

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أمحمد بوقرة - بومرداس
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA - BOUMERDES



Faculté Des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Science de la nature et de la vie.

Filière : Biotechnologie.

Spécialité: Biotechnologie microbienne.

THEME

**Évaluation de la production de biosurfactants par
*Bacillus thuringiensis***

Présenté par :

M^{lle} MEGHNI Mounira
M^{lle} MELLAH Zineb
M^{lle} ZITOUNI Asma

Devant le jury :

M ^r BOUZID M.	Professeur	à l'UMBB	Président
M ^{me} SAHIR-HALOUANE F.	Professeur	à l'UMBB	Encadreur
M ^{me} GANA-KEBBOUCHE S.	Professeur	à l'UMBB	Examinatrice

Année Universitaire 2019/2020

Remerciements

Nos remerciements vont d'abord au Créateur de l'univers qui nous a doté d'intelligence, de courage, et nous a maintenu en santé d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Nous exprimons nos profonds remerciements à notre promotrice Madame **SAHIR- HALOUANE F**, pour son suivi, son aide, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.*

*Nous tenons également à remercier les membres du jury, **Mr BOUZID M**.
Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire,
Mme GANA-KEBBOUCHE S. D'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

Nos remerciements s'étendent aussi à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation.

*Bref un merci aux personnes que nous avons
Peut-être oublié de citer.*

Dédicace



J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail :

À mon Père, aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer, mon respect et ma considération pour tous les sacrifices qu'il a consenti pour mon instruction, ma réussite et mon bien être.

À ma Mère pour son soutien et encouragement.

À ma grand -mère, qui ne m'a jamais oublié avec ses prières.

À mes sœurs et ma cousine sabrina.

À tous mes professeurs.

À tous mes collègues et amis.

À toute la promotion de biotechnologie microbienne 2019/2020.

Asma

Dédicace

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

Je dédier ce mémoire :

A mes très chers parents avec toute ma reconnaissance.

A mon cher père AREZKI : *tu m'as toujours appris le sens de la responsabilité*

De la raison du devoir et de la confiance en soi.

Aucune dédicace ne peut exprimer mon profond amour, ma sincère gratitude

Et ma profonde reconnais pour les sacrifices que tu as consentis.

A ma chère mère FATMA : *pour tous les sacrifices que tu as consentis à*

Mon égard et dont je suis à jamais redevable pour ton grand amour,

Ta tendresse et tes encouragements.

Que dieu te garde et t'accorde longue vie et bonheur.

A mon frère et mes sœurs.

*A mon grand-père et mes oncles **Mohamed** et **Amar***

A toute la famille.

A tous mes amies et collègues de la promotion.

Mounira

Dédicace

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur
Soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

A mon cher grand père... pour son appui et son encouragement,

*A mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur
soutien moral,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de
votre soutien infaillible,*

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes Moments les plus difficiles.

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde
reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

Zineb

Table des matières

Table des matières

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

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

Chapitre I: Étude bibliographique

I. <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
I.1.Caractéristiques générales sur <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
I.2.Classification de <i>Bt</i>	4
I.3. Cycle de vie de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
I.4.Les toxines et métabolites secondaires produites par <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
I.4.1.β –exotoxines.....	6
I.4.2. δ-endotoxines.....	6
• Les protéines Cry.....	6
• Les protéines Cyt.....	7
I.4.3. Les Protéines insecticides végétatives (VIP).....	7
I.4.4. Les enzymes.....	7
I.4.4.1. Chitinases.....	7
I.4.4.2.Protéases.....	7
I.4.4.3.Phospholipase C.....	8
I.5.Intérêt de <i>Bacillus thuringiensis</i> dans la lutte biologique.....	8

II. Les Biosurfactants.....	8
II.1.Définition.....	8
II.2.Classification et des différents types des biosurfactants.....	9
II.2.1.Glycolipides.....	9
II.2.2. Lipopeptides et lipoprotéines.....	11
II.2.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres.....	11
II.2.4. Biosurfactants polymériques.....	12
II.2.5. Biosurfactants particuliers.....	12
II.3.Propriétés fonctionnelles des biosurfactants produits par <i>Bacillus</i>	13
II.3.1.Activité de surface et d'interface.....	14
II.3.2. Émulsification/ Désémulsification.....	14
II.3.3.Mouillage.....	14
II.3.4.Moussage.....	14
II.3.5.Adsorption.....	15
II.3.6.Détergence et dispersion.....	15
II.3.7.Floculation.....	15
II.3.8.Réduction de la viscosité.....	15
II.3.9.Solubilisation.....	16
II.3.10.Inhibition de la corrosion.....	16
II.3.11.Tolérance à la température, au pH et à la force ionique.....	16
II.4.Rôle physiologique des biosurfactants dans les microorganismes.....	16
II.5.Avantages des biosurfactants.....	17
II.6.Paramètres influençant la production des Biosurfactants.....	18

II.6.1.Source de carbone.....	18
II.6.2.Source d'azote.....	18
II.6.3.Facteurs environnementaux.....	19
II.6.4.Aération et agitation.....	19
II.6.5.Concentration en sel.....	19
II.7.Applications des biosurfactants.....	19
➤ Biosurfactants comme biopesticide.....	23

Chapitre II : Matériel et méthodes

II .1. Matériel utilisé.....	24
II .1.1. Matériel non biologique et équipements.....	24
II .1.2. Matériel biologique.....	24
II .2. Méthodes.....	24
II .2.1.Revivification et purification de la souche bactérienne	24
II .2.2.Ré-identification de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
II .2.2.1. Etude des caractères culturels et mobilité.....	24
II .2.2.2. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire.....	27
II .2.2.3. Mise en évidence de la spore.....	28
II .2.2.4. Tests biochimiques en faveur de l'identification de l'espèce de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
II.2.3. Conduite de la fermentation.....	33
➤ Mise en évidence de la production de biosurfactants.....	33
II.2.4. Recherche de la production de biosurfactants.....	34

II.2.4.1. Test de dispersion d'huile	34
II.2.4.2. Test de Drop Collapse (Test d'effondrement de la goutte).....	34
II.2.4.3. Test d'émulsification.....	34
II.2.5. Extraction des biosurfactants.....	35

Chapitre III : Résultats et discussions bibliographiques

III.1. Revivification et purification de la souche bactérienne.....	36
III.2. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire.....	37
III.3. Mise en évidence de la spore.....	38
III.4. Tests biochimiques en faveur de l'identification de l'espèce de <i>Bacillus thuringiensis</i>	38
III.5. Recherche de la production de biosurfactants.....	43
Conclusion.....	45

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des Figures

Figure 01 : Cristaux de protéines mélangés à des spores de <i>Bt</i>	3
Figure 02 : <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopie en contraste de phase ; a:spore ; b : inclusion parasporale ; c : filament.....	3
Figure 03 : Représentation schématique de la formation de l'endospore au cours de la phase de sporulation de <i>Bt</i>	5
Figure 04 : Structure schématique d'un tensioactif.....	9
Figure 05: Structures chimiques des biosurfactants les plus étudiés (a) Lipides mannosylerythriales (b) Surfactine (c) Tréhalolipide (d) Sophorolipide (e) Rhamnolipides (f) Emulsane.....	10
Figure 06 : Structure chimique de différents biosurfactants produits par <i>Bacillus</i>	11
Figure 07 : Représentation des différents propriétés fonctionnelles des biosurfactants : (A) tension superficielle ; (B) tension superficielle et interfaciale ; (C) Émulsification ; (D) Désémulsification ; (E) Mouillage ; (F) Moussage ; (G) Adsorption.....	13
Figure 08 : Les différentes étapes de coloration de Gram.....	26
Figure 09 : Aspect macroscopique de <i>B.thuringiensis</i> après revivification sur gélose nutritive.....	36
Figure 10: Aspect microscopique de <i>Bacillus thuringiensis</i> après coloration de Gram(GX100).....	37
Figure 11 : Aspect microscopique des spores chez la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> (GX100).....	38

Liste des Tableaux

Tableau I : Différents domaines d'application des biosurfactants.....	20
Tableau II: Tests biochimiques utiles en pratique courant.....	27
Tableau III : Lecture de la galerie API 50 CH BioMérieux.....	31
Tableau IV: Résultats de différents tests biochimiques.....	37
Tableau V: Le profil biochimique des tests API 50 CH de trois isolats de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
Tableau VI : Le profil biochimique de <i>Bt</i> en utilisant le système API 50CHB.....	41

Liste des abréviations

API 20E : appareil et procédés d'identification 20 des entérobactéries.

ARN: Acide ribonucléique.

ATP : Adénosine-Tri-phosphate.

B : *Bacillus*.

Bt : *Bacillus thuringiensis*.

CMC: Concentration micellaire critique.

CPI : Cristaux protéiques insecticides.

Cry : Crystal.

Cyt : Cytolytique.

E24 : Indice d'émulsification.

G + : Gram positif

GN : Gélose nutritive.

HCl : Acide chlorhydrique.

LB: Lurie-Bertani.

MSM: mineral salt medium.

mN: millinewton.

pH : Potentiel d'hydrogène.

TIF : tension interfaciale.

TSF : tension superficielle.

Vip : Protéines insecticides végétatives.

VF : Viande-Foie.

Introduction

L'utilisation d'insecticides chimiques contre les insectes ravageurs a permis d'accroître considérablement la productivité des secteurs agricole et forestier. Récemment, **Popp et al., (2013)**, ont démontré que les pertes de production des cultures mondiales avant récolte à cause des insectes, micro-organismes, et adventices sont estimées à 35 %. Sans une protection efficace des cultures, ces pertes seraient de 70%. Toutefois, les inquiétudes croissantes de la population à l'égard des effets potentiellement néfastes des insecticides chimiques pour la santé et l'environnement ont amené la communauté scientifique à chercher des solutions alternatives à la lutte chimique (**Sellami et al., 2015**).

La production de biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* a été le scénario le plus réussi de ceux testés, avec une croissance et une sporulation remarquables du micro organisme. *Bacillus thuringiensis* (Bt) est le biopesticide microbien le plus utilisé, qui produit des protéines cristallines à effet biopesticide contre les insectes des ordres des coléoptères, des lépidoptères, des diptères, des hyménoptères, des hémiptères et des orthoptères, ainsi que les nématodes phytopathogènes. Actuellement, 90% des biopesticides commercialisés sont dérivés de cette bactérie entomopathogène. Par rapport aux pesticides chimiques conventionnels, ces biopesticides sont plus spécifiques aux ravageurs cibles, efficaces en petites quantités et rapidement décomposable sans laisser de résidus toxiques (**Mejias et al., 2020**).

Les tensioactifs sont largement utilisés pour les applications industrielles, agricoles, alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. La plupart de ces composés sont synthétisés chimiquement et peuvent causer des problèmes environnementaux et toxiques (**Schramm et al., 2003 ; Makkar and Rockne, 2003**). Cependant, ce n'est qu'au cours des dernières décennies que les molécules tensioactives d'origine microbienne, appelées biosurfactants, ont suscité un intérêt considérable. Les biosurfactants sont des agents tensioactifs produits principalement par des micro-organismes lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats miscibles à l'eau ou huileux : ils restent adhérents aux surfaces des cellules microbiennes ou sont sécrétés dans le bouillon de culture. Ils possèdent la propriété caractéristique de réduire les tensions superficielle et interfaciale en utilisant les mêmes mécanismes que les tensioactifs chimiques (**Gharaei-Fathabad , 2011**).

Les biosurfactants sont des exemples typiques de métabolites microbiens qui présentent une activité biologique contre les insectes nuisibles et les agents pathogènes. Ils présentent de nombreux avantages tels qu'un niveau élevé d'activité et de spécificité à des températures, un

pH et une salinité extrêmes et un degré élevé de biodégradabilité (**Banat et al.,2010**). L'utilisation de biosurfactants dans la lutte antiparasitaire gagne un intérêt en raison de sa biodégradabilité et de sa sécurité environnementale. par conséquent, l'utilisation de biosurfactant pourrait être une alternative possible pour vaincre la résistance des insectes ravageurs aux toxines Cry de *B.thuringiensis* (**Ben khedher et al.,2017**).

Le présent travail a pour but de rechercher la production de biosurfactants à partir d'une souche bactérienne locale : *Bacillus thuringiensis*.

Dans ce contexte, ce travail comprend trois chapitres :

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique sur l'espèce *Bacillus thuringiensis* ainsi que les biosurfactants et leurs applications. Le deuxième chapitre fait l'objet de la méthodologie. Dans le troisième chapitre nous présentons les résultats cités dans la littérature et leur interprétation.

