([Marouf and Tremblin, 2009](#)).

D'autres constituants mineurs sont aussi détectés par la chromatographie en phase gazeuse, après avoir analysé les pics du chromatogramme, on trouve les composés phénoliques ([Figure 41](#)) dont les plus importants sont le Nonylphénol (NP) (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O), qui est synthétisé pour leurs propriétés tensioactives et le hydroxytoluène butylé (BHT) (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O), qui est utilisé comme un additif alimentaire stabilisateur (E321).



**Figure 41.** Structures de quelques composés mineurs d'importance détectés dans les extraits des biosurfactants produits par l'isolat CH2.

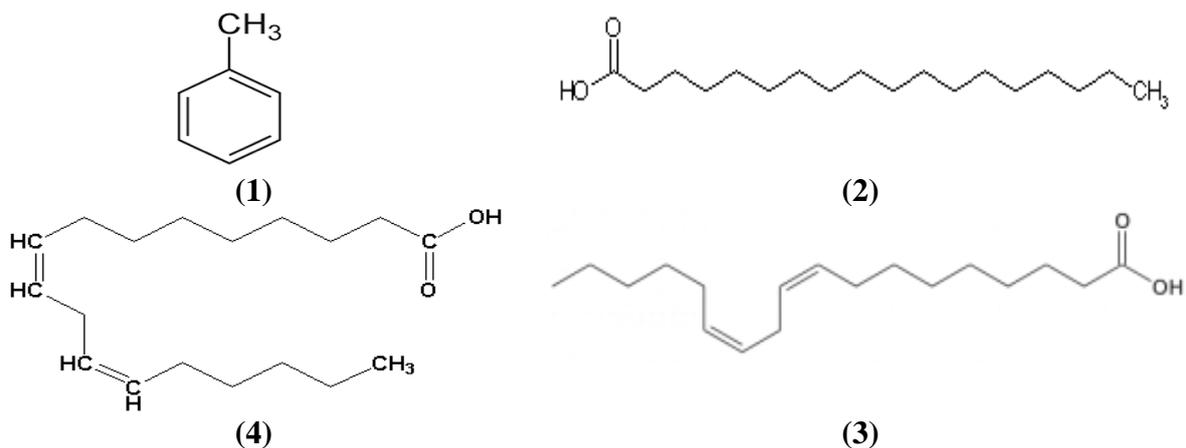


**Figure 42.** Chromatogramme de l'analyse au GC-MS pour déterminer les constituants des biosurfactants produits par l'isolat CH5.

**Tableau 20.** Composition des biosurfactants produits par CH5.

O.P.	T.R.	P (%)	Composés	PM (g/mol)	N.S
1	2.32	50.17%	<b>Toluène (benzène méthyle)</b>	92,14	(1)
32	31.93	1.662%	<b>Acide palmitique</b>	256,42	(2)
43	32.77	16.52%	<b>Acide linoléique</b>	280,44	(3)
44	32.88	1.044%	<b>Acide stéarique</b>	284,47	(4)

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



**Figure 43.** Structures des composés majeurs des biosurfactants produits par l'isolat CH5.

D'après le [tableau 20](#), on peut constater que les biosurfactants produits par l'isolat CH5 sont constitués d'un mélange de trois acides gras qui sont : l'acide linoléique C<sub>18:1</sub>, l'acide palmitique C<sub>16:0</sub> et l'acide stéarique C<sub>18:0</sub> avec les proportions suivantes : (16.52% ; 1.66 et 1.04

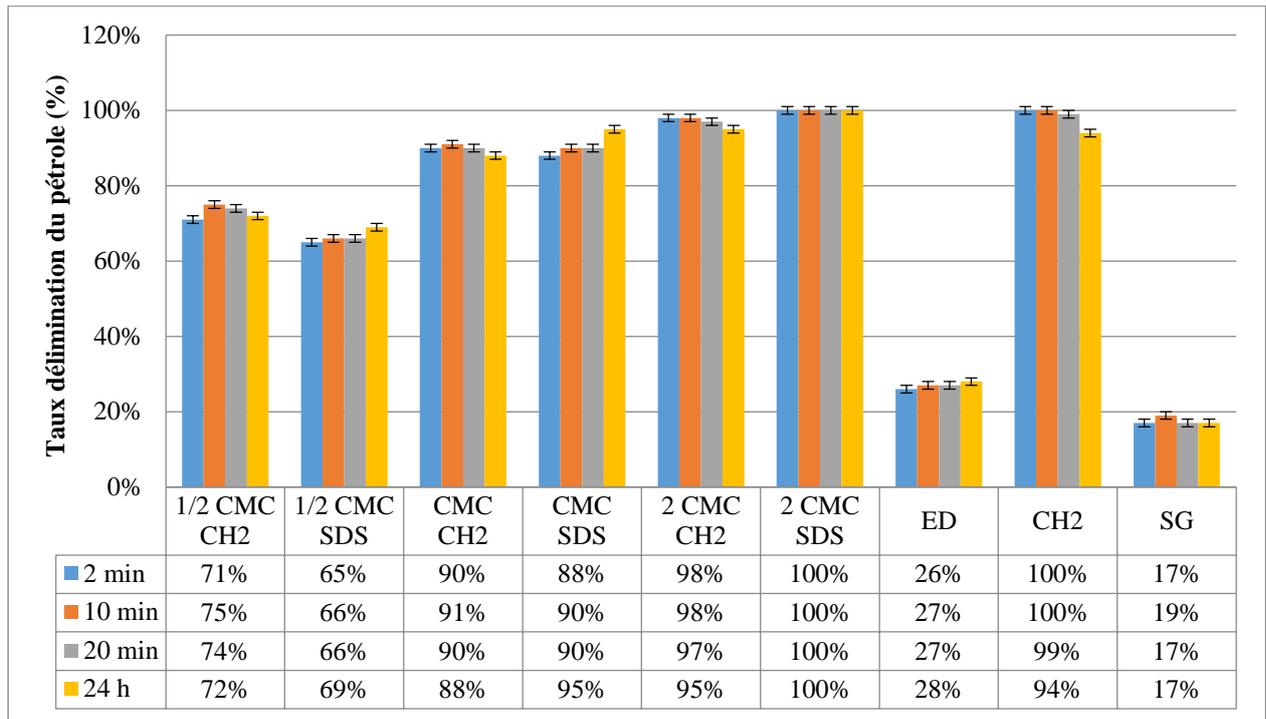
et le toluène comme un composé majoritaire avec une proportion de 50.17 % , ce qui confère à la culture une odeur particulière ; les structures de ces composés sont présentés dans la [figure 43](#).

En effet, les acides gras à longues chaînes hydroxylés sont utilisés comme des tensioactifs qui ont un fort potentiel économique puisque, les agros-tensioactifs, issus de matières premières renouvelables, jouissent d'une très bonne image auprès du grand public, due à la fois à leur faible écotoxicité et à leur faible innocuité pour la santé humaine ([Vandeputte, 2012](#)). Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et des phospholipides comme agents tensio-actifs au cours de leur croissance sur les n-alcanes, comme par exemple *Acenitobacter spp* est capable de produire des vésicules de phosphatidyl éthanolamine et de former des microémulsions optiquement limpides d'alcanes dans l'eau. Ces biosurfactants sont essentielles pour des applications médicales ([Alizadeh and Choobari, 2013](#)).

L'analyse des extraits des biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, en utilisant la GC-MS, a montré que ces biosurfactants sont les acides gras suivants : l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide caprique et dont l'acide gras majoritaire est l'acide acétique pour l'isolat CH2 et l'acide linoléique, l'acide palmitique et l'acide stéarique pour l'isolat CH5.

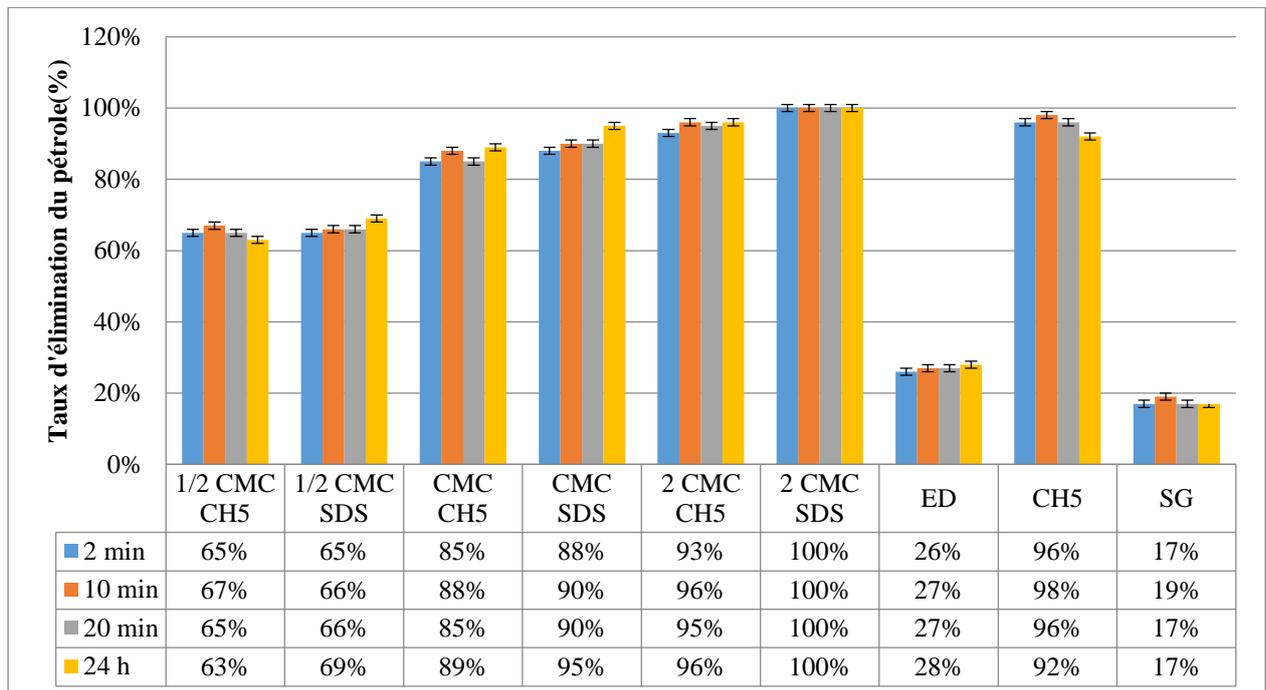
#### **IV.7. Application des biosurfactants dans l'élimination du pétrole adsorbé par le sable**

Mis à part les applications industrielles envisagées des biosurfactants, leur application dans l'industrie pétrolière est l'une des utilisations potentielles qui exigent moins de spécificité de purification, de telle sorte que tout le bouillon cellulaire pourrait être utilisé, ce qui élimine l'étape de purification qui représente près de 60% des coûts de production totaux ([Silva et al., 2014](#)). Les résultats obtenus de l'expérience, où on a testé l'efficacité des biosurfactants à différentes concentrations) et le moûts de fermentation à éliminer le pétrole adsorbé dans le sable à différentes périodes de contact avec le biosurfactant, sont mentionnés dans les [figures 44 et 45](#).



**Figure 44.** Taux d'élimination du pétrole sous l'action de solutions de biosurfactant produit par l'isolat CH2.

( $CMC_{CH2}=280$  mg/l,  $CMC_{SDS}= 2100$  mg/l, **ED** : Eau distillée, **SG** : milieu de culture Sehgal and Gibbons stérile)



**Figure 45.** Taux d'élimination du pétrole sous l'action de solutions de biosurfactant produit par l'isolat CH5.

( $CMC_{CH5}=80$  mg/l,  $CMC_{SDS}= 2100$  mg/l, **ED** : Eau distillée, **SG** : milieu de culture Sehgal and Gibbons stérile)

Les biosurfactants peuvent émulsionner les hydrocarbures améliorant leur solubilité dans l'eau, ce qui diminue la tension superficielle en augmentant le déplacement du pétrole à partir des particules des sols (Batista *et al.*, 2010).

#### **IV.7.1. Comparaison de l'efficacité de l'élimination du pétrole des sables contaminés par les biosurfactants et les surfactants chimiques**

Afin de valider l'efficacité des tensioactifs d'origine biologique, il est nécessaire de comparer les rendements obtenus à ceux de leurs homologues chimiques.

Selon des études précédentes, utilisant des tensioactifs de différentes origines ont montré que la comparaison entre ces études est difficile, du fait d'une grande diversité des conditions opératoires utilisées (types des sols et des polluants, conditions d'extraction, nature des surfactants, etc.) néanmoins, les études de laboratoire semblent montrer les bonnes « prédispositions » des biosurfactants pour la dépollution. En effet, ces derniers possèdent des efficacités comparables voire supérieures à leurs homologues chimiques. Ceci est associé à leurs propriétés non agressives envers l'environnement laisse entrevoir un fort potentiel d'utilisation de ces tensioactifs pour la bioremédiation des sols contaminés (Gabet, 2004).

#### **IV.7.2. Influence du temps de contact sur l'efficacité de l'élimination du pétrole des sables contaminés**

Le temps de contact entre le sable contaminé et les biosurfactants, est également un paramètre important qui affecte l'efficacité d'élimination du pétrole, ce temps de contact est suffisant et nécessaire pour l'élimination efficace des polluants. Dans cette étude, nous avons étudié l'efficacité de l'élimination du pétrole à 5, 10, 20 et 1440 min, comme il est indiqué dans les figures 44 et 45. Quelque soit le type et la concentration des biosurfactants, une augmentation du temps de contact de 5 à 1440 min ; en général, conduit à une efficacité similaire d'élimination du pétrole ou légèrement basse, ces résultats indiquent que le temps de contact 5 à 10 min sous agitation semblait être suffisant pour l'élimination du pétrole par les biosurfactants appliqués. Lai et al., (2009) ont testé l'efficacité d'élimination des polluants par les rhamnolipides et les surfactines pendant 7 jours, montrant qu'un jour de contact était suffisant pour la solubilisation des hydrocarbures.

#### **IV.7.3. Comparaison de l'efficacité du moût de fermentation (présence des cellules bactériennes) et les différentes concentrations des biosurfactants**

Les résultats obtenus pour l'élimination du pétrole adsorbé dans le sable testé par le moût de fermentation des CH2 et CH5, et du milieu de culture SG stérile (témoins) a montré le retrait de 100% , 98% et de 19 % du pétrole, respectivement. Une fois que les tests des extraits des biosurfactants sont effectués, les résultats ont été jugés aussi satisfaisants. Les moûts des fermentations et les biosurfactants produits par CH2 et CH5 étaient capables d'enlever le pétrole des sables contaminés (les figures 44 et 45). L'élimination du pétrole par les biosurfactants isolés, variait selon la concentration employée. Les moûts des fermentations et les biosurfactants isolés à deux fois sa CMC sont presque également efficaces pour l'élimination du polluant qui

est le pétrole dans ce cas (environ 100%). Ainsi, le moût de fermentation acellulaire peut être directement utilisés, ce qui réduit le cout de production des biosurfactants.

Des études menées par [Urum et al., \(2003\)](#) ont démontré que la mobilisation ou la solubilisation des composés hydrophobes par des agents tensioactifs peuvent ou non varier en fonction des concentrations utilisées. La performance de l'eau dans l'élimination du pétrole est non négligeable, comme il est indiqué dans [les figures 44 et 45](#). [Khalladi et al., \(2009\)](#), d'autre part, a montré que c'est l'application de l'eau dans l'élimination des carburants diesel a été jugée non négligeable, tandis que l'eau a contribué de 24.7% dans l'élimination des n-alcane. Des concentrations élevées (2.5 et 5.0 g/l) d'un biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ, étaient nécessaires (CMC 400 mg/l) pour éliminer 70% du pyrène adsorbé dans le sol ([Bordas et al., 2007](#)).

Des résultats prometteurs ont été obtenus par les biosurfactants produits à partir d'espèces de *Candida*. [Batista et al., \(2010\)](#), pour le bouillon exempt des cellules contenant un biosurfactant produit par *C.tropicalis*, a montré un pourcentage de récupération de 80% du pétrole adsorbé dans le sable et [Coimbra et al., \(2009\)](#), pour les biosurfactants produits par *C.guilliermondii* et *C.lipolytica* ont montré une capacité élevée d'enlever l'huile de moteur et le pétrole adsorbés dans les sables. Les résultats décrits dans la littérature ont montré que les biosurfactants produits par *C.sphaerica* cultivé dans un milieu à faible coût, retirent 65% de l'huile de moteur adsorbé dans le sable de la plage ([Sorbinho et al., 2008](#)).

Les biosurfactants affectent le processus de biodégradation en augmentant la solubilité et la dispersion des contaminants de deux manières à savoir, l'augmentation de la surface entre l'eau et le substrat hydrophobe, ou en augmentant la biodisponibilité des substrats insolubles hydrophobes dans l'eau ([Franzetti et al., 2010](#)).

L'un des principaux facteurs qui influent l'efficacité de la biodégradation des composés complexes huileux, c'est la faible disponibilité des contaminants biodégradables par les microorganismes ([Abalos et al., 2004](#)).

Une alternative pour élargir la biodisponibilité et le métabolisme des contaminants c'est d'augmenter la solubilité des substrats par l'utilisation des biosurfactants. Dans le traitement des zones contaminées par des composés complexes, qui sont difficiles à dégrader, il est à la fois économique et environnementalement intéressant d'utiliser des microorganismes autochtones qui devraient présenter une capacité de dégradation conjointement avec la production des biosurfactants ([Cameotra and Singh, 2008](#)).

Des études ont montré que la texture et la taille des particules des sols ont influencé l'action des biosurfactants, étant donné que les pourcentages d'élimination sont différents par rapport aux trois échantillons de sable. Dans ce contexte, l'élimination plus élevée a été observée

dans le limon et dans les sols sableux, le sol argileux, a une perméabilité inférieure, due à la formation des macro-pores entre les grains des sables, à travers lesquels l'eau et l'air circulent plus facilement, comme cela arrive avec les sols sableux (Amani, 2015).

Les biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, ont un potentiel d'application dans la remédiation des sables contaminés par le pétrole, compte tenu le pourcentage de l'élimination des polluants dans différentes conditions. Il est important de noter que les meilleurs résultats ont été obtenus avec les moûts de fermentations (100%) qui présentent une réduction considérable des coûts de la production de ces composés ; de même pour les extraits des biosurfactants à deux fois sa CMC, ce qui augmente les chances d'une prometteuse application industrielle.

#### IV.8. Etude taxonomique des isolats producteurs des biosurfactants

Les deux isolats halophiles extrêmes fortement actifs, notés CH2 et CH5, ont fait l'objet d'une étude taxonomique polyphasique sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires (analyse de l'ADNr16S).

##### IV.8.1. Caractères morphologiques

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des isolats CH2 et CH5, sont rapportées dans le [tableau 21](#).

**Tableau 21.** Caractères morphologiques et culturels des deux isolats étudiés.

	Caractères	CH2	CH5
Macroscopiques	Forme de la colonie	Ronde	Ronde
	Relief de la colonie	Bombée	Bombée
	Taille de la colonie	Grande	Petite
	Contour de la colonie	Régulier	Régulier
	Couleur de la colonie	Blanchâtre	Translucide à orange pâle
	Consistance de la colonie	Muqueuse	Crémeuse
	Croissance en milieu liquide	Trouble	Sédiment
	Odeur	±	+
Microscopiques	Forme de la cellule	Coccobacille	Bacille
	Réaction de Gram	-	-
	Arrangement cellulaire	Cellules dispersées	Cellules dispersées
	Mobilité	+	+

+ : caractère présent, - : caractère absent, ± : plus ou moins présent.

L'observation macroscopique des colonies des deux isolats CH2 et CH5 montre qu'elles ont une forme ronde avec un contour régulier, de couleur blanchâtre pour l'isolat CH2 et translucide à orange pâle pour l'isolat CH5 ; l'élévation est bombée avec un diamètre supérieur à 1mm pour CH2 et inférieur à 1mm pour CH5. Par ailleurs, les deux isolats ont quelques caractères différents. En effet, l'isolat CH2 a une consistance muqueuse, alors que l'isolat CH5 a une consistance crémeuse, avec une odeur plus importante chez CH5 que chez CH2.

L'observation microscopique a été réalisée suivant deux étapes : à l'état frais et après coloration de Gram. D'après nos observations il ressort que les deux bactéries sont mobiles à Gram négatif ; les cellules de CH2 sont sous forme de cocci dispersées alors que les cellules de CH5 sont des bacilles.

#### IV.8.2. Caractères physiologiques des isolats CH2 et CH5

Les deux isolats étudiés sont exposés aux variations de concentration de NaCl et MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O et à différentes valeurs de température et de pH, afin de déterminer les valeurs optimales correspondant aux taux maximum de croissance. En effet, la cinétique de croissance des deux bactéries a été suivie pendant 15 jours d'incubation, le taux de croissance est estimé en mesurant le densité optique des suspensions bactériennes à 600 nm à des intervalles de temps de 3jours. Des courbes de croissances ont été tracées, en fonction des variations des paramètres physico-chimiques de croissance. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le [tableau 22](#).

