

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques



Thèse

Présentée par: M^{me} DERGUINE-MECHERI Louiza
En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle L.M.D
Filière: Sciences Biologiques
Option: Biochimie, Microbiologie et Sciences Alimentaires
Thème

***Production et caractérisation des biosurfactants par
des levures et des moisissures***

Soutenue publiquement le 28 / 11 / 2019 devant le jury:

M. HOUALI Karim	Prof	Univ. de Tizi-Ouzou. Algérie	Président
M ^{me} KEBBOUCHE-GANA Salima	Prof	Univ. de Boumerdès. Algérie	Directrice de thèse
M. DJENANE Djamel	Prof	Univ. de Tizi-Ouzou. Algérie	Co-directeur de thèse
M ^{me} BOUANANE-DARENFED Nabila Amel	Prof	Univ. de Bab Ezzouar. Algérie	Examinatrice
M. OUELHADJ Akli	MCA	Univ. de Tizi-Ouzou. Algérie	Examineur
M ^{me} YAHIAOUI-AICHAOUI Karima	MCA	Univ. de Boumerdès. Algérie	Examinatrice

Année universitaire: 2019/2020

Remerciements

Arrivée au bout de ce travail de longue haleine. Il m'est donc agréable d'exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail.

Je remercie tout d'abord Allah le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la force afin de réaliser ce travail.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à Mr *Houali Karim* qui a bien voulu présider le jury de ce travail.

Je suis sensible à l'honneur que nous font :

Mme *Bouanane-Darenfed Nabila Amel*, Mme *Yahiaoui-Aichaoui Karima*,

et Mr *Ouelhadj Akli* en acceptant d'être les examinateurs de ce travail.

Je les remercie vivement pour cette marque d'intérêt et notamment de nous faire l'honneur de participer à ce jury.

Je remercie sincèrement ma directrice de thèse Mme *Kebbouche-Gana Salima*, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans ce travail, aussi pour son dévouement incomparable et son encadrement sans faille. Ses compétences, ses précieux conseils, sa grande expérience, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude et remerciements à mon co-directeur de thèse Mr *Djenane Djamel* pour tous ses conseils, aides et son encouragement et pour sa disponibilité et sa gentillesse indéfinie.



Dédicace

Je dédie ce travail, le fruit de mes longues années d'étude à :

À mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis ma naissance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Puisse Allah vous préserve et vous procure la santé et le bonheur.

A mon très cher époux *Mokrane* ,

Merci pour la noblesse de tes pensées, la douceur de tes mots et pour la chaleur de ton amour.

Et à notre fruit d'amour mon trésor et mon amour *Massilia*

A la mémoire de ma très chère grand-mère paternelle *Zouina* qui n'a jamais cessé de prier pour que ce jour arrive, qu'Allah la bénisse et qu'elle repose en paix, mon ange gardien.

A mon cher frère *Samir*

A mes très chères sœurs *Nawel* et *Linda*

A mes grands-parents maternels surtout *Jeddi* qui n'a jamais arrêté de me poser la question :
Quand est-ce tu vas soutenir ma fille ?

A tous mes oncles et leurs épouses ainsi que leurs enfants.

A toutes mes tantes et leurs époux ainsi que leurs enfants.

A tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.



Résumé

L'objectif de cette étude s'articule autour de la production et la caractérisation des biosurfactants par des levures et des moisissures isolées à partir de différents échantillons récoltés en Algérie, comprenant des produits laitiers, des fruits et des échantillons contaminés par les hydrocarbures provenant du Sahara Algérien. Ainsi, 143 isolats, ont été criblés pour la production des biosurfactants sur milieu minimum contenant 2% de gasoil comme source de carbone en utilisant les tests suivants : le test d'émulsification (E_{24}), le test du "drop-collapse", la technique de déplacement de l'huile et la recherche de l'activité hémolytique. Quatre souches fongiques dont deux levures et deux moisissures se sont révélées performantes ($E_{24} > 60\%$, formant ainsi des émulsions très stables). L'identification approfondie des deux souches de levures par l'étude de leurs caractères culturels, biochimiques, physiologiques et génétiques, nous a permis de les affilier aux genres *Cryptococcus* sp. YLF et *Rhodotorula* sp. YBR. Quant aux moisissures, elles ont été identifiées comme *Aspergillus* sp. FS11 et *Penicillium* sp. FS13, en se basant sur l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques. L'optimisation des paramètres physico-chimiques tel que le pH, la température, les sources de carbone (C) et d'azote (N_2) pour la production des biosurfactants a été réalisée pour les quatre souches fongiques sélectionnées.

Dans le cadre de la réduction des coûts de production des biosurfactants, des fermentations en batch ont été réalisées sur des milieux à base des déchets agro-industriels. En effet, sur milieu de culture à base de margines, les valeurs de E_{24} , TS et concentration en biosurfactants étaient $90 \pm 0,10 \%$, 35 mN/m et $10,08 \pm 0,38 \text{ g/L}$, respectivement pour *Rhodotorula* sp. YBR et $76 \pm 0,28 \%$, $42 \pm 0,20 \text{ mN/m}$, $11,15 \pm 0,7 \text{ g/L}$, respectivement pour *Aspergillus* sp. FS 11.

La culture de *Penicillium* sp. FS13 sur un milieu de culture à base de lactosérum a montré les résultats suivants : $E_{24} = 85 \pm 0,2 \%$, $TS = 40 \pm 0,28 \text{ mN/m}$ et un rendement en biosurfactants de $13,15 \pm 0,52 \text{ g/L}$. Quant à *Cryptococcus* sp. YLF, elle a produit des biosurfactants pour une valeur $E_{24} = 80 \pm 0,15 \%$, une valeur de $TS = 40 \text{ mN/m}$ avec un rendement en biosurfactants = $8,05 \pm 0,25 \text{ g/L}$ sur milieu à base de jus de datte.

Les extraits des biosurfactants ont été partiellement caractérisés par chromatographie sur couche mince (CCM) et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) comme étant des glycolipides et glycoprotéines pour les souches YLF et FS13, respectivement. Tandis que les biosurfactants produits par les souches FS11 et YBR ont été partiellement caractérisés comme des glycolipoprotéines. Les quatre biosurfactants ont présenté des propriétés intéressantes telles : une faible concentration micellaire critique (CMC), une importante réduction de la tension de surface TS et une importante activité émulsifiante. En outre, ils ont montré une grande stabilité vis-à-vis d'une large gamme de pH (2 à 12), de température (4–100 °C) et de salinité (1–10%). De plus, ces agents tensioactifs ont montré un grand potentiel en récupération de pétrole à partir des échantillons contaminés et également une activité antimicrobienne intéressante contre certains microorganismes pathogènes.

Mots-clés : Biosurfactants; *Aspergillus* sp. FS 11; *Cryptococcus* sp. YLF; *Penicillium* sp. FS 13; *Rhodotorula* sp. YBR; valorisation des sous-produits agricoles; TS; E_{24} .

Abstract

The aim of this study is the production and characterization of biosurfactants by yeasts and filamentous fungi. Fungal strains were isolated from different samples collected in Algeria. Screening for biosurfactants producing isolates was carried out with various tests including emulsification index (E_{24}), drop collapse, spread oil and blood agar test. Four isolates, coded YLF, YBR, FS11 and FS13 were found to be the most potent biosurfactants producers with E_{24} values greater than 60%. Identification of the two yeast strains (YLF and YBR) by studying their cultural, biochemical, physiological and molecular characteristics, allowed us to classify them in the genera of *Cryptococcus* and *Rhodotorula*, respectively. Fungal strains have been identified as *Aspergillus sp.* FS11 and *Penicillium sp.* FS13, based on macroscopic and microscopic characteristics. Optimization of the physicochemical parameters of biosurfactants production such as pH, temperature, best carbon and nitrogen sources was realized for the four selected strains. For low cost effective biosurfactants production, batch fermentations were carried out on media based on agro-industrial wastes. When grown on a medium based on OMW, the emulsification index values E_{24} reached $90 \pm 0.10 \%$ and $76 \pm 0.28 \%$, the surface tension values were 35 mN/m and 42 ± 0.20 mN/m and the biosurfactants yields were 10.08 ± 0.38 g/L and 11.15 ± 0.7 g/L, respectively for *Rhodotorula sp.* YBR and *Aspergillus sp.* FS11. *Penicillium sp.* FS13 grown on cheese whey medium showed E_{24} value of $85 \pm 0.2 \%$, ST value of 40 ± 0.28 mN/m and biosurfactants yield of 13.15 ± 0.52 g/L.

As for *Cryptococcus sp.* YLF, it produced biosurfactants with E_{24} value of $80 \pm 0.15 \%$, ST value of 40 mN/m and biosurfactants yield of 8.05 ± 0.25 g/L on crude date juice medium.

The partial characterization of crude extracts showed that strains YLF and FS13 produced glycolipid and glycoprotein biosurfactants. However, the biosurfactants produced by FS11 and YBR were partially characterized as glycolipoprotein complex based on CCM and FTIR results. The four biosurfactants presented interesting properties such as: low CMC, significant reduction in surface tension, and important emulsifying activity. In addition, they showed stability over a wide range of pH (2 to 12), temperature (4-100 °C) and salinity (1-10%). Further, produced biosurfactants, showed great potential in enhanced oil recovery from contaminated sand and broad spectrum of antimicrobial activity against certain pathogenic microorganisms.

Keywords: Biosurfactants; *Aspergillus sp.* FS11; *Cryptococcus sp.* YLF; *Penicillium sp.* FS13; *Rhodotorula sp.* YBR; valorization of agro-industrial by-products; ST; E_{24} .

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو إنتاج مواد مخفضة للتوتر السطحي بواسطة الخمائر والفطريات. للقيام بهذا قمنا كأول خطوة بعزل سلالات فطرية من عينات مختلفة في الجزائر. ثم قمنا باختبار قدرتها على إنتاج مخفضات التوتر السطحي بتقنيات بسيطة منها: حساب مؤشر الاستحلاب (E_{24})، اختبار انهيار القطرة، تقنية انتشار الزيت والبحث عن النشاط الانحلالي للدم. تم اختيار أربع سلالات مشفرة كالتالي: YBR، YLF، FS11 و FS13 بسبب قدرتها الكبيرة على إنتاج مخفضات التوتر السطحي حيث تميزت بمؤشر استحلاب E_{24} أكبر من 60٪، وتشكيل مستحلبات مستقرة جدا.

للتعرف على سلالاتي الخميرتين (YBR و YLF) تم إجراء دراسات مورفولوجية، فزيولوجية ووراثية، وسمح لنا هذا بتصنيفهما ضمن *Cryptococcus sp.* YLF و *Rhodotorula sp.* YBR؛ كما تم التعرف على الفطرين ك: *Aspergillus sp.* FS11 و *Penicillium sp.* FS13، بناءً على المعايير الظاهرية و المجهرية.

كما تمت دراسة تأثير العوامل الفيزيوكيميائية مثل: pH، درجة الحرارة، أيضا مصدر الكربون ومصدر الأزوت على نشاط وتكاثر السلالات الأربعة المختارة للدراسة.

في إطار إعادة تصنيع النفايات الزراعية، أجريت عمليات تخمير باستعمال السلالات المذكورة سابقا في أوساط مغذية تحتوي على بعض النفايات الزراعية والصناعية، وتم الحصول على مردود إنتاج عالي للمواد المخفضة للتوتر السطحي. على سبيل المثال، لما استعمل كوسط مغذي OMW، بلغت قيم مؤشر الاستحلاب E_{24} 90% و 76%، وكانت قيم التوتر السطحي 35 mN/m و 42 mN/m والمردود 10.08 غ/ل و 11.15 غ/ل، على التوالي لـ *Rhodotorula sp.* YBR و *Aspergillus sp.* FS11.

أظهر فطر *Penicillium sp.* FS13 المزروع على مصّل الحليب E_{24} 85% و 40 mN/m ST ومردود الانتاج 13.15 غ/ل. أما بالنسبة لـ *Cryptococcus sp.* YLF E_{24} 80%، وقيمة 40 ST mN/m والمردود هو 8.05 غ/ل، لما زرعت في وسط عصير التمر الخام.

للتعرف على طبيعة المواد المنتجة قمنا باستعمال تقنيات مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM، وقد بينت النتائج أن مخفضات التوتر السطحي المنتجة من طرف YLF و FS13 ذو طبيعة غليكوليبيدية وجليكوبروتينية على الترتيب، بينما الطبيعة الكيميائية للمواد المخفضة للتوتر السطحي المنتجة من طرف FS11 و YBR هي مزيج من السكريات والدهون والبروتينات.

للتأكد من فعالية المواد المخفضة للتوتر السطحي المنتجة من طرف السلالات الأربعة، قمنا بدراسة ثبوت خصائصها في عوامل فيزيوكيميائية قاهرة مثل (2-10) pH ودرجة الحرارة (4-100 درجة مئوية) والملوحة (1-10٪). النتائج اثبتت فعالية هذه المواد بسبب ثبوتها واستقرارها رغم قساوة الظروف. وعلاوة على ذلك، ثبت أن المواد المنتجة من طرف السلالات الأربعة ذات فعالية كمضادات لبعض الميكروبات المسببة للأمراض.

الكلمات المفتاحية: *Cryptococcus sp.* YLF؛ مواد مخفضة للتوتر السطحي؛ مؤشر الاستحلاب E_{24} ؛ التوتر السطحي TS؛ *Rhodotorula sp.* YBR؛ *Aspergillus sp.* FS11؛ *Penicillium sp.* FS13؛ إعادة تصنيع بعض النفايات الزراعية.

*Conclusion et
perspectives*

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique	
I.1. Levures	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.2. Morphologie	4
I.1.3. Taxonomie	5
I.1.3.1. Ascomycètes	5
I.1.3.2. Basidiomycètes	6
I.1.3.3. Deutéromycètes	6
I.1.4. Structure	8
I.1.5. Reproduction	9
I.1.5.1. Reproduction asexuée	9
I.1.5.1.1. Reproduction asexuée par bourgeonnement	9
I.1.5.1.2. Reproduction asexuée, par scission-scissiparité	10
I.1.5.2. La reproduction sexuée	10
I.1.6. Besoins nutritionnels	11
I.1.6.1. Besoins en carbone	11
I.1.6.2. Besoins en azote	12
I.1.6.3. Besoins en lipides	12
I.1.6.4. Besoin en sels minéraux, oligo-éléments et vitamines	12
I.1.6.5. Facteurs physicochimiques	13
I.1.7. Intérêt en biotechnologie	14
I.2. Moisissures	15
I.2.1. Généralité	15
I.2.2. Structure	15
I.2.3. Reproduction	17
I.2.3.1. Reproduction asexuée	17
I.2.3.2. Reproduction sexuée	17
I.2.4. Taxonomie	18
I.2.5. Besoins nutritionnels	20
I.2.5.1. Température	20
I.2.5.2. Aération	20
I.2.5.3. pH	20
I.2.5.4. Activité de l'eau (aw)	21
I.2.5.5. Nutriments	21
I.2.5.5.1. Source de carbone et d'énergie	21
I.2.5.5.2. Source d'azote	21
I.2.5.5.3. Eléments minéraux	22

I.2.6. Intérêt en biotechnologie	22
I.2.6.1. Intérêt alimentaire	22
I.2.6.2. Intérêt chimique	23
I.2.6.3. Intérêt pharmaceutique et médical	23
I.3. Biosurfactants	24
I.3.1. Généralités	24
I.3.2. Classification	25
I.3.2.1. Selon la structure	26
I.3.2.1.1. Glycolipides	26
I.3.2.1.2. Lipopeptides	27
I.3.2.1.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres	28
I.3.2.1.4. Biosurfactants polymériques	29
I.3.2.1.5. Biosurfactants particuliers	29
I.3.1.2. Selon le poids moléculaire	32
I.3.2.2.1. Biosurfactants à poids moléculaire élevé	32
I.3.2.2.2. Biosurfactants à poids moléculaire faible	32
I.3. 3. Microorganismes producteurs et physiologie	32
I.3.4. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants	34
I.3.4.1. Diminution de la tension superficielle	34
I.3.4.2. Concentration micellaire critique	34
I.3.4.3. Emulsification	35
I.3.4.4. Tolérance aux conditions extrêmes de température, pH et de salinité	36
I.3.4.5. Faible toxicité	36
I.3.4.6. Biodégradabilité	36
I.3.5. Paramètres influençant la production des biosurfactants	37
I.3.5.1. Source de carbone	37
I.3.5.2. Source d'azote	37
I.2.5.3. Conditions de culture	38
I.3.6. Production de biosurfactants en utilisant des substrats bon marché	39
I.3.7. Applications industrielles de biosurfactants	41
Chapitre II. Matériel et méthodes	45
II.1. Matériel	45
II.1.1. Matériel et équipement	45
II.1.2. Matériel biologique	45
II.2. Méthodes	46
II.2.1. Isolement des levures et moisissures	46
II.2.1.1. Milieux utilisés	47
II.2.1.2. Ensemencement	47
II.2.1.3. Purification	47
II.2.1.4. Conservation	47
II.2.2. Criblage des souches productrices des biosurfactants	48
II.2.2.1. Test d'émulsification E ₂₄	48

II.2.2. 2. Test du "drop-collapse"	49
II.2.2. 3. Test de déplacement de l'huile	50
II.2.2. 4. Recherche de l'activité hémolytique	51
II.2.3. Identification des isolats	51
II.2.3.1. Identification des levures	51
II.2.3.1.1. Identification phénotypique	51
II.2.3.1.2. Identification biochimique et physiologique	52
II.2.3.1.3. Lecture et analyse des résultats	54
II.2.3.1.4. Identification génotypique des souches performantes	54
II.2.3.2. Identification des moisissures	55
II.2.3.2.1. Caractères culturels	55
II.2.3.2.2. Caractères morphologiques	56
II.2.3.2.2.1. Coloration	56
II.2.3.2.2.2. Montage du matériel à examiner et l'observation	56
II.2.4. Valorisation des sous-produits agricoles pour la production des biosurfactants	57
II.2.4.1. Milieu de culture à base de jus de datte	57
II.2.4.2. Milieu à base de lactosérum	58
II.2.4.3. Milieu de culture à base de la liqueur de trempage de maïs ou	60
II.2.4.4. Milieu de culture à base des margines et des grignons d'olives	60
II.2.4.5. Milieu de culture à base de la mélasse	62
II.2.5. Optimisation des conditions de culture et de la composition du milieu pour la production des biosurfactants	62
II.2.6. Production des biosurfactants par fermentation	63
II.2.6.1. Revivification des souches	63
II.2.6.2. Vérification de la pureté des souches	63
II.2.6.3. Culture en Batch	63
II.2.6.3.1. Précultures	63
II.2.6.3.2. Culture en Erlenmeyers	64
II.2.6.3.3. Culture en fermenteur	64
II.2.6.3.3.1. Préparation du fermenteur	65
II.2.6.3.3.2. Conditions opératoires	66
II.2.6.3.3.3. Inoculation du fermenteur	66
II.2.6.4. Méthodes analytiques	67
II.2.6.4.1. Estimation de la biomasse	67
II.2.6.4.1.1. Spectrophotométrie (Turbidimétrie)	67
II.2.6.4.1.2. Méthode gravimétrique (Poids sec)	67
II.2.6.4.2. Dosage des sucres réducteurs	68
II.2.6.5. Evaluation de la production des biosurfactants	68
II.2.6.5.1. Suivi de la tension superficielle	68
II.2.7. Localisation des biosurfactants	68
II.2.8. Extraction des biosurfactants	69
II.2.9. Semi-purification des biosurfactants sur couche mince	71
II.2.10. Caractérisation des biosurfactants produits	71

II.2.10.1. Chromatographie sur couche mince	71
II.2.10.2. Analyses spectrophotométriques	73
II.2.10.2.1. Dosage des protéines	73
II.2.10.2.2. Dosage des sucres totaux	73
II.2.10.2.3. Dosage des lipides totaux	73
II.2.10.3. Analyse par spectroscopie (IRTF)	73
II.2.11. Stabilité des biosurfactants produits	73
II.2.12. Propriétés des biosurfactants produits	74
II.2.12.1. Etude de l'aspect de l'émulsion	74
II.2.12.2. Tension superficielle	74
II.2.12.3. Concentration micellaire critique	74
II.2.13. Essais d'applications des biosurfactants produits	75
II.2.13.1. Récupération assistée de pétrole à partir d'un échantillon du sable contaminé	75
II.2.13.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts des biosurfactants	75
II.2.13.2.1. Souches tests	75
II.2.13.2.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	76
II.2.14. Data	76

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Isolement des souches fongiques	77
III.2. Criblage des isolats producteurs des biosurfactants	82
III.3. Identification des isolats	92
III.3.1. Identification des levures	92
III.3.1.1. Caractères culturels	101
III.3.1.2. Caractères morphologiques	101
III.3.1.1.3. Caractères biochimiques	101
III.3.1.1.3 Analyse phylogénétique et alignement	102
III.3.2. Identification des moisissures	105
III.4. Optimisation de la production des biosurfactants par les souches sélectionnées	115
III.4.1. Effet de la température	115
III.4.2. Effet du pH	118
III.4.3. Effet de la source d'azote	120
III.4.4. Effet de la source de carbone	122
III.5. Cinétique de croissance et de production des biosurfactants sur milieux de culture à base des sous-produits agro industriels pour les quatre souches	124
III.6. Cinétique de production des biosurfactants par les quatre souches en bioréacteur	126
III.6.1. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Cryptococcus sp</i> .YLF sur milieu de culture à base de jus de datte.	126
III.6.2. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Cryptococcus sp</i> .YLF sur milieu de culture à base de jus de datte en condition de salinité	127

(2.5 M).	
III.6.3. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Rhodotorula sp.</i> . YBR sur milieu de culture à base des margines	129
III.6.4. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Aspergillus sp.</i> .FS11 sur milieu de culture à base des margines	131
III.6.5. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Penicillium sp.</i> .FS13 sur milieu de culture à base de lactosérum	133
III.6.6. Rendement en biosurfactants	135
III.7. Caractérisation des biosurfactant bruts	136
III.7.1. Caractérisation par CCM	136
III.7.2. Caractérisation par spectroscopie IRTF	141
III.8. Etude de la stabilité des biosurfactants produits	145
III.9. Propriétés des biosurfactants	153
III.9.1. Emulsions	153
III.9.2. Réduction de la tension superficielle	155
III.9.3. Concentration micellaire critique CMC	155
III.10. Essais d'application des biosurfactants produits	157
III.10.1. Récupération assistée du pétrole à partir d'un échantillon du sable contaminé	157
III.10.2. Activité antimicrobienne des biosurfactants	159
Conclusion et perspectives	163
Références bibliographiques	167

Annexes

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNg : ADN génomique

ADNr : ADN ribosomal

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : ARN ribosomal

ATCC : American Type Culture Collection

°C : degré Celsius température

CCM : Chromatographie sur couche mince.

cm : centimètre

CMC : Concentration micellaire critique

CYA: Czapek Yeast Agar

Da : Dalton

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : DésoxyriboNucléotide TriPhosphate

DO : Densité Optique

E₂₄: Indice d'émulsification

FS : Souche fongique

GC/MS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse

h : heure

H₂O : l'eau

IR : Infrarouge

IRTF : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

ITS (1) : Internal Transcribed Spacer (1)

j: jour

kb : kilobase

L.F.B: Laiterie et Fromagerie de Boudouaou

m : mètre

ml : millilitre

min : minute

mN/m : MilliNewton par mètre

pb : Paire de Base

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne de la polymérase)

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth (Bouillon de pomme de terre et dextrose)

pH : Potential Hydrogène

pmol : picomole

q.s.p : Quantité suffisante pour

rpm : Rotation par minute

s : seconde

SDS : Sodium DodécylSulfate

TS : Tension de Surface (Tension superficielle)

UV: Lumière ultra-violette

UFC : Unité Formant Colonie

V: Volume

v.v.m: Volume d'air par volume du milieu.

YPG: (Yeast-extract-Peptone-Glucose) (Extrait de levure-Peptone-Glucose)

YPGA: (Extrait de levure-Peptone-Glucose-Agar)

µL : microlitre

Figure	Page
Figure 1. Filamentisation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium.	5
Figure 2. Représentation schématique d'une cellule de levure de bière.	8
Figure 3. Représentation schématique de la reproduction asexuée d'une levure par bourgeonnement ; a : levure (cellule mère), b : membrane, c : noyau, d : bourgeon.	9
Figure 4. Représentation schématique de la reproduction asexuée d'une levure par scission ; a : levure (cellule mère), b : noyau.	10
Figure 5. Représentation schématique de la reproduction sexuée chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	11
Figure 6. Représentation schématique des différents domaines d'utilisation des levures.	14
Figure 7. Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonné.	16
Figure 8. L'organisation structurale d'une cellule fongique.	16
Figure 9. La reproduction chez les zygomycètes.	18
Figure 10. Représentation schématique des deux parties (hydrophile et hydrophobe) composant le biosurfactant rhamnolipide produit par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	25
Figure 11. La structure biochimique des biosurfactants les plus étudiés. (a) Rhamnolipide; (b) Sophorolipide; (c) Surfactine et (d) Emulsane.	30
Figure 12. Variations de la tension superficielle et la formation des micelles en fonction de la concentration en surfactant.	35
Figure 13. Localisation géographique des régions de récolte des différents échantillons biologiques en Algérie.	45
Figure 14. Test d'émulsification E ₂₄ ; (A) gasoil plus milieu de culture stérile, (B) gasoil plus un surnageant d'une culture microbienne.	49
Figure 15. Test du drop collapse.	50
Figure 16. Test de déplacement de l'huile.	50
Figure 17. Recherche de l'activité hémolytique.	51
Figure 18. Technique du drapeau de Roth.	57
Figure 19. Protocole de préparation du milieu de culture à base de jus de datte.	58
Figure 20. Protocole de préparation du milieu de culture à base du lactosérum.	59
Figure 21. Protocole de fabrication du milieu de culture à base de CSL.	60
Figure 22. Protocole de préparation de milieu de culture à base des grignons d'olives.	61
Figure 23. Inoculation des différents milieux à base de sous-produits agricoles en vue de culture en batch sur des Erlenmeyers par les 4 souches sélectionnées.	64
Figure 24. Bioréacteur Minifors 2L (INFORS HT) utilisé pour la production des biosurfactants par les souches sélectionnées.	65
Figure 25. Schéma du principe d'une culture en batch.	66
Figure 26. Protocole d'extraction des biosurfactants produits.	70
Figure 27. Schéma de calcul d'un rapport frontal	72
Figure 28. Résultats du screening pour la production des biosurfactants obtenus après 72h de culture de l'isolat YLF: (A): Drop collapse : deux puits d'une microplaque à 92 puits vus au microscope photonique grossissement x10, résultat positif à droite, (B): le test de déplacement de l'huile résultat positif à droite, (C): E ₂₄ obtenus pour les quatre souches YLF, YBR, FS11 et FS13, témoin négatif respectivement de gauche à droite.	91
Figure 29. Gel d'agarose (1%) présentant les produits de la PCR des gènes de	103

l'ARNr 5.8S des souches YBR (piste 3), YEG (piste 4), YH (piste 5) et YLF (piste 6) . Piste 1 : Marqueur de taille 1 kb (DNA leader Marker : figure en haut à gauche), piste 2 : témoin négatif.	
Figure 30. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 5.8S, montrant la position taxonomique de l'isolat YLF avec les espèces de genre <i>Cryptococcus</i> .	104
Figure 31. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 5.8S, montrant la position taxonomique de l'isolat YBR avec les espèces de genre <i>Rhodotorula</i> .	104
Figure 32. Effet de la température sur la croissance et la production des biosurfactants ; (A) <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (B) <i>Rhodotorula sp.</i> YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) <i>Aspergillus sp.</i> FS11, (D) <i>Penicillium sp.</i> FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).	117
Figure 33. Effet de pH sur la croissance et la production des biosurfactants ; (A) <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (B) <i>Rhodotorula sp.</i> YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) <i>Aspergillus sp.</i> FS11, (D) <i>Penicillium sp.</i> FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).	119
Figure 34. Effet de la source d'azote sur la croissance et la production des biosurfactants ; (A) <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (B) <i>Rhodotorula sp.</i> YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) <i>Aspergillus sp.</i> FS11, (D) <i>Penicillium sp.</i> FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).	121
Figure 35. Effet de la source de carbone sur la croissance et la production des biosurfactants ; (A) <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (B) <i>Rhodotorula sp.</i> YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) <i>Aspergillus sp.</i> FS11, (D) <i>Penicillium sp.</i> FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).	123
Figure 36. Cinétique de croissance et de production des biosurfactants par : (A) <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (B) <i>Rhodotorula sp.</i> YBR (30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) <i>Aspergillus sp.</i> FS11, (D) <i>Penicillium sp.</i> FS 13 (25 °C et 150 rpm pendant 144h) sur milieux de culture à base des sous-produits agroindustriels.	125
Figure 37. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF sur milieu de culture à base de jus de datte (à 30°C, pH 6 et 200 rpm).	127
Figure 38. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF sur milieu de culture à base de jus de datte sous conditions salines (NaCl 2,5 M)	128
Figure 39. Cinétique de production des biosurfactants par <i>Rhodotorula sp.</i> YBR sur milieu de culture à base des margines (30°C, pH 5.5 et 200 rpm).	130
Figure 40. Cinétique de croissance et de production des biosurfactants par <i>Aspergillus sp.</i> FS11 sur milieu de culture à base des margines (28°C, pH 5 et 150 rpm).	132
Figure 41. Cinétique de croissance de <i>Penicillium sp.</i> FS13 dans le milieu à base du lactosérum (25°C, pH 6 et 150 rpm).	134
Figure 42. Résultats obtenus après révélation des spots par vaporisation de la ninhydrine pour les peptides (A), vaporisation avec le réactif de Molisch pour les glucides (B) et par exposition de la plaque aux vapeurs d'iode pour les lipides (C).	137
Figure 43. Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant semi-purifié de la souche <i>Cryptococcus sp.</i> YLF.	142
Figure 44. Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche <i>Rhodotorula sp.</i> YBR.	143
Figure 45. Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche <i>Penicillium sp.</i> FS13.	144
Figure 46. Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche	

<i>Aspergillus sp.</i> FS11.	145
Figure 47. L'effet de la température (A), du pH (B) et des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF cultivée sur un milieu de culture à base de jus de datte (à 30 °C, pH 6 et 200 rpm).	148
Figure 48. L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, cultivée sur un milieu de culture à base de jus de datte sous des conditions de salinité.	149
Figure 49. L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par <i>Rhodotorula sp.</i> YBR cultivée sur un milieu de culture à base des margines (à 30 °C, pH 5 et 200 rpm).	150
Figure 50. L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par <i>Aspergillus sp.</i> FS 11 cultivé sur un milieu de culture à base des margines (à 28 °C, pH 5 et 150 rpm).	151
Figure 51. L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par <i>Penicillium sp.</i> FS 13 cultivé sur un milieu de culture à base du lactosérum (à 25 °C, pH 6 et 150 rpm).	152
Figure 52. Les émulsions obtenues avec les extraits bruts des biosurfactants produits par les souches de gauche à droite respectivement, <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, <i>Rhodotorula sp.</i> YBR, <i>Penicillium sp.</i> FS13 et <i>Aspergillus sp.</i> FS11.	153
Figure 53. L'aspect microscopique (Gx40) des émulsions obtenues avec le gazoil: (A) surfactant synthétique SDS, (B) l'eau distillée, (C) l'extrait brut de (B) biosurfactant produit par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, (D) l'extrait brut de (C) biosurfactant produit par <i>Rhodotorula sp.</i> YBR, (E) l'extrait brut de (D) biosurfactant produit par <i>Penicillium sp.</i> FS13, (F) l'extrait brut de (E) biosurfactant produit par <i>Aspergillus sp.</i> FS11	154
Figure 54. CMC du biosurfactant produit par <i>Rhodotorula sp.</i> YBR sur milieu de culture à base des margines (30°C, pH 5.5 et 200 rpm).	156
Figure 55. Effets de l'extrait brut des biosurfactans produits par <i>Cryptococcus sp.</i> YLF, <i>Rhodotorula sp.</i> YBR, <i>Penicillium sp.</i> FS13, <i>Aspergillus sp.</i> FS11, l'eau distillée, ainsi que les surfactants synthétiques SDS et Tween 80 sur la récupération assistée du pétrole brut contenu dans un sable contaminé.	158
Figure 56. Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches YBR et YLF contre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	160
Figure 57. Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton de la souche FS 11 contre <i>Salmonella typhi</i> ATCC 43300.	160
Figure 58. Activité antifongique sur milieu Mueller-Hinton de la souche FS 13 contre <i>Candida albicans</i> ATCC 549.	161
Figure 59. Activité antifongique sur milieu Sabouraud des souches YLF, YBR, FS11 et FS13 contre <i>Aspergillus niger</i> ATCC19404.	161

Tableau	Page
Tableau 1. Classification des levures.	7
Tableau 2. Les facteurs physico-chimiques influençant la croissance des levures.	13
Tableau 3. La classification des moisissures.	19
Tableau 4. Principaux types de biosurfactants selon leurs compositions biochimiques.	31
Tableau 5. Les différents types des biosurfactants produits par espèces fongiques	33
Tableau 6. Quelques sous-produits utilisés pour la production des biosurfactants.	40
Tableau 7. Les différents domaines d'utilisation des biosurfactants.	42
Tableau 8. Les différents échantillons biologiques et leurs provenances.	46
Tableau 9. Présentation de quelques isolats fongiques obtenus à partir des différents biotopes étudiés.	78
Tableau 10. Résultats du criblage des levures productrices des biosurfactants en utilisant différentes techniques	85
Tableau 11. Résultats du criblage des moisissures productrices des biosurfactants en utilisant différentes techniques.	89
Tableau 12. Caractères macroscopiques et microscopiques de quelques levures sélectionnées. Caractères cultureux des souches de levures isolées après une culture de 3 jours sur YPGA à 25°C. (+ : présence ; - : absence).	93
Tableau 13. Caractères biochimiques et physiologiques de quelques levures sélectionnées (+ : fermentation ou assimilation du substrat, - : absence de la fermentation ou l'assimilation du substrat).	99
Tableau 14. Identification de quelques isolats levuriens selon la galerie biochimique Auxacolor.	102
Tableau 15. Affiliation phylogénétique des isolats levuriens.	104
Tableau 16. Caractères macroscopiques et microscopiques des souches fongiques isolées, cultivés à 25 C° pendant 7 jours sur milieu PDA.	106
Tableau 17. Valeurs de Rf obtenues après révélation chimique des plaques de CCM.	138
Tableau 18. L'estimation des macromolécules des extraits des biosurfactants pour les 4 souches.	141

Introduction

générale

Les surfactants, les tensioactifs ou les agents de surface sont des molécules tensioactives, amphiphiles constituées de deux parties, une partie hydrophile et une partie hydrophobe **(Marchant et Banat, 2012)**. Les surfactants sont très demandés dans plusieurs secteurs de la vie courante : Industries agroalimentaires, pharmaceutiques, pétrochimiques, cosmétiques, de lessives, des additifs pour carburants et des lubrifiants **(Schramm et al., 2003 ; Geetha et al., 2018)**. Ce large spectre d'application se traduit par un marché mondial en expansion qui était estimé à 30,64 milliards de dollars américains en 2016 ; et qui devrait générer des revenus de plus de 42 milliards de dollars en 2020, avec un taux de croissance de 5,5% par an **(Bahia et al., 2018)**.

La plupart des tensioactifs, utilisés aujourd'hui, sont des dérivés chimiques du pétrole brut. Ils présentent un risque pour l'environnement, vu leur toxicité et leur non biodégradabilité **(Kiran et al., 2010 ; Ben Ayed et Nasri, 2016 ; Hentati et al., 2016)**. De ce fait, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, la production des surfactants d'origine microbienne ou biosurfactants suscite un grand intérêt par les scientifiques.

Les biosurfactants sont des molécules structurellement diversifiées produites par une grande variété de microorganismes (bactéries, levures et moisissures). Ils sont soit sécrétés à l'extérieur de la cellule, soit liés à des parties de la cellule **(Padmavia et al., 2013 ; Araújo et al., 2019)**. Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve des glycolipides, des phospholipides, des lipopeptides, des lipides neutres et des acides gras ou des lipopolysaccharides **(Geetha et al., 2018 ; Perfumo et al., 2018)**. Les études sur les biosurfactants ont commencé dans les années 1960 et l'utilisation de ces composés a augmenté au cours des dernières décennies et leur production est considérée comme l'une des technologies clés pour le développement au 21^{ème} siècle **(Santos et al., 2016)**. Ceci est dû principalement aux nombreux avantages qu'ils présentent tels que : la diversité structurale, la biodégradabilité, la basse toxicité, la résistance aux conditions extrêmes de température, pH et salinité et leur capacité de se produire sur des substrats peu coûteux et renouvelables comparant à leurs homologues synthétiques issus de l'industrie pétrolière **(Banat et al., 2010 ; Makkar et al., 2011; Santos et al., 2016 ; Nitschke et Silva, 2018)**.

En outre de leurs nombreuses applications industrielles, les biosurfactants occupent une place de plus en plus grande au sein de la biotechnologie environnementale **(Lang, 2002 ; Kebbouche-Gana et al., 2009)**, car ils offrent une application dans la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures.

Ils augmentent la solubilité et la disponibilité biologique des substrats hydrophobes. Ils ont également un rôle dans la solidification, stabilisation et le lavage des sédiments

contaminés par les métaux lourds (**Banat et al., 1991 ; Pacwa-Plociniczak et al., 2011 ; De Oliveira et al., 2015**). Les biosurfactants ont également montré un grand potentiel dans le traitement des eaux usées (**Perez-Ameneiro et al., 2015**).

Néanmoins, en dépit de leurs propriétés remarquables, l'utilisation et la disponibilité commerciale des biosurfactants restent limitées, et ils ne sont pas en mesure de concurrencer économiquement avec leurs homologues synthétiques en raison de leurs faibles rendements et de leurs coûts de production élevés, ce qui freinent jusqu'à présent leur succès commerciale et économique (**Banat et al., 1991 ; Marchant et Banat, 2012 ; Santos et al., 2016 ; Montero-Rodríguez et al., 2018 ; Singh et al., 2018 ; Araújo et al., 2019**). De nombreuses stratégies alternatives ont été étudiées pour faire face à ce problème, comme l'augmentation du rendement de production par des souches génétiquement modifiées, l'optimisation des conditions de croissance et l'utilisation de certaines matières premières et déchets provenant des procédés agricoles et industriels comme technique à faible coût et durable (**Sobrinho et al., 2008 ; Luna et al., 2013 ; Banat et al., 2014 ; Gudina et al., 2016**). Par conséquent, un nombre croissant d'études se sont consacrées à la production des biosurfactants en utilisant des déchets à faible coût provenant des procédés agricoles et industriels comme substrats (**Joshi et al., 2008 ; Al-Bahry et al., 2013 ; Kebbouche-Gana et al., 2013 ; Maass et al., 2015 ; Luna et al., 2016**). En effet, l'utilisation des sous-produits et des déchets agricoles de faible valeur marchande pour la production des molécules à haute valeur ajoutée comme les biosurfactants constitue une stratégie très importante, qui entraîne des réductions tant du coût de production que de la pollution causée par l'élimination de ces déchets, particulièrement ceux dangereux et hasardeux pour l'environnement.

La première et principale étape, pour la production d'un métabolite microbien par un procédé fermentaire, consiste à sélectionner un micro-organisme adéquat qui soit capable de les produire, le plus rapidement possible et à des concentrations convenables. Pour atteindre ce but, il est nécessaire d'isoler et de sélectionner des microorganismes possédant la caractéristique souhaitée. De ce fait, la sélection d'un microorganisme d'intérêt constitue une des étapes importantes en biotechnologie.

A l'état actuel, les micro-organismes dominent la terre entière, à peine 1% des levures ont été étudiées (**kurtzman et al., 2011**). Par conséquent leurs potentiels biotechnologiques restent inexplorés. En effet, les levures constituent un groupe important de microorganismes suscitant un intérêt grandissant de la part des scientifiques et des différents acteurs des secteurs bioalimentaire et médical (**Buzzini et al., 2012**). Les levures, non seulement, occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire, mais aussi, elles contribuent à la valorisation des

déchets agricoles et industriels et à la production de molécules à intérêt biotechnologique (**Kurtzman et al., 2011**). Une grande variété de levures productrices des biosurfactants ont été recensées, elles appartiennent principalement aux genres suivants : *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Trichosporon* (**Monterio et al., 2009 ; Sen et al., 2017 ; Silva et al., 2018**).

En outre, les moisissures constituent un groupe très important des Eucaryotes (**Blackwell, 2011**), elles représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (**Mueller et Schmit, 2007**).

De plus, les moisissures ont un rôle économique important en tant que productrices de biomolécules utilisées en pharmacologie et en microbiologie industrielle (**Mueller et Schmit, 2007 ; Stajich et al., 2009**). Très peu de travaux ont décrit la production des biosurfactants par les moisissures, puisque la majorité des études se sont portées principalement sur l'utilisation des bactéries et des levures (**Moody et al., 2005**). Néanmoins, récemment, les moisissures ont reçu une attention considérable pour leur potentiel de biodégradation qui est attribué aux biomolécules qu'elles produisent y compris les biosurfactants (**Silva et al., 2018**).

C'est dans cette optique que s'inscrit l'objectif de notre travail, qui se focalise sur l'isolement des espèces fongiques (levures et moisissures) et de montrer leur aptitude à produire des biosurfactants tout en réalisant un screening polyphasique.

Cette étude, repose sur plusieurs points importants :

- ✓ L'isolement des espèces fongiques, à partir de différents biotopes comprenant des produits alimentaires et des échantillons provenant des sites contaminés par les hydrocarbures en Algérie
- ✓ Le criblage des souches fongiques productrices des biosurfactants.
- ✓ La valorisation des sous-produits agro-industriels en vue de choisir le meilleur milieu pour la production des biosurfactants.
- ✓ La caractérisation biochimique préliminaire des biosurfactants produits par fermentation.
- ✓ L'application des biosurfactants produits dans la récupération assistée de pétrole et comme agents antimicrobiens.

Synthèse
bibliographique

I.1. Levures

I.1.1. Généralités

Le mot levure provient du mot latin «*levare*» qui se traduit par «lever» (**Kutzman et al., 2011**). Les levures sont classiquement définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles présentant une structure cellulaire eucaryote, en effet leurs cellules possèdent toutes les caractéristiques des eucaryotes mais se différencient des cellules végétales ou animales par leur petite taille (**Bouchet et al., 2005**). Certaines peuvent former des associations cellulaires, ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (**Bouix et Leveau, 1991 ; Kurtzman et al., 2011**). Il existe plus de 1500 espèces de levures, alimentaires, commensales ou pathogènes, notamment pour le genre *Candida* (**Satyanarayana et Kunze, 2009 ; Kurtzman et al., 2011**).

Sur milieux gélosés, les levures forment habituellement des colonies à surface luisantes dont la couleur est généralement crème à brunâtre et parfois rosâtre (**Larpent, 1991**). Elles sont dépourvues de chlorophylles, se nourrissent par absorption et se reproduisent de façon sexuée et/ou asexuée (**Lachance, 2012**).

Les levures sont des microorganismes ubiquitaires fréquemment isolés de l'environnement humain ou animal, elles peuvent coloniser l'air, le sol, l'eau, le tube digestif de certains animaux, les galeries d'insectes, les produits alimentaires, les produits laitiers, les céréales et les viandes. Leurs faibles exigences en nutriments leur permettent un développement rapide (**Rocco et al., 1985 ; Lachance et al., 2006 ; Walker, 2009**). Certaines levures ont été isolées à partir d'environnements extrêmes comme celles isolées à partir de l'antarctique (**Satyanarayana et Kunze, 2009 ; Turchetti et al., 2013**) et les lacs salins (**Gunde-Cimerman et al., 2000 ; Gunde-Cimerman et al., 2005**).

I.1.2. Morphologie

La morphologie des levures est d'une grande importance taxonomique. Les cellules sont généralement ovoïdes ou sphériques, mais peuvent présenter autres formes parfois cylindriques, allongées, apiculées ou des formes plus spécifiques : ogivales (genre *Dekkera*), en forme de bouteille (genre *Malassezia*), triangulaires (*Trigonopsis*) ou en forme de citron (*Hanseniaspor*) (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les levures se regroupent en paires, en chaînes, en petits amas, ou isolées. La taille des cellules est très variable suivant les espèces : 2.5-10.5 μm de largeur contre 4.5-21 μm de longueur (Larpent, 1991 ; Bourgeois et Larpent, 1996). La masse cellulaire des levures est 100 fois plus grande que celle des bactéries et elles se divisent 4 fois moins rapidement. Leur morphologie est très variée. On distingue trois formes : la forme levure, le pseudomycélium et le mycélium (Figure 1).

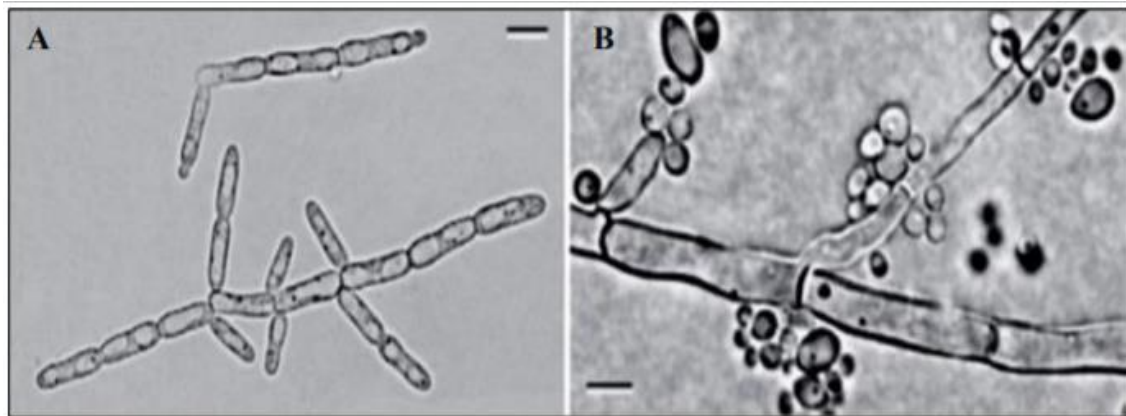


Figure 1 : Filamentation des levures. (A) : Pseudomycélium. (B) : Vrai mycélium. (Kurtzman et al., 2011).

I.1.3. Taxonomie

La classification de référence des levures est celle de **Kreger-Van (1984)** qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente classification de **Lodder (1970)**, où de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (Kreger-Van, 1984). Il y a environ 1500 espèces de levures connues, et le nombre prévu d'espèces de levures sur terre serait d'environ 150 000 (Kurtzman et al., 2011; Buzzini et Margesin, 2014). Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes.

I.1.3.1. Ascomycètes

Les ascomycotina ou « levures vraies » ou « levures ascosporegènes », elles se caractérisent par une reproduction sexuée, où les produits de la méiose ou les ascospores sont endogènes et

enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque. Cette classe regroupe de nombreuses levures de fermentation ainsi que des levures d'altération (**Suh et al., 2006**).

I.1.3.2. Basidiomycètes

Les Basidiomycotina ou « levures fausses », genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores (chez les levures sont souvent appelés ballistosporos) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote. Ce groupe comporte peu de levures capables de fermenter (**Kurtzman et Fell, 1998**).

I.1.3.3. Deutéromycètes

Levures imparfaites « fungi imperfecti » ou « levures asporogènes », genres asexués ne se multiplient que par reproduction asexuée. Ce groupe comprend des levures de fermentation et des levures pathogènes pour l'homme. Exemple : *Candida albicans* (**Satyanarayana et Kunze, 2009**).

La classification des levures est récapitulée dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Classification des levures (**Kreger-Van, 1984**)

Ascomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Deutéromycètes
Saccharomycetaceae 1.Schizosaccharomycetoida <i>Schizosaccharomyces</i> 2. Saccharomycetoidea <i>Ambrosiozyma</i> <i>Arthroascus</i> <i>Arxiozyma</i> <i>Citeromyces</i> <i>Clavispora</i> <i>Cyniclomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Guilliermonedella</i> <i>Hansenulla</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pachysolen</i> <i>Pachytichospora</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomycopsis</i> <i>Schwanniomyces</i> <i>Sporopachydermia</i> <i>Stephanoascus</i> <i>Torulaspora</i> <i>Wickerhamiella</i> <i>Wingea</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> 3. Lipomycetoideae <i>Lipomyces</i> 4. Nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomycodes</i> <i>Wickerhamia</i> 5. Spermophthoraceae <i>Coccidiascus</i> <i>Metshnikowia</i> <i>Nematospora</i>	Levures formant des Teliospores <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospordium</i> <i>Sporidiobolus</i> Filobasiaceae <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> Levure non classées <i>Sterigmatosporidium</i>	Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i> Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Eeniella</i> <i>Fellomyces</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Oosporidium</i> <i>Phaffia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Schizoblastosporion</i> <i>Sterigmatomyces</i> <i>Sympodiomyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>

I.1.4. Structure

La cellule levurienne possède une paroi épaisse de 15 à 230 nm et rigide, en plus de conférer à la cellule sa forme caractéristique et sa rigidité, la paroi assure une protection physique externe et rend la cellule complètement perméable à l'eau, aux sels minéraux et aux petites molécules. Elle contient aussi un noyau entouré d'une membrane nucléaire, le nombre de chromosomes varie selon les espèces (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes), un cytoplasme contenant divers organites et inclusions dont des mitochondries et une grande vacuole (**Figure 2**) (**Larpent, 1991 ; Bourdjoie et Larpent, 1996**). Chez certaines levures, on note l'existence d'une capsule constituée de phosphomannanes solubles dans l'eau (*Hansenula*, *Pichia*), de mannanes plus ou moins ramifiés (*Rhodotorula*) ou d'hétéropolysaccharides (*Cryptococcus*) (**Larpent, 1991**). Lorsqu'elle vieillit, la paroi se ride, s'épaissit tandis que le cytoplasme devient granuleux (**Kutzman et al., 2011**).

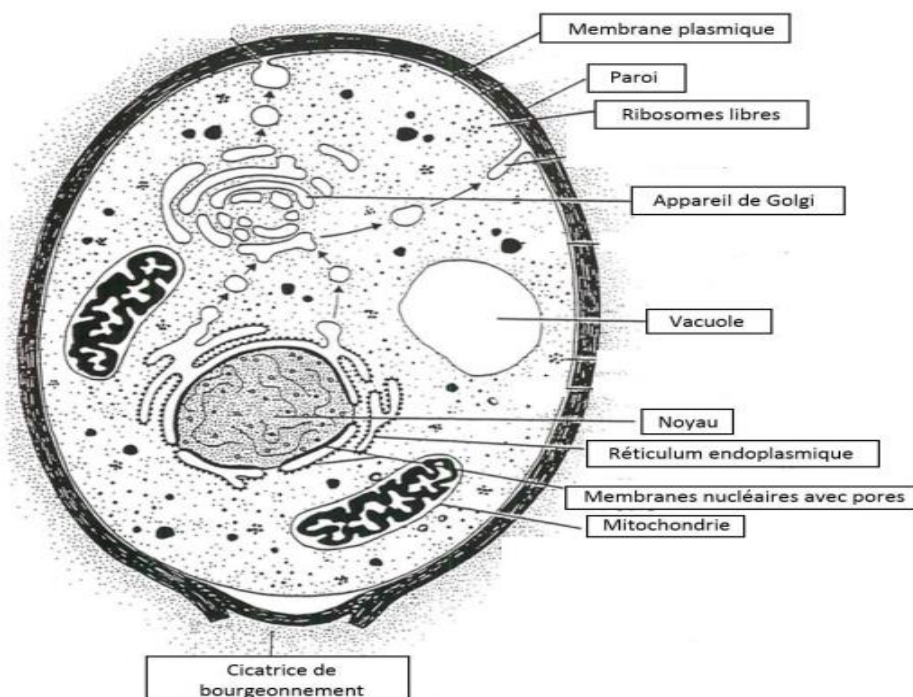


Figure 2 : Représentation schématique d'une cellule de levure de bière (**Larpent, 1997**).

I.1.5. Reproduction

Les levures se reproduisent aussi bien par un cycle asexué (végétatif) que par un cycle sexué (sporulation) en fonction des conditions favorables ou défavorables du milieu (**Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997**). On appelle levures sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée soit de façon asexuée, suivant les conditions du milieu. A l'inverse, les levures asporogènes sont celles qui se reproduisent uniquement de façon asexuée (**Larpent, 1991**).

I.1.5.1. Reproduction asexuée

Selon l'espèce de levures, cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission. Elle se fait essentiellement par bourgeonnement et rarement par scissiparité.

I.1.5.1.1. Reproduction asexuée par bourgeonnement

Lors d'un bourgeonnement, le noyau de la cellule mère se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule-mère et bourgeonner à son tour (**Figure 3**). La cellule fille est plus petite, elle grandit jusqu'à atteindre environ un diamètre égal au deux tiers de la cellule mère, puis donne à son tour de nouveaux bourgeons. Dans des conditions optimales de croissance, une seule levure peut ainsi donner très rapidement des millions de cellules (**Madigan et Martinko, 2007**).

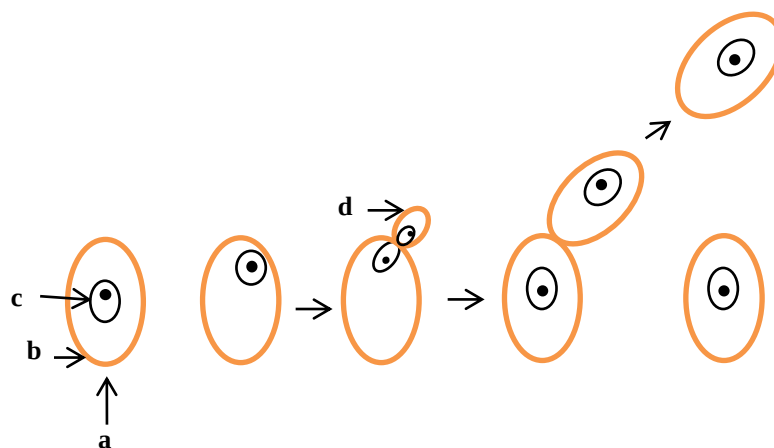


Figure 3 : Représentation schématique de la reproduction asexuée d'une levure par bourgeonnement ; **a** : levure (cellule mère), **b** : membrane, **c** : noyau, **d** : bourgeon.

I.1.5.1.2. Reproduction asexuée, par scission-scissiparité

Schizosaccharomyces est le seul genre représentatif, dans ce cas le noyau s'étire et se coupe en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules, d'où une multiplication très lente (**Figure 4**) (Barnett et *al.*, 2000).

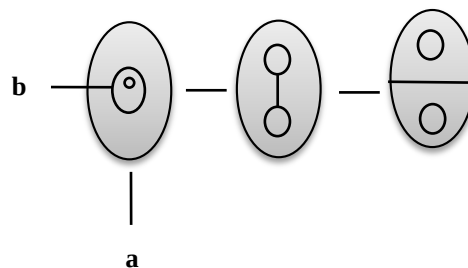


Figure 4 : Représentation schématique de la reproduction asexuée d'une levure par scission ;
a : levure (cellule mère), **b :** noyau.

I.1.5.2. La reproduction sexuée

Lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables (températures extrêmes, absence d'éléments nutritifs...), la levure cesse de se multiplier. La cellule diploïde de levure sporule et produit alors 4 ou 8 cellules haploïdes appelées ascospores par méiose. Le noyau subit deux divisions successives et chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère devient un asque. Il renferme 4 à 8 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne répondront leur vie active que lorsque les conditions de milieu seront favorables (**Figure 5**).

De tels cycles vitaux avec une reproduction sexuée permettent des changements plus rapides du point de vue de la transmission génétique contrairement à une reproduction asexuée, ce qui aboutit à des adaptations bénéfiques tout en éliminant rapidement les mutations préjudiciables (Satyanarayana et Kunze, 2009).

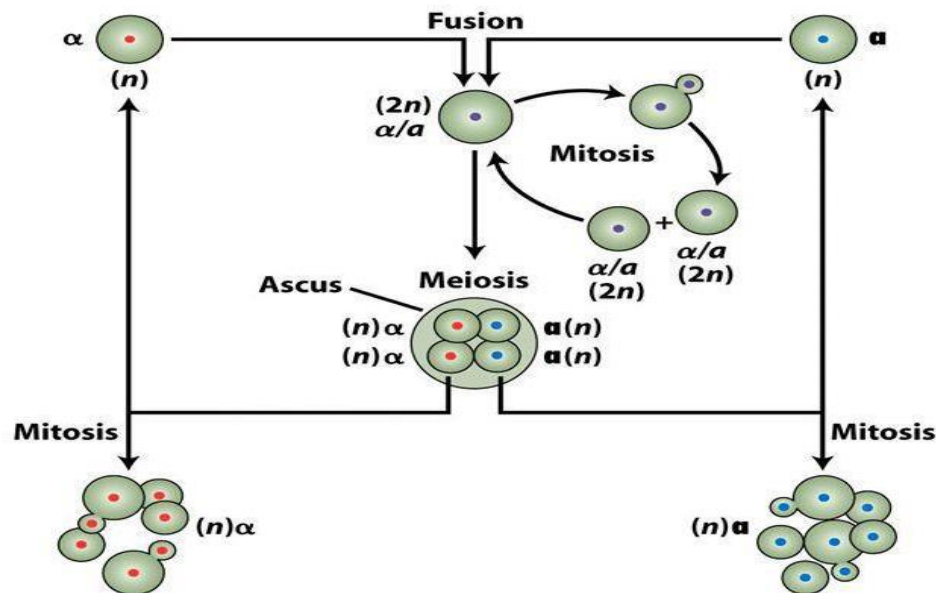


Figure 5 : Représentation schématique de la reproduction sexuée chez *Saccharomyces cerevisiae*.

I.1.6. Besoins nutritionnels

Les exigences nutritionnelles peuvent varier sur un plan quantitatif selon l'activité de la levure (la fermentation ou la multiplication végétative pour produire de la biomasse) (Walker, 2009). Les capacités de croissance et de production des levures sont généralement affectées par les conditions environnementales qui peuvent ralentir ou arrêter leurs activités (Sainz et al., 2003). Elles sont des organismes hétérotrophes, saprophytes et quelquefois parasites (Walker, 2009).

I.1.6.1. Besoins en carbone

Le carbone (C) constitue 50 % du poids sec de la levure (Leveau et Bouix, 1993 ; Barnett et al., 2000). Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène. La plupart des levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et les sucres les plus utilisés sont des sucres simples hexoses (glucose, galactose), mais aussi des pentoses, des disaccharides (saccharose, maltose, lactose), des trisaccharides (raffinose), et des polysaccharides, l'amidon, les dextrines, et aussi les alcools et les hydrocarbures (Bourgeois et Larpent, 1996). De nombreuses levures sont capables de fermenter le glucose, le fructose et le mannose, mais certaines ne fermentent aucun sucre : les espèces des genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, ainsi que quelques *Candida*. Les levures qui se développent sur les alcanes sont

essentiellement du genre *Candida* (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Kurtzman et al., 2011).

I.1.6.2. Besoins en azote

L'azote (N₂) compose 65 % de la matière sèche et donc sa présence, sous forme organique ou non, est indispensable lors de la multiplication (Barnett et al., 2000). La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Guiraud, 1998). L'azote peut être apporté sous deux formes :

- Minérale : toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puisqu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés). Certaines levures dégradent les nitrites et les nitrates (Lodder, 1970).
- Organique : les acides aminés des protéines et l'urée. La croissance est plus rapide en présence d'acides aminés, de préférence en mélange, ou des sels d'ammonium plutôt que des peptides (Lodder, 1970).

I.1.6.3. Besoins en lipides

Ils peuvent être indispensables pour la croissance : ainsi, de nombreuses espèces sont oléagineuses et lipolytiques. Les levures oléagineuses sont capables de synthétiser et d'accumuler des lipides jusqu'à la hauteur de 80% de la masse sèche de la cellule. *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* et *Lipomyces* sont des genres auxquels appartiennent des espèces typiquement oléagineuses (Ageitos et al., 2011).

I.1.6.4. Besoin en sels minéraux, oligo-éléments et vitamines

Comme la plupart des microorganismes, les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux (potassium, sodium, magnésium, calcium, phosphore) et d'oligoéléments (fer, cuivre, zinc, sélénium) nécessaires à de très faibles concentrations. En addition, d'autres facteurs sont essentiels, comme les vitamines de groupe B (biotine, acide pantothénique, inositol, thiamine, pyridoxine, niacine). Ces facteurs interviennent lors des réactions enzymatiques, comme éléments constitutifs de coenzymes variés (Botton et al., 1990 ; Lourens et Reid, 2002).

I.1.6.5. Facteurs physicochimiques

Certains paramètres physico-chimiques influencent la croissance des micro-organismes. Parmi ceux-ci figurent le pH, la température, la présence d'O₂, la disponibilité ou l'activité de l'eau (aw : *Activity of Water*).

Les facteurs physico-chimiques influençant la croissance des levures sont récapitulés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Les facteurs physico-chimiques influençant la croissance des levures (Leveau et Bouix, 1993 ; Delarras, 2007).