Étude bibliographique

I. *Bacillus thuringiensis*

I.1. Caractéristiques générales sur *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie entomopathogène, en forme de bâtonnet de 5 µm de long sur 1 µm de large, à Gram positif, sporulée et aérobie facultative que l'on trouve habituellement dans le sol, sur les poussières de céréales et dans les cadavres de certains insectes, caractérisée par des cristaux de protéines insecticides parasporaux ou δ-endotoxines (Figure 01 et 02) qu'elle produit lors de sa sporulation (Helassa, 2008 ; Nair et al., 2018). Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* (Sanahuja et al., 2011). De plus, elle est considérée comme l'alternative bioinsecticide la plus efficace disponible pour l'homme aujourd'hui, en raison de sa toxicité envers un large éventail d'insectes ravageurs tels que les diptères, les lépidoptères et les coléoptères (Nair et al., 2018).

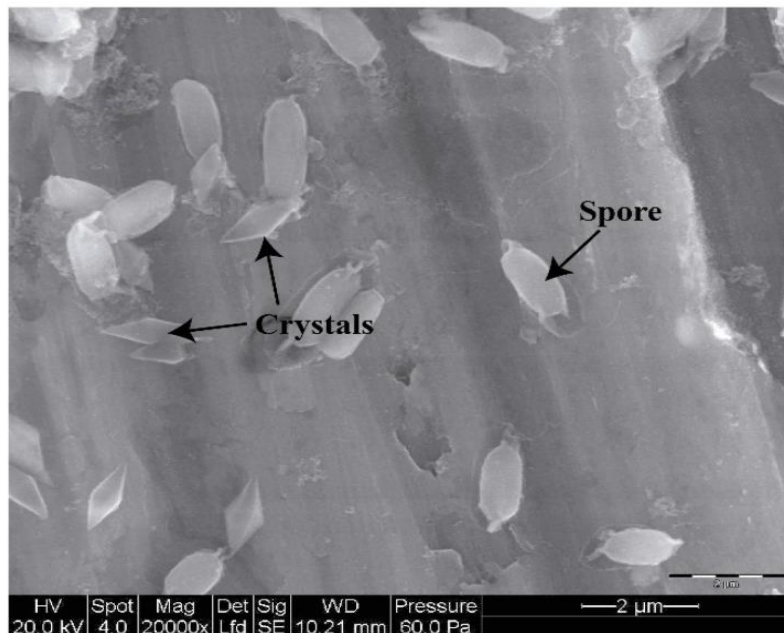


Figure 01 : Cristaux de protéines mélangés à des spores de *Bt* (G×20000) (Palma et al., 2014).

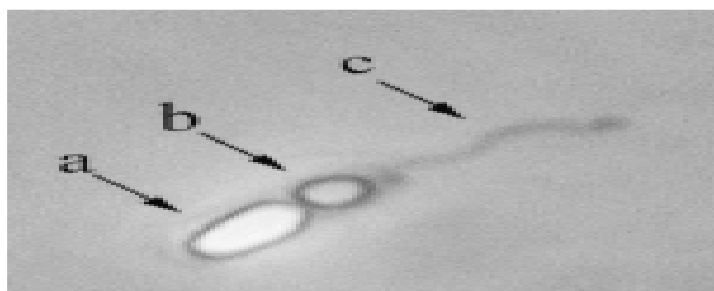


Figure 02 : *Bacillus thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ; a : spore ; b : inclusion parasporale ; c : filament (Rampersad et al., 2003).

I.2. Classification de *Bt*

Lecadet et al., (1999) ont révisé et mis à jour la classification des souches de *Bt* basée sur le sérotype H. Ils ont identifié 82 différents sérotypes. Chaque sérotype est caractérisé par la production de toxines particulières et agit spécifiquement sur une gamme de larves d'insectes, le sérotype le plus répandu est *Bt* ssp. *kurstaki* (**Sellami et al., 2015**).

Récemment, l'approche moléculaire a été également utilisée pour différencier entre les différentes bactéries du groupe *Bacillus*. Dans ce cadre, **Brahim , (2013)** a mis en évidence une méthode moléculaire simple, rapide et fiable pour distinguer les souches psychrotolérantes (*B. weihenstephanensis*) des souches mésophiles (*B. thuringiensis*) dans le groupe *B. cereus* par l'amplification du gène de ménage *pycA* suivie d'une digestion avec l'enzyme de restriction *PstI*. La substitution nucléotidique à la position 795 du gène *pycA* chez les souches psychrotolérantes a engendré un site de restriction pour l'enzyme *PstI*. Ce site est absent chez les souches mésophiles (**Sellami et al., 2015**).

I.3. Cycle de vie de *Bacillus thuringiensis*

Le cycle de vie du *Bt* est caractérisé par deux phases qui incluent la division cellulaire végétative et le développement des spores, autrement appelé cycle de sporulation (**Figure 03**) :

-La cellule végétative est en forme de bâtonnet (2–5 µm de long et environ 1,0 µm de large) se divise en deux cellules filles uniformes par formation d'un septum.

-La sporulation, en revanche, implique une division cellulaire asymétrique et se caractérise par sept étapes qui comprennent:

Phase I, la formation de filaments axiaux,

Phase II, formation de septum d'avant-spore,

Phase III, la formation d'engouffrement, première apparition de cristaux parasporaux et formation de la pré-spore,

Phases IV à VI, formation d'exosporium, paroi cellulaire primordiale, cortex et manteaux de spores accompagnées par la transformation du nucléoïde de la spore,

Phase VII, maturation des spores et de la lyse sporangiale.

La production de protéines cristallines par *Bt* pendant la sporulation est un phénomène biologique unique et génétiquement régulé qui, probablement, soulage le stress physiquement en compensant la perte d'eau pendant la formation des spores et offre un avantage de survie supplémentaire en exerçant une action létale contre les insectes hôtes (**Ibrahim et al.,2010**).

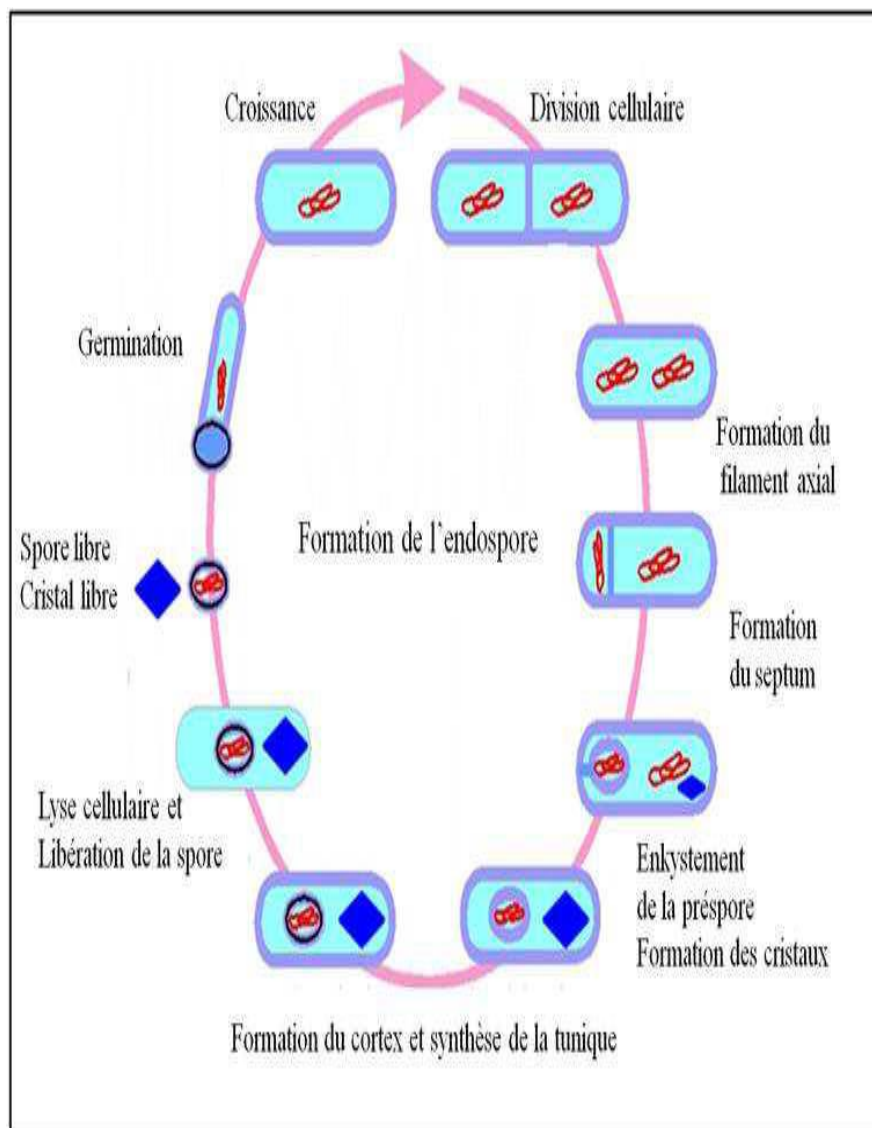


Figure 03: Représentation schématisque de la formation de l'endospore au cours de la phase de sporulation de *Bt* (**Sellami et al., 2015**).

I.4. Les toxines et métabolites secondaires produites par *Bacillus thuringiensis*

Bt produit des inclusions cristallines parasporales durant sa sporulation. Ces inclusions parasporales distinguent *Bt* des autres bacilles. Elles contiennent des cristaux protéiques insecticides (CPI) dont la composante majeure, les delta-endotoxines qui s'inscrivent dans la longue liste des toxines protéiques produites par *Bt* incluant la bêta-exotoxine, l'alpha-exotoxine et la gamma-exotoxine. Deux types de delta-endotoxine existent: les toxines spécifiques Cry et les toxines non spécifiques Cyt (cytolysine). Cependant, *Bt* produit aussi d'autres toxines, les Vip (vegetative insecticidal proteins) et une panoplie d'enzymes (protéases, chitinases, amylases, catalases ...) (**Barnabe,2004**).

I.4.1.β –exotoxines

β –exotoxines, également appelées thuringiensine, sont thermostables. La thuringiensine constitue un analogue de l'adénosine dont le 5'-hydroxyle est conjugué à un résidu d'acide diglucuronique phosphorylé. L'activité cytotoxique de la thuringiensine est probablement une conséquence de sa similitude structurelle avec l'ATP, car elle est capable de se lier aux sites de liaison à l'ATP de l'ARN polymérase provoquant une inhibition de la transcription (**Malovichko et al .,2019**).

I.4.2. δ-endotoxines

Les δ-endotoxines sont des inclusions de cristaux essentiellement constitués de protéines cristallines (Cry) et cytolytiques (Cyt) qui composent 20 à 30 % du poids sec des cellules sporulées (**Agaisse and Lereclus, 1995; Baum and Malvar, 1995**).

- **Les protéines Cry**

Les protéines Cry sont des inclusions cristallines parasporales produites par *Bt* qui présentent un effet toxique vérifiable expérimentalement sur un organisme cible ou ont une séquence similaire à une protéine Cry connue (**Jisha et al., 2013**).

- **Les protéines Cyt**

Les protéines Cyt sont toxiques *in vivo* pour les larves des membres de l'ordre diptères, elles sont produites pendant la phase de sporulation et sont déposés avec le Cry (δ -endotoxines) dans les corps d'inclusion cristalline où ils peuvent constituer environ 40% du cristal. De plus, Elles sont capables de former des pores dans les membranes en interagissant directement sur les lipides membranaires ou détruisant la membrane par une interaction détergente (**Raddadi et al.,2007**).

I.4.3. Les Protéines insecticides végétatives (VIP)

Elles sont sécrétées pendant la phase végétative. Deux classes de toxines VIP ont été identifiées : d'une part, les Vip1 et Vip2 qui sont hautement efficaces contre certains coléoptères et, d'autre part, les Vip3 qui sont actives contre certains lépidoptères (**Raddadi et al.,2007**).

I. 4.4. Les enzymes

I.4.4.1. Chitinases

Depuis longtemps, la chitinase, enzyme hydrolysant la chitine (un homopolymère de β -1,4-N-Acétyle-alignés glucosamine), a été utilisée avec *B.thuringiensis* comme agent synergique pour augmenter l'entomopathogénicité de *Bt* (**Raddadi et al.,2007**).

