



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique

Université ABOU BAKR BELKAID de Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie
des sciences de la terre et de l'univers
Département de Biologie
Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire,
au Biomédical et à l'Environnement



Mémoire

Présenté par

M^{elle} AMIMER Rahma Nor El Houda

M^{elle} ARAB TANI Nassima Ikram

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

**Recherche de la production des biosurfactants par
des bactéries extrêmophiles du genre *Bacillus* isolées
de la grande sebkha d'Oran.**

Soutenu le **22 /06/ 2025**

Devant le jury composé de :

Présidente	M ^{me} . KLOUCHE KHELIL Nihel Amina	Professeur à l'Université de Tlemcen-Algérie
Encadrante	M ^{me} . NAS Fatima ep. RABEHI	M.C.B. Université de Tlemcen-Algérie
Examineur	M ^r . BELYAGOUBI Larbi	Professeur à l' Université de Tlemcen-Algérie

Année universitaire 2024-2025

Remerciement

Avant tout, nous remercions **le bon dieu** le tout puissant de mener à terme ce présent travail. Ce travail est l'aboutissement d'un long chemin au cours duquel nous avons bénéficié de l'encouragement et du soutien de plusieurs personnes.

Nos vifs remerciements s'adressent aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail

- ❖ **Pr. KLOUCHE KHELIL NIHEL** : Professeur à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen et chef de l'équipe « Bactéries extrêmophiles » du laboratoire LAMAABE qui a accepté de présider ce jury, Votre participation revêt une importance capitale et nous vous en sommes profondément reconnaissantes.
- ❖ **Pr. BELYAGOUBI Larbi** : Professeur à l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen qui a accepté d'examiner ce travail, Nous sommes particulièrement honorée de bénéficier de vos remarques et nous tenons à vous assurer de notre profonde gratitude.

Nous tenons aussi à remercier notre encadrante **Mme NAS Fatima**, Maitre de Conférences B à l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen, pour son accompagnement tout au long de ce travail. Sa disponibilité, ses conseils éclairés, ainsi que son soutien constant ont été essentiels à la réalisation de ce mémoire. Son encadrement rigoureux et bienveillant nous'a permis d'avancer dans les meilleures conditions.

Nous exprimons notre profonde gratitude à l'ensemble de nos enseignants du département de Biologie, au sein de la faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers. Leur enseignement et leurs précieux conseils ont été d'une aide inestimable tout au long de notre parcours universitaire.

Nos remerciements s'adresse également à tous les membres du Laboratoire de **Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE)**.

Dédicace

Du plus profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers.

A ALLAH, le Très Haut, le Très Grand, le Clément, L'Omniscient, l'Omnipotent. Le Tout Puissant, le Très Miséricordieux, qui m'a accordé la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire « Ya Kayoum ».

Je dédie ce travail avant tout à celle qui mérite tout l'honneur et le plus profond respect, celle qui m'a offert l'amour, la tendresse, la compréhension, le courage et la volonté, celle qui m'a permis de surmonter tous les obstacles pour donner le meilleur de moi-même :

à toi, ma très chère mère, KHALIDA.

A mon cher père ABDELKADER, qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études.

A mes chères sœurs MARWA, BOUCHRA et AMANI, ainsi qu'à mon cher frère MOHAMED, je vous souhaite une longue vie pleine de succès et de bonheur. Que Dieu vous protège et éclaire votre chemin.

A mon cher binôme : IKRAM pour les bons moments qu'on avait partagés ensemble.

A toute ma promotion de Microbiologie LMD et à tous mes professeurs que je respecte profondément, merci de m'avoir transmis, avec passion et dévouement, le savoir qui me guide aujourd'hui.

RAHMA

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

*À mes chers parents, **Habib** et **Tsouria** qui ont toujours été à mes côtés et m'ont soutenu avec amour tout au long de ces longues années d'études.*

*À mes **grands-parents**, pour leur soutien constant, sans lequel je n'aurais pu atteindre ce niveau.*

*À mes frères, **Aïssa**, **Adel** et **Ali**, pour leurs encouragements.*

*À Ma très chère amie et sœur, **Nour**, symbole de tendresse et de fidélité.*

*À mes amies **Abir**, **Assil**, **safaa**, **Hiba** pour leur soutien et leur aide.*

*À notre encadrante **Mme NAS Fatima** pour son aide et son soutien durant tout au long de cette année.*

Que dieu vous protège toutes et tous.