**Tableau 22.** Caractères physiologiques des deux isolats étudiés.

Caractères	CH2	CH5
Exigence en NaCl (%)	8% - 25%	8% - 32%
	<b>Opt :8%</b>	<b>Opt :25%</b>
Exigence en MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O (M)	0.005M - 0.2M	0.05M -0.3M
	<b>Opt :0.005M</b>	<b>Opt :0.1M</b>
Tolérance à la température (°C)	25°C-45°C	25°C-50°C
	<b>Opt :37°C</b>	<b>Opt :45°C</b>
Tolérance au pH	5-9	5-9
	<b>Opt :7</b>	<b>Opt :7</b>

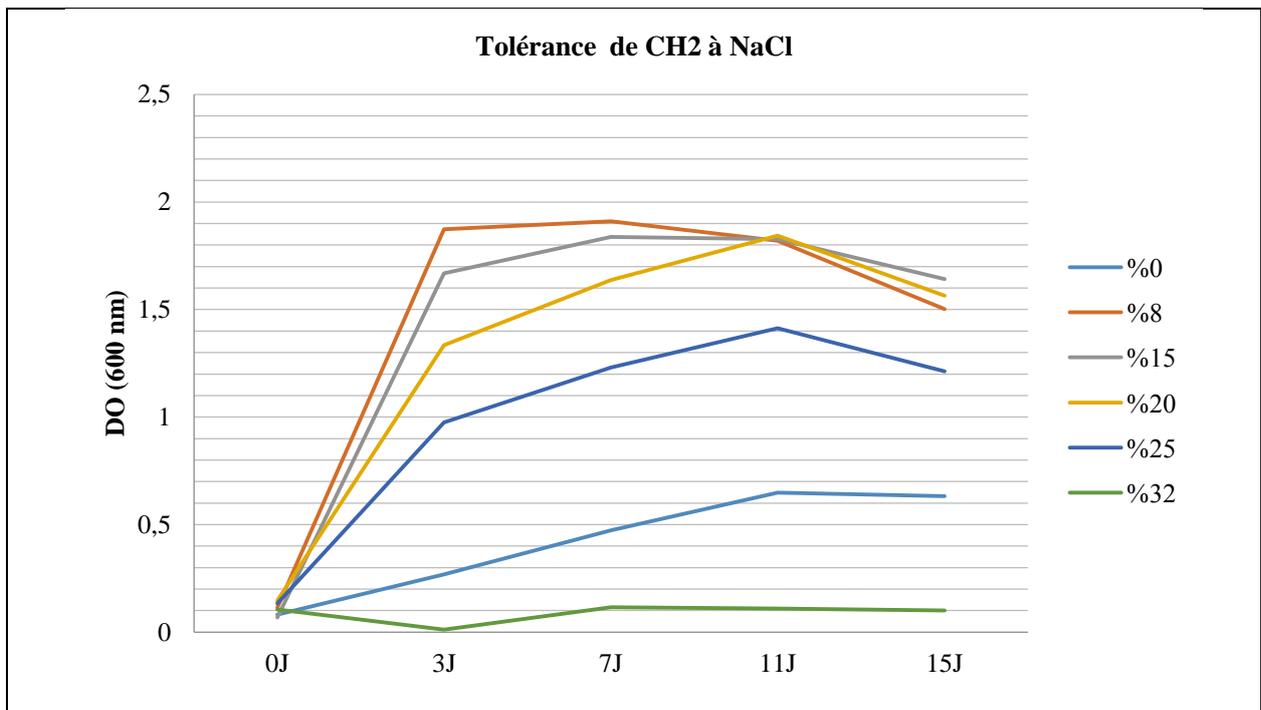
##### IV.8. 2.1. Tolérance à NaCl

Bien que les sels soient nécessaires pour toutes formes de vie, les exigences que manifestent les microorganismes vis-à-vis de la concentration en chlorure de sodium ; conduit à la distinction d'un certain nombre de catégories : les halophiles faibles qui ne supportent pas les écarts de concentrations salines et ne se développent pas qu'entre des limites rapprochées (croissance optimale entre 0.2 à 0.85 M soit 1-5 % de chlorure de sodium). A l'opposé, il existe des germes pour lesquels la croissance n'est possible qu'à de fortes concentrations salines : il s'agit des halophiles extrêmes qui poussent de façon optimale à 3.4 - 5.1 M (20 - 30%) de NaCl.

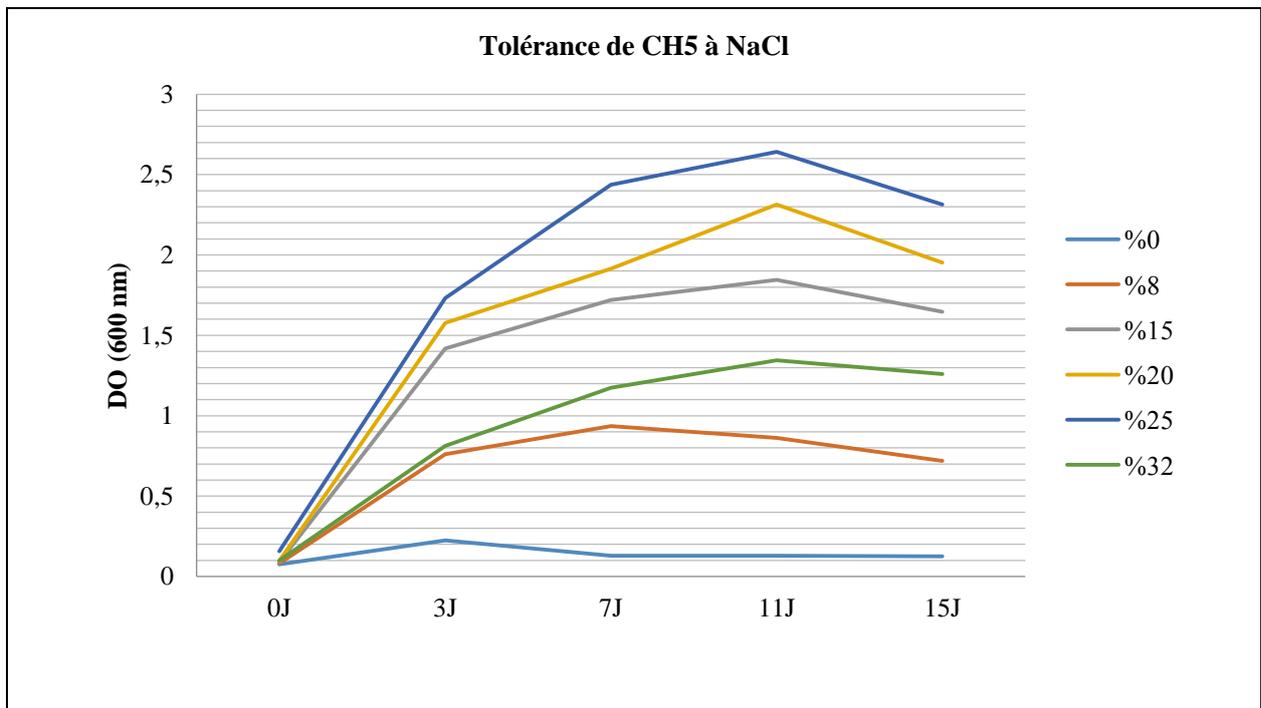
Enfin, un groupe important est constitué de germes halophiles modérés, ou indifférents, halophiles préférentiels, halotolérants ou halorésistants, avec une croissance optimale à 0.85 jusqu'à 3.4 M (5-20 %) de NaCl. En revanche, les non halophiles croissent de manière optimale en moins de 0.2 M de NaCl. En dépit des microorganismes halotolérants qui peuvent se développer dans les deux conditions (en absence de sels qu'en présence de fortes concentrations) ([DasSarma and DasSarma, 2012](#)).

D'après les résultats obtenus du test de l'estimation des concentrations en sels nécessaires pour la croissance des isolats, nous avons constaté que l'isolat CH2 a pu se développer dans une gamme de salinité, allant de 8 à 25 % de NaCl, avec un optimum de 8% (Figure 46) ce qui nous amène à considérer l'isolat CH2 comme étant une bactérie halotolérante, alors que l'isolat CH5 comme une bactérie halophile extrême, puisque, comme pour tous les membres de la famille des *Halobacteriaceae*, cet isolat nécessite des concentrations élevées en sels pour leur croissance et pour la stabilisation de leurs cellules (Oren, 2012), avec une salinité allant de 8-32% et un optimum de croissance à 25% (Figure 47).

Parmi les 110 souches d'*Haloarchaea*, validées et publiées, aucune espèce n'a un optimum de croissance en NaCl moins de 2 M ; un contraste frappant 30 % des souches publiées (Bowers et al., 2009). Environ 40% de ces souches, ont un optimum de croissance égale ou supérieur à 2 M (20% de NaCl), mais moins de 3.4 M (20% de NaCl). Environ 36% des espèces, ont un optimum de croissance supérieur ou égale à 3.4M et inférieure à 4.0 M (environ 24% p/v NaCl), et environ 22% (23 espèces) ont un optimum de croissance égale ou supérieure à 4 M. En outre, environ 60% (64 espèces) tolèrent plus de 5.0M (29% de NaCl), dont huit espèces tolèrent des concentrations de saturation, à savoir 5.5 à 6.5M (DasSarma and DasSarma, 2012).



**Figure 46.** Cinétique de croissance de l'isolat CH2 pendant 15 jours d'incubation sur le milieu SG à différentes concentrations en NaCl.



**Figure 47.** Cinétique de croissance de l'isolat CH5 pendant 15 jours d'incubation sur le milieu SG à différentes concentrations en NaCl.

### IV.8. 2.2. Tolérance au $Mg^{2+}$

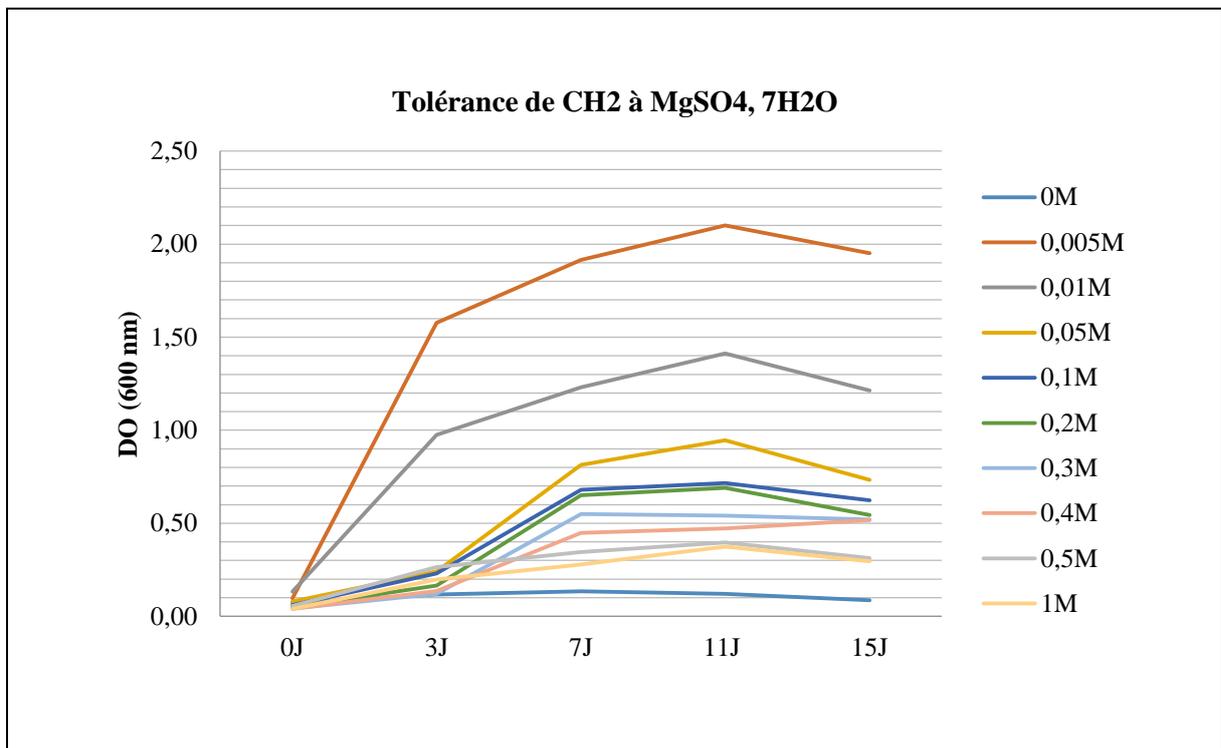
Les résultats obtenus de l'estimation des concentrations nécessaires en  $Mg^{2+}$  pour la croissance des deux isolats à identifier CH2 et CH5, sont représentés sous forme des courbes de croissance dans les figures 48 et 49, respectivement.

D'après les résultats obtenus par le suivi de la cinétique de croissance avec différentes concentrations des ions  $Mg^{2+}$  sous forme de complexe  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  dans le milieu de culture, nous avons constaté que les deux isolats CH2 et CH5 marquent un taux de croissance trop faible en absence des ions  $Mg^{2+}$ , ce qui signifie qu'elles exigent la présence de ces ions pour leur croissance.

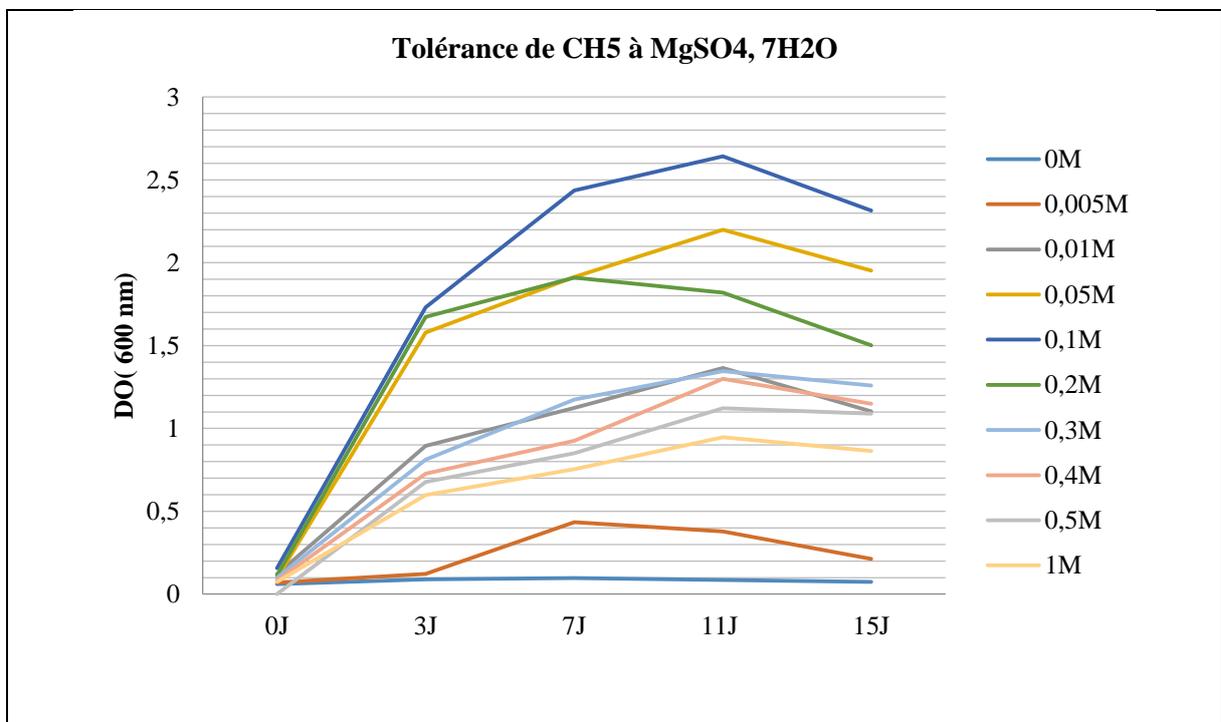
L'isolat CH2 peut croître dans un milieu où la concentration en  $Mg^{2+}$  est comprise entre 0.005 et 0.2 M, avec un optimum de croissance à 0.005 M, cela veut dire que la bactérie ne nécessite pas des concentrations élevées en  $Mg^{2+}$ . Par contre, à des faibles concentrations (0.005 jusqu'à 0.05 M), ainsi qu'à des fortes concentrations (0.3 à 0.5M) la souche bactérienne CH5 marque des taux de croissance plus ou moins faibles, donc elle exige des concentrations modérées puisque son optimum de croissance est marqué à 0.1 M de  $Mg^{2+}$  (Figures 48 , 49).

L'exigence en sel, notamment le  $Mg^{2+}$ , est largement répondu chez les microorganismes halophiles et halotolérants. Bien que le  $Mg^{2+}$ , est un composant commun des milieux de culture en microbiologie. Les *Haloarchaea* exigent des concentrations élevées en  $Mg^{2+}$  pour leur croissance. Cependant, les concentrations élevées en  $Mg^{2+}$  peuvent inhiber la croissance de quelques microorganismes halophiles et halotolérants. *Halobacterium cutirubrum* nécessite au moins 0.1 M de  $Mg^{2+}$  pour leur croissance, en aidant les cellules à maintenir une morphologie normale à des concentrations basses en NaCl (2.5 M). Tandis que, la croissance demeure lente à des concentrations de 0.01 à 0.025 M) et sera maximal à une gamme de concentration de 0.1 à 0.5 M de  $Mg^{2+}$  pour les souches *Halobacterium halobium*, *Pseudomonas cutirubra* et *P.salinarum*. Les sels de Magnésium, de chlorure, de nitrates et de sulfates sont également efficaces. Un cas particulier des microorganismes isolés de la mer morte, dont, ces eaux ont une concentration de  $MgCl_2$  de 1.1 à 1.5 M en plus de 1.7 M de NaCl (Schneegurt, 2012).

Les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des *Haloarchaea*, comprennent le  $Mg^{2+}$  avec des concentrations de 5%, sous forme de chlorures ou des sulfates, qui sont les formes les plus répondues. Alors que les milieux de cultures utilisés pour l'isolement des halotolérants comme *Halomonas*, comprennent des quantités plus faibles en  $Mg^{2+}$  de l'ordre de 2% (Schneegurt, 2012).



**Figure 48.** Cinétique de croissance de l'isolat CH2 pendant 15 jours d'incubation sur milieu SG à différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.



**Figure 49.** Cinétique de croissance de l'isolat CH5 pendant 15 jours d'incubation sur milieu SG à différentes concentrations en MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.

### IV.8. 2.3. Tolérance à la température et au pH

L'influence de la température sur la croissance des bactéries testées CH2 et CH5, est étudiée afin de déterminer l'optimum de la température à savoir 4°C, 25°C, 37°C, 45°C et 50°C. Les résultats sont représentés sous forme des courbes illustrés dans les figures 50 et 51.

L'intervalle de la température permettant la croissance de CH2 se situe entre 25°C et 45°C, avec un optimum de croissance de 37°C. l'isolat CH5 pousse dans des températures allant de 25° à 50°C, avec un optimum de croissance de 45°C, ce qui nous amène à considérer que l'isolat CH5 est thermophile.

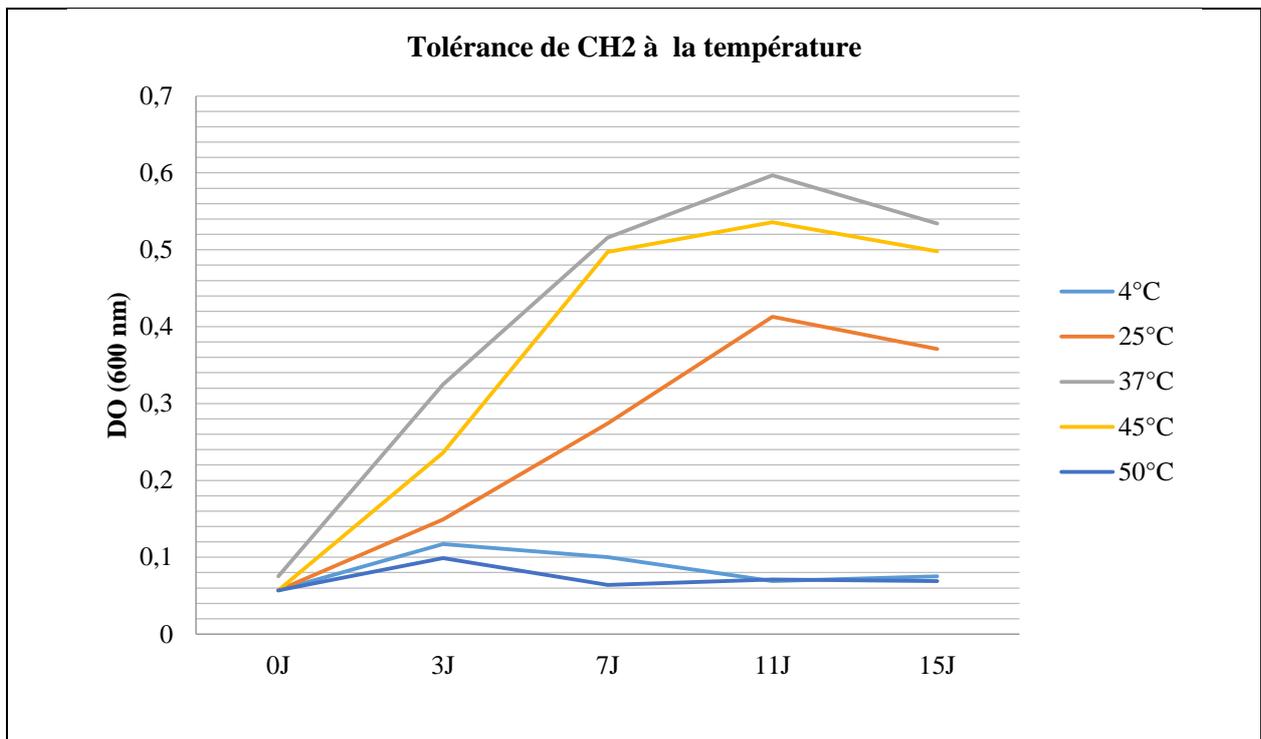
A l'exception de l'espèce psychrotrophile *Halorubrum lacusprofundi*, isolée du lac hypersalin de l'antarctique, les autres membres de la famille des *Halobacteriaceae* sont plutôt des thermotolérants, vu que la majorité des environnements hypersalés soient localisés dans des régions arides et semi arides. La température optimale de croissance de l'ensemble des souches est généralement entre 37 et 45°C (DasSarma and DasSarma, 2012).

L'intervalle de pH permettant la croissance des deux isolats CH2 et CH5, se situe entre 5.0 et 9.0 avec un optimum de croissance de 7.0 (Figures 52, 53), respectivement. Ces deux isolats sont considérés comme des neutrophiles à légèrement acido-alcali- tolérants.