I.4.4.2. Protéases

Bacillus thuringiensis produit certains types de protéases qui sont majoritairement à sérine, qui pourraient être intra ou extracellulaires. Les protéases intracellulaires interviennent dans plusieurs processus cellulaires et métaboliques tels que la régulation du cycle cellulaire, la différenciation et la sporulation (**Reddy et al., 2002**), alors que les protéases extracellulaires permettent à la bactérie d'hydrolyser les protéines dans les milieux de culture synthétiques ou complexes. Toutefois, le rôle des protéases dans l'accroissement ou la diminution de l'activité insecticide des δ -endotoxines contre les insectes nuisibles n'a pas été confirmé, mais il a été démontré que ces enzymes peuvent protéolyser et / ou dégrader les cristaux protéiques (**Sellami et al.,2015**).

I.4.4.3. Phospholipases C

les phospholipases C, sont connues pour agir comme facteurs de virulence dans diverses bactéries pathogènes (Agaisse et *al.*, 1999).

I.5. Intérêt de *Bacillus Thuringiensis* dans la lutte Biologique

Bien que la principale activité de lutte biologique de *B. thuringiensis* soit due à son potentiel entomopathogène, il a été démontré que différentes souches de cette espèce produisent de nombreux facteurs potentiels qui pourraient présenter un grand intérêt pour la lutte biologique des bactéries phytopathogènes. Cela fait de *Bt* un agent de lutte biologique polyvalent qui permet une meilleure protection des plantes et pourrait conduire à diminuer l'utilisation de pesticides chimiques qui ont généralement un impact nocif sur l'environnement (Raddadi et *al.*, 2007).

II .Les Biosurfactants

II .1. Définition du surfactant microbien ou biosurfactant

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de biomolécules tensioactives, structuralement variées produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons, les levures (Rone and Rosenberg, 2001; Chen et *al.*, 2007).

Ces composés amphiphiles possèdent une double affinité, ils sont composés d'une partie hydrophile (miscible dans l'eau) polaire et d'une partie hydrophobe (miscible dans l'huile) apolaire (**Figure 04**), Cette propriété leur donne la capacité de s'accumuler entre les phases fluides tels que huile/ eau ou air/ eau en réduisant la tension interfaciale et superficielle (Nitschek and Costa, 2007).

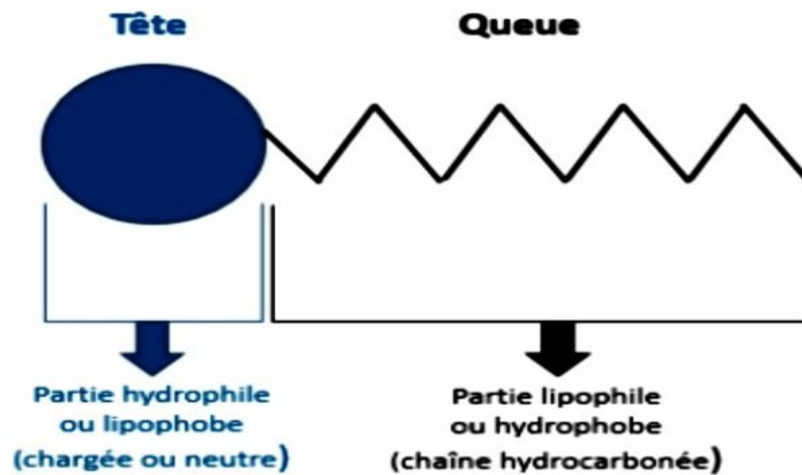


Figure 04 : Structure schématique d'un tensioactif (Anthony, 2019).

II .2. Classification des différents types des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés en fonction de leur composition chimique et leur origine microbienne. On distingue deux grandes classes de biosurfactants :

- ❖ Les biosurfactants à faible poids moléculaire qui abaissent efficacement la tension superficielle et interfaciale. Cette classe comprend : les glycolipides, les lipopeptides et les lipoprotéines, les acides gras, les lipides neutres et les phospholipides (Nitschek and Costa, 2007).

II .2.1. Glycolipides

Les biosurfactants les plus connus sont les glycolipides. Ce sont des glucides en combinaison avec une longue chaîne d'acide aliphatique ou hydroxyaliphatique. Parmi les glycolipides, les plus connus sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides (Gautam and Tyagi , 2006).

✓ Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont les glycolipides, dans lesquelles une ou deux molécules du rhamnose lié à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydecanoïque. La production du rhamnose, a été

décrite chez *Pseudomonas aeruginosa* par **Javis and Johnson, (1949)** (**Gautam and Tyagi , 2006 ; Roy,2017**).

✓ Tréhalolipides

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 (**Gautam and Tyagi , 2006 ; Roy,2017**).

✓ Sophorolipides

Les sophorolipides sont produites principalement par des levures telles que *Torulopsis bombicola* , *T. petrophilum*, et *T. apicola*. Les sophorolipides sont constituées d'un hydrate de carbone, le sophorosdimérique lié à une longue chaîne d'acide gras hydroxylé. Ces biosurfactants sont un mélange d'au moins six à neuf sophorosides hydrophobes différents (**Gautam and Tyagi , 2006 ; Roy,2017**).

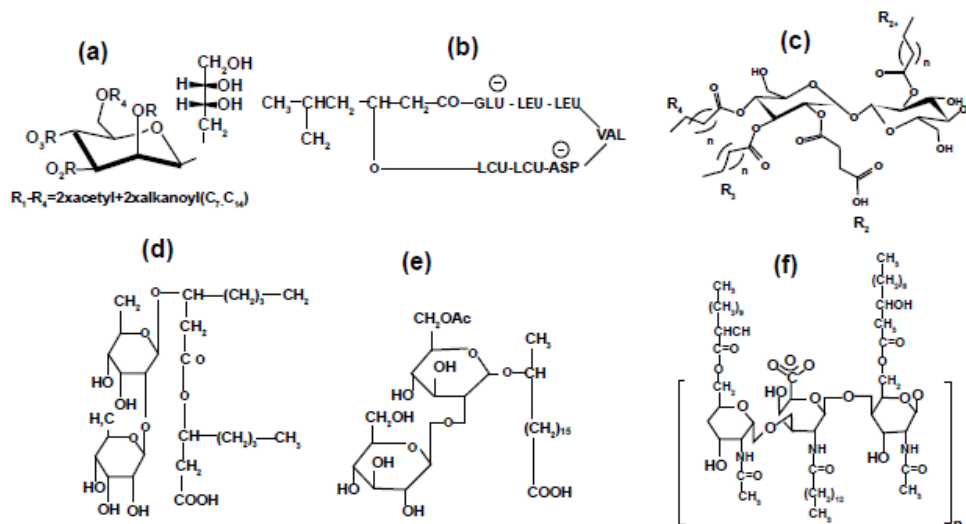


Figure 05 : structures chimiques des biosurfactants les plus étudiés (a) lipides mannosylerythriales (b) surfactine (c) Tréhalolipide (d) Sophorolipide (e) Rhamnolipide (f) Emulsane (**Fakruddin, 2012**).

II .2.2. Lipopeptides et lipoprotéines

Un grand nombre de lipopeptides cycliques, y compris des antibiotiques décapeptidiques(gramicidine) et des antibiotiques lipopetidiques (les polymyxines) sont produits. La surfactine, c'est une lipopeptide cyclique produite par *Bacillus subtilis* ATCC21332, est l'un des biosurfactants les plus puissants (**Figure 06**).

Bacillus licheniformis produit plusieurs biosurfactants qui agissent en synergie et présentent une meilleure stabilité de la température, du pH et de salinité (**Gautam and Tyagi , 2006**).

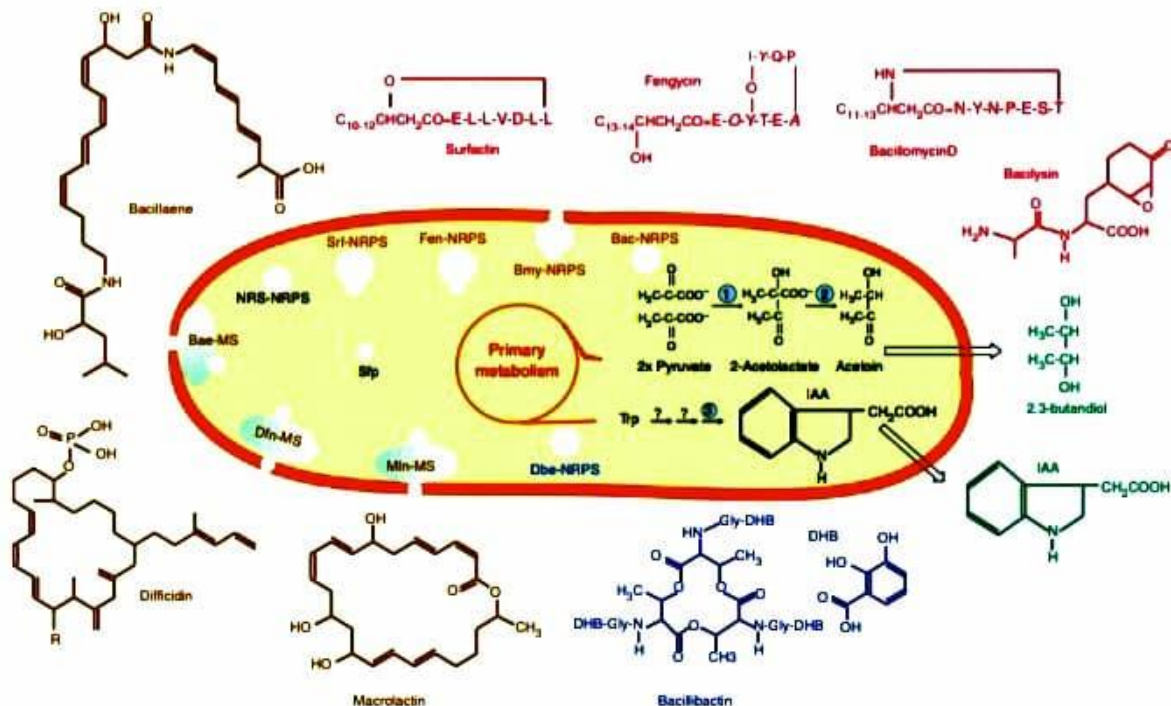


Figure 06 : Structure chimique de différents biosurfactants produits par *Bacillus* (**Chen et al.,2007**).

II.2.3. 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 phosphatidyl éthanol 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 (**Gautam and Tyagi , 2006**).

- ❖ Les biosurfactants à poids moléculaire élevé qui sont très efficaces comme des agents émulsifiants et des stabilisateurs. cette classe regroupe : les biosurfactants polymériques et les biosurfactants particuliers (**Nitschek and Costa, 2007**).

II .2.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymériques les mieux étudiés sont l'émulsane, le liposane, la mannoprotéine et d'autres complexes polysaccharidiques-protéiques.

L'émulsane est un agent émulsifiant très efficace pour les hydrocarbures dans l'eau à une concentration aussi faible que 0,001 à 0,01%. C'est l'un des stabilisateurs d'émulsion les plus puissants connus aujourd'hui et résiste à l'inversion même à un rapport eau / huile de 1: 4.

Le liposane est un émulsifiant extracellulaire soluble dans l'eau synthétisé par *Candida lipolytica* ; il est composé de 83% de glucides et de 17% de protéines (**Gautam and Tyagi , 2006 ; Santos et al., 2016**).

II .2.5. Biosurfactants particuliers

Les biosurfactants particuliers répartissent les vésicules de la membrane extracellulaire pour former une microémulsion qui exerce une influence sur l'absorption d'alcane dans les cellules microbiennes.

Acinetobacter sppH01-N possèdent des vésicules d'un diamètre de 20 à 50 nm et une densité flottante de 1,158 g/cm cube composées de protéines, phospholipides et lipopolysaccharides. (**Gautam and Tyagi , 2006 ; Santos et al., 2016**).

La plupart des biosurfactants sont soit anioniques ou neutres, tandis que ceux qui contiennent des groupes amine sont cationiques (**Santos et al., 2016**). la partie hydrophobe est basée sur des acides gras à longue chaîne ou dérivés d'acides gras alors que la partie hydrophile peut

être un glucide, un acide aminé, un phosphate ou un peptide cyclique (**Nitschek and Costa, 2007 ; Santos et al., 2016**).