IKRAM

Table des matières

ملخص

Résumé

Abstract

Liste des Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
général.....	
Synthèse bibliographique	3
I. Les microorganismes extrêmophiles.....	3
I. 1. Définition	3
.....	3
I. 2. Classification des microorganismes extrêmophiles.....	4
.....	5
I. 2. 1. Les microorganismes halophiles et halotolérants.....	5
I. 2. 2. Les microorganismes extrêmophiles et le pH.....	5
I. 2. 3. Les microorganismes piézophiles.....	6
I. 2. 4. Les microorganismes extrêmophiles et la température.....	7
II. Les écosystèmes naturels des microorganismes halophiles et halotolérantes.....	8
III. Les mécanismes d'adaptation.....	8
III. 1. L'adaptation par accumulation de KCl (Salt-in strategy ou High salt-in).....	8
.....	10
III. 2. L'adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) : « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in ».....	10
.....	11
IV. Les bactéries du genre <i>Bacillus</i>.....	13
.....	13
IV. 1. Taxonomie et caractéristique bactériologique du genre <i>Bacillus</i>	13
IV. 2. Répartition écologique des espèces du genre <i>Bacillus</i>	13

IV. 3. Potentiel biotechnologiques des espèces du genre <i>Bacillus</i>	13
V. Les biosurfactants	13
.....	14
V. 1. Généralités sur les biosurfactants	14
V. 2. Applications biotechnologiques des biosurfactants	14
.....	15
Matériel et méthodes	15
I. Origine, revivification et vérification de la pureté des souches.....	16
II. Screening de la production des biosurfactants.....	16
II. 1. Préparation des surnageants et des culots	16
.....	
II. 2. Méthodes de screening des biosurfactant.....	17
II. 2. 1. Recherche du pouvoir hémolytique des isolats.....	17
II. 2. 2. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte).....	17
II. 2. 3. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile).....	19
II. 2. 4. Test en microplaque (Optical distortion grid assay).....	20
II. 2. 5. Indice d'émulsion (E ₂₄)	21
.....	22
II. 2. 6. BATH assay.....	23
III. Nature biochimique des biosurfactants.....	27
III. 1. Recherche des glycolipides	29
.....	40
III. 2. Recherche des lipopeptides	
.....	
III. 3. Recherche des phospholipides.....	
Résultats et Discussions	
I. Résultats	
I. 1. Observation microscopique des isolats	

I. 2. Screening de l'activité biosurfactant.....			
I.	2.	1.	Test
d'hémolyse.....			
I. 2. 2. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte).....			
I. 2. 3. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile).....			
I. 2. 4. Test de microplaque (Optical distortion grid assay).....			
I. 2. 5. Indice d'émulsion (E ₂₄).....			
I. 2. 6. BATH assay.....			
I. 3. Nature biochimique des biosurfactants produits.....			
II. Discussion			
Conclusion et perspectives			
Références bibliographiques			
Annexe			

ملخص

المواد السطحية الحيوية (**Biosurfactants**) هي جزيئات ذات طبيعة مزدوجة المحبة للماء والدهنية، تُنتج من قبل الكائنات الدقيقة، وتُعرف بخواصها الخافضة للتوتر السطحي، وقابليتها للتحلل البيولوجي، وانخفاض سُمِّيَّتها. تحظى هذه المركبات باهتمام متزايد لتطبيقاتها المتنوعة في المجالات الصناعية والبيئية والصيدلانية والغذائية. ويُعدّ جنس *Bacillus* من أبرز الأجناس البكتيرية المعروفة بقدرتها على إنتاج أنواع متعددة من المواد السطحية الحيوية، بما في ذلك الليبوببتيدات، الليكوليبيدات، والفوسفوليبيدات.

في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى دراسة قدرة ستة عزلات بكتيرية محبة للملوحة وتنتمي إلى جنس *Bacillus*، تم عزلها من النظام البيئي عالي الملوحة في السبخة الكبرى لوهران، على إنتاج المواد السطحية الحيوية. وقد تم استنبات العزلات المدروسة في وسط مغذٍ مُدعم بـ 10% من كلوريد الصوديوم (NaCl).