Température	-La température optimale de croissance est comprise entre 25 °C et 30°C. -La température maximale de croissance est comprise entre 30 à 47°C - Certaines levures peuvent se développer à 0°C -Les levures sont classées en : ➤ Levures psychrophiles : T_{max} est de 20 °C et T_{min} est environ 5°C. ➤ Levures mésophiles : peuvent se développer de 0 à 48 °C ➤ Levures thermophiles : T_{max} 48-50 °C, T_{min} est 20 °C.
pH	L'optimum de pH est situé entre 4,5 et 6,5.
Oxygène	Levure aérobie stricte : <i>Rhodospiridium</i>, <i>Lipomyces</i>, <i>Saccharomycopsis</i> et levure aéro-anaérobie facultative. -Métabolisme fermentaire : même en présence d'oxygène Exemple : <i>Schizosaccharomyces</i> -Métabolisme respiratoire en présence d'oxygène. Exemple : <i>Candida</i>
Activité de l'eau et pression osmotique	La plupart des levures nécessitent entre 90 et 95% d'humidité relative, mais certaines peuvent se développer à moins de 65% : ce sont des levures « osmophiles », rencontrées dans les moûts de raisin concentrés de 630 à 800 g de sucre/L : elles s'y développent en surface dans la zone humide. Exemple de levures xérotolérantes : <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>, <i>Schizosaccharomyces pombe</i>

I.1.7. Intérêt en biotechnologie

Grace à leur métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire.

Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) et dans la production des enzymes (invertase, lactase, lipase et les amylases), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (**Walker, 2009**). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (exemple : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (**Mercier, 1997**).

Les utilisations des levures sont récapitulées dans la **Figure 6**.

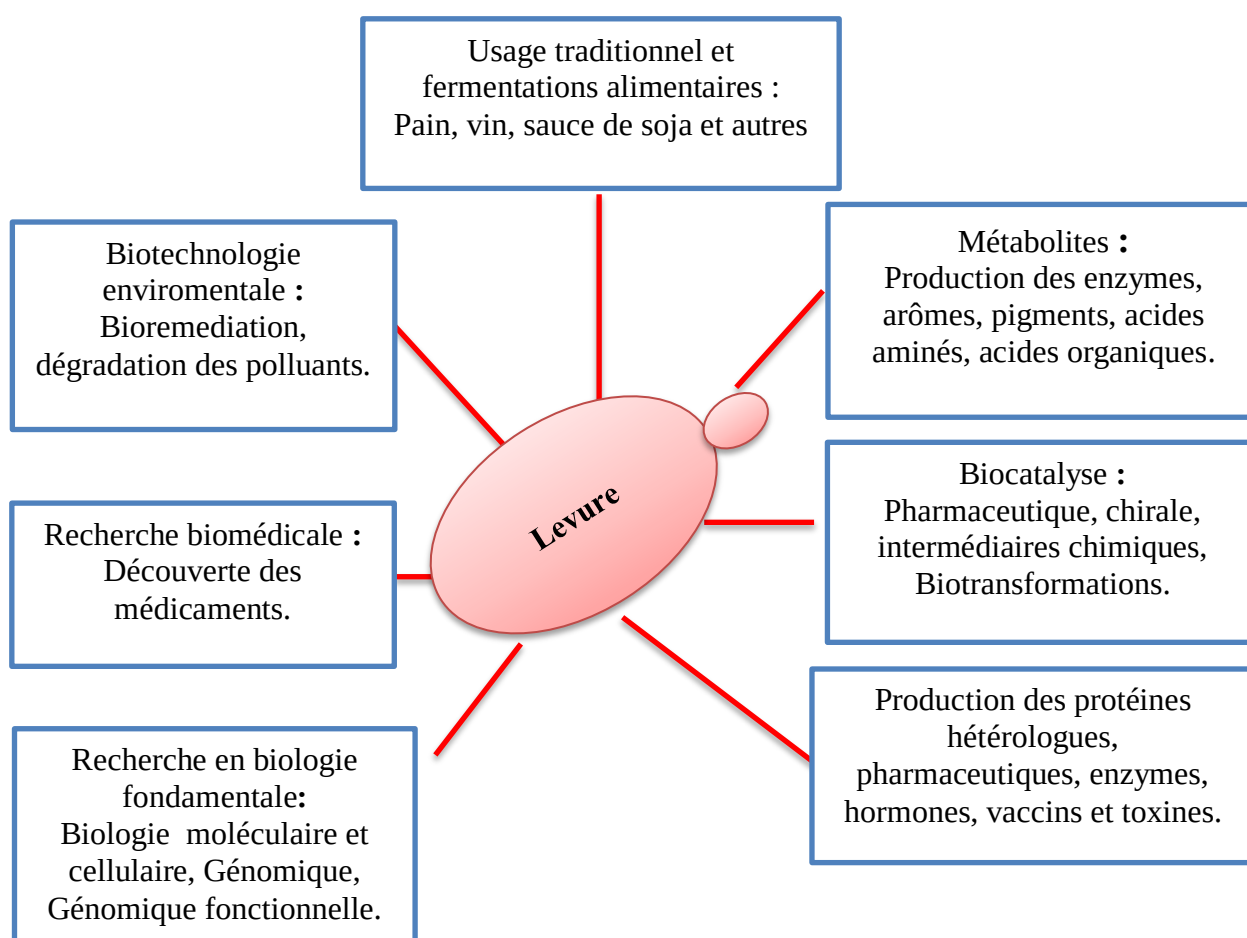


Figure 6 : Représentation schématisée des différents domaines d'utilisation des levures (**Barnett et al., 2000 ; Satyanarayana et Kunze, 2009**).

I.2. Moisissures

I.2.1. Généralités

Le règne des champignons (Fungi ou mycètes) représente l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre (**Mueller et Schmit, 2007**). Il renferme 65000 à 100000 espèces parmi elles, les moisissures (**Simpson et Roger, 2004**).

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes filamenteux aérobies strictes et rarement anaérobies, formant une structure mycélienne et des thalles constitués par de nombreux filaments ramifiés, unis ou multicellulaires, immobiles, non chlorophylliens et sporogènes (**Bocquet, 1993 ; Chabasse et al., 2002**).

Les moisissures sont ubiquistes, en effet certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres encore sont des saprophytes qui se développent sur des déchets organiques ou comme contaminants des denrées alimentaires (**Nicklin et al., 2000**).

Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques, lipolytiques), qui en font des agents de dégradation des matières organiques, mais aussi, elles sont à la base de nombreux procédés biotechnologiques allant de la production d'aliments fermentés tels que les fromages à celle des molécules à haute valeur ajoutée comme les vitamines, les antibiotiques et les enzymes industrielles (**Nicklin et al., 2000**). Elles peuvent aussi présenter un caractère pathogène pour l'homme, les animaux et les plantes (**Alexopoulos et Mims, 1979**).

I.2.2. Structure

Les champignons filamenteux sont caractérisés par une structure mycélienne. Leur appareil végétatif (thalle) est constitué par des filaments ramifiés, des hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 μm de diamètre, en fonction de l'espèce et des conditions de croissance. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium. Chez quelques classes des mycètes, comme par exemple *Mucor*, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ils ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples; ils sont appelés cénocytes ou « siphonnés » alors que chez d'autres champignons, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » la plupart des hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés (**Botton et al., 1990 ; Gonçalves et al., 2006**) (**Figure 7**).

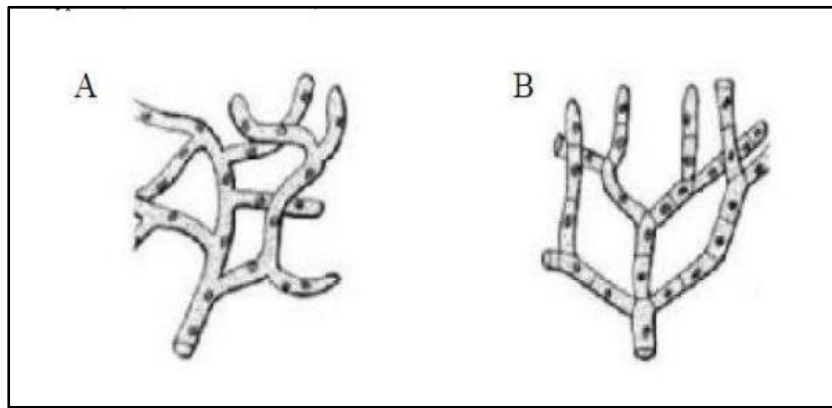


Figure 7 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : **(A)**, hyphe coenocytique ; **(B)**, hyphe cloisonnée (**Botton et al., 1990 ; Chabasse et al., 2002**).

Les hyphes, segmentés ou non, s'entourent d'une paroi rigide responsable de la forme, elle est riche en cellulose ou en chitine selon les groupes (cellulose chez les *Myxomycètes*, *Saprolegniales* et *Peronosporales*, chitine chez les *Mucorales*, Ascomycètes et Basidiomycètes). Elle contient également, en proportions variables, des substances mucilagineuses, des polysaccharides, des substances pectiques, des protéines, des pigments et de l'hémicellulose. Le cytoplasme, limité par une membrane cytoplasmique, contient des ribosomes, des mitochondries, un ergastoplasme, des vacuoles qui forment un réseau dans le mycélium jeune et une grande zone centrale dans le mycélium âgé et un ou plusieurs noyaux (**Figure 8**) (**Bocquet, 1993 ; Tortora et al., 2003**).

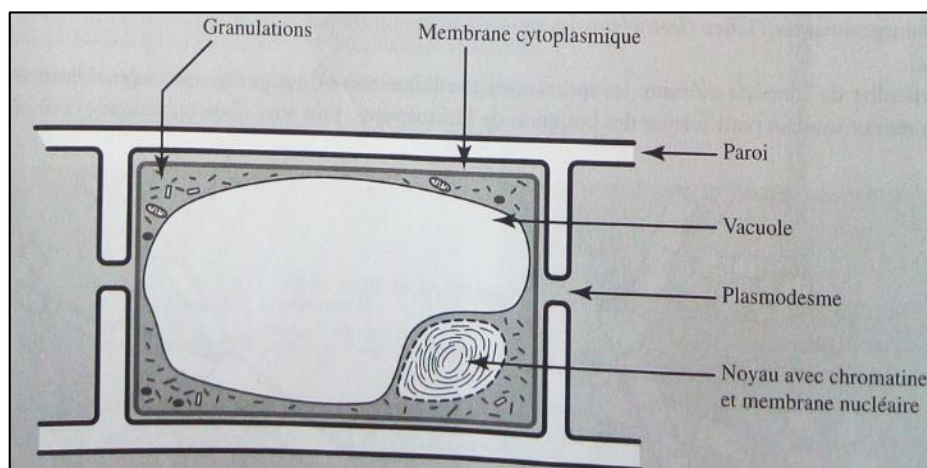


Figure 8 : L'organisation structurale d'une cellule fongique (**Leyral et Vierling, 2007**).

I.2.3. Reproduction

Les moisissures se reproduisent par germination des spores. Les spores mûres sont libérées des appareils sporifères et disséminées dans la nature, essentiellement par le vent. Une spore germe et émet un filament (hyphe) qui croît, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pour donner un nouveau mycélium. Il existe deux types de reproduction : reproduction végétative asexuée et reproduction sexuée (**Guiraud, 2003**).

I.2.3.1. Reproduction asexuée

La reproduction est assurée par la production des spores qui se différencient à partir des cellules fongiques. Trois types principaux de structures peuvent être rencontrés (**Guiraud, 1998 ; Leyral et Vierling, 2007**).

- i. **Thallospores (synonyme : arthrospores)** : les spores sont produites par transformation d'éléments préexistants des cellules du thalle.
- ii. **Conidiophores** : sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces cellules fongiques se multiplient et se différencient pour former une cellule particulière (les conidiophores), sur lequel se forment les spores : les conidies.
- iii. **Sporangiospores** : sont des cellules fongiques flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle, elles se multiplient et se différencient pour donner des sporanges dans lesquels se forment des sporangiospores.

I.2.3.2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée est souvent reliée à des conditions défavorables que vivent les moisissures. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) (**Botton et al., 1990**).

Elle est basée sur la succession de trois événements : La plasmogamie, c'est-à-dire la mise en commun des cytoplasmes de cellules somatiques ou gamétiques haploïdes, la caryogamie, c'est-à-dire la fusion de deux noyaux haploïdes pour former un zygote diploïde et la méiose qui, grâce à l'incidence des phénomènes de crossing-over susceptibles de se produire (**Leveau et Bouix, 1993**).

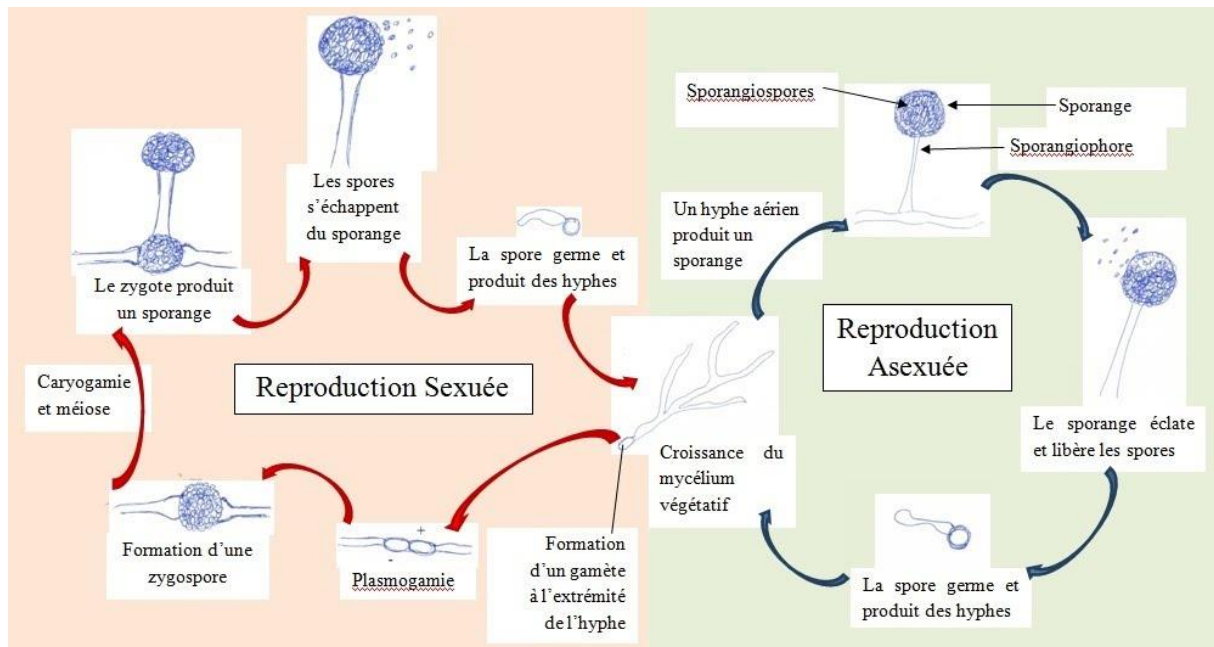


Figure 9 : La reproduction chez les zygomycètes.

I.2.4. Taxonomie

La classification des moisissures est fondée sur des critères purement morphologiques (**Meyer et al., 2004**). L'ensemble des champignons sont répartis en quatre subdivisions principales : Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et *Fungi imperfecti* (champignons imparfaits) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Classification des moisissures (Meyer et al., 2004).

Subdivision	Classe	Ordre	Genre
Zygomycotina (Zygomycètes)	Zygomycètes	Mucorales	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>
Ascomycotina (Ascomycètes)	Plectomycètes	Eurtiales	<i>Emericella (A.nidulans)</i>
	Pyénomycètes	Spahaeriales	<i>Neurospora(N.grassa)</i>
		Endomycétales (levures)	<i>Eremothecium</i>
Basidimycotina (Basidiomycotina)	Hémiascomycètes	Urénidales	<i>Puccinia</i>
	Hémibasidiomycètes	Ustilaginales	<i>Ustilago</i>
Deuteromycotina (Deutéromycètes)	Hyphomycètes (forme filamenteuse).	Monidiales	<i>Geotrichum</i> <i>Aspergillus</i> (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>) <i>Penicillium</i> <i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium</i> <i>camembertii</i> , <i>Penicillium roquefortii</i> .

I.2.5. Besoins nutritionnels

Les facteurs environnementaux tels que la température, l'aération, le pH, ainsi que les éléments nutritifs influencent la croissance des microorganismes et jouent un rôle déterminant sur la biodiversité microbienne dans un habitat particulier (**Brock et al., 1994b; Dix et Webster, 1995a**). Bien que les champignons filamenteux soient relativement peu exigeants, ils ont besoin de ces facteurs pour assurer leur croissance.

I.2.5.1. Température

Chaque microorganisme se caractérise par sa croissance dans une gamme de température bien définie. En effet, la température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (**Botton et al., 1990**). La majorité des moisissures sont des microorganismes mésophiles et se développent à une température comprise entre 5°C et 35°C, avec un optimum situé entre 25 et 30°C. Au-dessus de 40°C, la plupart des moisissures arrêtent leur croissance (**Deverall, 1965, Botton et al., 1990**). Exceptionnellement quelques espèces dites thermophiles ou thermotolérantes peuvent se développer à des températures supérieures à 50°C. Egaleme nt, quelques autres espèces dites psychrophiles ou psychrotolérantes peuvent se développer à basses températures (comprises entre -5 et 10°C) (**Botton et al., 1990 ; Nicklin et al., 2000**).

I.2.5.2. Aération

Les champignons sont des organismes aérobies sauf quelques exceptions. En effet, certaines espèces tolèrent des quantités relativement faibles d'oxygène et peuvent même se développer en absence totale de l'oxygène (anaérobies strictes) (**Alexopoulos et Mims , 1979**).

I.2.5.3. pH

La plupart des moisissures sont acidophiles, elles ont une préférence pour les milieux à pH acides. Généralement, elles se développent entre pH 4,5 et pH 8 avec un optimum entre pH 5 et pH 6 (**Botton et al., 1990**).

I.2.5.4. Activité de l'eau (aw)

Le développement des moisissures requiert une aw inférieure à celle des autres microorganismes. La majorité des moisissures se développent à une aw située entre 0,85 et 0,99 (**Leyral et Vierling, 2007**). Certaines moisissures sont xérophiles, elles ont la capacité de se développer à une aw inférieure à 0,85 comme *Penicillium martensii*, 0.8 comme *Aspergillus nidulans* et 0.75 pour *Aspergillus candidus* (**Carlile et Watkinson, 1996**).

Les moisissures se développant à fort taux d'humidité sont qualifiées d'hygrophiles, c'est le cas des genres *Cladosporium*, *Fusarium* et *Mucor*. L'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (**Carlile et Watkinson, 1996**).

I.2.5.5. Nutriments

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Grâce à une panoplie enzymatique extrêmement riche, les moisissures utilisent plus efficacement les substrats les plus complexes disponibles dans la nature (**Roquebert, 1984**).

I.2.5.5.1. Source de carbone et d'énergie

Le carbone est indispensable à la synthèse des éléments constitutifs et fonctionnels de la cellule. Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (**Nicklin et al., 2000 ; Punt et al., 2002**). D'après **Punt et al. (2002)**, seules deux moisissures, *Leptomitopsis lacteus* et *Araiospora spp*, seraient incapables d'utiliser le glucose.

I.2.5.5.2. Source d'azote

L'azote est nécessaire pour la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés ou encore la glucosamine et la chitine. Les moisissures sont incapables de fixer l'azote atmosphérique. Elles peuvent assimiler l'azote des nitrates, de l'ammoniaque, des acides aminés, de l'urée, des amines et amides et des polypeptides (**Punt et al., 2002**).

I.2.5.5.3. Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction pour plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de Phosphore, de soufre, de fer, de magnésium, de calcium et de potassium, ainsi que les éléments traces comme le manganèse, cuivre, molybdène, nickel et le zinc nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments et des acides organiques (Boiron, 1996 ; Uchicoba et al., 2001).

I.2.6. Intérêt en biotechnologie

Les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques et pharmaceutiques. Leur intérêt économique repose sur leurs activités biologiques dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par les industries pharmaceutiques et médicales (Scriban, 2003). Cependant le nombre de moisissures exploitées industriellement par rapport aux bactéries reste minime (Madigan et Martinko, 2007).

I.2.6.1. Intérêt alimentaire

Les moisissures sont des grandes productrices d'acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide malique, l'acide acétique et l'acide citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. A titre d'exemple, *Aspergillus niger* produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons (Madigan et Martinko, 2007). Cette moisissure secrète aussi des protéases, des lipases et des estérases utilisées dans différentes applications alimentaires (Scriban, 2003).

La production de biomasse est une source importante pour l'alimentation animale et même humaine, en servant de complémentation des produits céréaliers. Quelques espèces fongiques ont un grand usage, c'est le cas d'*Aspergillus niger*, de *Fusarium graminearum* et de *Trichoderma harzianum* (Botton et al., 1990 ; Delgado-Jarana et al., 2002).

I.2.6.2. Intérêt chimique

Une variété de moisissures est utilisée pour la production industrielle d'acides organiques et, en premier lieu, l'acide citrique par *Aspergillus niger*, qui est utilisé à 60% dans l'industrie alimentaire, l'acide itaconique par *Aspergillus terreus*, qui est utilisé comme copolymère dans les résines acryliques, pour la confection des encres d'imprimerie (Scriban, 2003).

La production de l'acide gluconique par *Aspergillus niger* qui rentre, sous forme de sel de calcium, dans nombreuses préparations alimentaires et pharmaceutiques (Miller, 2002).

D'autres exemples concrets, tel que l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002), et la production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum*, qui présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et par le genre *Penicillium*, est utilisée pour l'industrialisation des papiers et des textiles (Delgado-Jarana et al., 2002).

I.2.6.3. Intérêt pharmaceutique et médical

La diversité d'action des moisissures est remarquable dans le domaine de santé. En effet, les moisissures se manifestent dans la fabrication d'antibiotiques, de vitamines, d'hormones et de nombreuses substances pharmacologiquement actives (Leveau et Bouix, 1993).

➤ Antibiotiques

Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Botton et al., 1990).

➤ Vitamines

Deux moisissures *Eremothecium ashbyi* et *Ashbya gossypii* ont été utilisées successivement pour la production industrielle de la riboflavine. Les deux souches sont cultivées sur milieu agité et supplémenté de lipides (Botton et al., 1990).

30 % du marché mondial de cette vitamine, estimé à 2 000 tonne/ an, sont préparés par cette voie (Florent, 1993 ; Stahmann, 2002).

➤ Hormones

L'impact commercial des moisissures est très important dans le domaine des hormones stéroïdiennes. Elles interviennent comme agents de conversion des stéroïdes, sous forme de cultures ou de suspensions sporales (Leveau et Bouix, 1993).

I.3. Biosurfactants

I.3.1. Généralités

Les biosurfactants regroupent une classe de molécules tensioactives, structuralement variées, synthétisées par des microorganismes tels que les bactéries, les levures et les moisissures (Shoeb et al., 2013), ils peuvent être excrétés dans les milieux de culture (extracellulaires) ou incorporés principalement dans la paroi cellulaire (intracellulaire), facilitant ainsi la diffusion d'un substrat hydrophobe dans la cellule, le poids moléculaire des biosurfactants est généralement compris entre 500 et 1500 Da (Makkar et Cameotra, 2004 ; Santos et al., 2016). Ce sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire "dénommée tête" et d'une partie hydrophobe non polaire "dénommée queue" (Figure 10). Généralement le groupement hydrophile est constitué de mono- di- ou polysaccharides, d'acides carboxyliques, d'acides aminés ou de peptides, alors que le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés, des acides gras hydroxylés ou des alcools gras (Desai et Banat, 1997 ; Elazzazy et al., 2015 ; Bahia et al., 2018), ce qui confère aux biosurfactants la capacité de réduire les tensions interfaciales entre deux phases de polarités différentes comme l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou encore l'eau et un solide, permettant ainsi à ces deux phases de se mélanger et d'interagir plus facilement (Banat et al., 2010 ; Pacwa-Plokiniczak et al., 2011 ; Santos et al., 2016). De plus, ils se caractérisent par leur aptitude à former des agrégats et des micelles. Les micelles se définissent comme étant un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant une extrémité hydrophile et un intérieur hydrophobe (Figure 10) (Pacwa-Plokiniczak et al., 2011).

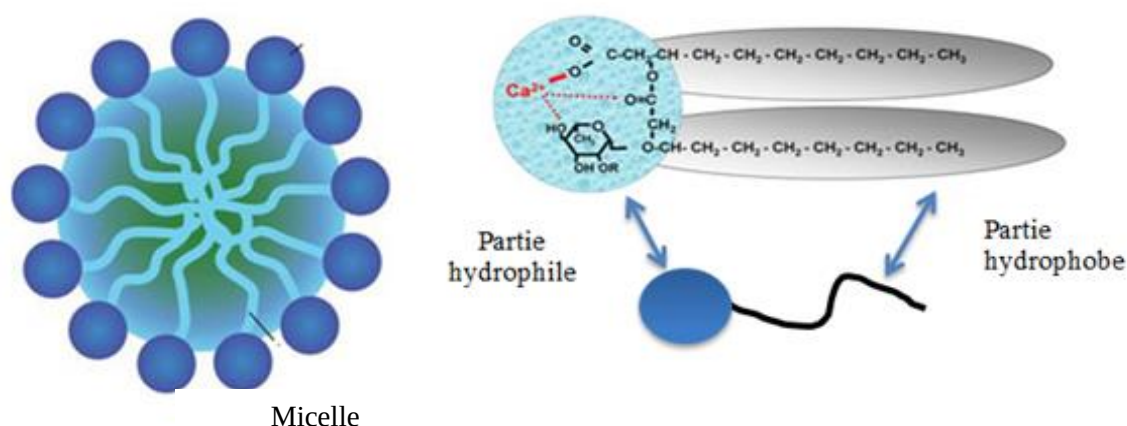


Figure 10 : Représentation schématique des deux parties (hydrophile et hydrophobe) composant le biosurfactant rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Maier, 2003 modifié).

Les surfactants sont classés en quatre types selon la nature et la charge de leur portion hydrophile: les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels libérant une charge négative (anion) en solution aqueuse et possèdent une tendance hydrophile plus marquée; les cationiques qui possèdent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse ; les non ioniques , sans charge où l'hydrophilie est apportée par des groupements fonctionnels non chargés de nature alcool, éther, ester ou amide et contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique, ils se comportent comme un surfactant anionique ou cationique suivant le pH du milieu où ils se trouvent (Marchant et Banat, 2012 ; Shafiei et al., 2014). La plupart des biosurfactants produits sont neutres ou chargés négativement c.-à-d. de type non ionique ou anionique (Makkar et Cameotra, 2004). Cependant, Il existe peu de structures cationiques (Mulligan, 2009). La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbone ou son degré de ramification (Santos et al., 2016).

I.3.2. Classification

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules structurellement variées. Contrairement aux surfactants chimiques, qui sont classés en fonction de la nature de leur groupement polaire, les biosurfactants sont classés principalement par leur composition chimique et leur masse moléculaire (Dessai et Banat, 1997).

I.3.2.1. Selon la structure

Selon leur nature biochimique, on distingue cinq grandes classes des biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides ou lipoprotéines, les phospholipides, les lipides neutres, les biosurfactants polymériques et les biosurfactants particuliers (**Dessai et Banat, 1997 ; Mulligan, 2009**).

I.3.2.1.1. Glycolipides

Les glycolipides sont les biosurfactants les plus connus, ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxy aliphatiques (**Santos et al., 2016**). Parmi ces derniers, on distingue : les rhamnolipides (ou rhamnolipides), les glucose-lipides, les tréhalose-lipides, les pentasaccharide-lipides et mélanges variés. Les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés (**Chrzanowski et al., 2012**).

A. Rhamnolipides

Sont des lipides extracellulaires produits par les bactéries du genre *Pseudomonas* (**Abouseoud et al., 2008**), qui contiennent une ou deux unités de rhamnose liées à une ou deux molécules d'acide β -hydroxydécanoïque. **Edwards et Hayashi (1965)**, ont identifié les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa*, il s'agit de type (R-1) qui contient deux unités de rhamnose et deux unités de l'acide β -hydroxydécanoïque et de type (R-2) qui contient une seule unité de rhamnose.

Des analyses ont permis d'identifier les deux principaux rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* KY 4025 et *Pseudomonas aeruginosa* UG2 comme étant : α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydécanoyl- β -hydroxydécanoate et α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydécanoyl- β -hydroxydécanoate (**Abdel-Mawgoud et al., 2010**).

Les analyses chromatographiques des acides gras des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614 ont montré que la position des acides gras dans la portion lipidique est variable selon les substrats utilisés pour la production (**Monteiro et al., 2009**).

B. Sophorolipides ou sophorosides

Sont des glycolipides produits par des levures appartenant au genre *Candida* tel que *Candida bombicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*, *Candida riidocensis*, *Candida rugosa*, *Candida kuoi*, *Candida stellata*, *Candida apicola*, et aussi à d'autres genres *Rhodotorula bogoriensis*, *Cyberlindnera samutprakarnensis* et *Wickerhamiella domercqiae* (**Bhardwaj et**

al., 2013; Cortés-Sánchez *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014). Ils sont constitués de deux unités de sophorose liées à un acide gras hydroxyle à longue chaîne par une liaison glycosidique (Santos *et al.*, 2016).

C. Tréhalolipides

Sont des glycolipides composés d'un disaccharide le tréhalose qui est lié en C6 et C6' à l'acide mycolique. Les tréhaloses sont produits par certains genres microbiens tels que : *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus* après leur culture en présence des hydrocarbures (Vijayakumar et Saravanan, 2015).

I.3.2.1.2. Lipopeptides

Ils sont constitués d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. Parmi les biosurfactants microbiens de nature lipopeptidique, on distingue : la surfactine, l'iturine, la fengycine et la lichenysine (Vandana et Singh, 2018).

A. Surfactine

Nommée ainsi en raison de son activité tensioactive exceptionnelle. Elle est capable d'abaisser la tension superficielle de 72 à 27,9 mN/m avec une concentration micellaire critique de 0,017 g /L. C'est un lipopeptide cyclique formé d'un peptide de 7 acides aminés L-Glu1-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7 formant un cycle lactonique lié à un acide gras β -hydroxylé linéaire ou ramifié contenant de 13 à 15 atomes de carbone (Yakimov *et al.*, 1998). Des études récentes indiquent que la surfactine forme un agent antiviral puissant, antitumoral avec des activités anticoagulantes. Les variantes peptidiques de surfactine appelées aussi lichenysine ou halobacilline et pumilacidine, sont produites respectivement par les espèces *Bacillus licheniformis* et *Bacillus pumilus* (Cochrane et Vederas, 2016 ; Vandana et Singh, 2018 ; Bouassida *et al.*, 2018).

B. Lichenysine

Produite par *Bacillus licheniformis*, elle présente une structure et des propriétés physicochimiques similaires à celle de la surfactine. La lichenysine A produite par *Bacillus licheniformis* BAS50, contient une longue chaîne d'acide gras bêta-hydroxylé. La lichenysine est stable dans une large gamme de pH, température et concentration de NaCl (Cochrane et Vederas, 2016).

C. Iturine

L'iturine A est le premier composé découvert du groupe iturine, isolé d'une souche de *Bacillus subtilis* prélevée à partir d'un échantillon de sol de l'Ituri (une province de la république démocratique du Congo). Ce sont des lipoheptapeptides cycliques qui contiennent un acide gras β -aminé. Les lipopeptides appartenant à la famille des iturines sont des agents antifongiques puissants qui peuvent également être utilisés comme biopesticides pour la protection des plantes (Vandana et Singh, 2018).

D. Fengycine

C'est un lipodécapeptide contenant un acide gras β -hydroxylé en C(15) à C(17) qui présente une dimorphie Ala-Val caractéristique en position 6 de peptide. La fengycine est moins hémolytique que les iturines et les surfactines mais elle conserve une forte activité antifongique contre les champignons filamenteux (Cochrane et Vederas, 2016).

I.3.2.1.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

De nombreuses bactéries et levures synthétisent des grandes quantités d'acides gras et des phospholipides pendant leur croissance sur les alcanes (Cirigliano et Carman, 1984). L'hydrophilie de ces composés est proportionnelle à la longueur de la chaîne d'hydrocarbure. Les acides gras saturés les plus actifs sont dans la gamme C-12 à C-14. En plus de la chaîne linéaire d'acides gras, les microorganismes produisent des acides gras complexes tels que les acides corynomycoliques contenant des groupes hydroxyles et des branches d'alkyles. A titre d'exemple, le biosurfactant produit par *Corynebacterium leprus* est formé par des acides gras corynomycoliques (Banat et al., 2000).

Les phospholipides sont constitués de groupements alcool et phosphate et une chaîne lipidique, ce sont les constituants essentiels des membranes microbiennes, en milieu aqueux, de telles molécules amphiphiles tendent à s'organiser de telle sorte que seule leur tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau, ce qui aboutit typiquement à des structures en micelle ou en bicouche lipidique.

Ils sont classés en deux groupes : Les glycérophospholipides et les glycopospholipides (Healy et al., 1996).

La phosphatidyl éthanolamine synthétisée par la bactérie *Rhodococcus erythropolis* cultivée sur des hydrocarbures diminue la tension interfaciale entre l'hexadécane et l'eau à moins de 1 mN/m avec une concentration micellaire critique (CMC) de 30 mg/L (Mulligan, 2009).

I.3.2.1.4. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polymériques sont généralement des polymères d'hétéro-saccharides contenant des protéines. Ce sont des biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée. L'émulsane, le lipomanane, l'alasane, le liposane sont les biosurfactants polymériques les plus connus et les mieux étudiés (**Santos et al., 2016**). L'émulsane présente une bonne activité émulsifiante même à des concentrations aussi faibles (de 0,001% à 0,01%) (**Lang, 2002**). Le liposane est un émulsifiant extracellulaire hydrosoluble synthétisé par *Candida lipolytica*, il est constitué de 83% de glucides et de 17% de protéines (**Cirigliano et Carman, 1984**). Ce groupe de biosurfactants est utilisé en tant qu'émulsifiant dans les industries alimentaires et cosmétiques (**Santos et al., 2016**).

I.3.2.1.5. Biosurfactants particuliers

On distingue deux types de biosurfactants particuliers :

- (i) Des vésicules membranaires extracellulaires : certains microorganismes secrètent des métabolites extracellulaires vésiculaires, appelés des biosurfactants particuliers, qui contribuent dans l'adsorption des n-alcanes par les cellules microbiennes (**Mnif et Ghribi, 2015**). A titre d'exemple, les vésicules d'*Acinetobacter sp.* HO1-N ayant un diamètre de 20-50 nm, se compose de protéines, phospholipides et lipopolysaccharides, qui sont impliqués dans l'adhérence des cellules aux hydrocarbures. Ces molécules sont souvent connues comme des agents bioémulsifiants (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**).
- (ii) Des cellules bactériennes entières peuvent jouer parfois le rôle d'un surfactant.

Les principaux types des biosurfactants selon la composition biochimique et les microorganismes producteurs sont récapitulés dans le **Tableau 4**, ainsi que les structures des biosurfactants les plus étudiés (**Figure 11**).

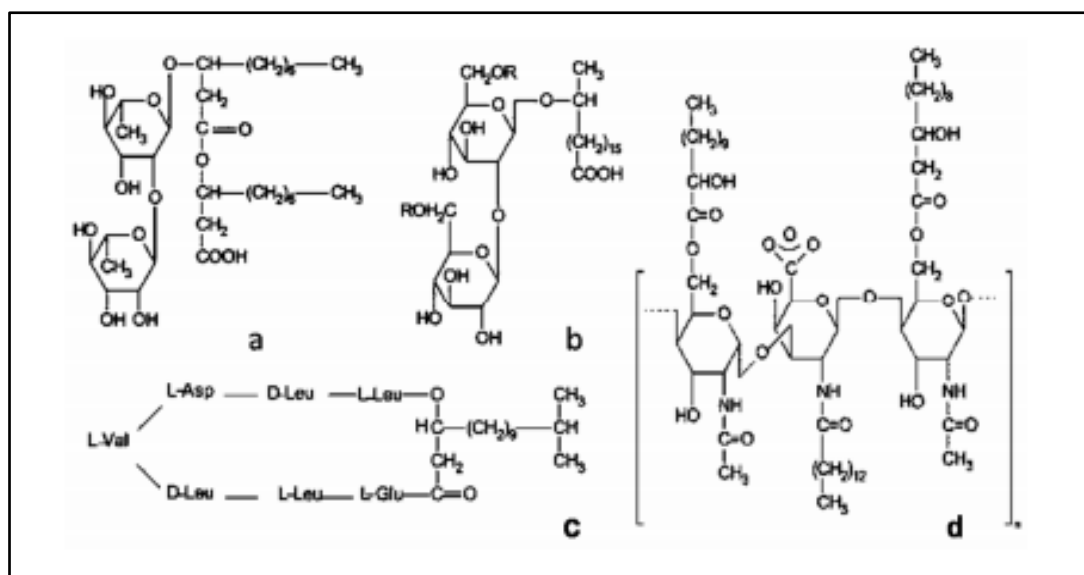


Figure 11 : La structure biochimique des biosurfactants les plus étudiés. (a) Rhamnolipide; (b) Sophorolipide; (c) Surfactine et (d) Emulsane (**Santos et al., 2016**).

Tableau 4 : Principaux types des biosurfactants selon leur composition biochimique (Desai et Banat, 1997).

Biosurfactants	Microorganismes producteurs	Biosurfactants	Microorganismes producteurs
Glycolipides -Rhamnolipides -Tréhalolipides -Sophorolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida apicola</i> <i>Candida petrophilum</i> <i>Ustilago zae, Ustilago maydis</i>	Lipopeptides et lipoprotéines - Lipopeptides -Serrawettine -Viscosine -Surfactine -Subtilisine -Gramicidines -Polymyxines	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Acides gras, phospholipides et lipides neutres -Acides gras -Lipides neutres -Phospholipides Biosurfactants particuliers -Vésicules -Cellules entières	<i>Candida lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Variété des bactéries	Biosurfactants polymériques -Emulsane -Biodispersane -Mannane-lipide-protéine -Liposane -Hydrates de carbone -Protéine-lipide	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphis</i>

I.3.2.2. Selon le poids moléculaire

D'après, **Pacwa-Plociniczak et al. (2011)**, on distingue deux types de biosurfactants :

I.3.2.2.1. Biosurfactants à poids moléculaire élevé

Sont des lipoprotéines et des acides gras complexes, qui sont très efficaces comme agents émulsifiants et stabilisateurs (**Mulligan, 2009**), ils sont utilisés généralement en tant qu'agents émulsifiants.

I.3.2.2.2. Biosurfactants à poids moléculaire faible

Comprenant les glycolipides, les lipides neutres et les lipopeptides, qui sont efficaces dans l'abaissement de la tension interfaciale, ce groupe de biosurfactants présente des activités de surface très efficaces.

I.3. 3. Microorganismes producteurs et physiologie

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie (**Mulligan, 2009**) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les glucides, les huiles, les hydrocarbures et même les déchets industriels (**Fukuoka et al., 2007 ; Mulligan, 2009 ; Santos et al., 2018**). Cependant, la plupart des biosurfactants sont synthétisés par des microorganismes croissant sur des substrats peu hydrosolubles, principalement les alcanes linéaires (**Hommel et al., 1994**). Ils peuvent s'adhérer à la surface cellulaire, comme ils peuvent être libérés à l'extérieur de la cellule microbienne dans le milieu de culture (**Saharan et al., 2011 ; Padmapriya et al., 2013; Banat et al., 2014**). Les microorganismes producteurs sont en général des bactéries, des levures et des moisissures, ils sont omniprésents, habitant dans divers habitats aquatiques (eau de mer douce et eau souterraine), milieux terrestres (le sol, les sédiments et les boues), ainsi que dans les environnements extrêmes comme les sites hyper salins (**Santos et al., 2016**). On les trouve également sur des tissus végétaux, des jus de fruits (Fruits, sève du phloème, concentré du jus de fruits et sirops) et le nectar (**Konishi et al., 2014**). Mais, souvent isolés des milieux contaminés par le pétrole et ses dérivés (**Banat et al., 2010**), comme les réservoirs de pétrole (**Banat et al., 2000**) et les sols contaminés (**Abu-Ruwaida et al., 1991**). On retrouve autant de diversité dans les microorganismes producteurs que dans les structures des biosurfactants.

Les nombreux microorganismes producteurs de biosurfactants appartenant aux genres suivant : *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* et *Thiobacillus* en tant que producteurs

de biosurfactants à base d'acides aminés ; *Pseudomonas*, *Torulopsis*, *Candida*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, en tant que producteurs des glycolipides. *Thiobacillus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* et *Acinetobacter* comme producteurs de phospholipides et d'acides gras (Liu et al., 2015). Les différents types des biosurfactants produits par les levures et les moisissures sont récapitulés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Les différents types des biosurfactants produits par les espèces fongiques.

Biosurfactant	Microorganisme producteur	Référence
Glycolipides	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Sympodiomyopsis paphiopedili</i> <i>Candida bogoriensis</i> <i>Pseudozyma rugulosa</i> <i>Candida sp.SY 16</i> <i>Pseudozyma aphidis</i> <i>Ustilago maydis</i> <i>Fusarium sacchari</i> <i>Cryptococcus sp. VITGBN2</i> <i>Rhodotorula babjevae</i> YS3 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> CCMA 0358.	Kim et al., 1997 Kitamoto et al., 2001 Solaiman et al., 2004 Thanomsub et al., 2004 Rau et al., 2005 Cortes-Sánchez et al., 2011 Basak and Das , 2014 Sen et al., 2017 Souza et al., 2017
Mannanoprotéines	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lukondeh et al., 2003
Acides gras	<i>Candida ingens</i>	Amezcu-Vega et al., 2007
Complexes glyco-protéiques.	<i>Yarrowia lipolytica</i> IMUFRJ 50682. <i>Candida lipolytica</i> <i>Aspergillus ustus</i> <i>Cunninghamella echinulata</i>	Amaral et al., 2006 Sarubbo et al., 2007 Kiran et al., 2009 Andrade et al., 2018
Lipopeptides	<i>Fusarium sp. BS-8</i>	Qazi et al., 2014

Le principal rôle physiologique des biosurfactants est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats qui sont insolubles dans l'eau par une réduction de la tension de

surface entre les phases, rendant le substrat plus disponible pour l'absorption et le métabolisme (**Hommel *al.*, 1994 ; Pacwa-Plociniczak et *al.*, 2011 ; Silva et *al.*, 2014**). Deux types de mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle des biosurfactants dans la dégradation des alcanes. Les biosurfactants ioniques extracellulaires, comme les rhamnolipides et les sophorolipides, émulsionnent le substrat aliphatique, le rendant plus biodisponible par augmentation de la surface d'échange. Il arrive toutefois que les molécules de biosurfactant restent attachées à la paroi cellulaire et la rendent hydrophobe, ce qui pourrait faciliter le contact avec les hydrocarbures et faciliter également leur diffusion dans la cellule (**Déziel et *al.*, 2000 ; Pacwa-Plociniczak et *al.*, 2011 ; Padmapriya et *al.*, 2013**).

I.3.4. Propriétés physico-chimiques des biosurfactants

De nombreuses propriétés physico-chimiques caractérisent les surfactants synthétiques ou biologiques. Les propriétés des biosurfactants par rapport à leurs homologues synthétiques rendent les plus convenables pour des applications commerciales. Ils sont caractérisés par leur activité de surface, leur biodégradabilité, leur faible toxicité et leur résistance aux conditions extrêmes du pH, température et salinité (**Déziel et *al.*, 2000**).

I.3.4.1. Diminution de la tension superficielle

La tension superficielle est définie comme étant la force existante à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface. Elle s'exprime en Dyne/cm ou mN/m. La nature amphiphile des surfactants explique leur tendance à s'accumuler à la surface de l'eau ou à l'interface avec un autre liquide, résultant en la diminution de la tension superficielle ou interfaciale. En effet, un bon surfactant peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale eau/hexadécane de 40 à 1 mN/m (**Mulligan, 2009**). A titre d'exemple, la surfactine produite par *Bacillus subtilis* peut réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN/m et la tension interfaciale de l'eau/hexadécane à 1 mN/m. *Pseudomonas aeruginosa* produit des rhamnolipides qui diminuent la tension superficielle de l'eau jusqu'à 26 mN/m (**Mulligan, 2009**). Ainsi, les sophorolipides produits par certaines espèces de *Candida* peuvent abaisser la tension superficielle à 25mN/m (**Luna et *al.*, 2013**).

I.3.4.2. Concentration micellaire critique (CMC)

Une des principales caractéristiques des surfactants est leur aptitude à former des agrégats moléculaires appelés micelles: un arrangement thermodynamiquement stable de molécules

amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe, où les parties hydrophobes des micelles se regroupent vers le centre et les portions hydrophiles externes restent en contact avec l'eau (**Figure 12**).

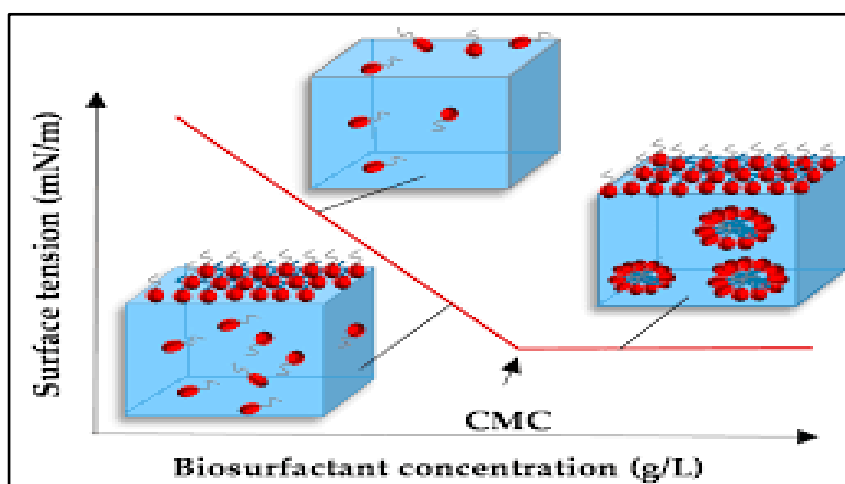


Figure 12 : Variations de la tension superficielle et la formation des micelles en fonction de la concentration en surfactant (**Campos et al., 2013**).

La CMC est définie comme étant la concentration minimale nécessaire pour initier la formation de micelles (**Pacwa-Plociniczak et al., 2011**). Avant que la CMC soit atteinte, les molécules de surfactant chimique ou biologique existent sous une forme dissoute dans la phase liquide. Une fois la CMC est dépassée, les molécules du surfactant supplémentaires formeront des micelles et la portion dissoute restera constante, tant que les conditions physico-chimiques ne varieront pas. Des changements de température, de pH ou l'ajout d'électrolytes peuvent modifier significativement la CMC (**Déziel et al., 2000 ; Mulligan, 2009**). La CMC est un indicateur de l'efficacité d'un surfactant. Les biosurfactants efficaces ont une CMC faible. En général, les biosurfactants sont plus efficaces et leur CMC est environ 10 à 40 fois plus faible que celle des tensioactifs chimiques, c'est-à-dire moins de surfactant est nécessaire pour obtenir une diminution maximale de la tension superficielle (**Desai et Banat, 1997 ; Mnif et Ghribi, 2015**).

I.3.4.3. Emulsification

Une émulsion est un système hétérogène constitué d'un liquide immiscible dispersé dans un autre liquide sous la forme de gouttelettes, le diamètre dont généralement dépasse 0,1 mm. Les émulsions ont une stabilité minimale, mais l'ajout de biosurfactants peut conduire à une émulsion qui demeure stable pendant des mois voire des années. A titre d'exemple, le liposane,

émulsifiant synthétisé par *Candida lipolytica*, a formé des émulsions stables avec des huiles comestibles pendant 3 mois (Cirigliano et Carmen, 1984 ; Sarubbo et al., 2007).

I.3.4.4. Tolérance aux conditions extrêmes de température, pH et salinité

Les propriétés de nombreux biosurfactants ne sont pas affectées par les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et les taux de salinités.

De nombreux biosurfactants peuvent être utilisés à des températures élevées et des valeurs de pH allant de 2 à 12. Ils tolèrent également une concentration de NaCl allant jusqu'à 30% (Kebbouche-Gana et al., 2009), alors que 2% de NaCl suffise pour inactiver les tensioactifs synthétiques (Santos et al., 2016). Luna et al. (2013), ont rapporté que le biosurfactant produit par *Candida sphaerica* a montré une grande stabilité dans des températures de 5 à 120 °C, pH de 2 à 12 et des concentrations de NaCl allant jusqu'à 10%.

I.3.4.5. Faible toxicité

Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des biosurfactants. Ils sont généralement considérés comme des produits peu ou pas toxiques et sont donc appropriés pour l'utilisation dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Une étude a suggéré qu'un tensioactif anionique synthétique (Corexit) a montré une CL50 (concentration létale pour 50% des espèces testées) contre la bactérie *Photobacterium phosphoreum* dix fois plus basse que les rhamnolipides (Vijayakumar et Saravanan, 2015).

Des tests de toxicité réalisés par Luna et al. (2013) ont montré l'absence de toxicité des biosurfactants produits par *Candida sphaerica* vis à vis d'une espèce des crustacés *Artemia salina* et des végétaux *Solanum gilo*, *Lactuca sativa* L et *Brassica oleracea* L. Les mêmes résultats ont été obtenus par Hentati et al. (2016) en évaluant la toxicité des biosurfactants produits par *Bacillus stratosphericus*. Ils ont montré que les biosurfactants étudiés n'ont pas des effets toxiques sur des cellules rénales humaines à des concentrations différentes allant jusqu'à 1000 µg/ml. Cependant, Wang et al. (2008) ont montré que les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* avaient un effet algicide sur l'algue microscopique *Heterosigma akashiwo* à des concentrations supérieures à 0.4 mg/L.

I.3.4.6. Biodégradabilité

Les biosurfactants, en raison de leur origine biologique, semblent être plus facilement biodégradables que leurs homologues synthétiques. Ils sont facilement dégradés par les microorganismes dans l'eau et le sol (Mohan et al., 2006 ; Mulligan, 2009).

I.3.5. Paramètres influençant la production des biosurfactants

Les biosurfactants sont le plus souvent des métabolites secondaires. Leur production commence à la fin de la phase de croissance exponentielle (**Mulligan et al., 1984**). La production de biosurfactant dépend non seulement de microorganisme producteur, mais aussi des conditions de culture. La productivité et la structure peuvent être affectées par la composition de milieu de culture, ainsi que les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation, l'âge de la culture, la source de carbone et la source d'azote (**Déziel et al., 2000**).

I.3.5.1. Source de carbone

La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants. En effet, la nature du substrat carboné utilisé peut affecter même la structure et donc, les propriétés des biosurfactants et pourrait aussi déterminer s'ils seront extracellulaires ou associés à la membrane (**Déziel et al., 2000**). Les sources de carbone utilisées pour la production des biosurfactants peuvent être divisées en trois catégories : les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales. Les sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose ou mannitol) sont utilisées pour la production des rhamnolipides par *Pseudomonas spp* : cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles comme les n-alcanes ou l'huile d'olive (**Desai et Banat, 1997**).

Cooper et Paddock (1984), ont indiqué qu'un mélange entre le glucose et l'huile végétale a permis d'obtenir une production de 70 g/L de biosurfactants par *Torulopsis bombicola*, cependant un très faible rendement a été trouvé lorsque le glucose ou l'huile végétale ont été utilisés séparément pour la production. De plus, un rendement massique maximal de sophorolipides a été obtenu par la même espèce en utilisant 80 g/L et 40 g/L de glucose et de l'huile de soja, respectivement (**Kim et al., 1997**). En outre, lorsque l'huile de colza et le glucose étaient utilisés comme sources de carbone à des concentrations de 10% chacun, un rendement maximal en sophorolipides (8 g/L) était atteint par *Candida lipolytica* (**Sarrubo et al., 2007**).

Amezcuaveja et al. (2007), ont noté que la nature des acides gras composant les biosurfactants produits par *Candida ingens* change en fonction de la composition de milieu de fermentation.

I.3.5.2. Source d'azote

Différentes sources d'azote organiques et inorganiques ont été utilisées pour la production des biosurfactants (**Banat et al., 1991**). **Mulligan et Gibbs (2004)**, ont rapporté que *Pseudomonas aeruginosa* utilise les nitrates, l'ammonium et les acides aminés comme source d'azote. En

comparaison avec l'ammonium, l'assimilation des nitrates est plus lente et simule la limitation de l'azote, ce qui est favorable à la production de rhamnolipides. Des rendements élevés en sophorolipides produits par *Candida bombicola*, ont été obtenus en utilisant l'extrait de levure et l'urée comme source d'azote (**Deshpande et Daniels, 1995**). De plus, des rendements élevés en biosurfactants par *Candida sp.* SY16, *Candida lipolytica* et *Candida glabrata* ont été obtenus en utilisant le nitrate d'ammonium et l'extrait de levure (**Kim et al., 1999 ; Sarrubo et al., 2006 ; Sarrubo et al., 2007**).

I.2.5.3. Conditions de culture

Les conditions de croissance (température, pH, vitesse d'agitation et oxygène) influencent également la production des biosurfactants (**Desai et Banat, 1997**). Les espèces du genre *Candida* produisent des biosurfactants dans une large gamme de pH, tel que pH 5,7 pour *Candida glabrata* UCP 1002, pH 7,8 pour *Candida sp.* SY16, pH 5,0 pour *Candida Lipolytica* et pH 6,0 pour *Candida batistae* (**Kim et al., 1999 ; Sarrubo et al., 2006 ; Konichi et al., 2008**). La température la plus favorable à la production des biosurfactants par les différentes espèces fongiques est 30 °C, comme observé chez différentes espèces de *Candida*, à savoir. *Candida sp.* SY16, *Candida bombicola* et *Candida batistae* (**Bhardwaj et al., 2013**).

Le temps d'incubation exerce également un effet significatif sur la production de biosurfactants. Les microorganismes produisent des biosurfactants à différents intervalles de temps. La production maximale des biosurfactants par *Aspergillus ustus* a été observée après cinq jours d'incubation (**Kiran et al., 2009**). Cependant, la production maximale de biosurfactants par *Cryptococcus sp* a été obtenue après 68 h d'incubation (**Basak et Das, 2014**).

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production. Les milieux de culture sont agités lors de la production des biosurfactants. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (**Desai et Banat, 1997**).

L'âge de la culture est une variable importante pour la production en batch des biosurfactants. Ces derniers, sont produits surtout en phase exponentielle et en phase stationnaire qui constituent le moment crucial pour l'augmentation de la biomasse et la diminution de la tension de surface (**Rodrigues et al., 2006**). L'âge de la culture augmente le phénomène d'autolyse avec la libération des lipides, ainsi que des fragments de la paroi et de la capsule qui possèdent une activité tensioactive (**Desai et Banat, 1997**).

Ainsi, les concentrations en ions métalliques jouent un rôle très important dans la production de certains biosurfactants. Une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induit une augmentation de production (**Santos et al., 2016**). **Mulligan et al. (1984)**, ont signalé que la production des biosurfactants pourrait être affectée par le métabolisme de phosphate. **Palejwala et Desai (1989)**, ont noté que la faible concentration de phosphate stimule la production des biosurfactants. **Lin et al. (1998)**, ont remarqué qu'une augmentation de la production des lipopeptides par *Bacillus licheniformis* JF-2 de 35 mg/L à 110 mg/L était obtenue en réduisant la concentration de phosphate. Le phosphate, le fer, le magnésium et le sodium influencent significativement la production des biosurfactants par *Rhodococcus sp* par rapport à l'effet du potassium ou du calcium (**Abu-Ruwaida et al., 1991**). L'addition de fer ou de manganèse a permis d'obtenir le rendement le plus élevé de la production de surfactine par *Bacillus subtilis* (**Copper et al., 1981**). La salinité du milieu de culture peut également jouer un rôle dans la production des biosurfactants. A titre d'exemple, la production des biosurfactants par *Rhodococcus sp* n'a pas été affectée par les concentrations de sel allant jusqu'à 10% (w/v). Cependant, des réductions de CMC ont été détectées (**Abu-Ruwaida et al., 1991**).

I.3.6. Production de biosurfactants en utilisant des substrats bon marché

Bien que les biosurfactants offrent des avantages par rapport à leurs homologues synthétiques et qu'ils aient des utilisations prometteuses dans diverses industries, ils ne sont pas encore largement utilisés à l'échelle industrielle, en raison de leurs faibles rendements et leurs coûts de production élevés (**Banat et al., 2014**). En effet, le succès de l'utilisation des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de déchets renouvelables et bon marché comme substrats pour la production de biosurfactants. Ceci a permis d'élaborer une stratégie efficace de réduction des coûts, associée à la gestion des déchets en réduisant les quantités des déchets à traiter générés par différentes entreprises (**Mukherjee et al., 2010 ; Banat et al., 2014, Gudina et al., 2016 ; Geetha et al., 2018**). Par conséquent, un nombre croissant d'études ont étudié la production de biosurfactants en utilisant différents substrats à faible coût tels que le lactosérum, la mélasse, la liqueur de maïs, les margines et les huiles comme substrats alternatifs et milieux pour la production de biosurfactants (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Quelques sous-produits utilisés pour la production des biosurfactants

Sous-produit utilisé	Microorganisme producteur	Référence
Liqueur de trempe de maïs (CSL)	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Luna et al., 2013
Mélange de CSL et de l'huile de friture usée	<i>Mucor circinelloides</i>	Silva et al., 2014
Huile de friture usée	<i>Bacillus pumilus</i>	Oliveira et al., 2013
Jus de datte	<i>Natrialba</i> sp strain C21	Kebbouche-Gana et al., 2013
Margine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mercadé et al., 1993
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Maass et al., 2015
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> #112	Gudina et al., 2016
Lactosérum	<i>Bacillus licheniformis</i> K51, <i>Bacillus subtilis</i> 20B, <i>Bacillus subtilis</i> R1 , <i>Bacillus</i> sp. HS3	Joshi et al., 2008
Graisse animale	<i>Candida lipolytica</i> UCP0988	Ławniczak et al., 2013
Mélasses	<i>Bacillus</i> sp	Saimmai et al., 2011
	<i>Bacillus subtilis</i> B20	Al-Bahry et al., 2013

I.3.7. Applications industrielles des biosurfactants

L'industrie s'intéresse de plus en plus aux biosurfactants comme substituts potentiels des surfactants synthétiques (**Santos et al., 2018**). Ils ont l'avantage de présenter une grande variété de propriétés physico-chimiques potentiellement intéressantes pour des besoins spécifiques. Par conséquent, les biosurfactants ont un large éventail d'applications biotechnologiques dans diverses industries : pétrolière, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, détergence, textiles, peintures, mines et en nanotechnologie (**Rodrigues et al., 2006 ; Santos et al., 2016**). Actuellement, le marché principal est l'industrie pétrolière (**Santos et al., 2018**).

Les biosurfactants peuvent être utilisés pour la récupération des résidus pétroliers des réservoirs de stockage, d'autres processus de récupération du pétrole, le nettoyage des déversements de pétrole et la biorestauration des eaux et des sols contaminés par les hydrocarbures (**Sobrinho et al., 2008 ; Silva et al., 2014**). Les utilisations des biosurfactants dans différentes industries sont récapitulées dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Différents domaines d'utilisation des biosurfactants.

Domaine	Applications	Rôles des biosurfactants	Références
Pétrole	Récupération assistée du pétrole Désémulsification	Amélioration de l'huile de drainage dans les puits. Libération stimulée de l'huile emprisonnée dans les capillaires. Mouillage des surfaces solides, réduction de la viscosité de l'huile et du point d'écoulement du pétrole. Emulsification des hydrocarbures Abaissement de la tension interfaciale, Solubilisation des émulsions, réduction de la viscosité, dispersion des huiles, mouillage des surfaces solides et lubrifiants. Inhibition de la corrosion d'équipement.	Pacwa-Plociniczak et al., 2011.
Environnement	Bioremediation Les opérations du nettoyage des déversements d'hydrocarbures Remédiation du sol	Emulsification des hydrocarbures, Abaissement de la tension interfaciale. Dispersion des huiles, solubilisation, mouillage. Rinçage du sol.	Silva et al., 2014.

Alimentaire	Emulsification et désémulsification Ingrédient fonctionnel	Solubilisation des huiles aromatisées. Contrôle de la consistance. Emulsification et désémulsification, Agent mouillant, détergent, moussant, anti-moussant et épaississant.	Campos et <i>al.</i>, 2013
Biologique et médical	Pharmaceutiques et thérapeutiques	Agents anti-adhésifs, antifongiques, antiviraux, antibactériens, vaccins, thérapie génique, molécules immunomodulatrices.	Ławniczak et <i>al.</i>, 2013.
Agriculture	Biocontrôle des engrais	Mouillage, dispersion, suspension de pesticides en poudre et engrais, Emulsification des solutions de pesticides, facilitation de mécanismes de biocontrôle des microbes phytopathogènes, L'élimination et l'augmentation de la biodisponibilité des nutriments pour les microbes bénéfiques associés aux plantes.	Sachdev et Cameotra, 2013.
Exploitation minière	Opérations de nettoyage de métaux lourds Assainissement des sols	Agent mouillant et moussant. Nettoyage des ions métalliques (métaux lourds) provenant des solutions aqueuses de sol et des sédiments. Inhibition de la corrosion.	Pacwa-Plociniczak et <i>al.</i>, 2011.