Récemment, **Bodour et al.,(2004)** ont décrit une nouvelle classe de biosurfactants nommée flavolipides produite par *Flavobacterium sp*, isolé du sol. Le nouveau surfactant a montré une forte activité de surface et une capacité d'émulsification, en plus, il présente une fraction polaire constituée d'acide citrique (**Nitschek and Costa, 2007**).

II .3.Propriétés fonctionnelles des biosurfactants produits par *Bacillus*

La position 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, etc. (**Satpute et al., 2010**).

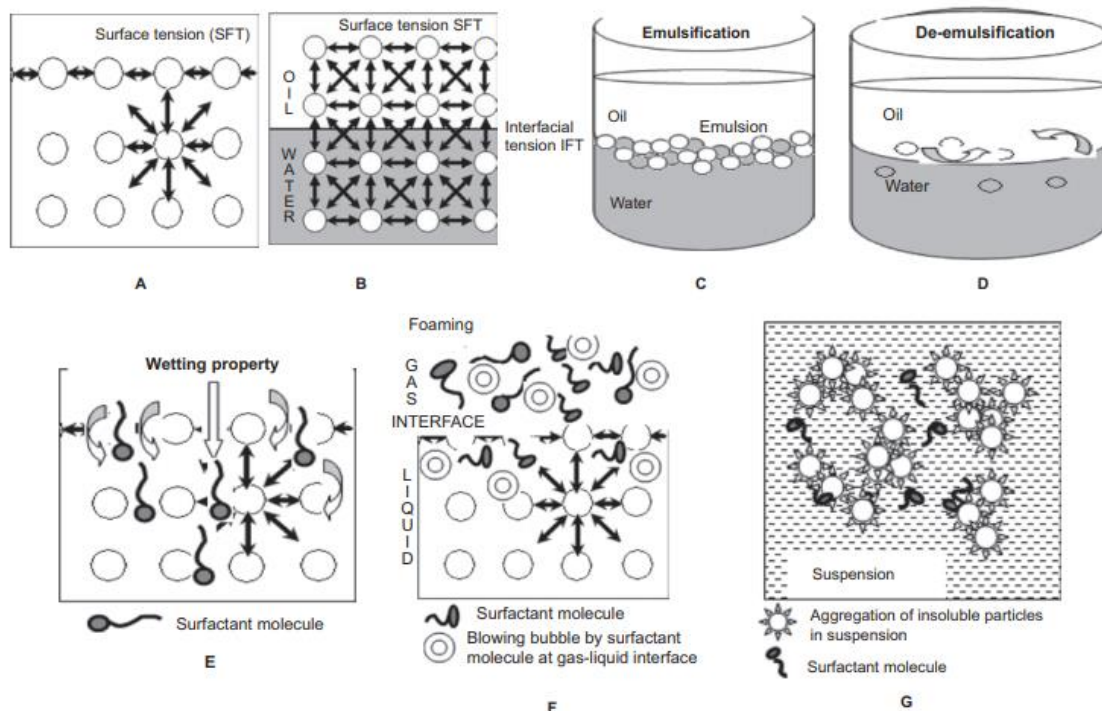


Figure 07 : Représentation des différentes propriétés fonctionnelles des Biosurfactants : (A) Tension superficielle ; (B) Tension superficielle et interfaciale ; (C) Émulsification ; (D) Désémulsification ; (E) Mouillage ; (F) Moussage ; (G) Adsorption (**Satpute et al., 2010**).

- Ces agents tensioactifs présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**).

II .3.1. Activité de surface et d'interface

Les tensions superficielles (TSF) et interfaciales (TIF) sont des propriétés très importantes de l'agent tensioactif (**Figure 07**). La TSF de l'eau est de 72 mN / m et lorsque l'agent tensioactif est ajouté, cette valeur sera réduite. la Surfactine produite par *Bacillus sp* est le biosurfactant le plus efficace pour réduire la TSF de l'eau de 72 à 27 dynes / cm (**Satpute et al., 2010**) .

II 3.2. Émulsification / Désémulsification

Une émulsion peut être définie comme la dispersion d'un liquide dans un autre sous forme de gouttelettes microscopiques conduisant à un mélange des deux liquides non – miscibles (**Figure 07.C**). Cependant, Après une certaine période, les micelles formées, se désémulsifient et puis se réunissent (**Figure 07.D**) et conduisant à la séparation des deux phases (**Satpute et al., 2010**).

II .3.3. Mouillage

Cette propriété permettant la diffusion et la pénétration d'une substance qui abaisse la tension superficielle (TSF), lorsqu'elle est ajoutée à un liquide (**Figure 07.E**). Elle réduit les forces d'attraction entre les molécules similaires, et augmente l'attraction aux surfaces (**Satpute et al., 2010**).

II. 3.4. Moussage

Les agents tensioactifs 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 07.F**) (**Satpute et al., 2010**).

II. 3.5. Adsorption

Cette propriété fonctionnelle aide à s'adsorber sur des substrats hydrophobes (**Figure 07.G**), permettant aux surfactants à améliorer la récupération pétrolière.

L'adsorption facilite une forte interaction des molécules de l'agent tensioactif avec la roche qu'avec le pétrole, ce qui augmente la récupération du pétrole.

Le meilleur exemple pour cette propriété des agents tensioactifs, est le tensio-actif pulmonaire (**Satpute et al., 2010**).

II .3.6.La détergence et la dispersion

Cette propriété permettant de maintenir les particules insolubles en suspension, en empêchant l'agrégation 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 (**Satpute et al., 2010**).

II. 3.7. La floculation

C'est un processus, où les gouttelettes d'émulsion se collent pour former un groupe qui peut être divisé par l'action mécanique, redonnant à l'émulsion sa forme originale. La micro-électrophorèse et le test de microscopie optique, sont utilisés pour évaluer la floculation (**Satpute et al., 2010**).

II .3.8. Réduction de la viscosité

En raison de la viscosité élevée du pétrole brut, il résiste à l'écoulement et devient très difficile à transporter. Le lourd pétrole brut (densité élevée) contient de l'azote, de l'oxygène, des composés de soufre et de lourds polluants métalliques. Cette viscosité des huiles lourdes est réduite en utilisant des surfactants pour augmenter la mobilité et faciliter le transport (**Satpute et al., 2010**).

II .3.9. La solubilisation

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 (Satpute et al., 2010). Perfumo et al., (2009) ont rendu compte des rôles de biosurfactants dans l'accès aux substrats hydrophobes. tandis que Wong et al., (2004) ont également rapporté la même observation sur les effets des agents tensioactifs synthétiques que biologiques.

II .3.10. Inhibition de la corrosion

Les inhibiteurs de corrosion, sont des matériaux qui protègent contre l'usure des surfaces des appareils (Satpute et al., 2010).

II .3.11. Tolérance à la température, au pH et à la force ionique

Les tensioactifs sont stables aux variations de température, de pH et de NaCl. par ailleurs, la lichenysine obtenue de *Bacillus licheniformis* JF-2 est stable jusqu'à 50°C, et aux pH de 4.5 à 9.0 et 5% de NaCl et 2.5% de Ca^{2+} (Satpute et al., 2010).

II .4. Rôle physiologique des biosurfactants dans les microorganismes

Le rôle physiologique principal des biosurfactants est de permettre aux microorganismes de se développer 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, bien que les mécanismes moléculaires liés à l'absorption et le métabolisme de ces substrats ne soient pas toujours claires et ne sont pas entièrement compris (Fakruddin, 2012).

II .5. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement, dont certains sont:

- **Biodégradabilité** : Les surfactants biologiques sont facilement dégradables par les micro-organismes (Mohan et al., 2006 ; Fakruddin, 2012).
- **Faible toxicité**: Bien que très peu de recherches soient disponibles dans le sujet de la toxicité des biosurfactants, ils sont généralement considérées comme des produits non ou faiblement toxiques et sont appropriées à des usages pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Vijayakumar et Saravanan, 2015);
- **Disponibilité des matières premières**: 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** : De nombreux biosurfactants ne sont pas affectés par des facteurs environnementaux 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 4-5-9.0), et des concentration (jusqu'à 50 g / l pour NaCl et 25 g / l pour Ca^{2+}) (Krishnaswamy, 2008 ; Fakruddin, 2012 ; Roy, 2017).
- **Abaissement de la tension superficielle et interfaciale** : Mulligan, (2005) a déclaré qu'un bon surfactant peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN.m⁻¹ et la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane de 40 à 1 mN.m⁻¹ ; la surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN.m⁻¹ et la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à une valeur inférieure à 1 mN.m⁻¹ (Krishnaswamy, 2008 ; Fakruddin, 2012).

- **Autres avantages :** Biocompatibilité et la digestibilité qui permettent leurs applications dans des produits cosmétiques, pharmaceutiques et comme des additifs alimentaires (**kosaric, 2001**).

II .6. Paramètres influençant 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 du rapport C: N, les paramètres physico-chimiques tels que la température, l'aération, les cations divalents et le pH influencent non seulement la quantité de biosurfactant produite mais aussi le type du polymère synthétisé (**Fakruddin,2012**).

II .6.1. 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 considérés comme des bons substrats pour la production des biosurfactants (**Fakruddin, 2012**).

II .6.2. Source d'azote :

Diverses sources d'azote ont été utilisées pour la production des biosurfactants tels que la peptone d'urée, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, les extraits de viande 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 les sources d'azote préférées pour la production des biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus*, tandis que le nitrate favorise une production maximale des biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* (**Fakruddin, 2012**).

II .6.3. 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, d'aération et des vitesses d'agitation.

La plupart des productions des biosurfactants sont effectuées dans une plage de températures de 25 à 30°C (**Fakruddin, 2012**).

II .6.4. 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 d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Elles peuvent également être liées à la fonction physiologique de l'émulsification. **Adamczak et Bednarski , (2000)** ont observé que la meilleure valeur de la production des tensioactifs est de 45,5 g / l , a été obtenue lorsque le débit d'air était 1vvm et la concentration en oxygène dissoute a été maintenue à 50% de la saturation (**Fakruddin, 2012**).

II.6.5. 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 certains produits de biosurfactants qui n'ont pas été affectés par des concentrations allant jusqu'à 10% (poids / volume) bien que des réductions légères de la CMC ont été détectées (**Fakruddin, 2012**).

II .7. Applications des biosurfactants

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les surfactants biologiques sont aujourd'hui largement 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 tels que les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou encore le domaine médical (**Meylheuc et al., 2001**).

Le Tableau I présente un résumé des utilisations des biosurfactants dans différents domaines.

Tableau I : Différents domaines d'application des biosurfactants (**Banat et al., 2000 ; Santos et al., 2016**).

Domaines	Applications	Propriétés fonctionnelles
Environnement	- Bioremédiation; - Opérations de nettoyage des déversements de pétrole; - Remédiation et rinçage des sols	- Émulsification, dispersion, solubilisation des huiles, - Abaissement de la tension interfaciale, - Mouillage, épandage, détergence, moussage, - Inhibition de la corrosion des huiles de carburant et des équipements, - Rinçage du sol.
Pétrole	- Récupération améliorée du pétrole; - Désémulsification	- Émulsification, solubilisation, dispersion des huiles - Abaissement de la tension interfaciale, - Désémulsification des émulsions de pétrole, - Réduction de la viscosité, - Mouillage des surfaces solides, épandage, détergence, moussage, - Inhibition de la corrosion des huiles de carburant et des équipements.

Exploitation minière	- Opérations de nettoyage des métaux lourds; - Assainissement des sols; - Flottation	- Mouillage et moussage, - Collectionneurs des agents moussants, - Élimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments, - Séquestration des métaux lourds, - Épandage, - Inhibition de la corrosion des huiles.
Alimentation	- Émulsification et désémulsification - Ingrédient fonctionnel	- Solubilisation des huiles aromatisées, - Contrôle de cohérence, - Émulsification - Agent mouillant, - Epandage, - Détergence, - Agent Moussant, - Epaississant.
Médecine	- Microbiologie; - Produits pharmaceutiques et thérapeutiques	- Agents anti-adhésifs, - Agents antifongiques, - Agents antibactériens, - Agents antiviraux, - Vaccins, - Thérapie génique, - Molécules immuno-modulatrices
Nettoyage	- Détergents de lavage	- Détergents et désinfectants pour les lessives, - Mouillage,

		- Diffusion, - Inhibition de la corrosion.
Agriculture	- Biocontrôle; - Les engrais	- Mouillage, dispersion, - Suspension de pesticides en poudre et engrais, - Émulsification de solutions de pesticides, - Facilite les mécanismes de biocontrôle des agents pathogènes des plantes. - Elimination et la biodisponibilité accrue des nutriments pour les microbes associés aux plantes bénéfiques.
Cosmétique	- Produits de santé et de beauté	- Émulsification, - Agents moussants, - Solubilisation, - Agents mouillants, - Nettoyants, - Agents antimicrobiens, - Médiateurs de l'action enzymatique.
Nanotechnologie	- Synthèse de nanoparticules	- Émulsification - Stabilisation
Les textiles	- Préparation des fibres; - Teinture et impression; - Finition des textiles	- Mouillage, - Pénétration, - Solubilisation, - Émulsification, - Détergent - Formulations - Ramollissement.