تم تطبيق عدة اختبارات لتقييم إنتاج المواد السطحية الحيوية، شملت: اختبار التحلل الدموي على الوسط المغذى بالدم، واختبار انهيار القطرة (**Drop Collapse**)، واختبار انتشار الزيت (**Oil Spreading**)، واختبار الانحراف البصري في الأطباق الدقيقة، بالإضافة إلى مؤشر الاستحلاب (E₂₄). وفي نفس الوقت، تم إجراء اختبار ارتباط البكتيريا بالهيدروكربونات (**BATH**) باستخدام الخلايا، لتقدير الخاصية الكارهة للماء للخلايا. وأخيراً، أُجريت تحاليل لونية كيميائية لتحديد الطبيعة الكيميائية الحيوية للمواد السطحية الحيوية المنتجة.

أظهرت النتائج أن جميع العزلات أبدت نشاطاً حاداً للدم، مما يدل على حدوث تحلل تام لخلايا الدم الحمراء، وهو ما يتوافق مع إنتاج المواد السطحية الحيوية. كما كشفت اختبارات انهيار القطرة، وانتشار الزيت، والانحراف البصري عن نشاط خافض للتوتر السطحي ملحوظ لدى جميع العزلات.

تجاوزت مؤشرات الاستحلاب (E_{24}) نسبة 50% لدى غالبية العزلات، مع نتائج مرتفعة بشكل خاص للعزلات LMB3077، LMB3088 و LMB3073، حتى عند تركيز ملحي مرتفع يبلغ 10% من NaCl. وأظهر اختبار BATH أن الخلايا تمتلك خاصية كارهة للماء تفوق 50%، ما يدل على ميل كبير للارتباط بالمواد الكارهة للماء.

أما التحليل الكيميائي فقد بين أن العزلات المختبرة تُنتج الغليكوليبيدات، والليبوببتيدات، والفوسفوليبيدات، وذلك باختلاف السلالة. وتشير هذه النتائج إلى أن العزلات المدروسة، المستخرجة من بيئة غير ملوثة وذات ملوحة عالية، قادرة على إنتاج مواد سطحية حيوية مستقرة وفعالة في ظروف ملوحة قاسية، مما يمنحها إمكانيات واعدة للتطبيق في التكنولوجيا الحيوية البيئية، لا سيما في مجالات المعالجة الحيوية واستخلاص النفط في البيئات المالحة.

الكلمات المفتاحية: المواد السطحية الحيوية، البكتيريا المحبة للظروف القاسية، جنس *Bacillus*، سبحة وهران، الإمكانيات البيوتكنولوجية.

Abstract

Biosurfactants are amphiphilic molecules of microbial origin, known for their surface-active properties, biodegradability, and low toxicity. These compounds are of growing interest for various industrial, environmental, pharmaceutical, and food-related applications. The *Bacillus* genus, in particular, is renowned for its ability to produce various types of biosurfactants, including lipopeptides, glycolipids, and phospholipids.

In this context, the present study aims to explore the biosurfactant production capacity of six halotolerant bacterial strains affiliated to the *Bacillus* genus, isolated from the hypersaline ecosystem of the Great Sebkha of Oran.

The strains were cultured in nutrient broth supplemented with 10% of NaCl. Several screening tests were applied to the culture supernatants to assess biosurfactant production: hemolysis test on blood agar, drop collapse test, oil spreading test, microplate optical distortion test, and emulsification index (E_{24}). In parallel, the Bacterial Adhesion To Hydrocarbons (BATH) test was carried out using the pellet, to estimate cell surface hydrophobicity. Finally, colorimetric analyses were conducted to characterize the biochemical nature of the biosurfactants produced.

The results showed that all isolates exhibited positive hemolytic activity, indicating complete red blood cell lysis, consistent with biosurfactant production. The drop collapse, oil spreading, and microplate tests revealed significant surface activity in all isolates. The E_{24} emulsification indices exceeded 50% for the majority of the strains, with particularly high results for isolates LMB3077, LMB3088, and LMB3073, even at a high salinity of 10% NaCl. The BATH test showed cell hydrophobicity levels above 50%, indicating a strong affinity of the cells for hydrophobic phases. Biochemical analysis revealed the production of glycolipids, lipopeptides, and phospholipids, depending on the strain.