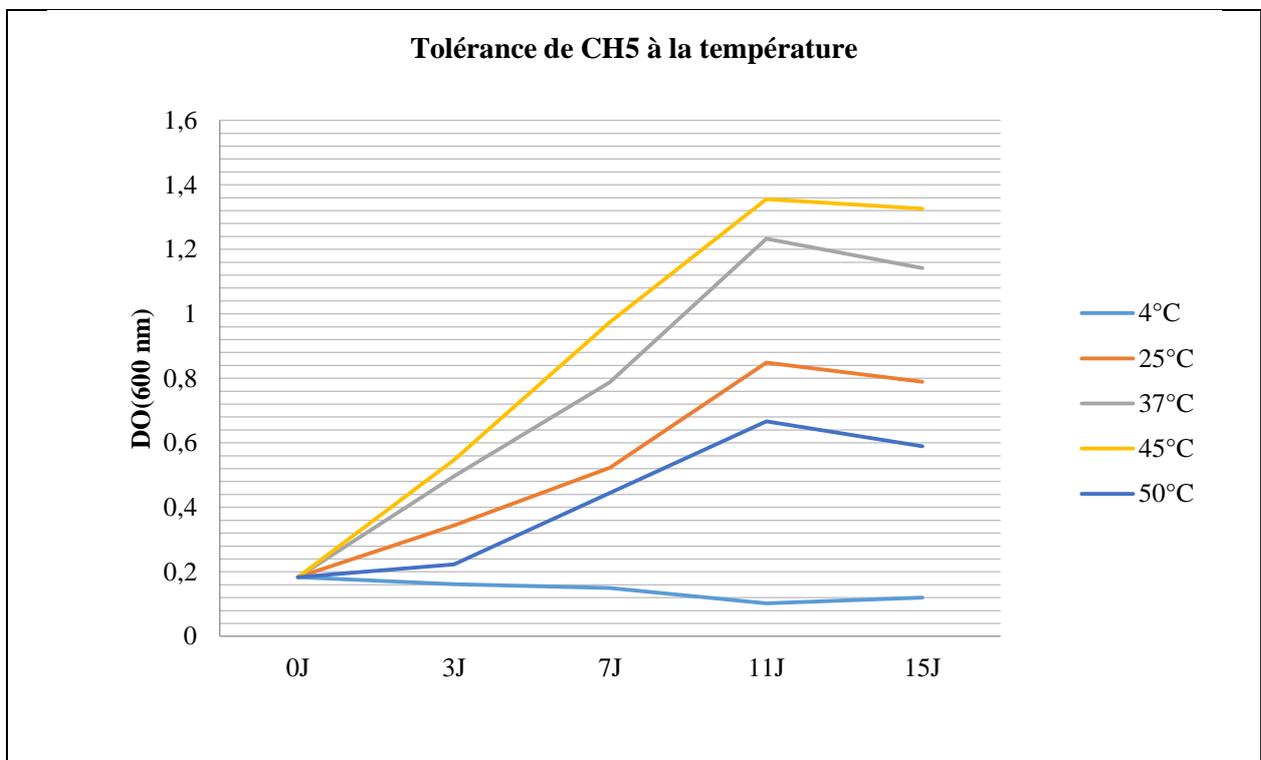
Actuellement, l'accent est mis sur les poly-extrêmophiles, à savoir les taxa ayant un optimum de croissance égale ou supérieur à 1.7 M (environ 10 % p/v de NaCl) ; un pH alcalin, supérieur ou égale à 8.5 et une température égale ou supérieure à 50°C. jusqu'à présent, un nombre réduit d'*Haloarchaea* ont été isolé et qui sont capables de se développer dans des conditions alcalines ainsi qu'à des températures élevées.

La répartition des *Haloarchaea* extrêmement halophiles (croissance optimale à 3.4M environ 20% de NaCl) est bifurquée par rapport au pH optimal, soit elles sont des neutrophiles, avec un pH optimal d'environ 7 ou fortement alcaliphile, avec un pH optimal égale ou supérieur à 8.5 parmi ces halophiles extrêmes qui poussent à cette valeur de pH, seuls quatre taxons ont une température optimale au-dessus de 50°C ; *Haloarcula quadrata* (52°C), *Haloferax elongans* (53°C), *Haloferax mediterranei* (51°C) et *Natronolimnobius aegyptiacus* (55°C).

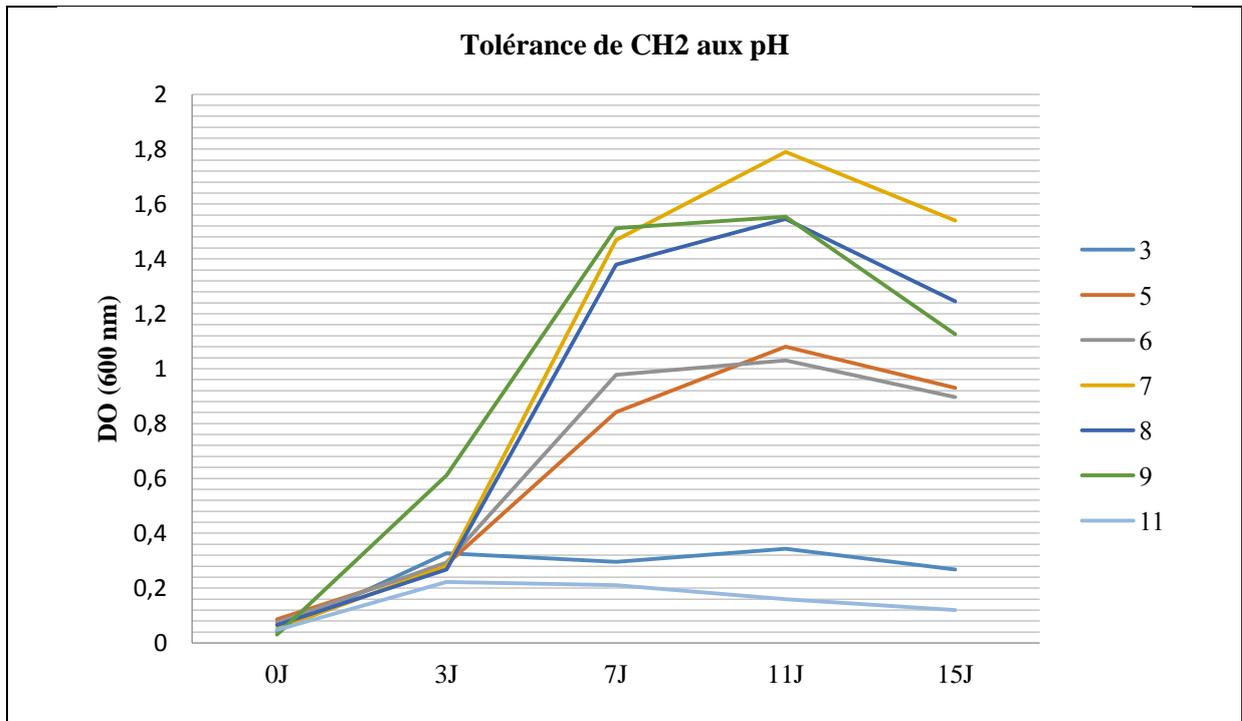
Parmi toutes les *Archaea* halophiles extrêmes, seuls deux espèces sont extrêmement halophiles, obligatoirement alcaliphile et thermophile, et sont donc appelés des poly-extrêmophiles ; *Natrialba hulunbeirensis*, qui a les optima de croissance suivants : NaCl : 3.4 M, pH : 9.0 et Temperature : 50°C (Xu et al., 2001) ; et *Natronolimnobius aegyptiacus* qui a des optima de croissance suivants : NaCl : 4.5M, pH : 9.5 et Température : 55°C (Bowres and Wiegel, 2011).



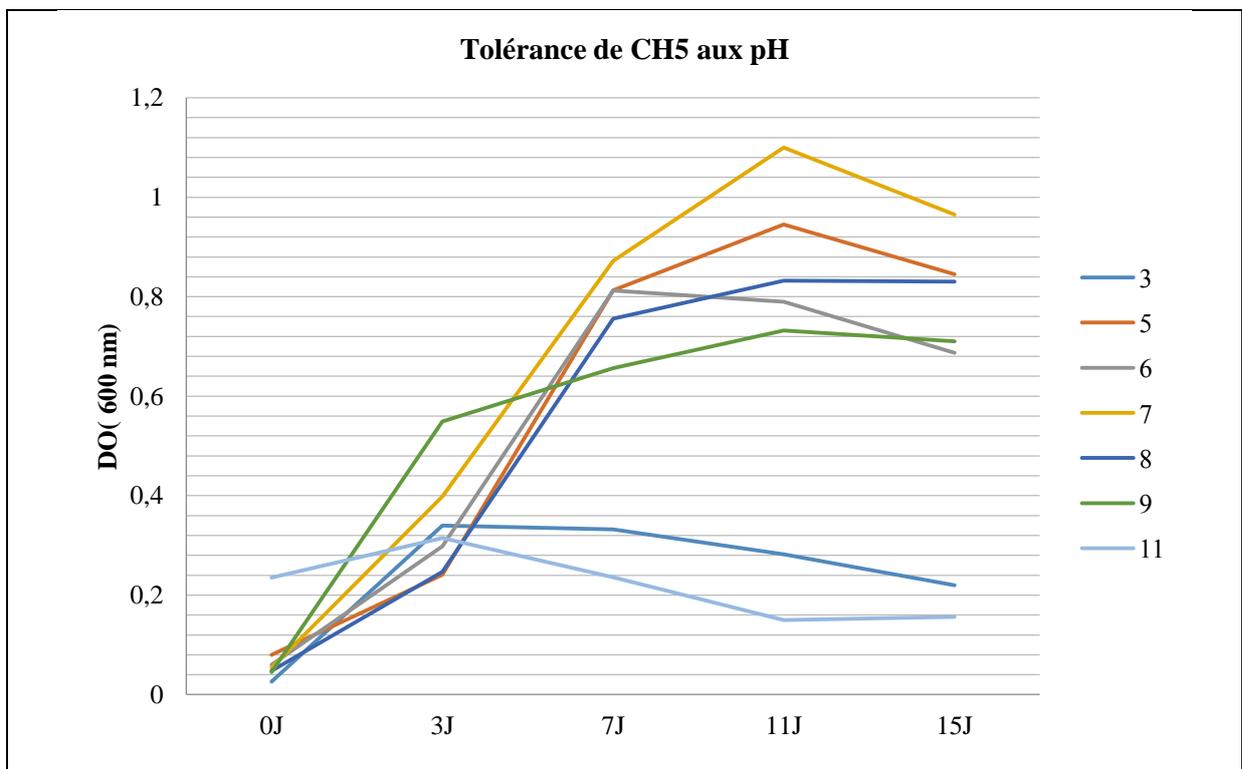
**Figure 50.** Cinétique de croissance de l'isolat CH2 sur milieu SG à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.



**Figure 51.** Cinétique de croissance de l'isolat CH5, sur milieu SG à différentes températures pendant 15 jours d'incubation.



**Figure 52.** Cinétique de croissance de l'isolat CH2, sur milieu SG aux différents pH pendant 15 jours d'incubation.



**Figure 53.** Cinétique de croissance de l'isolat CH5, sur milieu SG aux différents pH pendant 15 jours d'incubation.

## IV.8. 3. Caractères biochimiques

Les résultats des tests biochimiques de CH2 et CH5, sont représentés dans le [tableau 23](#).

**Tableau 23.** Caractères biochimiques des deux isolats étudiés.

Caractères biochimiques	CH2	CH5
<b>Enzymes respiratoires</b>		
<b>Oxydase</b>	-	+
<b>Catalase</b>	+	+
<b>Nitrate réductase</b>	+	-
<b>Métabolisme glucidique</b>		
<b>Test de MR</b>	+	+
<b>Test de VP</b>	-	-
<b>D-glucose</b>	+	+
<b>D-galactose</b>	+	-
<b>Lactose</b>	+	-
<b>D-fructose</b>	+	-
<b>L-arabinose</b>	+	+
<b>D-xylose</b>	+	-
<b>D-mannitol</b>	+	-
<b>Dégradation de l'amidon</b>	-	-
<b>Métabolisme protéique</b>		
<b>Formation de l'indole</b>	-	-
<b>Production de l'H<sub>2</sub>S</b>	+	-
<b>Glycine</b>	+	-
<b>L-leucine</b>	+	+
<b>L-proline</b>	+	-
<b>L-tyrosine</b>	+	-
<b>Dégradation de la gélatine</b>	+	+
<b>Métabolisme lipidique</b>		
<b>Tween 80</b>	-	-

D'après ces résultats, nous avons constaté que les deux souches possèdent l'enzyme respiratoire la catalase, alors que celle de l'oxydase est absente chez CH2. Par ailleurs, nous avons observé que ces dernières possèdent l'enzyme respiratoire la nitrate réductase responsable de la réduction des nitrates en nitrites et les nitrites en azote gazeux ; donc, cet isolat peut croître en anaérobiose sur un milieu contenant les nitrates comme source d'azote et comme source d'énergie (donneur d'électron) dans la respiration anaérobie. L'étude des différentes voies fermentaires intermédiaires, a été effectuée sur le milieu de culture R.M.V.P. Les résultats du test ont montré que les deux souches présentent RM<sup>+</sup> et VP<sup>-</sup> ; cela indique qu'elles réalisent une fermentation acide mixte qui provoque l'acidification du milieu et l'abaissement du pH à des valeurs inférieures à 5, et non pas la fermentation butylène glycolique. Le test indole est apparu négatif, ce qui signifie qu'il n'y a pas une production d'indole à partir du tryptophane par l'enzyme tryptophanase. La dégradation de l'amidon quant à elle est apparue négative pour les deux isolats par contre la gélatine est hydrolysée par CH2 et CH5 qui demeurent incapables de

dégrader le tween 80. L'isolat CH2 est capable de produire de l' $H_2S$ . La plupart de ces résultats sont en concomitance avec les travaux réalisés sur les *Haloarchaea* (Oren, 2014b).

La croissance sur les sucres et les acides aminés utilisés s'accompagne parfois d'une production d'acide responsable de la variation du pH du milieu. Selon le [tableau 23](#), la réduction du pH est observée le plus souvent en présence de glucose et d'arabinose. Ainsi, il a été observé que la production d'acide à partir du galactose, lactose, fructose, xylose et mannitol est absent chez l'isolat CH5 testé. En effet, l'assimilation des acides aminés est observée chez CH2. Donc, cette souche peut croître dans un milieu contenant les acides aminés comme source de carbone et d'azote. Alors que CH5 n'a pas d'activité décarboxylase vis-à-vis de tous les acides aminés testés sauf l'acide aminé leucine qui peut être hydrolysé par une déshydrogénation. Jean-F. B., (1980) a trouvé que les halophiles extrêmes assimilent mal les glucides et préfèrent les substances azotées : les protéines, peptones, acides aminés, extraits de levure, l'hydrolysate de la caséine et d'autres sources similaires de nutriments. Dans certains cas, des petites quantités de vitamines ou autres facteurs de croissance peuvent encore être nécessaires.

#### **IV.8.4. Sensibilité aux antibiotiques**

La sensibilité aux antibiotiques et d'autres substances antibactériennes est souvent utilisée dans les études taxonomiques. Des informations sur la sensibilité aux antibiotiques suivants : Novobiocine, Bacitracine, Anisomycine, Aphidicoline, Erythromycine, Pénicilline, Ampicilline, Rifampicine, Chloramphénicol et Néomycine et d'autres agents antimicrobiens devraient être inclus dans la description de nouveaux taxons des *Haloarchaea* (Oren, 1997).

Les antibiotiques qu'on a testés sont appliqués sous forme de disques imprégnés d'agents antimicrobiens à des concentrations différentes. Après avoir étaler la suspension bactérienne sur le Miller-Hinton II modifié (Cf. [annexe](#)), après incubation à 37°C pendant une semaine, la lecture est faite par mesure des diamètres d'inhibition. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le [tableau 24](#).

**Tableau 24.** Résultats de l'antibiogramme des deux isolats.

Antibiotiques	Mode d'action	CH2	CH5
<b>Pénicilline</b>	Inhibition de la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne.	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Ampicilline</b>	Inhibition de la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>Novobiocine</b>	Interfère avec la réplication de l'ADN en inhibant l'action de l'ADN gyrase.	<b>R</b>	<b>S</b>
<b>Bacitracine</b>	Inhibition du transfert des précurseurs de la paroi sur un lipide porteur	<b>R</b>	<b>S</b>
<b>Rifampicine</b>	Exerce un effet détergent, causant la lyse cellulaire.	<b>R</b>	<b>S</b>
<b>Anisomycine</b>	Inhibiteur de l'ARN polymérase	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Néomycine</b>	Se lie à la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries et interfèrent avec la traduction des ARN messagers en protéines.	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Chloromphicol</b>	Inhibiteurs de la synthèse des protéines	<b>S</b>	<b>R</b>

**R** : résistante ; **S** : sensible.

Les *Archaea* sont caractérisées par leur résistance à large spectre des agents antimicrobiens, en particulier, due au manque de peptidoglycane de la paroi cellulaire, ce qui les rends résistants aux agents antimicrobiens, interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane. Toutefois, les *Archaea* sont sensibles aux inhibiteurs de la synthèse des protéines comme l'acide fusidique ou les dérivés d'imidazoles. De ce fait, la sensibilité aux antibiotiques permet de grouper les microorganismes en *Archaea* ou en *Bacteria* (Oren, 2012). Selon les résultats du tableau 24, les deux isolats sont résistants à la pénicilline et à l'ampicilline qui inhibent la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne. Ce qui nous permet de proposer CH2 et CH5 comme étant des *Archaea* ; la résistance de CH2 à la rifampicine qui exerce un effet détergent, causant la lyse cellulaire, ce qui signifie qu'il possède une vrai paroi cellulaire, alors que les *Archaea* ne le possède pas, cependant, la souche CH5 se présente sensible à cet antibiotique, ce qui nous permet de conclure qu'elle est dépourvue d'une paroi cellulaire, ainsi, cette souche est sensible à la néomycine qui est un inhibiteur de la synthèse des protéines, ce résultat est en concordance avec Pecher and Bock, (1981). Ce résultat concorde en général avec les travaux réalisés sur les *Haloarchaea* ( Kharroub, 2007).

#### IV.8.5. Chimiotaxinomie : analyse des lipides polaires membranaires

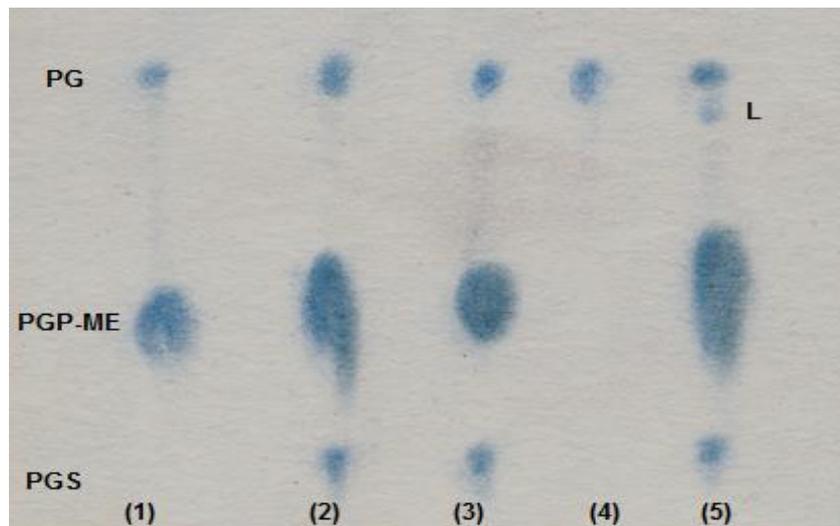
L'analyse des lipides polaires (phospholipides et glycolipides) des isolats CH2 et CH5 a été effectuée dans le laboratoire du DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) à partir des cellules lyophilisées et broyées sous forme de poudre. Les figures 54 et 55 représentent les chromatogrammes obtenus.

L'analyse des lipides polaires (phospholipides et glycolipides) des deux isolats CH2 et CH5, en comparaison avec des lipides polaires des souches d'*Archaea* de références qui sont les suivants : *Haloterrigena turkmenica* DSM5511<sup>T</sup>, *Haloarcula hispanica* DSM 4426T, *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup>, le Tableau 25, a montré que l'isolat CH2 ne possède pas le PGS et le PGP-ME qui sont les phospholipides caractéristiques des *Archaea*, de ce fait, on peut conclure que cet isolat n'est plus une *Haloarchaea*, mais on observe un spot qui correspond à PG qu'il est évidemment considéré comme un phosphatidyl glycerol et non pas un diether phosphatidyl glycérol caractéristique des *Archaea* (Figure 54). La révélation des glycolipides a montré que l'isolat CH2 ne possède pas de glycolipide caractéristique (Figure 55).

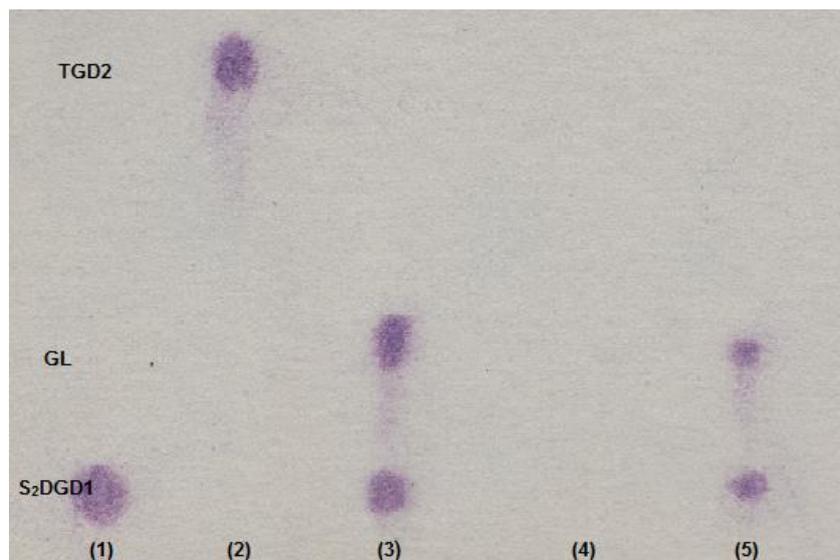
L'isolat CH5 possède une composition en phospholipides similaires à celles de *Haloarcula hispanica* DSM 4426T, *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup>, qui sont le PG le PGP-ME ET le PGS. EN plus d'un lipide non identifié représenté par un spot bleu clair au dessous de PG.