➤ **Biosurfactants comme biopesticide**

La stratégie conventionnelle du contrôle des arthropodes implique l'application des produits chimiques et des pesticides à large spectre, qui produisent souvent des effets indésirables. De plus, 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 présentent une activité insecticide contre la mouche des fruits *Drosophila melanogaster* et sont donc prometteurs d'être utilisés comme biopesticides (**Mulligan, 2005 ;Fakruddin,2012**).

Matériel et méthodes

La première partie de notre travail (isolement et ré-identification de *Bt*) a été réalisée au sein du laboratoire de Biotechnologie microbienne de la faculté des sciences de l'université M'Hamed Bougara de Boumerdès (UMBB). Il a pour objectif l'évaluation de la production de biosurfactants réalisée à partir d'une souche bactérienne locale entomopathogène : *Bacillus thuringiensis*.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique et équipements

La réalisation de cette étude a fait appel à un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages (**Annexe 1**) ainsi que des milieux de culture. Leur composition est mentionnée en **annexe 2**.

II.1.2. Matériel biologique

La souche *Bacillus thuringiensis* utilisée dans cette étude a été isolée à partir du sol de la faculté des Sciences de l'Université M'hamed Bougara de Boumerdès (UMBB). Elle a été fournie dans un tube de gélose inclinée par le laboratoire de recherche VALCORE de l'UMBB.

II.2. Méthodes

II.2.1. Revivification et purification de la souche bactérienne

La revivification de la souche bactérienne a été faite par étalement sur gélose nutritive neuve dans des boîtes de Pétri, préalablement coulées. L'incubation est réalisée dans l'étuve à 37°C pendant 48 heures. A partir des colonies bien distinctes, plusieurs repiquages ont été menés jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

II.2.2. Ré-identification de *Bacillus thuringiensis*

La ré-identification nécessite que la souche *Bcillus thuringiensis* soit à l'état pur et fait appel aux caractères principaux pour une identification rapide et sure.

II.2.2.1. Étude des caractères cultureux et mobilité

L'identification de *Bacillus thuringiensis* fait essentiellement appel aux caractères cultureux (aspect macroscopique : la forme, la taille, la couleur), à la morphologie (aspect

microscopique : type de Gram, présence ou absence de spores, mobilité) et à des propriétés biochimiques (catalase, oxydase..).

➤ Étude microscopique

Coloration de Gram :

La morphologie, l'arrangement cellulaire et le Gram de l'isolat sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration différentielle et l'observation à l'aide d'un microscope optique.

Etapes pour réaliser la technique :

1-préparation d'un frottis sur une lame de microscope :

❖ **Prélèvement :** On dépose au centre d'une lame une goutte d'eau distillée stérile.

A l'aide d'une anse de platine, on prélève une colonie bactérienne jeune (18 à 24 heures) et on l'étale de façon homogène.

❖ **Séchage et fixation :** la lame ainsi préparé est séchée et fixée en faisant des rotations en dessus de la flamme du bec Bunsen, la fixation du frottis peut se faire avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis on enflamme la lame au bec Bunsen.

2 - La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée.

3 -Mordantage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

4-Décoloration à l'alcool: verser goutte à goutte l'éthanol sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.

5-Contre coloration : utiliser de la Fuchsine ou de la Safranine et laisser agir entre 30 secondes et 1 minute après laver doucement à l'eau déminéralisée et sécher la lame.

6-Observation : on passe à l'observation sous microscope photonique à l'immersion (G×100).

b/ Résultats possibles :

Les bactéries Gram négative : se décolorent suite à la pénétration de l'alcool et leur paroi se colore en rose par la fuchsine. Les bactéries Gram positif sont colorées en violet (**Figure 08**).

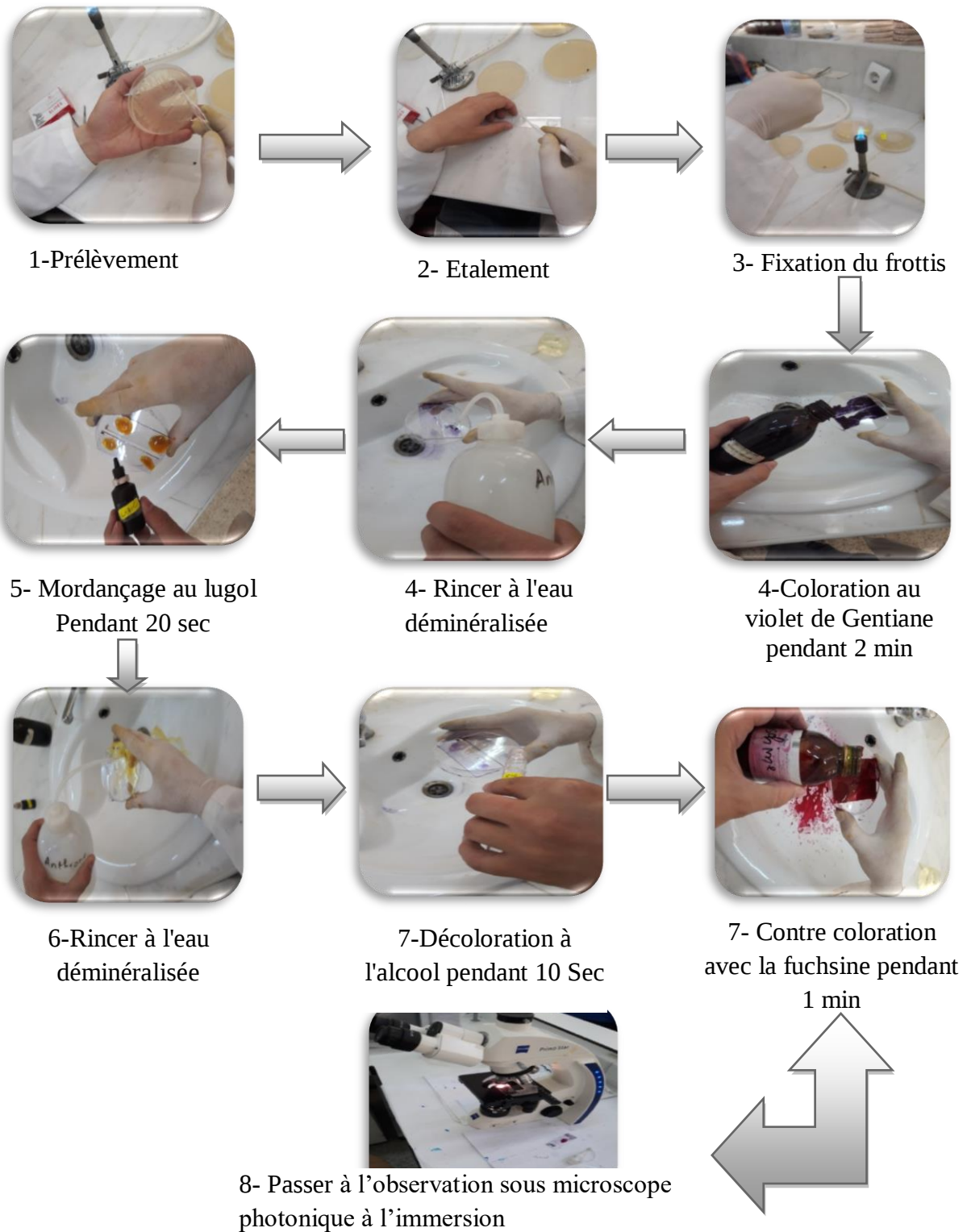


Figure 08: Les différentes étapes de coloration de Gram (AIT AMER MEZIANE et al., 2019).

II.2.2.2. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire

Ces tests ont été effectués sur des colonies pures et bien isolées (**Tableau II**).

Tableau II : Tests biochimiques utiles en pratique courante.

Métabolisme	Tests biochimiques	Principes	Techniques	Lectures
Energétique	Test catalase	La catalase est une enzyme, présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène. (Delarras, 2014).	La catalase est mise en évidence en déposant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes en dissociant un peu de la colonie suspecte ou de la culture obtenue sur gélose (Delarras, 2014).	La présence de catalase se manifeste par un dégagement gazeux (Delarras, 2014).
	Test oxydase	L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires cytochromiques bactériennes qui catalysent des réactions d'oxydoréduction. (Delarras, 2014).	L'oxydase est mise en évidence en ajoutant sur une lame un disque d'oxydase imbibé avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile puis en prélevant une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée stérile	La présence d'oxydase se traduit par une coloration violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes puis vire au noir : test oxydase+ (Delarras, 2014).

			en étalant sur le disque. (Delarras, 2014).	
	Type respiratoire	Réalisé sur la gélose VF (viande foie)	L'ensemencement se fait à partir du tube incliné, à l'aide d'une pipette pasteur en profondeur par pique centrale, en décrivant des tours de spires, suivant d'une incubation à 37°C pendant 24h.	Des bactéries soit : *bactéries aérobies strictes : uniquement en surface *bactéries micro-aérophiles : à quelques centimètres de la surface *bactéries aéro-anaérobies facultatives : sur tout le tube *bactéries anaérobies strictes : au fond du tube

II.2.2.3. Mise en évidence de la spore

A l'intérieur d'une cellule végétative, le phénomène de sporulation conduit en plusieurs étapes et en sept heures environ à la formation d'une spore qui, par sa structure et sa composition chimique est multi-résistante (thermo-résistance, résistance aux agents physico-chimiques...) (Delarras, 2014).

Coloration des spores bactériennes

Technique :

Réaliser un frottis de la culture bactérienne à étudier, puis :

- le recouvrir d'une solution aqueuse de vert de malachite à 0.5%.
- Chauffer pendant quelques minutes, sur une platine chauffante, jusqu'à émission de vapeurs.
- Rajouter du colorant pendant le chauffage si nécessaire, sans jamais laisser évaporer complètement le colorant ;
- Laver à l'eau distillée.
- Colorer avec la fuchsine pendant 30 secondes (**Delarras, 2014**).

Lecture :

Les cellules végétatives apparaissent colorées en rouge, les spores en vert dans leurs sporanges rouges et les spores libres colorées en vert (**Delarras, 2014**).

II.2.2.4. Tests biochimiques en faveur de l'identification de l'espèce *Bacillus thuringiensis*

Des tests biochimiques conventionnels nécessaires pour l'identification rapide de *Bacillus thuringiensis* ont été effectués. Parmi eux, on distingue le système API BioMérieux qui se présente sous forme de galerie (API 50 CH).

Utilisation de La galerie API 50 CH BioMérieux

La galerie API 50 CH en combinaison avec le milieu << API 50 CHB/E Medium >> est un système standardisé permettant d'identifier des *Bacillus* et apparentés, des *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. Pour ces deux dernières familles, la galerie doit être obligatoirement accompagnée de la galerie API 20 E, alors qu'elle est optionnelle pour les *Bacillus* et apparentés (**Delarras, 2014**).

Cette galerie est composée de 50 microtubes contenant des substrats déshydratés, qui appartiennent aux hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques). Ils permettent de réaliser 50 tests de fermentation après inoculation de la galerie avec API 50CHB/E Medium **(Delarras, 2014)**.

Les microtubes de la galerie API 50CH ont été inoculés avec une suspension bactérienne (*Bt*), puis incubées à 37°C pendant 24-48 h.

Durant la période d'incubation, la fermentation se traduit par un changement de couleur dans le tube, dû à une production d'acide en anaérobiose révélée par l'indicateur de pH du milieu choisi. Le premier tube sans principe actif, sert de témoin négatif.

Après incubation, la lecture de la galerie API 50 CH est présentée dans le tableau III réalisé à partir des fiches techniques bioMérieux. Cependant, on recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu, mais pour le test esculine (tube n°25), on observe un virage du rouge au Noir **(Delarras, 2014)**.