These findings suggest that the studied isolates, originating from an hypersaline environment, are capable of producing stable and active biosurfactants under extreme salinity conditions. This gives these compounds strong potential for environmental biotechnology applications, particularly for bioremediation or oil recovery in saline environments.

Keywords: biosurfactants, extremophilic bacteria, *Bacillus* genus, Sebkha of Oran, biotechnological potential.

Résumé

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles d'origine microbienne, reconnues pour leurs propriétés tensioactives, leur biodégradabilité et leur faible toxicité. Ces composés présentent un intérêt croissant pour diverses applications industrielles, environnementales, pharmaceutiques et alimentaires. Le genre *Bacillus*, en particulier, est réputé pour sa capacité à produire divers types de biosurfactants, notamment les lipopeptides, glycolipides et phospholipides.

Dans ce contexte, ce travail vise à explorer la capacité de production de biosurfactants par six souches bactériennes halotolérantes affiliées au genre *Bacillus*, isolées à partir de l'écosystème hypersalin de la grande Sebkhah d'Oran.

Les souches étudiées ont été cultivées dans un bouillon nutritif supplémenté à 10 % de NaCl. Plusieurs tests de criblage ont été appliqués sur les surnageants issus de la culture, afin d'évaluer la production de biosurfactants : test d'hémolyse sur gélose au sang, test d'effondrement de goutte (drop collapse), test de diffusion d'huile (oil spreading), test de distorsion optique en microplaque et indice d'émulsion (E_{24}). En parallèle, le test d'adhérence bactérienne aux hydrocarbures (BATH) a été réalisé en utilisant le culot, pour estimer l'hydrophobicité cellulaire. Enfin, des analyses colorimétriques ont permis de caractériser la nature biochimique des biosurfactants produits.

Les résultats ont montré que l'ensemble des isolats présentent une activité hémolytique positive, indiquant une lyse complète des globules rouges, compatible avec une production de biosurfactants. Les tests drop collapse, oil spreading et microplaque ont révélé une activité tensioactive notable pour tous les isolats. Les indices d'émulsion E_{24} ont dépassé les 50 % pour la majorité des souches, avec des résultats particulièrement élevés pour les isolats LMB3077, LMB3088 et LMB3073, même à une salinité élevée de 10 % de NaCl. Le test BATH a montré une hydrophobicité cellulaire supérieure à 50 %, traduisant une forte affinité des cellules pour les phases hydrophobes. L'analyse biochimique a mis en évidence la production de glycolipides, lipopeptides et phospholipides, selon les souches testées.

Ces résultats suggèrent que les isolats étudiés, issus d'un environnement non pollué et hypersalin, sont capables de produire des biosurfactants stables et actifs dans des conditions extrêmes de salinité. Cela confère à ces composés un fort potentiel pour des applications en biotechnologie environnementale, notamment pour la bioremédiation ou la récupération pétrolière en milieux salins.

Mots clés : biosurfactants, bactéries extrémophiles, genre *Bacillus*, Sebkhah d'Oran, potentiel biotechnologique.

Liste des abréviations

ADN	:	Acide désoxyribonucléique
BATH	:	Bacterial Adhesion to Hydrocarbons assay
DO	:	Densité optique
E₂₄	:	Indice d'émulsion
he	:	Hauteur de l'émulsion.
ht	:	Hauteur totale du mélange
M	:	Molaire
mL	:	Millilitre
μS	:	Micro-siémens
rpm	:	Rotation par minute
SDS	:	Sodium DodécylSulfate