Le même profil de migration sur plaque de silice que le glycolipide S<sub>2</sub>DGD1 de *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup> en plus d'un glycolipide non identifié représenté par une spot mauve claire située au dessus de S<sub>2</sub>DGD1.

En effet c'est un test d'une importance dans la taxonomie des *Haloarchaea*, vu que chaque genre possède une composition spécifique en glycolipides (Oren et al., 1996)



**Figure 54.** Chromatogramme des phospholipides de *Haloterrigena turkmenica* DSM5511<sup>T</sup> (1), *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup> (2), *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup> (3), CH2 (4), CH5 (5).



**Figure 55.** Chromatogramme des glycolipides de *Haloterrigena turkmenica* DSM5511<sup>T</sup> (1), *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup> (2), *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup> (3), CH2 (4), CH5 (5).

**Tableau 25.** Profils des lipides polaires membranaires des deux isolats étudiés et des souches de référence utilisées.

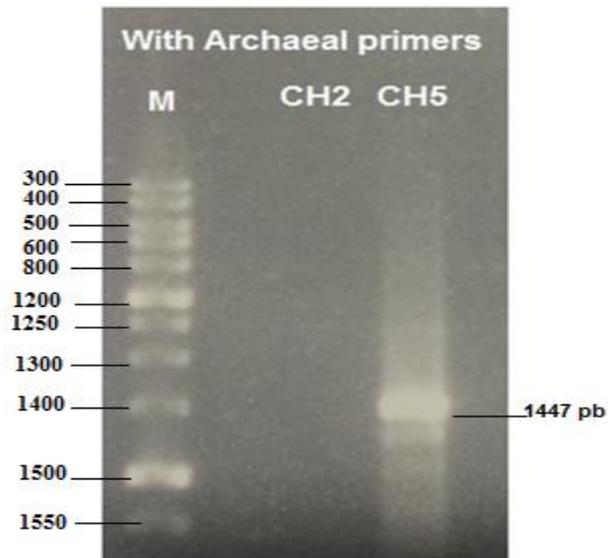
Souches	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
<b>Phospholipides</b>					
<b>PG</b>	+	+	+	+	+
<b>PGP-ME</b>	+	+	+	-	+
<b>PGS</b>	-	+	+	-	+
<b>L</b>	-	-	-	-	+
<b>Glycolipides</b>					
<b>SteGD</b>	-	-	-	-	-
<b>STGD1</b>	-	-	-	-	-
<b>S<sub>2</sub>DGD1</b>	+	-	+	-	+
<b>SDGD3</b>	-	-	-	-	-
<b>SDGD1</b>	-	-	-	-	-
<b>TGD1</b>	-	-	-	-	-
<b>TGD2</b>	-	+	-	-	-
<b>DGD1</b>	-	-	-	-	-
<b>DGD2</b>	-	-	-	-	-
<b>GL</b>	-	-	+	-	+

- (1) *Haloterrigena turkmenica* DSM 5511<sup>T</sup> ;  
 (2) *Haloarcula hispanica* DSM 4426<sup>T</sup> ;  
 (3) *Natrinema pellirubrum* NCIMB 786<sup>T</sup> ;  
 (4) CH2 ; (5) CH5.

**PG** : phosphatidylglycérol, **PGP-Me** : phosphatidylglycérol phosphate méthyle ester, **PGS** : phosphatidylglycérol sulfate, **L** : lipide non identifié, **SteGD** : tétraglycosyl sulfate, **STGD1** : triglycosyl sulfate, **S<sub>2</sub>DGD** : diglycosyl bisulfate, **SDGD3** et **SDGD1**: diglycosyl sulfate, **TGD1** et **TGD2** : triglycosyl, **DGD1** et **DGD2**: diglycosyl, **GL** : glycolipide non identifié, + : présence, - : absence.

#### IV.8.6. Etude moléculaire

Après l'extraction de l'ADN, nous avons dans un premier temps utilisé la technique de PCR afin de détecter s'il existe des *Haloarchaea* parmi les deux échantillons d'ADN extraits à partir des isolats CH2 et CH5. Dans ce cas bien précis, la séquence d'ADN cible que nous désirons amplifier correspond au gène codant les ARNr16S, gène appelé également ADNr 16S. ces séquences ont été choisies car elles sont considérées comme de véritables chronomètres moléculaires puisqu'il est possible de trouver des motifs nucléotidiques spécifiques d'une espèce ou d'un genre bactérien. Il est donc intéressant de pouvoir amplifier ces séquences afin de mettre en évidence la présence de l'ADNr16S d'un microorganisme recherché dans un échantillon d'ADN (Precott et al ., 2003).



**Figure 56.** Amplifiats des deux isolats CH2 et CH5.

**M :** Maqueurs de taille ou leader. **CH2 et CH5 :** Génotypes des deux isolats à identifier.

La [figure 56](#) montre l'analyse électrophorétique en gel d'agarose des produits d'amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques des *Haloarchaea*, et de l'ADN extrait à partir des deux isolats CH2 et CH5. De ce fait, seulement l'isolat CH5 appartient au domaine des *Archaea* ; Après amplification de l'ADNr16S de l'isolat sélectionné CH5, la séquence correspondante (1447 paires de bases) est déterminée, déposée à la GenBank puis alignée et comparée avec les séquences des bactéries contenues dans les bases des données génomiques. Le test de « BLAST » ainsi obtenu peut être résumé comme suit : Le BLAST effectué pour l'isolat CH5 ([Tableau 26](#)) montre une similitude de 99.40 % avec l'espèce *Natrinema gari* HIS40-3T apparue comme étant la plus proche. L'analyse phylogénétique par la méthode du « neighbor-joining » montre la position de l'isolat et sa relation avec les souches-types des espèces les plus proches de *Natrinema* et *Haloterrigena* ([Figure 57](#)).



Les deux isolats CH2 et CH5 fortement actifs et qui font l'objet d'une identification polyphasique, demeurent appartenir aux deux groupes tout à fait différents ; en effet, l'isolat CH2 c'est une bactérie qui fait partie du domaine *Bacteria*, selon les résultats obtenus de la caractérisation physiologique, la détermination de la composition en lipides polaires de la paroi cellulaire et la sensibilité vis à vis les antibiotiques ; ce résultat a été confirmé par l'analyse de l'ADNr16S, alors que l'isolat CH5 c'est une *Archaea* halophile, appartenant au domaine *Archaea*; à la famille des *Halobacteriaceae*, l'analyse de l'ADNr16S a montré que l'isolat CH5 présente une similitude de 99.40 % avec l'espèce *Natrinema gari*, leurs colonies sont oranges pâles, circulaires, entières, convexes, translucides, de diamètre de presque 1mm. Les cellules ont une forme bacillaire avec les caractéristiques suivantes : Gram négatif, oxydase et catalase positives. Ces bactéries ont un caractère aérobie strict, cette bactérie est capable d'utiliser le glucose, le fructose et le lactose comme substrats, elles ne réduisent pas le nitrate en nitrite. Elle est incapable de dégrader le ribose, l'amidon et la gélatine. Concernant, la réaction de cette souche vis-à-vis les antibiotiques, CH5 montre une sensibilité aux antibiotiques suivants : anisomycine, bacitracine, novobiocine et à rifampicine, et insensible à ampicilline, chloramphénicol, érythromycine, et streptomycine. Sa croissance est optimale dans les intervalles de température, de pH et de sel suivants : T de 37°C à 45°C, pH de 6 à 9, NaCl de 15% à 32% et MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O de 0,1 M à 1M. Leur paroi est constitué essentiellement des phospholipides suivants : PG, PGP-ME et de PGS ; et le S<sub>2</sub>DGD1 comme un glycolipide en plus un lipide et un glycolipide non identifiés, nous permettons de supposer que CH5 s'agit de l'espèce *Natrinema gari*.

## **Conclusion**

---

## Conclusion

---

De nombreuses équipes de recherche dans le monde étudient des micro-organismes qualifiés d'extrémophiles qui, pour certains, vivent en présence de sel à forte concentration (halophiles), pour d'autres à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles), dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcaliphiles) ou sous pression (piézophiles). Ces conditions de vie non conventionnelles nous laissent penser que ces microbes de l'extrême ont mis en place des stratégies originales (enzymes spécifiques) pour s'adapter aux stress physico-chimiques auxquels ils sont confrontés (Gregoire *et al.*, 2009). De ce fait, ces microorganismes peuvent être considérés comme des réservoirs de nouvelles biomolécules inhabituelles qui trouvent des applications dans différents domaines de la vie, grâce aux propriétés fonctionnelles singulières de ces biomolécules à savoir les biosurfactants qui ont vite attiré l'attention des biotechnologues.

L'objectif fixé dans notre travail de thèse, était le screening de la capacité des souches d'*Archaea* halophiles extrêmes, isolées des sols salins du Chott El Hodna-M'sila de produire les biosurfactants comme étant des biomolécules d'intérêt biotechnologique ; notamment, en raison de leurs stabilité et activité dans des conditions environnementales hostiles comme la salinité élevée des milieux de cultures des bactéries qui les produisent.

Pour ce faire, on a pu isoler une trentaine d'isolats à partir de six prélèvements de sols salins, de différents sites de Chott El Hodna, en utilisant le milieu de culture SG, approprié pour l'isolement de tels groupes des microorganismes à une concentration de 25% en NaCl. Un isolat représentatif pour chaque'un des six sites de prélèvement, a été sélectionné pour des tests de screening.

Afin de mener à bien notre travail, quatre tests de screening de la capacité de produire les biosurfactants, ont été réalisés par ordre chronologiques : test de l'effondrement de la goutte, test de dispersion de l'huile, calcul de l'index d'emulsification et mesure de la tension superficielle.

Les résultats obtenus de ces tests indiquent que parmi les six isolats qui ont été testés (CH1, CH2, CH3, CH4, CH5 et CH6), les deux isolats CH2 et CH5, ont montré une bonne capacité de production des biosurfactants, avec une stabilité de l'émulsion supérieure à 50%, en réduisant la tension superficielle au-dessous de 40 mN.m<sup>-1</sup>. Les résultats obtenus étaient de (ES%=80.00±0.1%, TS=23.7±0.2 mN.m<sup>-1</sup>) et de (ES%=54.39±0.2%, TS=38.1±0.1 mN.m<sup>-1</sup>), pour CH2 et CH5 respectivement, ce qui les rends des nouveaux candidats potentiels pour la production des biosurfactants.

D'après les tests statistiques qui ont été faits pour déterminer la corrélation entre les tests de screening et selon les avantages et les inconvénients que présentent chaque test, on a conclu qu'une combinaison des différentes méthodes est appropriée pour un dépistage réussi.

Selon le but visé dans notre travail, qui est l'identification des souches d'*Archaea* halophiles productrices des biosurfactants, la logique nous amène à faire juste après le screening, une identification des isolats actifs pour qu'on puisse poursuivre le travail avec les espèces d'*Archaea* halophiles seulement, mais pour la simple raison qu'on a pas pu faire la chimiotaxonomie et l'identification moléculaire qui confirment l'affiliation des souches qu'au dernier stade de notre travail de thèse, on a traité les deux isolats comme étant des espèces appartenant au domaine *Archaea*, en raison de leurs comportements vis-à-vis la salinité élevée du milieu de culture (croissance, production des biosurfactants, etc.).

Donc, les deux isolats CH2 et CH5, fortement actifs ont été retenus pour des études portant sur la détermination des propriétés des biosurfactants produits et de leur pouvoir de dépollution ainsi que la taxonomie des souches productrices après avoir réalisé une caractérisation préliminaire, en étudiant les caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques des isolats producteurs des biosurfactants.

Le moût de fermentation des deux isolats sur le milieu de culture liquide SG, a été utilisé pour déterminer les propriétés des biosurfactants produits par CH2 et CH5. Les résultats obtenus montrent que ces biosurfactants sont extracellulaires ou attachés aux cellules. Les concentrations micellaires critiques (CMC) ont été déterminées aussi, les résultats obtenus sont  $CMC_{CH2}=280$  mg/l et  $CMC_{CH5}=80$  mg/l, ces résultats correspondent aux concentrations en biosurfactants dans le milieu au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément

Cependant, les isolats CH2 et CH5, se présentent capables de produire les biosurfactants à la fin de la phase stationnaire de croissance. Donc, ces biomolécules sont des métabolites secondaires ; en plus, elles demeurent assez stables aux variations de la température, du pH et de la salinité.

L'optimisation des conditions de production des biosurfactants, en utilisant le milieu de culture SG a été faite en deux étapes. La 1<sup>ère</sup> étape de l'optimisation a été basée essentiellement sur l'évaluation de l'effet des différents facteurs physico-chimiques (T, pH, agitation, sels minéraux) sur le rendement de production qui a été évalué indirectement en calculant le pourcentage de réduction de la tension superficielle. La 2<sup>ème</sup> étape consiste donc à évaluer l'effet de la source de carbone et la source d'azote, en fixant les valeurs optimales déterminées des conditions physico-chimiques ; les résultats obtenus ont permis d'obtenir un pourcentage de réduction de la tension superficielle  $\%RTS=68.54\pm 0.7\%$  pour l'isolat CH2, une valeur qui

correspond à une  $TS_{CH2}=20.66\pm 0.7$  mN.m<sup>-1</sup>. L'extraction des biosurfactants produits par CH2 après optimisation des conditions de production, a donné un rendement  $R_{CH2}=17.32$  g/l. De même pour l'isolat CH5, les meilleurs résultats obtenus sont: un  $\%RTS_{CH5}=48.52\pm 0.5\%$  ; une valeur qui correspond à une  $TS_{CH5}=35.67\pm 0.2$  mN.m<sup>-1</sup>. L'extraction des biosurfactants produits par CH5 après optimisation des conditions de production, a donné un rendement  $R_{CH5}=19.65$  g/l.

La caractérisation structurale préliminaire des biosurfactants produits par les deux isolats actifs, a été faite par chromatographie sur couche mince. La révélation des plaques a montré que ces biomolécules sont de nature lipidique ou il s'agit tout simplement des acides gras. L'identification de ces molécules par la chromatographie phase gaz couplée avec la spectrophotométrie de masse, a permis de conclure que les biosurfactants produits par l'isolat CH2 sont constitués d'un mélange d'acides gras, qui sont principalement : l'acide acétique, l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide caprique et l'acide oléique.

L'analyse des biosurfactants produits par l'isolat CH5, en utilisant la technique de GC-MS, a révélé 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. En plus, ces biosurfactants sont constitués aussi d'un mélange d'acide gras dont la composition est : l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide linoléique

Les biosurfactants produits par les isolats CH2 et CH5, ont un potentiel d'application dans la dépollution des sables contaminés par le pétrole, compte tenu le pourcentage de l'élimination des polluants dans différentes conditions. Il est important de noter que les meilleurs résultats ont été obtenus avec les moûts de fermentations (100%) qui présentent une réduction considérable des coûts de la production de ces composés ; de même pour les extraits des biosurfactants à deux fois sa CMC, ce qui augmente les chances d'une prometteuse application industrielle.

Les deux isolats fortement actifs ont fait l'objet d'une taxonomie polyphasique (caractérisation morphologique, biochimique, physiologique, chimiotaxonomique et séquençage de l'ADNr16S). Les résultats obtenus ont montré que parmi les deux isolats producteurs des biosurfactants, que CH5 faisant partie du domaine : *Archaea*, phylum : *Euryarchaeota*, ordre : *Halobacteriales*, famille : *Halobacteriaceae*, genre : *Natrinema* ; l'isolat CH5 est rapproché à l'espèce *Natrinema gari* avec un pourcentage de similarité de 99,4%.

Alors que l'isolat CH2 fait parti du domaine des *Proteobacteria*, de fait qu'il ne contient pas les lipides polaires PGP-ME caractéristiques des *Archaea*, après avoir analysé les lipides polaires de leur paroi. En plus, la lecture de l'électrophorogramme de l'amplifié de

l'ADNr16S de CH2 a montré qu'il n'a pas eu une amplification en utilisant les primers caractéristiques des *Archaea*.

A la lumière des résultats obtenus dans ce travail de thèse :

- Il est recommandé de faire le screening de la production des biosurfactants par les vingt quatre isolats restants, car c'est fort possible de trouver parmi eux d'autres *Haloarchaea* biologiquement actives ;
- Il sera recommandé de déterminer les propriétés fonctionnelles et la toxicité des biosurfactants produits par CH2 et CH5 ;
- Du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'effectuer une hybridation ADN-ADN entre la souche CH5, et les espèces de *Natrinema* les plus proches phylogénétiquement sur la base du gène codant pour l'ADNr16S ;
- Il serait nécessaire de compléter l'optimisation des conditions de production des biosurfactants, en évaluant l'effet du volume de l'inoculum, l'effet des oligoéléments, etc. En utilisant un modèle statistique qui prend en considération l'effet combiné des différents facteurs physico-chimiques et nutritionnelles qui entrent en jeu où ces paramètres doivent être traités simultanément pour une appréciation précise de leur apport en utilisant des logiciels spécialisés ;
- Il est intéressant de valoriser la capacité de la souche CH2 à produire la vitamine E, le BHT et le NP et d'essayer d'optimiser les conditions de production de ces molécules, ainsi de trouver des applications pour les autres composés phénoliques comme des additifs alimentaires dans le domaine de l'industrie agroalimentaire ;
- Il est important aussi de valoriser la capacité de la souche CH5 de produire le noyau benzène, qui peut être utilisé comme un solvant organique de choix.
- Ainsi, il existe un besoin pour des études approfondies dans le but d'évaluer l'efficacité des processus de bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures ayant différents niveaux de salinité.

## **Références bibliographiques**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) **Abalos AM, Vinas J, Sabate MA, Manresa AM, Solanas MAM (2004).** Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegr.* 15 : 249-260.
- 2) **Abhijit K, Biao R, Xiang-Yang L, Kakasaheb M, Lixin Z, Chandrakant K (2012).** Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of Colloid and Interface Science.* 367: 311–318.
- 3) **Adamczak M, Bednarski W (2000).** Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antartica*. *Biotechnol. Lett.* 22: 313-316.
- 4) **Ainon H, Noramiza S, Shahidan R (2013).** Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *Sains. Malays.* 42(5):615-623.
- 5) **Akmouci S (2009).** Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Mémoire de Magister. Option : Biochimie et microbiologie appliquée. Université M'hamad Bougara Bumerdès. P 109.
- 6) **Alain B (2012).** *Microbiochimie et alimentation.* Educagri Editions. P: 146. ISBN : 2844445586, 9782844445582
- 7) **Alizadeh Kaloorazi N, Choobari MFS (2013).** Biosurfactants: Properties and Applications. *Journal of Biology and today's world.* 2(5) : 235-241. ISSN 2322-3308.
- 8) **Amani H (2015).** Evaluation of Biosurfactants and Surfactants for Crude Oil Contaminated Sand Washing. *Petrol. Sci. Technol.* 33(5): 510-519, DOI: 10.1080/10916466.2014.999941.
- 9) **Amiard JC (2011).** Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier. P : 782. ISBN 2743013443, 9782743013448.
- 10) **Antón J, Meseguer I, Rodríguez-Valera F (1988).** Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2381-2386.
- 11) **Ariech M (2011).** Contribution à l'isolement et l'identification des archéobactéries hyper halophiles du Chott El-Hodna (M'sila). Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en microbiologie. Université Ferhat Abbas- Sétif. Département de Microbiologie. Pp : 111.
- 12) **Ayad R (2011).** Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences

- Alimentaires. Université Mentouri-Constantine. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.A.T.A.A). Département de Biotechnologie Alimentaire.
- 13) **Banat I (2000)**. Les biosurfactants plus que jamais sollicités. *Biofutur* ; mensuel européen de biotechnologie. 198 : 40-46.
  - 14) **Banat M, Makkar RS, Cameotra SS (2000)**. Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 : 495-508.
  - 15) **Batista RM, Rufino RD, Luna JM, Souza JEG, Sarubbo LA (2010)**. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis*, Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. *Water Environ. Res.* 82 : 1-8.
  - 16) **Batista SB, Mounteer AH, Amorim FR, Totola MR (2006)**. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 97(6): 868-875.
  - 17) **Bauer AW, Serries JC, Turck M, et Kirby WM (1966)**. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am. J. Clin. Path.* 45: 493- 496.
  - 18) **Becker EA, Seitzer PM, Tritt A, Larsen D, Krusor M, Yao AI, Wu D, Madern D, Eisen A, Darling AE, Facciotti MT (2014)**. Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic. Osmo-response. *PloS Genet.* 10 (11) : e1004784. Doi : 10.1371/journal.pgen. 1004784.
  - 19) **Bensaci T, Nouijem Y, Bouzegag A, Saheb M, Houhamdi M (2008)**. L'importance du Chot El Hodna pour l'avifaune aquatique. Séminaire National sur l'interaction Biologique - Environnement, 08 et 09 décembre 2008 à Skikda.
  - 20) **Bertrand JC, Amallah M, Acquaviva M, Mille G (1990)**. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett. Appl. Microbiol* 11: 260-263.
  - 21) **Bhatnagar T, Boutaiba S, Hacene H, Cayol J-L, Fardeau M-L, Ollivier B, Baratti JC (2005)**. Lipolytic activity from halobacteria: screening and hydrolase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 248:133-140.
  - 22) **Bodour A, Drees K, Maier R (2003)**. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3280-3287.
  - 23) **Bodour A, Guerrero-Barajas C, Jiorle BV, Malcomson ME, Paull AK, Somogyi A (2004)**. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants

- produced by *Flavobacterium sp.* strain MTN11. Appl. Environ. Microbiol. 70(1) : 114-120.
- 24) Bodour A, Maier MR (1998).** Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J. Microbiol. Methods. 32(3): 273-280.
- 25) Bognolo G (1999).** Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces : Physicochemical and Engineering Aspects.
- 26) Bordas F, Lafrance P, Villemur R (2007).** Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. Environ. Poll. 138 : 69-76.
- 27) Bosch R, Axcell E (2005).** Produced-water chemical treatments enable environmental compliance. World. Oil. 226 (10): 75-80.
- 28) Boumezbeur A (2002).** Atlas 2, les zones humides algériennes d'importance internationale. Direction Générale des Forêts. Alger. Pp : 22-24.
- 29) Bowers KJ, Wiegel J (2011).** Temperature and pH optima of extremely halophilic *Archaea*: a mini-review. Extremophiles. 15: 119-128. DOI 10.1007/s00792-010-0347-y.
- 30) Bowers KJ, Mesbah NM, Wiegel J (2009).** Biodiversity of polyextremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physicochemical boundary for life?. Saline Syst. 5: 9 .
- 31) Briandet R, Fechner L, Naïtali M, Dreanno C (2012).** Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae. P: 164. ISBN 2759217647, 9782759217649.
- 32) Cameotra SS, Singh P (2008).** Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. Int. Biodeter. Biodegr . 62: 274-280
- 33) Campbell NA, Reece JB (2004).** Biologie. Renouveau pédagogique inc. Pp : 571-591.
- 34) Cappuccino JG and Sherman N (1999).** Microbiology: A Laboratory Manual. The Benjamin/Cummings publishing inc. co. California. Pp: 36-38.
- 35) Carol D, Litchfield W (2011).** Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38:1635-1647 . DOI: 10.1007/s10295-011-1021-9.
- 36) Castillo AM, Gutierrez MC, Kamekura M , Xue Y , Ma Y, Cowan DA, Jones BE, Grant WD and Ventosa A (2007).** *Halorubrum ejinorensis* sp. Nov., isolated from lake Ejinor, inner Mongolia, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2538-2542.
- 37) Castillo AM, Gutierrez MC, Kamekura M, Ma Y, Cowan DA, Jones BE , Grant WD and Ventosa A (2006).** *Halovivax asiaticus* gen. Nov., sp. Nov., a novel extremely

- halophilic archaeon isolated from inner Mongolia, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 765-770.
- 38) Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF (2006).** Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52 (2) : 73-116.
- 39) Chen C, Baker S, Darton R (2007).** The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J. Microbiol. Methods.* 70 (6): 503-510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.006>.
- 40) Chen C, Baker S, Darton R (2007).** The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J. Microbiol. Methods* 70(6): 503-510.
- 41) Coimbra CD, Rufino RD, Luna JM, Sarubbo LA (2009).** Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. *Curr. Microbiol.* 58 : 245-249.
- 42) Corcelli A, Lobasso S, Palese LL, Saponetti MS, Papa S (2007).** Cardiolipin is associated with the terminal oxidase of an extremely halophilic archaeon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (3): 95-801.
- 43) Danson MJ, Lamble HJ, Hough DW (2007).** *Archaea : Molecular and Cellular Biology.* Chapter Central Metabolism. ASM Press. Pp : 260-287.
- 44) DasSarma A, Arora P (2001).** Halophiles. *General & Introductory Life Sciences.* 2 (3): 1-9. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub3.
- 45) DasSarma P, DasSarma S (2008).** On the origin of prokaryotic "species": the taxonomy of halophilic *Archaea*. *BioMed Central*, 4(5) :1-5. DOI: 10.1186/1746-1448-4-5.
- 46) Dassarma S, DasSarma P (2012).** Halophiles. *General. Introduct. Life Sci.*(3) : 1-11. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.
- 47) Dauvergne j (2010).** Synthèse et étude physico-chimique de nouveaux tensioactifs utilisables pour la cristallisation 2D sur film lipidique et l'étude des protéines membranaires. Thèse présentée à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse pour obtenir le diplôme de Doctorat. Spécialité: Chimie organique. Ecole Doctorale 250 «Sciences chimiques» Laboratoire de Chimie Bio-Organique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels (EA 932).
- 48) Desai JD, Banat IM (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiological Molecular Reviews.* 61: 47-64.

- 49) Dubey KV, Juwarkar AA, Singh SK (2005).** Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 21: 860-867.
- 50) Dussault HP (1995).** An Improved Technique For Staining Red Halophilic Bacteria. *J. Bacteriol.* 70(4):484-485. PMID: PMC386254.
- 51) Emanuel B (2003).** Transitions de mouillage: rôle des interactions entre interfaces. Editions Publibook. P: 67. ISBN 2748303032, 9782748303032.
- 52) Emerson D, Chauhan S, Oriol P, Breznak JA (1994).** *Haloflex* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Archiv. Microbiol.* 161: 445-452.
- 53) Enache M, Cojoc R, Kamekura M (2015).** Halophilic Microorganisms and Their Biomolecules : Approaching into Frame of Bio (Nano) Technologies. Springer International Publishing. Switzerland DK , Maheshwari MS (eds.). *Halophiles, Sustainable Development and Biodiversity* 6. DOI: 10.1007/978-3-319-14595-2\_5.
- 54) Fakruddin Md (2012).** Biosurfactant: Production and Application. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 3: 4. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000124>.
- 55) Felsenstein J (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.
- 56) Fernandez-Castillo R, Rodriguez-Valera F, Gonzalez-Ramos J, Ruiz-Berraquero F (1986).** Accumulation of poly(-hydroxybutyrate) by halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 : 214-216.
- 57) Fiechter A (1992).** Biosurfactants: moving towards industrial application. *Tibtech.* 10: 3-12.
- 58) Fiedler HP, Bruntner C, Bull AT, Ward AC, Goodfellow M, Potterat O, Puder C. and Mihm G (2005).** Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87 : 37-42.
- 59) Franzetti A, Tamburini E, Banat IM (2010).** Application of biological surface active compounds in remediation technologies. In: Sen, R. (Ed.), *Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany. 672 : 121-134.
- 60) Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A, Usami R (2005).** Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* 9: 85-89.

- 61) Gabet S (2004).** Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges. Discipline : Chimie et Microbiologie de l'Eau. Faculté des sciences et techniques. Ecole doctorale : science, technologie, santé. Laboratoire des sciences de l'eau et de l'environnement. Pp :186.
- 62) Gharaei-Fathabad E (2011).** Biosurfactants in pharmaceutical industry : A Mini-Review. *Amer. J. Drug. Disc. Devel.* 1: 58-69.
- 63) Gregoire P, Fardeau ML, Guasco S, Bouanane A, Michotey V, Bonin P, Dubourg K, Cambar J, Ollivier B (2009).** Les micro-organismes de l'extrême. *Press. Therm. Climat.* 146: 49-61.
- 64) Guezennec J (2004).** « Les bactéries des sources hydrothermales profondes a l'origine de nouvelles molécules bioactives? ». *Vertigo, la revue électronique en sciences de l'environnement.* 5 :3 .URL :<http://vertigo.revues.org/3214> ; DOI :10.4000/vertigo.3214
- 65) Guzmán MN, Vargas VA, Antezana H, Svoboda M (2008).** Lipolytic enzyme production by halophilic/ halotolerant microorganisms isolated from Laguna Verde, Bolivia. *Rev. Boliv. Quim.* 25(1) : 14-23.
- 66) Haas SR, Nascimento FR, Schneider IAH, Gaylarde C (1999).** Flocculation of fine fluorite particles with *Corynebacterium xerosis*. *Revista de Microbiol.* 30: 225-230.
- 67) Helmut K, Harald C, Ajit V (2010).** Prokaryotic Cell Wall Compounds : Structure and Biochemistry. Springer Heidelberg Dordrecht London New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P : 518. ISBN 978-3-642-05061-9e-ISBN 978-3-642-05062-6. DOI 10.1007/978-3-642-05062-6 .
- 68) Hezayen FF, Rehm BHA, Tindall BJ, chel AS (2001).** Transfer of *Natrialba asiatica* BIT to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). *Inter. J.Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1133-1142. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00711>
- 69) Hurst CJ (2016).** Their World: A Diversity of Microbial Environments ; Volume 1 de *Advances in Environmental Microbiology*. Springer. ISBN 3319280716, 9783319280714. P : 381.
- 70) Hwang JM, Eu JC, Jeong AP, Jae HJ, Che OJ, Young RC (2013).** *Amorphus suaedae* sp. nov., isolated from the root of a tidal flat plant, Suaeda maritima. *Inter. J.Syst. Evol. Microbiol.* 63 : 3868-3872. DOI 10.1099/ijs.0.048959-0.

- 71) Ihara K, Satoshi W, Takeshi T (1997).** Two New Extremely Halophilic *Archaea* Collected in Argentina ; *Haloarcula argentinensis* sp. nov. and *Haloarcula mukohataei* sp. nov., international journal of microbiology systematics and ecology. P : 73-77. International Union of Microbiological Societies 0020-7713/97 . 47 : 1.
- 72) Jain D, Collins-Thompson D, Lee H, Trevors JT (1991).** A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. J. Microbiol. Methods.13(4) : 271-279.
- 73) Jarvis SG, Johnson MJ (1949).** Glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. 73 : 4124-4126.
- 74) Jean F, Brisou M (1980).** Les bactéries marines : Halophilie-Psychrophilie-Bioluminescence-Barophilie-Taxinomie-Téchniques d'étude. Masson. Paris New York Barcelone Milan. Pp : 170-171.
- 75) Jukes TH, Cantor CR (1969).** Evolution of protein molecules. In: Mammalian protein metabolism. Munro H.N. (Eds). Academic Press. New York. 3 : 21-132.
- 76) Kachholz T, Schlingmann M (1987).** Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment. In: Kosaric N, Cairns WL, Grey NCC, (eds.). Biosurfactant and Biotechnology, New York, Marcel Dekker Inc. 25: 183-208.
- 77) 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. Pp: 20-56.
- 78) Kargi F, Uygur A (1996).** Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing halophilic bacteria. Environ. Technol. 17 :325-330.
- 79) Kebbouche-gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009).** Isolation and characterization of halophilic *Archaea* able to produce biosurfactants. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36 (5) : 727-738.
- 80) Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009).** Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36(5): 727-738.
- 81) Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009).** Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36(5): 727-738.
- 82) Kebbouche-Gana S, Gana ML (2014).** Bactéries du sel et Biosurfactants: Entre Isolement, Screening et Production (French) Paperback . Presses Académiques Francophones. ISBN-10: 3838143140 ; ISBN-13: 978-3838143149. P: 168.

- 83) Khalladi R, Benhabilesa O, Bentahara F, Moulai-Mostefab N (2009).** Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. *J. Hazard. Mater.*164: 1179-1184.
- 84) Kharroub K (2007).** Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur d'Etat. Spécialité: Microbiologie et Biologie Moléculaire. Constantine, Université Mentouri- Constantine. N° d'ordre: 79 / T.E / 2007.
- 85) Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C (2012).** Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* *B4. Desalination* 285: 198-204.
- 86) Kosaric N (2001).** Biosurfactants and their Applications for Soil Bioremediation. *Food Technol Biotechnol.* 39: 295-304.
- 87) Krishnaswamy M, Subbuchettiar G, Ravi TK, Panchaksharam S (2008).** Biosurfactants properties, commercial production and application. *Current Science.* 94: 736-747.
- 88) Kulichevskya IS, Milekhina EI, Borzenkov IA, Zvyagintseva IS, Belyacv SS (1992).** Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiol.* 60:596-601.
- 89) Kumar S, Stecher g, Tamura k (2016).** MEGA7 : Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datests. *Molecular biology and evolution* (accepted)
- 90) Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS (2009).** Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167:609-614.
- 91) Lattanzio VMT, Corcelli A, Mascolo G, Oren A (2002).** Presence of two novel cardiolipins in the halophilic archaeal community in the crystallizer brines from the salterns of margherita di savoia (italy) and eilat (israel). *Extremophiles.* 6 (6): 437- 444.
- 92) Le Grand-Piteira N (2006).** Ruissellement avec effets de mouillage: Gouttes et méandres sur un plan incliné. Thèse pour l'obtention du Doctorat en physique . Spécialité : physique des fluides. Université Denis Diderot- paris7. Tel- 00083935. Pp : 233
- 93) Li X, Mu G (2005).** Tween - 40 as corrosion inhibitor for cold rolled steel in sulphuric acid: Weight loss study, electrochemical characterization and AFM. *Appl. Surface. Sci.* 252: 1254-1265.
- 94) Lin SC (1996).** Biosurfactants: Recent advances. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 66(2): 109-120.

- 95) Litchfield CD, Gillevet PM (2002).** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28(1):48-55.
- 96) Litchweld CD (2011).** Potential for industrial products from the halophilic *Archaea*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38: 1635-1647. DOI : 10.1007/s10295-011-1021-9.
- 97) Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000).** Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 38 :471.
- 98) Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Darnell J (2005).** Biologie moléculaire de la cellule: Biologie cellulaire et moléculaire. De Boeck Supérieur. P : 1096. ISBN: 2804148025, 9782804148027.
- 99) Loganathan K, Gaurav K, Kokati V, Bhaskara R (2010).** Comparaison of methods and screening of biosurfactant producing marine *Actinobacteria* isolated from Nicobar marine sediment. *Environ. Biotechnol. Div.* 2 (1): 34-38.
- 100) Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM (2013).** Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf B Biointerfaces* . 102 : 202-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.08.008>.
- 101) Madern D, Ebel C, Zaccai G (2000).** Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles* . 4 : 91- 98.
- 102) Maier RM, Soberon-Chavez G (2000).** Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (5) : 625-633.
- 103) Makhdoumi-Kakhki A, Amoozegar MA, Bagheri M, Ramezani M, Ventosa A (2012).** *Haloarchaeobius iranensis* gen. nov. sp. nov. an extremely halophilic archaeon isolated from a saline lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 : 1021-1026. DOI: 10.1099/ijs.0.033167-0
- 104) Makkar RS, Rockne KJ (2003).** Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2280-2292.
- 105) Marouf A , Tremblin G (2009).** Abrégé de biochimie appliquée. EDP sciences. P: 399. ISBN 978-2-7598-0446-7.
- 106) Marty V (2011).** Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de grenoble spécialité: Biologie structurale et nanobiologie. Adaptation de l'*Archaea* halophile *Halobacterium salinarum* aux stress environnementaux: mécanismes de survie et rôle de la protéolyse intracellulaire. Université de grenoble. Pp : 236.

- 107) McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD, Stan-Lotter H (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ. Microbiol.* 2 (3) : 243-250.
- 108) Merck E (1975).** Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Darmstadt. P:149.
- 109) Meylheuc T, Herry JM, Bellon-Fontaine MN (2001).** Biosurfactants, surface-active biomolecules with wide potential applications. *Sci.Aliment.* 21 (6) : 591-649. DOI :10.3166/sda.21.591-649.
- 110) Mohan PK, Nakhla G, Yanful EK (2006).** Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water. Res.* 40 : 533-540.
- 111) Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T (2000).** A study on the structure function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488(3) : 211-218.
- 112) Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T (2000).** A study on the structure function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488(3) : 211-218.
- 113) Mukherjee S, Das P, Sen R (2006).** Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends. Biotechnol.* 11 : 509-515.
- 114) Mukherjee S, Das P, Sen R (2006).** Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends. Biotechnol.* 24: 509-515.
- 115) Mulligan CN (2005).** Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133: 183-198.
- 116) Nadarajah N, Singh A, Owen P (2002).** Ward Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 435-440.
- 117) Nasr S, Soudi M R, Mehrnia M R , 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.
- 118) Nima AK, Fekri M, Choobari S (2013).** Biosurfactants: Properties and Applications. *Journal of Biology and today's world.* 2(5) : 235-241. ISSN 2322-3308.
- 119) Nitscheke M, Costa SG (2007).** Biosurfactants in food industry. *Trends. Food. Sci. Tech.* 18(5): 252-259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>.
- 120) Nitschkea M, Costa SGVAO (2007).** Biosurfactants in food industry. *Trends. Food. Sci. Tech.* 18 : 252-259.

- 121) Oberwinkler TM (2011).** Metabolic and Genomic Annotations in Halophilic *Archaea* aus Fürstfeldbruck. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Pp : 245.
- 122) Oren A (1999).** Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 334-348.
- 123) Oren A (2000).** Biological processes in the Dead sea as influenced by short-term and long-term salinity changes. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues. Advanc. Limnol.* 55: 531-542.
- 124) Oren A (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28(1) : 56-63.
- 125) Oren A (2006).** The Order *Halobacteriales* In: *Prokaryotes*. Springer. 3: 113-164. DOI :10.1007/0-387-30743-5\_8.
- 126) Oren A (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems.* 4 : 2-10.
- 127) Oren A (2012).** Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* : a paradigm for changing concepts in prokaryote systematic. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2) : 263-271.
- 128) Oren A (2014a).** Taxonomy of halophilic *Archaea*: current status and future Challenges. *Extremophiles.* 18 (5) : 825-834. DOI 10.1007/s00792-014-0654-9.
- 129) Oren A (2014b).** The Family *Halobacteriaceae* in : *Prokaryotes*. Springer. Berlin Heidelberg. Pp : 41-121. ISBN 978-3-642-38954-2.
- 130) Oren A, Duker S, Ritter S (1996).** The polar lipid composition of Walsby's square bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 135-140.
- 131) Oren A, Ventosa A, Grant WD (1997).** Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 233-238.
- 132) Organisation Maritime Internationale (2003).** Manuel sur la pollution par les hydrocarbures (IV)–lutte contre les versements d'hydrocarbures, Volume 4. IMO Publishing . P : 226. ISBN 928014118X, 9789280141184.
- 133) Ozcan B, Cokmus C, Coleri A, Caliskan M (2006).** Characterization of extremely halophilic *Archaea* isolated from saline environment in different parts of turkey. *Russ. microbiol.* 75 (6) : 849-856. <http://dx.doi.org/10.1134/s002626170606018x>.
- 134) Ozcan B, Ozcengiz G, Coleri A and Cokmus C (2007).** Diversity of Halophilic *Archaea* from Six Hypersaline Environments in Turkey. *J. Microbiol .Biotechnol.* 17(6) : 985-992. PMID:18050917.

- 135) Palashpriya D, Soumen M, Sivapathasekaran C, Ramkrishna S (2010).** Microbial Surfactants of Marine Origin : Potentials and Prospects. Biosurfactants / edited by Ramkrishna Sen. p. cm. (Advances in experimental medicine and biology. v. 672). ISBN 978 1 4419 5978 2.
- 136) Papillon E, Bonaz B, Fourne J (1999).** Production et absorption des acides gras à chaîne courte. Gastroentérologie clinique & biologique. 23 : 761.
- 137) Pastewski S, Hallmann E, Medrzycka K(2006).** Physicochemical aspects of the application of surfactants and biosurfactants in soil remediation. Environ .Eng. Sci. 23(4) : 579-588.
- 138) Patzelt H, Kessler B, Oesterhelt D (1998).** Decomposition of halogenated hydrocarbons by halophilic *Archaea* and Bacteria. International Patent WO/1998/013105. German Patent 19639894.0 27.09.1996.
- 139) Pecher T, Böck A (1981).** In vivo susceptibility of halophilic and methanogenic organisms to protein synthesis inhibitors. FEMS Microbiol. Lett. 10: 295-297.
- 140) Perfumo A, Smyth TJP, Marchant R, Banat IM (2009).** Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates: Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. In Kenneth N. Timmis ed. Springer, UK (in press).
- 141) Perry JJ, Staley TJ, Lory S (2004).** Microbiologie « cours et questions de révision ». Dunod, Pp 397-403.
- 142) Pétitjean C (2013).** Phylogénie et évolution des *Archaea*, une approche phylogénomique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI. Pp :322.
- 143) Pfeifer F (2015).** *Haloarchaea* and the Formation of Gas Vesicles. Life. 5 : 385-402; DOI:10.3390/life5010385.
- 144) Pfeifer F, Gregor D, Hofacker A, Plösser P, Zimmermann P (2002).** Regulation of gas vesicle formation in halophilic *Archaea*. J. Mol. Microbiol Biotechnol. 4 (3): 175-181.
- 145) Platas G, Meseguer I, Amils R (2002).** Purification and biological characterization of halocin H1 from *Haloferax mediterranei* M2a. Int. Microbiol. 5 : 15-19.
- 146) Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM (2006).** Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. J. Pet. Sci. Eng. 50(1) : 71-77.
- 147) Prescott LM , Harley J, Klein DA (2003).** Microbiologie. De Boeck Supérieur. P : 1137. ISBN 2804142566, 9782804142568.