Interprétation : le profil biochimique de la souche de *Bacillus* (*Bt*) ou apparentée ainsi obtenu après la lecture finale peut être identifié à l'aide de l'automate ATB™, du mini-API, ou du logiciel d'identification apiweb™ **(Delarras, 2014)**.

Tableau III : Lecture de la galerie API 50 CH BioMérieux (Delarras, 2014).

Tube	Test	Composants actifs	Résultats	
			Positif	Négatif
Bande 0-9				
0		Témoin	Jaune	Rouge
1	GLY	Glycérol		
2	ERY	Erythritol		
3	D ARA	D-Arabinose		
4	L ARA	L-Arabinose		
5	RIB	D-Ribose		
6	D XYL	D-Xylose		
7	L XYL	L-Xylose		
8	ADO	D-Adonitol		
9	MDX	Méthyl- βD-Xylopyranoside		
Bande 10-19				
10	GAL	D-Galactose		
11	GLU	D-Glucose		
12	FRU	D-Fructose		
13	MNE	D-Mannose		
14	SBE	L-Sorbose		

15	RHA	L-Rhamnose	Jaune	Rouge
16	DUL	Dulcitol		
17	INO	Inositol		
18	MAN	D-Mannitol		
19	SOR	D-Sorbitol		
Bande 20-29				
20	MDM	Méthyl- αD-Mannopyranoside	Jaune	Rouge
21	MDG	Méthyl- αD-Glucopyranoside		
22	NAG	N-Acétyleglucosamine		
23	AMY	Amygdaline		
24	ARB	Arbutine	Jaune	Rouge
25	ESC	Esculine	Noir	Rouge
26	SAL	Salicine	Jaune	Rouge
27	CEL	D-Cellobiose		
28	MAL	D-maltose		
29	LAC	D-lactose (origine bovine)		
Bande 30-39				
30	MEL	D-Melibiose	Jaune	Rouge
31	SAC	D-Saccharose		
32	TRE	D-Trehalose		
33	INU	Inuline		
34	MLZ	D-Mélézitose		
35	RAF	D-Raffinose		
36	AMD	Amidon		
37	GLYG	Glycogène		
38	XLT	Xylitol		

39	GEN	Gentiobiose		
Bande 40-49				
40	TUR	D-Turanose	Jaune	Rouge
41	LYX	D-Lyxose		
42	TAG	D-Tagatose		
43	DFUC	D-Fucose		
44	LFUC	L-Fucose		
45	DARL	D-Arabitol		
46	LARL	L-Arabitol		
47	GNT	Potassium gluconate		
48	2KG	Potassium 2-Cétogluconate		
49	5KG	Potassium 5-Cétogluconate		

II.2.3. Conduite de la fermentation

La souche bactérienne a été étalée par stries sur un nutriment gélose oblique et incubée pendant 24 h à 30 °C. Deux boucles de culture sont inoculées dans 40 ml de bouillon nutritif dans un flacon erlenmeyer de 100 ml. Le flacon a été incubé dans un agitateur rotatif 150 tr / min à 30 ° C pendant 8 à 12 h jusqu'à ce que le nombre de cellules aurait atteint 10^8 UFC / ml. Utilisé comme inoculum à la concentration de 5% (p / v) (El-Sheshtawy et al., 2016).

➤ Mise en évidence de la production de biosurfactants

Pour la production de biosurfactants, un milieu de sels minéraux a été préparé (Annexe 2), des concentrations respectives de 2% et 3% de glucose et d'extrait de levure, ont été ajoutées au milieu de fermentation (El-Sheshtawy et al., 2016).

Deux autres milieux de base ont été préparés : le milieu MSM (minéral Salt medium), et un milieu LB (Lurie-bertani) (Annexe 2) (Rikalović et al., 2012).

II.2.4. Recherche de la production de biosurfactants

II.2.4.1. Test de dispersion d'huile

Dans le test de dispersion de l'huile, 50 ml de l'eau distillée a été ajouté à la surface d'une boîte de Pétri de 25 cm de dimension, plus 20µl d'huile brute sur la surface de l'eau. 10 µl de la culture a été ajouté sur la surface de l'huile.

Le diamètre de la zone claire à la surface de l'huile a été mesuré et lié à la concentration de biosurfactant en utilisant une courbe standard préparée avec un biosurfactant disponible dans le commerce, la surfactine (Sigma, St. Louis, MO) à des concentrations allant de 50 à 2000 mg/l (Morikawa et al.,2000 ; Youssef et al.,2004 ; Loganathan et al.,2010).

II.2.4.2. Test de Drop Collapse (Test d'effondrement de la goutte)

Jain et al., (1991) ont développé le test d'effondrement de la goutte. Ce test repose sur la déstabilisation des gouttelettes liquides par les agents tensioactifs (Walter et al., 2010).

Il consiste à ajouter 2 µl d'huile minérale à une microplaque à 96 puits, cette huile a été équilibrée pendant 1h à une température ambiante. Ensuite, 5 µl de la culture a été ajoutée sur la surface d'huile. La forme de la goutte a été observée après 1 minute.

Les résultats ont été interprétés comme suit : de « + » à « ++++ » correspondant à la diffusion partielle ou totale sur la surface de l'huile. Les cultures qui ont donnés des gouttes de forme arrondie ont été notées comme étant « - » indiquant un manque de la production des biosurfactants (Youssef et al.,2004 ; Loganathan et al., 2010).

II.2.4.3. Test d'émulsification (E24)

Le test d'émulsification a été réalisé selon le protocole de Sarubbo et al., (2006) .Il consiste à ajouter un volume de 2 ml de kérosène avec 2 ml du surnageant du milieu de fermentation dans un tube à essai. Agiter fortement au vortex pendant 02 minutes et laisser au repos pendant 24 heures. L'indice d'émulsification est calculé en utilisant l'équation suivante (Sidkey et al., 2016).

$$E24 = \frac{\text{Hauteur de l'émulsion formée} \times 100}{\text{Hauteur totale de la solution}}$$

II.2.5.Extraction des biosurfactants

L'extraction des biosurfactants a été réalisée selon le protocole de **Vater et al., (2002)** :

- Le bouillon bactérien (10 ml) a été inoculé dans le milieu MSM (1000 ml) utilisant le glucose comme seule source de carbone et la valeur du pH ajustée à 7,5. L'incubation a été réalisée à 30 °C, 150 tr / min, pendant 72 h.
- Un volume de 1000 ml de l'échantillon de la culture a été centrifugé à 13000g pendant 15 min à 4°C.
- Le surnageant a été traité par acidification par l'HCl à un pH 2.0 et laissé pendant une nuit à 4°C pour précipiter complètement les biosurfactants ; puis, centrifugé à 13000g pendant 15 min à 4°C.
- Le surnageant est retiré pour l'obtention du culot, puis , L'extraction est faite par l'addition du méthanol au culot, sous agitation continue pendant 2h.
- Le méthanol est ensuite filtré pour éliminer les matériaux restants et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (**El-Sheshtawy et al., 2016**).

Résultats et discussions bibliographiques

III .1.Revivification et purification de la souche bactérienne :

Après la revivification de la souche bactérienne *B. thuringiensis* sur milieux GN et après purification nous avons constaté l'apparition de colonies distinctes visible à l'œil nu spécifique de l'espèce utilisée (**Figure 09**).



Figure 09: Aspect macroscopique de *B.thuringiensis* après revivification sur gélose nutritive.

Les caractéristiques morphologiques coloniales de l'espèce de *Bacillus thuringiensis* enregistrées sont :

Taille de colonie	0,2 à 0,5 cm
Forme de colonie	Circulaire
Opacité	Opaque
L'élévation	Plate
Aspect de surface	Lisse
Le contour	Irréguliers
La couleur	Crème, blanchâtre
Odeur	Présence d'odeur

➤ **Aspect microscopique**

L'examen à l'état frais et la coloration du Gram montrent des cellules bactériennes de forme bacillaire à extrémité arrondies de 1µm de largeur et de 5 µm de longueur, regroupées en chaînette et elles sont mobiles à G+ (**Figure 10**).

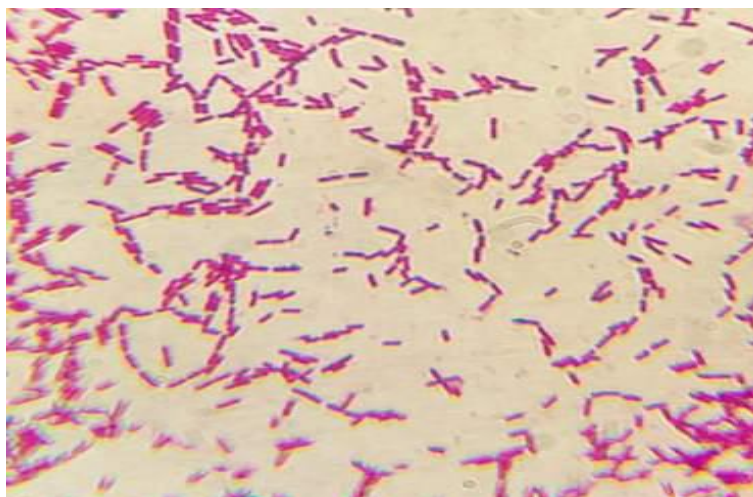
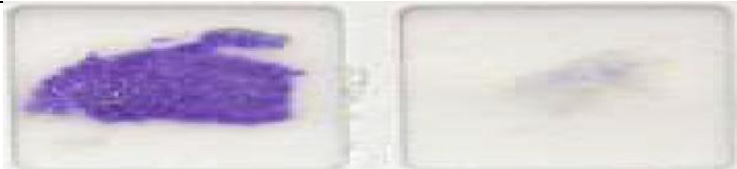
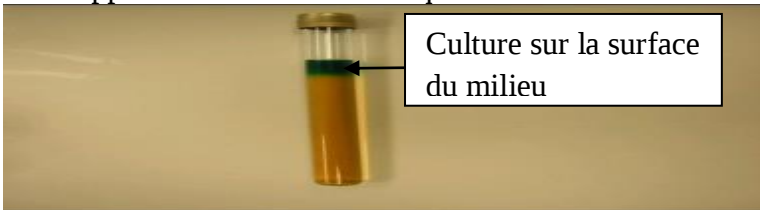


Figure 10 : Aspect microscopique de *Bacillus Thuringiensis* après coloration de Gram (G×100).

III .2. Recherche des enzymes respiratoires et du type respiratoire

Les résultats sont mentionnés dans le tableau IV .

Tableau IV : Résultats de différents tests biochimiques.

Tests biochimiques	Observations	Résultats
Test de catalase	- l'apparition des bulles d'air sur la lame. 	Catalase +
Test d'oxydase		Oxydase variable
Type respiratoire	Développement de la culture uniquement en surface.  Culture sur la surface du milieu	Bactéries aérobie stricte

Les résultats indiqués dans le tableau en ci-dessus renseignent que la souche *Bt* utilisée est Catalase +, Oxydase variable et aérobie stricte.

Pendant la respiration aérobique, le micro-organisme décompose le peroxyde d'hydrogène en oxygène. Des bulles d'air apparaissent, indiquant une réponse positif (Catalase +) (**Eswarapriya et al.,2010 ; Hamedo ,2016 ; Sharma and Iyer ,2018**).

Pour *Bt*, les résultats du test oxydase sont variables ; En effet **Sharma and Iyer, 2018** montraient une réponse positif (oxydase +), alors que **Hamedo,2016** indique une réponse négatif (oxydase -).

III .3. Mise en évidence de la spore

L'observation microscopique au grossissement $\times 100$ a permis l'identification des endospores vertes teinté avec le vert de malachite qui se distinguent des cellules végétatives colorées en rouge.

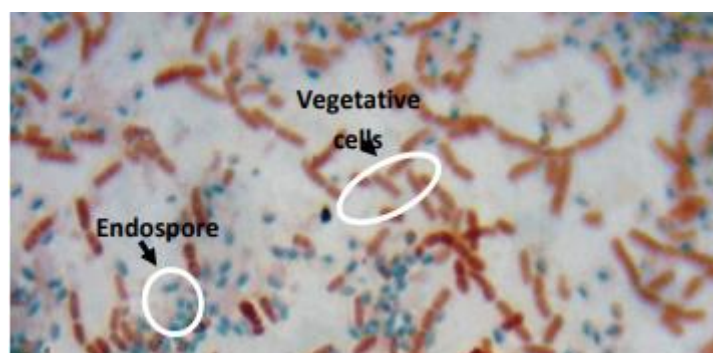


Figure 11:Aspect microscopique des spores chez la souche *Bacillus thuringiensis* (G $\times 100$).