Liste des figures

Figure N° 1	: Schéma du transport membranaire des ions dans les cellules d'archea du genre <i>Halobacterium</i>	07
Figure N° 2	: Photos des résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram des isolats après 24 heures d'incubation à 37°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) (Objectif 100 à immersion).	18
Figure N° 3	: Résultat de la recherche du pouvoir hémolytique des isolats sur gélose au sang après 48 heures d'incubation à 37°C.	19
Figure N° 4	: Résultats du Drop collapse test des isolats avec contrôle négatif (eau distillés) et contrôle positif (SDS 10%).	19
Figure N° 5	: Résultats du Oil spreading test.	20
Figure N° 6	: Résultats obtenus par le test de microplaque.	20
Figure N° 7	: Résultats du test d'émulsion (E_{24}) avec 1 de ces 3 substrats.	21
Figure N° 8	: Indice d'émulsion (E_{24}) des isolats.	21
Figure N° 9	: Pourcentages d'adhérence obtenus par les isolats.	22
Figure N° 10	: Résultats de la révélation chimique de la nature du biosurfactant.	23

Liste des tableaux

- Tableau N° 1** : Répartition de quelques espèces halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* **09**
- Tableau N° 2** : Nature biochimique du biosurfactant produit avec les différents isolats. **23**

Introduction générale

Les biotechnologies microbiennes représentent aujourd'hui une voie prometteuse pour le développement de produits durables et respectueux de l'environnement. Parmi les métabolites secondaires d'origine microbienne, les biosurfactants. Ces agents tensio-actifs, capables de réduire la tension superficielle entre deux phases, ont récemment suscités un intérêt croissant en raison de leurs propriétés uniques par rapport à leurs homologues chimiques. Ils sont biodégradables, moins toxiques, efficace à faible concentration, actifs à des conditions extrêmes de température, pH ou de salinité, et peuvent être produits à partir de substrats renouvelables. Les biosurfactants possèdent également des propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques (**Sohail et Jamil, 2023 ; Rizvi et al., 2024**).

Toutes ces propriétés rendent les biosurfactants particulièrement attractifs pour des applications dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière, ils sont utilisés pour la récupération assistée du pétrole (MEOR) et la bioremédiation de sols contaminés par les hydrocarbures, grâce à leur capacité à réduire la tension interfaciale. Dans l'industrie des détergents, ils agissent comme agents nettoyants biodégradables avec une faible toxicité, constituant ainsi une alternative aux tensioactifs synthétiques. En agroalimentaire, ils jouent le rôle émulsifiant, d'agents antimicrobiens et antioxydants, améliorant la qualité et la durée de conservation des produits. En cosmétique, ils confèrent des propriétés moussantes, émoullientes et hydratantes, tout en étant sûrs pour la peau. En pharmacie et médecine, certains ont des effets antimicrobiens, antiviraux, antitumoraux et cicatrisants. En agriculture, ils sont utilisés comme agents antifongiques pour la protection des cultures. Enfin, leur production durable et leur biodégradabilité en font des agents de choix pour une chimie verte respectueuse de l'environnement (**Chandra et al., 2018 ; Christopher et al., 2019 ; Singh et al., 2019; Sarubbo et al., 2022 ; Zargar et al., 2022**).

Les écosystèmes salins et hypersalins représentent une niche écologique pouvant héberger une grande diversité de microorganismes halophiles et halotolérants particuliers possédant des capacités d'adaptation étonnantes et présentant une source potentielle de métabolites originaux et intéressants (**Edbeib et al., 2016**). Les bactéries du genre *Bacillus* sont parmi les microorganismes isolés de tels milieux extrêmes. Ces bactéries offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité de former des endospores résistantes et qui leur permettent de s'adapter à plusieurs conditions extrêmes y compris la salinité (**Horikoshi, 2008**). Egalement, plusieurs espèces de ce genre sont rapportées pour leurs potentialités d'applications biotechnologiques très étendues (**Mondol et al., 2013**). Elles produisent des enzymes actives à des conditions extrêmes (**Nabti et al., 2013**), des composés antimicrobiens et anticancéreux, et des biosurfactants (**Kumar et al., 2020**).

Introduction générale

Parmi les métabolites produits par ces bactéries, les lipopeptides (surfactine, iturine, fengycine) et les glycolipides, ils se distinguent par leurs propriétés tensioactives, antimicrobiennes et antifongiques, utiles en biorestauration, agroalimentaire et pharmacologie (Torres *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2017 ; Zhao *et al.*, 2018).