Cosmétique	Produits de santé et de beauté	Emulsification, solubilisation, Agents moussants, mouillants, nettoyants, et antimicrobiens.	Vijayakumar et Saravanan, 2015.
Nettoyage	Détergents à lessive	Détergents et désinfectants pour la lessive, l'humidification,	Banat et <i>al.</i>, 2010.
Textiles	Préparation de fibres Teinture et impression	Mouillage, solubilisation, dispersion et émulsification	Banat et <i>al.</i>, 2010.
Nanotechnologie	Synthèse de nanoparticules	Emulsification et stabilisation.	Vijayakumar et Saravanan, 2015.

*Matériel et
méthodes*

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel et équipement

La liste de verreries, équipements et réactifs est indiquée dans l'**annexe 1**.

II.1.2. Matériel biologique

Plusieurs échantillons biologiques récoltés en Algérie ont été utilisés pour l'isolement des levures et des moisissures comprenant des fruits tels que l'orange, les dattes, le melon, les fraises, les figues, la framboise, la pêche, les bananes, l'abricot et le citron, des produits laitiers tels que (le lait de chèvre et le lait de vache), ainsi que des échantillons collectés à partir des sites contaminés par les hydrocarbures y compris des échantillons du sable, de l'eau de gisement et de la boue de forage provenant de la région de Haoud Berkaoui. Cette région représente une des principales zones productrices d'hydrocarbures du Sahara algérien. Elle se situe à environ 800 km au sud-est de la capitale Alger, à 100 km au nord-ouest de Hassi Messaoud et à 30 km d'Ouargla. Elle s'étend du sud-est de Ghardaïa jusqu'au champ extrême Boukhzana près de la route de Touggourt.

L'échantillonnage a été effectué à partir de mois d'Avril 2014, au niveau des wilayas de Bouira, Boumerdès et Ouargla (**Figure 13**).



Figure 13 : Localisation géographique des régions de récolte des différents échantillons biologiques en Algérie.

Environ 250 g de chaque échantillon ont été transférés au laboratoire dans des bocaux stériles et conservés à 4 °C pour l'étude microbiologique. La liste des échantillons et leurs régions de provenance est présentée dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Les différents échantillons biologiques et leurs provenances.

Échantillons	Nombre d'échantillons	Région	Date de prélèvement
Fruits Citron Pêche Framboise Datte Fraise Banane Melon Orange Abricot Figue	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	Boumerdès	14 Avril 2014
Produits laitiers Lait de vache Lait de chèvre	3 3	Bouira	28 Avril 2014
Echantillons contaminés par les hydrocarbures Sable Eau de gisement Boue de forage	4 4 4	Ouargla	05 Juin 2014

II.2.Méthodes

II.2.1. Isolement des levures et des moisissures

L'isolement a été réalisé selon la méthode décrite par **Kurtzman et Fell (1998)**. Les différents fruits ont été dénoyautés, broyés et homogénéisés séparément dans des mortiers stériles. La première étape consiste à faire un pré-enrichissement pour favoriser l'isolement des levures et des moisissures. Ce pré-enrichissement consiste à introduire 10 g de chaque échantillon solide et 10 ml de chaque échantillon liquide aseptiquement dans des Erlenmeyers contenant 90 ml de

bouillon (YPGC) pour l'isolement des levures et le bouillon (PDC) pour l'isolement des moisissures, les deux milieux contiennent 0,1 g/L de chloramphenicol pour inhiber la croissance bactérienne. Les échantillons ainsi préparés, sont homogénéisés, puis placés dans un incubateur agitateur avec une agitation de 120 rpm à 30 °C et 25 °C pendant 18h.

Les isollements à partir de différents échantillons ont été réalisés par la méthode classique de dilutions décimales. Une série de dilutions (de 10^{-1} à 10^{-4}) a été effectuée : 1ml de chaque préculture a été prélevé aseptiquement, puis introduit dans un tube contenant 9 ml de l'eau physiologique (NaCl à 0,9% m/v). On obtient ainsi la dilution 10^{-1} et ainsi de suite.

II.2.1.1. Milieux d'isolement

Les levures sont isolées sur milieux gélosés Sabouraud et OGA tandis que les moisissures sont isolées sur les milieux PDA et MEA (la composition des milieux est donnée en **annexe 2**). Ces milieux ont été supplémentés de 0,1 g/L de chloramphenicol pour inhiber la croissance bactérienne.

II.2.1.2. Ensemencement

Après l'apparition de trouble dans les milieux pré-enrichis. Nous avons procédé à l'ensemencement en surface des milieux solides par étalement de 0,1 ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau. Les boîtes ainsiensemencées sont mises dans des sacs en plastiques, et ensuite incubées à 30 °C, pendant 48 h pour les levures et 72 h pour les moisissures voire une semaine pour laisser le temps aux microorganismes d'intérêt de se développer (**Yarrow, 1980**).

II.2.1.3. Purification

Après une étude sommaire de l'aspect macroscopique des colonies, celles qui étaient bien isolées sont repiquées sur les mêmes milieux de cultures d'isolement. La purification est effectuée par la méthode des stries, qui consiste à tracer des stries avec l'anse contenant la levure ou un fragment de la moisissure sur la surface d'une gélose neuve coulée dans des boites de Pétri plusieurs fois jusqu'à l'obtention des souches pures (**Kurtzman et Fell, 1998**).

II.2.1.4. Conservation

Les isolats de levures et moisissures sont conservés sur les milieux OGA et PDA supplémentés d'un antibiotique en gélose inclinée à 4 °C afin d'éviter d'éventuelles contaminations par les bactéries. Des repiquages réguliers sont effectués tous les mois pour maintenir la viabilité des

souches et pour une conservation de longue durée, les isolats sont conservés à – 20 °C en milieu YPGA plus une solution stérile de glycérol (Kurtzman *et al.*, 2011).

II.2.2. Criblage des souches productrices des biosurfactants

Le but de ce travail consistait à isoler des micro-organismes spécialement des levures et des moisissures productrices des biosurfactants. Pour ce faire, nous avons procédé à un criblage des différents isolats fongiques isolés à partir des différents biotopes prospectés pour évaluer leur capacité à produire les biosurfactants, en utilisant différentes techniques tel que le test d'émulsification E₂₄, la technique du drop collapse, le test de déplacement de l'huile ou spread oil et la recherche de l'activité hémolytique. Chaque isolat a été transféré dans un Erlenmeyer de 100 ml contenant 50 ml de milieu minimum MM (**annexe 2**) contenant 2% du gasoil (2,0%, v/v) comme source de carbone. Le gasoil utilisé dans cette étude a été stérilisé sur filtre seringue de 0,45 µm puis additionné à 50 ml de MM à raison de 2% (v/v).

Ensuite les cultures sont incubées dans un incubateur agitateur avec une agitation constante de 150 rpm, à 30 °C pendant 72 h. Les moûts de fermentations obtenus ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 20 min, puis les surnageants des différentes cultures ont été utilisés pour mettre en évidence la production des biosurfactants.

II.2.2.1. Test d'émulsification E₂₄

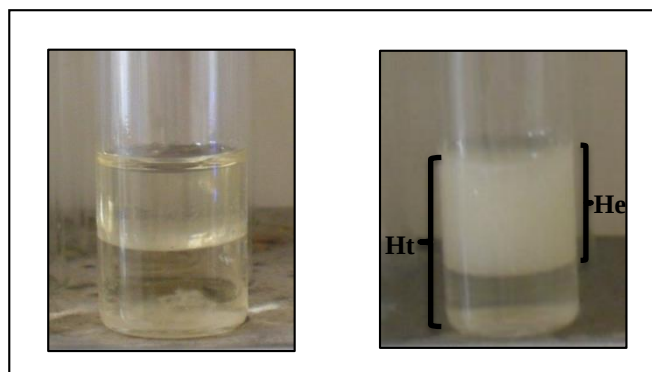
Ce test permet de vérifier la capacité de former une émulsion entre une phase hydrophobe (gasoil) et une phase hydrophile (le surnageant de culture microbienne). Le test consiste à mélanger 3 ml du surnageant avec 3 ml d'hydrocarbure (gasoil) dans un tube à essai. Ce dernier est homogénéisé avec un vortex à une grande vitesse durant 2 à 3 min, et après le calcul d'indice d'émulsification E₂₄ est réalisé. Les tubes sont laissés reposer pendant 24 h à température ambiante, puis l'indice d'émulsification E₂₄ est recalculé une seconde fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion formée.

La comparaison se fait par rapport à un témoin négatif, constitué de gasoil et de milieu de culture stérile (**Figure 14**). L'indice d'émulsification E₂₄ est le pourcentage de la hauteur de la phase émulsionnée formée, divisée par la hauteur totale du mélange selon l'équation suivante (Bodour et Maier, 1998):

$$E_{24} = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

He: hauteur de l'émulsion formée (cm).

Ht: hauteur totale de mélange (cm)



(A) Résultat négatif

(B) Résultat positif

Figure 14 : Test d'émulsification E₂₄ ; (A) gasoil plus milieu de culture stérile, (B) gasoil plus un surnageant d'une culture microbienne.

II.2.2. 2. Test du "drop-collapse"

Selon **Bodour et Maier (1998)**, il s'agit d'une technique qualitative pour la mise en évidence de la production des biosurfactants, elle est réalisée dans une microplaque (12,7 × 8,5 cm) de 96-micropuits circulaires (diamètre = 8 mm). Avant l'utilisation, la plaque est rincée trois fois avec de l'eau chaude, de l'éthanol et d'eau distillée, puis séchée (**Bodour et Maier, 1998**). Après la préparation de la plaque, chaque puits est rempli de 2 µl de gasoil, et cette dernière est maintenue à température ambiante pendant 1 h. Par la suite, 5 µl du surnageant ont été mis à la surface de l'huile. En parallèle, des puits ont été préparés autant que témoins pour la comparaison ; l'un rempli de gasoil et du milieu de culture stérile et l'autre rempli de gasoil et d'un surfactant chimique (Sodium Dodecyl Sulfate : SDS) (**Figure 15**). Les résultats ont été déterminés visuellement puis observés au microscope photonique (grossissement × 10), après 1 min. Si la goutte est restée perlée, le résultat est négatif. Si la goutte s'est étalée, le résultat est positif.

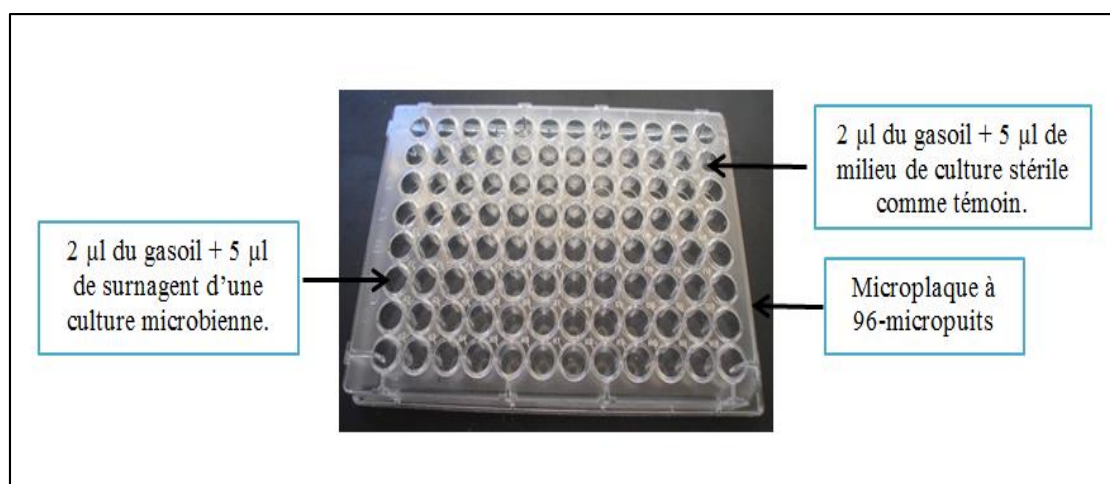


Figure 15 : Test du drop collapse.

Les résultats positifs sont marqués de «+» à «++++», ils correspondent à l'étalement partiel ou complet sur la surface de l'hydrocarbure. Alors que les résultats négatifs, sont marqués «-», ce qui signifie l'absence de la production des biosurfactants (Youssef et al., 2004).

II.2.2. 3. Test de déplacement de l'huile ou Spread oil

Pour ce test, 20 µl de gasoil ont été mis à la surface de 20 ml d'eau distillée dans une large boîte de Pétri en verre de 25 cm de diamètre. Ensuite, 20 µl du surnageant de culture sont placés doucement au centre de la couche d'huile (Figure 16). La présence des biosurfactants se traduira par le déplacement de l'huile et la formation d'une zone de déplacement. Les résultats ont été déterminés visuellement après 1 min et le diamètre de la zone de déplacement a été mesuré (Morikawa et al., 2000).

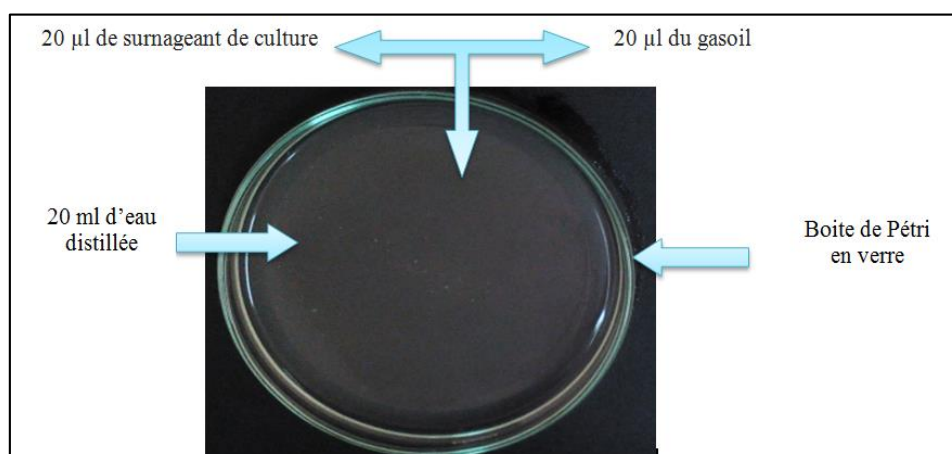


Figure 16 : Test de déplacement de l'huile

II.2.2. 4. Recherche de l'activité hémolytique

Les isolats ont été transférés sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Sabouraud additionnée du sang de mouton à 5% et sont incubés pendant 48 à 72 h à 30 °C. Les boîtes ont été visiblement inspectées pour rechercher une zone d'hémolyse autour de la colonie (**Mulligan et al., 1984**).

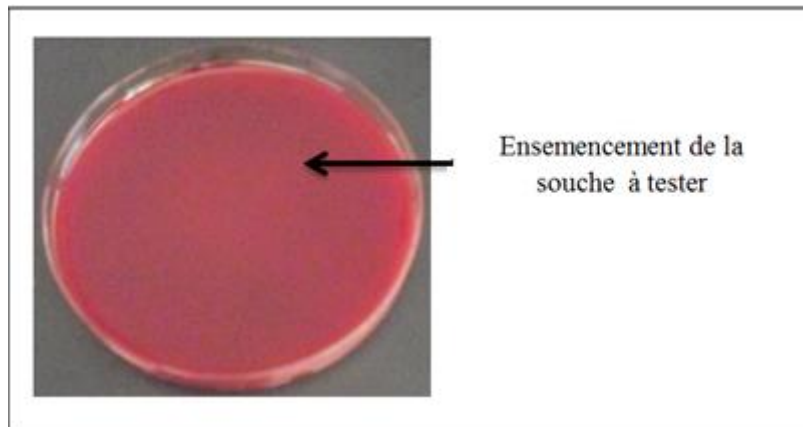


Figure 17: Recherche de l'activité hémolytique

II.2.3. Identification des isolats

II.2.3.1. Identification des levures

Elle comprend l'identification phénotypique et génotypique des levures sélectionnées.

II.2.3.1.1. Identification phénotypique

L'identification phénotypique est basée sur les critères morphologiques des isolats (**Kurtzman et Fell, 1998 ; Kurtzman et al., 2011**).

A. Caractères macroscopiques

L'étude des caractères morphologiques est réalisée sur milieu liquide et solide. Elle consiste à examiner l'aspect, la forme, la pigmentation et la consistance des cultures. Les souches pures sont repiquées dans des boîtes de Pétri sur le milieu YPGA, incubées pendant 48 h à 30 °C puis maintenues à température ambiante durant une semaine. L'observation des colonies a été faite à l'aide d'une loupe binoculaire pour déterminer leur forme (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves), la couleur ou l'observation de la pigmentation, la coupe des colonies, la taille des colonies, leur aspect sur gélose inclinée (brillant ou mat) et l'aspect de la culture en

milieu liquide (la présence d'un trouble, d'un voile, d'un anneau, de dépôt poussiéreux, de dépôt granuleux ou mie de pain, croissance le long des parois) (**Kurtzman et Fell, 1998**).

B. Caractères microscopiques

L'examen microscopique à l'état frais (grossissement $\times 40$) permet de définir la forme, l'arrangement, le mode de division cellulaire et la taille des cellules. Cette étude a été réalisée sur des cultures jeunes croissant sur milieu YPG liquide et solide gélosé à 2% après 48 h de culture à 30 °C.

C. Aptitude à la filamentation

Certains genres de levures peuvent former des filaments mycéliens (vrai ou pseudo-mycélium) comme *Candida*, *Pichia*, *Trichosporon* (**Kurtzman et Fell, 1998**). La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche s'effectue sur un milieu spécifique tel que le milieu PDA. Les levures sont ensemencées par une strie sur des lames contenant le milieu PDA recouvertes des lamelles et placées dans des boîtes de Pétri en verre stériles, puis ces dernières sont incubées à 25 °C pendant une semaine (**Guiraud, 1998 ; Kurtzman et Fell, 1998**).

D. Caractéristiques sexuelles

a. Reproduction asexuée

La reproduction végétative est observée sur une lame à l'état frais ou fixée par coloration au bleu de méthylène pour la recherche de bourgeonnement.

b. Reproduction sexuée

Différents milieux de culture sont utilisés pour étudier la sporulation (**annexe 2**). Les tubes à essais contenant des milieux de sporulation Mac Clary, Malt agar MA, Gordkowa et Fowell en géloses inclinées sont ensemencés par les souches levuriennes et incubés à 25 °C pendant 1 à 4 semaines. Des observations microscopiques sont effectuées pour la mise en évidence des asques et des ascospores (la forme et le nombre de spores par asque) (**Guiraud, 1998**).

II.2.3.1.2. Identification biochimique et physiologique

A. Fermentation des sucres

L'étude du métabolisme des glucides par la voie de la fermentation est réalisée sur milieu liquide YP (**Annexe 2**), contenant une cloche de Durham. Les substrats carbonés testés sont :

D-glucose, D-galactose, D-maltose, D-saccharose et D-tréhalose à une concentration finale en sucre de 2%. Les tubes sontensemencés avec 0,1 ml de la suspension de chaque levure.

La fermentation des sucres se traduit par une croissance de la souche testée ainsi que la production du gaz dans la cloche du durham après incubation à 25 °C pendant 48 heu à 3 semaines (à raison d'une lecture tous les deux jours).

B. Assimilation des composés carbonés

L'étude de l'assimilation des substrats carbonés par les souches levuriennes est un critère pertinent pour leur identification. Ils existent des systèmes standardisés pour l'identification des levures, contenant des tests d'assimilation miniaturisés. Parmi eux, la galerie Auxacolor. Cette galerie est un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH. La galerie comporte 16 cupules, 3 pour des tests enzymatiques et 13 pour les tests d'assimilation des sucres, contenant chacune un substrat carboné sous forme déshydraté, remplie d'un milieu semi-solide préalablement inoculé.

Des colonies jeunes de 24 h sont transférées dans de l'eau physiologique stérile. Chaque cupule de la galerie est inoculée par la suspension microbienne. La galerie est ensuite incubée 48 h à 30 °C. La composition de la galerie, le mode opératoire et l'interprétation des résultats sont représentés en **annexe 3**.

C. Croissance à différentes températures (thermorésistance)

Chaque souche isolée estensemencée par une strie sur milieu Sabouraud coulé sur boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées pendant 72 h à 25, 30, 35, 37, 40, 42, 45 et 47 °C.

D. Résistance aux antibiotiques

La résistance des souches aux antibiotiques a été évaluée. Chaque souche estensemencée sur milieu Sabouraud additionné des concentrations de 0,01% et 0,1% de cycloheximide (ou actidione). L'incubation a eu lieu à 30 °C pendant 48 h à une semaine.

E. Résistance au NaCl

L'halotolérance des souches a été testée. Chacune des souches estensemencée sur milieu Sabouraud contenant respectivement 5, 10, 15, 20 et 25% de NaCl pendant 48 h à une semaine.

F. Croissance sur 50% de glucose

L'osmophilie des souches a été testée par la croissance des souches sur milieu Sabouraud contenant 50% de glucose pendant 48 h à une semaine.

Dans tous les cas, une culture positive se traduit par l'apparition des colonies.

II.2.3.1.3. Lecture et analyse des résultats

Les isolats ont été identifiés en analysant les résultats des différents tests morphologiques, physiologiques et biochimiques à l'aide de l'interprétation des résultats de la galerie Auxacolor et des clés taxonomiques décrites selon **Kurtzman et Fell (1998)**.

II.2.3.1.4. Identification génotypique des souches performantes

Seulement quatre souches levuriennes les plus performantes en terme de production des biosurfactants codées YBR, YH, YEG, YLF ont été utilisées pour la caractérisation moléculaire. L'identification moléculaire nécessite l'extraction de l'ADN à partir d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de régions spécifiques des unités de répétition de l'ADNr, tel que le gène imbriqué codant pour l'ARNr 5.8S. Cette région comporte des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre des souches d'espèces différentes (**Las Heras-Vasquez et al., 2003**). L'ADN génomique total de chaque levure a été extrait selon la méthode décrite par **Harju et al. (2004)**. Les amorces universelles utilisées pour l'amplification de l'ADNr 5.8S des souches levuriennes étaient les suivantes: l'amorce directe était ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et l'amorce inverse était ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'). Le mélange réactionnel contenait 14 µl de mélange PCR, 2,5 µl de chaque amorce avant (ITS-1) et inverse (ITS-4), 1 µl de matrice ADN et le volume total atteint 50 µl avec de l'eau distillée stérile. La PCR a été réalisée en utilisant l'appareil PCR: Prime Thermal Cycler (Techne) sous les conditions suivantes :

1 µL	ADNg (~ 300 ng)
5 µL	Tampon d'ADN polymérase Taq commercial
2 µL	dNTP (10 mM)
5 µL	Amorce directe ITS1 (10 pmol)
5 µL	Amorce inverse ITS4 (10 pmol)
1 µL	ADN polymérase Taq (2 U)
1 µL	MgCl ₂ 25 mM
q.s.p. 50 µL	H ₂ O Ultrapure

Dans nos conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 3 min à 94 °C est suivie de 40 cycles de polymérisation dont chacun comprend:

- Une étape de dénaturation de la matrice (30 s à 94 °C).
- Une étape d'hybridation des nucléotides amorces à la matrice (45 s à 60 °C).
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase (90 s à 72 °C).

Les produits de PCR ont été chargés sur des gels d'agarose à 1% et purifiés en utilisant le kit de purification QIAquick PCR (QIAGEN, Allemagne). Les produits de PCR purifiés ont été directement séquencés en utilisant le kit de séquençage de cycle BigDye Terminator (Applied Biosystems) avec un analyseur génétique ABI Biosystèmes. La séquence d'ADN a été examinée à l'aide du logiciel MEGA version 6.06 (Tamura et al., 2013) et sa similarité avec les séquences génomiques de GenBank a été étudiée à l'aide de l'algorithme BLASTN (<http://www.blastn.ncbi.nlm.nih.gov>). Après une analyse bioinformatique, les levures ont été identifiées et leurs séquences annotées ont été déposées dans la base de données EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>).

II.2.3.2. Identification des moisissures

L'identification des moisissures fait recours essentiellement aux caractères cultureux et morphologiques et rarement à des propriétés biochimiques. Cela nécessite l'utilisation des milieux standards qui favorisent une bonne croissance et une meilleure expression des caractères à étudier surtout pour les genres suivant : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

II.2.3.2.1. Caractères cultureux

L'observation macroscopique des colonies se développant sur des milieux spécifiques pour l'identification des moisissures (milieu de Czapek, milieu MEA, milieu PDA dont la composition est détaillée en **annexe 2**) à l'aide d'une loupe binoculaire permet d'effectuer une première caractérisation, l'ensemble des caractères à vérifier sont résumés comme suit (Botton et al., 1990) :

- ✓ La vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours)
 - rapide : ≥ 3 cm;
 - modérée: entre 1 et 3 cm;
 - lente: ≤ 1 cm.
- ✓ La texture du thalle (velouté, laineux, poudreux, granuleux, etc.).
- ✓ La couleur du thalle (pigmentation du mycélium, couleur des conidies).

- ✓ Couleur du revers de la culture et la présence d'un pigment diffusible dans le milieu.
- ✓ L'exsudat (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).
- ✓ La présence ou l'absence des structures de fructifications.

II.2.3.2.2. Caractères morphologiques

L'étude des caractères morphologiques se fait par une observation microscopique du thalle : absence ou présence de cloisons, les conidiophores, les conidies, le mode d'implantation des cellules conidiogènes, les spores et leurs aspects (**Botton et al., 1990**).

II.2.3.2.2.1. Coloration

L'observation microscopique des moisissures ne nécessite pas une coloration, cependant l'utilisation de certains colorants (bleu coton et lactofuchsine) peut améliorer la qualité du contraste ou mettre en relief certains détails structurels notamment les spores et le cloisonnement des hyphes (**Botton et al., 1990**).

II.2.3.2.2.2. Montage du matériel à examiner et observation

L'observation microscopique des moisissures se fait par la technique « du drapeau de Roth ou du scotch » (**Figure 18**). La face adhésive d'un petit morceau d'un papier adhésif transparent, est déposée sur la surface de la colonie fongique cultivée dans une boîte de Petri. Ce contact permet de prélever du mycélium et des spores. La face adhésive du papier est ensuite appliquée sur une lame dans une surface sèche et propre en évitant la formation des bulles d'air. Pour augmenter le contraste, une goutte de colorant (bleu coton ou lactofuchsine) est déposée sur la lame avant d'y accoler le papier adhésif (**Botton et al., 1990**). Dans le cas des moisissures à conidiogènes abondantes comme *Aspergillus* et *Penicillium*, le grand nombre des spores peut gêner l'observation d'où l'importance de leur élimination en effectuant des lavages successifs à l'aide d'alcool (70%) et dans l'eau. L'observation se réalise à différents grossissements jusqu'à l'émersion.

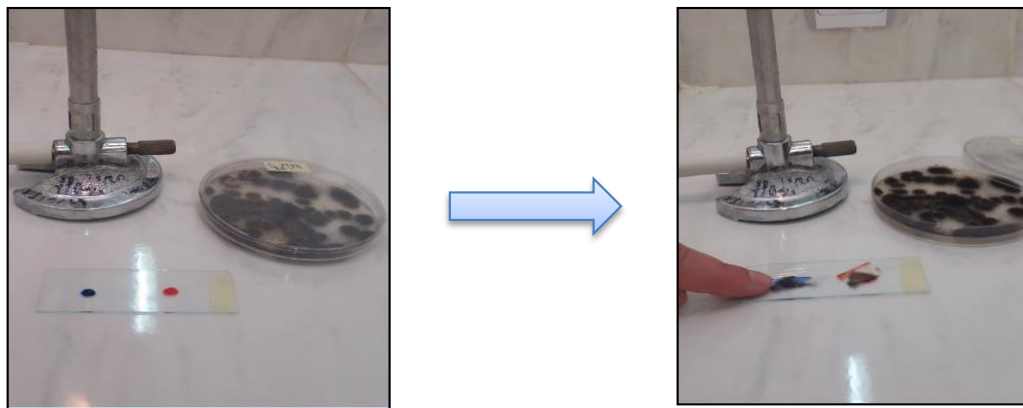


Figure 18: Technique du drapeau de Roth (originale).

II.2.4. Valorisation des sous-produits agricoles pour la production des biosurfactants

Notre travail consiste à utiliser plusieurs milieux de cultures issus des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire.

II.2.4.1. Milieu de culture à base de jus de datte

Le matériel végétal utilisé est constitué des dattes récoltées à partir des palmiers dattiers dans la région du Biskra. Elles sont caractérisées par une forme plus ou moins allongée, une couleur jaune orangée et une texture sèche voir dure. Ce choix a été orienté par sa faible valeur marchande, sa richesse en sucre et sa disponibilité. Les dattes ont été triées naturellement (élimination de celles qui sont infestées). Après dénoyautage, les pulpes ont été découpées en petits morceaux, ensuite ces derniers sont immergés dans de l'eau distillée à raison de 100 g/L de pulpe fraîche préparée et le tout est porté au bain marie à 80 °C pendant 45 min sous agitation continue. Le mélange est ensuite filtré à travers une passoire munie d'une gaze (**Kebbouche-Gana et al., 2013**). Le milieu de culture à base de jus de datte est préparé selon le protocole établi dans la **Figure 19**.



Figure 19 : Protocole de préparation du milieu de culture à base de jus de datte.

II.2.4.2. Milieu à base de lactosérum

Le lactosérum est un liquide jaune pâle généré après la coagulation du lait lors de la fabrication du fromage. Sa composition chimique varie considérablement d'un lait à un autre selon la source du lait, les traitements chimiques et les procédés de fabrication (**Banat et al., 2014**). Il

représente un milieu potentiel pour la production des biosurfactants, car il est composé de taux élevés de lactose, de protéines, d'acides organiques et de vitamines pouvant servir comme sources de carbone et sources d'azote pour les microorganismes **(Rodriguez et al., 2006)**. Le lactosérum utilisé dans cette étude est obtenu à partir de la laiterie LFB Boudouaou, il a été transporté au laboratoire dans une glacière et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation. La préparation de milieu de culture à base de lactosérum est récapitulée dans la **figure 20**.

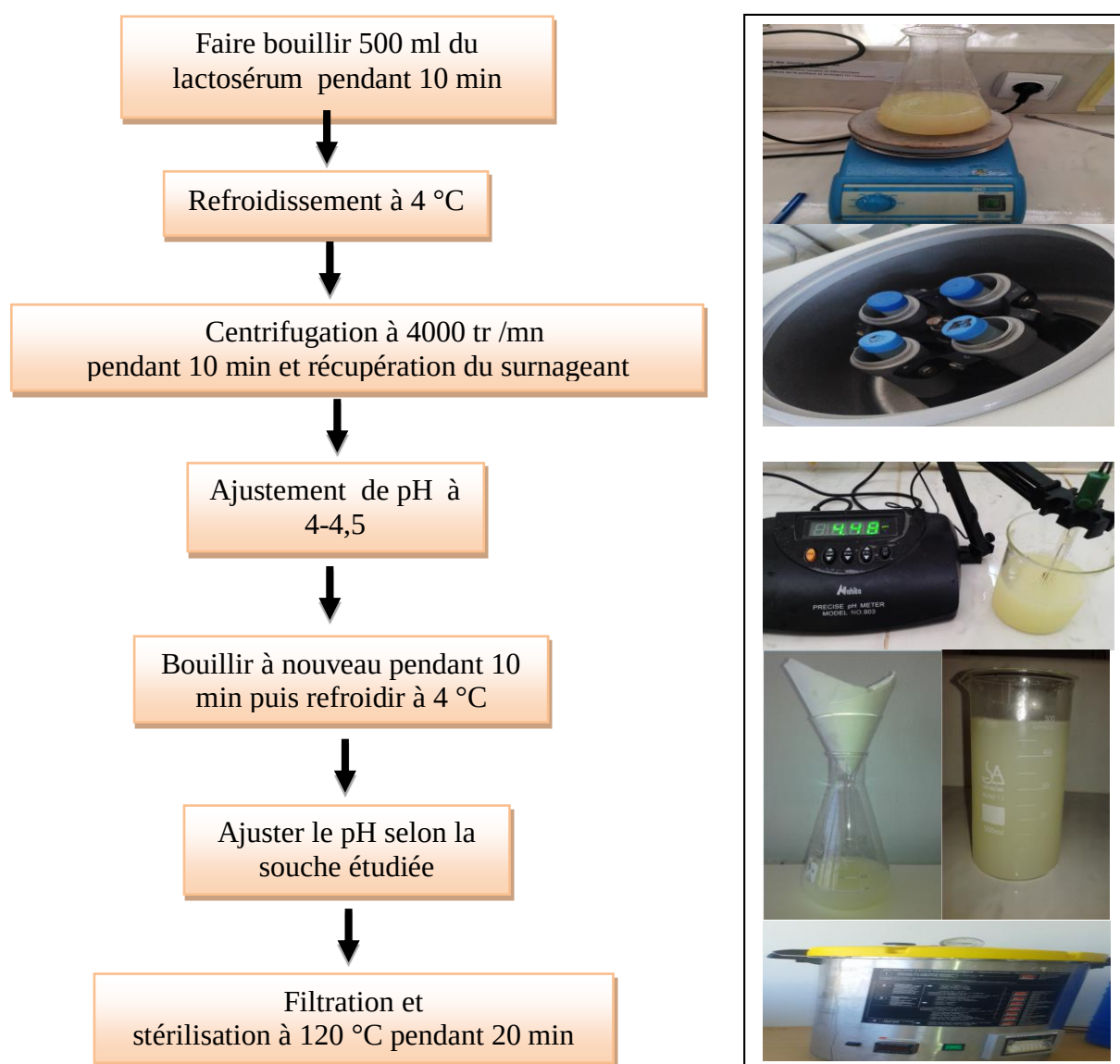


Figure 20 : Protocole de préparation du milieu de culture à base du lactosérum **(Dubey et Juwarker, 2001)**.

II.2.4.3. Milieu de culture à base de la liqueur de trempe de maïs ou CSL

L'agro-industrie des produits à base de maïs génère à la fois des sous-produits solides et liquides, qui deviennent une source de contamination et nuisent à l'environnement. La liqueur de maïs est un sous-produit de lavage et du trempage des graines de maïs ainsi que le fractionnement en amidon. Ce sous-produit se compose de 40% de matière sèche, 21% à 45% de protéines, 20% à 26% d'acide lactique, environ 8% de cendres (contenant Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , etc.), environ 3% des glucides et une faible teneur en matières grasses (0,9% à 1,2%) (**Banat et al., 2014**). Le CSL utilisé dans cette étude est obtenu à partir de l'amidonnerie de Meghnia, il a été transporté au laboratoire dans une glacière et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation.

Les étapes de préparation du milieu à base de CSL sont présentées dans la **Figure 21** :

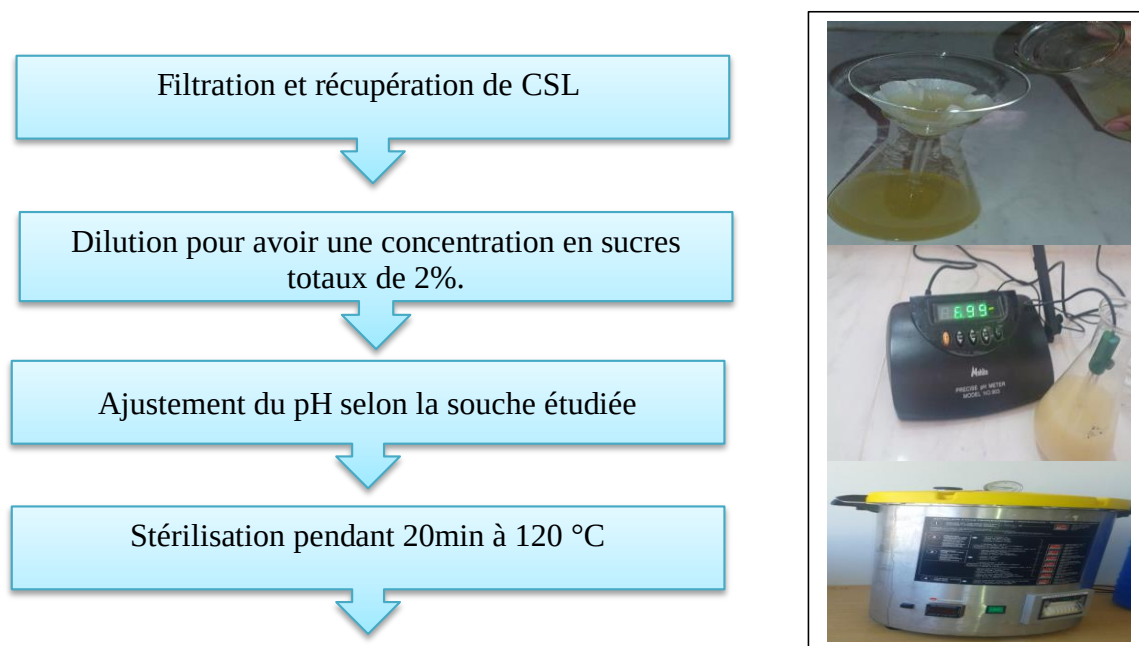


Figure 21: Protocole de préparation du milieu de culture à base de CSL.

II.2.4.4. Milieu de culture à base des margines et des grignons d'olives

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile d'olive, elle génère deux résidus: l'un liquide (les margines) et l'autre solide (les grignons). Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire avec une forte odeur d'olive et un aspect trouble (**Dermeche et al., 2013**). Ces effluents comprennent deux fractions, l'une insoluble (matière organique 64,6%), est essentiellement constituée de pulpes d'olives,

l'autre soluble et contient les sucres (12%), les lipides (4,2%), les sels minéraux (7,2%) et les composés phénoliques (2,2%).

Les margines utilisées ont été prélevées dans une huilerie moderne de la région de Bouira.

Ces margines ont été utilisées telles qu'elles sans traitement juste diluées de telle sorte à avoir une concentration en sucres totaux de 2%, ensuite filtrées et stérilisées pendant 20 min à 120 °C. Les grignons d'olives sont les résidus solides ou pâteux générés de l'extraction de l'huile d'olive après le premier pressage des olives, ils sont composés de peaux, de résidus de pulpe et de fragments des noyaux. Ces résidus sont riches en matière organique, ils contiennent en moyenne 28,5% d'eau, 41,5% de coque, 21,5% de pulpe et 8,5% d'huile constituant un bon milieu pour la croissance des microorganismes (**Saharan et al., 2011**).

Le milieu à base de grignons d'olives est préparé comme suit (**Figure 22**) :



Figure 22 : Protocole de préparation de milieu de culture à base des grignons d'olives.

II.2.4.5. Milieu de culture à base de la mélasse

La mélasse est un sous-produit des industries de la fabrication de sucre à partir de la canne à sucre et de la betterave. Elle se présente comme un résidu sirupeux, pâteux visqueux, de coloration brune noirâtre. Ce substrat bon marché contient 75% de matière sèche, 9-12% de matière organique non sucrée, 2,5% de protéines, 1,5-5,0% de potassium et environ 1% de calcium, de magnésium et de phosphore. D'autres composants tels que la biotine, l'acide pantothénique, l'inositol et la thiamine de 1 à 3% sont également présents, ce qui lui donne un aspect épais brun foncé. La teneur élevée en sucre, comprise entre 48 et 56%, représente un bon substrat pour la croissance, ainsi que la production de composés bioactifs microbiens pour divers microorganismes (**Archimède et al., 2011**). La mélasse utilisée dans notre étude provient du groupe Cevital de Béjaïa, elle a été utilisée telle qu'elle-sans traitement juste diluée d'une sorte à avoir une concentration en sucres totaux de 2%.

II.2.5. Optimisation des conditions de culture et de la composition du milieu pour la production des biosurfactants

En se basant sur les résultats de criblage, toutes les études qui vont suivre ont été réalisées uniquement pour quatre souches deux levures et deux moisissures, en raison de leurs potentiels intéressants de production des biosurfactants et leurs caractéristiques physiologiques intéressantes. L'optimisation des conditions de culture et de la composition du milieu pour la production des biosurfactants a été menée dans une série d'expériences qui consiste à changer un facteur à la fois, tout en maintenant les autres facteurs et ainsi de suite pour les quatre souches sélectionnées. Différents facteurs environnementaux ont été choisis tels que: la température (25, 28, 30, 32, 35, 37, 40, 42 et 45 °C), le pH (2 à 8). L'effet des facteurs nutritionnels a été aussi étudié. Différentes sources de carbone ont été testées comme les sucres (glucose, fructose, saccharose, amidon, lactose) dont la concentration est ajustée à 2% (v/v).

L'effet de la source d'azote a également été étudié, de nombreuses sources d'azote organiques et inorganiques ont été testées comme : l'extrait de levure, l'extrait de viande, la peptone, la tryptone, le sulfate d'ammonium et l'urée, chaque source d'azote ayant été ajustée à 0,2% (v/v). Toutes les expériences ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu de culture stérile YPG liquide inoculé avec 5 ml d'inoculum de 24 h des deux souches de levures et sur le milieu PDB inoculé par une suspension sporale de 10^6 UFC/ml des deux moisissures sélectionnées.

La cinétique de croissance et de production des biosurfactants a été réalisée pendant 72 h à 30 °C et à 200 rpm pour les deux souches levuriennes sélectionnées. Quant aux deux moisissures la cinétique de croissance et de production des biosurfactants a été effectuée pendant 144 h à 25 °C avec une agitation de 150 rpm. Après mises en culture, des aliquotes ont été prélevées pour la détermination de la $DO_{600\text{ nm}}$, la biomasse et l'indice d'émulsification E_{24} .

II.2.6. Production des biosurfactants par fermentation

II.2.6.1. Revivification des souches

La revivification est réalisée dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu de culture YPG liquide pour les levures et PDB liquide pour les moisissures. Les Erlenmeyers sont ensemencés à partir des tubes de conservation et sont incubés dans un agitateur incubateur à 25 °C et 30 °C pendant 48 h et 72 h.

II.2.6.2. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches de levures a été vérifiée par une observation microscopique d'un frottis à l'état frais : à partir d'une culture liquide, on prélève une goutte à l'aide d'une pipette Pasteur, cette goutte est mise entre lame et lamelle et observée au microscope photonique au grossissement $\times 40$ et $\times 100$.

II.2.6.3. Culture en Batch

Les cultures en batch ont été réalisées en Erlenmeyers et en fermenteur, mais avant de les réaliser, il faut tout d'abord effectuer des précultures afin de permettre aux souches de s'adapter au milieu étudié.

II.2.6.3.1. Précultures

Les levures sont réactivées en Erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml de milieu YPG liquide, puis incubées dans un incubateur agitateur pendant 48 h à 30 °C avec une agitation fixée à 150 rpm. Pour les moisissures, une suspension sporale est préparée pour chaque souche dans de l'eau physiologique stérile. Chaque suspension doit avoir une concentration initiale en spore de 10^6 spores/ml. Des précultures sont ensuite effectuées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de milieu PDB. Les précultures sont incubées pendant 72 h dans un incubateur à 25 °C, avec une agitation orbitale fixée à 150 rpm.

La préparation de la préculture se fait en 2 étapes de 48 h ou 72 h et de 24 h, la première préculture a permis l'adaptation de la souche aux conditions du milieu et la seconde a servi d'inoculum.

II.2.6.3.2. Culture en Erlenmeyers

Des cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant 100 ml de différents milieux de culture à base de sous-produits agricoles testés. L'inoculation se fait à partir des précultures réalisées auparavant (**Figure 23**). La température est fixée à 30 °C et l'agitation est réglée à 200 rpm pour les souches levuriennes et 25 °C et 150 rpm pour les deux moisissures. La cinétique de croissance et de production de biosurfactants sur les différents milieux par les quatre souches est réalisée en suivant les paramètres suivants :

La $DO_{600\text{ nm}}$, la biomasse (g/L), l'indice d'émulsification E_{24} (%) et la tension superficielle TS (mN/m).



Figure 23 : Inoculation des différents milieux à base de sous-produits agricoles en vue de culture en batch sur des Erlenmeyers par les 4 souches sélectionnées.

II.2.6.3.3. Culture en fermenteur

Après avoir testé différents milieux de culture à base des sous-produits agricoles, le meilleur milieu qui a permis une bonne croissance, et une bonne production des biosurfactants évaluée

par l'indice d'émulsification E_{24} et la tension superficielle pour chacune des souches a été choisi pour la production en fermenteur (Luna et al., 2013).

La fermentation a été réalisée dans un bioréacteur de type Minifors d'une capacité totale de 2,5L. Ce fermenteur est composé d'une cuve en verre borosilicatée, d'un bloc chauffant et d'une extension thermo bloc; l'ensemble est relié à l'unité de base permettant une configuration et un contrôle de tous les paramètres du bioréacteur à l'aide du panneau de contrôle (Minifors direct digital control (DDC)). La température est réglée par un régulateur balayant d'une gamme de 0 à 60 °C. Le pH est de même contrôlé par un système de régulation automatique contrôlant une pompe péristaltique munie d'une sonde à pH. L'aération du bioréacteur; muni d'un diffuseur d'air fixe est assurée par un compresseur d'air (1 bar) relié à un rotamètre afin de fixer le débit d'air (0-6 v/v/m).

La mesure de la pression partielle de l'oxygène dissous (PO_2) est réalisée à l'aide d'une sonde polarographique Ingold reliée à un oxymètre. L'agitation est assurée par un arbre d'agitation muni de deux agitateurs et relié au moteur du fermenteur (rpm entre 30 et 300) (Figure 24).



Figure 24 : Bioréacteur Minifors 2L (INFORS HT) utilisé pour la production des biosurfactants par les souches sélectionnées.

II.2.6.3.3.1. Préparation du fermenteur

Un fermenteur Minifors d'une capacité de 2,5 L, a été utilisé pour l'étude de la cinétique en culture discontinue dont le volume utile est estimé à 1,6 L. La cuve, préalablement nettoyée, est remplie du volume du milieu requis puis stérilisée avec les périphériques du fermenteur

(flacons de réactifs, système de prélèvement, tête de pompe.... etc.) à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.

II.2.6.3.3.2. Conditions opératoires

Les conditions opératoires de la culture comme la température et l'agitation sont réglées selon la souche étudiée. Le pH est ajusté par l'ajout de la soude NaOH (1N) ou de l'HCl (1N). L'aération est maintenue à 1 v/v/m, et la formation de mousse est contrôlée par l'ajout d'un anti-mousse aseptique sous forme d'octanol.

II.2.6.3.3.3. Inoculation du fermenteur

L'inoculation du fermenteur a été réalisée à l'aide d'une aiguille perce septum. Le flacon contenant l'inoculum sous forme de préculture jeune est alors transvasé dans la cuve par surpression à l'aide d'une seringue connectée au filtre du flacon. Le volume de l'inoculum constitue 10% du volume utile. La suspension microbienne est pure, jeune âgée de 24 h et sa densité optique à 600 nm est comprise entre [2-3]. Et pour les moisissures la cuve est inoculée avec une suspension sporale pure à une concentration de 10^6 spores/ml. La conduite de fermentation en batch est schématisée dans la **Figure 25**.

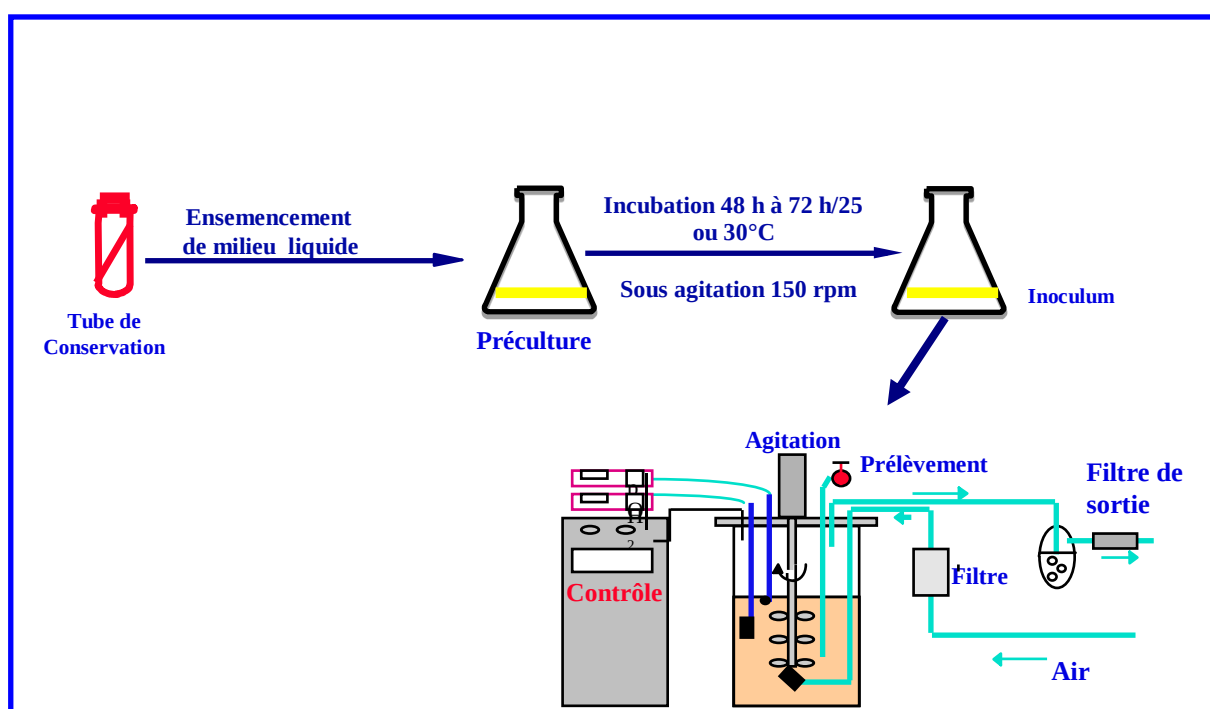


Figure 25 : Schéma du principe d'une culture en batch.

II.2.6.4. Méthodes analytiques

Le suivi de la cinétique de croissance a été fait par le contrôle régulier des paramètres suivants: L'estimation de la biomasse, le dosage des sucres réducteurs, la mesure de pH, le calcul de l'indice d'émulsification et le suivi de la tension superficielle.

II.2.6.4.1. Estimation de la biomasse

Le suivi de l'évolution de la biomasse durant la période de fermentation a été effectué par deux méthodes différentes. Ces méthodes apportent des informations complémentaires et leur combinaison augmente la fiabilité des résultats obtenus.

II.2.6.4.1.1. Spectrophotométrie (Turbidimétrie)

Les mesures ont été réalisées sur des échantillons de culture à t_0 et après chaque 4 heures jusqu'à atteindre la phase de déclin de la croissance des levures en utilisant des cuves en quartz de 2 mm de trajet optique (Zaccanti et al., 2003).

II.2.6.4.1.2. Méthode gravimétrique (Poids sec)

La matière sèche a été déterminée par centrifugation de 10 ml de moût de fermentation à 5000 × g pendant 20 min. Après rinçage à l'eau physiologique, le culot est récupéré dans un creuset préalablement tarée, puis séché à 105 °C pendant 24 h, puis pesé (Li et de Orduña, 2003).

Tandis que le surnageant est gardé pour le dosage des sucres. Les valeurs de la matière sèche (X) sont obtenues par la formule suivante :

$$X = \frac{P_1 - P_2}{V}$$

Avec : **P₁** : Poids du creuset + biomasse.

P₂ : Poids du creuset vide

V : Volume de l'échantillon prélevé

La biomasse sèche (X) est exprimée en (g/L).

II.2.6.4.2. Dosage des sucres réducteurs

La concentration des sucres totaux présents dans les échantillons prélevés au cours des fermentations est déterminée par la méthode décrite par **Dubois et al. (1956)**. Les sucres et leurs dérivés méthyles, les oligosaccharides et les polysaccharides réagissent avec le phénol et l'acide sulfurique concentré et donnent une coloration jaune orange qui peut rester stable pendant plusieurs heures. L'intensité de la coloration a une corrélation avec la concentration en sucres. La densité optique est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'onde de 492 nm. Le protocole détaillé ainsi que la courbe d'étalonnage sont donnés dans l'**annexe 4-A**.

II.2.6.5. Evaluation de la production des biosurfactants

La production des biosurfactants par les quatre souches sélectionnées a été évaluée par le calcul de l'indice d'émulsification E_{24} comme décrit précédemment et aussi par la mesure de la tension superficielle par la méthode décrite par **Pallas et Pethica (1983)**.

II.2.6.5.1. Suivi de la tension superficielle

L'activité de surface de tous les échantillons prélevés à partir des cultures durant la période de la fermentation est testée en mesurant la tension superficielle par la méthode de l'anneau de DuNouy (**Pallas et Pethica, 1983**), à l'aide d'un tensiomètre digital Gibertini, Italy. Cette méthode est basée sur l'interaction d'un anneau en platine avec la solution à tester. Les résultats sont exprimés en mN/m.

II.2.7. Localisation des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules qui peuvent être extracellulaires libérées directement dans le milieu de production ou intracellulaires attachées à la surface cellulaire. C'est pour cette raison, nous avons réalisé cette manipulation dont l'objectif est de localiser les biosurfactants produits par les souches sélectionnées.

A partir d'une culture microbienne de chaque souche, on prélève 20 ml de moût de fermentation, on effectue une centrifugation à $5000 \times g$ pendant 20 min et on récupère 3 ml du surnageant. Chacun des surnageants est ajouté à 3 ml d'un hydrocarbure (gasoil), le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant 2 à 3 min, puis on calcule l'indice d'émulsification (E_{24}). S'il y a une émulsion, cela indique que le biosurfactant produit est extracellulaire, en cas d'absence de l'émulsion, cela indique que les biosurfactants sont intracellulaires.

II.2.8. Extraction des biosurfactants

Au cours de cette étude, nous avons utilisé plusieurs protocoles d'extraction des biosurfactants, on cite ceux de **Sarrubo et al. (2006)** ; **Sobrinho et al. (2008)** ; **Wadekar et al. (2012)**, mais l'on retient uniquement celui de **Sobrinho et al. (2008)** avec quelques modifications.

Pour extraire les biosurfactants du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les microorganismes du milieu de culture par centrifugation.

Le bouillon de culture a été centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée à 10000 tr/min pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant obtenu a été filtré à travers un filtre de 0,2 µm, ensuite le pH du surnageant filtré a été ajusté à 2 en utilisant une solution d'acide chlorhydrique HCl 1N, puis, il a subi une précipitation acide à 4 °C pendant une nuit. Le surnageant obtenu a été extrait trois fois avec un mélange d'acétate d'éthyle et du méthanol 2/1 (v/v) , par une méthode d'extraction liquide-liquide, en secouant vigoureusement et en laissant les deux phases se séparer dans une ampoule à décanter pendant 24 h. La phase organique est récupérée, filtrée sur papier filtre contenant du sulfate de sodium anhydre qui permet d'éliminer les contaminants hydrophiles et les traces d'eau résiduelles, puis évaporée en utilisant un évaporateur rotatif à 40 °C.

Les solvants ont été évaporés en laissant un biosurfactant brut sous forme d'une matière visqueuse de couleur brune. Le concentré est ensuite lyophilisé. Le protocole d'extraction est récapitulé dans la **Figure 26**.

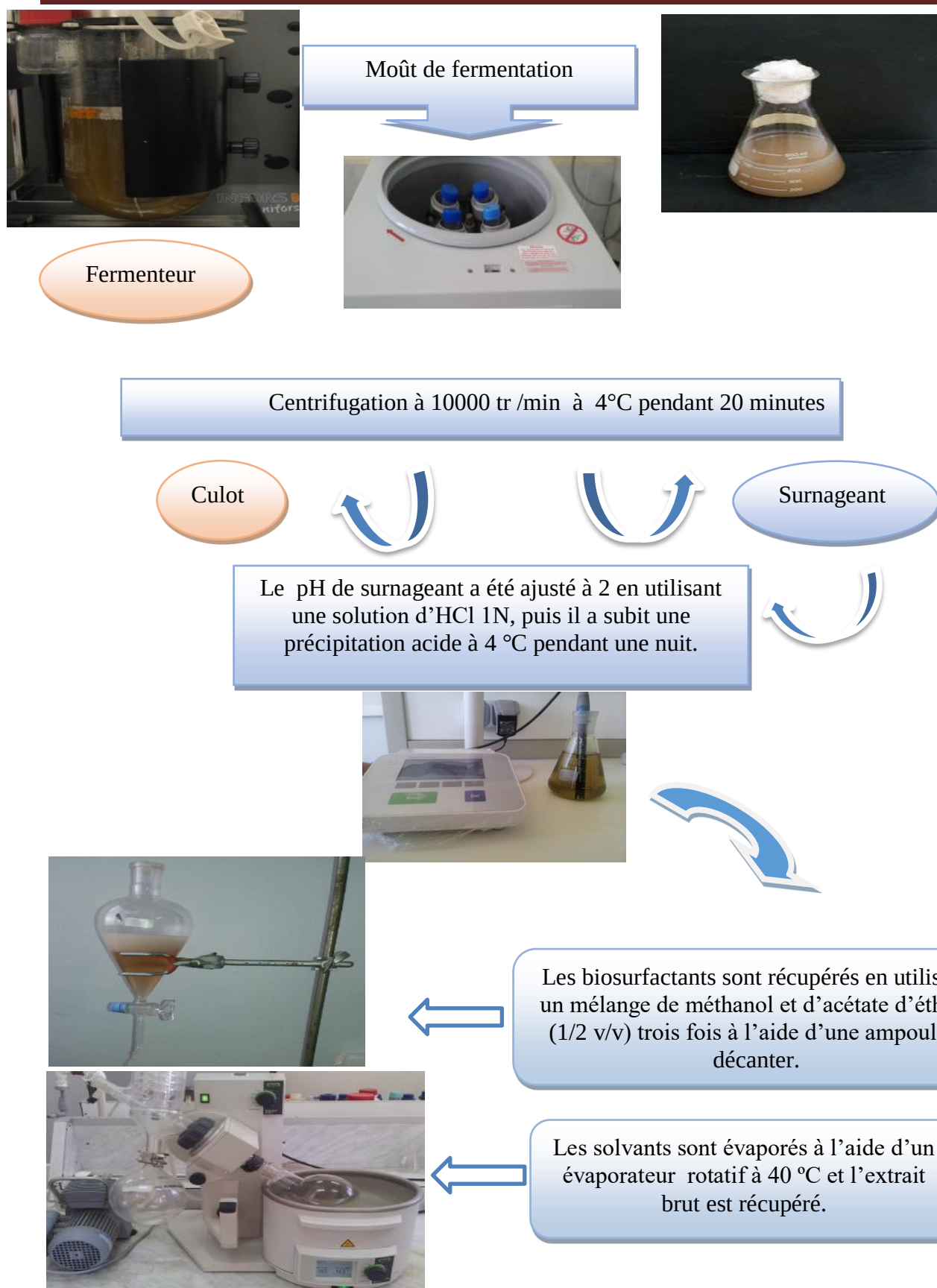


Figure 26 : Protocole d'extraction des biosurfactants produits (Sobrinho et al., 2008, modifié).

II.2.9. Semi-purification des biosurfactants

Les biosurfactants sont semi-purifiés en utilisant la chromatographie préparative sur couche épaisse de gel de silice (**Qazi et al., 2014 ; Sen et al., 2017**). Les extraits bruts des souches sélectionnées sont semi-purifiés, afin d'éliminer le maximum des impuretés. Les plaques utilisées sont de type gel de silice 60A (Merck). Elles ont été activées à 120 °C avant d'être utilisées. Environ 40 à 50 µL de chaque extrait concentré sont déposés et ensuite développés dans le système solvant (chloroforme-méthanol-eau distillée, 80/18/2 v/v/v). Les parties de gel de silice correspondant aux bandes actives visualisées sous lumière UV sont grattées et mises dans 20 ml de méthanol afin de désorber les biosurfactants. Les mélanges sont mis sous agitation permanente pendant 30 min, à température ambiante, et la silice est éliminée par filtration sur verre fritté n° 4. Ensuite, les mélanges sont testés pour les activités de surface en utilisant le test qualitatif du drop collapse.

II.2.10. Caractérisation des biosurfactants produits

II.2.10.1. Chromatographie sur couche mince

Nous avons procédé à la caractérisation des biosurfactants présents dans les fractions actives issues de la chromatographie préparative par chromatographie sur couche mince.

La phase stationnaire, solide et polaire, est constituée de gel de silice. La phase mobile, quant à elle, est un mélange de solvants organiques de polarités différentes.

➤ Systèmes solvants

Les biosurfactants ont été séparés en utilisant différents systèmes solvants (**Kiran et al., 2009, modifié**):

Acétone/acide acétique/eau (70/20/10) pour la séparation des acides aminés.

Chloroforme/méthanol/eau (60/30/10) pour les glucides.

Chloroforme/méthanol/eau (65/25/10) pour les lipides.

➤ Dépôt

On dépose 10 µl à 2 cm du bord inférieur de la plaque puis on procède au séchage de la plaque.

➤ Développement des plaques

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera

plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

➤ Révélation

La révélation des spots obtenus se fait par les mélanges suivants (**Lee et al., 2008**):

Les constituants peptidiques ont été visualisés par vaporisation de la ninhydrine (0,5 g de ninhydrine dans 100 ml d'acétone) sous formes de tâches de couleur bleu-violacée.