- 148) Robert MB (1995).** Statistical Methods for Engineers and Scientists, Third Edition, *Volume 144 de Statistics: A Series of Textbooks and Monographs*. CRC Press. P : 363. ISBN 0824793358, 9780824793357.
- 149) Rocha MVP, Souza MCM, Benedicto SCL, Bezerra MS, Macedo GR., Saavedra Pinto GA, Gonçalves LRB (2007).** Production of Biosurfactant by *Pseudomonasaeruginosa* Grown on Cashew Apple Juice. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Pp:136-140.
- 150) Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006a).** Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chem.* 57(2) : 609-618.
- 151) Rodrigues LR, Teixeira JA, Mei HC, Oliveira R (2006b).** Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B.* 49(1) : 79-86.
- 152) Ronald M (1997).** Handbook of microbiological media. Second edition. ATLAS CRC.
- 153) Rone EZ, Rosenberg E (2001).** A Review of Natural Roles of Biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3(4) : 229-236. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
- 154) Rothschild LJ, Mancinelli RL (2001).** Life in extreme environments. *Nature.* 409(6823) : 1092-1101.
- 155) Sadouk z et al. (2008).** Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a Rhodococcus Strain. Institut français du pétrole. *Oil. Gas. Sci. Technol.* 63(6) : 747-753. DOI: 10.2516/ogst:2008037.
- 156) Saitou N, Nei M (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biolo. Evol.* 4 : 406-425.
- 157) Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA , Sarubbo LA (2016).** Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int. J. Mol. Sci.* 17 : 401. DOI:10.3390/ijms1703
- 158) Satpute SK , Banpurkar AG , Dhakephalkar PK , Banat IM , Chopade BA (2010).** Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers : a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* Pp :1-18. DOI :10. 3109/07388550903427280.
- 159) Schiraldi C, Giuliano M, De Rosa M (2002).** Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea.* 1(2) : 75-86. PMID: PMC2685559.
- 160) Schneegurt MA (2012).** Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant *Bacteria* and *Archaea* (chapter2). In : *Advances in Understanding the*

- Biology of Halophilic Microorganisms. Springer Science and Business Media Dordrecht. DOI 10.1007/978-94-007-5539-0\_2.
- 161) Sébastien Le roux S (2015).** Effet Marangoni aux Interfaces Fluides. Thèse pour l'obtention du Doctorat en physique, Ecole doctorale science de la matière (SDLM). Université Renne 1. Tel-01198414. Pp : 180.
- 162) Seckbach J, Chela-Flores J (2007).** Extremophiles and chemotrophs as contributors to astrobiological signatures on Europa: A review of biomarkers of sulfate-reducers and other microorganisms. In: R.B. Hoover, G.V. Levin, A.Y. Rozanov, and P.C.W. Davies (eds.), Instruments, Methods, and Missions for Astrobiology X. Proc. SPIE 6694: 66940W.
- 163) Silva RCFS, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2014).** Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. Int. J. Mol. Sci. 15 : 12523-12542.
- 164) Smaoui S (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat de l'université de Toulouse. Spécialité : Génie de procédés et environnement. Pp : 251.
- 165) Sobrinho HBS, Rufino RD, Luna JM, Salgueiro AA, Campos-Takaki GM, Leite LFC, Sarubbo LA (2008).** Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. Process Biochem. 43 : 912-917.
- 166) Stan-lotter H, Fendrihan S (2015).** Halophilic *Archaea*: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. Life. 5 : 1487-1496. DOI:10.3390/life5031487.
- 167) Stuti P, Meenu S (2015).** Perspectives and Application of Halophilic Enzymes. In book: Halophiles- Biodiversity and Sustainable Exploitation, Chapter: Perspectives and Application of Halophilic Enzymes, Publisher: Springer, Editors: Dinesh K Maheshwari, Meenu Saraf. Pp : 403-419. DOI: 10.1007/978-3-319-14595-2\_15.
- 168) Thaniyavarn J, Roongsawang N, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S (2003).** Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1239-1244.
- 169) Thavasi R, Sharma S, Jayalakshmi S (2011).** Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. J. Pet. Environ. Biotechnol. S1 : 001. <http://dx.doi:10.4172/2157-7463.S1-001>.

- 170) Thomas DP, William CE (2004).** Biologie cellulaire. Elsevier. Masson. P :115.
- 171) Tindall BJ, Sikorski J, Smibert RM, Kreig NR (2007).** Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In Methods for General and Molecular Microbiology 3rd edn. Editors: Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf G, Schmidt TM, Snyder LR. ASM Press, Washington DC. USA. Pp: 330-393.
- 172) Tindall BJ (1990).** A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovorum* from Various Sources. System. Appl. Microbiol. 13 : 128-130.
- 173) Tindall BJ (2003).** Taxonomic problems arising in the genera *Haloterrigena* and *Natrinema*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1697-1698. DOI:10.1099/ijs.0.02529-0.
- 174) Tugrul T, Cansunar E (2005).** Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. World. J. Microbiol. Biotechnol. 21(7) : 851-853.
- 175) Urum K, Pekdemir T (2004).** Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere. 57(9) : 1139-1150.
- 176) Urum K, Pekdemir T, Copur M (2003).** Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. Trans. IchemE Pt. B. 81 : 203-209.
- 177) Van dyke MI, Lee H , Trevors JT (1991).** Applications of microbial surfactants, Biotechnol. Adv. 9 : 241-252.
- 178) Vandeputte J (2012).** Les agro-tensioactifs. O.C.L. 19 : 133-7.
- 179) Vater J, Kablitz B, Wilde C, Franke P, Mehta N, Cameotra, SS (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.
- 180) Ventosa A, Nieto JJ, Oren A (1998).** Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 504-544.
- 181) Wang w, Bobo C, Zongze S (2014).** Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3. Front.Microbiol.
- 182) Willey J, Sherwood L , Woolverton C, Prescott LM, Coyette J, Mergeay M (2010).** Microbiologie. Traduit par : Jean Dusart. De Boeck Supérieur. P: 1216. ISBN : 2804160122, 9782804160128.
- 183) Willumsen PA, Karlson U (1997).** Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. Biodegradation. 7(5): 415-423.

- 184) Wong JW, Fang M, Zhao Z, Xing B (2004).** Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environ. Qual.* 33: 2015-2025.
- 185) Woolard CR, Irvine RL (1995).** Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Wat. Res.* 29 : 1159-1168.
- 186) Xu Y, Wang Z, Xue Y, Zhou P, Ma Y, Ventosa A, Grant WD (2001).** *Natrialba hulunbeirensis* sp. nov. and *Natrialba chahannaensis* sp. nov., novel haloalkaliphilic *Archaea* from soda lakes in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51 : 1693-1698.
- 187) Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL (1995).** Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1706-1713.
- 188) Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ (2004).** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods.* 56(3):339-347.
- 189) Yun L, Xiang H, Liu J, Meixian Z, Huarong T (2003).** Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles.* 7 : 401. doi:10.1007/s00792-003-0335-6.
- 190) Z, Wang Q, Wang K, Brain K, Liu C (2010).** Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour. Technol.* 101 : 292-297.
- 191) Zinjarde SS, Pant A (2002).** Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J. Basic. Microbiol.* 42 : 67-73.

## **Annexes**

---

## MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS UTILISES

- **Préparation des milieux de cultures**

Tous les ingrédients sont mélangés et additionnés d'eau distillée (q.s.p 1000 ml), la préparation est soigneusement mélangée et chauffé doucement jusqu'à dissolution puis le pH est ajusté. La stérilisation de ces milieux est faites à **120°C / 20 minutes**, pour avoir des milieux de cultures solides, il suffit d'ajouter l'agar agar à une quantité suffisante (Ronald, 1997).

<b>Milieu SG</b>	<b>(g/l)</b>	<b>Test de production de H<sub>2</sub>S</b>	<b>(g/l)</b>
NaCl.....	250g	Proteose peptone.....	5.0g
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	20g	Peptone.....	15.0g
KCl.....	2.0g	Glucose.....	1.0g
Extrait de levure.....	8.5g	Acétate de plomb.....	0.2g
FeSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O.....	0.0023g	Thiosulfate de sodium.....	0.08g
Citrate de Sodium.....	3.0g	NaCl.....	200g
Agar.....	20g	Agar.....	15.0g
pH=7.2 ± 0.2 à 25°C		pH=7.2 ± 0.2 à 25°C	
<b>R.M.V.P.</b>	<b>(g/l)</b>	<b>Milieu Mueller-Hinton II</b>	<b>(g/l)</b>
Peptone.....	5.0g	Hydrolysate de caséine.....	17.5g
Glucose.....	5.0g	Extrait de viande.....	2.0g
Di-potassium phosphate.....	5.0g	Amidon.....	1.5g
NaCl.....	200g	NaCl.....	200g
pH=7.5 ± 0.2 à 25°C		Agar.....	17.0g
		pH=7.3 ± 0.2 à 25°C	
<b>Indole</b>	<b>(g/l)</b>	<b>Milieu à base du rouge de phénol</b>	<b>(g/l)</b>
Tryptone.....	10.0g	Proteose peptone.....	10.0g
NaCl.....	200g	Rouge de phénol.....	0.018g
pH=7.5 ± 0.2 à 25°C		NaCl.....	200g
		pH=7.4 ± 0.2 à 25°C	
<b>Nitrate</b>	<b>(g/l)</b>	<b>Milieu à base de la gélatine</b>	<b>(g/l)</b>
Peptone .....	5.0g	Gélatine.....	240g
Extrait de viande.....	3.0g	Extrait de viande.....	3.0g
Nitrate de potassium.....	1.0g	Peptone.....	5.0g
NaCl.....	200g	NaCl.....	200g
pH=6.9 ± 0.2 à 25°C		pH=6.8 ± 0.2 à 25°C	

<b>Milieu à base de l'amidon</b>	<b>(g/l)</b>	<b>Eau de mer synthétique</b>	<b>(g/l)</b>
Amidon.....	20.g	NaCl.....	27.2g
Extrait de viande.....	3.0g	MgCl <sub>2</sub> .....	2.42g
Tryptose.....	10.0g	KCl.....	0.39g
NaCl.....	200g	CaCl <sub>2</sub> .....	1.17g
Agar.....	15.0g	MgSO <sub>4</sub> .....	3.38g

pH=7.4 ± 0.2 à 25°C

- **Réactifs utilisés pour l'identification**

Les réactifs utilisés dans les méthodes conventionnelles pour la caractérisation des bactéries sont préparés comme il est décrit par [Cappuccino and Sherman, \(1999\)](#).

#### **Violet de Gentiane**

Violet de Gentiane.....	10.0g
Phénol.....	20.0g
Ethanol à 0.95.....	100 cm <sup>3</sup>

#### **Lugol (g/l)**

Iode.....	5.0g
Iodure de potassium.....	10.0g

Le lugol est conservé à l'abri de la lumière dans un flacon brun

#### **Nitrate I**

Acide sulfanilique.....	8.0g
Acide éthanoïque à 1mol.dm <sup>3</sup> .....	1dm <sup>3</sup>

#### **Voges-Proskauer I**

α-naphtol.....	10.0g
ethanol à 0.95.....	100cm <sup>3</sup>

#### **Peroxyde d'hydrogène**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3 volumes

#### **Rouge de phénol 0.02%**

Rouge de phénol.....	2.00g
Ethanol.....	500ml
Eau distillée.....	q.s.p.1L

#### **Fuchsine de Ziehl**

Fuchine de Ziehl.....	10.0g
Phénol.....	50.0g
Ethanol à 0.95.....	100 cm <sup>3</sup>

#### **Réactif de l'oxydase**

Diamine.....	10.0g
Pentanol I.....	q.s.p 1L

Des disques pré-imprégnés peuvent être utilisés.

#### **Nitrate II**

Alpha naphtyl-amine	5.0g
Acide éthanoïque à 1mol.dm <sup>3</sup> .....	1dm <sup>3</sup>

#### **Voges-Proskauer II**

KOH.....	20.0g
----------	-------

#### **kovacs**

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde	50.0g
Acide chlorhydrique.....	250g
Pentanol I.....	750 cm <sup>3</sup>

#### **Rouge de méthyl**

Rouge de méthyl.....	0.1g
Ethanol 95%.....	300ml
Eau distillée.....	q.s.p.0.5L

- **Réactifs utilisés pour la révélation des CCM** (Merck, 1975)

#### Réactif de Dragendorff

En milieu acétique dont la composition est :

Solution mère : Solution (A + B), acide acétique, eau distillée, (2-2-6) v/v.

Solution A : 0,85 g de sous nitrate de bismuth 40 ml eau distillée 10 ml acide acétique glacial.

Solution B : 8 g iodure de potassium 20 ml eau distillée.

#### Réactif periodique de schiff

Fuschine basique < 1% + Acide chlorhydrique < 10% + Métabisulfite de sodium < 1%.

#### Réactif de Ninhydrine

Une solution à 0,2 % dans l'éthanol. chauffage à 105°C pendant 10minutes.

#### Vert de bromocresol

0.1g de vert de bromocresol + 500ml d'éthanol+ 5ml NaOH (0.1M).

#### Acide dodecamolybdophosphoric

250 mg de l'acide molybdato phosphorique + 50ml d'éthanol.

#### Réactif de Molisch

50 ml d'éthanol 95 %

50 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 %

0,25g d'a-naphtol

chauffage à 100°C pendant 3-5 minutes.

#### Réactif à base de phénol et l'acide sulfurique

solution de phénol à 5% (w/v) - acide sulfurique concentré : solution commerciale à 95%.

#### Zinzadze reagent of Dittmer & Lester (1964) : réaction bleu de molybdène.

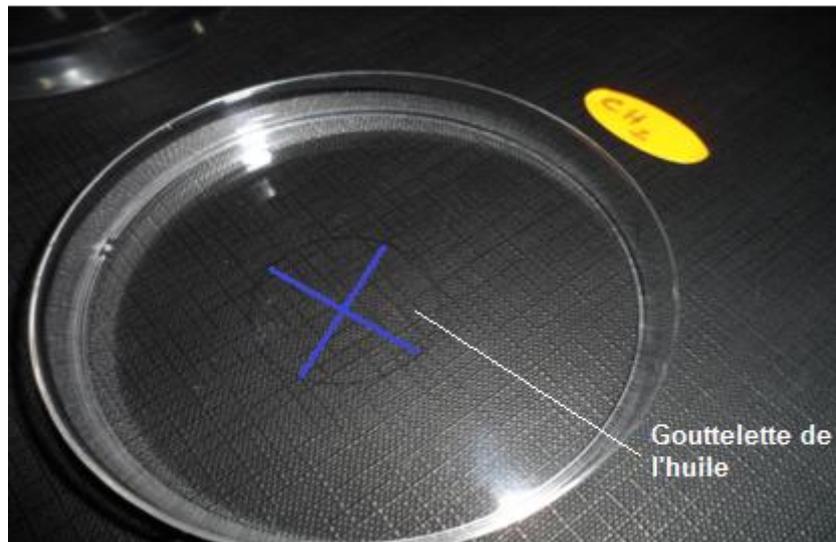
1. Faire bouillir 40,11 g de MoO<sub>3</sub> dans 1 l d'acide sulfurique à 12,5 mol /l, pendant 3 à 4 heures jusqu'à ce que l'oxyde de molybdène soit complètement dissous. Laisser la solution jaune clair refroidir lentement à une température ambiante pendant une nuit, la solution devient bleu clair.

2. Faire bouillir 1,78 g de poudre de molybdène et de 500 ml de la solution 1 pendant 15 minutes, refroidir et décanter. Pour la préparation du réactif de pulvérisation ajouter des volumes égaux des solutions 1 et 2 à 4,5 parties en volume d'eau. Une solution verte foncée est formée. Les solutions 1 et 2 sont stables pendant plusieurs mois lorsqu'elles sont stockées dans l'obscurité, le réactif de pulvérisation doit être préparé pendant la semaine de la manipulation.

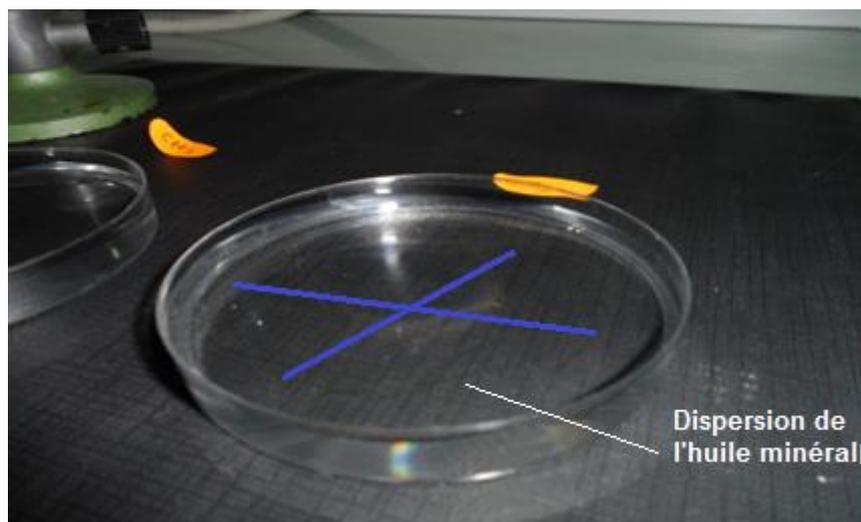
## ILLUSTRATIONS PHOTOGRAPHIQUE



**Figure 1.** Test de l'effondrement de la goutte « Drop collapse assay ».



**Figure 2.** Test de dispersion de l'huile avant l'ajout des biosurfactants.



**Figure 3.** Test de dispersion de l'huile après l'ajout des biosurfactants.

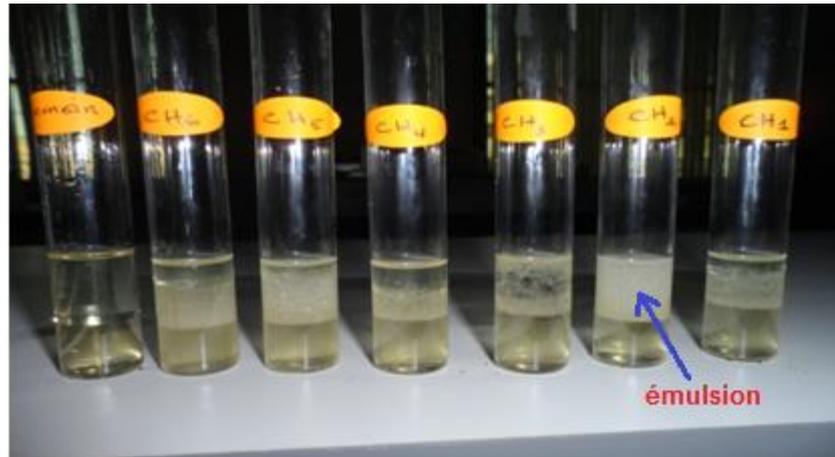
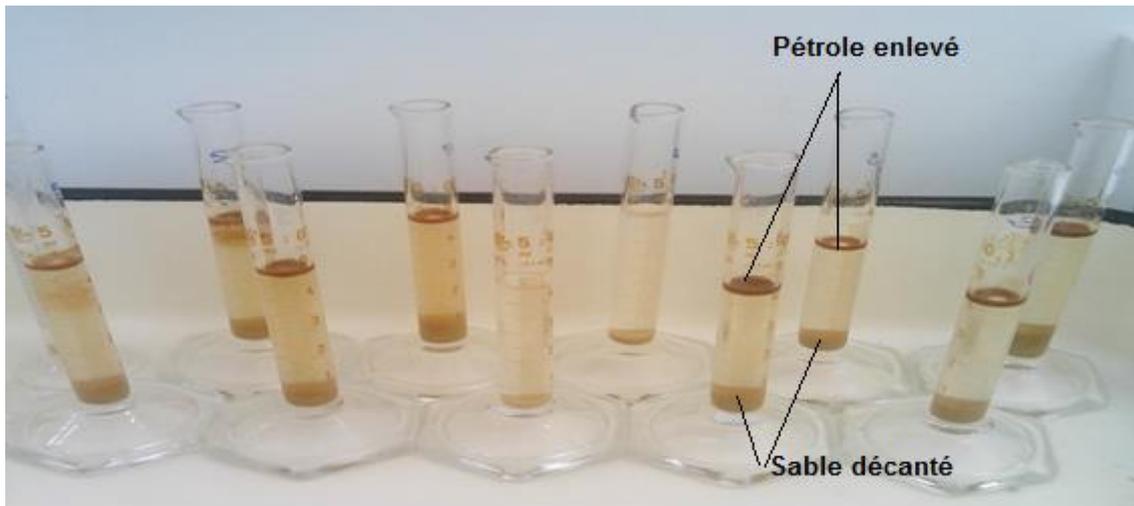


Figure 4. Test d'émulsification pour les six isolats testés.



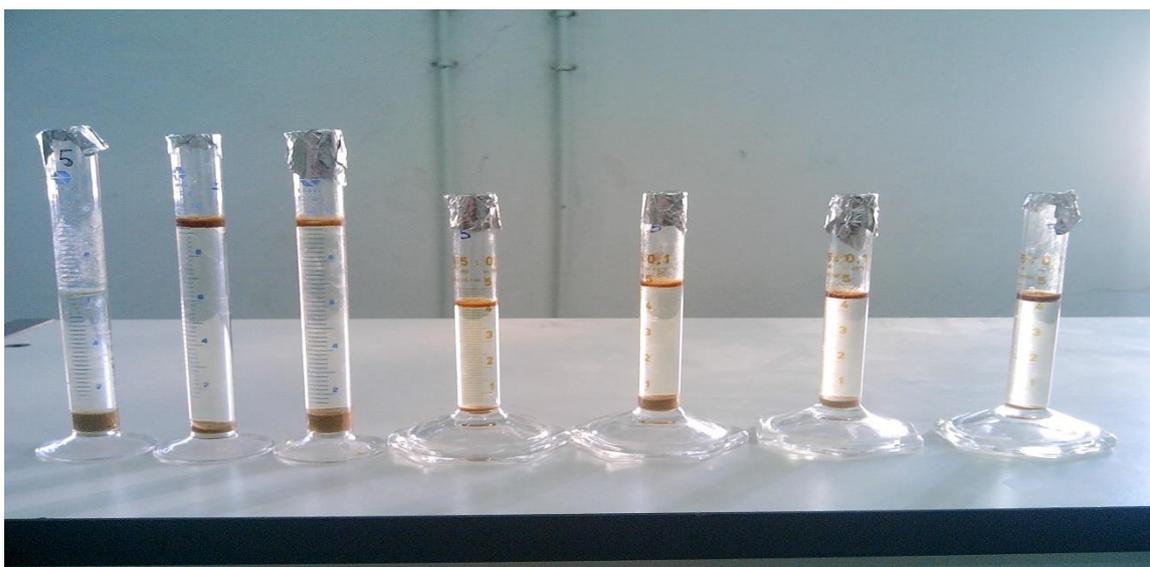
Figure 5 et 6. Tentiomètre (DU NOUI RING METHOD) TD1C LAUDA.