L'objectif principal de ce mémoire est d'étudier la production de biosurfactants par des isolats bactériens affiliés au genre *Bacillus*, issus de la grande Sebkhah d'Oran. Ces isolats, préalablement identifiés par Dr. NAS Fatima, sont conservés au sein de l'équipe 3 « Bactéries extrêmophiles » sous la responsabilité de Pr. KLOUCHE KHELIL Nihel, au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (L.A.M.A.A.B.E.) de l'Université de Tlemcen.

Ces isolats ont démontré un potentiel prometteur pour la production de métabolites secondaires d'intérêt, notamment des composés antimicrobiens et des extrêmoenzymes, ce qui justifie leur sélection pour cette étude.

La démarche expérimentale s'est articulée autour des étapes suivantes :

- Revivification et la vérification de la pureté des souches,
- Screening de la production des biosurfactants à l'aide des tests spécifiques, qualitatifs (hémolyse, drop collapse, oil spreading, microplaque) et quantitatifs (indice d'émulsion E_{24} et BATH et) à une concentration saline importante (10% de NaCl (p/v)).
- Caractérisation biochimique des biosurfactants produits, par des tests colorimétriques pour la détection des glycolipides, lipopeptides et phospholipides.

Synthèse Bibliographique

I. Les microorganismes extrêmophiles

I. 1. Définition

Le terme « extrêmophile » désigne les microorganismes qui sont capables de survivre et de prospérer dans des niches écologiques caractérisées par des conditions extrêmes où les organismes classiques ne peuvent pas survivre. Ces conditions incluent des températures extrêmement élevées ou basses, des pH acides ou basiques, des radiations, des pressions extrêmes (élevées ou basses), des concentrations élevées de sel, de déchets toxiques, de solvants organiques ou de métaux lourds (**Salwan et Sharma, 2020 ; Thakur et al., 2022**).

Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1974 par le scientifique MacElroy dans un article intitulé 'Some comments on the evolution of extremophiles' (**Macelroy, 1974**)

En fonction de leurs conditions de croissance, les extrêmophiles sont classés en deux catégories : les microorganismes extrêmophiles strictes et les microorganismes extrême-tolérants. La première catégorie nécessitent des conditions environnementales extrêmes pour croître, tandis que les extrême-tolérants désignent les microorganismes qui, bien qu'ayant une croissance optimale dans des conditions standards, peuvent néanmoins survivre lorsqu'ils sont exposés à des environnements extrêmes, ils sont également appelés extrêmotrophes. Par ailleurs, certains microorganismes possèdent la capacité de tolérer simultanément plusieurs conditions extrêmes, ils sont qualifiés poly-extrêmophiles (**Salwan et Sharma, 2020**).

I. 2. Classification des microorganismes extrêmophiles

Selon les conditions de stress spécifiques présentes dans les environnements extrêmes, les microorganismes extrêmophiles sont classés en plusieurs groupes distincts, parmi lesquels : les acidophiles ou alcaliphiles, les thermophiles ou psychrophiles, les barophiles (piézophiles), les halophiles ou les halotolérants, les métallophiles et les radiophiles (**Raddadi et al., 2015**).

I. 2. 1. Les microorganismes halophiles et halotolérants

Les microorganismes halophiles et halotolérants constituent un groupe de microorganismes extrêmophiles qui colonisent les habitats caractérisés par des concentrations extrêmes de sels (**Dutta et al., 2022**).

Ces microorganismes sont divisés en plusieurs communautés selon la concentration en sels qui amène à une croissance optimale. Plusieurs classifications ont été données (**Larsen, 1962 ; Echigo et al., 2005 ; Echigo et al., 2007 ; Bowers et al., 2009**), néanmoins, la

classification décrite par Kushner (1978) reste la plus adoptée. Il a distingué plusieurs catégories : les halophiles extrêmes, dont la croissance optimale se situe entre 2,5 et 5,2 M de sel ; les halophiles modérément extrêmes, qui se développent préférentiellement entre 1,5 et 4,0 M de sel ; les halophiles modérés, dont la croissance optimale est observée entre 0,5 et 2,5 M de sel ; et enfin, les halotolérants, qui ne nécessitent pas impérativement du sel pour leur croissance, mais sont capables de se développer à des concentrations salines élevées.