Le réactif de Molisch (2 g d'alpha naphtol dans 5 ml d'acide sulfurique mélangé à 95 ml d'éthanol) est pulvérisé pour la détection des composés glucidiques sous forme de tâches rouges-violacées. La visualisation des composés lipidiques est réalisée par exposition de la plaque aux vapeurs d'iode. Ces derniers ont été détectés sous forme de tâches brunes sur les plaques de CCM. Tous les solvants organiques utilisés sont d'une grande pureté (Sigma-Aldrich, Germany). Après pulvérisation avec les réactifs, les plaques ont subi un chauffage à 100 °C pendant 5 min. Après la révélation, les tâches visibles sont rapidement délimitées afin de calculer les rapports frontaux (R_f) (**Figure 27**). Ces derniers sont obtenus par la formule suivante :

$$R_f = X / Y$$

Tel que :

X : Distance entre la ligne de dépôt et le centre de la tâche (cm).

Y : Distance entre la ligne de dépôt et le front de migration (cm).

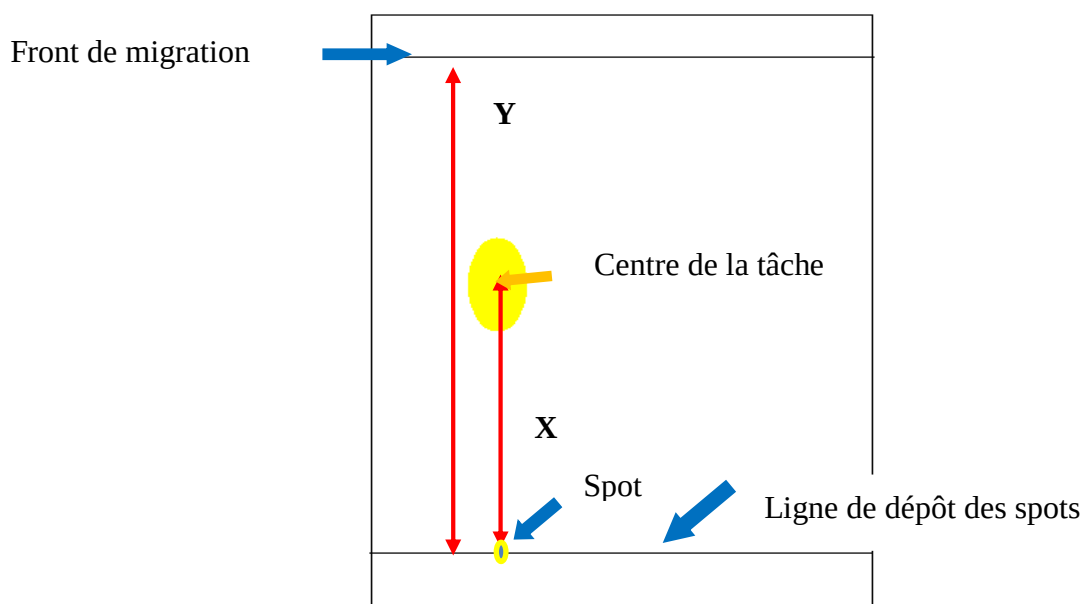


Figure 27 : Schéma de calcul d'un rapport frontal

II.2.10.2. Analyses spectrophotométriques

II.2.10.2.1. Dosage des protéines

La concentration des protéines présentes dans les extraits est déterminée par la méthode de **Bradford (1976)**. L'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée comme étalon standard. La mesure de la densité optique se fait à 595 nm. Le protocole détaillé ainsi que la courbe d'étalonnage sont donnés dans l'**annexe 4-B**.

II.2.10.2.2. Dosage des sucres totaux

La concentration des sucres totaux présents dans les éluats obtenus lors de la chromatographie sur couche mince est déterminée par la méthode de **Dubois et al. (1956)**, précédemment décrite en utilisant le glucose comme standard. La courbe d'étalonnage est donnée dans l'**annexe 4-A**.

II.2.10.2.3. Dosage des lipides totaux

La concentration des lipides totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique à la sulfo-phospho-vanilline décrite par **Goldsworthy et al. (1972)**, en utilisant l'huile d'olive comme standard. Le protocole détaillé et la courbe d'étalonnage sont donnés dans l'**annexe 4-C**.

II.2.10.3. Analyse par spectroscopie (IRTF)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est utilisée pour explorer les groupes fonctionnels et pour identifier les types de liaisons chimiques présentes dans un mélange inconnu. 1 mg de biosurfactant partiellement purifié a été complètement séché dans un lyophilisateur et ensuite broyé avec 100 mg de KBr et pressé pendant 30 secondes pour obtenir des pastilles translucides. Puis analysé dans un IRTF (Perkin-Elmer Spectrum RX1, Shelton, Connecticut). Les spectres d'absorption infrarouge des échantillons ont été mesurés dans la gamme de 400 à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} (**Gartshore et al., 2000**).

II.2.11. Stabilité des biosurfactants produits

L'effet de différents paramètres physicochimiques tel que le pH, la température et les concentrations de NaCl sur les émulsions et l'activité de surface des biosurfactants produits par les quatre souches sélectionnées est étudié. Cette étude est réalisée en suivant les protocoles décrits par **Sarrubo et al. (2006)** ainsi que **Luna et al. (2016)**. Des études de stabilité ont été réalisées en utilisant les surnageants des cultures des quatre souches, obtenus après centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. L'effet du pH a été étudié sur une gamme allant de

2 à 12 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 2N ou d'une solution de KOH 2N.

L'effet de la température a été étudié par chauffage du surnageant à haute température (60 °C - 100 °C) pendant 1 heure et également en mettant le surnageant à basse température (4 °C). L'effet de l'ajout de chlorure de sodium (NaCl) à des concentrations allant de 1 à 10% a également été étudié. 3 ml de gasoil sont ajoutés à chaque surnageant, et les tubes sont vortexés pendant 2 à 3 min, et les indices d'émulsifications sont calculés après 1 heure et après 24 h. La stabilité des biosurfactants produits est estimée également par la mesure de la tension superficielle (TS) de chaque surnageant après chaque traitement.

II.2.12. Propriétés des biosurfactants produits

II.2.12.1. Etude de l'aspect de l'émulsion

Afin de déterminer sa taille et l'uniformité des gouttelettes dans le gasoil, une goutte de l'émulsion formée par le surnageant de chaque souche et le gasoil est déposée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle et observée au microscope optique avec grossissement $\times 40$. Cette émulsion est comparée à l'émulsion formée par les deux témoins positif et négatif (SDS et eau distillée).

II.2.12.2. Tension superficielle

La TS des extraits bruts des biosurfactants est mesurée par la méthode de Ring ou anneau de DuNouy, à l'aide d'un tensiomètre digital Gibertini, Italy.

II.2.12.3. Concentration micellaire critique

La CMC est la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 mN/m en solution aqueuse). Cette concentration est déterminée à la température de 25 ± 1 °C par la mesure de la TS en fonction des différentes concentrations des extraits obtenus après leurs dilutions successives dans l'eau déminéralisée, puis en traçant la courbe de la TS en fonction des concentrations des solutions du biosurfactant brut. La concentration du biosurfactant, au-delà de laquelle la tension de surface ne change pas, est définie comme étant la CMC. La CMC est le point d'intersection de deux courbes, déterminée graphiquement par l'utilisation d'une linéarisation de la transformation logarithmique des concentrations et de celle de la tension superficielle mesurée (Luna et al., 2013 ; 2016).

II.2.13. Essais d'applications des biosurfactants produits

II.2.13.1. Récupération assistée de pétrole à partir d'un échantillon du sable contaminé

Le potentiel des biosurfactants bruts produits par les souches sélectionnées à améliorer la récupération assistée de pétrole a été évaluée par la méthode décrite par **Sobrinho et al. (2008)**. Une masse de 250 g d'un échantillon du sable prélevé à partir d'une plage à Boumerdès. 60 g de cet échantillon du sable ont été imprégnés avec 5 ml de pétrole brut. Des fractions de 20 g du sable contaminé ont été transférées dans des Erlenmeyers de 250 ml, et ont été soumises aux traitements suivants: addition de 40 ml d'eau ultra-pure (contrôle négatif) ; 40 ml des solutions des biosurfactants bruts des souches sélectionnées ; 40 ml d'une solution aqueuse de SDS (0,2304%, m/v) ; 40 ml de Tween 80 (0,0016%, m/v) et 40 ml de Tween 20 (0,05%, m/v) (**Hentati et al., 2016**). Les différentes solutions des biosurfactants bruts et des surfactants chimiques ont été préparées à la CMC. Par la suite, les échantillons ont été incubés dans un agitateur rotatif (150 rpm) pendant 24 h à 27 °C, puis centrifugés à 10 000 g pendant 15 min pour la séparation des surnageant et du sol.

La quantité de pétrole brut dans l'échantillon de sable après lavage avec les biosurfactants a été mesurée par gravimétrie après extraction par hexane et évaporation du solvant selon l'équation suivante :

$$\text{Le pétrole brut enlevé (\%)} = (O_i - O_r) / O_i \times 100$$

Tel que :

O_i est la quantité initiale de pétrole brut en g avant le lavage

O_r est la quantité de pétrole brut restante après le lavage

II.2.13.2. Activité antimicrobienne des extraits bruts des biosurfactants

II.2.13.2.1. Souches tests

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne, vis-à-vis de huit souches microbiennes, 6 souches bactériennes Gram- et Gram+ et 2 souches fongiques *Candida albicans* ATCC 549 et *Aspergillus niger* ATCC19404, a été réalisée avec l'extrait brut des biosurfactants préparés à la CMC. Les souches tests ont été obtenues au niveau du laboratoire de Bactériologie Médicale du C.H.U. Mustapha Pacha (Alger), elles sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC). (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

27893, *Salmonella typhi* ATCC 43300, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumonia* ATCC 4352, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 549 et *Aspergillus niger* ATCC19404).

II.2.13.2.2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Un inoculum est réalisé à partir des cultures de 24 h pour chaque bactérie, mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile de telle manière à obtenir une densité optique comprise entre 0,1 à 0,2 à 620 nm (approximativement 10^6 UFC/mL). La technique de diffusion des disques sur gélose est réalisée selon la méthode décrite par **Rufino et al. (2011)**. Des disques de papier filtre stériles (4 mm de diamètre, Whatman N° 3) sont imprégnés dans 20 µL de l'extrait brut de biosurfactant préparé à la CMC pour chaque souche, les disques témoins reçoivent 20 µL de l'eau distillée. Après séchage sous courant d'air chaud les disques sont déposés sur les boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu PDA pour les espèces fongiques, préalablement ensemencés par écouvillons avec les souches tests (**Abalos et al., 2001**).

Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes sont laissées 2 h à 4 °C. La lecture des résultats est réalisée après 24 h pour les bactéries et la levure et 72 h pour la moisissure. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif (**Abalos et al., 2001**).

II.2.14. Data

Toutes les expériences ont été menées en triplicata et les données ont été présentées en valeurs moyennes $\pm$ l'écart-type.

Résultats
et discussion

La première partie de ce travail de recherche a été consacrée à l'isolement des levures et des moisissures productrices des biosurfactants à partir de différents biotopes. Cette étape est la plus importante et elle est primordiale au cours d'un processus biotechnologique, elle nous permet d'obtenir des microorganismes producteurs des biosurfactants, pouvant présenter des caractéristiques innovantes et intéressantes.

III.1. Isolement des souches fongiques

Dans un premier lieu, nous avons procédé à l'isolement des levures et des moisissures à partir de différents échantillons y compris des produits alimentaires (fruits et produits laitiers) et des échantillons de sable, d'eau de gisement et de boue de forage provenant de Sahara Algérien. Ainsi, nous avons pu isoler une centaine des levures et une quarantaine des moisissures.

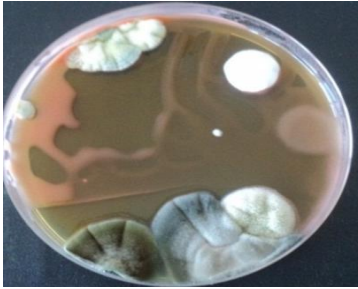
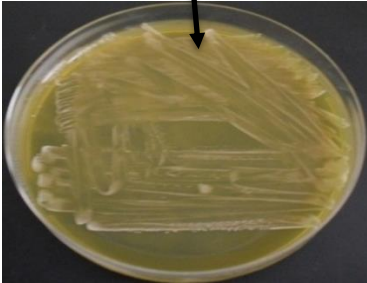
Les levures sont isolées sur milieux gélosés Sabouraud et OGA tandis que les moisissures sont isolées sur les milieux PDA et MEA (la composition des milieux se trouve dans l'**annexe 2**).

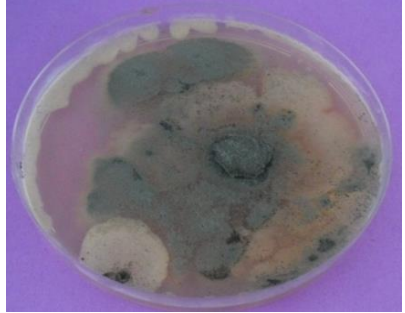
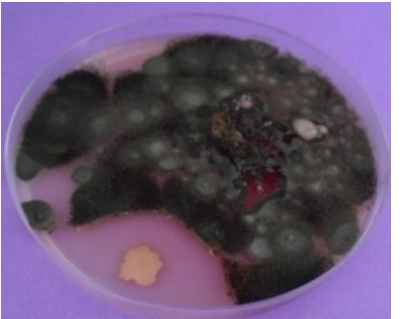
Les colonies de levures ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent lisses, rugueuses, pigmentées ou non, adhérent à la gélose, rondes à contour régulier ou irrégulier et présentent des tailles différentes moyennes, petites ou grosses. Les colonies bien distinguées ont été purifiées par repiquage sur le milieu OGA et incubées à 30 °C pendant 48 h.

Les colonies de moisissures ont été également reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Les moisissures forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses, de couleurs variées, les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant au violet ou le bleu, le vert, le brun allant au noir et le relief des colonies peut être plat ou plissé avec présence ou absence de plis radiaires. Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage sur le milieu PDA et incubées à 25 °C pendant 7 jours. Les isolats purifiés sont désignés selon des codes composés de lettres (FS pour les moisissures qui signifie souche fongique et Y pour les levures suivi de l'initiale de l'échantillon d'isolement) et des numéros donnés aux souches isolées.

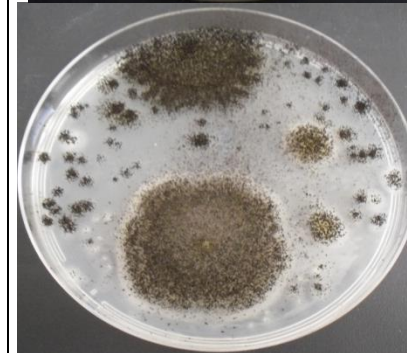
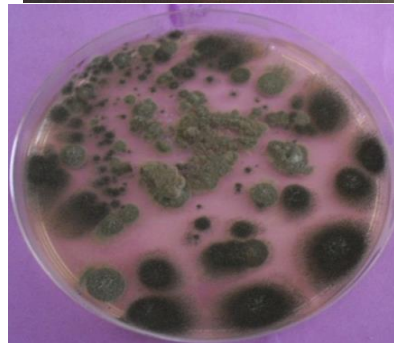
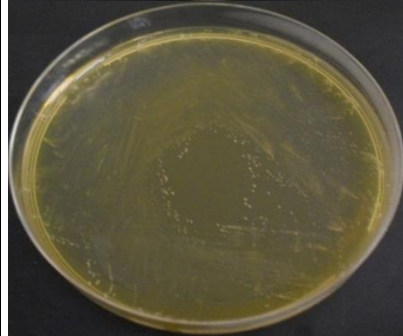
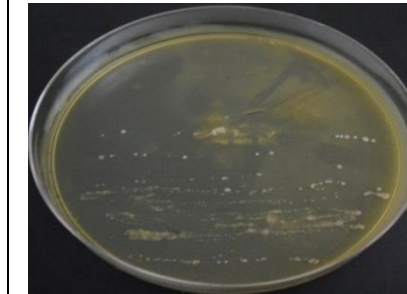
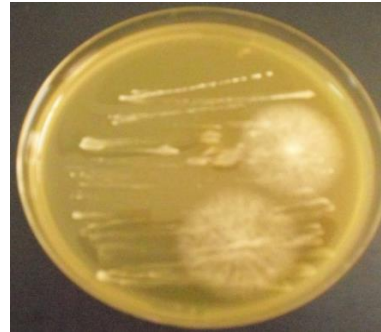
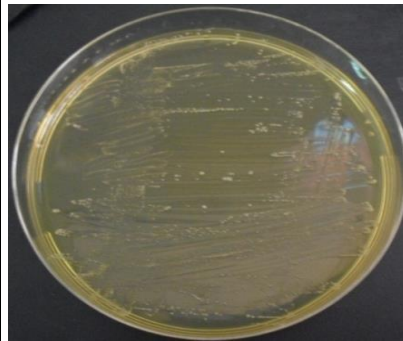
Le **Tableau 9** représente quelques isolats fongiques obtenus à partir des différents biotopes étudiés.

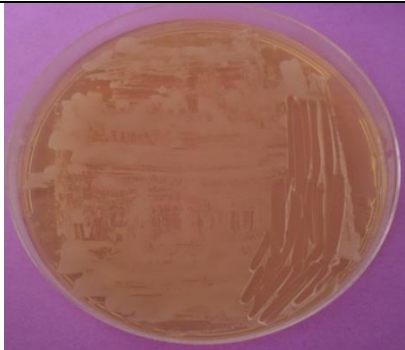
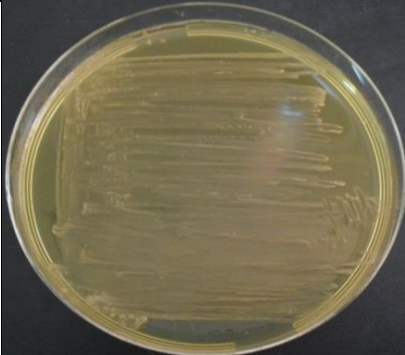
Tableau 9 : Présentation de quelques isolats fongiques obtenus à partir des différents biotopes étudiés.

Origine d'isolement	Photos d'isolement		
Echantillons de Sable	 Colonies des moisissures		
			Colonies des levures 

Echantillons de la boue de forage			
Echantillons d'eau de gisement	 	 	 

Fruits



				
Produits laitiers				
				

La population des espèces fongiques dépend considérablement du biotope et donc des éléments nutritifs utiles à leur survie (**Johansen et al., 2019**). Ainsi, nous avons pu isoler 100 isolats levuriens dont la répartition est comme suit : 45 isolats à partir des différents fruits, 24 isolats à partir des échantillons de sables, 13 isolats à partir des produits laitiers, 13 isolats à partir de la boue de forage et 05 isolats à partir des eaux de gisement. Quant aux moisissures, nous avons pu isoler 43 isolats dont la répartition est comme suit : 15 isolats à partir des fruits, 15 isolats à partir des échantillons de sables, 06 isolats à partir des produits laitiers, 05 isolats à partir des eaux de gisement, et 2 isolats à partir de la boue de forage.

Les levures et les moisissures sont largement distribuées dans la nature et leur aspect ubiquitaire est encore une fois confirmé par leurs présences dans les différents échantillons prospectés dans la présente étude. En effet, elles représentent une part notable de la flore microbienne des fruits, des produits laitiers et des différents échantillons provenant de sites contaminés par les hydrocarbures du Sahara Algérien, où elles sont susceptibles de participer aux différentes modifications biochimiques et à la dégradation des matières organiques qui sont à l'origine de changement de la saveur et de l'arôme des fruits et des produits laitiers (**Botton et al., 1990 ; Nicklin et al., 2000 ; Kurtzman et al., 2011 ; Starmer et Lachance, 2011 ; Johansen et al., 2019**).

Parmi les facteurs physicochimiques qui affectent l'écologie des espèces fongiques, les sources d'énergie, les nutriments, la température, le pH et l'activité de l'eau (**Botha, 2011**). En outre, les levures capsulées, les formes sporulantes et les moisissures peuvent survivre mieux dans les habitats pauvres en aliments que les autres formes. De même, elles arrivent à résister dans le sol en raison de leur grande tolérance pendant les périodes de dessiccation et aux températures élevées (**Starmer et Lachance, 2011**).

III.2. Criblage des isolats producteurs des biosurfactants

Pour déterminer la capacité des différents isolats fongiques à produire les biosurfactants, nous avons procédé à un criblage par différentes méthodes à savoir ; le test d'émulsification E₂₄, la technique de drop collapse, le test de déplacement de l'huile et la recherche de l'activité hémolytique, afin de sélectionner les souches les plus performantes. Les résultats du criblage effectué sur 143 souches fongiques (100 levures et 43 moisissures) isolées à partir des différents biotopes en Algérie sont représentés dans les **Tableaux 10 et 11**, pour les levures et les moisissures, respectivement.

L'utilisation d'une combinaison de différentes méthodes pour le criblage est nécessaire pour une détection efficace et simultanée des microorganismes importants en terme de production des biosurfactants (**Youssef et al., 2004 ; Satpute et al., 2008 ; Thavasi et al., 2011**).

Parmi les 100 isolats de levures obtenus, les résultats de calcul d'indice d'émulsification E_{24} ont montré 61% des résultats positifs et 39% des résultats négatifs. 44 isolats ont montré de faibles valeurs E_{24} , qui se situent entre $4,5 \pm 0,28$ % et $20,75 \pm 0,06$ %, 10 souches présentaient des valeurs de E_{24} entre $20,75 \pm 0,06$ et $50 \pm 0,17$ % et 7 souches présentaient un pourcentage supérieur à $50,44 \pm 0,70$ %. Nous avons noté également une activité émulsifiante remarquable pour les 4 souches codées YBR, YLF, YH et YB₂, elles ont présenté des valeurs de E_{24} de $69,50 \pm 0,7$, $69,00 \pm 0,69$, $69,33 \pm 0,76$ et $65,53 \pm 0,56$, respectivement.

Pour les 43 moisissures isolées 12 souches FS1 à FS13 ont montré des valeurs $E_{24} > 50$ % ,8 souches présentaient des valeurs de E_{24} entre 30 et 49 % et 9 souches présentaient des valeurs de E_{24} qui se situent entre 5 et 11 %, cependant, 13 souches ont présenté des résultats négatifs. Selon **Youssef et al. (2004)**, la méthode de drop collapse est une méthode sensible et facile pour détecter la présence des biosurfactants. L'apparence d'une goutte perlée dans la plaque confirme le résultat positif du test. Les résultats ont révélé que 58 % des souches levuriennes étaient positives pour la production des biosurfactants, tandis que 42% ont présenté des résultats négatifs. L'intensité des résultats positifs se répartissent comme suit : 31 souches (+), 18 souches (++) et 9 souches (+++) parmi lesquelles YBR, YLF, YH et YB₂.

Pour les moisissures, les résultats ont montré que 60,46% des isolats pouvaient produire les biosurfactants. Ces résultats positifs, sont répartis comme suit : 5 souches (+), 10 souches (++) et 11 souches (+++) de FS1 à FS9, aussi FS11 et FS13.

Le test du déplacement de l'huile est un test rapide et facile à réaliser, et ne nécessite aucun équipement spécialisé, juste un petit volume de l'échantillon, et il peut être appliqué lorsque l'activité et la quantité de biosurfactant produit est faible (**Plaza et al., 2006**).

56% des résultats négatifs et 44% positifs ont été obtenus pour les levures dont 32 souches ont présenté un diamètre de déplacement de $0,5 \pm 0,1$ cm et 8 souches un diamètre de déplacement $> 0,5$ cm. Selon les résultats de ce test, les meilleures souches sont YB₂, YH, YBR et YLF ($\varnothing = 2$ à 2,5 cm).

Pour les souches fongiques, le test a révélé que les quatre meilleures souches sont FS1, FS9, FS11 et FS13 avec des diamètres de 2 à 2,5 cm.

Les résultats obtenus par la technique du déplacement de l'huile étaient semblables avec ceux obtenus avec le test du drop collapse. En effet, les isolats positifs pour le test du drop collapse

étaient également positifs pour le test de déplacement de l'huile (**Tableaux 10, 11**). Des résultats similaires ont été rapportés par **Youssef et al. (2004)** et **Thavasi et al. (2011)**.

En ce qui concerne l'activité hémolytique (test réalisé sur la gélose au sang), tous les résultats obtenus étaient négatifs, sauf pour les souches suivantes : YS₉, YS₇, YS₁₁, YS₃, YS₁₇, YB₃, FS 6, FS 19, FS 20, FS 22, FS 31, FS 33 et FS 42.

Youssef et al. (2004), ont affirmé que le test de la recherche de l'activité hémolytique excluait de nombreux microorganismes producteurs des biosurfactants et que, dans certains rapports, des souches à activité hémolytique positive se révélaient en même temps négatives pour la production des biosurfactants. En outre, les mêmes auteurs ont confirmé que cette méthode n'est pas spécifique, car elle peut donner un pourcentage élevé de faux positifs ou négatifs, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que d'autres composés autres que les biosurfactants tels que les enzymes lytiques et les facteurs de virulence pourraient également causer une hémolyse.

De plus, **Schulz et al. (1991)** ont rapporté que tous les biosurfactants ne présentent pas forcément tous une activité hémolytique. Par conséquent, l'activité hémolytique doit être considérée comme un critère peu fiable pour la détection de la production des biosurfactants comparée aux autres méthodes comme : l'activité émulsifiante, le test du drop collapse, la méthode de déplacement de l'huile et la mesure de la tension superficielle, qui sont plus cohérentes et plus fiables (**Youssef et al., 2004 ; Satpute et al., 2008**).

Tableau 10 : Résultats du criblage des levures productrices des biosurfactants en utilisant différentes techniques.

Isolats	Indice d'émulsification E ₂₄ (%)	Drop collapse	Déplacement de l'huile	Activité hémolytique
YC	45 ± 0,7	+++	++	-
YC ₂	14 ± 0,60	+	+	-
YS ₁	9,50 ± 0,70	++	+	-
YS ₂	0	-	-	-
YP	0	-	-	-
YC ₃	0	-	-	-
YS ₃	0	-	-	+
YBn	0	-	-	-
YS ₄	9,50 ± 0,70	+	+	-
YS ₅	0	-	-	-
YP ₂	0	-	-	-
YP ₃	18,50 ± 0,70	+	+	-
YF	15,33 ± 0,57	+	+	-
YD	15,50 ± 0,86	+	-	-
YD ₂	0	-	-	-
YS ₆	19,00 ± 1,41	+	+	-
YFr	19,50 ± 0,70	-	-	-
YFr ₂	09,75 ± 0,35	+	-	-
YB	04,83 ± 0,28	-	-	-
YS ₇	25,50 ± 0,70	++	++	+
YLV	59,33± 0,70	+++	++	-
YLV ₂	0	-	-	-
YS ₈	05,66 ± 0,15	+	+	-
YBn ₂	20 ± 0,70	+	+	-

YS ₉	0	-	-	+
YFr ₃	50,44 ± 0,70	+++	++	-
YFr ₄	0	-	-	-
YFr ₅	05,50 ± 0,70	+	-	-
YM	30,00 ± 0,41	+	+	-
YM ₂	0	-	-	-
YM ₃	25,75 ± 0,06	++	+	-
YM ₄	05,25 ± 0,35	-	-	-
YS ₁₀	0	-	-	-
YS ₁₁	14,00 ± 1,41	++	+	+
YS ₁₂	0	-	-	-
YS ₁₃	06,75 ± 0,35	+	+	-
YS ₁₄	30,00 ± 1,41	++	+	-
YS ₁₅	11,00 ± 1,41	++	+	-
YS ₁₆	05,50 ± 0,70	+	-	-
YS ₁₇	14,50 ± 0,70	++	+	+
YF ₂	11,00 ± 1,41	++	+	-
YO	09,25 ± 0,35	++	+	-
YO ₂	0	-	-	-
YA	09,50 ± 0,70	++	+	-
YA ₂	09,50 ± 0,70	+	+	-
YLV ₃	15,00 ± 0,1	+	-	-
YLV ₄	0	-	-	-
YLV ₅	0	-	-	-
YF ₃	0	-	-	-
YO ₃	0	-	-	-
YS ₁₈	0	-	-	-
Yeg	60 ± 0,30	+++	++	-
YS ₁₉	25 ± 1,41	++	+	-
YE ₂	0	-	-	-
YE ₃	0	-	-	-
YE ₄	05,25 ± 0,35	+	-	-
YBn ₃	0	-	-	-

YE ₅	0	-	-	-
YBn ₄	16,00 ± 1,41	+	-	-
YO ₄	09,50 ± 0,70	++	+	-
YF ₄	11,50 ± 2,12	++	+	-
YM ₅	0	-	-	-
YM ₆	0	-	-	-
YO ₅	0	-	-	-
YS ₂₀	19,50 ± 0,70	++	++	-
YLC ₁	0	-	-	-
YB₂	65,53 ± 0,56	+++	+++	-
YB ₃	09,50 ± 0,72	+	+	+
YB ₄	0	-	-	-
YLV ₆	0	-	-	-
YS ₂₁	05,66 ± 1,15	-	-	-
YO ₆	04,75 ± 0,35	+	-	-
YLC ₂	05,00 ± 0,71	+	+	-
YLV ₇	05,00 ± 0,73	-	-	-
YLV ₈	18,75 ± 1,06	++	+	-
YLV ₉	05,25 ± 0,35	+	-	-
YLV ₁₀	0	-	-	-
YFg ₁	09,50 ± 0,71	++	+	-
YFg ₂	23,00 ± 1,41	+	+	-
YFg ₃	05,66 ± 1,15	-	-	-
YLV ₁₁	0	-	-	-
YB ₅	19,00 ± 1,41	+	+	-
YO ₇	0	-	-	-
YH	69,33 ± 0,76	+++	+++	
YF ₄	0	-	-	-
YF ₅	05,00 ± 0,1	+	-	-
YF ₆	0	+	-	-
YB ₆	0	-	-	-
YB ₇	0	+	-	-
YFg ₄	0	+	-	-

YS ₂₁	20,75 ± 1,06	+	+	-
YS ₂₂	26,00 ± 0,71	+	-	-
YLF	69,00 ± 0,69	+++	+++	-
YB ₈	60,00 ± 1,41	+++	++	-
YB ₉	0	-	-	-
YB ₁₀	10 ± 1,15	+	+	-
YB ₁₁	45 ± 0,15	++	++	-
YBR	69,50 ± 0,70	+++	+++	-
YFg ₅	15 ± 0,28	++	+	-
YS ₂₃	05 ± 0,18	+	+	-

Tableau 11 : Résultats du criblage des moisissures productrices des biosurfactants en utilisant différentes techniques.

Isolats	Indice d'émulsification E ₂₄ (%)	Drop collapse	Déplacement de l'huile	Activité hémolytique
FS1	55,33±0,47	+++	+++	-
FS2	55,66±0,94	+++	++	-
FS3	61,26±0,82	+++	++	-
FS4	61±0,4	+++	++	-
FS5	60,66±0,29	+++	++	-
FS6	60,66±0,29	+++	++	+
FS7	60,33±0,47	+++	++	-
FS8	61,33±0,47	+++	++	-
FS9	60,33±0,47	+++	+++	-
FS10	57,88±0,08	++	++	-
FS11	65,33± 0,47	+++	+++	-
FS12	50±0,0	++	++	-
FS13	62,33± 0,8	+++	+++	-
FS14	49,66±0,47	++	++	-
FS15	47,55±0,38	++	++	-
FS16	43,65±0,24	++	++	-
FS17	43,98±0,71	++	++	-
FS18	40±0,0	++	++	-
FS19	40±0,1	++	++	+
FS20	34,66±0,47	++	++	+
FS21	30±0,0	++	++	-
FS22	5,66±0,94	+	+	+

FS23	4,33±0,47	+	+	-
FS24	5±0	+	+	-
FS25	5,66±0,94	+	+	-
FS26	7±0,81	+	+	-
FS27	5±0,0	-	-	-
FS28	11±0,8	-	-	-
FS29	8,66±0,45	-	-	-
FS30	10±0,0	-	-	-
FS31	0	-	-	+
FS32	0	-	-	-
FS33	0	-	-	+
FS34	0	-	-	-
FS35	0	-	-	-
FS36	0	-	-	-
FS37	0	-	-	-
FS38	0	-	-	-
FS39	0	-	-	-
FS40	0	-	-	-
FS41	0	-	-	-
FS42	0	-	-	+
FS43	0	-	-	-

-Drop collapse: "-" absence de production des biosurfactants, "+" à "++++" correspondant à l'étalement partiel à complet de la goutte.

-Technique de déplacement de l'huile: "-" pas de déplacement, "+" ($\varnothing = 0,5$ et $0,9$ cm), "++" ($\varnothing = 1$ et $1,5$ cm), "+++" ($\varnothing = 1,5$ et $2,1$ cm), et "++++" ($\varnothing > 2,1$ et < 3 cm).

-L'activité hémolytique: "-", pas d'hémolyse; "+", Hémolyse incomplète; "++", Hémolyse complète ($\varnothing$ de lyse < 1 cm); "+++", hémolyse complète ($\varnothing$ de lyse > 1 cm mais < 3 cm); et "++++", hémolyse complète ($\varnothing$ de lyse > 3 cm et l'apparition des colonies vertes).

Selon les résultats de cette étude, les souches productrices des biosurfactants ont été isolées à partir de différents biotopes, cependant nous avons remarqué que les souches les plus performantes ont été isolées à partir des sites contaminés par des hydrocarbures. En effet, au début des travaux sur les biosurfactants, la recherche des microorganismes producteurs étaient exclusivement sur des sites contaminés par les hydrocarbures (**Bodour et al., 2003 ; Decesaro et al., 2013**). Etant donné que, la littérature a toujours souligné le lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles, surtout les hydrocarbures et les huiles et la production des biosurfactants (**Hommel et al., 1994**). Grâce à la capacité des biosurfactants à abaisser la tension superficielle, à émulsionner des mélanges d'eau et d'hydrocarbures et également la dégradation de ces derniers (**Geetha et al., 2018**). La production exclusive ou élevée des biosurfactants lors de la croissance sur des alcanes suggère fortement qu'ils

puissent avoir un rôle à jouer dans l'assimilation des substrats faiblement disponibles. Cela peut être expliqué par le rôle physiologique des biosurfactants. En effet, ils aident à réduire la tension de surface et à convertir les hydrocarbures hautement immiscibles en petites gouttelettes ou micelles, et augmentent leur biodisponibilité (Van Hamme et al., 2006). Par conséquent, les zones contaminées par des hydrocarbures représentent des sources idéales et potentielles pour l'isolement des microorganismes performants.

Toutefois, au cours des dernières décennies, la recherche de nouveaux microorganismes producteurs de biosurfactants s'est élargie à différents habitats naturels tels que le sol, l'eau de mer et les sédiments marins (Yakimov et al., 1998), les environnements extrêmes tels que les sources chaudes, les sebkhas (Kebbouche-Gana et al., 2009), les eaux usées (Ilori et al., 2008). Les microorganismes producteurs des biosurfactants ont été également isolés à partir des aliments et des produits laitiers (fromage et yaourt) (Kermanshahi et Peymanfar, 2012), et même des fruits et des légumes (Konichi et al., 2014). Ces données sont en corrélation avec les résultats obtenus par notre étude, où nous avons pu isoler des micro-organismes producteurs des biosurfactants à partir de différents biotopes, y compris des aliments, et des sites contaminés par des hydrocarbures.

Ces résultats, mettent en relief, les potentialités intéressantes des souches isolées à produire des biosurfactants, et nous ont permis de sélectionner quatre souches, il s'agit de deux souches de levures codées YLF et YBR et de deux souches fongiques FS11 et FS13.

Les résultats du screening pour les quatre souches sont représentés dans la **Figure 28**.

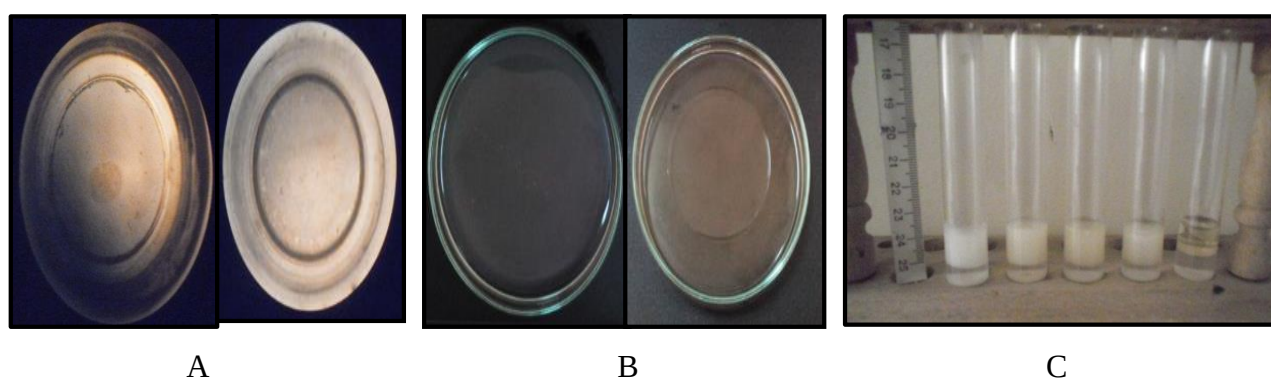


Figure 28 : Résultats du criblage pour la production des biosurfactants obtenus après 72h de culture de l'isolat YLF: **(A):** Drop collapse : deux puits d'une microplaque à 92 puits vus au microscope photonique grossissement x10, résultat positif à droite, **(B):** le test de déplacement de l'huile résultat positif à droite, **(C):** Indices d'émulsifications obtenus pour les quatre souches YLF, YBR, FS11 et FS13, témoin négatif, respectivement de gauche à droite.

III.3. Identification des isolats

En se basant sur les résultats du criblage, les souches fongiques présentant des résultats positifs pour la production des biosurfactants ont été identifiées par des méthodes conventionnelles : morphologiques, physiologiques et biochimiques. Seules, les quatre levures les plus performantes ont été identifiées par l'utilisation des techniques moléculaires.

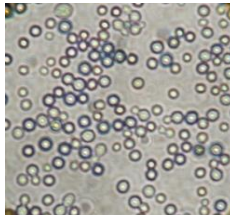
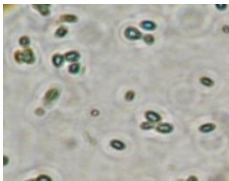
III.3.1. Identification des levures

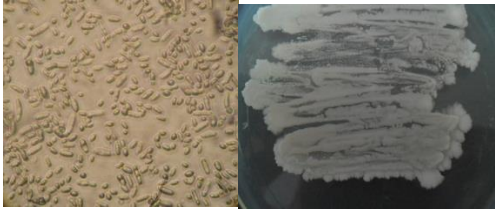
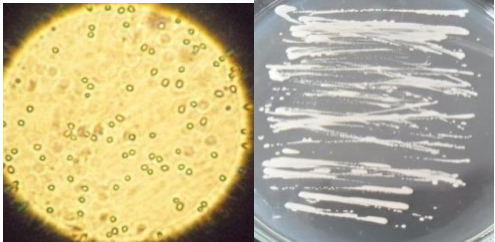
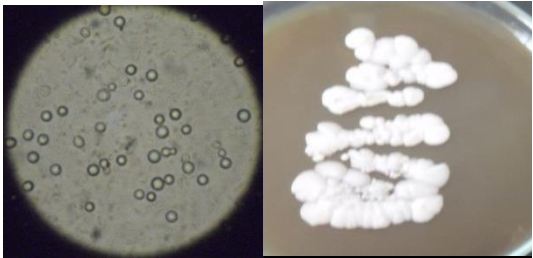
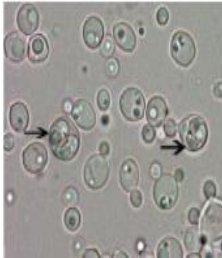
L'identification des souches est basée sur l'étude des caractères culturels associés aux colonies tels que la pigmentation, la forme, le contour, la taille des cellules, la sporulation et la présence du pseudo ou vrai mycélium.

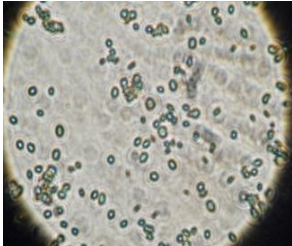
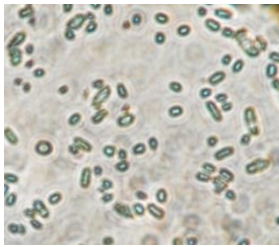
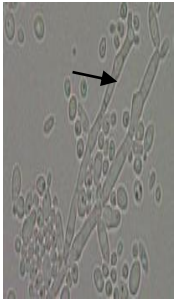
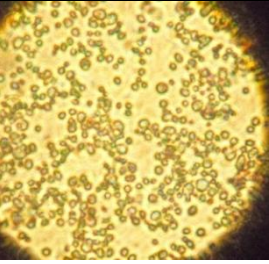
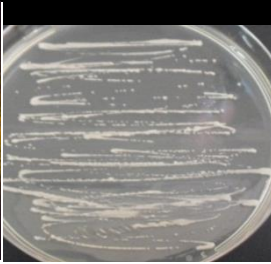
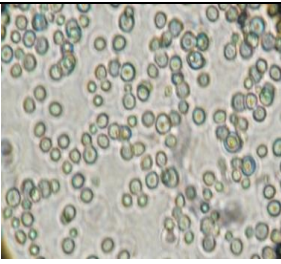
Les aspects macroscopiques et microscopiques des levures identifiées sont représentés dans le **Tableau 12**.

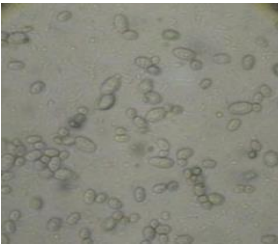
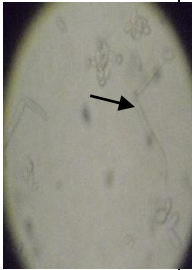
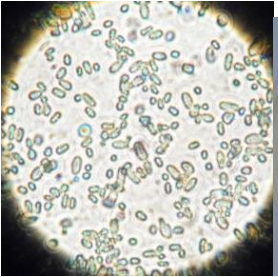
Rappelant que cette identification des levures a été réalisée en se référant aux clés d'identification citées dans trois monographies sur les levures publiées au fil des années (**Kreger-van Rij, 1984 ; Kurtzman et Fell, 1998 ; Kurtzman et *al.*, 2011**).

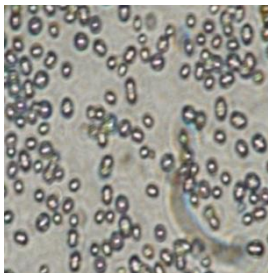
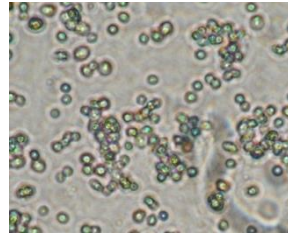
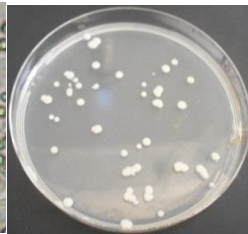
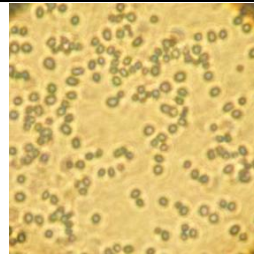
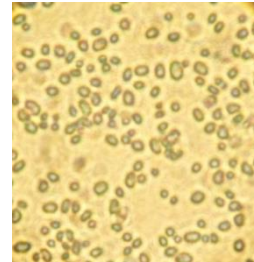
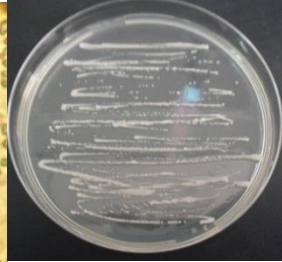
Tableau 12 : Caractères macroscopiques et microscopiques des levures sélectionnées après une culture de 3 jours sur YPGA à 28°C.
(+ : présence ; - : absence).

Isolat	Caractères cultureux	Aspect macroscopique et microscopique	Sporulation	Présence de Pseudo ou vrai mycélium	Espèce
YLF	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, bombées avec un aspect brillant. Un anneau et sédiment modérés sont présents sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses à ovoïdes et simples.	 	-	-	<i>Cryptococcus sp</i>
YH	Colonies rondes, blanches, lisses, bombées. Présence de dépôt et d'anneau sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses à ovoïdes, simple, par paires, chaînes et grappes.	 	-	+ Pseudo mycélium	<i>Candida sp</i>
YBR	Colonies de couleur orange saumon et mucilagineuses. Présence d'un anneau rose fraise sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes à sphériques, peuvent se produire séparément, par paires, en chaînes courtes ou en petites grappes.	 	-	-	<i>Rhodotorula sp</i>

YEg	Colonies de couleur crème, élevées à devenir cérébriforme avec des marges lisses. Présence de dépôt et de pellicule sur milieu liquide.		+	+	<i>Trichosporon</i> <i>sp</i>
YLV ₈	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Les cellules sont ovoïdes, apparaissent seules. Présence d'un sédiment et une pellicule mince est formée sur milieu liquide.		+	+	<i>Kluyveromyces</i> <i>sp</i>
YS ₆	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, bombées avec un aspect brillant. Présence de dépôt et d'anneau sur milieu liquide Les cellules sont globuleuses, apparaissent seules et encapsulées.		+	+	<i>Lypomyces</i> <i>sp</i>
			1 à 3 ascospores ellipsoïdales	Pseudo mycélium	
			1 à 4 ascospores globuleuses	Pseudo mycélium	
					

YB ₂	Colonies rondes, crémeuses, lisses, bombées modérément, brillantes. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes à allongées, apparaissent seules.	 	-	-	<i>Cryptococcus</i> <i>sp</i>
YFg ₂	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont allongées, apparaissent seules.	 	3 ascospores ellipsoïdales	+ 	<i>Kluyveromyces</i> <i>sp</i>
YP ₃	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, et plates. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes, simples, par paires, et en grappes.	 	-	-	<i>Candida</i> <i>sp</i>
YS ₇	Colonies rondes, roses pales, mucoïdes, lisses, bombées et brillantes. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses à ovoïdes, pouvant se produire séparément, par paires ou en courtes chaînes.	 	-	-	<i>Rhodotorula</i> <i>sp</i>

YFr	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, bombées et brillantes. Présence de dépôt et d'anneau sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes à allongées, apparaissent seules ou en courtes chaînes.	 	-	+ 	<i>Candida sp</i>
YBn ₂	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de dépôt et d'anneau sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes, simple ou par paire.	 	-	-	<i>Candida sp</i>
YS ₁₄	Colonies rose pale, crémeuses, lisses, bombées et brillantes. Présence de dépôt et de pellicule sur milieu liquide. Les cellules sont sphéroïdales à allongées, et apparaissent séparément, en paires ou en petites grappes.	 	2 à 4 ascospores en forme de chapeau.	+ Pseudo mycélium	<i>Pichia sp</i>

YB ₁₂	Colonies rondes, de couleur orange, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence d'un anneau et d'un sédiment rose à orange sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes à globuleuses, ou plus allongées.	 	-	-	<i>Rhodotorula sp</i>
YS ₁₉	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses à ovoïdes, apparaissent uniques, par paires et souvent en petites grappes.	 	-	-	<i>Cryptococcus sp</i>
YM ₃	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses et plates. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses, ellipsoïdales, se répartissent uniques ou par paires.	 	+ 1 à 4 ascospores sphériques.	-	<i>Saccharomyces sp</i>
YFr ₃	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de pellicule sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes à allongées.	 	-	-	<i>Candida sp</i>

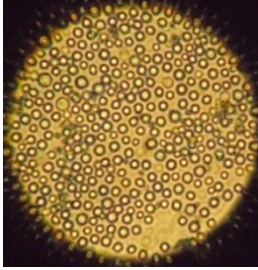
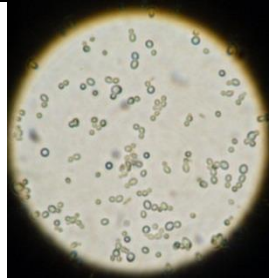
YS ₂₂	Colonies crème, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de dépôt et d'anneau sur milieu liquide. Les cellules sont globuleuses à ovoïdes et apparaissent seules.	 	-	-	<i>Cryptococcus sp</i>
YFg ₃	Colonies rondes, blanches, crémeuses, lisses, plates et brillantes. Présence de dépôt sur milieu liquide. Les cellules sont ovoïdes, unique, par paires et par petits groupes.	 	-	-	<i>Candida sp</i>

Tableau 13 : Caractères biochimiques et physiologiques de quelques levures sélectionnées
 (+ : fermentation ou assimilation du substrat, - : absence de la fermentation ou de l'assimilation du substrat).

Souches Caractères biochimiques	YLF	YH	YBR	YP ₃	YFg ₃	YM ₃	YS ₁₉	YBn ₂	YFr	YS ₁₄	YB ₂	YS ₆	YS ₇	YFr ₃	YB ₁₂	YEg	YFg ₂	YLV ₈	YS ₂₂
Assimilation																			
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
L-Arabinose	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
D-Xylose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
D-Cellobiose	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
D-Lactose	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
D-Tréhalose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-Mannose	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
D-Raffinose	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
D- Mélézitose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
D-Inositol	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
D-Adonitol	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Fermentation																			
Glucose	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Maltose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tréhalose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Physiologie																			
Urease	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Nitrate	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Gélatinase	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Résistance au Cycloheximide (0,1%)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Croissance à 40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 42 °C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 47 °C	-		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Croissance à 50% de glucose (osmophilie)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Tolérance au NaCl plus de 20%.	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

III.3.1.1. Caractères cultureux

Selon les résultats obtenus (**Tableau 12**), après une croissance de 3 jours à 25 °C sur milieu YPGA, la majorité des souches possèdent une forme ronde, un contour régulier, surface lisse et bombée. La croissance des isolats de levures sur milieu YPG liquide se manifeste de façon différente. Après 14 jours d'incubation à 25 °C, on note l'apparition d'un dépôt qui renseigne sur la masse cellulaire chez l'ensemble des souches isolées. La formation de l'anneau en surface est observée chez presque toutes les espèces. En revanche, l'apparition de pellicule est observée uniquement chez les espèces *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Trichosporon*. Ces caractères concordent avec ceux décrits dans la littérature (**Kurtzman et Fell, 1998 ; Kurtzman et al., 2011**).

III.3.1.2. Caractères morphologiques

La morphologie des cellules est variable d'une souche à une autre (**Tableau 12**). Elle est subglobeuse à ovoïde allongée, ovoïde, globuleuse, sphérique à ellipsoïdale allongée et ellipsoïdale. Le mode de reproduction végétative se fait par bourgeonnement pour la totalité des souches. Il est soit monopolaire, bipolaire ou multilatéral.

Le test de filamentation révèle la présence du pseudomycélium chez certaines souches telles : YH, YEg , YLV₈, YS₆ , YFg₂, YFr, YS₁₄ , qui correspondent au genres suivants : *Candida*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces*, *Lypomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* et *Pichia*, respectivement. En revanche, on note l'absence d'un vrai mycélium chez les souches identifiées.

La sporulation ou la présence des ascospores a été observée chez certains genres tels que *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Saccharomyces*.

III.3.1.3. Caractères biochimiques

L'étude des caractères morphologiques des levures n'est pas suffisante pour l'identification des genres. Pour cela, nous avons étudié certains caractères biochimiques, comme l'assimilation des substrats carbonés (les sucres) en utilisant la galerie Auxacolor. L'identification finale repose sur l'association des tests biochimiques et des caractères complémentaires (morphologiques et physiologiques). Après avoir déterminé le profil numérique de chaque isolat, celui-ci est recherché dans la base de données fourni par le fabricant, la liste est donnée en **annexe 3**.

Les résultats de l'identification sont récapitulés dans le **Tableau 14**. Ces résultats nous ont permis d'affilier les 19 souches au genres suivants : *Candida* (6 souches), *Cryptococcus* (4

souches), *Rhodotorula* (3 souches), *Kluyveromyces* (2 souches), *Trichosporon* (une souche), *Pichia* (une souche), *Lypomyces* (une souche) et *Saccharomyces* (une souche).

Tableau 14 : Identification de quelques isolats levuriens selon la galerie biochimique Auxacolor.

Code de l'isolat	Code de la galerie biochimique Auxacolor.	Identification
YLF	77771-40	<i>Cryptococcus albidus</i>
YH	77460-05	/ <i>Candida intermedia</i>
YBR	74670-14	/ <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
YP ₃	71430-04	<i>Candida dubliniensis</i>
YFg ₃	57010-04	<i>Candida kefyr</i>
YM ₃	75400-04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YS ₁₉	77771-40	<i>Cryptococcus laurentii</i>
YBn ₂	73670-04	<i>Candida lusitanae</i>
YFr	71460-05	<i>Candida tropicalis</i>
YS ₁₄	76241-05	/ <i>Pichia sp</i>
YB ₂	75361-44	<i>Cryptococcus albidus</i>
YS ₆	77441-45	/ <i>Lypomyces sp</i>
YS ₇	75471-14	/ <i>Rhodotorula glutinis</i>
YFr ₃	12400-04	<i>Candida glabrata</i>
YB ₁₂	75440-14	/ <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
YEg	77771-25	<i>Trichosporon mucoides</i>
YFg ₂	56250-05	/ <i>Kluyveromyces sp</i>
YLV ₈	16250-05	/ <i>Kluyveromyces sp</i>
YS ₂₂	71561-44	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>

(/) Signifie : l'absence d'un code qui correspond à la souche dans la table de référence (**annexe 3**).

III.3.1.1.3. Analyse phylogénétique et alignement

Une identification approfondie, par voie moléculaire, est effectuée sur les quatre souches les plus performantes comme productrices de biosurfactants (YLF, YH, YBR et YEg), par séquençage des domaines D1 et D2 de 5.8 d'ARNr (**Figure 29**).

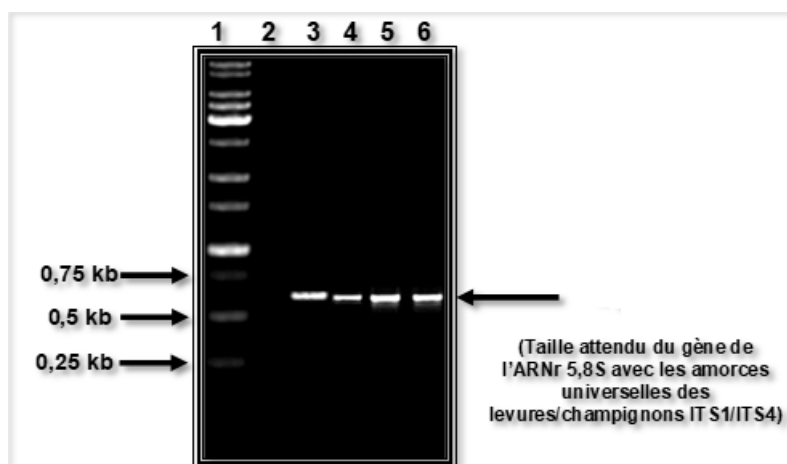


Figure 29 : Gel d'agarose (1%) présentant les produits de la PCR des gènes de l'ARNr 5.8S des souches ; YBR (piste 3), YH (piste 4), YEG (piste 5) et YLF (piste 6). Piste 1 : Marqueur de taille 1 kb (DNA leader Marker : figure en haut à gauche), piste 2 : témoin négatif.

Les produits de PCR des 4 souches ont été séquencés et déposés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accessions cités dans le **Tableau 15**. Les séquences de l'ADN 5.8S obtenues (**Annexe 5**) sont alignées et comparées par Blast avec les séquences des levures contenues dans les bases de données génomiques.

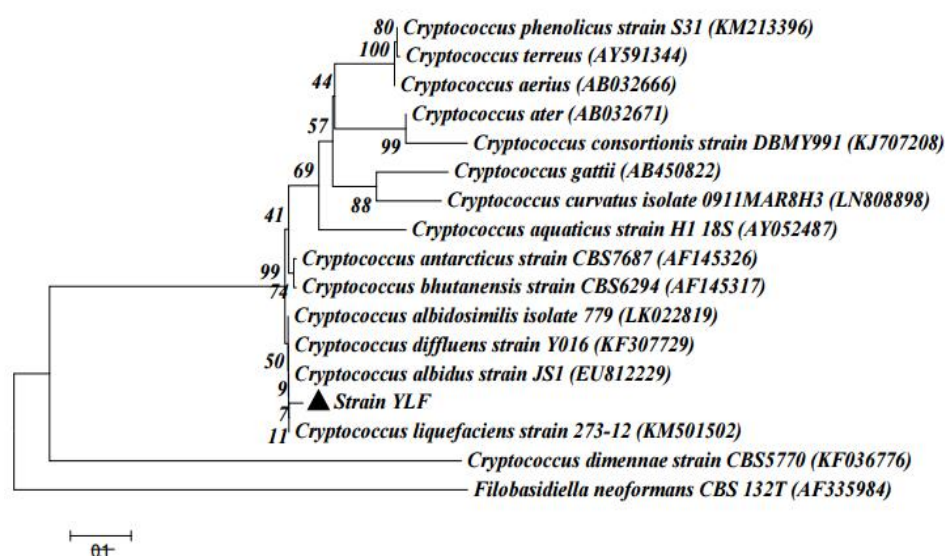
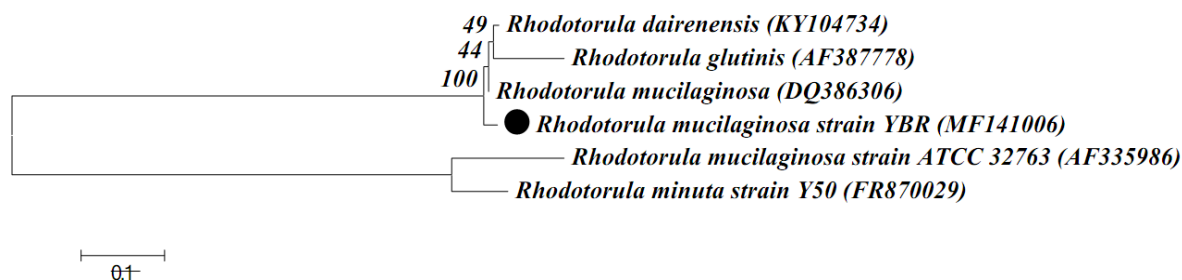
D'après les résultats, la souche YLF (544 pb) appartient au genre *Cryptococcus* avec un pourcentage de similitude de 98% avec *Cryptococcus albidus*. La souche YBR (677 pb) appartient au genre *Rhodotorula* et plus exactement au *Rhodotorula mucilaginosa* avec un pourcentage de similitude de 99%. La souche YEG (553 pb) appartient au genre *Trichosporon* avec un pourcentage de similitudes de 99% avec *Trichosporon mucoide*. Quant à la souche YH (575 pb), elle appartient au genre *Candida* car elle a présenté des similitudes de 98% avec *Candida intermedia*.

L'analyse des séquences d'ARNr 5.8S des souches levuriennes a permis d'affilier les quatre souches et d'aboutir à une identification définitive (**Tableau 15**).

Les arbres phylogénétiques basés sur l'analyse des séquences d'ADN r 5.8S des deux isolats sélectionnés dans notre étude YLF et YBR sont représentés dans les **Figures 30** et **31**, respectivement.

Tableau 15 : Affiliation phylogénétique des isolats levuriens.

Code de la souche	Nombre de séquence du gène de l'ARNr 5,8S (pb)	Plasmide	Identité (%)	Identification moléculaire (ripotypage): genre + espèce	Numéro d'accèsion
YBR	677	pDL-YBR	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	MF141006
YEg	553	pDL-YEg	99	<i>Trichosporon mucoides</i>	MF141007
YH	575	pDL-YH	98	<i>Candida intermedia</i>	MF141008
YLF	544	pDL-YLF	98	<i>Cryptococcus albidus</i>	MF141009

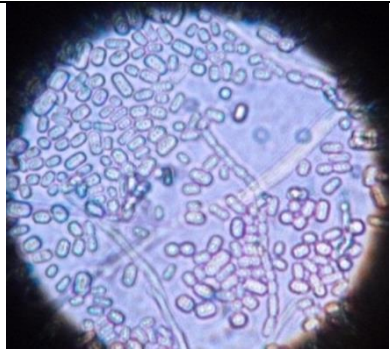
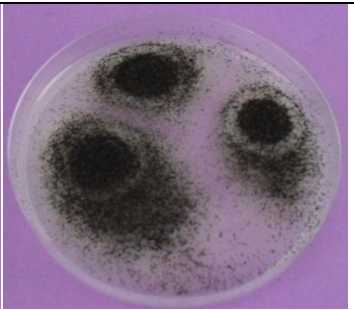
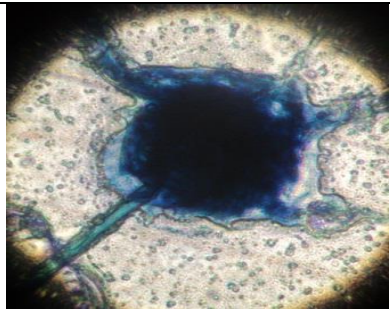
Figure 30 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 5.8S, montrant la position taxonomique de l'isolat YLF avec les espèces de genre *Cryptococcus*.Figure 31 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 5.8S, montrant la position taxonomique de l'isolat YBR avec les espèces de genre *Rhodotorula*.