**Figure 7.** Dépollution des sables contaminés par le pétrole après l'ajout des biosurfactants.



**Figure 8.** Résultat de la dépollution des sables contaminés par le pétrole après l'ajout des biosurfactants de l'isolat CH2.



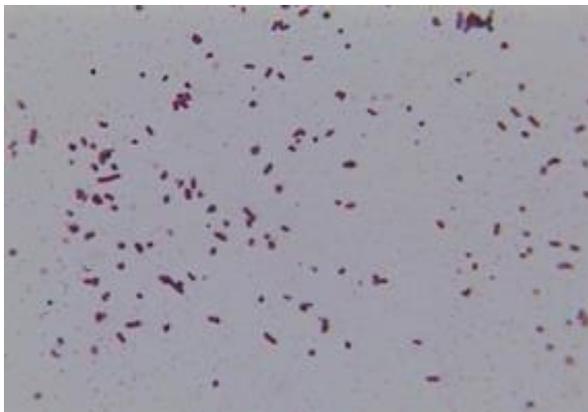
**Figure 9.** Résultat de la dépollution des sables contaminés par le pétrole après l'ajout des biosurfactants de l'isolat CH5.



**Figure 10.** Observation macroscopique de CH2



**Figure 11.** Observation macroscopique de CH5



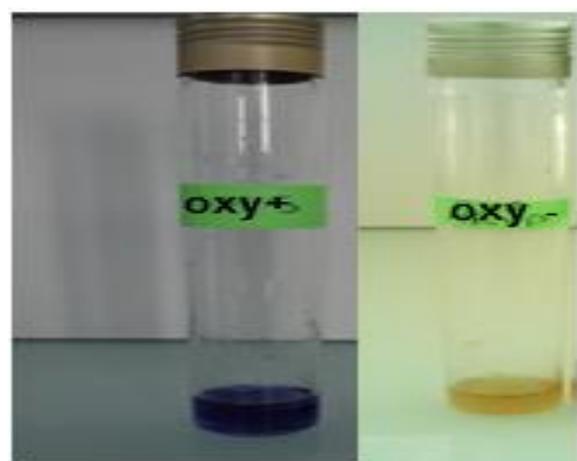
**Figure 12.** Observation microscopique de CH2  
(×100)



**Figure 13.** Observation microscopique de CH5  
(×100)



**Figure 14.** Test de la catalase



**Figure 15.** Test de l'oxydase



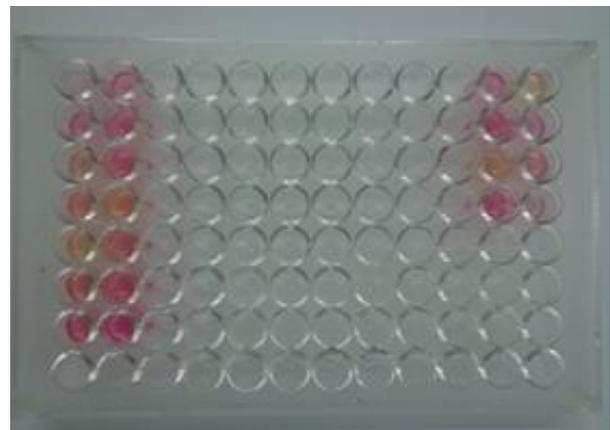
**Figure 16.** Test de MRVP



**Figure 17.** Test de l' $H_2S$



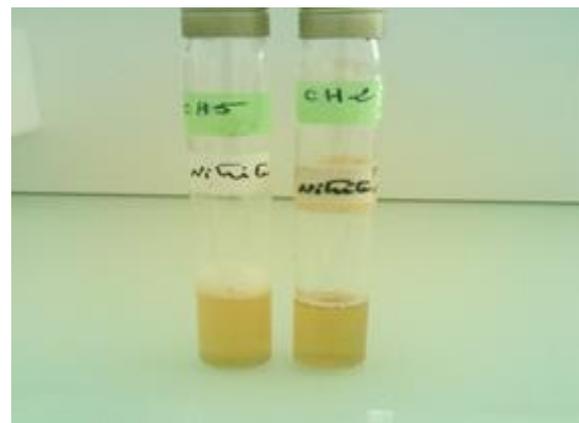
**Figure 18.** Production de l'acide à partir des glucides



**Figure 19.** Dégradation des acides aminés



**Figure 20.** Antibiogramme



**Figure 21.** Test de Nitrate

# Publication

---

Full Length Research Paper

## Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria

ARIECH Mounira<sup>1,2\*</sup> and GUECHI Abdelhadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departement of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, Mohamed Boudiaf University, M'sila, 28000, Algeria.

<sup>2</sup>Departement of Microbiology, Faculty of Natural Sciences and Life, Ferhat Abbas Setif-1-University, Setif, 19000, Algeria.

Received 1 April, 2015; Accepted 25 May, 2015

Biosurfactants are surface active agents with broad range commercial applications in various industries and have considerable advantages over their chemical counterparts. In this study, drop collapse assay, oil spreading assay, emulsification assay and surface tension measurement were compared for their reliability and ease of use to screen biosurfactant producing six extremely halophilic bacteria isolated from saline soil of Chott El Hodna-M'sila (Algeria), which is considered as a thalassohaline environment. Results from screening methods revealed that, CH2 and CH5 strains are potential candidates for biosurfactant production. Among these, there was a very strong negative linear correlation between the emulsification index and surface tension ( $r_s = -0.987$ ) and a strong negative linear correlation between the oil spreading technique and surface tension ( $r_s = -0.971$ ) and a weaker negative correlation between the drop collapse method and surface tension ( $r_s = -0.807$ ), suggesting that strains highly active in any one of these methods were active in other three methods. As every method has its advantages and disadvantages, a combination of different methods is appropriate for a successful screening.

**Key words:** Biosurfactant, drop collapse, emulsification stability, extremely halophilic bacteria, oil spreading, surface tension.

### INTRODUCTION

Biosurfactants are natural surface active agents produced by bacteria, yeast, and fungi, having very different chemical structures and properties (Rone and Rosenberg, 2001; Chen et al., 2007). These biosurfactants are amphiphilic molecules consisting of hydrophobic and hydrophilic domains that find application in an

extremely wide variety of industrial processes involving emulsification, foaming, detergency, wetting, dispersing or solubilization (Rodrigues et al., 2006).

Nowadays, biosurfactants are used in industries as a cosmetic and special chemical substance, food, pharmaceuticals, agriculture, cleansers, enhanced oil recovery

\*Corresponding author. E-mail: [mouniraa63@yahoo.fr](mailto:mouniraa63@yahoo.fr). Tel: +213 779 01 65 57. Fax: +213 35 55 05 24.

and bioremediation of oil-contaminated environments and can be effectively used in numerous processes, including enhanced oil recovery, transportation in pipelines, cleaning of oil storage tanks, refining and product formulation (Urum and Pekdemir, 2004; Mukherjee et al., 2006).

They are potential alternatives of chemically synthesized surfactant in a variety of applications because of their advantages such as lower toxicity, higher biodegradability, better environmental compatibility, lower critical micelle concentration, each of production, ability to be synthesized from renewable resources, higher foaming, higher selectivity, specific activity at extreme temperature, pH and salinity (Chen et al., 2007; Nitscheke and Costa, 2007).

For this reasons a variety of methods for the screening of new biosurfactant producing microbes has been developed and successfully applied. Since the 1970th there have been various trials in this field (Walter et al., 2010). Hence, for efficient detection of potential biosurfactant producers, combination of various screening methods are required which was evaluated during this study.

Thus, the main goal of this study was to introduce novel extremely halophilic bacteria with potential for biosurfactant/bioemulsifier production isolated from saline soils of Chott El Hodna-M'sila (Algeria). The potential of these isolates in producing biosurfactant was examined by drop collapse assay, oil spreading assay, emulsification assay and surface tension measurement.

Finally, this study is considered as a valorization of this environment which is a representative type of wetland in the Mediterranean by the extent of its size and its watershed, its location in the arid zone is another advantage to justify the rarity of this type of natural environment in one piece having undergone little or no significant changes by man.

Chott El Hodna is a model representative of the presence of several types of soil, bioclimates and biological species. For this reason, it was classified as humid zone of international importance by the RAMSAR convention in 2001. It presents a considerable ecological interest and accommodates a large number of animals and plants species diversifies of interest for biodiversity of the region El Hodna (Boumezeur, 2002).

## MATERIALS AND METHODS

### Area study

Chott El Hodna is a shallow saline lake in Algeria; it is located within an endorheic basin in North-Central of Algeria (lat. 35°18'/35°32', long. 4°15'/5°05') (Figure 1). The peripheral zone of this Chott is characterized by wadis and oases which surrounds the central zone of the sebkha with a complete absence of vegetation. The basin of Hodna has an area of 8500 Km<sup>2</sup>, but what is called the Chott has an area of 1100 Km<sup>2</sup> and is located about 400 m above sea level. It gets water only in winter and dry in summer, salt crusts

cover its full extent. Due to the high evaporation, it becomes regularly a desert of salt (Boumezeur, 2002).

### Sample collection and physicochemical analysis

Water samples (200 ml) were collected at 10 cm depth from the water surface with 250 ml sterile flasks. Samples were gathered during the winter season (January). A total of five water samples were collected from this lake, and dispatched on the day of collection in ice box to the laboratory. Physicochemical properties of the samples taken from Chott El Hodna were analysed according to the methods described by Rodier et al. (1996). Chemical properties included compositional estimation of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>: by a complexometric method using ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA), HCO<sub>3</sub> and Cl<sup>-</sup> by a titrimetric method, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> by UV/Vis spectrophotometry (Beckman/DU, 520), Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> by spectrophotometry with flame ionisation (Jenway PEP7) and nitrate by the sodium salicylate method. Physical parameters included pH and temperature measured *in situ* using a portable instrument. In addition, the colour and odour of the lake water were noted. The conductivity was monitored using a conductivity meter (Rodier et al. 1996).

### Isolation of extremely halophilic bacteria

Five saline soil samples were collected in sterile plastic bags from Chott El Hodna-M'sila (Algeria). Each sample was inoculated for enrichment and was streaked on SG medium. This medium contained (g/L): NaCl, 250; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 20; KCl, 2; sodium citrate (trisodium salt), 3; casamino acids, 7.5; yeast extract, 1 and FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.0023. The pH was adjusted to 7.3 with 1 M KOH. For solid medium, 20 g agar/L was added. Plates were incubated at 37°C. After two weeks incubation, representative colonies were transferred to fresh SG medium and isolated in pure culture (Ozkan et al., 2006).

### Screening for haloarchaea

Haloarchaeal strains were selected among all isolates by their susceptibility to antibiotic and a bile acid. They were streaked on the solidified medium containing chloromphenicol at 20 mg/L. The cultures were incubated for ten days at 37°C. Strains that grew on the plates with chloromphenicol were regarded as Haloarchaea (Madalin et al., 2008).

### Characterisation of isolates

Phenotypic characterisation was carried out in accordance with the recommended minimal standards for the description of new taxa in the order *Halobacteriales* (Oren et al., 1997). Cell motility and morphology of exponentially growing liquid cultures were examined using a microscope equipped with phase contrast optics. Colony morphology was observed on agar medium after incubation at 37°C for 10 days. Gram strains were carried out as described by Dussault (1995). Cytochrome oxidase, catalase, nitrate reduction, indol and H<sub>2</sub>S production, hydrolysis of gelatin and starch were determined as explained before (Oren et al., 1997; Ozekan et al., 2007). The optimum salt concentrations for growth were determined in media containing 0-32% NaCl by turbidity measurement, pH from 2-11 and temperature from 0-60°C. Acid production was carried out in a medium with sugars as substrates. Antibiotic susceptibility was tested according to the methods described by Stan-Lotter et al. (2002).

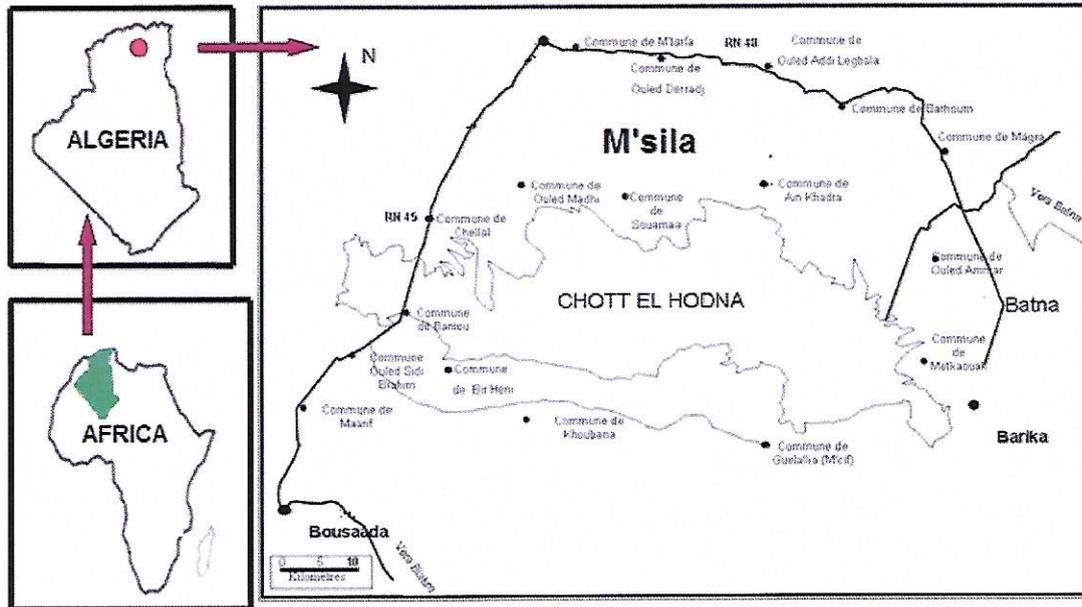


Figure 1. The area study is located in North-Central of Algeria.

#### Screening methods

Biosurfactant producing Haloarchaea were screened by using four methods. Experiments are done in three replicates.

#### Drop collapsing test

A modified oil collapse method was carried out using 96 well microtitre-plates containing 100  $\mu$ l mineral oil, which was equilibrated for an hour at room temperature. 10  $\mu$ l of supernatant of culture broth was added to the surface of a well and the picture captured after 1 min using  $\times 10$  objective lens of a microscope. Biosurfactant production was considered positive when the drop diameter was at least 0.5 mm larger than those produced by distilled water and also by culture medium as negative controls (Plaza et al., 2006; Youssef et al., 2004). The results were interpreted as follows « + » to « ++++ » corresponding to partial to complete spreading on the oil surface. Those cultures that gave rounded drops were scored as negative « - » indicative of the lack of biosurfactant production (Loganathan et al., 2010).

#### Oil spreading test

In oil spreading method, 50 ml of sea water synthetic was added to the large Petri plate (90  $\times$  15 mm) followed by 20  $\mu$ l of crude oil making a thin layer on the surface of the water. A 10  $\mu$ l aliquot of supernatant was delivered onto the surface of oil (Morikawa et al., 2000). The triplicate assays from the same sample were determined (Rodrigues et al., 2006).

#### Emulsification index

After growing in standard for 7 days in an orbital shaker at 160 rpm and 40°C, cells were removed by centrifugation at 12,000  $\times$  g for 5 min at room temperature. 2 ml of the cell-free supernatant was mixed with 2 ml gazoil in a test tube (125  $\times$  15 mm). This mixture

was shaken for 2 min and then left to stand relative emulsion volume (EV,%) and emulsion stability (ES,%) were measured in intervals up to 24 h using the following Equations:

$$EV, \% = \frac{\text{Emulsion height (mm)} \times \text{cross-section area (mm}^2\text{)}}{\text{Total liquid volume (mm}^3\text{)}} \times 100$$

$$ES, \% = \frac{EV, \% \text{ at time } t, h}{EV, \% \text{ at } 0h} \times 100$$

Emulsion formed by the isolates were compared to those formed by a 1% (w/v) solution of synthetic surfactant sodium dodecyl sulfate in deionised water as positive control and with sterile medium as negative control (Kebbouche-Gana et al., 2009). A criterion cited for emulsion stabilizing capacity is the ability to maintain at least 50% of original emulsion volume 24 h after formation (Nasr et al., 2009).

#### Surface tension measurement

The surface tension measurements of cell free supernatant were determined in a tensiometer (TD1C LAUDA). The values reported are the mean of three measurements. All measurements were made on cell-free broth (50 ml) collected at different time intervals after centrifugation (10 000 $\times$ g for 25 min) at room temperature. The criterion used for selecting biosurfactant-producing isolates was the emulsification and the reduction of the surface tension of the medium to below 40 mN m<sup>-1</sup> (Aïnon et al., 2013).

#### Statistical analysis of the correlation between different tests

A general rank correlation test according to Spearman, was conducted to determine the correlation between each of the four methods. The Spearman rank correlation coefficient,  $r_s$  ranged

**Table 1.** Chemical and physical properties of Chott El Hodna Salt Lake compared to other hypersaline and marine ecosystems.

Ecosystem <sup>b</sup>	Chemical and physical properties <sup>a</sup>							
	pH	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
Chott El Hodna- Algeria	8.2	22.4	0.2	5.1	2.2	34.2	0.3	0.3
Dead Sea	6.1	40	8	44	17	225	0.5	0.2
Wadi Natrun (Egypt)	11	142	2.3	< 0.1	< 0.1	155	22.6	67
Great salt Lake	7.7	105.4	6.7	11.1	0.3	181	27	0.72
Sea water	8.1	11	0.4	1.3	0.4	19	3	0.1

<sup>a</sup>Ions are represented as g per litre. For Chott El Hodna : Conductivity of the brine sample was 108300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , ash content was 73.644 g/L and hardness was 725.60 °F. <sup>b</sup>Chemical and physical properties of some hypersaline and marine ecosystems (Gavrieli, 1997 ; Lmhoff et al., 1979; Post, 1981; Copin-Montégut, 1996).

between -1 (strong negative correlation) to +1 (strong positive correlation).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physicochemical properties of brine sample

Chemical and physical properties of brine sample taken from Chott El Hodna were compared to other hypersaline and marine ecosystems (Table 1). The results obtained indicate that the mineral content, pH and hardness of brine are suitable for the growth of haloarchaea.

As there is no previous description about a physical and chemical property of Chott El Hodna, these few tests was conducted to understand an outline of ecological condition where halophilic microbes were thriving. Chott El Hodna saline environment was an ideal habitat for haloarchaea and other halophiles, which were well adapted to gradual changes in Chott El Hodna ecosystem and was formed by ecological changes during last hundreds of years of evolution. The presence of all ions and a relatively high Mg<sup>2+</sup> ion content (Table 1) enhances the natural enrichment of Haloarchaea (Bolhuis et al., 2006). But it contains about 73 and 74 g/L salts, approximately three times lower than the salinity of the Dead Sea, which is a source of extremely halophilic archaea. Typically, salt concentrations of 100 to 150 g/L are required for structural stability and viability of members of the Halobacteriaceae. Exposure to lower concentrations, even for short periods, leads to denaturation of the cells' proteins, including the glycoprotein cell wall present in most species, and the cells lyse. Still, there are reports of the isolation of Haobacteriaceae from low-salt environments, and some members have a surprising ability to survive exposure to low salt for prolonged periods. Isolates affiliated with the genera *Halococcus*, *Haladaptatus* and *Halogeometricum* obtained from a traditional Japanese salt field survived prolonged suspension at 50 g/L salts, and cells of an isolate related to *Haladaptatus paucihalophilus* even retained viability after nine days at 30 g/L (Fukushima et al., 2007).

To gain deeper understanding of Chott El Hodna salt lake, physicochemical properties of brine sample were determined, including pH, conductivity and ion composition (Table 1). The results indicate that the mineral content is dominated by chlorides (34.2 g/L) among the anions and sodium, magnesium and calcium among the cations (22.4 g/L, 5.1 g/L, and 2.3 g/L) respectively, which explains the slightly alkaline pH (8.2) of these lakes. As these environments result from evaporation of sea water (Oren, 2006), compared to the above, we can deduce that Chott El Hodna part of thalassohaline environment.

### Extremely halophilic strains

In the current study six halophilic strains isolated from saline soil samples named CH1, CH2, CH3, CH4, CH5, CH6, were phenotypically characterized (Table 2), and compared with strains described previously by Oren, (2014). The strains studied belong to the family of *Halobacteriaceae*, order *Halobacteriales*. These strains were screened for biosurfactant production and emulsification activity.

### Screening of biosurfactant production

The primary screening of biosurfactant producing halophilic archaea was carried out using, drop collapse and oil spreading techniques. Selecting of these methods was due to their strong advantages including simplicity, low cost, quick implantation and use of relatively common equipment that is accessible in almost every microbiological laboratory. Results obtained from various screening protocols are mentioned in Table 3 and Figure 2 (A, B and C.)