III .4. Tests biochimiques en faveur de l'identification de l'espèce *Bacillus thuringiensis*

➤ Test API 50 CH

Les résultats des tests API 50 CH donnés par **González et al.,(2011)** pour trois isolats de *Bt* (**Tableau V**), indiquent que les trois isolats présentaient des réactions positives pour : Ribose,

Glucose, Fructose, Mannose, N-acétyl glucosamine, Arbutine, Esculine, Tréhalose, Amidon, Glycogène. En contraste, Glycérol, D-arabinose, L-arabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonitol, Méthylxyloside, Galactose, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, inositol, Mannitol, Sorbitol, Méthyl-manoside, Méthyl glucoside, Cellobiose, Lactose, Melobiose, Saccharose, Inuline, Melizitose, Raffinose, Xylitol, Gentobiose, Turanose, D-Lyxose, D-Tagose, D-Fucose, D-arbitol, Gluconate, K-2-Cétogluconate, K-5-Cétogluconate étaient négatif dans les trois isolats.

Tableau V: Le profil biochimique des tests API 50 CH de trois isolats de *Bacillus thuringiensis* (González et al., 2011).

Test	A21	A51	C17
Glycerol	-	-	-
Erythritol	-	+	-
D-arabinose	-	-	-
L-arabinose	-	-	-
Ribose	+	+	+
D-xylose	-	-	-
L-xylose	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Methyl xyloside	-	-	-
Galactose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Fructose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Sorbose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Methyl-mannoside	-	-	-
Methyl –glucoside	-	-	-
N-acethyl-glucosamine	+	+	+
Amygdaline	-	-	-
Arbutine	+	+	+
Esculine	+	+	+
Salicine	-	-	+
Cellobiose	-	-	-
Maltose	+	-	+
Lactose	-	-	-
Melobiose	-	-	-
Saccharose	-	-	+

Trehalose	+	+	+
Inuline	-	-	-
Melizitose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
Amidon	+	+	+
Glycogène	+	+	+
Xylitol	-	-	-
Gentobiose	-	-	-
Turanose	-	-	-
D-lyxose	-	-	-
D-tagose	-	-	-
D-fucose	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Gluconate	-	-	-
K-2- Céto gluconate	-	-	-
K-5 -Céto gluconate	-	-	-

Logan and Berkeley, (1984) ont rapporté que le système biochimique API 50 CHB a révélé pour *Bt*, une activité positive pour Ribose ,D-Glucose ,D-Fructose, D-Mannose, α -Methyl-D-glucoside , N-Acetyl-glucosamine, Amygdaline , Arbutine , Esculine , Salicine , Cellobiose , Maltose ,Saccharose ,Tréhalose ,Mélizitose ,D-Raffinose, Amidon, Glycogène , β -Gentiobiose , D-Turanose, L-Fucose, Gluconate. En revanche ,les tests : Glycérol, Erythritol, D-Arabinose ,L-Aabinose, D-Xylose, L-Xylose, Adonitol, β -Methylxyloside ,Galactose,L-Sorbose, Rhamnose, Dulcitol ,Inositol, Mannitol , Sorbitol , α Methyl-Dmannoside,Lactose, Melibiose, Inuline, Xylitol,D-Lyxose,D-Tagatose, D-Fucose, D- Arabitol, L-Arabitol, K-2- Céto gluconate, K-5-Céto gluconate présentaient une réactivité négative (**Tableau VI**).

Tableau VI : Le profil biochimique de *Bt* en utilisant le système API 50CHB (**Logan and Berkeley,1984**).

Test	Résultats
Glycérol	
Erythritol	
D-Arabinose	
L-Arabinose	
Ribose	98
D-Xylose	
L-Xylose	
Adonitol	
β -Methylxyloside	
Galactose	
D-Glucose	100
D-Fructose	100
D-Mannose	41
L-Sorbose	
Rhamnose	
Dulcitol	
Inositol	
Mannitol	
Sorbitol	
α -Methyl-D -mannoside	
α -Methyl-D-glucoside	4
N-Acetylglucosamine	100
Amygdaline	2
Arbutine	100

Esculine	98
Salicine	83
Cellobiose	72
Maltose	100
Lactose	
Melibiose	
Saccharose	55
Trehalose	100
Inuline	
Melezitose	4
D-Raffinose	1
Amidon	94
Glycogène	92
Xylitol	
β -Gentiobiose	4
D-Turanose	11
D-Lyxose	
D-Tagatose	
D-Fucose	
L-Fucose	2
D-Arabitol	
L-Arabitol	
Gluconate	6
K- 2-Cétogluconate	
K-5-Cétogluconate	

III .5. Recherche de la production de biosurfactants

Les biosurfactants sont considérés comme des métabolites secondaires, comme le montrent les résultats de la tension superficielle qui a diminuée progressivement à 36 mN/m avec une émulsification croissante jusqu'à 95% (**El-sheshtawy et al.,2016**).

Ces mêmes auteurs ont rapporté que la production maximale de biosurfactant surfactine par *B.licheniformis* a été obtenue en 72 h d'incubation pendant la phase stationnaire de la courbe de croissance.

Les travaux de **Al-Bahry et al., (2013)** et **Al-Wahaibi et al., (2014)** ont avancé que *Bacillus subtilis* produit entre 0,3 et 2,3 g / l de biosurfactant sur un milieu ordinaire complété avec de la mélasse de dattes comme source de carbone.

Aussi, **Morikawa et al., (2000)** ont rapporté que le diamètre de la zone de déplacement de l'huile est proportionnelle à la concentration des biosurfactants et que la méthode de dispersion d'huile reste la plus fiable pour détecter la production des biosurfactants.

La méthode d'effondrement des gouttes peut être utilisée pour détecter les microorganismes producteurs de biosurfactants dans les milieux naturels (**Bodour et al.,2003**) . C'est une étape primaire de dépistage primaire pour la production de biosurfactant, alors que la méthode de dispersion de l'huile est une étape de quantification de biosurfactant (**Loganathan et al.,2010**).

Plaza et al., (2015) ont souligné que les souches de *B. cereus* , *B. subtilis* , *B. pumilus* et *B. thuringiensis* produisent en commun les biosurfactants. La souche *Bacillus thuringiensis* demeure la meilleure productrice (**Santos et al.,2019**).

La réalisation du test d'émulsification selon le protocole **Sarubbo et al., (2006)** a permis de tirer des informations sur la capacité synthétique de la souche de *Bt*. L'émulsion obtenue reste

stable pendant plus d'une semaine et constitue un bon indice de présence des biosurfactants dans le milieu (**Krepsky et al.,2007 ; Loganathan et al.,2010**).

Conclusion

Actuellement, les biosurfactants sont devenus des biopesticides prometteurs dans la gestion des insectes nuisibles. Le genre *Bacillus*, est considéré comme l'un des réservoirs de ces biomolécules en raison de sa capacité de sporuler ainsi que sa survie dans les conditions environnementales extrêmes et la production des enzymes extracellulaires.

L'objectif d'étude était d'évaluer la production des biosurfactants en utilisant la souche *Bacillus thuringiensis* isolée à partir du sol dans la région de Boumerdès.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de réaliser les tests de ré-identification macroscopique et microscopique tels que : la coloration de Gram, le test oxydase, la catalase et la coloration de spores. Ces tests nous ont permis de confirmer les critères de *Bt*.

Pour la production des biosurfactants, une série de tests a été réalisés : test de dispersion d'huile, test de l'effondrement de la goutte et le test d'émulsification.

Les résultats bibliographiques ont montré une bonne production de biosurfactants de la souche *Bt*. Ces biosurfactants peuvent être exploités en lutte biologique contre les arthropodes nuisibles.

Perspectives :

- La réalisation d'une identification plus fiable des souches étudiées par des moyens moléculaires tels que le séquençage pour mieux caractériser les isolats.
- La recherche d'autres métabolites secondaires à l'origine de ces effets bénéfiques.
- L'étude des propriétés physico-chimiques de biosurfactant produit pour mieux connaître sa structure...etc.
- L'exploitation de la production de biosurfactant dans des bioréacteurs à grande échelle, pour l'amélioration des rendements de production.
- Etude de l'activité insecticide des biosurfactants par leur formulation en biopesticide.

Références bibliographiques

<<A>>

1. **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.
2. **Agaisse .H. Gominet M., Okstad.O.A. Kolsto.A.B. and Lereclus.D. (1999).** PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol.Microbiol.* 32:1043-1053.
3. **Agaisse H. and Lereclus D. (1995).** How does *Bacillus thuringiensis* produce so much Insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol* 177: 6027-6032.
4. **AIT AMER MEZIANE M.,HADDAH F.et OMARI N.(2019).** contribution à l'étude de l'effet larvicide de quelques entomopathogènes vis-à-vis des larves de 4 ème stade du moustique domestique *Culex pipiens* (Linnaeus,1758).Mém.Mast.UMBB.147P.
5. **Al-Bahry,S.N.,Al-Wahaibi,Y.M.,Elshafie,A.E.,Al-Bemani,A.S.,Joshi,S.J.,Al-Makhmari,H.S.,et al.(2013).** Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery .*Int.Biodeterior. Biodegradatio.* 81:141–146.
6. **Al-Wahaibi,Y.,Joshi,S.,Al-Bahry,S.,Elshafie,A.,Al Bemani,A.,andShibulal,B . (2014).** Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery . *Colloids Surf. B Biointerfaces* 114:324–333.
7. **Anthony.H.(2019).** Les petits savoirs du physicochimiste : 2. les tensioactifs. DOI: 10.13140/RG.2.2.34205.97763.

<>

8. **Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology.* 53(5): 495-508.

9. **Barnabé S.,(2004).** Hydrolyse et oxydation partielle des boues d'épuration comme substrat pour produire *bacillus thuringiensis* HD-1. Thèse (Ph. D). INRS, Québec ,235p.
 10. **Baum J.A. and Malvar T. (1995).** Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* .18: 1-12.
 11. **Ben Khedher.S., Boukedi.H., Dammak.M., Kilani-Feki.O., Sellami-Boudawara.T., Abdelkefi-Mesrati.L., Tounsi.S.(2017).** Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of invertebrate pathology*.144:11-17.
 12. **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.
 13. **Bodour AA, Drees KP, Maier RM. (2003).** Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol.* 69 (6):3280–3287.
 14. **BRAHIM S. (2013).** Propriétés physiologiques et génétiques communes entre *Bacillus weihenstephanensis* et des souches de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus mycoides*. Thèse de Doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, 205 p.
- <<C>>
15. **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.

16. **Chen.X.H., Koumoutsi.A., Scholz.R., Eisenreich.A., Schneider.K., Heinemeyer.I., Morgenstern.B., Voss.B., Hess.W.R., Reva.O., Junge.H., Voigt.B., Jungblut.P.R., Vater.J., Süßmuth.R., Liesegang.H., Strittmatter.A., Gottschalk .Gand Borriss.R. (2007).**Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth–promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*.25: 1007-1014.

<<D>>

17. **Delarras, C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier-Tec & Doc. P757.

<<E>>

18. **El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2015).**production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*.24: 155-162.

19. **El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2016).** Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. *Egyptian Journal of Petroleum*. 25(3): 293-298.

20. **Eswarapriya.B., Gopalsamy.B., Kameswari.B., Meera.R., Devi.P.(2010).**Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* IBT- 15 Strain against *Plutella xylostella*. *Int.J. Pharm Tech Res.* 2 : 2048-2053.

<<F>>

21. **Fakruddin.M.d .(2012).** Biosurfactant: Production and Application. *J. Pet. Environ.Biotechnol.* 3: 1-5.

<<G>>

22. **Gautam .K.K et Tyagi.V.K (2006).** Microbial Surfactants : A review.*J.Oleo Sci.*,55(4):155 – 166.
23. **Gharaei-Fathabad.E.(2011).**Biosurfactants in pharmaceutical industry : A Mini-Review. *American journal of Drug Discovery and Development*.1:58-69.
24. **González.A., Díaz.R., Díaz1.M., Borrero.Y., Bruzón.R.Y., Carreras.B., Gato . R . (2011).** Characterization of *Bacillus thuringiensis* soil isolates from Cuba,with insecticidal activity against mosquitoes. *Rev. Biol. Trop.*59 :1007-1016.