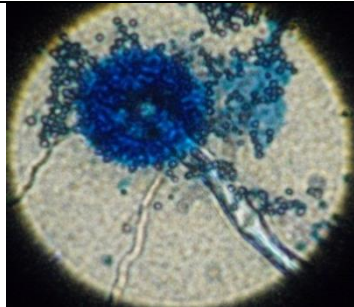
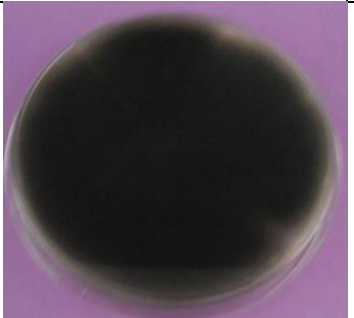
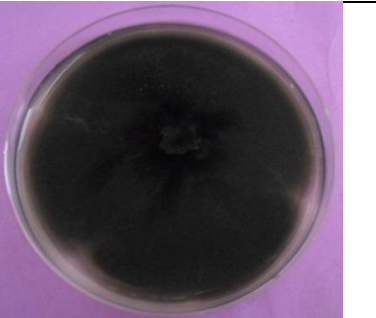
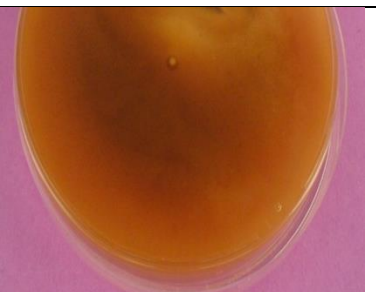
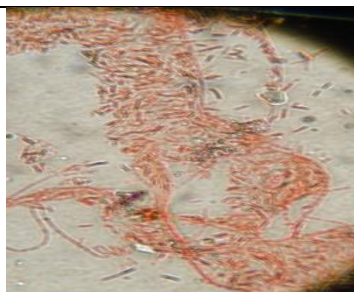
III.3.2. Identification des moisissures

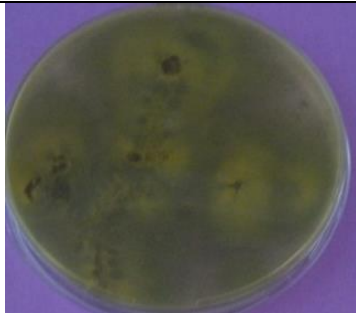
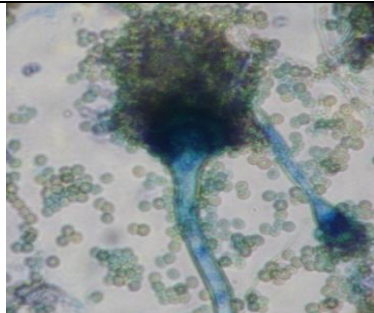
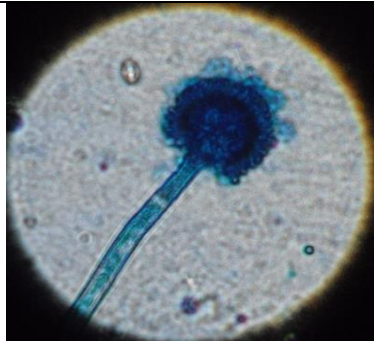
Parmi les champignons isolés, 20 isolats ont été sélectionnés et purifiés en vue de les identifier. L'identification de ces genres est basée sur les clés d'identification décrites par la littérature (**Botton et al., 1990 ; Guiraud, 1998**), en se basant essentiellement sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc.).

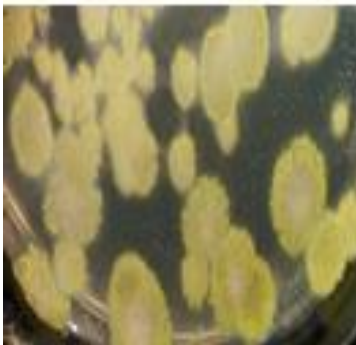
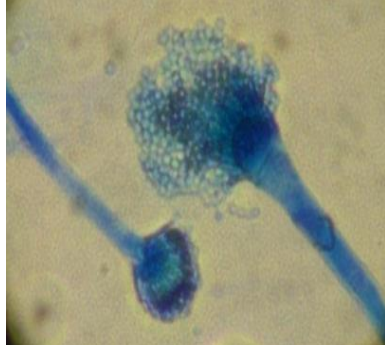
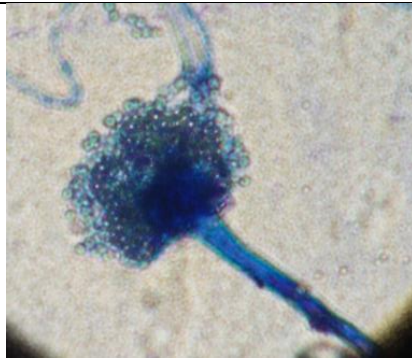
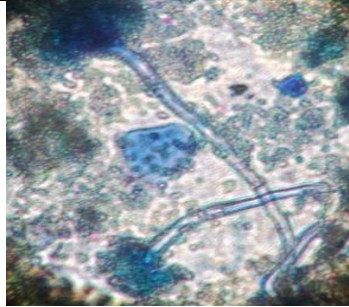
Les caractères macroscopiques des différents isolats sont étudiés sur les quatre milieux PDA, MEA, Czapek et Sabouraud (**Annexe 2**), les plus communément utilisés pour l'identification des moisissures (**Botton et al., 1990**). Les résultats des caractéristiques macroscopiques et microscopiques sont récapitulés dans le **Tableau 16**.

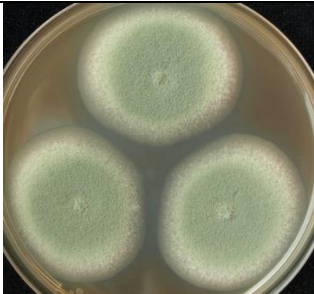
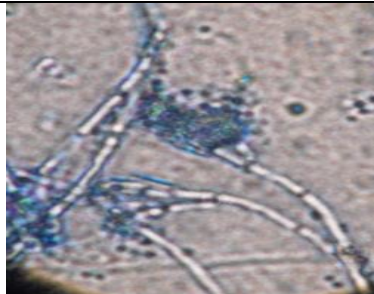
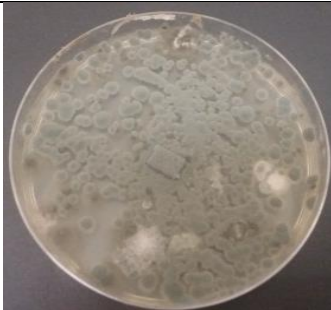
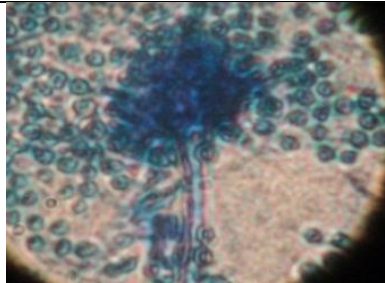
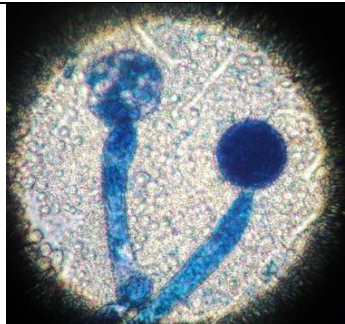
Tableau 16 : Caractères macroscopiques et microscopiques des souches fongiques isolées, cultivées à 25 °C pendant 7 jours sur milieu PDA.

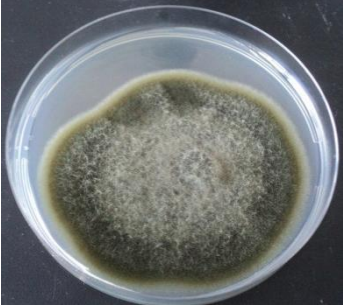
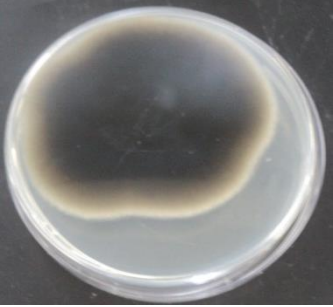
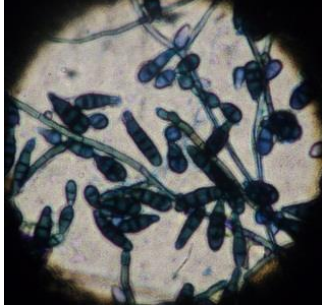
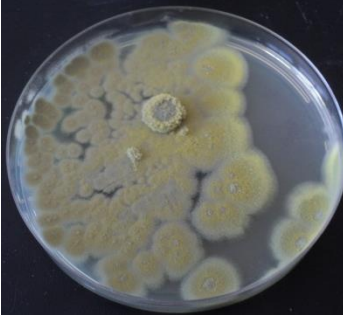
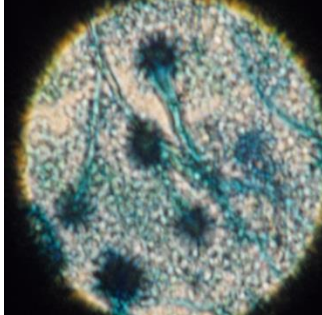
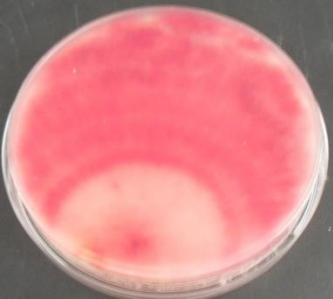
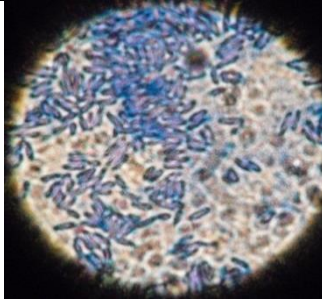
Isolat	Caractères cultureux	Aspect macroscopique après 7 jours de culture sur milieu PDA		Aspect microscopique après 72 h de culture sur milieu PDA	Espèces identifiées
		Revers	Surface	Observation microscopique colorée au bleu coton GX40	
FS1	Colonie plate, d'un aspect rayonné, blanche. Centre plus ou moins surélevé et contour très régulier. Revers blanc-cassé.				<i>Geotrichum sp</i>
FS2	Colonie plate, présente un mycélium aérien abondant portant des têtes conidiennes noires à l'origine de l'aspect granuleux de la colonie. Revers blanc verdâtre avec des plis radiaires.				<i>Aspergillus sp</i>

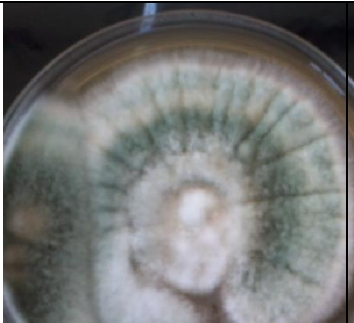
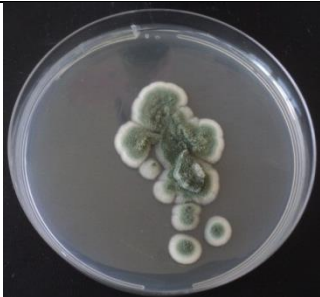
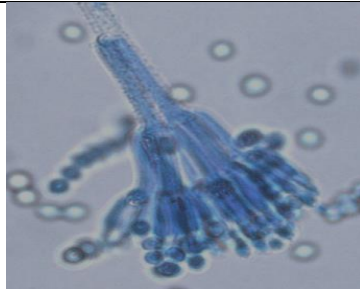
FS3	Colonie plate à croissance rapide, poudreuse, de couleur marron-cannelle, contour échancré, à revers blanc-verdâtre.				<i>Aspergillus sp</i>
FS4	Colonie à thalle noir, plate, d'un aspect laineux, ombiliquée, à contour régulier, revers noir.				<i>Alternaria sp</i>
FS5	Colonie cotonneuse, blanche grisâtre, ombiliquée à contour régulier. Revers pigmenté en orange foncé au niveau des vieux mycéliums.				<i>Fusarium sp</i>

FS7	Thalle poudreux de couleur grise foncée après 5 jours d'incubation à 25°C. La colonie est ombiliquée avec quelques plis radiaires, le revers est jaune- verdâtre.				<i>Aspergillus sp</i>
FS8	Colonie de couleur blanche-beige, plate, à contour régulier et à croissance rapide. Revers jaune.				<i>Aspergillus sp</i>
FS9	Colonie plate à croissance rapide, poudreuse, de couleur blanche, contour échancré et à revers jaune.				<i>Aspergillus sp</i>

FS 10	Thalle jaune-verdâtre, contour irrégulier, revers jaunâtre, présentant un brun-rouge très foncé au niveau du vieux mycélium.				<i>Aspergillus sp</i>
FS 11	Thalle vert-brun, poudreux, plat, duveteux, à contour régulier. Revers marron.				<i>Aspergillus sp</i>
FS 12	Colonie jaune, plate, veloutée, lisse à contour échancré, revers blanc-jaunâtre.				<i>Aspergillus sp</i>

FS 13	Colonie plate, de couleur bleu-vert avec une courte marge blanche, à contour régulier. Revers blanc.				<i>Penicillium sp</i>
FS 14	Thalle vert-grisâtre, poudreux, la colonie est plate et à contour régulier. Revers blanc-jaunâtre.				<i>Aspergillus sp</i>
FS 15	Thalle siphonné blanc. La colonie est ombiliquée à contour irrégulier. Revers blanc.				<i>Mucor sp</i>

FS 16	Colonie veloutée couverte d'un mycélium aérien vert olive, grisâtre. Revers vert noir.				<i>Alternaria sp</i>
FS 17	Colonie jaune-verdâtre, ombiliquée à contour irrégulier. Revers jaune-brun à brun au centre.				<i>Aspergillus sp</i>
FS 18	Colonie plate, floconneuse, blanche rosée. Revers et milieu pigmenté en rose, présentant quelques plis radiaires.				<i>Fusarium sp</i>

FS 19	Thalle vert gris, lisse, floconneux et surélevé au centre, sillonné radialement, à contour blanc et revers blanc-jaune.				<i>Penicillium sp</i>
FS 20	Colonie de couleur bleu-vert foncé avec une courte marge blanche, à contour irrégulier et revers blanc.				<i>Penicillium sp</i>

D'après les observations macroscopiques (aspect, couleur et vitesse de croissance des colonies) et microscopiques (nature du filament, présence de conidiophores et forme des conidies), nous avons constaté que les isolats appartiennent aux 6 genres différents : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor* et *Penicillium* (**Tableau 16**). Néanmoins, afin de confirmer ces constatations et d'en déduire les espèces exactes de chaque isolat, une identification approfondie, par voie moléculaire, est recommandée.

L'identification de ces genres a été réalisée selon les critères décrits dans la littérature (**Botton et al., 1990 ; Guiraud, 1998**).

Les isolats FS2, FS3, FS5, FS7, FS8, FS9, FS10, FS11, FS12, FS14 et FS17 appartiennent au genre *Aspergillus* par ce qu'ils répandent aux critères suivants :

Un thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule, phialides formées directement sur la vésicule (têtes conidiennes unisériées) ou portées sur des métules ou stérigmates (têtes conidiennes bisériées). Conidies sèches , en chaines divergentes ou associées en colonnes compactes , unicellulaires , sub-globuleuses ou elliptiques , lisses, hyalines ou pigmentées en jaune , brun , noir ou vert . L'ensemble vésicule, métules, phialides, conidies constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*. Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud, PDA), ils forment des colonies poudreuses ou granuleuses. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais, il peut brunir ou rougir avec l'âge (**Botton et al., 1990**).

Les isolats FS4 et FS16 appartiennent au genre *Alternaria* par ce qu'ils sont caractérisés par:

Un thalle noir, vert olivacé, des conidies bourgeonnées à travers un ou plusieurs pores de la paroi du conidiophore, en chaines acropétales, noires, souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement (**Guiraud, 1998**).

Les isolats FS6 et FS18 appartiennent au genre *Fusarium* par ce qu'ils sont caractérisés par:

Un thalle blanc à gris, rose et orange. Les conidiophores sont parfois très ramifiés formant sur le thalle des coussinets et portant des masses de spores d'aspect gras. Les phialides sont plus ou moins allongées pouvant produire deux types de conidies : Des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriséptées, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon; des microconidies petites, septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes (certaines

espèces produisent les deux types de spores , d'autres ne forment que des macroconidies) (**Botton et al., 1990**).

Les trois moisissures FS13, FS19 et FS20 appartiennent au genre *Penicillium* car elles présentent les critères suivants:

Un thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores. Ces derniers, peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches, hyalins, lisses ou granuleux, simples ou ramifiés, terminés par un pénicille. Les pénicilles sont constitués soit d'un simple verticille de phialides (monoverticillés) soit d'un verticille de ramifications (métules) portant les phialides (biverticillés), soit de plusieurs verticilles successifs comportant des ramifications, des métules et des phialides. Les phialides sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau. Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces. Les conidies sont disposées en longues chaînes, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (**Botton et al., 1990**).

La souche FS1 appartient au genre *Geotrichum* par ce qu'elle représente les critères suivants :

Colonie plate, plâtreuse, d'un aspect rayonné feutré, couleur toujours d'un blanc pur. Centre plus ou moins surélevé et contour très régulier. Les filaments mycéliens forment de nombreuses arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités de tailles variables par des articulations du mycélium au niveau des doubles cloisons présentant un aspect de levure (**Guiraud, 1998**).

La souche FS15 appartient au genre *Mucor* par ce qu'elle est composée d'un thalle floconneux, blanc. Absence de stolons. Sporocystophores dressés, toujours terminés par un sporocyste, simples ou à ramification sympodiale, monopodiale ou mixte. Sporocystes globuleux, blancs ou un peu colorés. Les spores sont de formes variées lisses ou granuleuses (**Guiraud, 1998**).

L'étude des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques est suffisante pour identifier les genres fongiques. Cependant, certaines caractéristiques physiologiques ont été étudiées, il s'agit de la tolérance au NaCl (20% v/v) et la tolérance à des températures élevées. Les résultats ont révélé que les isolats FS5, FS11, FS13 et FS20 peuvent tolérer des concentrations de NaCl plus de (20% v/v) et les isolats FS15, FS11 et FS19 peuvent se développer à 47 °C.

L'identification des 20 souches de moisissures a permis de mettre en évidence la présence de 6 genres : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* , *Geotrichum*, *Mucor* et *Penicillium* avec une forte prédominance du genre *Aspergillus* suivi par le genre *Penicillium*. La forte prédominance

des *Aspergillus* est due à leur pouvoir élevé de sporulation et à leur capacité de coloniser des milieux très différents, même les plus complexes, contrairement aux autres genres qui se sont présentés en nombre réduit. Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud ; ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, les denrées alimentaires, les céréales et dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air. Quant au genre *Penicillium*, ce sont des champignons très communs dans l'environnement, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition et les céréales (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

A la lumière des résultats obtenus, les souches *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS 11 et *Penicillium sp.* FS 13 ont montré leur capacité intéressante à produire des agents tensioactifs, en utilisant le gasoil comme source de carbone. De plus, ces souches ont présenté aussi une caractéristique physiologique importante, il s'agit de l'halotolérance, vu qu'elles peuvent se développer à 20% de NaCl. Ce qui suggère leur fort potentiel en biotechnologie pour la production de biomolécules stables et efficaces dans des conditions extrêmes de salinité. Dans la suite de ce travail, nous avons suivi la production des biosurfactants par les souches *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS 11 et *Penicillium sp.* FS13.

III.4. Optimisation de la production des biosurfactants par les souches sélectionnées

Afin d'obtenir de meilleurs rendements, nous avons étudié les principaux facteurs affectant la production des biosurfactants : température, pH, sources de carbone et d'azote.

III.4.1. Effet de la température

La température est un paramètre important pour le développement microbien. En effet, différents processus microbiens sont affectés par même un petit changement de température (Santos et al., 2016) . L'effet de différentes températures d'incubation sur la production des biosurfactants par *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS11 et *Penicillium sp.* FS13 est représenté dans la **Figure 32**. Les résultats ont montré que les quatre souches ont produit des biosurfactants avec des valeurs de E_{24} élevées dans une gamme de température comprise entre 25 et 40 °C. Néanmoins, chaque souche est caractérisée par une température qui assure une croissance et une production optimale. La production maximale des

biosurfactants pour les deux souches levuriennes a été obtenue à 30 °C ($E_{24} > 70\%$). Tandis que la production maximale des biosurfactants a été obtenue à 28 °C pour *Aspergillus sp.* FS11 ($E_{24} = 65,12\%$) et 25 °C pour la souche *Penicillium sp.* FS13 ($E_{24} = 70\%$) (**Figure 32**).

Ces résultats sont en corrélation avec des travaux antérieurs. **Padmapriya et al. (2013)**, suite à l'étude de la production des biosurfactants par des espèces de genre *Candida*, ils ont noté que la température optimale pour la production des biosurfactants se situait entre 30 et 35 °C.

En outre, la littérature a toujours souligné que la température la plus favorable pour la production des biosurfactants par les espèces fongiques était de 30 °C, comme chez diverses espèces de *Candida*: *Candida sp.* SY16, *Candida bombicola*, *Candida batistae* et autres genres fongiques ; *Ustilago Maydis*, *Cryptococcus sp.* VITGBN2 et *Fusarium sp.* BS-8, respectivement (**Cooper et Paddock, 1984 ; Kim et al., 1999 ; Konishi et al., 2008; Liu et al., 2011 ; Basak et Das, 2013 ; Qazi et al., 2014**).

Néanmoins, **Mahdy et al. (2012)** ont rapporté que la température optimale pour la production des biosurfactants chez certaines espèces de *Candida* était généralement de 20 °C.

De même, **Kiran et al. (2009)** ont noté que l'activité tensioactive d'une espèce marine *Aspergillus ustus* MSF3 était maximale lorsque la souche était cultivée à 20 °C. Cependant, la production maximale des biosurfactants par *Trichosporon asahii* a été enregistrée à 35 °C (**Chandran et Das, 2010**).

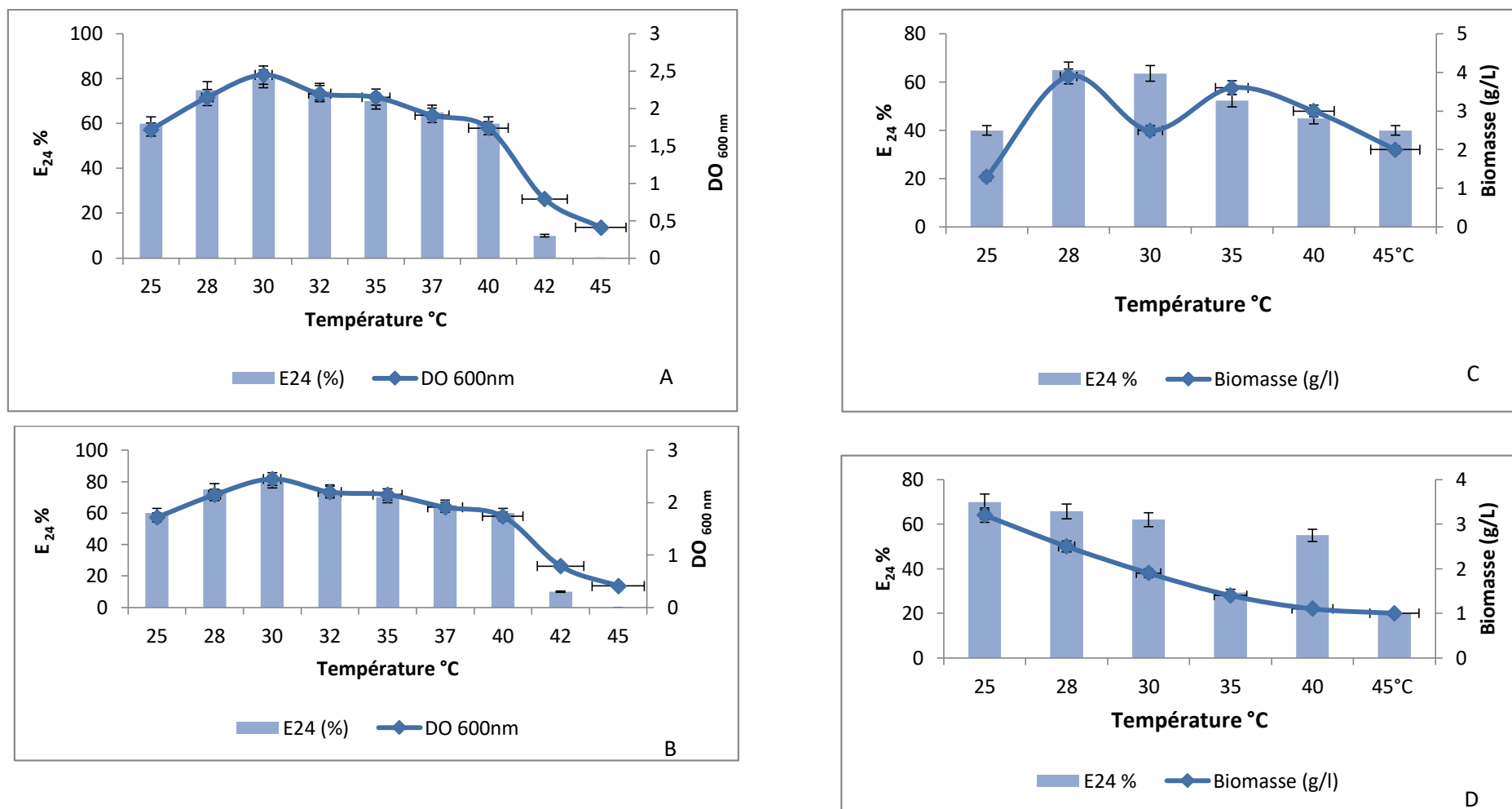


Figure 32 : Effet de la température sur la croissance et la production des biosurfactants ; **(A)** *Cryptococcus sp.* YLF , **(B)** *Rhodotorula sp.* YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), **(C)** *Aspergillus sp.* FS11, **(D)** *Penicillium sp.* FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).

III.4.2. Effet du pH

L'effet du pH sur la production des biosurfactants par les 4 souches a été étudié en variant les valeurs de pH de 2 à 8. Selon les résultats présentés dans la **Figure 33**, les quatre souches ont produit des biosurfactants à différents pH avec des valeurs de $E_{24} > 60\%$. Cependant, le meilleur pH = 6 a été obtenu pour la croissance de *Cryptococcus* sp.YLF et la production des biosurfactants ($E_{24} = 71,42 \pm 0,24 \%$) a été obtenu à pH 6 pour *Cryptococcus* sp.YLF, pH 5,5 ($E_{24} = 72 \pm 0,5 \%$) pour *Rhodotorula* sp. YBR, pH 5 ($E_{24} = 78,94 \pm 0,47 \%$) pour *Aspergillus* sp. FS11 et pH 6 ($E_{24} = 70,58 \pm 0,31 \%$) pour *Penicillium* sp. FS13.

La production des biosurfactants a été fortement inhibée à pH 2 pour les deux moisissures, contrairement aux deux levures. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Bednarski et al. (2004)**, confirmant que le pH 5,5 a permis d'atteindre le rendement maximal en glycolipides par *Candida antarctica* et *Candida apicola*. En outre, plusieurs études ont montré que les espèces du genre *Candida* produisent des biosurfactants dans une large gamme du pH 5 à 7 pour *Candida glabrata* UCP 1002, pH 5,0 pour *Candida lipolytica* et pH 6,0 pour *Candida batistae*, respectivement (**Kim et al., 1999; Sarubbo et al., 2006; Konishi et al., 2008; Bhardwaj et al., 2013**). De plus, *Aspergillus ustus* a atteint son rendement maximal en biosurfactants à pH 5,5 (**Kiran et al., 2009**).

Cependant, **Cirigliano et Carman (1984)** ont rapporté que le pH 7,8 a permis une meilleure production des glycolipides par *Candida* sp. SY16. De même, **Mahdy et al. (2012); Padmapriya et al. (2013)**, ont étudié la production des biosurfactants à partir de certaines espèces de *Candida*, ils ont montré que le meilleur pH pour la production des biosurfactants est situé entre 7 et 8. En outre, **Zinjarde et Pant (2002)** ont noté que la production maximale des biosurfactants par *Yarrowia lipolytica* était à pH 8.

Chandran et Das (2010), ont indiqué que la concentration des biosurfactants produits par *Trichosporon asahii* était maximale à pH 7,5. De même, **Thaniyavarn et al. (2008), Basak et Das (2013) et Qazi et al. (2014)**, ont également noté que le pH le plus convenable pour la production des biosurfactants par *Pichia anamola*, *Cryptococcus* sp. VITGBN2 et *Fusarium* sp. BS-8, respectivement était pH 7.

Cependant, certaines espèces produisent des biosurfactants dans des pH acides, à titre d'exemple **Liu et al. (2011)** ont noté que le meilleur pH pour la production des glycolipides par *Ustilago Maydis* était pH 4.

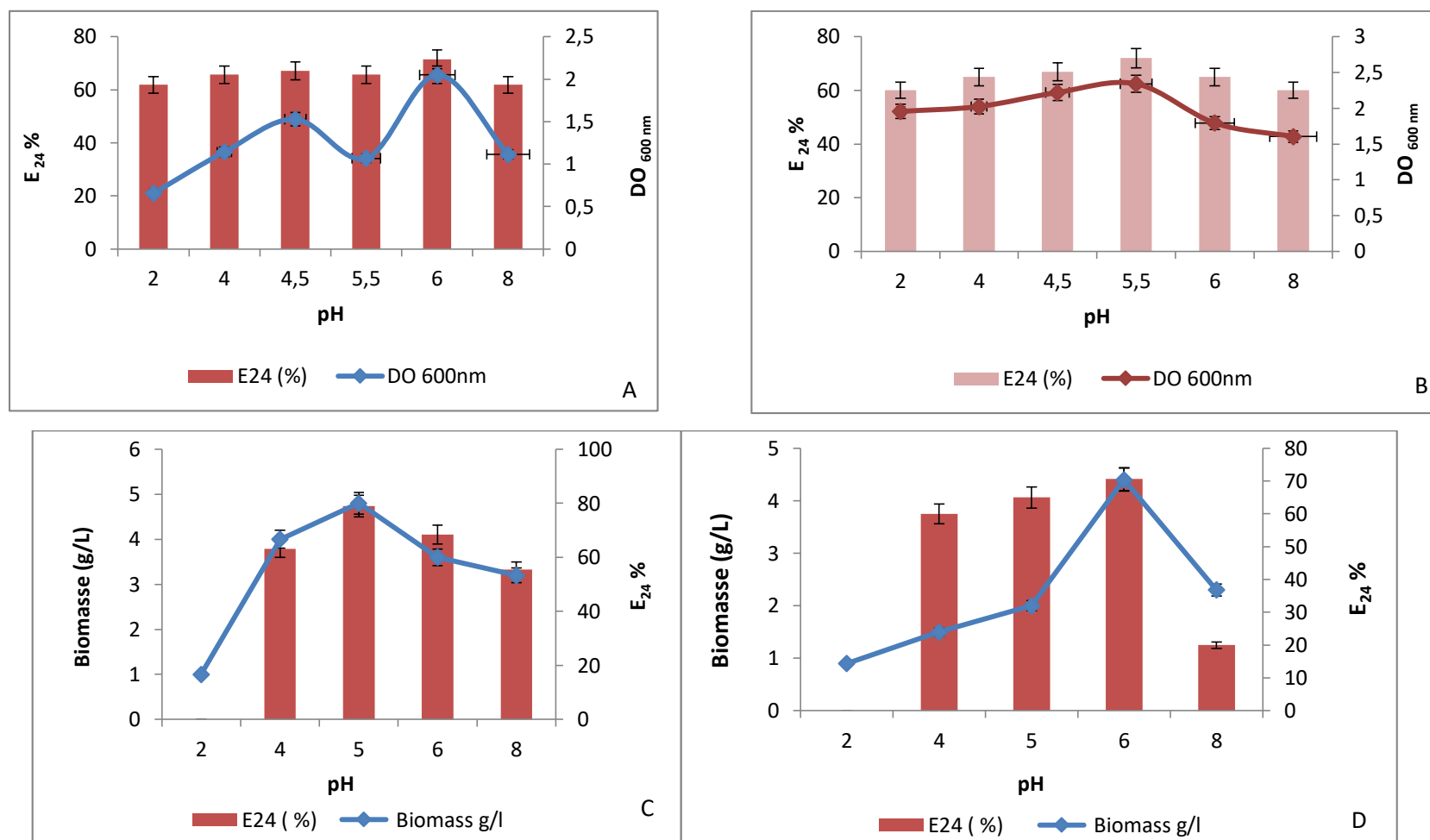


Figure 33: Effet de pH sur la croissance et la production des biosurfactants; **(A)** *Cryptococcus* sp. YLF, **(B)** *Rhodotorula* sp. YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), **(C)** *Aspergillus* sp. FS11, **(D)** *Penicillium* sp. FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).

III.4.3. Effet de la source d'azote

Plusieurs sources d'azote organiques et inorganiques ont été testées pour la production des biosurfactants par les quatre souches performante. L'extrait de levure était la source d'azote la plus acceptée, qui a abouti à une production maximale des biosurfactants par les quatre souches (**Figure 34**). **Santos et al. (2016)**, ont souligné l'importance majeure de l'azote pour la production des biosurfactants. Des rendements élevés en sophorolipides ont été obtenus par *Torulopsis bombicola* et *Candida bombicola* en utilisant l'extrait de levure et l'urée comme source d'azote, respectivement (**Deshpande et Daniels, 1995**).

Hasani-Zadeh et al. (2018), ont trouvé que l'extrait de levure était la meilleure source d'azote pour la production des biosurfactants par *Mocur circinelloides*. De plus, des rendements élevés en biosurfactants ont été obtenus en utilisant le nitrate d'ammonium et l'extrait de levure par *Candida sp.* SY16, *Candida lipolytica* et *Candida glabrata* (**Cirigliano et Carman, 1984 ; Sarubbo et al., 2006; Konishi et al., 2008**). En outre, l'extrait de levure a été rapporté comme le substrat préféré pour l'optimisation de la production des biosurfactants par plusieurs souches fongiques (**Bhardwaj et al., 2013 ; Qazi et al., 2013**).

Cependant, **Morita et al. (2011)** ont montré que parmi différentes sources d'azote organiques et inorganiques, l'urée a donné le rendement le plus élevé en glycolipides par *Ustilago scitaminea*.

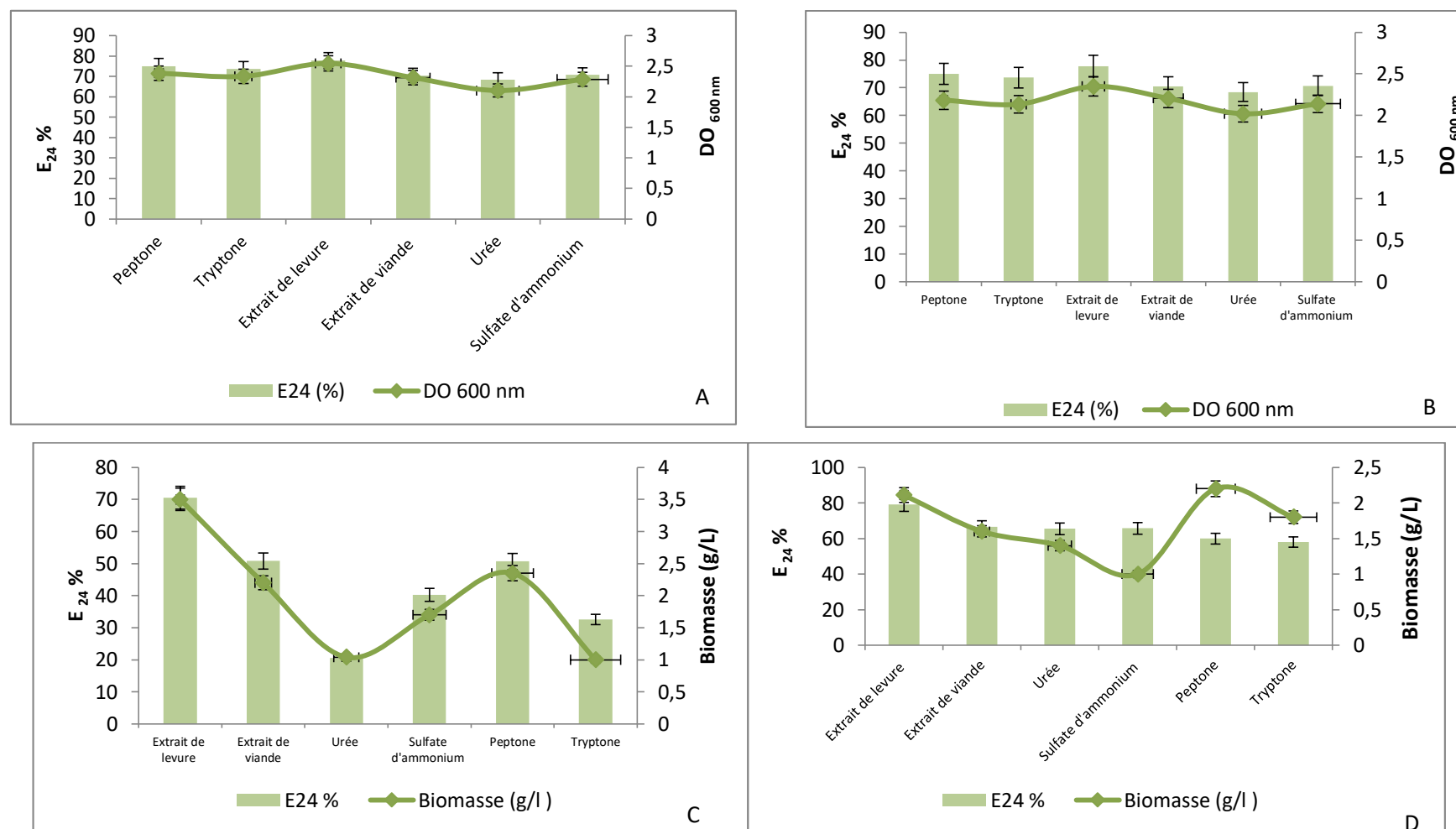


Figure 34: Effet de la source d'azote sur la croissance et la production des biosurfactants; **(A)** *Cryptococcus sp. YLF*, **(B)** *Rhodotorula sp. YBR* (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), **(C)** *Aspergillus sp. FS11*, **(D)** *Penicillium sp. FS 13* (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).

III.4.4. Effet de la source de carbone

La source de carbone joue un rôle important dans la croissance et la production des biosurfactants et elle varie d'une espèce à l'autre (**Déziel et al., 2000**). D'après les résultats, le glucose s'est avéré la source de carbone la plus préférable par les quatre souches (**Figure 35**). Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont révélé que la présence de glucose dans le milieu de culture favorise la production des biosurfactants (**Daverey et Pakshirajan, 2009 ; Silva et al., 2014**). Une production élevée des biosurfactants a été obtenue par *Candida lipolytica* en utilisant un milieu qui contient 1,5% de glucose (**Sarubbo et al., 2001**). *Candida antarctica* et *Candida apicola* ont respectivement produit 13,4 et 7,3 g /L des sophorolipides quand le glucose a été utilisé à une concentration de 5% (**Bednarski et al., 2004**). **Kiran et al. (2009)**, ont rapporté que la meilleure source de carbone pour la production des biosurfactants par *Aspergillus ustus* MSF3 était le glucose.

De plus, **Liu et al. (2011)** ont noté que le glucose était la meilleure source de carbone pour la production des glycolipides par *Ustilago Maydis*.

D'autres études ont aussi révélé que la meilleure source de carbone pour la production des biosurfactants était le glucose mélangé avec l'huile. Un bon rendement de 70 g/L a été obtenu par *Torulopsis bombicola* lorsque le glucose et l'huile végétale ont été utilisés comme source de carbone pour la production des biosurfactants (**Cooper et Paddock, 1984**).

À une concentration de 80 g/L et 40 g/L de glucose et de l'huile de soja, respectivement, un rendement maximal en sophorolipides a été enregistré par *Torulopsis bombicola* (**Kim et al ., 1997**). Des rendements encore plus élevés en sophorolipides (120 g/L) ont été obtenus avec *Candida bombicola*, en utilisant le glucose et l'huile végétale comme source de carbone (**Casas et Ochoa, 1999**).

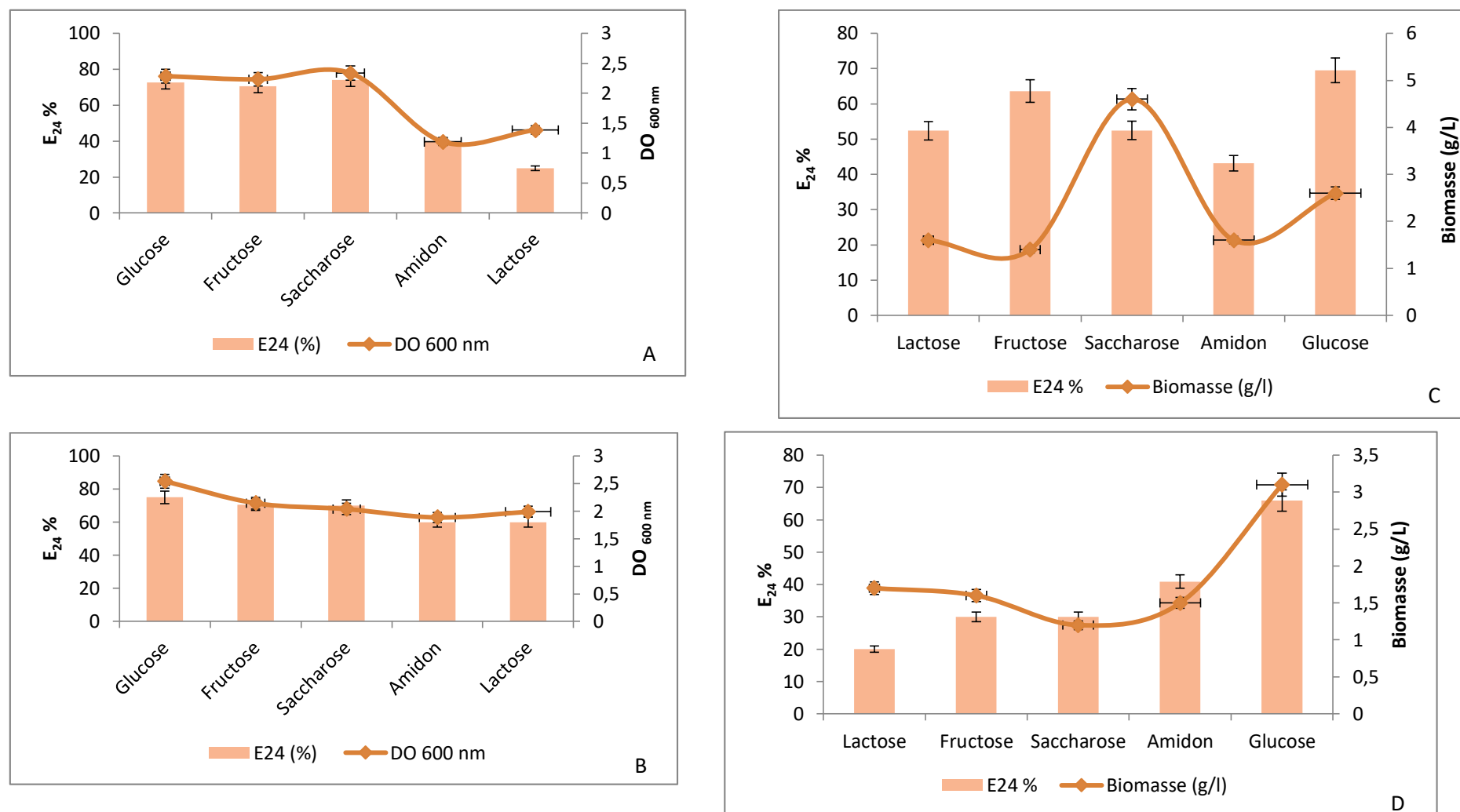


Figure 35: Effet de la source de carbone sur la croissance et la production des biosurfactants ; **(A)** *Cryptococcus* sp. YLF , **(B)** *Rhodotorula* sp. YBR (milieu YPG à 30 °C et 200 rpm pendant 72 h), **(C)** *Aspergillus* sp. FS11, **(D)** *Penicillium* sp. FS 13 (milieu PDB à 25 °C et 150 rpm pendant 144h).

III.5. Cinétique de croissance et de production des biosurfactants sur milieux de culture à base des sous-produits agro-industriels pour les quatre souches

La recherche d'une source de carbone alternative et moins chère afin de réduire le coût de production de ces biomolécules est envisagée. Dans ce contexte, des fermentations ont été réalisées sur différents milieux de culture à base de sous-produits agro-industriels (milieu de culture à base de lactosérum, milieu de culture à base de la liqueur de trempage de maïs CSL, milieu de culture à base des margines, milieu de culture à base de grignons d'olives, milieu de culture à base de jus de datte et milieu de culture à base de la mélasse), afin de choisir le substrat bon marché le plus convenable pour la production des biosurfactants par les quatre souches sélectionnées.

D'après la **Figure 36A**, nous remarquons que tous les milieux de cultures testés, ont un effet positif sur la croissance et la production des biosurfactants par *Cryptococcus sp.* YLF, qui a atteint des densités optiques et des valeurs de E_{24} élevées ($> 60\%$) après 72h d'incubation à 30 °C et 200 rpm. Du côté biomasse cellulaire, les milieux les plus intéressants sont les milieux à base de jus de datte et de lactosérum avec des rendements respectifs de $2,25 \pm 0,12$ et $1,59 \pm 0,05$ (g /L). Quant à la réduction de la TS, le milieu à base de jus de datte s'est avéré le plus convenable (TS= 40 mN/m).

La **Figure 36 B** présente le suivi de la fermentation en batch sur milieux à base des sous-produits agro-industriels par *Rhodotorula sp.* YBR après 72 h d'incubation à 30 °C et 200 rpm. Nous constatons que l'optimum de croissance et de production des biosurfactants a été enregistré sur le milieu de culture à base des margines (E_{24} $90 \pm 0,04$ %, TS $35 \pm 0,05$ mN/m), $DO_{600\text{ nm}}$ $2,4 \pm 0,15$ et biomasse $1,95 \pm 0,2$ g/L). Le minimum de production et d'activité de surface a été enregistré sur le milieu de culture à base de CSL (E_{24} $40 \pm 0,14$ %, TS $45 \pm 0,05$ (mN/m), $DO_{600\text{ nm}}$ $1,66 \pm 0,15$ et biomasse $0,94 \pm 0,08$ g/L).

Les résultats de la cinétique de fermentation sur milieux à base des sous-produits agroindustriels pour les deux souches fongiques *Aspergillus sp.* FS 11, *Penicillium sp.* FS 13, sont représentés dans les **Figures 36C et 36D**, respectivement. D'après les résultats, nous avons noté que la croissance et la production maximale des biosurfactants (**Figure 36C**) ont été enregistrées sur le milieu de culture à base des margines (E_{24} $78 \pm 0,08$ %, TS $41 \pm 0,05$ (mN/m) et biomasse $2,5 \pm 0,05$ g/L) pour *Aspergillus sp.* FS 11 et sur milieu à base du lactosérum pour *Penicillium sp.* FS 13 (E_{24} $70 \pm 0,05$ %, TS $40 \pm 0,08$ mN/m et biomasse $1,7 \pm 0,08$ g/L).

D'après ces résultats, il ressort que les quatre souches ont produit des biosurfactants sur certains substrats bon marché mieux que les milieux standards YPG et PDB utilisés comme témoins.

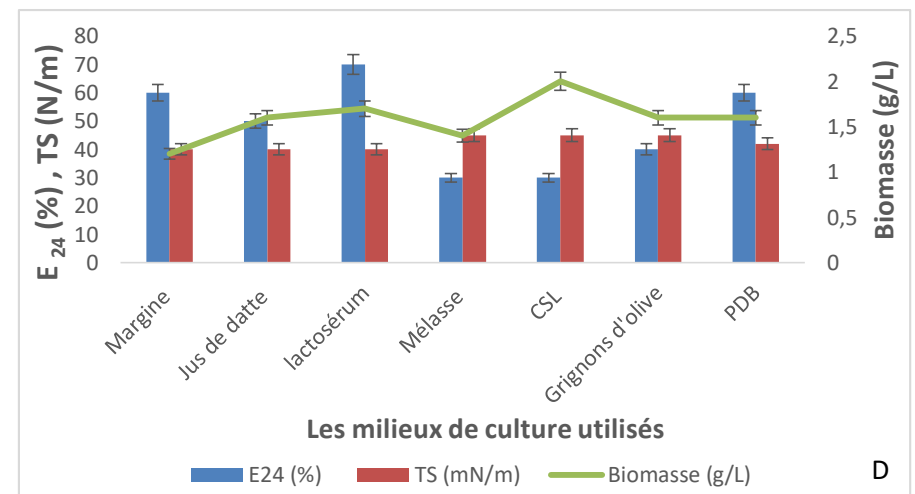
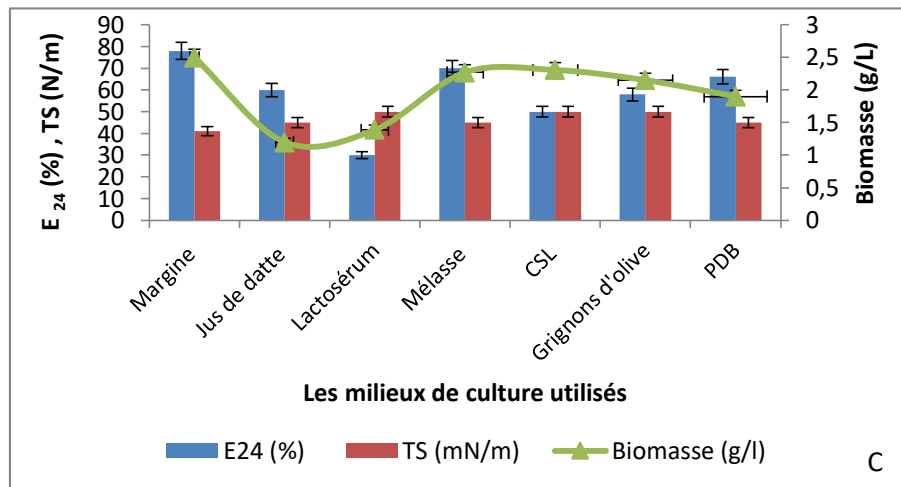
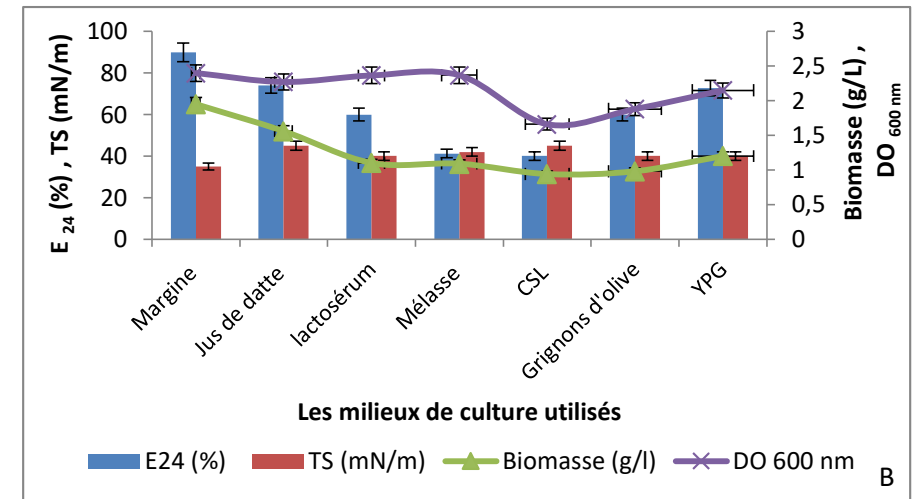
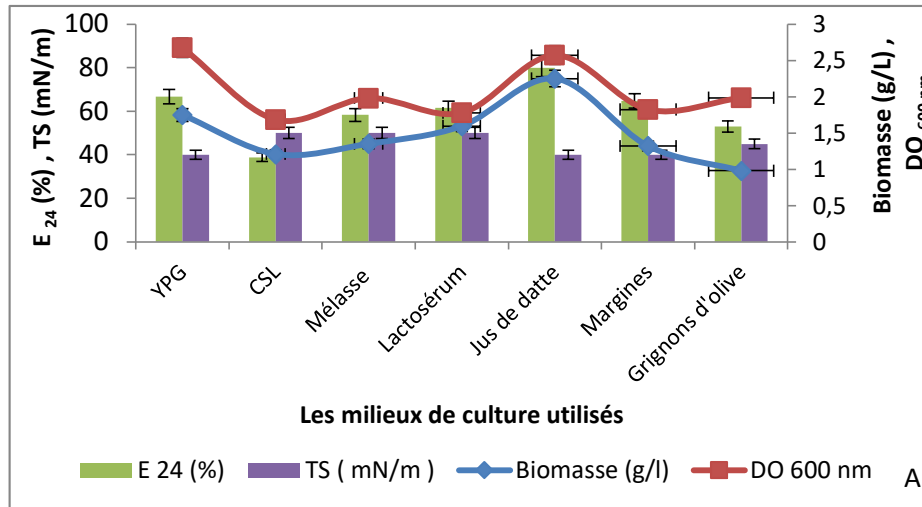


Figure 36 : Cinétique de croissance et de production des biosurfactants par : (A) *Cryptococcus* sp. YLF, (B) *Rhodotorula* sp. YBR (30 °C et 200 rpm pendant 72 h), (C) *Aspergillus* sp. FS11, (D) *Penicillium* sp. FS 13 (25 °C et 150 rpm pendant 144h) sur milieux de culture à base des sous-produits agroindustriels.

III.6. Cinétique de production des biosurfactants par les quatre souches en bioréacteur

On se référant aux résultats précédents, les milieux de culture qui ont donné les meilleurs rendements, pour les 4 souches ont été sélectionnés pour une fermentation discontinue dans un bioréacteur Minifors Bioreactor (INFORS HT) de 2,5 L.

III.6.1. Cinétique de production des biosurfactants par *Cryptococcus sp* .YLF sur milieu de culture à base de jus de datte.

La **Figure 37** représente la cinétique de production des biosurfactants par *Cryptococcus sp* .YLF sur milieu de culture à base de jus de datte riche en sucre (20 g/L).

La production des biosurfactants prend place dès les 1^{ères} heures de fermentation, pour atteindre un maximum de production durant la phase stationnaire. Cette production est directement liée à la croissance cellulaire, quand la biomasse augmente, l'indice E_{24} augmente et la TS diminue. Une concentration maximale de $7,8 \pm 0,09$ g/L de biomasse a été atteinte après 48 h, et une $DO_{600\text{ nm}}$ de 2,37 lorsque la levure a atteint la phase de croissance stationnaire. La valeur de l'indice E_{24} la plus élevée ($80\% \pm 0,15$) a été enregistrée après 48h de fermentation, coïncidant avec la chute de la tension superficielle TS (de 72 à 40 mN/m). Ces valeurs de E_{24} et TS sont restées stables jusqu'à la fin de la fermentation. Des résultats similaires ont été obtenus pour d'autres levures productrices des biosurfactants (**Sarrubo et al., 2007 ; Luna et al., 2016**).

Nos résultats concernant la réduction de la tension superficielle sont cohérents avec de nombreux travaux publiés. En effet, **Morita et al. (2011)** ont rapporté des valeurs de TS de 43,1 mN/m à pH 4,0 et de 41,9 mN/m à pH 7,0 chez *Cryptococcus humicola* JCM 1461. Cependant, **Basak et Das (2013)**, ont noté que les biosurfactants produits par *Cryptococcus sp*. VITGBN2 ont abaissé la tension superficielle de $72 \pm 0,5$ à $33 \pm 0,5$ mN/m.

De même, **Accorsini et al. (2012)**, en étudiant la production des biosurfactants par une levure LBPF 9, ils ont rapporté les résultats suivants : la concentration du produit final était de 2,20 g/L, une TS finale de 42 mN/m, après 168 h de culture. Cependant, **Sarrubo et al. (2007)** en étudiant la production des biosurfactants par *Candida lipolytica* dans un milieu contenant un mélange de l'huile végétale et du glucose comme source de carbone, ils ont signalé que *Candida lipolytica* a réduit la tension superficielle de 71 à 30 mN/m. De plus, le biosurfactant produit par *Candida sphaerica* a diminué la TS de 72 à 27 mN / m (**Luna et al., 2013**).

La consommation de sucre était de $20 \pm 0,1$ à $4,88 \pm 0,15$ g /L et a été atteinte après 120 h de fermentation. Le pH initial du milieu était 6,0, et n'a pas changé durant la période de fermentation. **Bednarski et al. (2004)**, ont étudié la production des biosurfactants par *Candida*

antarctica ATCC20509 et *Candida apicola* ATCC96134 et ils ont constaté que l'acidité du milieu est un facteur important et il est en corrélation avec la synthèse des glycolipides.

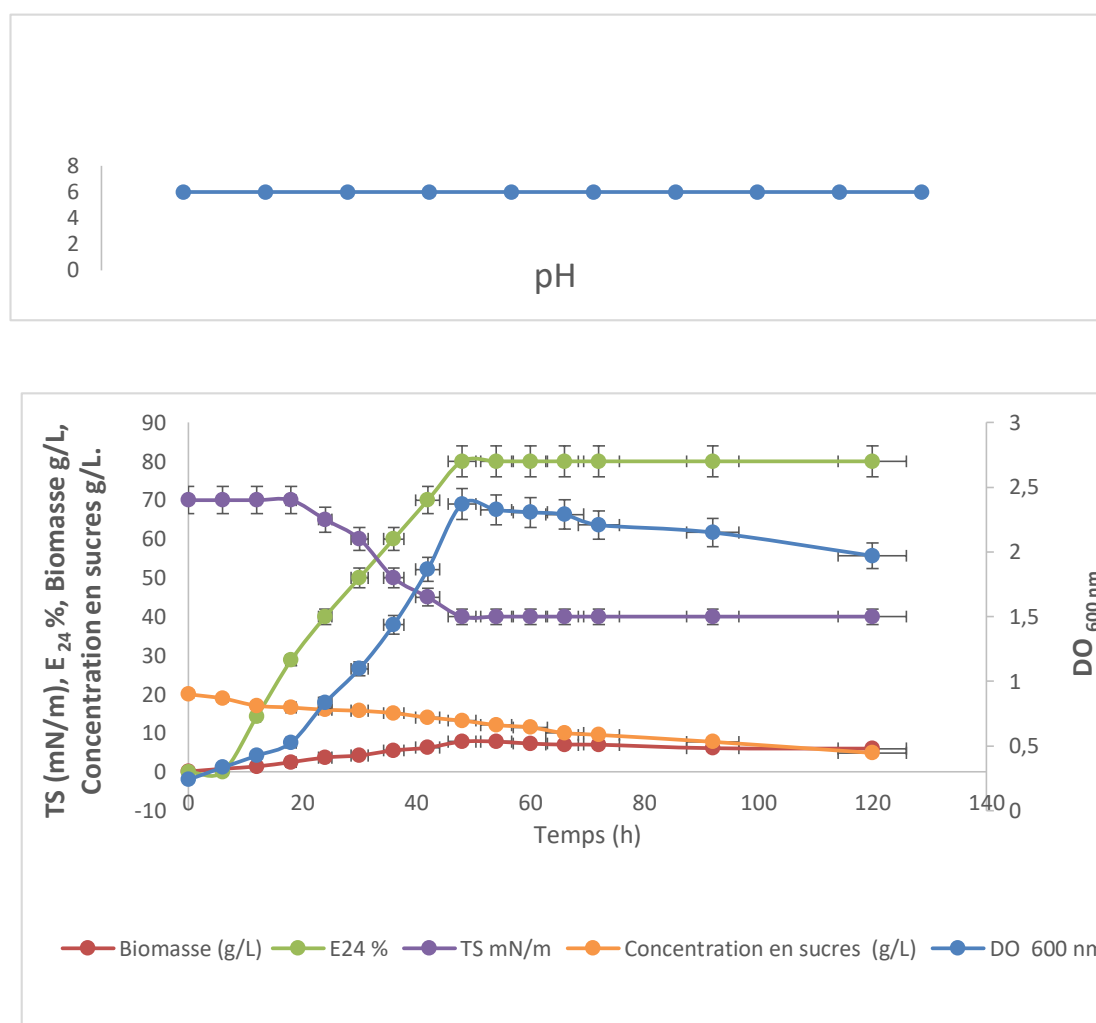


Figure 37 : Cinétique de production des biosurfactants par *Cryptococcus sp.* YLF sur milieu de culture à base de jus de datte à 30°C, pH 6 et 200 rpm.

III.6.2. Production des biosurfactants à partir de la souche halophile *Cryptococcus sp.* YLF en conditions salines (2.5 M)

En raison de la tolérance de la souche *Cryptococcus sp.* YLF à une concentration élevée de NaCl (plus de 20%). La production des biosurfactants par la levure *Cryptococcus sp.* YLF a été également réalisée dans un Bioréacteur Minifors de 2,5 L (Infors HT), contenant 1000 ml du milieu à base de jus de datte supplémenté de 0,2 % d'extrait de levure comme source

d'azote et sous des conditions de salinité élevée (2.5 M). La température, la vitesse d'agitation et le pH ont été fixés à 30 °C, 200 rpm et 6, respectivement.