### Drop collapse method

Jain et al. (1991) suggested the use of the drop collapse method as a sensible and easy to perform method which requires a small volume (5-10  $\mu\text{l}$ ) of culture broth or

**Table 2.** Features of the extremely halophilic strains.

Characteristics	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6
<b>Colony morphology</b> (shape, relief, contour, size, and color)	Round Flat Regular Little Cream	Round Cambered Regular Big White	Round Flat Regular Little Orange	Round Cambered Regular Little Orange	Round Cambered Regular Little Translucent	Round Cambered Regular Big Translucent
Cell morphology	Rods	Short rods	Rods	Rods	Rods	Cocci
Gram reaction	-	-	-	-	-	-
Motility	+	+	-	-	-	-
<b>Physiology</b>						
NaCl tolerance (%)	8-25	8-25	20-25	20-25	8-32	15-25
pH tolerance	7-9	5-9	7-8	7-9	5-9	7-8
T° tolerance (°C)	10-45	25-45	25-45	35-45	25-50	35-45
<b>Biochemical tests</b>						
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+	+	+
Test (MR)	+	+	-	-	+	+
Test (VP)	-	-	-	-	-	-
Indol production	-	-	-	-	-	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	-	+
Hydrogen sulfide test	-	+	-	-	-	+
<b>Acid production from</b>						
Mannose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	+	-	+	-	-
Fructose	-	+	+	+	-	+
Galactose	-	+	+	-	-	+
Xylose	+	+	+	+	-	-
Arabinose	-	+	-	-	+	-
mannitol	-	+	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
<b>Hydrolysis of</b>						
Gelatin	-	-	-	-	+	-
Starch	-	-	ng	ng	-	ng
<b>Sensitivity to antimicrobial agents</b>						
Penicilline	R	R	R	R	R	R
Ampicilline	R	R	R	R	R	R
Novobiocine	S	R	S	S	S	S
Bacitracine	S	R	S	S	S	S
Rifampicine	R	R	R	S	S	R
Anisomycine	S	S	S	S	S	S
Chloromphenicol	R	S	R	R	R	R

R, resistance; S, sensible; ng, no growth.

biosurfactant solution to test the surfactant property. In addition, it can be performed in Microplates (Tugrul and

Cansunar, 2005). This assay has been applied several times for screening purposes (Batista et al., 2006; Bodour

Table 3. Drop-collapse test.

Strain	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5	CH6
Motor oil	++	++++	+	+++	++++	++
Corn oil	++	++++	+	++	++++	+
Olive oil	+	++++	+	++	++++	+

Flat drops with a scoring system ranging from (+) to (++++), corresponding to partial to complete spreading on the oil surface, rounded drops were scored as negative (-) indicative of the lack of biosurfactant production. Sterilized standard medium used as negative control (-) and a solution of 1% SDS used as positive control (++++).

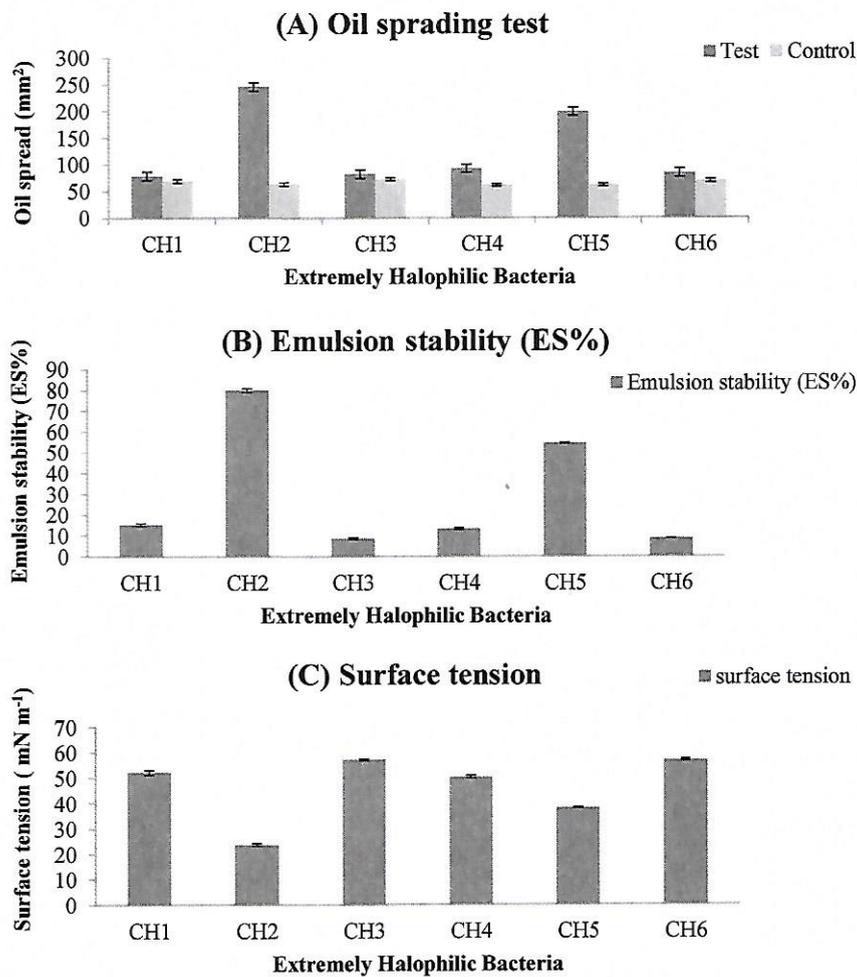


Figure 2. Oil spreading test, emulsion stability and surface tension of culture media without cells and relative volume of emulsions formed between cell culture media and diesel oil after growth of bacteria strains in standard medium for 7 days at 40°C and 200 rpm. Oil dispersion was expressed as mm<sup>2</sup> using the sterile standard medium as control (A); emulsion stability was as a percentage (B) and surface tension was expressed as mN m<sup>-1</sup>(C). Values reported are average of three replicates.

et al., 2003; Plaza et al., 2006). The results of our experiments indicate that all strains tested positive for biosurfactant in the drop-collapse test reduced as shown

as Table 3. Motor oil proved better to work with than olive oil and corn oil. Since, it has caused spreading of the sterilized standard medium used as negative control and

produced plates in which drop diameter was most readily estimated, an important factor given this test is based on visual observation.

In this experiment, cell free culture broth was used as the biosurfactant source. For strains which produce extracellular biosurfactant there was a drop collapse activity and four strains which do not produce biosurfactant the results were negative, which also inferred that to check the biosurfactant production of any microbial strain, cell free culture broth should be used instead of using culture broth with cells. This criterion will exclude microbial strains having high cell hydrophobicity but no biosurfactant production. Accuracy and reliability of results obtained in the drop collapse assay in this study were similar to the results reported by Kebbouche-Gana et al. (2009). The isolates with more than one positive response were exposed to complementary screening. The latter screening stage included surface tension and emulsion activity measurements.

To further confirm the biosurfactant production of the above strains with positive and negative results, cell free culture broth from all six archaeal strains was subjected to oil spreading, emulsion stability and surface tension measurement experiments.

#### Oil spreading assay

Oil spreading assay results were in corroboration with drop collapse assay results. Strains found with positive drop collapse results were positive for oil spreading assay also (Table 3 and Figure 2A). These results confirmed the presence (for strains with positive results) and absence (for strains with negative results) of surface active compounds (biosurfactant) in the cell free culture broth. Morikawa et al. (2000), reported that the area of oil displacement in an oil spreading assay is directly proportional to the concentration of the biosurfactant in the solution. However, in this study there was no quantitative study conducted on biosurfactant concentration versus oil spreading activity, but a qualitative study to check the presence of biosurfactant in the cell free culture broth was in concurrence with the above mentioned earlier report. Similar results with drop collapse and oil spreading assay was reported by Youssef et al. (2004), while screening bacteria from biosurfactant production and also recommended that both drop collapse and oil spreading assay methods as reliable techniques for testing biosurfactant production. These results suggested that the oil-spreading technique is more sensitive than the other methods for biosurfactant detection in the supernatant from a culture medium.

#### Emulsification capacity assay

According to Willumsen and Karlson (1997), a criterion

used for selecting biosurfactant producers is the ability to maintain at least 50% of the original emulsion volume 24 h after formation. The results observed in this study (Figure 2B) reveal that from six strains screened, two (33.33%) strains showed positive emulsification activity. CH2 and CH5 strains showed that the relative emulsion stability formed:  $80.00 \pm 1.0\%$  and  $54.39 \pm 0.2$ , respectively. Evaluating the emulsification capacity is a simple screening method suitable for a first screening of biosurfactant producing microbes. It is applied in many screenings (Chen et al., 2007), whereas, the Kerosene can be replaced with other hydrophobic compounds. In this study, gas oil was used as the hydrophobic substrate. Consequently, this method gives just an indication of the presence of biosurfactants.

#### Surface tension measurement

According to Bodour and Maier (1998), the criterion used for selecting biosurfactant producers is the ability to reduce the surface tension below  $40 \text{ mN.m}^{-1}$ . Surface tension measurement of cell free culture broth revealed that out of the six strains screened, two (33.33%) strains (CH2 and CH5) showed reduction in surface tension and the highest reduction was observed up to  $23.7 \pm 0.5$  and  $38.1 \pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectively (Figure 2C). There was a direct correlation found between drop collapse, oil spreading, emulsification stability and surface tension assays. Strains highly active in any one of these methods were active in other three methods. The direct measurement of the surface activity of the culture supernatant is the most straight forward screening methods. This gives a strong indication on biosurfactant production (Lin, 1996; Thavasi et al. 2011).

#### A comparison of the four methods using statistical analysis

Table 4 shows the coefficient of correlation between the four methods that were used to detect biosurfactant production. The Spearman rank correlation, ( $r_s = -0.987$ ) showed a strong negative correlation between the emulsification index with measurement of emulsion stability in intervals up to 24 h and surface tension. A weaker negative correlation, ( $r_s = -0.971$ ) was detected between the diameter of clear zone obtained with the oil spreading technique and surface tension. However, there was a weak negative correlation ( $r_s = -0.807$ ) between drop collapse method and surface tension. Oil spreading technique and emulsification stability method were strongly correlated with Spearman rank correlation coefficient of  $r_s=0.991$ . However, a weak correlation was detected between drop collapse method and oil spreading method ( $r_s=0.864$ ) and between drop collapse technique and emulsification stability method ( $r_s=0.822$ ).

Table 4. Statistical correlation between different methods.

Spearman rank correlation coefficient ( $r_s$ )	Drop collapse	Oil spreading	Emulsification stability	Surface tension
Drop collapse	1			
Oil spreading	0.864	1		
Emulsification stability	0.822	0.991	1	
Surface tension	-0.807	-0.971	-0.987	1

## Conclusion

Interest in biosurfactants has led to the development of a multitude of methods for the screening of biosurfactant producer strains. A combination of different methods is appropriate for a successful screening. In the present study two superior haloarchaea isolates CH2 and CH5 with biosurfactant-producing ability and the former with emulsion capacity were isolated from saline soil of Chott El Hodna-M'sila (Algeria). Their ability to reduce surface tension and emulsion capacity makes them new potential candidates for biosurfactant and bioemulsion production. Further studies have been initiated to identify their properties and consequently determine the potential of their different industrial applications in particular enhanced oil recovery application.

## Conflict of interests

The authors did not declare any conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. The authors would like to acknowledge all those who contributed directly or indirectly in the development of this work.

## REFERENCES

- Ainon H, Noramiza S, Shahidan R (2013). Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *Sains Malays*. 42(5):615-623.
- Batista SB, Mounter AH, Amorim FR, Totola MR (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol*. 97(6):868-875.
- Bodour A, Drees K, Maier R (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl. Environ. Microbiol*. 69(6):3280-3287.
- Bodour A, Miller-Maier R (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 32(3):273-280.
- Bolhuis H, Palm P, Wende A, Falb M, Rampp M, Rodriguez-Valera F (2006). The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genome* 7:169.
- Boumezeur A (2002). Atlas 2: Algerian wetlands of international importance. Direction Generales des Forets, Ben Aknoun, Algeria pp. 14-17.
- Chen C, Baker S, Darton R (2007). The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J. Microbiol. Methods* 70(6): 503-510.
- Chen SY, Wei YH, Chang JS (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 76(1):67-74.
- Copin-Montegut G (1996). *Sea Water Chemistry*. Ocean Institut, Paris. pp. 319.
- Dussault HP (1995). An Improved Technique for Staining Red Halophilic Bacteria. *J. Bacteriol*. 70(4):484-485.
- Fukushima T, Usami R, Kamekura M (2007). A traditional Japanese-style salt field is a niche for haloarchaeal strains that can survive in 0.5% salt solution. *Saline Systems* 3:2.
- Gavrieli I (1997). Halite deposition in the Dead Sea: 1960-1993. In: *The Dead Sea- the lake and its setting*. Oxford Univ. Press. pp.162 -171.
- Jain D, Collins-Thompson D, Lee H, Trevors JT(1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 13(4):271-279.
- Kebbouche-Gana S, Gana ML, Khemili S, Fazouane-naimi F, Bouanane NA, Penninckx M, Hacene H (2009). Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 36(5): 727-738.
- Lin SC (1996). Biosurfactants: Recent advances. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 66(2):109-120.
- Lmhoff J, Sahl H, Soliman G, Truper H (1979). The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiol. J*. 1(3): 219 - 234.
- Loganathan K, Gaurav K, Kokati V, Bhaskara R (2010). Comparison of methods and screening of biosurfactant producing marine actinobacteria isolated from Nicobar marine sediment. *Environ. Biotechnol. Div*. 2(1):34-38.
- Madalin E, Takashi I, Masahiro K, Gabriela P, Lucia D (2008). Halophilic archaea of *Haloperax* genus isolated from Anthropocentric Telega (PALADA) salt lake. *Proc. Rom. Acad*. 1-2:11-16.
- Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T (2000). A study on the structure function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1488(3):211-218.
- Mukherjee S, Das P, Sen R (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol*. 11:509-515.
- Nasr S, Soudi M R, Mehria M R , 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.
- Nitscheke M, Costa SG (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends Food. Sci. Technol*. 18(5): 252-259.
- Oren A (2006). Life at Haigh Salt Concentrations in: *Prokaryotes*. Springer 2: 263-282.
- Oren A (2014). The Family *Halobacteriaceae* in: *Prokaryotes*. Springer. pp. 41-121. [http:// dx. doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2\\_313](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_313)
- Oren A, Ventosa A, Grant WD (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int. J. Sustain. Bacteriol*. 47(1): 233-238.
- Ozcan B, Cokmus C, Coleri A, Caliskan M (2006). Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. *Mikrobiologija* 75(6): 849-856.

- Ozekan B, Ozcengiz G, Coleri A, Cokmus C (2007). Diversity of Halophilic Archaea from Six Hypersaline Environments in Turkey. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(6):985-992.
- Plaza GA, Zjawiony I, Banat IM (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *J. Pet. Sci. Eng.* 50(1):71-77.
- Post FJ (1981). Microbiology of the Great Salt Lake north arm. *Hydrobiology* 81-82(1):59-69.
- Rodier J, Bazin C, Broutin JC, Chambon P, Champsaur H, Rodi L (1996). Analysis of the water. *Dun. Par.* pp. 50-85.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R (2006). Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chem.* 57(2):609-618.
- Rodrigues LR, Teixeira JA, Mei HC, Oliveira R (2006). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B.* 49(1):79-86.
- Rone EZ, Rosenberg E (2001). A Review of Natural Roles of Biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3(4):229-236.
- Stan-Lotter H, Pfaffenhuemer M, Legat A, Busse HG, Radax C, and Gruber C (2002). *Haloococcus dombrowskii* sp. nov., an Archaeal Isolat from a Permian Alpine Salt Deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(5):1807-1814.
- Thavasi R, Sharma S, Jayalakshmi S (2011). Evaluation of Screening Methods for the Isolation of Biosurfactant Producing Marine Bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* S1:001. <http://dx.doi:10.4172/2157-7463.S1-001>.
- Tugrul T, Cansunar E (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 21(7):851-853.
- Urum K, Pekdemir T (2004). Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57(9):1139-1150.
- Walter V, Syldatk C, Hausmann R (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672:1-13
- Willumsen PA, Karlson U (1997). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Biodegradation* 7(5):415-423.
- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInemey MJ (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 56(3):339-347.

## « تشخيص البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة المعزولة من شط الحضنة-المسيلة، والمنتجة للجزيئات الحيوية . » ملخص

*Haloarchaea* هي بكتيريا أثرية محبة للملوحة توجد ضمن رتبة وعائلة وحيدتين، تدعى *Halobacteriale* و *Halobacteriaceae* على التوالي. تعيش في الأوساط ذات التركيز العالي من الملح (كلورور الصوديوم <1.5 مول). حاليا البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، لها أهمية كبيرة بفضل قدرتها على إنتاج المنشطات الحيوية للسطح التي لها تطبيقات هامة في مختلف ميادين الحياة ، و ذلك لخصائصها الوظيفية كالحالطية و التخفيض من التوتر السطحي . في هذا العمل قمنا بانتقاء القدرة على إنتاج منشطات حيوية للسطح بواسطة سلالات بكتيرية أثرية محبة للملوحة القسوى معزولة من التربة المالحة لسط الحضنة- المسيلة، باستعمال أربعة اختبارات. جميع النتائج أظهرت أن العزلتين CH2 و CH5 نشطتين وقادرتين على إنتاج منشطات حيوية للسطح خارج الخلية، وذلك في نهاية المرحلة الثابتة من النمو و التي تبدي استقرارا أثناء التغيرات في درجة الحرارة، الأس الهيدروجيني، ودرجة الملوحة. إن التراكيـز المذيـليـة الحرجة للمنشطات الحيوية للسطح، المنتجـة من طرف العزلتين CH2 و CH5، تعتبر منتجات جد نشطة تقدر ب :  $CMC_{CH2}=280 \text{ mg/l}$  و  $CMC_{CH5}=80 \text{ mg/l}$ . كما أظهر تحقيق الشروط الفيزيوكيميائية والغذائية الأمثل لإنتاج المنشطات الحيوية للسطح، ارتفاعا للنسبة المئوية لانخفاض التوتر السطحي للعزلتين، يرافقه انخفاضا للتوتر السطحي للعزلتين وارتفاعا لمردود إنتاج لهذه المنشطات الحيوية للسطح. أفضل النتائج كانت:  $TS_{CH2}=20.66\pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$  للعزلة CH2، قيمة مقابلة للنسبة المئوية لانخفاض التوتر السطحي :  $RTS_{CH2}=68.54\pm 0.7\%$  وكذا بالمثل للعزلة CH5، حيث جاءت أفضل النتائج كما يلي :  $RTS_{CH5}=48.52\pm 0.5\%$ ، وهي القيمة التي توافق  $TS_{CH5}=35.67\pm 0.2 \text{ mN.m}^{-1}$ . إن تشخيص هذه الجزيئات بواسطة تقنية GC-MS خلص أن المنشطات الحيوية للسطح المنتجة من طرف CH2 و CH5 أنها تتكون أساسا من الأحماض الدهنية، كما أنها قادرة على تطهير الرمال الملوثة بالنفط (البترو) بنسبة 100% وذلك باستخدام المعلق البكتيري أو  $CMC$  2 بنسبة 98%.

العزلتين النشطتين للغاية، كانتا محل تصنيف متعدد الأطوار (مورفولوجي، بيوكيميائي، فيزيولوجي، التحليل الكيميائي للجدار الخلوي وتحليل ADNr16S). أثبتت النتائج المحصل عليها أن السلالة CH5، تنتمي إلى مجموعة البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، وأنها متقاربة مع السلالة *Natrinema gari* بنسبة 99.4%.

**الكلمات المفتاحية**  
البكتيريا الأثرية المحبة للملوحة، المنشطات الحيوية للسطح، إزالة التلوث، مستحلب، انتقاء، التوتر السطحي.

### « Identification des *Archaea* halophiles isolées du Chott El Hodna-M'sila, productrices des biomolécules. »

#### Résumé

Les *Haloarchaea* sont des *Archaea* halophiles, inclus dans un ordre et une famille uniques, nommés *Halobacteriales* et *Halobacteriaceae*, respectivement. Elles survivent dans les milieux à très fortes concentrations en sel ( $NaCl > 1,5M$ ).

Actuellement, les *Haloarchaea* présentent un grand intérêt grâce à leur capacité de produire les molécules bioactives telles que les biosurfactants qui ont des applications très importantes dans divers domaines de la vie ; vue les propriétés fonctionnelles de ces molécules, dont les propriétés d'emulsification et la réduction de la tension superficielle.

Dans le présent travail, nous avons effectué un screening de la capacité de produire les biosurfactants par six isolats des bactéries halophiles extrêmes, isolées des sols salins de Chott El Hodna-M'sila, en utilisant quatre tests. Tous les résultats montrent que les isolats CH2 et CH5, sont actifs et capables de produire à la fin de la phase stationnaire de croissance, des biosurfactants extracellulaires, qui demeurent stables aux variations de la température, du pH et de la salinité . Les concentrations micellaires critiques déterminées sont :  $CMC_{CH2}=280 \text{ mg/l}$  et  $CMC_{CH5}=80 \text{ mg/l}$ .

L'optimisation des conditions physico-chimiques et nutritionnelles qui influencent la production des biosurfactants a donné les meilleurs résultats à savoir un  $RTS=68.54\pm 0.7\%$  pour l'isolat CH2 ; une valeur qui correspond à une  $TS_{CH2}=20.66\pm 0.1 \text{ mN.m}^{-1}$ . De même pour l'isolat CH5, les meilleurs résultats obtenus sont les suivants :  $RTS_{CH5}=48.52\pm 0.5\%$  ; une valeur qui correspond à une  $TS_{CH5}=35.67\pm 0.2 \text{ mN.m}^{-1}$ .

L'identification de ces molécules par GC-MS a permis de conclure que les biosurfactants produits par l'isolat CH2 et CH5 sont constitués essentiellement d'acides gras. Ces biosurfactants demeurent capables de décontaminer les sables pollués par le pétrole, en utilisant le moût de fermentation ou les biosurfactants à 2 CMC avec un pourcentage d'élimination de 100% avec un pourcentage d'ellimination de 98%.

Les deux isolats fortement actifs ont fait l'objet d'une taxonomie polyphasique (caractérisation morphologique, biochimique, physiologique, chimiotaxonomique et séquençage de l'ADNr16S). Les résultats obtenus ont montré que l'espèce CH5 faisant partie du domaine des *Archaea*, la souche CH5 est rapprochée à l'espèce *Natrinema gari* avec un pourcentage de similarité de 99,4%.

#### Mots clés

*Archaea* halophiles, biosurfactants, dépollution, émulsion, screening, tension superficielle.