<<H>>

25. **Hamedo.H.A.(2016).** Identification of *Bacillus Thuringiensis* Isolated from Different Sources by Biolog GEN III System and Scanning Electron Microscopy.The *International Journal of Environmental Sciences*. 15 :51-57.
26. **Helassa N.(2008).**Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de *Bacillus thuringiensis* (Bt) dans le sol. Thèse doctorat.179p.

<<I>>

27. **Ibrahim, M. A., Griko.N., Junker.M., Bulla.L.A.(2010).** *Bacillus thuringiensis*: A genomics and Proteomics perspective. *Bioengineered bugs*. 1(1): 31-50.

<<J>>

28. **Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T., (1991).**A drop-collapsing test for screening biosurfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods*.13: 271– 279.

29. **Javis SG, Johnson MJ. (1949).** Glycolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* . *J .Am .Chem.*73: 4124-4126.

30. **Jisha.V.N., Smitha.R.B., Benjamin.S. (2013).** An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology.* 3: 462-472.

<<K>>

31. **Kosaric N (2001).** Biosurfactants and their Applications for Soil Bioremediation. *Food Technol Biotechnol.* 39: 295-304.

32. **Krepsky N, Da Silva FS, Fontana LF, Crapez M.(2007).** Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. *Braz J Biol* . 67: 117-124.

33. **Krishnaswamy M, Subbuchettiar G, Ravi TK, Panchaksharam S (2008).** Biosurfactants properties, commercial production and application. *Current Science.* 94:736-747.

<<L>>

34. **Lecadet MM, Frachon E, Dumanoir VC, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, Thierry I(1999).** Updating the H antigen classification of *Bacillus thuringiensis* . *J . Appl . Microbiol.*86:660-672.

35. **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.

36. **LoganNA, BerkeleyRC(1984).** Identification of *Bacillus* Strains Using the API System. *J. General Microbiol.* 130: 1871 -1882.

<<M>>

37. **Makkar.R.S. and Rockne.K.J.(2003).** Comparaison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ.Toxicol.Chem.*22:2280-2292.
38. **Malovichko . Y.V., Nizhnikov.A.A.,Antonets.K.S.(2019).** Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* Virulence Factors Unrelated to Major Classes of Protein Toxins and Its Role in Specificity of Host-Pathogen Interactions. *Toxins*.11 (347): 1-18.
39. **Mejias.L., Estrada.M., Barrena.R., Gea.T.(2020).** A novel two-stage aeration strategy for *Bacillus thuringiensis* biopesticide production from biowaste digestate through solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 161 : 1-9.
40. **Meylheuc T, Herry JM, Bellon-Fontaine MN (2001).** Biosurfactants, surface-active biomolecules with wide potential applications. *Sci.Aliment*. 21 (6) : 591-649.
41. **Mohan PK, Nakhla G, Yanful EK (2006).** Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water. Res.* 40 : 533-540.
42. **Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000).** A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218 .
43. **Mulligan CN (2005).** Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*133: 183-198.

<<N>>

44. **Nair.K.,Al-thani.R.,Al-thani .D., Al-Yafei.F.,Ahmed.T.,Jaoua.S.(2018).** Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and cry gene content. *Front.Microbiol.*9(708):1-10.

45. Nitschke M et SagvaoC (2007). Biosurfactants in food industry. *Trends. Food.Sci. Tech.* 18: 252-259.

<<P>>

46. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., and Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins (Basel)*. 6 : 3296–3325.
47. 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. Timmised. Springer, UK (in press).47 :1502-1512.
48. Plaza, G.; Chojniak, J.; Rudnicka, K.; Paraszkievicz, K.(2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *J App Microbiol*, 119:1023-34.
49. Popp J., PetÖ K., and Nagy J.(2013). Pesticide productivity and food security. A review.Agron. Sustainable Dev. 33: 243-255.

<<R>>

50. Raddadi.N.,Cherif.A.,Ouzari.H., Marzorati.M., Brusetti.L., Boudabous.A., Daffonchio.D.(2007).*Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Annals of Microbiology*. 57 (4):1-14.
51. Rampersad J., Khan A. and Ammons D. (2003). A *Bacillus thuringiensis* isolate possessing a spore-associated filament. *Current Microbiology*. 47: 355-357.

52. Reddy Y.C. & Venkateswerlu G.(2002). Intracellular proteases of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and a protease-deficient mutant Btk-q. *Curr. Microbiol.*45: 405-409.
53. Rikalovic, M. G., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M. M., & Karadzic, I. (2012). Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of the Serbian Chemical Society* . 77(1): 27-42.
54. Ron E.Z. et Rosenberg E. (2001). A Review of Natural Roles of Biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3(4) : 229-236.
55. Roy.A.(2017). A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications.*J Fundam Renewable Energy appl.* 8 : 1-5.
- <<S>>
56. Sanahuja.G.,Banakar.R.,Twyman.R.M.,Capell.T.,Christou.P.(2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research,development and commercial applications .*Plant Biotechnology.* 9:283-300.
57. Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA ,Sarubbo LA (2016) .Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int. J. Mol. Sci.*17(401):1-31.
58. Santos.E.C.L.D.,Miranda.D.A.D.R.,Silva.A.L.D.S.,López.A.M.Q.(2019).Biosurfactant production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill waste waters.*Brazilian Archives of Biology and Technology.*62:1-12.
59. Sarubbo LA, Luna JM, Campos-Takaki GM. (2006).Production and stability studies of the bioemulsifiers obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology.* 9:400-406.
60. Satpute.S.K ,Banpurkar A.G , Dhakephalkar P.K , Banat I.M , Chopade B.A. (2010).Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers : a review. *Crit.Rev. Biotechnol.* Pp :1-18.

61. Schramm.L.L., Stasiuk.E.N and Marangoni.D.G.(2003). Surfactants and their applications. *Ann.Rep.Program Chem.Sec.*,99:3-48.
62. Sellami.S., Tounsi.S.,Jamoussi.K.(2015). *Bacillus thuringiensis*: un biopesticide environnemental (synthèse bibliographique). *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, N° 7: 25-42.
63. Sharma.J and Iyer.P.(2018). Isolation and Identification of *Bacillus Thuringiensis* and Corroborate Its Insecticidal Property. *J Agri Sci Food Res.* 9: 1-3.
64. Sidkey, N. M., Mohamed, H. F., & Elkhoully, H. I. (2016). Evaluation of different screening methods for biosurfactant producers isolated from contaminated Egyptian samples Grown on Industrial Olive Oil Processing waste. *British Microbiology Research Journal*.17 (4):1-19.

<<V>>

65. 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.
66. Vijayakumar, S., Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. 10(5): 181-192.

<<W>>

67. Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation Of biosurfactant producing microorganisms. In *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.

- 68. 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.

<<Y>>

- 69. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. (2004).** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *J Microbiol Methods.* 56: 339-347.

Annexes

Annexe 1 : Liste de matériels utilisés

Verreries et autres instruments	Appareillages	Réactifs et additifs
Erlenmeyer	Bec bunsen	Eau distillée
Béchers	Microscope photonique	Eau physiologique
Boîtes de pétri en plastique	Balance	Violet de gentiane
Tube à essai	Etuve	NaOH
Pipette pasteur	Four pasteur	HCl
Micropipette	Autoclave	NaCl
Anse de platine	Vortex	Lugol
Lame et lamelle	Plaque chauffante	Ethanol à 95%
Para film	Incubateur-agitation	Fuchsine
Ecouvillon	PH-mètre	L'huile à immersion
Pince	Bain marie	Eau oxygénée
Cuve de spectrophotomètre	Spectrophotomètre	Disque d'oxydase
Spatule	Centrifugeuse	Huile de vaseline
Barreaux magnétiques	Dispositif de filtration	Vert de malachite
microplaque à 96 puits		

Annexe 2 : la composition de milieux de cultures utilisés

Bouillon nutritif

Peptone.....	10g
Extrait de levure.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Eau distillée.....	1000 ml

Gélose nutritive

Peptone.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000ml

Gélose viande-foie

Base viande foie.....	30g
Glucose.....	2g
Agar.....	8g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

L'eau physiologique

Chlorure de sodium.....	9g
Eau distillée qsp.....	1000 ml

Milieu de sels minéraux (El-Sheshtawy et *al.*, 2016).

NaNO₃.....2, 5 g/l
KCl.....0, 1 g/l
KH₂PO₄.....3, 0g/l
K₂HPO₄.....7,0 g/l
CaCl₂.....0,01 g/l
MgSO₄.7H₂O...0,5 g/l
Eléments traces0,005g/l
Glucose.....20 g/l
Extrait de levure....30 g/l
Source de carbone ajoutée : glycérol.

Eléments traces (El-Sheshtawy et *al.*, 2015).

FeSO₄.7H₂O.....0, 116g/l
H₃BO₃.....0.232g/l
CoCl₂.6H₂O.....0, 41g/l
CuSO₄.5H₂O.....0, 008g/l
MnSO₄.H₂O.....0, 008g/l
[NH₄]₆ Mo₇O₂₄.....0,022 g/l
ZnSO₄.....0, 174 g/l

Les milieux de base (Rikalović et *al.*, 2012).

Milieu MSM (mineral salt medium)

NH₄NO₃.....4, 0 g/l
KH₂PO₄.....4, 08g/l
Na₂HPO₄.....5, 68 g/l
CaCl₂.....7, 77.10⁻⁴ g/l
MgSO₄.7H₂O.....0, 2 g/l
Sodium EDTA.....1, 49.10⁻³ g/l
FeSO₄.7H₂O.....5, 56.10⁻⁴ g/l

Milieu LB (Lurie-Bertani)

NaCl.....5 g/l
Extrait de levure.....5 g/l
Peptone I.....10 g/l

Résumé

Bacillus thuringiensis est l'espèce de bactérie utilisée pour ses propriétés insecticides, qui peuvent synthétiser différents agents tensioactifs à partir de plusieurs sources de carbone et d'azote. Les biosurfactants en tant qu'agent tensioactif biologique efficace, peuvent fournir une solution alternative pour l'élimination des polluants. Ils présentent des propriétés de réduire la tension superficielle et interfaciale, et de stabiliser l'émulsion. Dans cette étude, la souche *Bacillus thuringiensis* isolée du sol a été testée pour sa capacité de produire les biosurfactants. De ce fait, des études microbiologiques, biochimiques de la souche *Bt* ont été effectuées. Des résultats différents ont été obtenus selon les auteurs. Certains ont montrés que la souche *Bacillus thuringiensis* est le meilleur producteur de biosurfactants qui présentant d'excellents outils dans la lutte biologique.

Mots clés : Biosurfactants , *Bacillus thuringiensis* , tension superficielle, biopesticide.

Abstract

Bacillus thuringiensis is the species of bacteria used for its insecticidal properties, which can synthesize different surfactants from several sources of carbon and nitrogen. Biosurfactants, as an effective biological surfactant, can provide an alternative solution for the removal of pollutants. They exhibit properties of reducing surface and interfacial tension, and of stabilizing the emulsion. In this study, the *Bacillus thuringiensis* strain isolated from soil was tested for its ability to produce biosurfactants. Therefore, microbiological, biochemical studies of the *Bt* strain have been carried out. Different results were obtained according to the authors. Some have shown that the *Bacillus thuringiensis* strain is the best producer of biosurfactants which have excellent tools in biological control.

Key words: Biosurfactants, *Bacillus thuringiensis*, Surface tension, Biopesticide.

الملخص

باسيلوس ثورينجينسيس هي نوع من البكتيريا تستخدم لخصائصها المبيدات الحشرية ، والتي يمكن أن تصنع مواد خافضة للتوتر السطحي من عدة مصادر للكربون والنيتروجين. يمكن أن توفر المواد الخافضة للتوتر السطحي ، كعامل خافض للتوتر السطحي البيولوجي ، حلاً بديلاً لإزالة الملوثات إنها تظهر خصائص تقليل التوتر السطحي ، وتثبيت المستحلب. في هذه الدراسة ، تم اختبار سلالة باسيلوس ثورينجينسيس المعزولة من التربة لقدرتها على إنتاج المواد الحيوية. لذلك، تم إجراء دراسات ميكروبيولوجية و كيميائية حيوية لسلالة باسيلوس ثورينجينسيس. تم الحصول على نتائج مختلفة وفقاً للمؤلفين. و قد أظهر البعض أن سلالة باسيلوس ثورينجينسيس هي أفضل منتج للمواد الحيوية التي تمتلك أدوات ممتازة في مكافحة البيولوجية.

الكلمات المفتاحية : المواد الحيوية ، باسيلوس ثورينجينسيس ، التوتر السطحي، المبيدات الحيوية .