La cinétique de production de biosurfactants de *Cryptococcus sp.* YLF en culture discontinue sur un milieu de jus de dattes brut à 2% (p/v) en conditions salines est représentée dans la **Figure 38**. La concentration maximale de biomasse de 12,98 g /L a été atteinte après 72 h, lorsque la levure a atteint la phase de croissance stationnaire. La plus grande activité émulsifiante (80%) a été obtenue après 48h de fermentation, coïncidant avec la chute de TS (de 70 à 40 mN/m), ces résultats sont corrélés aux résultats obtenus en absence de NaCl. Le pH du milieu a commencé à 6,0, a diminué à environ 5,0 pendant 48 h de la phase de croissance exponentielle et est resté proche de 5,0 jusqu'à la fin de la période de culture. Cette étude s'agit du premier rapport sur la production de biosurfactants à haute salinité (NaCl 2,5 M) à partir d'un sous-produit agro-industriel. L'utilisation de déchets agro-industriels avec une concentration appropriée d'éléments nutritifs pour la production de biosurfactants est une étape nécessaire pour accroître la production au niveau industriel avec un coût moindre pour donner aux biosurfactants la place qu'ils méritent économiquement.

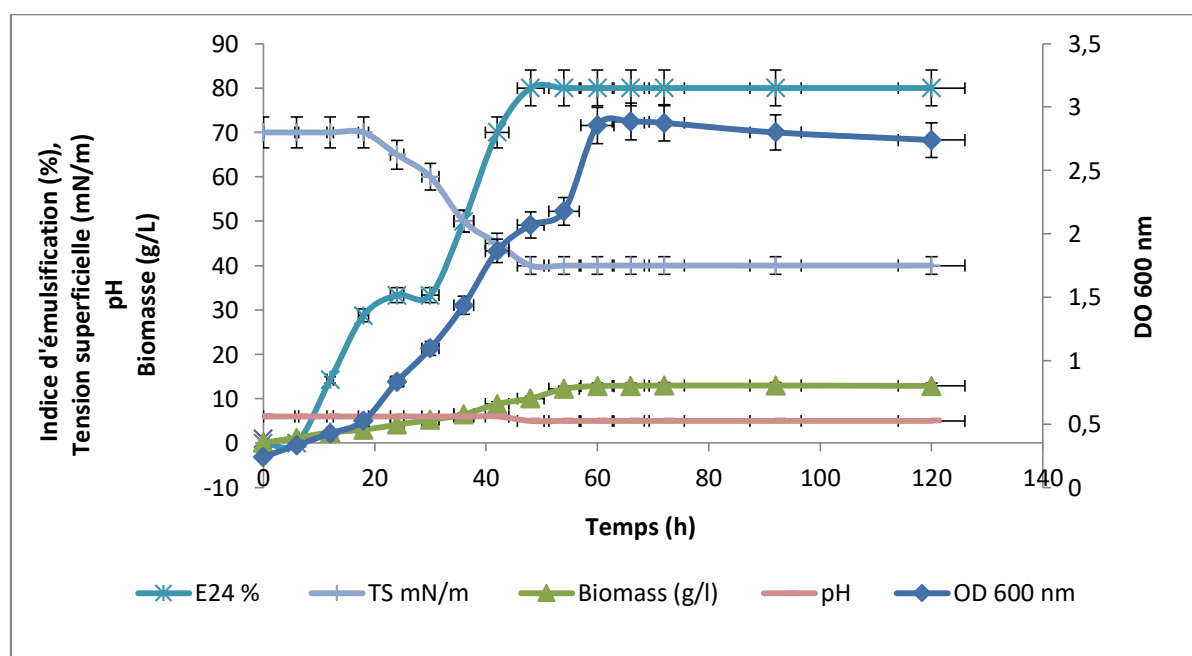


Figure 38 : Cinétique de production des biosurfactants par *Cryptococcus sp.* YLF sur milieu de culture à base de jus de dattes à 30°C, pH 6, 200 rpm, sous conditions salines (NaCl 2,5 M)

III.6.3. Cinétique de production des biosurfactants par *Rhodotorula sp* . YBR sur milieu de culture à base des margines

La **Figure 39** présente le suivi de la fermentation en batch de la souche *Rhodotorula sp* .YBR sur milieu de culture à base des margines. D'après les résultats, nous avons constaté que la valeur de E_{24} ($90 \pm 0,10\%$) a augmenté proportionnellement avec la biomasse, en revanche la TS a diminué pour atteindre après 54 h un maximum estimé à 35 mN/m. La concentration en biomasse obtenue était de $10,80 \pm 0,2$ g/L. Le pH initial de milieu de fermentation était de 5,5 et n'a pas varié tout au long de l'expérience. La consommation de sucre était de $20 \pm 0,01$ à $4,00 \pm 0,25$ g/L et a été atteinte après 120 h de fermentation.

Les valeurs de TS observées sont similaires à celles décrites pour les biosurfactants produits par des levures cultivées sur des milieux à base des sous-produits agroindustriels dans les études suivantes : *Rhodotorula babjevae* YS3 35 mN/m (**Sen et al., 2017**) , *Rhodotorula mucilaginosa* 35 mN/m (**Chandran et Das , 2011**) et *Candida antartica* 35 mN/m (**Berdnarski et al., 2004**). **Silva et al. (2014)**, ont signalé que les biosurfactants produits par la souche fongique *Cunninghamella echinulata* ont réduit la TS après 48 h de croissance sur milieu de culture à base de sous-produit agricoles à des valeurs inférieures à 40 mN/m et continuellement jusqu'à 36,0 mN/m, avec un $E_{24} = 90\%$, ces résultats sont similaires aux notre.

Dans une autre étude, la production des biosurfactants par une levure *Aureobasidium thailandense*. LB01 a été rapportée pour la première fois, en utilisant différents sous-produits agro-industriels (liqueur de maïs, mélasse et margines). La production des biosurfactants la plus élevée (139 ± 16 mg/L) a été obtenue dans un milieu de culture contenant de l'extrait de levure (2 g/L), des margines (1,5%), après 48 h de fermentation (**Meneses et al., 2017**). De plus, le biosurfactant produit pouvait réduire la tension superficielle de 70 mN/m à 34,2 mN/m.

Dans le même contexte, **Sen et al. (2017)** ont décrit le profil de la production des biosurfactants par *Rhodotorula babjevae* YS3, ils ont signalé que la croissance de la levure a commencé sans temps de latence et la phase exponentielle a été prolongée jusqu'à 168 h. La valeur de biomasse maximale (16,61 g/L) a été enregistrée après 192 h de croissance. Le rendement en biosurfactant était (19,0 g/L) après 72 h. Cependant, il a chuté d'une manière significative après 216 h (12,23 g/L), le pH de milieu de fermentation était de 7,0 et n'a pas varié de manière significative tout au long de l'expérience. La TS de la culture a été réduite de 70 à 35 mN/m après 24 h de culture au début de la phase exponentielle, et elle est restée stable tout au long de la période d'incubation (240 h).

Bien que le biosurfactant produit par *Rhodotorula sp.* YBR sur milieu de culture à base des margines a présenté une très bonne activité de surface, certaines espèces de *Candida* ont réduit la TS à des valeurs inférieures à 30 mN/m. A titre d'exemple, *Candida guilliermondii* UCP0992 cultivée sur un milieu contenant 2,5% de l'huile de friture, 2,5% de liqueur de maïs et 4,0% de mélasse a réduit la tension de surface de 72 à 28 mN/m (Santos et al., 2016).

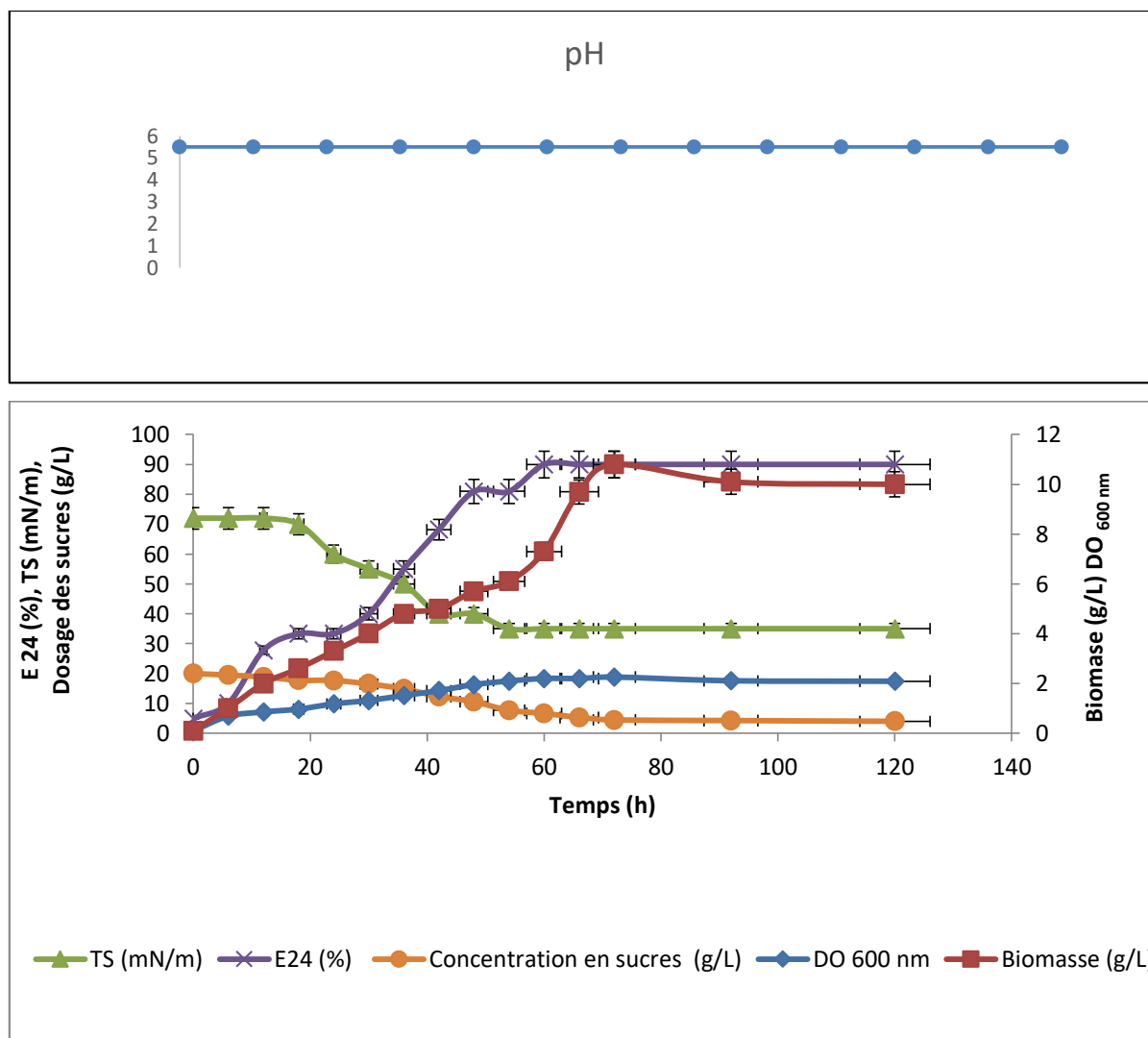


Figure 39 : Cinétique de production des biosurfactants par *Rhodotorula sp.* YBR sur milieu de culture à base des margines sous les conditions opératoires (30°C, pH 5,5 et 200 rpm).

III.6.4. Cinétique de production des biosurfactants par *Aspergillus sp.* FS11 sur milieu de culture à base des margines

La **Figure 40** présente le suivi de la fermentation en batch de la souche *Aspergillus sp.* FS11 sur milieu de culture à base des margines. La biomasse atteint sa valeur maximale au bout du 7^{ème} jour de fermentation (biomasse égale à $8,77 \pm 0,05$ g/L) correspondant à la valeur d'indice E_{24} la plus élevée ($76 \pm 0,28$ %) et aussi à la valeur de la TS la plus basse qui est égal à $42 \pm 0,20$ mN/m (**Figure 40**). La production des biosurfactants prend place dès le 2^{ème} jour de fermentation, pour atteindre un maximum de production durant la phase stationnaire avec une concentration en biosurfactant de $11,15 \pm 0,7$ g/L. Cette production est directement liée à la croissance cellulaire, quand la biomasse augmente la tension superficielle diminue. Le pH a légèrement augmenté après le 8^{ème} jour de fermentation, parallèlement à cette augmentation, une légère augmentation de valeur de la TS et une diminution légère de l'indice E_{24} suivi de la diminution de la biomasse qui indique le début de la phase de déclin (**Figure 40**). La consommation des sucres a débuté de 20 jusqu'au 6,8 g/L au 10^{ème} jour de fermentation. **Mercadé et al. (1993)**, ont utilisé un milieu de culture à base des margines pour la production des biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* pour la première fois. **Colak et Kahraman (2013)**, ont rapporté que *Pseudomonas aeruginosa* a produit un maximum de rhamnolipides (400 mg/L) en utilisant un milieu de culture à base des margines à 50%. En outre, **Gudina et al. (2016)** ont étudié la production des rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* #112 en utilisant un milieu de culture à base des margines à 25%, ils ont trouvé que *Pseudomonas aeruginosa* #112 a produit $5,124 \pm 0,125$ g/L des rhamnolipides après 168 h de culture, avec une réduction de la TS de 72 à 29,2 mN/m et un E_{24} de 58,4 %.

Qazi et al. (2014), ont étudié la production des biosurfactants par *Fusarium sp.* BS-8 sur PDB supplémenté de l'huile végétale, ils ont noté que *Fusarium sp.* BS-8 a produit un biosurfactant avec une concentration de 5,25 g/L, ce dernier était capable de réduire la TS de 72 à 32 mN/m, avec un $E_{24}=71\%$. **Mendes Souza et al. (2016)**, ont évalué la production des biosurfactants par une souche fongique *Mucor polymorphosphorus*, en utilisant la liqueur de trempe de maïs CSL comme substrat, pendant 96 h, à 28 ° C et 150 rpm. Une réduction de la tension superficielle de 72 à 33,2 mN/m a été obtenue.

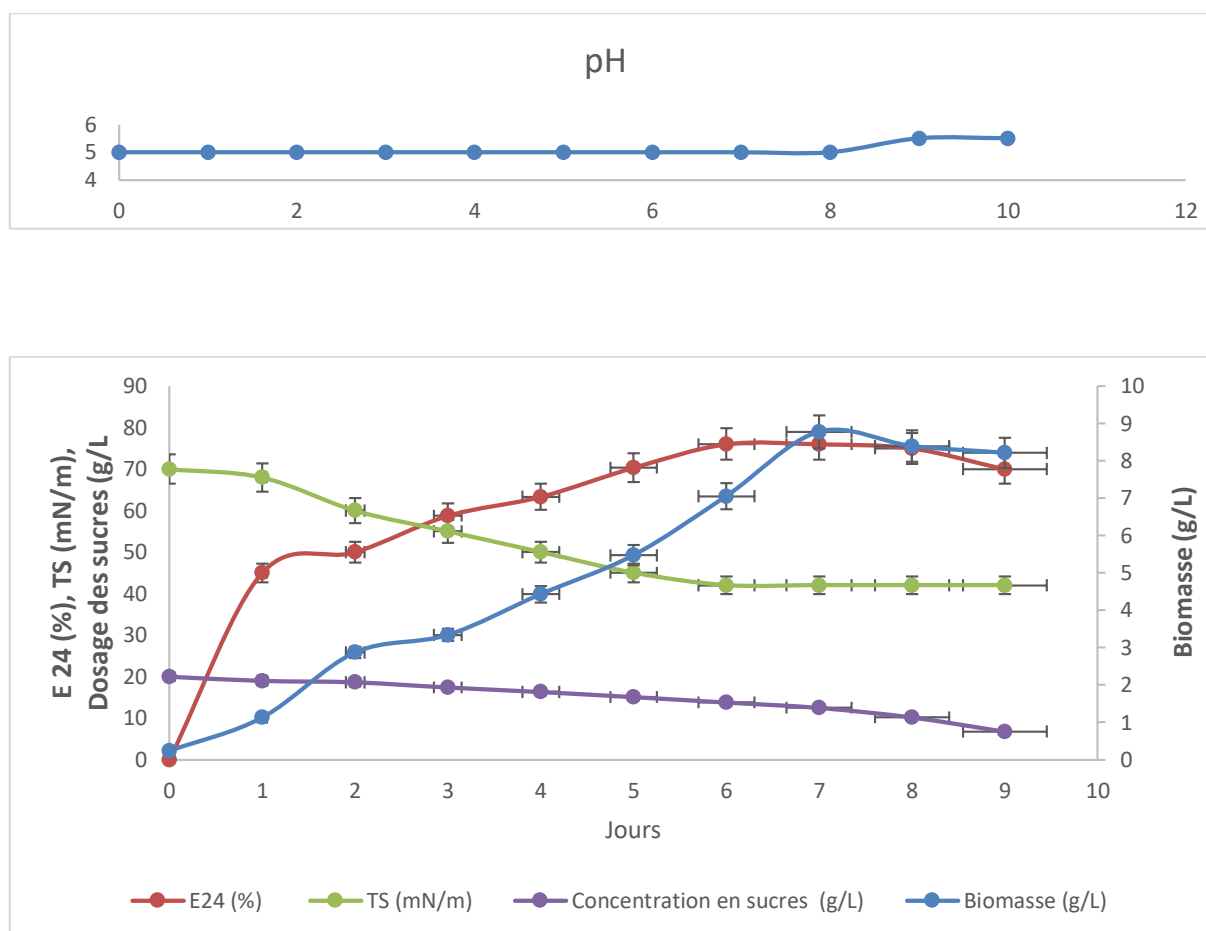


Figure 40: Cinétique de croissance et de production des biosurfactants par *Aspergillus sp.* FS11 sur milieu de culture à base des margines sous les conditions opératoires (28°C, pH 5 et 150 rpm).

Aspergillus sp. FS11 et *Rhodotorula sp.* YBR ont utilisé les margines comme substrat pour la production des biosurfactants, sachant que ce résidu se caractérise par un contenu organique élevé (DCO 220 g/L). Il contient aussi des polyphénols, mais également des sucres, des composés azotés, des acides organiques et des huiles résiduelles qui favorisent la croissance microbienne, mais également rend leur traitement difficile, et leur élimination devient un problème environnemental critique. Ainsi, l'utilisation de ces matériaux est importante à la fois des points de vue environnemental et économique, vu que la marge est considérée comme la source la plus économique disponible qui pourrait être utilisée pour la production des biosurfactants (Saharan et al., 2011 ; Zenati et al., 2018).

En effet, **Mercadé et al. (1993)** ont constaté que l'utilisation des margines pour la synthèse d'un rhamnolipide par la souche *Pseudomonas sp.* JAMM a conduit à une réduction de la charge polluante (exprimée en DCO), et à une diminution de 55% des polyphénols totaux.

III.6.5. Cinétique de production des biosurfactants par *Penicillium sp.* FS13 sur milieu de culture à base de lactosérum

La **Figure 41** présente le suivi de la fermentation en batch de la souche *Penicillium sp.* FS13 sur milieu de culture à base de lactosérum riche en lactose (20 g/L). La biomasse cellulaire augmentait proportionnellement avec l'indice E_{24} . Elle atteint sa valeur maximale au bout du 6^{ème} jour de fermentation (biomasse égal à $8,87 \pm 0,02$ g/L) correspondant à la valeur de l'indice E_{24} la plus élevée ($85 \pm 0,2$ %) et aussi à la valeur la plus basse de la TS ($40 \pm 0,28$ mN/m) (**Figure 41**). La consommation des sucres a débuté de 20 g/L jusqu'au 6,42 g/L le 10^{ème} jour de fermentation. Les valeurs de l'indice E_{24} obtenues sont compatibles avec celles des espèces fongiques décrites dans la littérature (**Qazi et al., 2014 ; Luna et al., 2016 ; Mendes Souza et al., 2016**).

La production des biosurfactants prend place dès le 1^{er} jour de fermentation, pour atteindre un maximum de production durant la phase stationnaire. Au cours du 9^{ème} jour de fermentation, la TS réaugmente légèrement suivie de la diminution de l'indice E_{24} et de la biomasse qui indiquent le début de la phase de déclin. Cette production est directement liée à la croissance cellulaire, quand la biomasse augmente la tension superficielle diminue puis augmente légèrement durant la fin de la phase stationnaire. Le pH du milieu est resté stable durant la fermentation.

Daniel et al. (1998), ont utilisé le lactosérum comme substrat pour la production des sophorolipides par *Candida bombicola* ATCC 22214 et *Cryptococcus curvatus* ATCC et des rendements consécutifs ont été obtenus.

Les résultats obtenus dans ces essais sont similaires à ceux obtenus par **Daverey et Pakshirajan (2009)**, qui ont étudié la production des biosurfactants par *Candida bombicola* dans différents milieux, où ils ont obtenu une production de 12,67 g /L lorsque la levure a été cultivée dans un milieu à base de lactosérum comme source de carbone.

Gautam et al. (2014), ont évalué la production des biosurfactants par *Penicillium chrysogenum* SNP5 en utilisant des milieux de culture à base des sous-produits agricoles. Ils ont signalé que *Penicillium chrysogenum* SNP5 a produit des biosurfactants sur milieu à base des grignons d'olives avec un indice E_{24} de $25 \pm 0,62$ %, cette valeur reste largement inférieure à celle trouvée dans notre étude ($E_{24} = 85\%$).

Concernant la réduction de la TS, une réduction comprise entre 34 et 37 mN/m a été enregistrée lors de la production des biosurfactants sur milieu à base de lactosérum par *Bacillus licheniformis* K₅₁, *Bacillus subtilis* 20B et *Bacillus subtilis* R1 (Joshi et al., 2008).

Cependant, Qazi et al. (2014) en utilisant le saccharose et l'extrait de levure, comme source de carbone et d'azote, respectivement pour la production des biotensioactifs par *Fusarium sp.* BS-8, ils ont enregistré une réduction de la TS de 72 à 32 mN/m. De même, dans une autre étude, le biosurfactant produit par *Candida bombicola* URM 3718 cultivée sur un milieu à faible coût formé de 5% de liqueur de trempe de maïs, 5% de mélasse et 5% de l'huile de friture comme substrat, a réduit la TS à des valeurs autour de 30 mN/m après 144 h de culture (Luna et al., 2016).

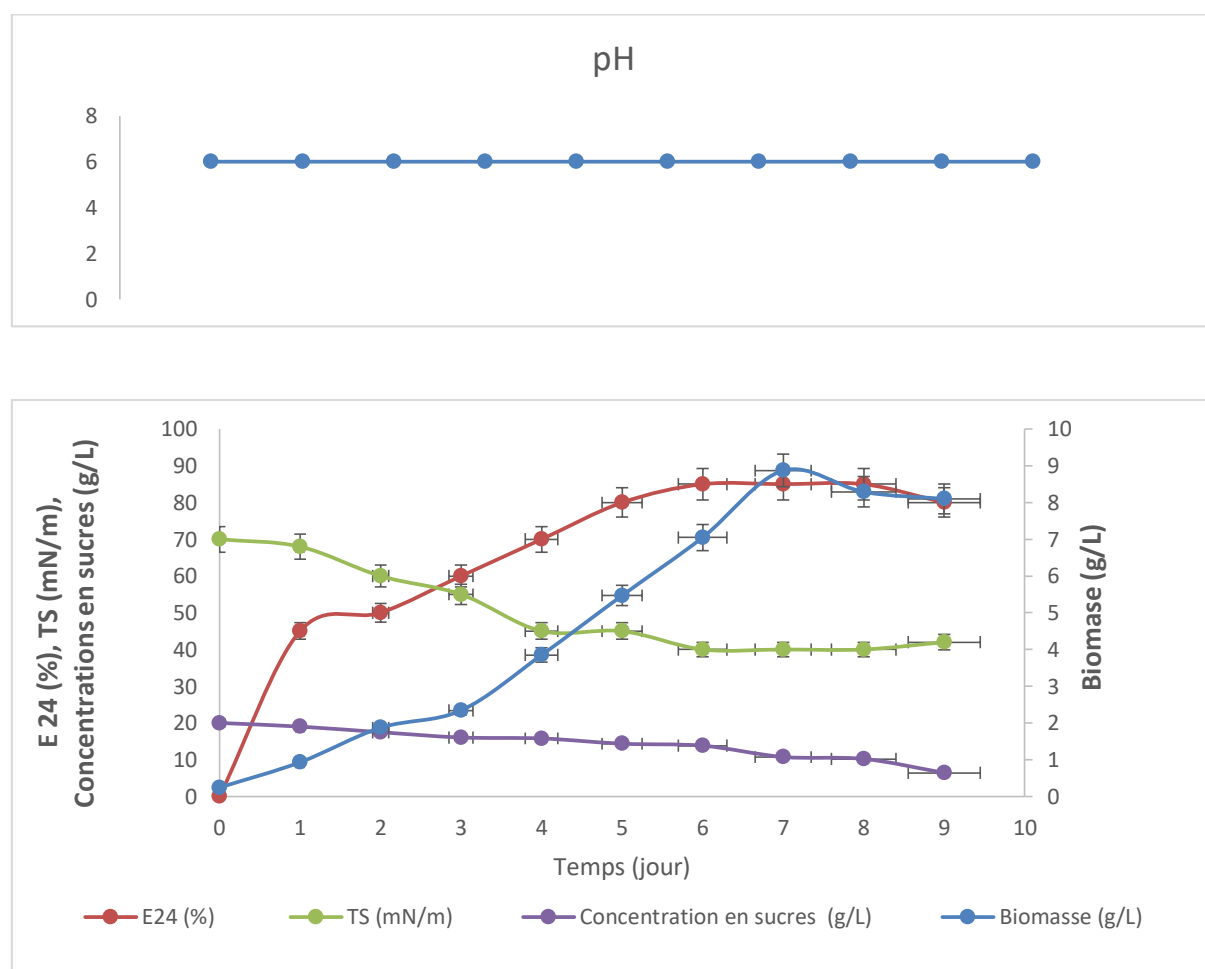


Figure 41 : Cinétique de croissance de *Penicillium sp.* FS13 dans le milieu à base du lactosérum sous les conditions opératoires (25°C, pH 6 et 150 rpm).

En conclusion, dans cette étude nous avons constaté que la production des biosurfactants pour les 4 souches a débuté en phase exponentielle de croissance et le pH des milieux de culture n'ont pas changé au cours de fermentation. Selon **Amaral et al. (2010)**, la plupart des biosurfactants sont produits en phase stationnaire de croissance, bien que certaines espèces puissent présenter une production pendant leur phase de croissance exponentielle.

Chez certaines espèces la production des biosurfactants est maximale durant la phase de croissance exponentielle.

En outre, selon **Bednarski et al. (2004)**, l'acidité constante enregistrée dans le milieu de culture est un paramètre corrélé à l'efficacité de la synthèse des glycolipides par des levures telles que *Candida antarctica* et *Candida apicola*. Une plus grande production de glycolipides est obtenue si la valeur de pH est contrôlée et maintenue stable pendant la durée de culture. Cependant, lorsque le pH n'est pas ajusté dans le milieu, un effet négatif est exercé sur l'efficacité de la synthèse de ces produits. De plus, la production des biosurfactants est également influencée par la durée de l'incubation. Les microorganismes sont capables de produire des biosurfactants à différents intervalles de temps comme observé pour *Candida bombicola* après 7 à 11 jours d'incubation, *Aspergillus ustus* après 5 jours, *Cryptococcus humicola* JCM 1461 après 11 jours de culture et *Fusarium sp.* BS après 8 à 15 jours (**Cavalero et Cooper, 2003 ; Kiran et al., 2009 ; Morita et al., 2011 ; Qazi et al., 2014**).

III.6.6. Rendement en biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules extracellulaires ou attachées à la surface cellulaire (**Santos et al., 2016**). Le test d'émulsification (E_{24}) calculé pour le surnageant a donné un bon résultat comparé à celui de moût de fermentation. Il est, respectivement, de 80% et 72% pour la souche *Cryptococcus sp.* YLF et de 90% et 85% pour la souche *Rhodotorula sp.* YBR, de 76 % et 70 % pour la souche *Aspergillus sp.* FS11 et de 85% et 75% pour la souche *Penicillium sp.* FS13. Cela nous amène à dire que les biosurfactants produits par les souches *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS11 et *Penicillium sp.* FS13 sont des produits extracellulaires, ce qui facilite leurs extractions.

La quantification des extraits bruts des biosurfactant a révélé que la levure *Cryptococcus sp.* YLF a produit des biosurfactants, avec une concentration de $8,05 \pm 0,25$ g/L lorsqu'elle a été cultivée sur un milieu à base de jus de dattes brut à 30 °C, pH 6 et 200 rpm. De même pour la souche *Rhodotorula sp.* YBR avec une concentration de $10,08 \pm 0,38$ g/L lorsqu'elle a été cultivée sur un milieu à base des margines à 30 °C, pH 5,5 et 200 rpm.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Sarubbo et al. (2007)**, qui ont rapporté un rendement de 8 g/L pour un biosurfactant produit par *Candida lipolytica* en utilisant l'huile végétale et le glucose comme source de carbone. De même, **Rufino et al. (2011)** et **Luna et al. (2013)**, ont signalé un rendement de 8,0 g/L pour *Candida lipolytica* et *Candida sphaerica*. Cependant, 13,1 g/L des glycolipides ont été produits par *Cryptococcus humicola* JCM 1461 après 11 jours de culture, en utilisant un milieu optimisé qui contient (10% de glucose, 0,1% de peptone, 0,3% d'extrait de levure et 0,1% d'extrait de malt, pH 6,0) (**Morita et al., 2011**).

Sen et al. (2017), ont étudié la production des biosurfactants sur milieu Bushnell-Haas contenant du glucose (10%) par *Rhodotorula babjevae* YS3, et le rendement obtenu était 19,0 g/L. Pour les deux moisissures des rendements successifs de $11,15 \pm 0,7$ g/L pour *Aspergillus* sp. FS11 et $13,15 \pm 0,52$ g/L pour *Penicillium* sp. FS13, ont été obtenus.

Avec ces rendements, il ressort que nos moisissures sont des productrices efficaces des biosurfactants. Récemment, une étude a révélé que le rendement en biosurfactants produits par *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 sur milieu à base de CSL pendant 96 h d'incubation était de 1,74 g/L (**Pele et al., 2019**). *Ustilago maydis* FBD12 a produit des biosurfactants avec un rendement de 0,183 g/L et 0,096 g/L en utilisant comme substrats l'huile de poisson et l'huile de soja, respectivement, pendant 9 jours de culture (**Cortes-Sánchez et al., 2011**). Ces valeurs sont largement inférieures à celles trouvées dans notre étude. Cependant, **Silva et al. (2014)** ont obtenu un rendement en biosurfactants de 20 g/L par *Cunninghamella echinulata*, en utilisant un milieu de culture à base du CSL et de l'huile de soja comme source de carbone.

III.7. Caractérisation des biosurfactants bruts

III.7.1. Caractérisation par CCM

Les extraits bruts sont d'abord semi purifiés par chromatographie préparative sur plaque épaisse de gel de silice. Ainsi, les bandes correspondantes aux tâches bien révélées sont grattées et récupérées séparément, résorbées de la silice avec du méthanol, concentrées à sec et testées par méthode du drop collapse pour leurs activités tensioactives. Elles sont ensuite caractérisées par une CCM analytique en utilisant différents systèmes solvants. Nous présentons ci-dessous les résultats de cette opération pour chacun des composés obtenus (**Figure 42**) et (**Tableau 17**).

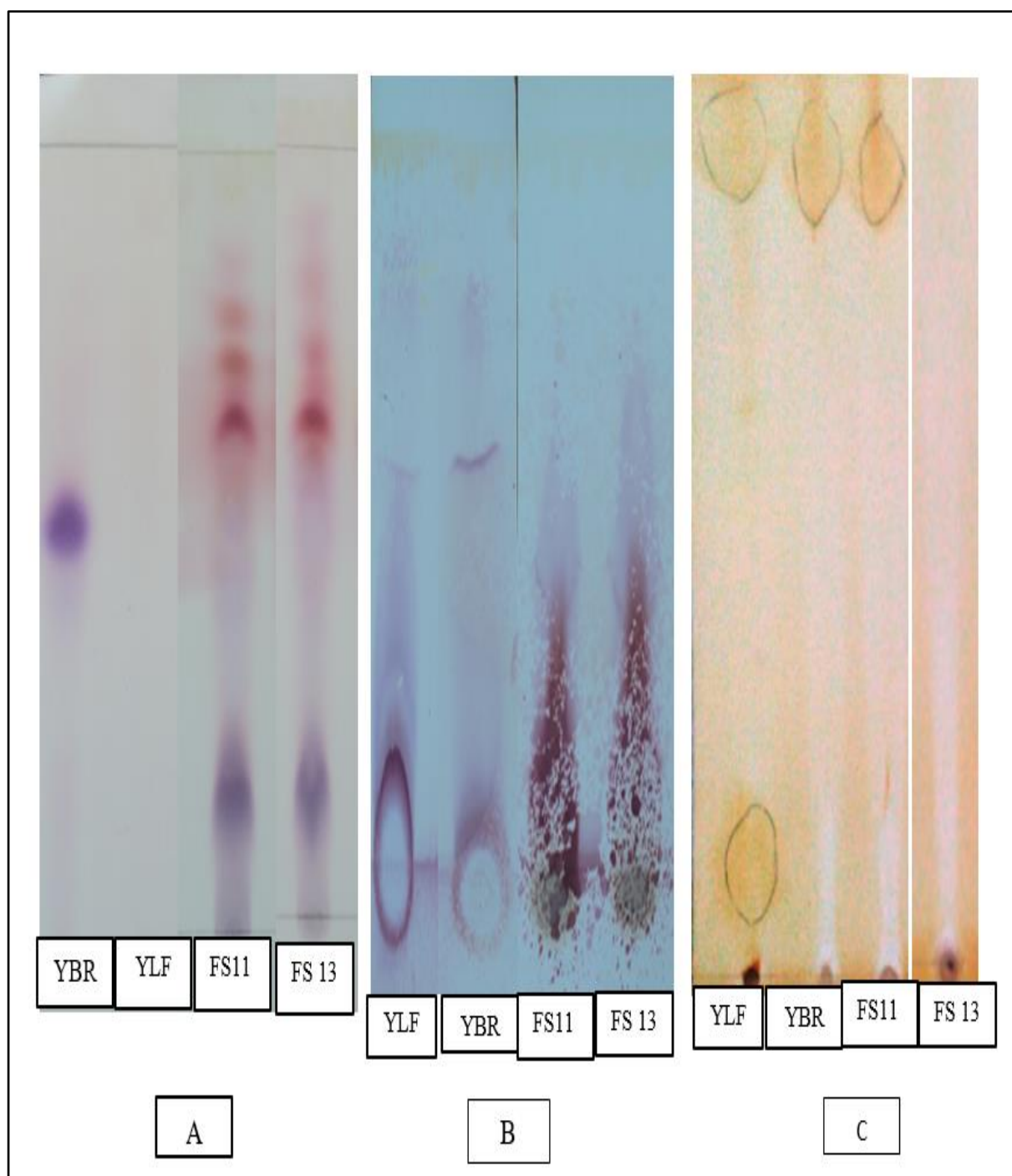


Figure 42 : Résultats obtenus après révélation chimique ;(A) par vaporisation de la ninhydrine pour la révélation des peptides, (B) vaporisation avec le réactif de Molisch pour la révélation des glucides, (C) par exposition de plaque aux vapeurs d'iode pour la révélation des lipides.

Tableau 17 : Valeurs de Rf obtenues après révélation chimique des plaques de CCM

Fractions	Souche YLF		Souche YBR		Souche FS 11		Souche FS 13	
	Nombre de tâches	Rf	Nombre de tâches	Rf	Nombre de tâches	Rf	Nombre de tâches	Rf
Glucidiques	2	0,24 0,30	1	0,62	1	0,25	1	0,36
Peptidiques	0	-	1	0,48	4	0,18, 0,59 0,73, 0,80	6	0,16, 0,48 0,57, 0,61 0,69, 0,78
Lipidiques	2	0,20 0,79	1	0,76	1	0,74	0	-

D'après le **Tableau 17** et la **Figure 42**, les biosurfactants produits par la souche YLF comportent à la fois des composés lipidiques et glucidiques, ils sont probablement des glycolipides. Tandis que, les biosurfactants produits par la souche FS13 comportent à la fois des composés peptidiques et glucidiques, ils sont probablement des glycoprotéines ou des glycopeptides. Cependant, les produits des souches FS11 et YBR sont composés d'un mélange de glucides, peptides et lipides donc, ils pourraient être soit des glycoprotéines, des glycolipides ou des lipopeptides ou un mélange des trois.

La caractérisation de l'extrait brut produit par *Cryptococcus sp.* YLF sur milieu à base de jus de datte par CCM a montré la présence de deux fractions glucidiques et deux fractions lipidiques avec des valeurs de Rf de 0,24, 0,30 et 0,20, 0,79, respectivement. En outre, les macromolécules ont été estimées et les résultats sont les suivants : $1,72 \pm 0,16$ g/L des lipides et $1,15 \pm 0,08$ g/L des glucides (**Tableau 18**).

Concernant, l'extrait brut produit par *Cryptococcus sp.* YLF sur milieu à base de jus de datte en conditions salines, l'analyse par CCM a montré la présence d'une fraction glucidique et deux fractions lipidiques correspondent aux valeurs de Rf suivantes : 0,67, 0,30 et 0,79 , respectivement.

D'après l'estimation et l'analyse par CCM, les composés produits par *Cryptococcus sp.* YLF ont été partiellement caractérisé en tant que glycolipide. **Morita et al. (2011)**, en analysant les biosurfactants produit par *Cryptococcus humicola* JCM 1461, ils ont observé une tâche principale avec un Rf de 0,20 et une tâche mineure avec un Rf de 0,09 en utilisant un système solvant composé du chloroforme – méthanol – eau (75/20/5 v/v/v).

Concernant l'extrait brut produit par *Rhodotorula sp.* YBR, l'analyse chromatographique par CCM a montré trois fractions : une glucidique (Rf = 0,62), une peptidique (Rf = 0,48) et une autre lipidique (Rf = 0,76). L'estimation des macromolécules a révélé les concentrations suivantes : $1,50 \pm 0,04$ g/L des lipides, $1,61 \pm 0,01$ g/L des glucides et $1,46 \pm 0,04$ g/L des protéines (**Tableau 18**). D'après l'estimation et l'analyse chromatographique par CCM, le composé produit par *Rhodotorula sp.* YBR a été partiellement caractérisé en tant que glycolipoprotéine.

Sen et al. (2017), ont analysé le biosurfactant produit par *Rhodotorula babjevae* YS3 par CCM en utilisant un système solvant composé de chloroforme: méthanol: eau (65/15/20 v/v/v). Les auteurs en question, ont rapporté que la nature chimique du biosurfactant produit par *Rhodotorula babjevae* YS3 est glycolipidique, plus précisément c'est un sophorolipide. Le standard utilisé dans l'étude est un sophorolipide (1,4''-sophorolactone 6',6''-diacetate), il a montré des valeurs de Rf 0,49, 0,56 et 0,68. Par contre l'extrait brut de *Rhodotorula babjevae* YS3 a présenté des valeurs de Rf de 0,13, 0,18 et 0,56.

L'extrait brut produit par *Aspergillus sp.* FS11 a montré plusieurs fractions après l'analyse chromatographique par CCM : une glucidique, quatre protéiques et une lipidique qui correspondent aux valeurs de Rf suivantes : 0,25, 0,18, 0,59, 0,73, 0,80 et 0,74, respectivement. L'estimation des macromolécules a révélé les concentrations suivantes : $1,07 \pm 0,04$ g/L des lipides, $2,76 \pm 0,11$ g/L des glucides et $0,80 \pm 0,02$ g/L des protéines (**Tableau 18**). D'après l'estimation et l'analyse chromatographique, le composé produit par *Aspergillus sp.* FS11 a été partiellement caractérisé en tant qu'un complexe glycolipoprotéique.

Les mêmes résultats ont été rapportés par **Kiran et al. (2009)** pour la souche *Aspergillus ustus* MSF3 cultivée sur milieu Sabouraud. Ces auteurs ont affirmé que le biosurfactant formé par *Aspergillus ustus* MSF3 a été partiellement caractérisé par CCM et par estimation des macromolécules comme un mélange glycolipoprotéique, avec les valeurs de Rf suivantes : 0,84

pour la fraction lipidique, 0,73 pour la fraction glucidique et 0,80 pour la fraction peptidique, respectivement avec les concentrations suivantes : 0,38 g/L des lipides, 1,87 g/L des glucides et 0,92 g/L des protéines. Ces résultats sont obtenus en utilisant les mêmes systèmes solvants que dans notre étude.

Récemment, **Pele et al. (2019)** ont réalisé une caractérisation préliminaire par estimation des macromolécules dans l'extrait brut d'un biosurfactant produit par *Rhizopus arrhizus* UCP 1607. Les mêmes auteurs ont rapporté que le biosurfactant produit dans un milieu à base du CSL et de glycérol est composé de protéines (38%), de glucides (35,4%) et de lipides (5,5%), suggérant ainsi qu'il s'agit d'une glycolipoprotéine.

Par ailleurs, **Akintunde et al. (2015)**, ont réalisé une caractérisation préliminaire des biosurfactants produits par deux souches isolées à partir d'un échantillon du sable contaminé par des hydrocarbures, il s'agit d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus flavus*.

Ainsi, ils ont noté qu'une seule fraction pour chacune des deux souches est apparue après pulvérisation avec le réactif de Molisch, avec des valeurs de Rf de 0,38 et 0,46, respectivement, ce qui leur a permis de déduire que les deux extraits bruts sont de nature glycolipidique.

Les résultats de la caractérisation préliminaire des deux extraits produits par *Rhodotorula sp.* YBR et *Aspergillus sp.* FS11 comme étant des glycolipoprotéines sont en accord avec différentes études réalisées sur différentes espèces fongiques majoritairement appartenues au genre *Candida* (**Zinjarde et Pant, 2002 ; Sarubbo et al., 2006 ; Rufino et al., 2007 ; Gusmão et al., 2010 ; Luna et al., 2016**).

L'analyse chromatographique par CCM de l'extrait brut produit par *Penicillium sp.* FS13 a montré différentes fractions : une glucidique et six protéiques qui correspondent aux valeurs de Rf suivantes : 0,36, 0,16, 0,48, 0,57, 0,61, 0,69 et 0,78, respectivement. L'estimation des macromolécules a révélé les concentrations suivantes : $3,65 \pm 0,54$ g/L des glucides et $2,0 \pm 0,16$ g/L des protéines (**Tableau 18**). D'après l'estimation et l'analyse par CCM, le composé produit par *Penicillium sp.* FS13 a été partiellement caractérisée en tant que glycoprotéine.

Les mêmes résultats ont été obtenus par **Cirigliano et Carman (1984)**, en étudiant le Liposan, un biosurfactant produit par *Candida lipolytica* cultivée sur l'hexadécane comme substrat. Ils ont révélé que le biosurfactant en question est composé de 83% de glucides et de 17% de protéines, donc il s'agit d'une glycoprotéine. Par ailleurs, **Gautam et al. (2014)** ont utilisé le système solvant suivant : Chloroforme : Méthanol : H₂O (65/25/10 v/v/v) pour la caractérisation d'un biosurfactant produit par *Penicillium chrysogenum* SNP5. Les résultats ont montré l'apparition de plusieurs tâches protéiques après révélation avec la ninhydrine, avec les valeurs de Rf suivantes : 0,62, 0,68 et 0,66, respectivement, et également des tâches développées après

exposition aux vapeurs d'iode avec des valeurs de Rf suivantes : 0,69 et 0,73, respectivement. Ces résultats ont confirmé que le biosurfactant produit par *Penicillium chrysogenum* SNP5 en utilisant des déchets agricoles comme substrat est de nature lipopeptidique. Dans le même contexte, **Qazi et al. (2014)** ont indiqué que les biosurfactants partiellement purifiés produits par *Fusarium sp.* BS-8 ont présenté des valeurs de Rf de 0,56, 0,36, 0,22 et 0,16 lorsqu'ils étaient développés avec un système solvant contenant l'hexane / l'acétate d'éthyle (1/3 v/v) et après visualisation avec la ninhydrine et exposition aux vapeurs d'iode. Sur la base de ces résultats la nature lipopeptidique du biosurfactant a été proposée par les auteurs. Selon **Garima et al. (2013)**, les valeurs Rf (0,38 et 0,46) correspondent au D-mannose et au méso-érythritol respectivement, qui sont des composants des biosurfactants sophorolipides produits par des espèces de *Candida*. Dans le même sens, des valeurs de Rf (0,19, 0,39 et 0,40) ont été signalées respectivement pour les glycolipides, les dirhamnolipides et les mono-rhamnolipides produits par *Bacillus subtilis* (**Mariathason et al., 2013; Mukherjee et al., 2010**).

Tableau 18 : L'estimation des macromolécules des extraits des biosurfactants pour les 4 souches.

	Les souches	YLF	YBR	FS 11	FS 13
Estimation des macromolécules	Glucides	1,15 ± 0,08	1,61 ± 0,01	2,76 ± 0,11	3,65 ± 0,54
	Protéines	0	1,46 ± 0,04	0,80 ± 0,02	2 ± 0,16
	Lipides	1,72 ± 0,16	1,50 ± 0,04	1,07 ± 0,04	0

III.7.2. Caractérisation par spectroscopie IRTF

La nature chimique des biosurfactants partiellement purifiés a été encore étudiée en utilisant la spectroscopie IRTF. Cette dernière, est une méthode simple et rapide, elle est la méthode la plus fréquemment utilisée pour identifier les groupements (alkyles, carbonyles et esters) dans des échantillons des biosurfactants (**Gartshore et al., 2000**). Dans cette étude une caractérisation par IRTF a été réalisée pour les quatre extraits bruts. Elle nous a permis d'identifier les groupements et les fonctions présentes dans les échantillons à l'aide de tables de corrélations. Nous représentons les résultats de cette analyse en dessous (**Figures 43, 44, 45 et 46**).

Le spectre d'absorption en infrarouge de biosurfactant semi purifié produit par *Cryptococcus sp.* YLF est donné en **Figure 43**. Ce spectre a montré la présence de liaison O-H à 3339 cm^{-1} , liaisons typiques des polysaccharides (**Pele et al., 2019**). Une bande à 2920 cm^{-1} , résultant de la liaison C-H qui suggère la présence d'une chaîne aliphatique, à 2850 cm^{-1} caractérisant la présence des liaisons C-H, des groupements CH_2 et CH_3 , La bande d'absorption à 1643 cm^{-1} est due à la présence du groupe C=O qui correspond à une fonction cétone (**Abouseoud et al., 2008**). Les bandes d'absorption notées à 1455 cm^{-1} et 1015 cm^{-1} indiquent un groupe OH d'un acide carboxylique et des liaisons C-O, respectivement (**Basak et Das, 2014**). L'absence des pics à 3422, 3246 et 1552 cm^{-1} confirme l'inexistence des groupements N-H dans la structure du biosurfactant produit par *Cryptococcus sp.* YLF (**Varjani et Upasani, 2016**). Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été rapporté par **Basak et Das (2014)** pour les biosurfactants de type sophorolipides produits par *Cryptococcus sp.* VITGBN2 et *Candida rugosa*, respectivement.

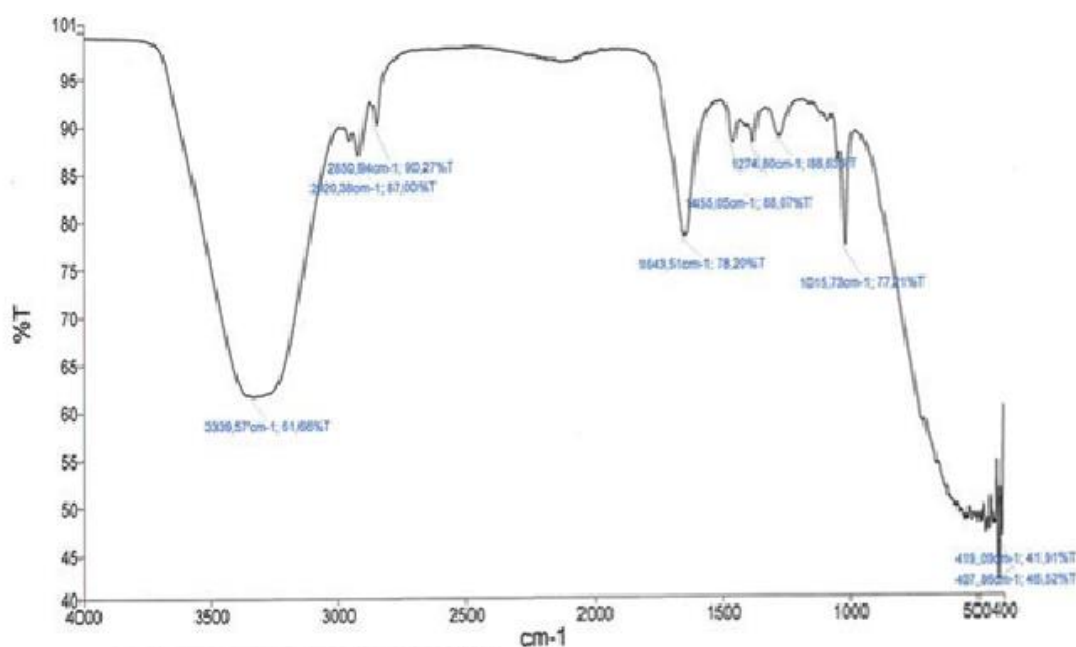


Figure 43 : Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant semi-purifié de la souche *Cryptococcus sp.* YLF.

Le spectre d'absorption en infrarouge de l'extrait de la souche *Rhodotorula sp.* YBR de la **Figure 44** montre la présence des bandes suivantes : à 3339 cm^{-1} (qui indique la présence d'une liaison O-H liée (liaison hydrogène) , à 1643 cm^{-1} indique la présence de C=O qui représente une fonction cétone, Les pics affichés entre 1300 et 1000 cm^{-1} (1274 et 1015 cm^{-1}) sont attribués aux vibrations d'élongation des liaisons C-O et C-O-C affirmant la présence d'hydrates de

carbone dans la structure du biosurfactant (Lee et al., 2018), à 1377 cm^{-1} (liaison C-N) (Pele et al., 2019).

La spectroscopie IRTF a révélé la présence des fragment peptidique, et des hydrates de carbone (Andrade et al., 2018).

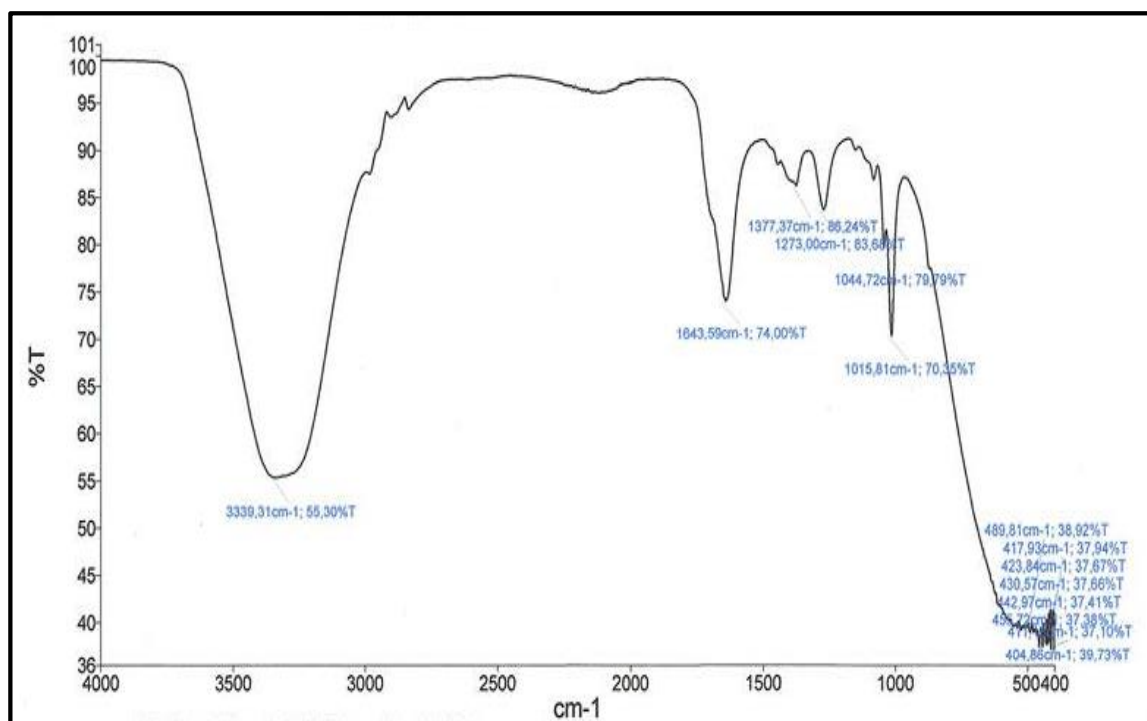


Figure 44 : Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche *Rhodotorula* sp .YBR.

Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant partiellement purifié produit par la souche *Penicillium* sp .FS13 (Figure 45) a montré que les bandes les plus importantes se situaient entre 404 et 3423 cm^{-1} . OH à 3446.92 cm^{-1} (liaisons typiques des polysaccharides), 1638.73 cm^{-1} (liaison ester C=O), les pics de 1263.70 à 1044.05 cm^{-1} indiquent la présence des liaisons C–O et C–O–C, ce qui affirme la présence d'hydrates de carbone (Lee et al., 2018), à $1403,67\text{ cm}^{-1}$ (Groupes C-N amide) (Pele et al., 2019). Le spectre infrarouge du biosurfactant a suggéré la présence des monomères polysaccharidiques et le groupe amide des protéines. Ainsi, nous avons fortement suggéré que le composé est de nature glycoprotéique. Ces résultats sont en corrélation avec ceux rapportés par Pele et al. (2019). En effet, les mêmes auteurs ont obtenu le même spectre infrarouge pour le biosurfactant produit par *Rhizopus arrhizus* UCP 1607, à l'évidence des résultats obtenus la nature glycoprotéique a été fortement suggéré par

les auteurs. Les résultats de l'interprétation des spectres IRTF viennent confirmer et renforcer les résultats de la CCM et l'estimation des macromolécules.

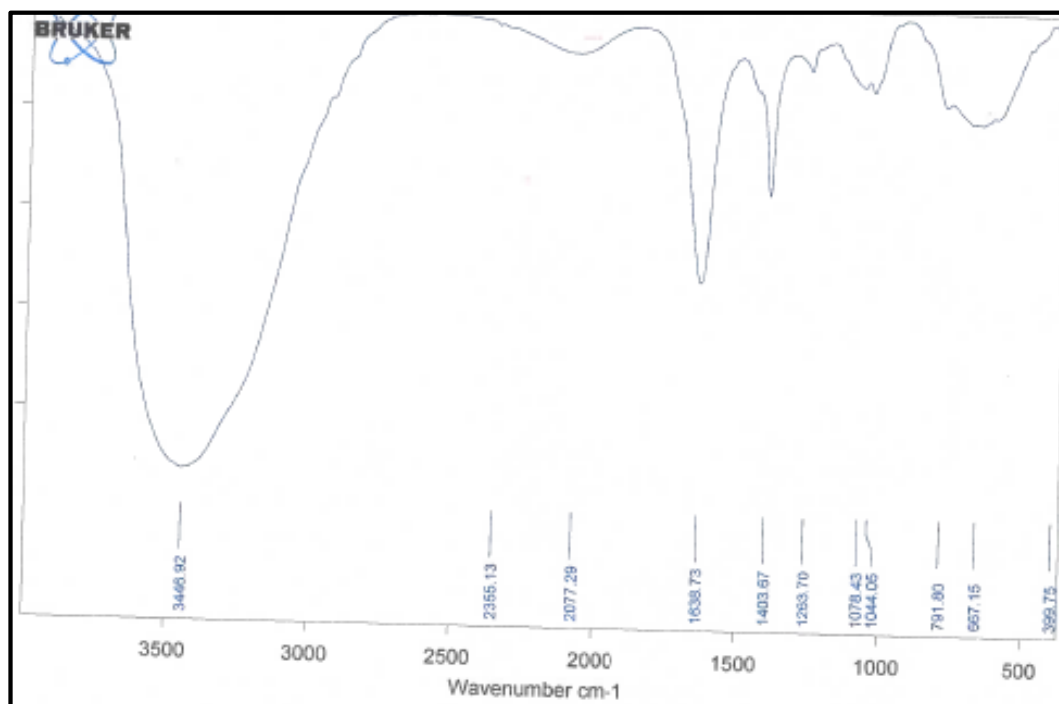


Figure 45: Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche *Penicillium sp* .FS13.

Le spectre d'absorption en infrarouge de l'extrait de la souche *Aspergillus sp* .FS11 donné en **Figure 46** a montré les bandes suivantes : à 3339 cm^{-1} (qui indique la présence d'une liaison O-H liée (liaison hydrogène)), à 2850 cm^{-1} caractérisant la présence des liaisons C-H, à 1643 cm^{-1} qui indique la présence de C=O (cétone) , à 1376 cm^{-1} (liaison C-N) , à 1455 cm^{-1} (liaison O-H des acides carboxyliques) , de 1015 à 1044 cm^{-1} , les pics situaient entre 1300 et 1000 cm^{-1} (1274 , 1044 et 1015 cm^{-1}) correspondent aux liaisons C-O et C-O-C (**Lee et al., 2018**). Ainsi, la spectroscopie IR a révélé la présence à la fois des fragments aliphatiques (liaison C-H), peptidiques (liaison C-N) et des polysaccharides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la CCM et l'estimation des macromolécules dans notre étude.

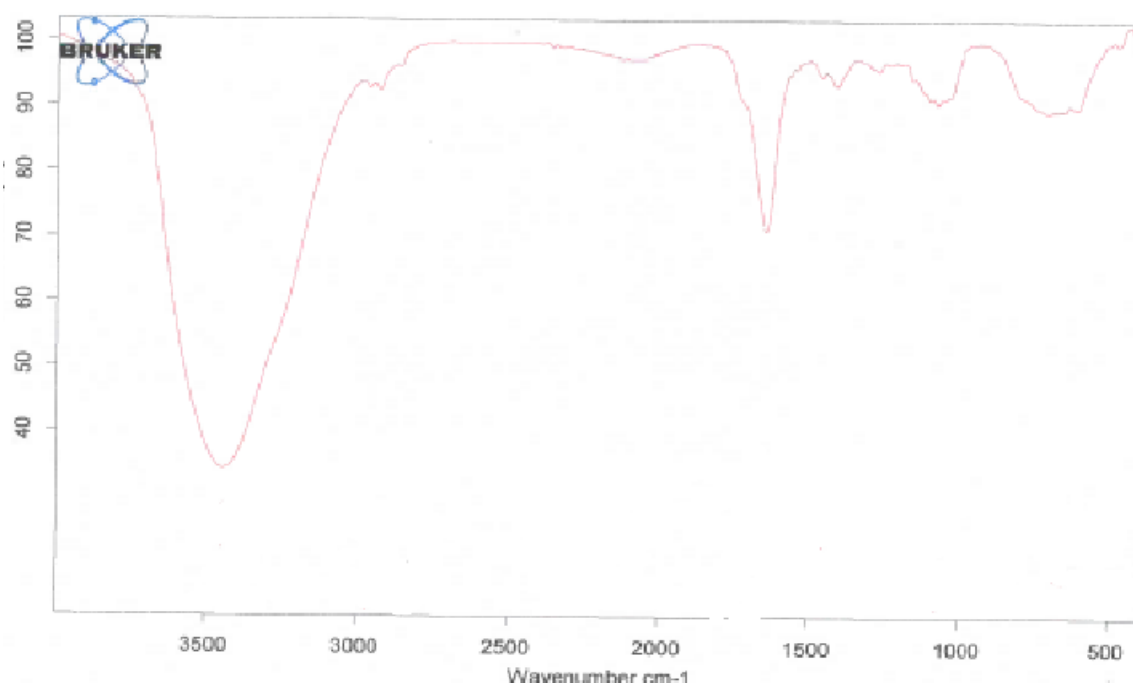


Figure 46 : Le spectre d'absorption en infrarouge du biosurfactant de la souche *Aspergillus* sp .FS11.

En conclusion, la spectroscopie IR nous a permis d'identifier les groupements fonctionnels présents dans les extraits et de confirmer la caractérisation par CCM et par estimation des macromolécules. Cependant, pour la structure détaillée des biosurfactants produits, nous recommandons une analyse plus approfondie.

III.8. Etude de la stabilité des biosurfactants produits

Les applications des biosurfactants dans plusieurs industries dépendent de leur stabilité et de leur résistance aux facteurs environnementaux extrêmes, tels que : le pH, la salinité et la température qui affectent l'activité et la stabilité des biosurfactants, il est donc important d'étudier l'influence de ces variables (Mulligan, 2009).

Dans cette optique, l'effet des concentrations du NaCl, de température, et de pH a été étudié et illustré dans les **Figures 47, 48, 49, 50 et 51** pour les quatre biosurfactants produits.

Pour l'influence du pH, nous remarquons que les biosurfactants produits par les quatre souches sont très stables dans une gamme de pH allant de 2 à 12, avec une stabilité optimale au pH acide 4 et 6 et également à pH alcalin 8. À pH 10 et 12, l'indice E_{24} des quatre souches étaient, respectivement ; 70% et 65% pour *Cryptococcus* sp.YLF , 66,66% et 61,9 % pour *Cryptococcus* sp.YLF à 2,5 M de NaCl, 68% et 62% pour *Rhodotorula* sp. YBR, 70 % et 55% pour

Penicillium sp. FS13 et 70 % et 65 % pour *Aspergillus* sp. FS11. Ces résultats indiquent que le pH n'a aucun effet sur la stabilité des émulsions formées. Des résultats similaires ont été rapportés par (Sarubbo et al., 2006 ; Sarubbo et al., 2007 ; Abouseoud et al., 2008 ; Khopade et al., 2012 ; Mouafi et al., 2016) pour des biosurfactants produits par *Candida glabrata*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Nocardiopsis* sp. B4 et *Bacillus brevis*, respectivement.

En outre, un émulsifiant produit par la levure *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, cultivée sur l'hexadécane était également trouvé stable et actif sur une large gamme de pH (2 à 10), bien qu'une perte considérable d'activité émulsifiante a été enregistrée au-delà du pH 10 (Zinjarde et Pant, 2002). De plus, Techaoei et al. (2011) ont rapporté que l'activité émulsifiante de *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 était stable dans une gamme de pH allant de 6 à 12, mais diminuait à un pH de 2 et 4.

La stabilité des émulsions a été étudiée à différentes températures de 4 à 100 °C pour les quatre souches. Les valeurs de l'indice E_{24} pour les quatre souches ont montré une très grande stabilité à l'égard d'une gamme de températures de 4 °C à 80 °C. Cependant, 20% de l'activité émulsifiante était perdue à 100 °C. Des résultats similaires ont été rapportés par Sarubbo et al. (2006) et Mouafi et al. (2016), où l'effet du traitement thermique sur l'activité émulsifiante de *Candida glabrata* et de *Bacillus brevis*, respectivement, a montré qu'il n'y avait pas une modification de l'activité émulsifiante, et quand les surnageants des cultures étaient chauffés à 100 °C, seulement 10% de l'activité émulsifiante était perdue.

Par ailleurs, Khopade et al. (2012) ont montré que le biosurfactant produit par *Nocardiopsis* sp. B4 s'est avéré thermostable. En effet, le chauffage du biosurfactant à 100 °C n'a pas eu d'effet significatif sur sa performance. L'activité émulsifiante était assez stable aux températures testées (E_{24} = 66%) en comparaison avec des tensioactifs synthétiques tels que le SDS qui présente une perte significative d'activité émulsifiante à partir de 70 °C (Persson et al., 1988). Quant à l'effet de la salinité, nous avons noté une grande stabilité à toutes les concentrations de NaCl de 1% à 10% pour les deux levures et une petite réduction de l'activité de surface à 10% pour les deux moisissures. Une stabilité optimale des biosurfactants a été observée à des concentrations de 1% à 8% de NaCl. Peu de changements, ont été observés à 10% (p/v). À la plus haute concentration de NaCl, les biosurfactants retiennent 50% de leur activité émulsifiante. La stabilité des émulsions en présence de NaCl a été rapportée comme l'une des propriétés du biosurfactant produit par *Candida lipolytica* lorsqu'elle a été cultivée sur l'huile végétale en tant que substrat (Rufino et al., 2007).

Kiran et al. (2010), ont constaté que le biosurfactant produit par *Actinobacterium* était stable à une concentration de NaCl (jusqu'à 5%). De plus, **Kebbouche-Gana et al. (2009)**, ont rapporté que le biosurfactant produit par une *Achaeta* halophile était stable vis-à-vis des concentrations de NaCl allant jusqu'à 30%.

En plus de l'activité émulsifiante, la réduction de la tension superficielle, est un autre paramètre très pertinent pour l'évaluation d'une production efficace des biosurfactants.

Les résultats des études de stabilité ont montré que les biosurfactants produits maintenaient des valeurs de TS stables dans des conditions extrêmes de pH, de température et de salinité pour les quatre souches (**Figures : 47, 48, 49, 50 et 51**). Ces résultats sont en corrélation avec ceux rapportés par (**Ilori et al., 2008 ; Singh et al., 2007 ; Joshi et al., 2008 ; Luna et al., 2013 ; Sen et al., 2017; Araújo et al., 2019 ;Kumar Gaur et al., 2019**) pour les souches suivantes : *Aeromonas spp* , *Candida tropicalis*, *Bacillus sp* , *Candida sphaerica* UCP0995, *Rhodotorula babjevae* YS3, *Serratia marcescens* UCP 1549 et *Candida spp*, respectivement.

En conclusion, les biosurfactants produits par les souches fongiques sélectionnées dans notre étude ont montré une stabilité importante à des conditions extrêmes de pH, de salinité et de température, ce qui leur confère une importance majeure dans des applications industrielles agro-alimentaires et environnementales (**Rufino et al., 2014**).

La bonne stabilité des biosurfactants produits à des températures élevées, les rend très utiles dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques où les produits sont stérilisés par chauffage. Ainsi, la stabilité des produits à 4°C permet leurs conservations au froid. En outre, la stabilité au salinité élevée offre aux biosurfactants plus d'efficacité dans les industries pétrolières où la salinité est très élevée (**Saharan et al., 2011**).

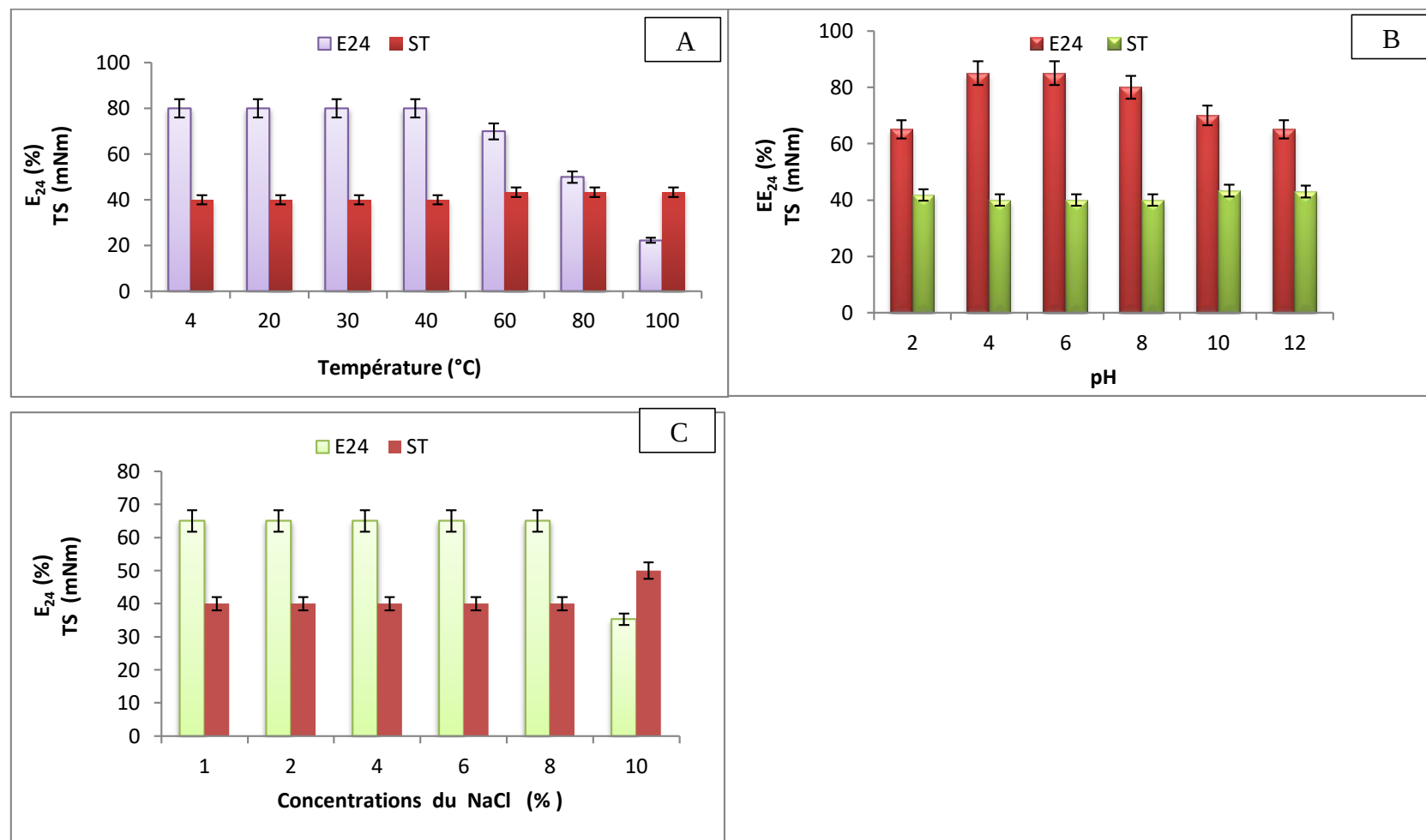


Figure 47 : L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par *Cryptococcus sp.* YLF, cultivée sur un milieu de culture à base de jus de datte (à 30 °C, pH 6 et 200 rpm).

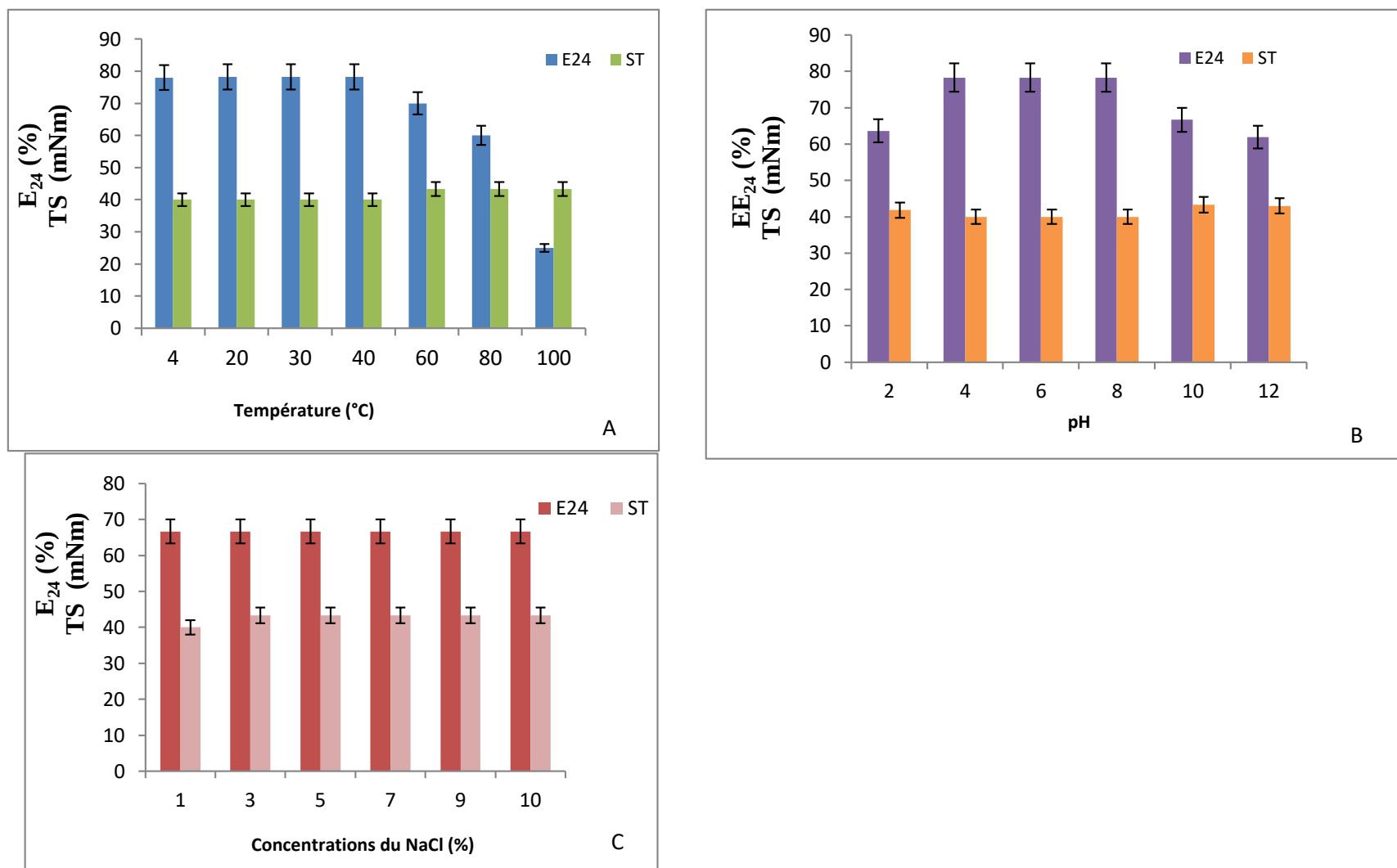


Figure 48 : L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par *Cryptococcus sp.* YLF, cultivée sur un milieu de culture à base de jus de datte sous des conditions de salinité.

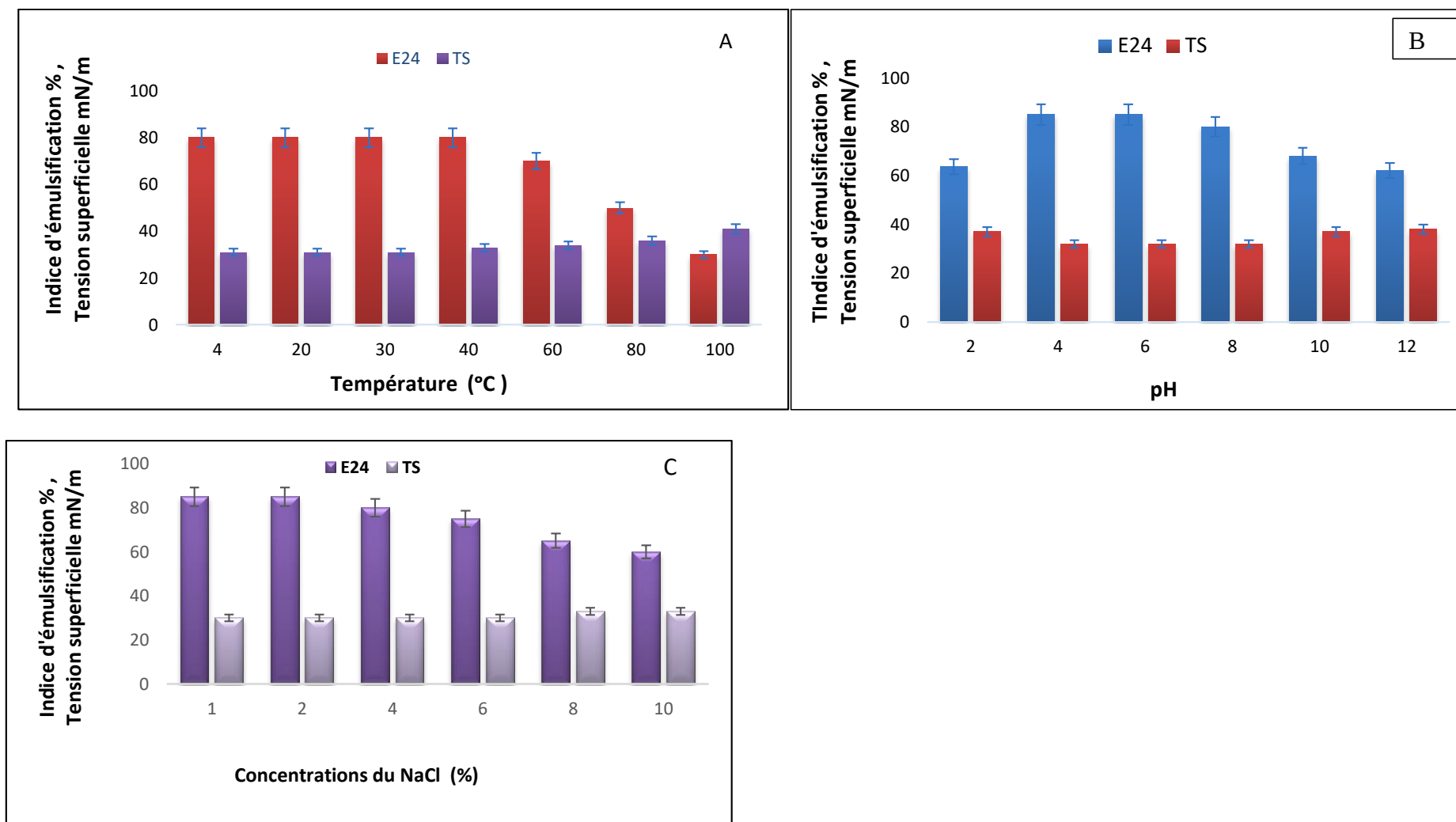


Figure 49 : L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par *Rhodotorula sp.* YBR, cultivée sur un milieu de culture à base des margines (à 30 °C, pH 5.5 et 200 rpm).

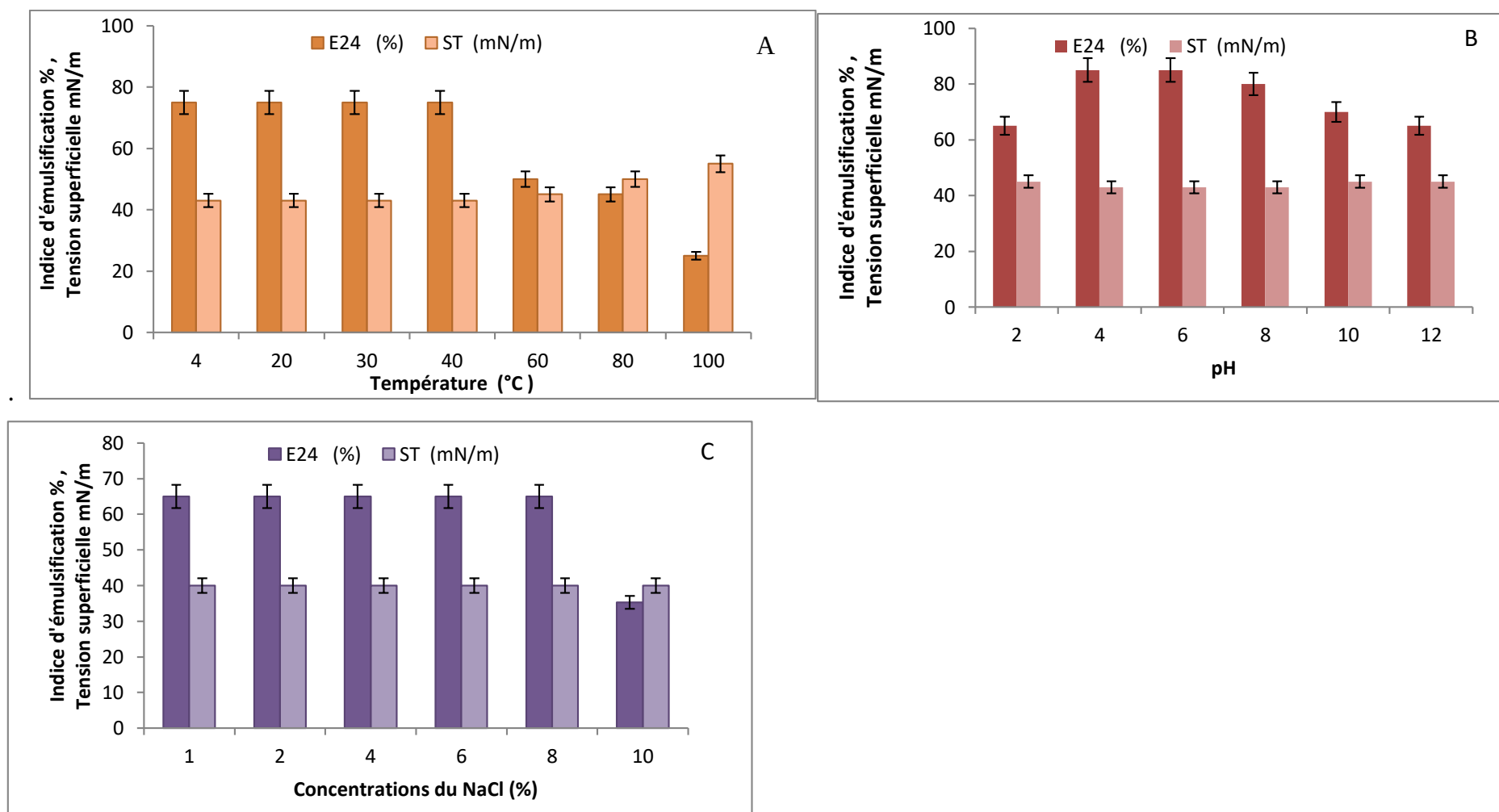


Figure 50 : L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par *Aspergillus* sp. FS 11 cultivé sur un milieu de culture à base des margines (à 28 °C, pH 5 et 150 rpm).

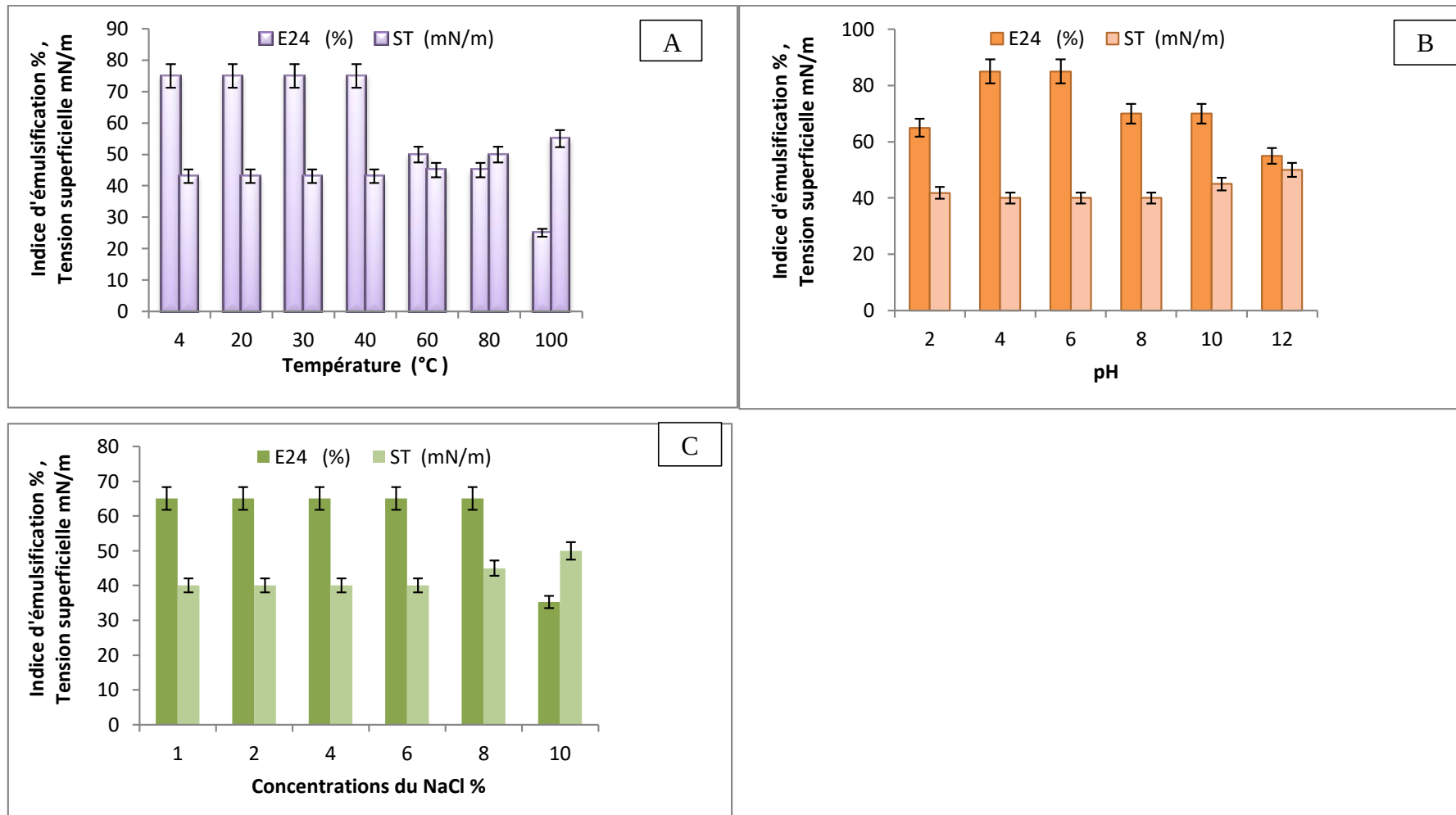


Figure 51 : L'effet de la température (A), du pH (B), des concentrations en NaCl (C) sur la stabilité du biosurfactant brut produit par *Penicillium* sp. FS 13 cultivé sur un milieu de culture à base du lactosérum (à 25 °C, pH 6 et 150 rpm).

Les barres d'erreur illustrent les erreurs expérimentales (écarts types), calculées à partir de trois expériences indépendantes

III.9. Propriétés des biosurfactants produits

III.9.1. Emulsions

Après extraction des biosurfactants produits par les quatre souches étudiées, les extraits bruts obtenus ont présenté des indices d'émulsifications E_{24} de 100% (**Figure 52**), avec des émulsions stables pendant plus de 3 mois.

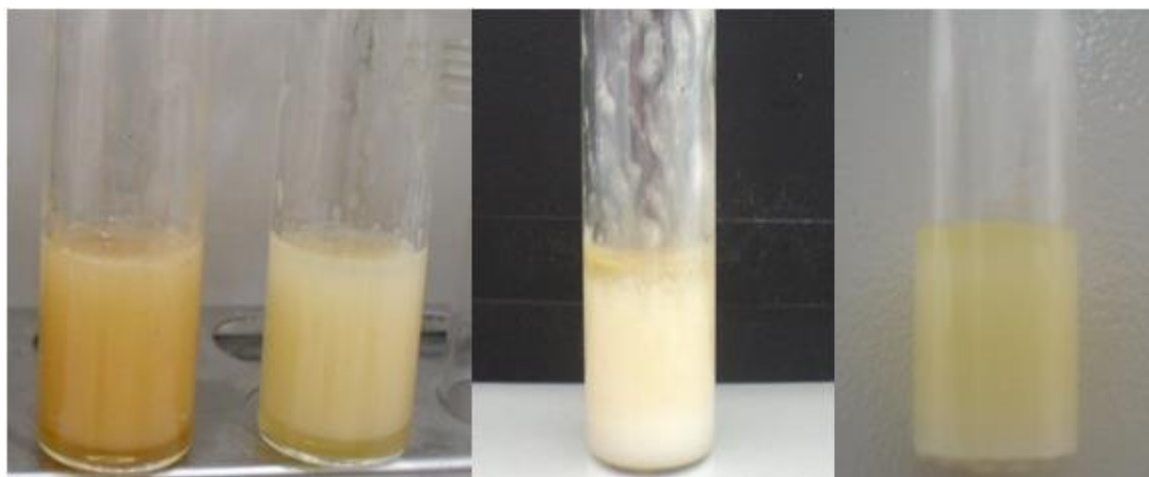


Figure 52 : Les émulsions obtenues avec les extraits bruts des biosurfactants produits par les souches de gauche à droite respectivement, *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Penicillium sp.* FS13 et *Aspergillus sp.* FS11.

Les observations microscopiques des émulsions obtenues sont représentées dans la **Figure 53**. Sous microscope photonique, l'émulsion formée par *Cryptococcus sp.* YLF possède des gouttelettes homogènes de petites tailles, et les autres émulsions formées par *Rhodotorula sp.* YBR, *Penicillium sp.* FS13, *Aspergillus sp.* FS 11 présentent des gouttelettes homogènes supérieures à celles formées par *Cryptococcus sp.* YLF.

Les résultats obtenus confirment que les émulsions formées par les extraits bruts des biosurfactants sont meilleures que celle formée par le surfactant synthétique SDS, avec des gouttelettes non homogènes de grandes tailles.

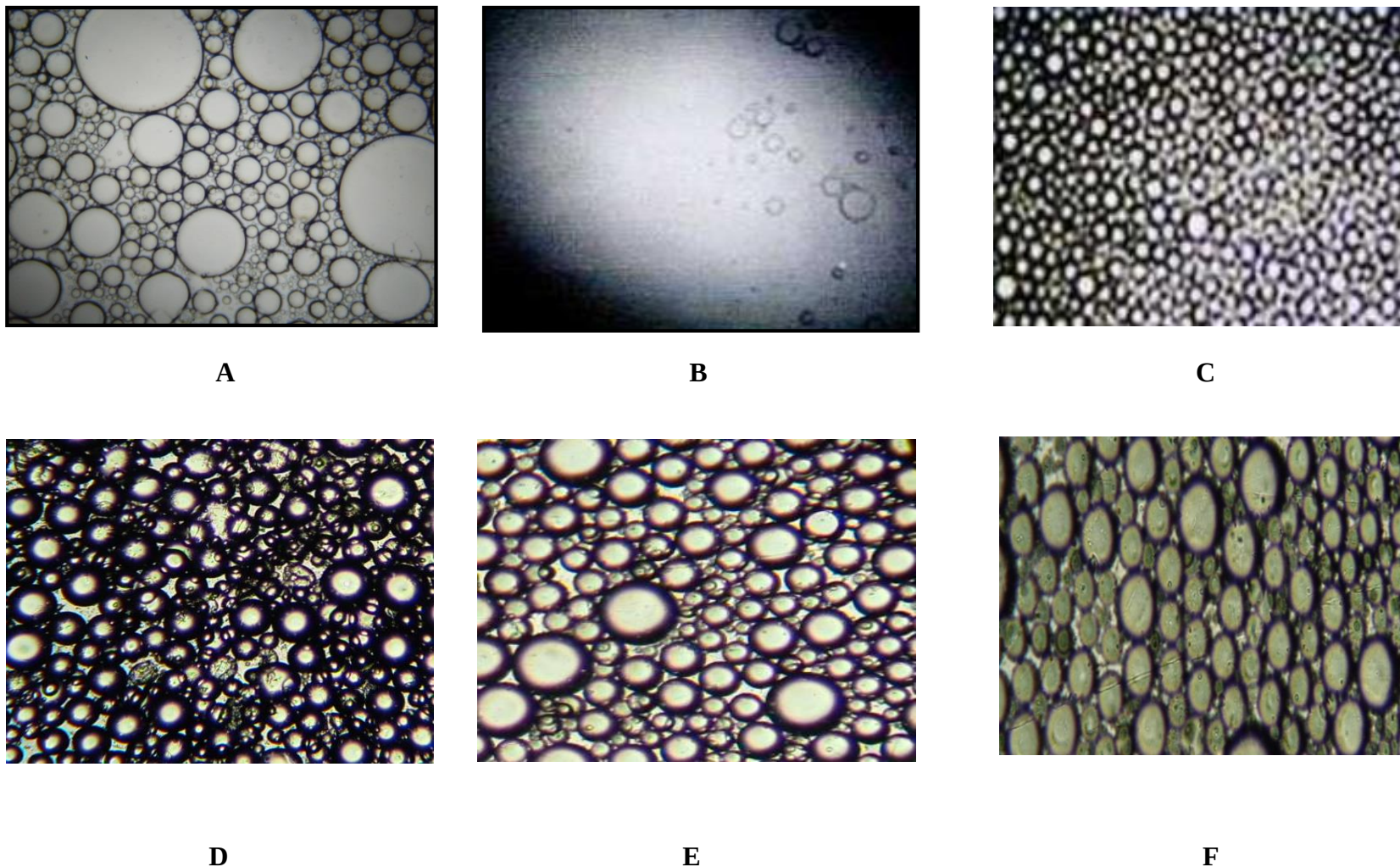


Figure 53 : L'aspect microscopique (Gx40) des émulsions obtenues avec le gasoil : (A) surfactant synthétique SDS, (B) l'eau distillée, (C) l'extrait brut de biosurfactant produit par *Cryptococcus* sp. YLF, (D) l'extrait brut de biosurfactant produit par *Rhodotorula* sp. YBR, (E) l'extrait brut de biosurfactant produit par *Penicillium* sp. FS13, (F) l'extrait brut de biosurfactant produit par *Aspergillus* sp. FS11.

III.9.2. Réduction de la tension superficielle

Les valeurs de TS obtenues avec les extraits bruts des biosurfactants sont respectivement $35,75 \pm 0,02$ mN/m, $30,16 \pm 0,09$ mN/m, $37,44 \pm 0,04$ mN/m et $40,72 \pm 0,04$ mN/m pour *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Penicillium sp.*FS13 et *Aspergillus sp.*FS11. Nos résultats ont montré une bonne activité de surface qui ne concorde pas avec certains travaux. Selon **Mnif et Ghribi (2015)**, les biosurfactants les plus efficaces sont ceux capables de réduire la tension superficielle de l'eau à des valeurs égal ou inférieur à 35 mN/m. Ils sont principalement produits par des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. En outre, certaines espèces de *Candida* sont capables de produire des biosurfactants présentant une activité tensioactive très efficace et peuvent réduire les tensions superficielles à des faibles valeurs (**Daverey et Pakshirajan, 2008 ; Rufino et al., 2011 ; Luna et al., 2016**).

Kiran et al. (2009) et **Silva et al. (2014)** ont rapporté que les biosurfactants produits par *Aspergillus sp.* MSF et *Mucor circinelloides* pourraient réduire la TS de 70 à 28 mN/m et 26 mN/m, respectivement. Récemment, une étude a révélé que le biosurfactant produit par *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 a réduit la TS à 26,5 mN/m (**Pele et al., 2019**).

III.9.3. Concentration micellaire critique CMC

La CMC des extraits bruts des biosurfactants obtenus pour les 4 souches fongiques *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Penicillium sp.*FS13 et *Aspergillus sp.* FS11, sont respectivement 280 mg/L, 180 mg/L (**Figure 54**), 390 m/L et 430 mg/L. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues par **Basac et Das (2014)** 270 mg/L, **Sen et al. (2017)** 150 mg/L, **Luna et al. (2013)** 250 mg/L et **Rufino et al. (2011)** 300 mg/L respectivement pour les souches *Cryptococcus sp.* VITGBN2 , *Rhodotorula babjevae* YS3, *Candida sphaerica* UCP0995 et *Candida lipolytica* UCP 0988.

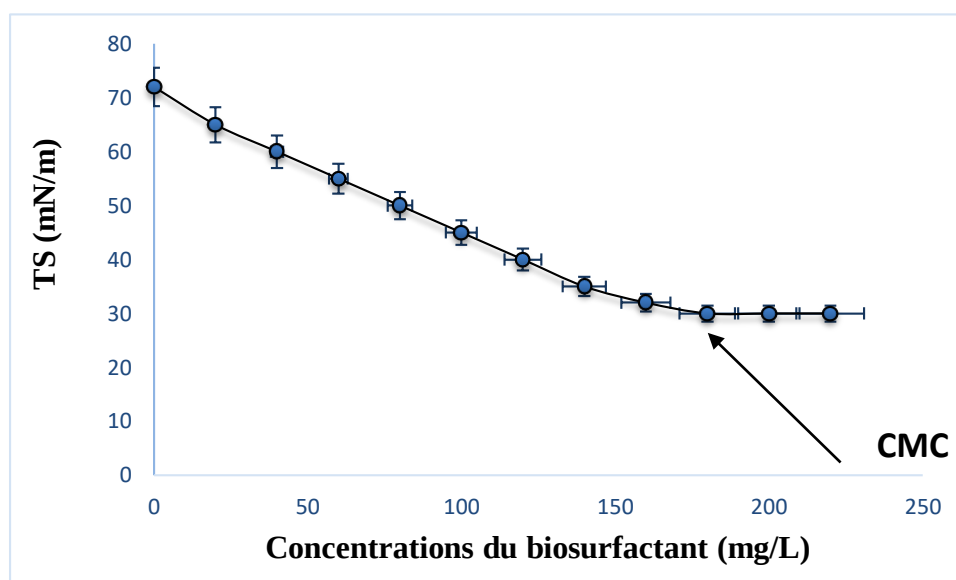


Figure 54 : CMC du biosurfactant produit par *Rhodotorula sp.* YBR sur milieu de culture à base des margines (30°C, pH 5,5 et 200 rpm).

Comme le montre la **Figure 54**, la TS est inversement proportionnelle à la concentration en biosurfactant pour des valeurs inférieures à 180 mg/L. Au-delà, aucune diminution significative n'est observée. Cela, donne une valeur de CMC de 180 mg/L pour le biosurfactant produit par *Rhodotorula sp.* YBR. La CMC de trois de nos biosurfactants est relativement élevée par rapport aux CMC des biosurfactants, généralement comprises entre 1 et 200 mg/L (**Mulligan, 2009**). Néanmoins, les CMC de nos biosurfactants sont inférieures à celles de certains tensioactifs chimiques tels que le SDS, dont la CMC allant de 2307 à 2596 mg/L (**Luna et al., 2013**).

De plus, les valeurs de CMC obtenues dans notre étude sont inférieures à celles rapportées par **Zenati et al. (2018)** ; **Meneses et al. (2017)** ; **Eddouaouda et al. (2012)** et **Gudiña et al. (2010)** (787 mg/L, 550 mg/L, 750 mg/L et 500 mg/L) respectivement, pour les souches suivantes *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Aureobasidium thailandense* LB01, *Staphylococcus sp.* 1E et *Lactobacillus paracasei*.

Par ailleurs, il faut signaler que la CMC d'un surfactant varie avec sa structure, la température de la solution, la présence d'électrolytes ou de composés organiques. La variation de la taille de la région hydrophobe est un facteur important et en général, la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe du surfactant augmente (**Banat et al., 1991**).

III.10. Essais d'application des biosurfactants produits

III.10.1. Récupération assistée du pétrole à partir d'un échantillon du sable contaminé

L'utilisation des surfactants biologiques dans la restauration des sites contaminés, semble être une stratégie prometteuse qui favorise la biodisponibilité des produits hydrophobes (**Banat et al., 2014**). Les biosurfactants émulsifient les hydrocarbures en améliorant leur solubilité, en diminuant la tension superficielle et en augmentant le déplacement des substances huileuses à partir de particules de sol (**Chrzanowski et al., 2012**).

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs équivalents chimiques, du fait qu'ils sont éco-compatibles, biodégradables, moins toxiques et non dangereux. De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier les effets des biosurfactants produits sur la récupération de pétrole brut adsorbé sur un échantillon de sable contaminé. Une comparaison a été réalisée dans les mêmes conditions, avec des surfactants chimiques (Tween 80 et SDS) comme des témoins positifs et avec de l'eau distillée comme un témoin négatif. La capacité du biosurfactant brut à récupérer le pétrole brut a été évaluée par la méthode décrite par **Sobrinho et al. (2008)**. En imprégnant 60 g de sable de plage avec 5 ml du pétrole brut. Des résultats satisfaisants ont été obtenus pour l'élimination de pétrole brut adsorbé sur le sable par les extraits bruts des biosurfactants produits par les quatre souches, avec les pourcentages de récupération suivants : 98%, 80%, 60% et 55%, respectivement pour *Rhodotorula sp.* YBR, *Cryptococcus sp.* YLF, *Penicillium sp.* FS13 et *Aspergillus sp.* FS11, par rapport aux témoins négatif et positif, l'eau distillée et les surfactants synthétiques SDS et Tween 80 avec des pourcentages de 10 % et 35 %, 45% respectivement (**Figure 55**). *Rhodotorula sp.* YBR a présenté le meilleur pourcentage de récupération (proche de 100%).

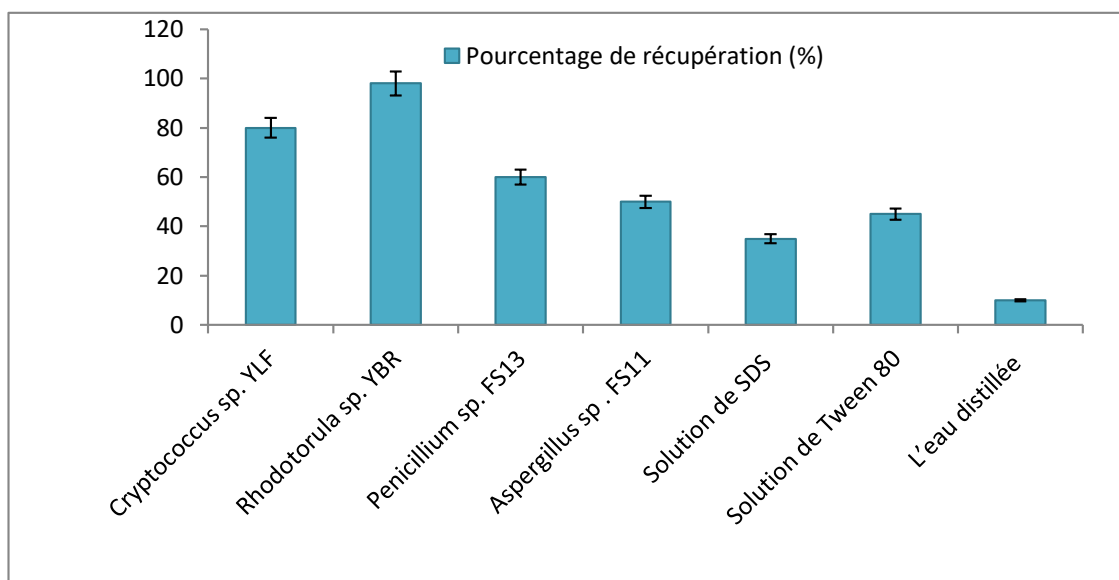


Figure 55 : Effets de l'extrait brut des biosurfactants produits par *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Penicillium sp.* FS13, *Aspergillus sp.* FS11, l'eau distillée, ainsi que les surfactants synthétiques SDS et Tween 80 sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sable contaminé par l'huile de moteur usée.

Différents biosurfactants ont été testés pour la récupération des produits dérivés du pétrole dans des sols contaminés. **Sobrinho et al. (2008)** ont testé un biosurfactant produit par *Candida sphaerica* pour la récupération de l'huile de moteur adsorbé au sol. Les auteurs en question, ont signalé des pourcentages d'élimination de 75% et 92% des sols argileux et limoneux, respectivement.

De même, **Batista et al. (2010)** et **Gusmão et al. (2010)** ont étudié l'application des biosurfactants produits par *Candida tropicalis* et *Candida glabrata* UCP1002 dans la récupération de l'huile de moteur adsorbé sur des échantillons du sable et ils ont enregistré des taux de récupération de 80% et 92,6 %, respectivement.

Dans le même contexte, **Rufino et al. (2007)** ont montré que les biosurfactants produits par *Candida sphaerica* ont récupéré 65% de l'huile de moteur adsorbée sur le sable.

De plus, **Luna et al. (2013)** ont isolé un nouveau biosurfactant, Lunasan, produit par *Candida sphaerica* UCP 0995. Ce biosurfactant a éliminé 95 % de gasoil.

Coimbra et al. (2009) ont montré la considérable aptitude de biosurfactants produit par *Candida guilliermondii* et *Candida Lipolytica*, pour éliminer le pétrole adsorbé sur un échantillon du sable (plus de 85%). En outre, un biosurfactant produit par *Candida antarctica* a récupéré environ 50% de l'huile adsorbée sur le sable (**Joshi et al., 2008**).

En outre, les rhamnolipides ont été utilisés avec succès dans ce domaine (**Abdel-Mawgoud et al., 2010 ; Silva et al., 2014 ; Rosa et al., 2015**). Autres tensioactifs produits par les espèces de *Pseudomonas* (**Silva et al., 2014**), *Bacillus* (**Vijayakumar et Saravanan, 2015**), *Fusarium* sp. bs-8 (**Qazi et al., 2013**) ont aussi montré leurs succès dans cette industrie.

III.10.2. Activité antimicrobienne des biosurfactants

La recherche des nouveaux agents antimicrobiens sûrs et efficaces justifie l'intérêt que porte l'industrie pharmaceutique aux molécules bioactives d'origine microbienne (**De Oliveira et al., 2015**). Les biosurfactants sont dotés de propriétés intéressantes potentiellement utiles dans l'industrie pharmaceutique. Plusieurs biosurfactants ont présenté une activité antimicrobienne contre divers micro-organismes. Ils comprennent la surfactine et l'iturine produites par *Bacillus subtilis*, les rhamnolipides de l'espèce *Pseudomonas*, les lipides mannosylerythritol de *Candida antarctica* et autres biosurfactants produits par certains champignons (**Santos et al., 2016**).

L'activité antibactérienne des biosurfactants est attribuée particulièrement à leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec différents constituants membranaires (**Ben Ayed et Nasri, 2016**).

Dans ce contexte, le potentiel antimicrobien des biosurfactants produits par les quatre souches sélectionnées a été mis en évidence contre des bactéries pathogènes Gram positif et Gram négatif, ainsi que *Candida albicans* et *Aspergillus niger*.

Ces résultats montrent que les extraits bruts des biosurfactants produits par les 4 souches ont exercé une activité antimicrobienne contre la totalité des souches tests utilisées.

Les extraits bruts des biosurfactants produits par *Rhodotorula* sp. YBR et *Cryptococcus* sp. YLF ont montré leurs plus fortes activités contre *Escherichia coli* ATCC 25922 ($\varnothing = 20 \pm 0,2$ mm et $16 \pm 0,24$ mm), respectivement (**Figure 56**).

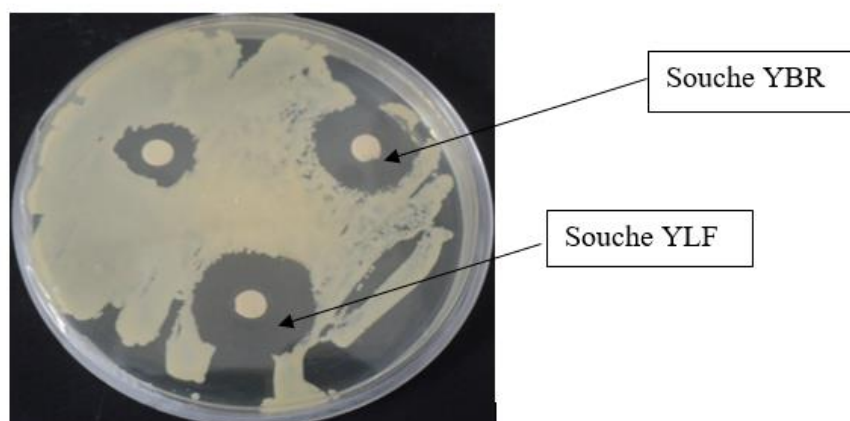


Figure 56 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton des souches YBR et YLF contre *Escherichia coli* ATCC 25922.

De même, *Aspergillus sp.* FS11 a présenté le diamètre le plus élevé contre *Salmonella typhi* ATCC 43300 ($\varnothing = 24 \pm 0,4$ mm) (**Figure 57**).

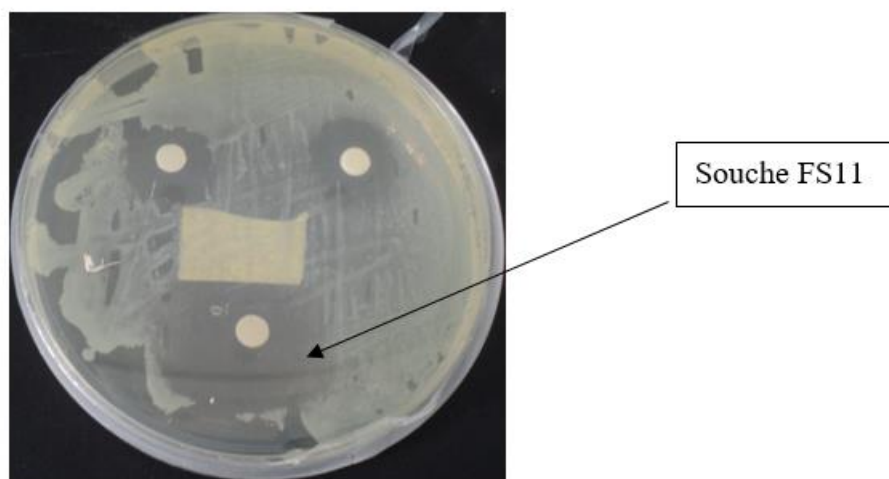


Figure 57 : Activité antibactérienne sur milieu Mueller-Hinton de la souche FS 11 contre *Salmonella typhi* ATCC 43300.

Le biosurfactant produit par *Penicillium sp.* FS13 a exercé la plus grande activité contre *Candida albicans* ATCC 549 ($\varnothing = 19 \pm 0,7$ mm) (**Figure 58**).

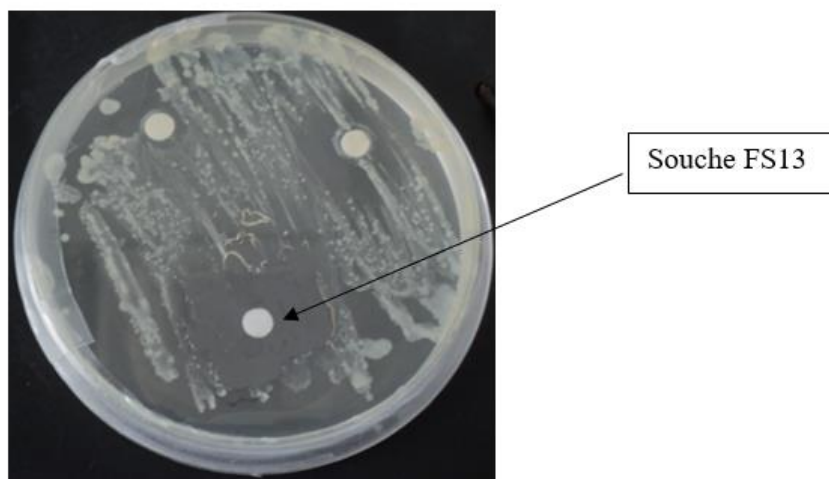


Figure 58 : Activité antifongique sur milieu Mueller-Hinton de la souche FS 13 contre *Candida albicans* ATCC 549.

Plus intéressant, les extraits bruts des biosurfactants produits par les 4 souches ont présenté une activité antifongique remarquable contre *Aspergillus niger* ATCC19404, comme le montre la **Figure 59**, où une inhibition totale de la croissance a été enregistrée.

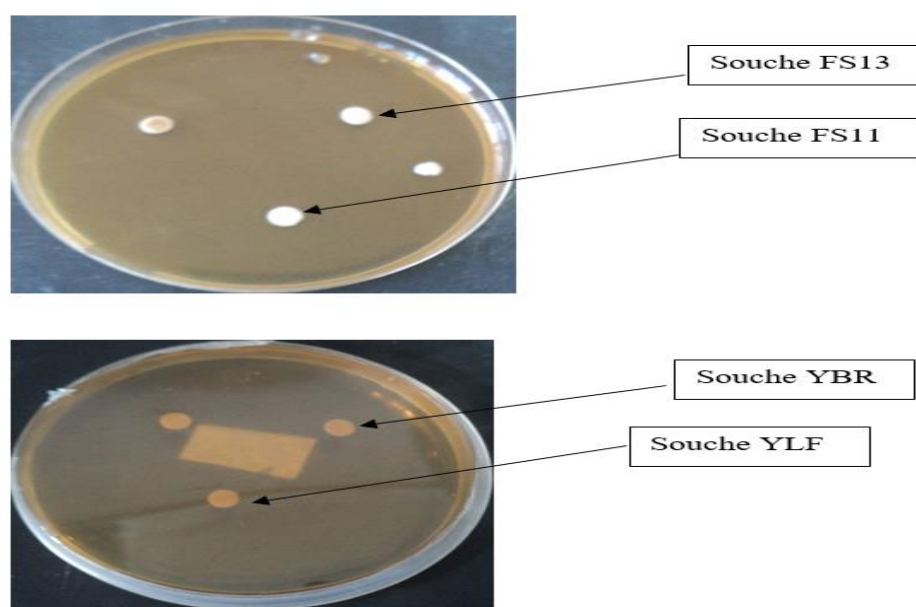


Figure 59 : Activité antifongique sur milieu Sabouraud des souches YLF, YBR, FS11 et FS13 contre *Aspergillus niger* ATCC19404.

Les résultats obtenus sont en accord avec plusieurs études. A titre d'exemple, **Joshi-Navare et Prabhune (2013)** ont rapporté que les sophorolipides dérivés de *Candida bombicola* ont inhibé la croissance des bactéries Gram-négatif et Gram-positif *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358) et *Bacillus subtilis* (ATCC6633). En outre, *Candida bombicola* et *Candida apicola*, ont produit un biosurfactant de type glycolipide (sophorolipide) inhibant la croissance de *Bacillus subtilis* et *Streptococcus faecium* à des concentrations comprises entre 6 et 29 mg /L (**Lang et al., 2002**). **Kitamoto et al. (2001)**, ont rapporté une forte activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* par un mannosylérythritole produit par *Candida antarctica* et un sophorolipide produit par *Candida apicola*.

Une autre étude a révélé que le biosurfactant partiellement purifié produit par *Aspergillus ustus* (MSF3) avait un large spectre d'activité antimicrobienne contre divers microorganismes *Streptococcus sp*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* (**Kiran et al., 2009**).

En outre, **Rufino et al. (2011)**, ont rapporté que les biosurfactants produits par *Candida lipolytica* UCP 0988 ont montré une activité antimicrobienne intéressante contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

Abalos et al. (2001), ont également rapporté que les rhamnolipides obtenus à partir de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries (*Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* et *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium phlei* et *Staphylococcus epidermidis*) et les champignons (*Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium crysogenum*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani*) à diverses concentrations.

Récemment, **Garg et al. (2018)** ont souligné l'activité antibactérienne du biosurfactant partiellement purifié produit par la souche *Candida parapsilosis* contre les souches *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les concentrations croissantes du biosurfactant ont entraîné une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition pour chaque souche. Le diamètre maximal de la zone d'inhibition a été observé à une concentration de biosurfactant de 1,5 mg/ ml dans lequel, il était d'environ 2,87 cm pour *Escherichia coli* et de 2,66 cm pour *Staphylococcus aureus*.

*Conclusion et
perspectives*

Pour répondre à notre objectif qui consistait à rechercher des souches microbiennes fongiques productrices de biosurfactants, dans un premier lieu, nous avons procédé à l'isolement des levures et des moisissures à partir de différents biotopes. Cette manipulation nous a permis d'obtenir une centaine de levures et une quarantaine de moisissures. Par la suite, ces isolats ont subi un criblage pour déterminer les souches possédant une capacité efficiente en production des biosurfactants. Ce criblage a été réalisé avec différents tests comme l'indice d'émulsification E_{24} , le test de drop collapse, le test de déplacement de l'huile et la recherche de l'activité hémolytique.

Sept (07) levures sont révélées performantes en terme de production des biosurfactants ($E_{24} > 50\%$), cependant deux seulement ont été sélectionnées, il s'agit des deux souches codées YLF et YBR. Parmi les trente (30) moisissures obtenues pouvant produire des biosurfactants, deux (02) seulement ont été sélectionnées pour leur performance (codées FS11 et FS13). En plus de leurs potentiels de production des biosurfactants, les quatre (04) souches sélectionnées ont présenté une caractéristique d'halotolérance importante (NaCl jusqu'à 20%). En effet, la présence de concentrations extrêmement élevées en NaCl dans le milieu de croissance empêcherait les contaminations dues aux autres microorganismes et ouvre une voie vers des biotechnologies futures génératrices de molécules actives et hautement stables dans des conditions extrêmes de salinité, qui peuvent être explorées pour plusieurs applications.

L'identification sommaire des isolats, nous a permis de distinguer des genres levuriens très diversifiés, à savoir (*Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* et *Trichosporon*). De même pour les moisissures, 6 genres ont été distingués (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor* et *Penicillium*).

L'identification approfondie des deux souches (YLF et YBR) par l'étude de leurs caractères culturels, biochimiques, physiologiques et génétiques, nous a permis de les affilier aux genres *Cryptococcus* et *Rhodotorula*. La position phylogénétique de ces souches a été déterminée par le séquençage de l'ARNr 5.8S. Les données obtenues ont été comparées aux données de la banque de données EMBL. Le séquençage partiel de l'ARNr 5.8S de la souche YLF a été comparé aux autres levures, nous avons démontré que cette souche possédait des similitudes d'apparenté élevées (98%) avec celles du genre *Cryptococcus*. Quant à la souche YBR, elle appartient au genre *Rhodotorula* avec des similitudes d'apparenté très élevées (99%). Les deux moisissures ont été identifiées comme *Aspergillus sp.* FS11 et *Penicillium sp.* FS13, en se basant sur les caractères macroscopiques et microscopiques.

Ces mêmes souches (*Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS11 et *Penicillium sp.* FS13) ont été sélectionnées pour leurs capacités efficaces en production de biosurfactants, formant ainsi des émulsions très stables.

La deuxième partie de cette étude consiste à l'optimisation des paramètres physico-chimiques de la production des biosurfactants tel que l'étude de l'optimum de pH, de température, la meilleure source de carbone et la meilleure source d'azote pour les quatre souches fongiques sélectionnées. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de levure et le glucose étaient les sources d'azote et de carbone les plus préférables, qui ont abouti à une production maximale des biosurfactants pour les quatre souches. La température optimale pour la croissance et la production des biosurfactants pour les deux levures était 30 °C ($E_{24} > 70\%$). Tandis que la production maximale des biosurfactants a été obtenue à 28 °C pour *Aspergillus sp.* FS11 ($E_{24} = 65,12\%$) et à 25 °C pour *Penicillium sp.* FS13 ($E_{24} = 70\%$). En outre, l'optimum de croissance et de production des biosurfactants ($E_{24} = 71,42\%$) a été obtenu à pH 6 pour *Cryptococcus sp.* YLF, pH 5,5 ($E_{24} = 72\%$) pour *Rhodotorula sp.* YBR, pH 5 ($E_{24} = 78,94\%$) pour *Aspergillus sp.* FS11 et pH 6 ($E_{24} = 70,58\%$) pour *Penicillium sp.* FS13.

Le succès de la commercialisation de tout produit biotechnologique dépend largement de ses bioprocédés économiques. Actuellement, les coûts de production élevés et les faibles rendements des biosurfactants, les rendent non compétitifs face à leurs homologues chimiques. Par conséquent, ils n'ont pas été largement commercialisés. Afin d'obtenir un processus de fermentation économique, on s'est intéressé à la valorisation des substrats bon marché. Différents milieux de culture à base des déchets agro-industriels ont été utilisés pour le processus de fermentation sous des conditions connues ; milieu à base de margine, milieu à base de grignons d'olives, milieu à base de la mélasse, milieu à base de la liqueur de trempage de maïs (CSL), milieu à base de lactosérum et milieu à base de jus de datte.

La troisième partie de cette étude consiste à la production, la récupération, la caractérisation et l'étude des propriétés des biosurfactants produits par les souches sélectionnées. Des fermentations en batch ont été réalisées sur des milieux à base des déchets agro-industriels, elles ont montré que les souches ont produit des biosurfactants sur des matières premières bon marché en tant que substrats, ce qui représente une bonne alternative pour minimiser les coûts de production des biosurfactants et les rendre compétitifs à l'échelle industrielle à l'égard de leurs homologues synthétiques.

Ainsi, les effluents de l'industrie oléicole comme les margines, favorise une bonne croissance microbienne. En effet, sur milieu de culture à base des margines, les valeurs de E_{24} ont atteint $90 \pm 0,10\%$ et $76 \pm 0,28\%$, les valeurs de tension superficielle étaient : 35 mN/m et

$42 \pm 0,20$ mN/m et les concentrations en biosurfactants étaient $10,08 \pm 0,38$ g/L et $11,15 \pm 0,7$ g/L, respectivement pour les souches *Rhodotorula sp.* YBR et *Aspergillus sp.* FS 11. La souche *Penicillium sp.* FS 13 cultivée sur un milieu de culture à base de lactosérum a montré les résultats suivants : $E_{24} = 85 \pm 0,2$ %, $TS = 40 \pm 0,28$ mN/m et un rendement en biosurfactants de $13,15 \pm 0,52$ g/L. Quant à *Cryptococcus sp.* YLF, elle a produit des biosurfactants avec un E_{24} de $80 \pm 0,15$ %, une TS de 40 mN/m et une concentration en biosurfactants de $8,05 \pm 0,25$ g/L sur milieu à base de jus de datte.

La semi purification des extraits bruts des biosurfactants et leur caractérisation respective par CCM ont permis de mettre en évidence la présence de peptides, glucides et lipides dans leurs structures. En effet, le biosurfactant produit par la souche YLF est composé d'un mélange de sucres et de lipides, donc il s'agit probablement d'un glycolipide. Tandis que, le biosurfactant produit par la souche FS13 comporte à la fois des composés peptidiques et glucidiques, il est probablement une glycoprotéine ou un glycopeptide.

Par contre, les biosurfactants produits par les deux autres souches FS11 et YBR, sont composés d'un mélange de sucres, de lipides et de protéines. Ils pourraient s'agir donc de glycoprotéines, de glycolipides, de lipopeptides ou un mélange des trois (glycolipoprotéines). Les groupements fonctionnels des extraits bruts ont été déterminés en utilisant la spectroscopie IRTF, les spectres obtenus renforcent les résultats de CCM. De même, les résultats de l'estimation des macromolécules ont confirmé les résultats de CCM. Cependant, la caractérisation de la composition biochimique précise de ces biosurfactants exige une purification et une identification plus détaillée.

La stabilité des biosurfactants produits a été testée dans diverses conditions physicochimiques extrêmes, ainsi nous avons démontré que les biosurfactants obtenus sont stables à une gamme de températures (4 à 100 °C), stables aussi à des valeurs de pH (2 à 12) et également à des concentrations de NaCl (1-10%). En outre, les résultats obtenus dans cette étude mettent en relief les propriétés émulsifiantes et tensioactives intéressantes des biosurfactants produits.

Toutefois, ces propriétés pourraient encourager la possibilité d'utiliser ces produits dans diverses applications industrielles. Dans ce contexte, et comme dernier volet, nous nous sommes intéressés à réaliser des essais d'applications des biosurfactants produits dans la récupération de pétrole brut et également comme agents antimicrobiens. Les biosurfactants ont montré un grand potentiel en récupération de pétrole à partir des échantillons contaminés et également une activité antimicrobienne intéressante contre certains microorganismes pathogènes

A la lumière de ces résultats pertinents, les souches *Cryptococcus sp.* YLF, *Rhodotorula sp.* YBR, *Aspergillus sp.* FS11 et *Penicillium sp.* FS13, ainsi que leurs biosurfactants se sont avérés prometteurs, ils pourraient être utilisés avec succès dans diverses applications biotechnologiques comme le domaine de la récupération du pétrole là où la pression et le pH sont à leurs valeurs extrêmes, ainsi que la décontamination des sols, des eaux et des sédiments marins contaminés par les hydrocarbures, ainsi que d'autres applications en tant qu'émulsifiants en agroalimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens.

A l'issue de notre travail de recherche et en guise des perspectives visées pour compléter, approfondir et renforcer les résultats obtenus, nous recommandons les points suivants :

- ✓ Compléter l'étude par une analyse statistique approfondie sur la répartition des levures et mycètes dans les produits explorés.
- ✓ Caractérisation génotypique complète et l'identification phylogénétique des souches sélectionnées (hybridation ADN-ADN).
- ✓ Séquençage des génomes complets des souches sélectionnées, qui permettra d'identifier les gènes responsables de la production des biosurfactants.
- ✓ Expression des gènes codant pour la synthèse des biosurfactants dans différents systèmes d'expression, afin de surproduire les biosurfactants sur une grande échelle.
- ✓ La purification des biosurfactants produits par HPLC préparative, pour une caractérisation structurale bien approfondie, nous recommandons un ensemble de techniques plus performantes telles; la spectrométrie de masse qui permettra de connaître le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournira l'analyse élémentaire de la molécule et la résonance magnétique nucléaire à haut champs qui indiquera la structure et la conformation des composés, ainsi qu'une CG-SM pour les acides gras.
- ✓ L'étude de la toxicité des biosurfactants produits vis-à-vis des organismes vivants.
- ✓ La réalisation d'autres applications des biosurfactants produits comme dispersant, émulsifiant en industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et pétrolière.

Références

bibliographiques

- Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., García F., Manresa A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. 17:1367–1371.
- Abdel-Mawgoud A.M., Lépine F., Deziel E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 1323–1336.
- Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*. 223: 143–151.
- Abu-Ruwaida A.S., Banat M., Haditirto M., Salem S., Kadri A. (1991). Isolation of biosurfactant producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotechnologica*. 11: 315-324.
- Accorsini F.R., Rossini Mutton M.J., Macedo Lemos E.G., Benincasa M. (2012). Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 10: 116-125.
- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga-Crespo P., Villa T.G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90: 1219–1227.
- Akintunde T.A., Boboye Bolatito E., Abioye Olabisi P., Oyeleke S.B., Ijjah Udemé J.J., Suleiman A. (2015). Characterization of new glycosophorolipid-surfactant produced by *Aspergillus Niger* and *Aspergillus flavus*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 3: 34-39.
- Al-Bahry S.N., Al-Wahaibi Y.M., Elshafie AE., Al-Bemani A.S., Joshi S.J., Al-Makhmari H.S., Al-Sulaimani H.S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 81: 141–146.
- Alexopoulos C.J and Mims C.W. (1979). *Introductory Mycology*. 3rd Edition. Wiley, New York.
- Amaral P.F.F., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M.J., Coutinho J.A.P. (2010). Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. Chapter Biosurfactants Volume 672 of the series *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 672: 236-249.
- Amezcuá-Veja C., Poggi-Varaldo H.M., Esparza-García F., Rodríguez-Vázquez R. (2006). Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced

- by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*. 98: 237–240.
- Andrade R.F., Silva T.A., Ribeaux D.R. (2018). Promising biosurfactant produced *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 using renewable resources and its application in cotton fabric cleaning process. *Advances in Materials Science and Engineering*. 162: 45-73.
- Araújo H. W. C., Andrade R. F. S., Montero-Rodríguez D., Rubio-Ribeaux D.C.A Alves da Silva and Campos-Takaki G.M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*. 18: 1-13.
- Archimède H., Xande X., Gourdine J.L., Fanchone A., Alexandre G., Boval M., Coppry O., Arquet R., Fleury J., Regnier C., Renaudeau D. (2011). La canne à sucre et ses co-produits dans l'alimentation animale. *Innovations Agronomiques*. 16: 165-179
- B**ahia F.M., Carneiro de Almeida G., Pereira de Andrade L., Gonçalves Campos C., Queiroz L.R., Vieira da Silva R.L., Verardi Abdelnur P., Corrêa J.R., Bettiga M., Parachin N.S. (2018). Rhamnolipids production from sucrose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*. 8: 29-35.
- Banat I.M., Samarah N., Murad M., Horne R., Banerjee S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 7: 80-88.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 495–508.
- Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia I., Smyth T., Marchant R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 427-444.
- Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R and Nyayanit N.V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*. 5: 1-18.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (2000). Yeasts: Characteristics and Identification, (third ed.) *Cambridge University Press*. p. 163-172.
- Basak G and Das N. (2014). Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by *Cryptococcus* sp. VITGBN2 and its application on Zn (II) removal from electroplating wastewater. *Journal of Environmental Biology*. 35: 1087–1094

- Batista R.M., Rufino R.D., Luna J.M., De Souza J.E.G., Sarubbo L.A. (2010). Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water Environment Research*. 82: 418–25.
- Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J. (2004). Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*. 95 :15-18.
- Ben ayed H et Nasri M. (2016). Les lipopeptides de *Bacillus*: des molécules bioactives à structure particulière et à forte potentialité d'application. *Nutrition et Santé*. 5: 115-125.
- Bhardwaj G., Cameotra S.S., Chopra H.K. (2013). Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. 4: 160–166.
- Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species? *American Journal of Botany*. 98: 426-438.
- Bocquet J. (1993). Généralités sur les microorganismes. En 'Biotechnologie'. Ed. R. Scriban. *Tec. Doc. Lavoisier. Paris*.p.38-46.
- Bodour A.A and Miller-Maier R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 273 – 280.
- Bodour A.A., Drees K.P., Maier R.M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3280–3287.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. *Nathan. Paris*. 80 : 29-36.
- Botha A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 43: 1–8.
- Botton B., Breton M., Fevre M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles Importance industrielle. 2ème édition, *Collection Biotechnologies, Masson*. p. 512.
- Bouassida M., Ghazala I., Ellouze-Chaabouni S., Ghribi D. (2018). Improved biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SPB1 mutant obtained by random mutagenesis and its application in enhanced oil recovery in a sand system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 95–104.

- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F. (2005). Les champignons mycologie fondamentale et appliquée. 2^{ème} édition. Masson.
- Bouix M et Leveau J.Y. (1991). Les levures dans : Bourgeois C.M., Leveau J.Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires, édition 2 *Lavoisier-Tec & Doc, Paris*. p. 206-229.
- Bourgeois C.M et Larpent J.P. (1996). Microbiologie alimentaire. vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed). *Lavoisier. Paris*. p. 523.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- Brock T.D., Madingan M.T., Martingo J.M., Parker J. (1994b). Grown and Its Control. En 'Biology of Microorganisms'. *Prentice-Hall International, Inc. New Jersey*. 321-360.
- Buzzini P., Branda E., Goretti M., Turchetti B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology. Ecol.* 82: 217–241.
- Buzzini P and Margesin R. (2014). Cold-Adapted Yeasts: A Lesson from the Cold and a Challenge for the XXI Century. *Springer*. DOI: 10.1007/978-3-642-39681-6_1.
- Campos J.M., Stamford T.L.M., Sarubbo L.A., Luna J.M., Rufino R.D., Banat I.M. (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*. 29: 1097–1108.
- Carlile M.J and Watkinson S.C. (1996b). Fungal Cells and Vegetative Growth. En: 'The Fungi'. *Academic Press. London*. p. 121-139.
- Casas J and Ochoa F.G. (1999). Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88: 488-494.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans La sécurité alimentaire du consommateur, *Lavoisier, Tec&Doc*.
- Cavalero D.A and Cooper D.G. (2003). The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of Biotechnology*. 103:31–41.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P. (2002). Cahier de formation ; les moisissures d'intérêt médicale.

- Chandran P and Das N. (2010). Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2: 6942-6953.
- Chrzanowski L., Lawniczak L. and Czaczyk K. (2012). Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 401–419.
- Cirigliano M.C and Carman G.M. (1984). Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied Environmental Microbiology*. 48: 747-750.
- Cochrane S.A and Vederas J.C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*. 36: 4-31.
- Coimbra C.D., Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A. (2009). Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Current Microbiology*. 58: 245–251.
- Colak A.K and Kahraman H. (2013). The use of raw cheese whey and olive oil mill wastewater for rhamnolipid production by recombinant *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental and Experimental Biology*. 11: 125–130.
- Cooper D.G., Macdonald C.R., Duff S.J., Kosaric N. (1981). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Applied Environmental Microbiology*. 42: 408–412.
- Cooper D.G and Paddock D.A. (1984). Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied Environmental Microbiology*. 47:173-176.
- Cortes-Sánchez A., Hernández-Sánchez H., Jaramillo-Flores M. (2011). Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *African Journal of Microbiology Research*. 5: 2512–2523.
- Daniel H.J., Reuss M., Syldatk C. (1998). Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnology Letters*. 20:1153-1156.
- Daverey A and Pakshirajan K. (2009). Production, characterization, and properties of sophorolipids from the yeast *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium. *Applied. Biochemistry and Biotechnology*. 158: 663–674.
- Decesaro A., Rigon M.R., Thomé A., Colla, L.M. (2013). Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. *Química Nova*. 36 : 947-954.

- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. *Edition TEC& DOC. Lavoisier*.
- Delgado-Jarana J., Rincon A.M., Benitez T. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*. 148: 1305-1315.
- De Oliveira M.R., Magri A., Baldo C., Neto D.C., Minucelli T., Colabone Celligoi M.A.P. (2015). Review: Sophorolipids a promising biosurfactant and it's applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*. 6 : 161-174.
- Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*. 48: 1532-1552.
- Desai J.D and Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61: 47-64.
- Deshpande M and Daniels L. (1995). Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresource Technology*. 54: 143–150.
- Deverall B.J. (1965). The Physical Environment for Fungal Growth. En 'The Fungi, an Advanced Treatise'. Ed. G.C. Ainsworth & A.S. Sussman. Vol. I. Academic Press. New York. 543-550.
- Déziel E., Leptine F., Milot S., Villemur R. (2000). Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain from 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 485: 145-155.
- Dix N.J and Webster J. (1995a). Structure of Fungal Communities. En 'Fungal Ecology'. Chapman & Hall. London. p. 39-84.
- Dubey K and Juwarkar A. (2001). Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17: 61-69.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350–356.
- Eddouaouda K., Mnif S., Badis A., Younes S.B., Cherif S., Ferhat S., Mhiri N., Chamkha, M., Sayadi S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of basic microbiology*. 52: 408-418.
- Edwards K.R and Hayachi R. (1965). Structure of Rhamolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 111: 415-421.

- Elazzazy A.M., Abdelmoneim T.S., Almaghrabi O.A. (2015). Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22: 4466–475.
- Florent J. (1993). Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêts industriels. *Ed. Lavoisier Tec et Doc*. p. 612.
- Fukuoka T., Morita T., Konishi M., Imura T., Kitamoto D. (2007). Characterization of new glycolipid biosurfactant tri-acylated mannosylerythritol lipids, produced by *Pseudozyma* yeasts. *Biotechnology Letters*. 29: 1111–1118.
- Garcia-Ochoa F and Casas J.A. (1999). Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 613-621.
- Garg M., Priyanka L., Chatterjee M. (2018). Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. *Biotechnology Reports*. 18: 251.
- Garima B., Swaranjit S.C., Harish K.C. (2013). Biosurfactant from fungi. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. 4: 5 - 6.
- Gartshore J., Lim Y.C., Cooper D.G. (2000). Quantitative analysis of biosurfactants using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy. *Biotechnology Letters*. 22: 169–172.
- Gautam G., Mishra V., Verma P., Pandey A.K and Negi S. (2014). A cost effective strategy for production of Biosurfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*. 4: 6-11.
- Geetha S.J., Banat I.M., Joshi S.J. (2018). Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14: 23-32.
- Goldsworthy G.J., Mordue W., Guthkelch J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*. 18: 545-551.
- Gonçalves A.B., Paterson R.R.M., Lima N. (2006). Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209: 257-264.

- Gudiña E.J., Rocha V., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*. 50: 419-424.
- Gudiña E.J., Rodrigues A.I., de Freitas V., Azevedo Z., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. (2016). Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*. 212: 144-150.
- Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. *Dunod, Paris*. p. 7-330.
- Guiraud J.P. (2003). Microbiologie Alimentaire. *Edition Dunod. Paris*. p. 136-139.
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitas A. (2000). Hypersaline waters in salterns natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 235– 240.
- Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitas A. (2005). Halotolerant and halophilic fungi. In: Deshmukh S.K., Rai M.K. (eds), Biodiversity of Fungi—Their Role in Human Life. *Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi*. p. 69–128.
- Gusmão C.A.B., Rufino R.D., Sarubbo L.A. (2010). Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fatwaste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26: 1683–92.
- H**arju S., Fedosyuk H., Peterson K.R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*. 4: 4-8.
- Hasani zadeh P., Moghimi H., Hamed J. (2018). Biosurfactant production by *Mucor circinelloides*: Environmental applications and surface-active properties. *Engineering in life sciences*. doi.org/10.1002/elsc.201700149.
- Healy M.G., Devine C.M., Murphy R. (1996). Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*. 18: 41-57.
- Hentati D., Chebbi A., Loukil S., Godon J.J., Sayadi S., Chamkha M. (2016) . Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia. *Environmental Sciences and Pollution Research*. 23: 15088-15100.
- Hommel R.K., Stegner S., Weber L., Kleber H.P. (1994). Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42: 192-197.

- I**lori M.O., Adebuseye S.A., Ojo A.C. (2008). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2539–2545.
- J**ohansen P.G., Owusu-Kwarteng J., Parkouda C., Wilfrid Padonou S., Jespersen L. (2019). Occurrence and Importance of Yeasts in Indigenous Fermented Food and Beverages Produced in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1-22.
- Joshi S., Bharucha C., Jha S., Yadav S., Nerurkar A., Desai A.J. (2008)+. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*. 99: 195–199.
- Joshi-Navare K and Prabhune A. A. (2013). Biosurfactant sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *Biomedical Research International*. 7: 1-8.
- K**atamai W., Maneerat S., Kawai F., Kanzaki H., Nitoda T., Kittikun A. (2008). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Issatchenkia orientalis* SR4. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 54: 79-82.
- Kebbouche-Gana S., Gana M.L., Khemili S., Fazouane-Naimi F., Bouanane N. A., Penninckx M., Hacene H. (2009). Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36: 727–738.
- Kebbouche-Gana S., Gana M.L., Ferrioune I., Khemili S. (2013). Production of biosurfactant on crude date syrup under saline conditions by entrapped cells of *Natrialba* sp. strain E21, an extremely halophilic bacterium isolated from a solar saltern (Ain Salah, Algeria). *Extremophiles*. 17: 981–993.
- Kermanshahi R.K and Peymanfar S. (2012). Isolation and identification of lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16s rDNA gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 5: 528-532.
- Khopade A., Biao R., Liu X. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*. 285: 198–204.
- Kim S.Y., Oh D.K., Lee K.H., Kim J.H. (1997). Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48: 23–26.

- Kim H.S., Yoon B.D., Choung D.H., Oh H.M., Katsuragi T. (1999). Characterization of a biosurfactant mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY 16. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 713-721.
- Kiran G.S., Hema T.A., Gandhimathi R., Selvin J., Thomas T.A. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* .73: 250–256.
- Kiran G. S., Thomas T. A., Selvin J., Sabarathnam B., Lipton A. P. (2010): Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresource Technology*. 101: 2389– 2396.
- Kitamoto D., Ikegami T., Suzuki T., Sasaki A., Takeyama Y., Idemoto Y., Koura N., Yamagishita H. (2001). Microbial conversion of nalkanes into glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. *Biotechnology Letters*. 23: 1709-1714.
- Konishi M., Fukuoka T., Morita T., Imura T., Kitamoto D. (2008). Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *Journal of Oleo Science*. 57: 359-369.
- Konishi M., Nishi S., Fukuoka T., Kitamoto D., Watsuj T., Nagano Y., Yabuki A., Nakagawa S., Hatada Y., Horiuchi J. (2014). Deep-sea *Rhodococcus* sp. BS-15, lacking the phytopathogenic fas genes, produces a novel glucotriose lipid biosurfactant. *Marine Biotechnology*. 16: 484–493.
- Kreger-van Rij N.J.W. (1984). The Yeasts: a taxonomic study. 3rd edn Amsterdam: Elsevier.
- Kumar Gaur V., Regara R K ., Dhiman N., Gautam K., Srivastava J.K., Patnaik S., Kamthane M., Manickam N. (2019). Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida spp.*: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource Technology*. 285: 121-131.
- Kurtzman C.P and Fell J.W. (1998). The Yeasts, a taxonomic study. ELSEVIER SCIENCE B.V.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011). The Yeasts: a taxonomic study. 5th edn Amsterdam: Elsevier.
- Lachance M. A., Bowles J. M., Wiens F., Dobson J., Ewing C. P. (2006). *Metschnikowia orientalis* sp. nov., an Australasian yeast from nitidulid beetles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2489–2493.

- Lachance M. A. (2012). In defense of yeast sexual life cycles: the forma asexualis – an informal proposal. *Yeast Newsletters*. 61: 24–25.
- Lang S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 7: 12–20.
- Larpent J.P. (1991). Biotechnologie des levures. *Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris*. p. 97-127.
- Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire. Techniques de laboratoire. Les levures. *Tec et Doc. Lavoisier*. p. 464-472.
- Larpent L.P et Larpent-Gourgaud M. (1997). Mémento technique de microbiologie - 3ème Edition Ed. *Tec & Doc*. p. 1039.
- Las Heras-Vazquez F.J., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J. M., Rodriguez-Vico F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*. 3: 3-9.
- Ławniczak L., Marecik R., Chrzanowski L. (2013). Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 2327–2339.
- Lee S.C., Lee S.J., Kima S.H., Parka I.H., Lee Y.S., Chungb S.Y., Choi Y.L. (2008). Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. *Bioresource Technology*. 99: 2288–2292.
- Lee D.W., Lee H., Kwon B.O., Khim J.S., Yim U.H., Kim B.S., Kim J.J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution*. 241: 254-264.
- Leveau J.Y et Bouix M. (1993). Les levures. Dans : Microbiologie industrielle, les micro-organismes d'intérêt industriel. Eds. *Tech. et Doc. Lavoisier. Paris*. p. 2-39.
- Leyral G et Vierling E. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires. 4^{ème} édition *Biosciences et techniques*. p. 87.
- Li E et De Orduña M.R. (2003). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Frontiers in Microbiology*. 50: 283-288.
- Lin S, Carswell KS, Sharma MM, Georgiou G. (1998). Continuous production of the lipopeptide biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 281–285.

- Liu Y., Koh C.M.J., Ji L. (2011). Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*. 120: 3927-3933.
- Liu Y., Wang H., Li X., Li J. (2015). Heavy metal contamination of agricultural soils in Taiyuan. *China Pedosphere*. 25: 901-909.
- Lodder J. (1970). The Yeasts: a taxonomic study. 2nd edition Amsterdam: North-Holland Publishing.
- Lourens K and Reid G. (2002). Yeast nutrient management in winemaking. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker. *Annual Technical*. 5. 50 - 54.
- Lukondeh T., Ashbolt N.J., Rogers P.L. (2003). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 52–56.
- Luna J.M., Rufino R., Sarubboa L.A., Campos-Takaki G.B. (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 and Surfaces B: Biointerfaces*. 102: 202– 209.
- Luna J. M., Santos Filho A. S., Rufino R. D., Sarubbo L. A. (2016). Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. *Chemical Engineering Transactions*. 49: 583–588.
- Maass** D., Moya Ramírez I., García Román M., Jurado Alameda E., Ulson de Souza A.A., Borges Valle J.A., Altmajer Vaz D. (2015). Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91: 1990-1997.
- Madigan M.T and Martinko J.M. (2007). Biologie des microorganismes. 11^{ème} édition. Pearson Education. Broek. France. p. 478- 479.
- Mahdy H.M., Fareid M.A., Hamdan M.N. (2012). Production of biosurfactant from certain *Candida* strains under special conditions. *Researcher*. 4: 39-55.
- Maier R.M. (2003). Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. 5: 101–121.
- Makkar R.S and Cameotra S.S. (2004). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 428–434.
- Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat I.M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 28: 1-5.

- Marchant R and Banat I.M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnology*. 30: 558-565.
- Mariathason B. D., Fernando A. R., Vijayaragavan T. V., Subramanian V., John S. C., Jenifer A., Mariavincent M., Prasnjit D., Citarasu T. (2013). *Halomonas* species, Bs4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. *Springer Open Journal*. 2:149.
- Mendes Souza P., Freitas-Silva M., Alves de Lima E., Silva T., Silva G.K.B., Lima M.A.B., Nascimento A.E., Marques N., Santos V.P., Oliveira L.T., Campos-Takaki G.M. (2016). Factorial Design based Medium Optimization for the Improved Production of Biosurfactant by *Mucor polymorphosphorus*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5: 898-905.
- Menesesa D.P., Gudiña E. J., Fernandes F., Gonçalves L.R.B., Rodrigues L.R., Rodrigues S. (2017). The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiological Research*. 204 : 40-47.
- Mercadé M.E., Manresa M.A., Robert M., Espuny M.J., De Andrés C., Guinea J. (1993). Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*. 43: 1-6.
- Mercier C. (1997). Transgènes et modification quantitative et/ou qualitative de la composition de lait à de fins nutritionnels. In : Frend G. (Ed), intérêts nutritionnels et diététique du lait de chèvre. *Nord-France*. p. 169-177.
- Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004). Cours de microbiologie générale. *Doin. France*.p. 430.
- Miller J.D. (2002). Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *Journal of Fermentation Technology*. 54: 872-884.
- Mnif I and Ghribi D. (2015). Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*. 104 :129–147.
- Mohan P.K., Nakhla G., Yanful E.K. (2006). Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*. 40: 533-540.
- Monterio A.S., Countinho J.O.P.A., Junior A.C., Rosa C.A., Siqueira E.P., Santos V.L. (2009) . Characterization of new biosurfactant produced by *Trichospora*

- montevideense* CLOA 72 isolated from dairy industry effluents. *Journal of Basic Microbiology*. 49: 553-563.
- Montero-Rodríguez D., Andrade R.F.S., Rubio-Ribeaux D., Silva T.A.L., Silva G.K.B., Araújo H.W.C., Campos-Takaki G.M. (2018). Suitability of wheat bran as promising substrate for coproduction of prodigiosin and biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. In: Méndez-Vilas A, editor. Exploring microorganisms: recent advances in applied microbiology. *Badajoz: BrownWalker Press*. p. 149–153.
- Moody J.D., Freeman J.P., Cerniglia C.E. (2005). Degradation of benz [a] anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* stain PYR-1. *Biodegradation*. 16: 513-526.
- Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. (2000). A study on the structure– function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 488: 211– 218.
- Morita T., Ishibashi Y., Fukuoka T., Imura T., Sakai H., Abe M., Kitamoto D. (2011). Production of Glycolipid Biosurfactants, cellobiose lipids, by *Cryptococcus humicola* JCM 1461 and their interfacial properties. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 75: 1597-1599.
- Mouafi F.E., Abo E.M.M., Moharam M.E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*. 9: 31– 37.
- Mueller G.M and Schmit J.P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?, *Biodiversity and Conservation*. 16: 1-5.
- Mukherjee S., Das P., Sen R. (2010). Commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*. 24: 509-515.
- Mulligan C.N., Cooper D.G., Neufeld R.J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of Fermentation Technology*. 62: 311 – 314.
- Mulligan C.N and Gibbs B.F. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*. 70: 31–55.
- Mulligan C.N. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion Colloid Interface Sci*. 14: 372–378.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L’essentiel en microbiologie. *Berti. Paris*. p. 210-216.

- Nitschke M and Silva S.S.E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58: 631–638.
- O**liveira D. W. F., Sousa J.R., França I. W.L., Felix A. K. N., Martins J. J. L., Gonçalves L. R. B. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 101: 34–43.
- P**acwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 633–654.
- Padmapriya B., Suganthi S., Anishya R.S. (2013). Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences*. 13: 227-233.
- Palejwala S and Desai J.D. (1989). Production of extracellular emulsifier by a Gram-negative bacterium. *Biotechnology Letters*. 11: 115-118.
- Pallas N.R and Pethica, B.A. (1983). The surface tension of water. *Colloids Surf*. 6: 221-227.
- Pele M.A., Ribeaux D.R., Vieira E.R., Souza A.F., Luna M.A.C., Rodríguez D.M., Andrade R F.S., Alviano D.S., Alviano C.S., Barreto-Bergter E., Santiago A L.C.M.A., Campos-Takaki G.M. (2019). Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*. 38: 40–48.
- Perez-Ameneiro M., Vecino X., Cruz J.M., Moldes A.B. (2015). Waste treatment enhancement by applying a lipopeptide biosurfactant to a lignocellulosic biocomposite. *Carbohydrate Polymers*. 131: 186-196.
- Perfumo A., Rudden M., Marchant R., Banat I.M. (2018). Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. In: Krell T, editor. Cellular ecophysiology of microbe: hydrocarbon and lipid interactions. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. *Springer: Cham*. p. 75–103.
- Persson A., Österberg E., Dostalek M. (1988). Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29: 1–4.
- Plaza G.A., Zjawiony I., Banat I.M. (2006). Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 50: 71-77.

- Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., Van den Hondel C. (2002). Filamentous fungi as cellfactories for heterologous protein production. *Trends in Biotechnology*. 20: 200-206.
- Qazi M.A., Malik Z.A., Qureshi G.D., Hameed A., Ahmed S.(2013).Yeast extract as the most preferable substrate for optimized biosurfactant production by rhlB gene positive *Pseudomonas putida* SOL-10 isolate. *Journal of Bioremediation Biodegradation*. 4: 204.
- Qazi M.A., Kanwal T., Jadoon M., Ahmed S., Fatima N. (2014). Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. *Biotechnology Progress*. 30: 1065-1075.
- Rau U., Nguyen L.A., Roeper H., Koch H., Lang S. (2005). Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 107: 373-380.
- Rocco K.A., Galligan P., Little K.J., Spurgash A. (1985). A rapid bioluminescent ATP method for determining yeast contamination in a carbonated beverage. *Food Technology*. 39: 49-52.
- Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Oliveira R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria .*Biochemical Engineering Journal*. 32 : 135–142.
- Roquebert M.F. (1984). Introduction à la mycologie alimentaire. En 'Les Mycotoxines'. Ed. J.L. Multon & B. Cahagnier. C.P.C.I.A. Paris. p. 3-18.
- Rosa C.F.C., Freire D.M.G., Ferraz E.C. (2015). Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 3: 89–94.
- Rufino R.D., Sarubbo L.A., Campos-Takaki G.M. (2007). Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 729–734
- Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., Campos-Takaki G.M. (2011). Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surface B*. 84:1–5.
- Sachdev D.P and Cameotra S.S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:1005–1016.

- Saharan B.S., Sahu R.K., Sharma D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering Biotechnology*.29: 1–39.
- Saimmai A, Sobhon V, Maneerat S. (2011). Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 165: 315–335.
- Sainz J., Pizarro F., Pérez-Correa J.R., Agosin E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnol Bioeng*. 81: 818-828.
- Santos D.K.F., Rufino R.D., Luna J.M., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 401-432.
- Santos A.P.P., Silva M.D.S., Costa E.V.L., Rufino R.D., Santos V.A., Ramos C.S., Sarubbo L.A., Porto A.F.L. (2018). Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 51: 57-66.
- Sarubbo L.A., Porto A.L.F., Campos-Takaki G.M. (2001). Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 95: 59–67.
- Sarubbo L.A., Luna J.M., Campos-Takaki G.M. (2006). Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology* .52: 4-9.
- Sarubbo L.A., Farias C.B., Campos-Takaki G.M. (2007) .Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*. 54: 68-73.
- Satpute S.K., Bhawsar B.D., Dhakephalkar P.K., Chopade B.A. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian Journal of Marine Sciences*. 37: 243-250.
- Satyanarayana T and Kunze G. (2009). Yeast biotechnology: Diversity and Applications. *Springer Science, New Delhi*. p. 744.
- Schramm L.L., Stasiuk E. N., Marangoni D. G. (2003). Surfactants and their applications. *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section A*. 99: 30–48.
- Schulz D., Passeri A., Schmidt M. (1991). Marine biosurfactants.1. Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North Sea. *Z Naturforsch (C)*. 46 :197-203.

- Scriban R. (1999). Biotechnologie. 5^{ème} édition. *Technique et Documentation*. Lavoisier. Paris. p. 149-159.
- Scriban R. (2003). Biotechnologie. 4^{ème} édition *Technologie et documentation*- Lavoisier. Paris. p. 10-17.
- Sen S., Borah S.N., Bora A., Deka S. (2017). Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3 *Microbial Cell Factories*. 16: 95-109.
- Shafiei Z, Abdul Hamid A, Fooladi T and Yusoff W.M.W. (2014). Surface-active components: Review. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 6: 89–95.
- Sharma D., Singh Saharan B., Chauhan N., Procha S., Lal S. (2015). Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springer plus*. 4: 1-4.
- Shoeb E., Akhlaq F., Badar U., Akhter J., Imtiaz S. (2013). Classification and industrial applications of biosurfactants. *Natural and Applied Sciences*. 39: 210-216.
- Silva R.C.F.S., Almeida D.G., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*. 15: 12523–12542.
- Silva T.A.L., Almeida F.C.G., Freitas-Silva M.C. (2014). Influence of two agroindustrial by-products in the production of biosurfactant by *Mucor circinelloides*. In: Méndez-Vilas A, editor. Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: Current status and trends. *Wageningen: Wageningen Academic Publishers*. 115–118.
- Silva A.C.S.D., Santos P.N.D., Lima e Silva T.A., Silva Andrade R.F., Campos-Takaki G.M. (2018). Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Arquivos do Instituto Biológico*. 85: 1-12.
- Simpson A.G.B and Roger A.J. (2004). The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology*. 14: 693-696.
- Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*. 25: 99-121.
- Singh P., Patil Y., Rale V. (2018). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*. 126: 2-13.
- Sobrinho H.B.S., Rufino R.D., Runa J.M., Salgueiro A.A., Campos-Takaki G.M., Leite L.F.C., Sarubbo L.A. (2008). Utilization of two agroindustrial by-products for the

- production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry*. 43: 912-917.
- Solaiman D.K., Ashby R.D., Nuñez A., Foglia T.A. (2004). Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. *Biotechnology Letters*. 26: 1241-1245.
- Souza K.S.T., Gudiña E.J., Azevedo Z., Freitas V., Schwana R.F., Rodrigues L.R., Dias D.R., Teixeira J.A. (2017). New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 154: 373-382.
- Stahmann K.P. (2002). Vitamins. In: Osiewacz H.D. (eds) Industrial Applications. *The Mycota* (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). 10: 231-246.
- Stajich J.H., Berbee M.L., Blackwell M., Hibbett D.S., James T.Y. (2009). The fungi. *Current Biology*. 19: 840-845.
- Starmer W. T and Lachance M. A. (2011). Yeast ecology In Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. The yeasts: A Taxonomic Study (Vol. 1) *Amsterdam: Elsevier*. p. 65–83.
- Suh S.O., Kurtzman C. P., Lachane M. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the Ascomycete yeasts. *Mycologia*. 98: 1006-1017.
- T**amura T., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725–2729.
- Techaoei S., Lumyong S., Prathumpai W., Santiarwar D., Leelapornpisid P. (2011). Screening characterization and stability of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* scmu106 isolated from soil in northern Thailand. *Asian Journal of Biological Sciences*. 4: 340-351
- Thaniyavarn J., Chianguthai T., Sangvanich P., Roongsawang N., Washio K., Morikawa M., Thaniyavarn S. (2008). Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72: 2061–2068.
- Thanomsub B., Watcharachaipong T., Chotelersak K., Arunrattiyakorn P.N.T. (2004). Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 588-592.

- Thavasi R., Subramanyam Nambaru V.R.M., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., Banat I.M. (2008). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the Marine Environment. *Marine Biotechnology*.11: 551-556.
- Thavasi R., Sharma S., Jayalakshmi S. (2011). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. doi:10.4172/2157-7463.S1-00.1.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. *Edition du renouveau pédagogique. Canada*. p. 945.
- Turchetti B., Goretti M., Branda E., Diolaiuti G., D'Agata C., Smiraglia C., Onofria A., Buzzini P. (2013). Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbiology Ecology*. 86: 327-340.
- Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H., Kaneda M. (2001). Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biological Chemistry*. 382: 1509-1513.
- Vandana P and Singh D. (2018). Review on Biosurfactant Production and its Application. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.7: 4228-4241.
- Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. (2006). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. Physiological aspects. *Biotechnology Advance*. 24: 604–620.
- Varjani S.J. and Upasani V.N. (2016). Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*. 221: 510-516.
- Vijayakumar S and Saravanan V. (2015). Biosurfactants-types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*. 10: 181-192.
- Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P. (2012). Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 42: 125–142.
- Walker G.M. (2009). Yeasts. *University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. Elsevier Inc*. p. 1174-1187.
- Wang Q., Chen S., Zhang J., Sun M., Liu Z., Yu Z. (2008). Co-producing lipopeptides and poly-[gamma]-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresource Technology*. 99: 3318–3323.

- Y**akimov M. M., Golyshin P. N., Lang S. E., Moore R. B., Abraham W. R., Lünsdorf H. (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon- degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48 : 339–348.
- Yarrow D. (1980). ‘‘Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts’’. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4th ed., C. P. Kurtzman, J. W. Fell (Eds.), Elsevier, Amsterdam. p. 77–101.
- Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N., He B. (2008). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*. 44: 302-308.
- Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiology Methods*. 56: 339-347.
- Z**accanti G., Del Bianco S., Martelli F. (2003). Measurements of optical properties of high-density media. *Applied Optics*. 42: 4023–4030.
- Zenati B., Chebbi A., Badis A., Eddouaouda K., Boutoumi H., El Hattab M., Hentati D., Chelbi M., Sayadi S., Chamkha M., Franzetti A. (2018). A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 154: 100-107.
- Zinjarde S.S and Pant A. (2002). Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*. 42: 67-73.

Annexes

Annexe 1

Verreries, réactifs et appareillages utilisés

Verreries	Réactifs	Appareillages
• Ampoules à décanter • Anse de platine • Ballons • Béchers de 50, 100, 250, 500 et 1000 ml • Boîtes de Pétri en plastique et en verre • Cuvettes de spectrophotomètre en quartz • Entonnoirs • Epprouvettes de 10, 250, 500 et 1000ml • Erlenmeyers de 50, 100, 250, 500 et 1000 ml • Eppendorfs • Flacons 250ml et 500 ml • Lames et lamelles • Micropipettes • Pipettes (graduées et pipettes Pasteur) • Pincés (à bois et métallique) • Passoire • Spatule métallique • Tubes à essais	• Acétate d'éthyle • Acide acétique • Acide orthophosphorique • Acide sulfurique concentré • Agar-Agar • BSA • Bleu coton • Bleu de Coomassie • Chloroforme • Eau distillée • Ethanol • Extrait de levure • Gasoil • Glucose • Méthanol • Ninhydrine • α naphthol • Peptone • Phénol • Plaque de silices • Rouge de Congo • Vanilline • FeSO_4 • SDS • HCl • KCl • K_2HPO_4 • MgSO_4 • NaNO_3, NaOH	• Agitateur magnétique chauffant • Autoclave :Sano Adolf Wolf. • Bain -marie : Mermmert. • Balance analytique :Startirius • Bec benzène • Centrifugeuse à eppendorf • Centrifugeuse réfrigérée • Chambre UV • Etuve :Incucell. • Evaporateur rotatif • FTIR (Perkin-Elmer Spectrum RX1, Shelton, Connecticut). • Incubateur agitateur Thermo scientific MAXQ4000 • Microscope photonique : Zeiss • PCR: Prime Thermal Cyler (Techne) • pH mètre : IKA® RCT basic. • Plaque chauffante : Snijders. • Spectrophotomètre : UV-visible • Tensiomètre digital Gibertini, Italy • Vortex Witomixor Vtx

Annexe 2

Composition des milieux de culture utilisés

➤ Milieux d'isolement et d'identification des levures et des moisissures

➤ Czapek concentré

-NaNO ₃	300g
-MgSO ₄	50g
-KCl	50g
-FeSO ₄	1g
-Eau distillée.....	1000ml

➤ CYA (Czapek Yeast Agar)

-K ₂ HPO ₄	1g
-CZapek concentré.....	10 ml
-Extrait de levure	5g
-Glucose.....	30g
-Agar.....	20g
-Eau distillée.....	1000ml

➤ MEA (Malt Extract Agar)

-Extrait de malt.....	20g
-Agar.....	15g
-Eau distillée	1000 ml

➤ Milieu O.G.A (Oxytetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar)

-Extrait de levure	5g
-Glucose.....	20g
-Agar.....	20g
-Oxytétracycline	0,1g
-Eau distillée.....	1000ml

➤ PDA (Potato Dextrose Agar)

-Pomme de terre.....	200g
-Eau distillée	700ml
Chauffage et filtration : le filtrat + chauffage et filtration : le filtrat +	
-Glucose	10g
-Agar.....	15g
-Eau distillée	1000ml

➤ PDB (Potato Dextrose broth)

-Pomme de terre.....	200g
-Eau distillée	700ml
Chauffage et filtration : le filtrat + chauffage et filtration , le filtrat +	
-Glucose	10g
-Eau distillée	1000ml

➤ **Milieu Sabouraud**

- Peptone.....10 g.
- Glucose 20 g.
- Agar-agar.....15 g.
- Eau distillée 1000 ml.

➤ **Milieu YPGA gélosé (Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar)**

- Extrait de levures.....10 g
- Peptone.....20 g
- Glucose.....20 g
- Agar-agar.....15 g.
- Eau distillée 1000 ml.

➤ **Bouillon YPG (Yeast-extract-Peptone-Glucose)**

- Extrait de levures.....10 g
- Peptone.....20 g
- Glucose.....20 g
- Eau distillée 1000 ml.

➤ **Milieu pour l'étude des caractéristiques sexuelles des levures**

➤ **Fowell**

- Agar..... 20 g
- Acétate de sodium trihydraté.....5 g
- Eau distillée.....1000 ml

➤ **Gordkowa**

- Glucose.....1g
- Peptone.....10g
- NaCl.....5g
- Agar.....25 g
- Eau distillée.....1000m

➤ **Malt Agar (MA)**

- Extrait de malt 30g
- Peptone.....5 g
- Glucose.....15 g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1000 ml

➤ **Mac Clary**

- Glucose.....1g
- KCl.....1.8 g
- Extrait de levure.....2.5 g
- Acétate de sodium 8.2g
- Agar.....15 g
- Eau distillée.....1000 ml

➤ **Milieu pour l'étude de la fermentation des sucres**

➤ **Yeast Extract Peptone (YP)**

Peptone.....	7.5g
Extrait de levure.....	4.5 g
2% du substrat carboné testé	
Eau distillée.....	1000 ml

➤ **Milieu minimum pour le criblage des souches productrices des biosurfatants**

Glucose.....	2g
Extrait de levure.....	2g
Gasoil 2% (v/v)	
Eau distillée.....	1000 ml

Remarque : Ces milieux sont ajustés à un pH final de $6,0 \pm 0,2$ à 25°C et stérilisés à 120 °C pendant 20 min.

➤ **Milieu pour l'étude de l'activité antimicrobienne**

➤ **MH (Mueller-Hinton)**

- Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
- Infusion de viande.....	2,0 g
- Amidon soluble	1,5 g
- Agar agar bactériologique.....	17,0 g
-Eau distillée	1000 ml
-pH du milieu à 25°C : 7	

Annexe 3

➤ Utilisation de la galerie Auxacolor pour l'identification des levures

➤ Principe

La galerie Auxacolor est un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres. La croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH.

➤ Composition de la galerie

La galerie comprend :

- Un témoin négatif pour faciliter la lecture des résultats d'assimilation (cupule de couleur bleue).
- 13 tests d'assimilation comportant les sucres suivants :
 - Glucose (GLU) : Témoin positif
 - Maltose (MAL) - Cellobiose (CEL)
 - Saccharose (SAC) - Trehalose (TRE)
 - Galactose (GAL) - Adonitol (ADO)
 - Lactose (LAC) - Melezitose (MEL)
 - Raffinose (RAF) - Xylose (XYL)
 - Inositol (INO) - Arabinose (ARA)
- 3 tests enzymatiques pour la détection de l'activité N-acétyl-galactosaminidase (hexosaminidase : HEX.) et pour détecter l'activité phénoloxidasique de *Cryptococcus neoformans*.



Figure 1 : La galerie Auxacolor.

➤ **Etapes**

- Réaliser une suspension avec l'eau physiologique à partir d'une culture pure et jeune de 24 h cultivée sur milieu Sabouraud supplémenté d'un antibiotique.
- Homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex.
- Prélever et distribuer, à l'aide d'une pipette, 100 µl de l'inoculum dans chacune des cupules de la microplaque.
- Recouvrir la microplaque avec l'adhésif en s'assurant que l'adhésion est parfaitement uniforme.
- Incuber 48h à 30°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

➤ **Lecture des résultats**

La lecture définitive doit s'effectuer à 48h (72h si nécessaire).

➤ **Interprétation des résultats**

➤ **Le codage**

Un profil numérique à 5 chiffres est obtenu en regroupant par 3 les valeurs des 15 tests suivants :
On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet. 1 pour la position 1, 2 pour la position 2 et 4 pour la position 3, tel que :

1er chiffre Glucose -Maltose -Saccharose

2nd chiffre Galactose -Lactose -Raffinose

3ème chiffre Inositol- Cellobiose -Trehalose

4ème chiffre Adonitol -Melezitose -Xylose

5ème chiffre Arabinose- Hexosaminidase- Phenoloxidase

L'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres.

- Après avoir déterminé le profil numérique, celui-ci est recherché dans la base de données (la table suivante)

Code	
10000 -{+} 05	<i>Candida krusei</i>
10000 - 25	<i>Geotrichum capitatum</i>
10000 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10000 +{-} 05	<i>Candida lipolytica</i>
10000 + 05	<i>Candida norvegensis</i>
10000 v 04	<i>Candida inconspicua</i>
10010 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10010 +{-} 05	<i>Candida lipolytica</i>
10040 -{+} 21	<i>Geotrichum candidum</i>
10200 - 00	<i>Kloeckera apiculata</i>
10200 + 05	<i>Candida norvegensis</i>
10200 +{-} 05	<i>Candida lipolytica</i>
10240 + 05	<i>Candida norvegensis</i>
10400 - 04	<i>Candida glabrata</i>
10400 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10402 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10410 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10600 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
10610 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>

11000 - 25	<i>Geotrichum capitatum</i>
11000 +{-} 05	<i>Candida lipolytica</i>
11000 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11001 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11010 +{-} 05	<i>Candida lipolytica</i>
11010 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11040 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11040 -{+} 21	<i>Geotrichum candidum</i>
11041 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11050 v 05	<i>Candida rugosa</i>
11050 -{+} 21	<i>Geotrichum candidum</i>
11400 - 04	<i>Prototheca wickerhamii</i>
11400 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
11410 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
11600 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>
11610 +{-} 01	<i>Candida zeylanoides</i>

12400 - 04	<i>Candida glabrata</i>
------------	-------------------------

13400 - 04	<i>Prototheca wickerhamii</i>
------------	-------------------------------

31002 - 07	<i>Candida albicans</i> 2
31042 - 07	<i>Candida albicans</i> 2

31052 - 07	<i>Candida albicans</i> 2
31402 - 07	<i>Candida albicans</i> 2
31442 - 07	<i>Candida albicans</i> 2
31452 - 07	<i>Candida albicans</i> 2
31472 - 07	<i>Candida albicans</i> 2

33242 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33243 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33262 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33263 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33342 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33343 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33362 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33363 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33642 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33643 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33662 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33663 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33742 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33743 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
33762 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>

55000 - 05	<i>Candida kefyr</i>
55001 - 05	<i>Candida kefyr</i>
55040 - 05	<i>Candida kefyr</i>
55041 - 05	<i>Candida kefyr</i>

57000 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57001 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57010 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57011 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57040 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57041 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57050 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57051 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57200 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57201 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57240 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57241 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57400 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57401 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57440 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57441 - 05	<i>Candida kefyr</i>

57600 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57601 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57640 - 05	<i>Candida kefyr</i>
57641 - 05	<i>Candida kefyr</i>

70160 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70161 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70170 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70171 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70400 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
70462 v 01	<i>Candida sake</i>
70560 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70561 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
70620 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
70660 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70661 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70662 v 01	<i>Candida sake</i>
70670 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
70760 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
70761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>

71002 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71010 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71012 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71021 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71031 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71042 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71052 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71061 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71071 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71124 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71125 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71134 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71135 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71164 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71165 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71174 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71175 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71324 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>

71325 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71334 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71335 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71400 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71402 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71410 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71411 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71412 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71420 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
71421 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71422 v 01	<i>Candida sake</i>
71430 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71431 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71432 v 01	<i>Candida sake</i>
71432 + 07	<i>Candida dubliniensis</i>
71440 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71441 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71442 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71443 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71450 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71451 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71451 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71452 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71453 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71460 -{+} 05	<i>Candida tropicalis</i>
71461 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71462 v 01	<i>Candida sake</i>
71462 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71470 -{+} 05	<i>Candida tropicalis</i>
71471 v 05	<i>Candida parapsilosis</i>
71472 v 01	<i>Candida sake</i>
71472 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71473 + 07	<i>Candida albicans</i> 1
71524 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71525 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71534 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71535 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71553 - 05	<i>Candida ciferrii</i>
71560 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
71561 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
71564 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Code	
71565 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
71571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
71574 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71575 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71620 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71620 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
71630 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71660 -(+) 05	<i>Candida tropicalis</i>
71660 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71661 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71662 v 01	<i>Candida sake</i>
71670 -(+) 05	<i>Candida tropicalis</i>
71670 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71670 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
71671 + 05	<i>Candida guilliermondii</i>
71671 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
71672 v 01	<i>Candida sake</i>
71724 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71725 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71734 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71735 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71764 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71765 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71774 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
71775 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
72762 - 25	<i>Trichosporon inkin</i>
72763 - 25	<i>Trichosporon inkin</i>
73242 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73243 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73262 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73263 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73342 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73343 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73362 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73363 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73641 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73642 -(+) 25	<i>Trichosporon spp</i>
73643 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73651 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>

Code	
73653 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73661 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73662 -(+) 25	<i>Trichosporon spp</i>
73663 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73670 v 05	<i>Candida lusitanae</i>
73671 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73673 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73741 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73742 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73743 - 25	<i>Trichosporon asahii</i>
73751 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73753 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73761 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73762 -(+) 25	<i>Trichosporon spp</i>
73763 -(+) 25	<i>Trichosporon spp</i>
73771 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
73773 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
74000 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
74020 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
74361 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74371 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74400 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
74420 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
74560 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
74561 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
74570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
74571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
74660 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74661 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74760 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
74771 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
75000 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
75020 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
75124 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75125 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75134 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75135 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75164 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75165 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>

Code	
75174 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75175 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75324 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75325 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75334 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75335 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75361 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
75371 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
75400 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
75420 - 04	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
75524 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75525 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75534 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75535 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75551 - 05	<i>Candida ciferrii</i>
75553 - 05	<i>Candida ciferrii</i>
75560 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
75561 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
75564 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75565 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75570 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
75571 v 40	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>
75574 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75575 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75630 v 00	<i>Candida famata</i>
75631 + 05	<i>Candida guilliermondii</i>
75631 v 00	<i>Candida famata</i>
75651 v 00	<i>Candida famata</i>
75670 v 00	<i>Candida famata</i>
75671 + 05	<i>Candida guilliermondii</i>
75671 v 00	<i>Candida famata</i>
75724 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75725 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75734 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75735 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75751 - 05	<i>Candida ciferrii</i>
75753 - 05	<i>Candida ciferrii</i>
75761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
75764 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75765 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75771 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>

Code	
75774 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
75775 - 44	<i>Cryptococcus neoformans</i>
76361 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
76371 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
76761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
76771 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
77361 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
77371 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
77610 v 00	<i>Candida famata</i>
77611 v 00	<i>Candida famata</i>
77630 v 00	<i>Candida famata</i>
77631 v 00	<i>Candida famata</i>
77641 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77643 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77651 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77651 v 00	<i>Candida famata</i>
77653 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77661 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77663 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77670 v 00	<i>Candida famata</i>
77671 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77671 v 00	<i>Candida famata</i>
77673 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77741 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77742 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77743 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77751 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77753 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77761 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77761 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
77763 - 25	<i>Trichosporon mucoides</i>
77771 - 25	<i>Trichosporon mucoides</i>
77771 - 40	<i>Cryptococcus laurentii</i>
77771 v 40	<i>Cryptococcus albidus</i>
77772 -(+) 21	<i>Trichosporon spp</i>
77773 - 25	<i>Trichosporon mucoides</i>

Annexe 04

Annexe 04-A

➤ Dosage des sucres totaux par la méthode au phénol –sulfurique

Pour déterminer la concentration des sucres réducteurs dans nos échantillons, nous avons établi une courbe d'étalonnage. A partir d'une solution mère de glucose à 1 g/L, on réalise une série de dilutions comme le montre le **Tableau 1**.

Tableau 1: Préparation des dilutions de glucose et de la gamme étalon pour le dosage des sucres.

Réactif /Tube	Tube témoin négatif	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Solution mère de glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Phénol à 5%	1	1	1	1	1	1
H ₂ SO ₄ (ml)	5	5	5	5	5	5

➤ Protocole expérimental

1 ml d'échantillon, est ajouté à 1 ml de phénol à 5% (dans l'eau distillée) et 5 ml d'acide sulfurique concentré. Laisser reposer pendant 10 min à température ambiante, puis incubé à 30°C pendant 20 min. L'apparition du complexe jaune orange est suivie en mesurant la densité optique à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV / Visible, par rapport à une gamme d'étalonnage établie avec une solution mère de 1g/L de glucose.

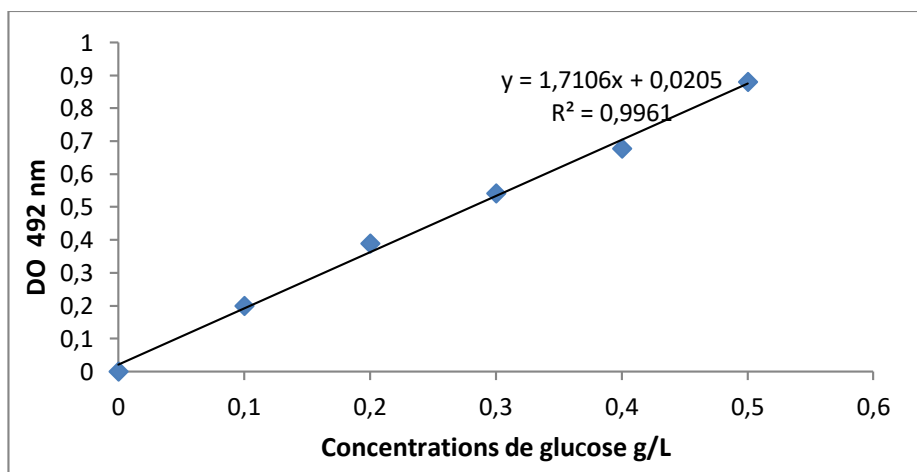


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la solution de glucose.

Annexe 04-B

➤ Dosage des protéines

On prépare une solution mère de BSA de concentration connue à savoir 1 g /L et à partir de cette solution mère on réalise des dilutions comme représenté dans le tableau 2. A partir de ces dilutions, on réalise une gamme de solutions étalons, auxquelles on ajoute le réactif de Bradford (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Préparation des dilutions de BSA et de la gamme étalon pour le dosage des protéines.

Réactif /Tube	Tube témoin négatif	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Solution mère de BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Volume pris des dilutions (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Volume du réactif de Bradford (ml)	3	3	3	3	3	3

➤ Protocole expérimental

Un volume de 0,1 de l'échantillon à doser est mélangé à 3ml du réactif de Bradford. Une fois ces préparations sont effectuées, les tubes sont vortexés pour bien mélanger leur contenu, ils sont mis à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. On mesure l'absorbance à 595 nm contre le blanc de la gamme étalon. La courbe d'étalonnage correspond à la régression linéaire de la densité optique (DO) en fonction de la quantité de protéines de la gamme : $DO_{595\text{ nm}} = f(\text{concentration de protéines})$. La quantité de protéines présente dans notre échantillon peut alors être estimée à partir de cette équation.

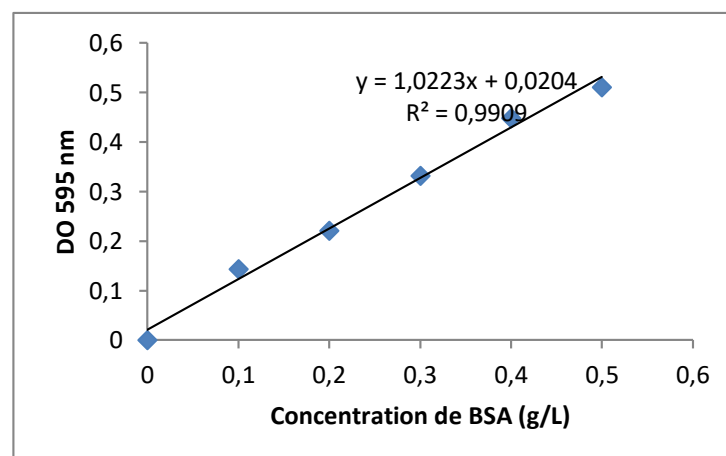


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de la solution de BSA.

➤ Préparation de réactif de Bradford

Le réactif est préparé comme suit : dissoudre 0,1 g de Bleu de Coomassie G 250 dans 50 ml d'éthanol à 95 % et ajouter 100 ml d'acide ortho phosphorique à 85%. Le mélange est ajusté à 1000ml d'eau distillée. Ce réactif se conserve pendant 3 semaines à +4°C et à l'obscurité.

Annexe 04-C

➤ Dosage des lipides totaux

Les lipides ont été quantifiés en utilisant le réactif sulfo-phospho-vanillique. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique en présence de vanilline et d'acide ortho phosphorique, un complexe rose. La solution mère de lipides est préparée extemporanément à partir de 2,5mg d'huile d'olive dissous dans 1ml d'éther / chloroforme, 1/1 ; V/V). (**Tableau 3**). A partir de ces dilutions, on réalise une gamme de solutions étalons, auxquelles on ajoute le réactif sulfo-phospho-vanillique.

Tableau 3: Préparation des dilutions de l'huile et réalisation de la gamme d'étalonnage pour la quantification des lipides.

Réactif /Tube	Tube témoin négatif	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5
Solution mère des lipides (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Mélange Ether /chlorophorme, (1/1 ; V/V) (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Volume pris de chaque tube (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Acide sulfurique (ml)	1	1	1	1	1	1
Volume du réactif sulfo-phospho-vanillique (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

➤ Protocole expérimental

Le dosage se fait sur des aliquotes de 0,1 ml de l'échantillon à doser ou de gamme d'étalonnage auxquelles on ajoute 1 ml d'acide sulfurique concentré (96%). Les tubes sont fermés, agités et placés pendant 10 minutes dans un bain sec à +100°C. Après refroidissement pendant 5 minutes, on prend 0,2 ml de ce mélange auquel on ajoute 2,5ml de réactif sulphosphovanillique et on agite vigoureusement. Après 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est lue dans un spectrophotomètre à 530 nm contre un blanc de gamme.

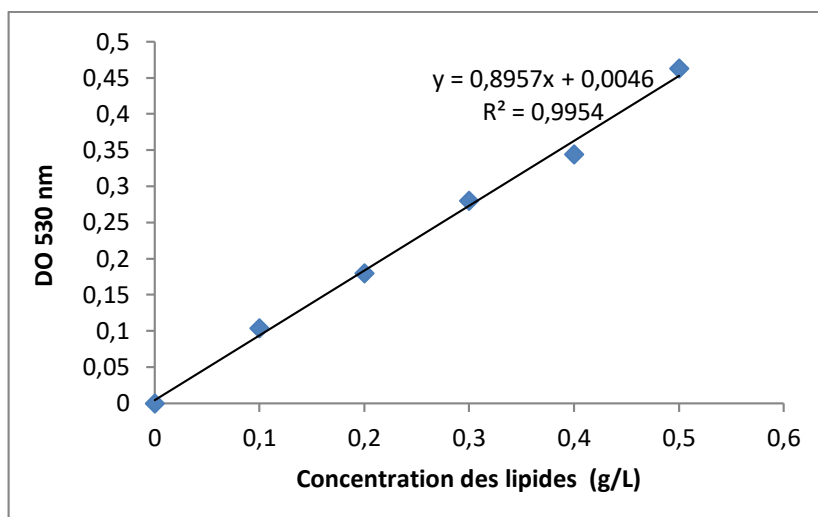


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'huile d'olive.

➤ **Préparation de réactif ortho-phospho-vanillique**

Le réactif est préparé comme suit : dissoudre 0,38g de vanilline dans 55ml d'eau distillée et ajouter 195ml d'acide ortho phosphorique à 85%. Ce réactif se conserve pendant 3 semaines à +4°C et à l'obscurité.

Annexe 5

Les séquences des souches levuriennes YLF, YBR ,YH et Yeg.

Souche YBR : 677 pb

ggcttgatggccagtgaggcctccggattggctattgggagctcgcgagagcaccgactgccgagaagttgtacgaacttggtcattta
gaggaagtaaaagtcgtaacaagggttccgtaggtgaacctgcggaagggaacattagtgaaatagggacgtccaacttaactggagtggg
aactctcacttttaaccctgtgcacttgttgggtagtaactctcgcaagagagcgaactcctattcattataaacacaaaagtctatgaatgt
attaaattttataacaaaataaaactttcaacaacggatctcttggctctcgcacatgataagaacgcagcgaaatgcgataagtaagtgaatt
gcagaattcagtgaaacatcgaatcttgaacgcaccttgcgctccatggattccgtggagcatgcctgtttgagtgatcgaataacttcaacc
ctcctctttctaatgattgaagaggtgttgggttctgagcgtctgctggcctttacggcttagctcgttcgtaaggcattagcatccgcaatcgaa
cttcggattgacttggcctaatagactattcgtcgaggaattctagtcttcggactagagccgggttgccttaaagggaagc ttctaatcagaatg
tctacatttaagattcc

Souche YLF : 544 pb

atcttatcatatccntaacacctgtgcacttgtcggatggcttantgaagaccgcaaggttgaacccccatctactttacataacaatttagtaa
caaatgtagtcttattataacataataaaactttcaacaacggatctcttggctctcgcacatgataagaacgcaaagaaatgcgataagtaagt
tgattgcagaattcagtgaaatcgaatcttgaacgcaccttgcgctccctggattccggggagcatgcctgtttgagggcatgaaaac
cctcaaccggggattggtaaacacctttcttggcttggatttgacgtttgccgatgataagtcggctcgtcttaaaagtaatagctggatctgt
ctcgcgacatggttgacttggcgtaataagtatttcgctaangacatcttcggatggccgcttgcaagactaaagaccgctttctaatccatt
gatcttcggattaatattcttgacatctgggcctcaaatcnngtaggactacccgctganttagtcgc

Souche Yeg : 553 pb

ccgagtcgtaacaagggttccgtaggtgaacctgcggaaggatcattagtgaaatgctcttgagcgttaaaactatatccatctacacctggga
actgttgattgacttcggtcaattactttacaacattgtgtaatgaacgtcatgttattataacaaaaataactttcaacaacggatctcttggctc
tcgcacatgataagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtaattgcagaattcagcgaatcatcgaatcttgaacgcaacttgcgctctc
tggtattccggagagcatgcctgtttgagtatcatgaaatctcaaccattaggggttctaatggcttggattgggcgctgccacttgcctggct
cgccttaaaagagttagcgtattaactgtcgatctggcgtaataagtttcgctgggtgtagacttgagaagtgcgct tctaatcgaattcggaca
attctagaactctggtctcaaatcaggtaggactacccgctgaacttaagcatatcaatagcgaggaagatcgcac

Souche YH : 575 pb

Ctcatcattaaaattaattttattacattgtttaagaagcaaacactaataaccattaatattcaataacttagaaaaatcaaaactttcaacaacgg
atctcttgggtctcgcacatgataagaacgcagcgaattgcgatacgtatcatgacttgagacgtgaatcatcaatcttgaacgcacattgc
gccttgaggtattctcaaggcatgcctgtccgagcgtcggtcccttcaaacccccgggttgggttgcctccgaaatatcacagttgttg
caatacgttactccaactttattcttcgccctcaaatcaggtaggactacccgctgaacttaagcatatcaataagcggaggaaaagaaacca
acagggattgcctcagtaaccccagtggaagcggcaagggctcaaatgtgaaatccttcgggagttgtaattttaggttgggagacccgc
ggctagtggcaccaagtccttggaaacagggcgccttagaggggtgagagcggcgtaggtaccacaacaccgcttgtgtctcctctcaaaa
gagtcgagttgct.