Selon Tiquia *et al.* (2006), microorganismes de la communauté des halotolérantes sont classés en trois groupes en fonction de leur tolérance au sel (NaCl). Les microorganismes légèrement halotolérantes peuvent tolérer des concentrations allant de 0 jusqu'à 6 à 8% de NaCl (p/v). Les halotolérants modérés supportent des concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'à 18 à 20% de NaCl (p/v). Enfin, les halotolérants extrêmes sont capables de tolèrent toutes concentrations de NaCl variant de 0% de NaCl (p/v) jusqu'à le point de saturation.

Définir précisément l'halophilie et l'halotolérance reste complexe, car les microorganismes habitants les environnements salins et hypersalins sont influencés par d'autres facteurs qui peuvent significativement affecter leur croissance et moduler leur réponse au NaCl. Un exemple de rapport entre le sel et d'autres facteurs a été démontrée chez *Halomonas halophila* qui présente une croissance optimale à une concentration de 5 % de NaCl (p/v) à température de 22°C, alors qu'elle est de 7.5 % de NaCl (p/v) lorsque la température varie de 32 à 42°C (Quesada *et al.*, 1987).

I. 2. 2. Les microorganismes extrêmophiles et le pH

Les microorganismes qui nécessitent des conditions de pH extrêmement bas ou élevés pour avoir un métabolisme actif, sont respectivement désignés sous les termes d'acidophiles et d'alcaliphiles.

Les microorganismes acidophiles prospèrent dans les environnements à pH inférieur à 3. Ces environnements sont souvent caractérisés par une forte concentration en métaux lourds (fer, arsenic, cuivre, zinc, chrome...), ils peuvent être des environnements naturellement acides, tels que les champs solfatares, les bassins sulfuriques et les geysers, ou des milieux d'origine anthropique, notamment ceux issus des activités minières du charbon et des minerais métalliques (Bargiela *et al.*, 2023).

Les microorganismes alcaliphiles se développent dans des environnements alcalins avec un pH égale ou supérieur à 9, présentant généralement une croissance optimale à un pH d'environ 10. Ils se trouvent dans les lacs de soude comme exemple le Lake Magadi au Kenya, et les sols riches en carbonates de sodium (Na₂CO₃) (Mucsi *et al.*, 2024).

I. 2. 3. Les microorganismes piézophiles

Les microorganismes piézophiles sont des microorganismes adaptés à des pressions hydrostatiques supérieures à 10 MPa. Ils se trouvent principalement dans la biosphère profonde, incluant les grands fonds marins dont la profondeur est supérieure ou égale 1000 mètres, et les subsurfaces terrestres soumis à des pressions élevées. Ceux qui présentent une croissance optimale au-dessus de 50 MPa sont baptisés hyper-piézophiles (**Scheffer et Gieg, 2023**).

Sur le plan adaptatif, ces micro-organismes présentent des adaptations membranaires par augmentation des acides gras insaturés et à chaînes ramifiées afin de maintenir la fluidité membranaire sous pression, des régulations génétiques, des adaptations protéiques et enzymatiques et l'utilisation de solutés compatibles tels que le glutamate et la bêtaïne, favorisant la stabilité intracellulaire (**Scheffer et Gieg, 2023**).

I. 2. 4. Les microorganismes extrêmophiles et la température

Les microorganismes thermophiles sont adaptés aux températures élevées et se répartissent généralement en trois catégories, selon la température optimale de leur croissance (**Gupta et al., 2014**) :

- **Les thermophiles modérés** : température optimale de croissance entre 50 et 60 °C.
- **Les thermophiles extrêmes** : optimums de croissance entre 60 et 80 °C.
- **Les hyperthermophiles** : se développent idéalement entre 80 et 110 °C.

Quant aux microorganismes psychrophiles, ils se caractérisent par une croissance optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C et ne se développent pas au-dessus de 20 °C. Ils colonisent les eaux glacières et les régions polaires où la lumière disparaît tout près de trois mois par année, où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas (**Boetius et al., 2015**).

II. Les écosystèmes naturels des microorganismes halophiles et halotolérantes

Les microorganismes halophiles et halotolérants colonisent une grande variété d'environnements naturels riches en sels. Ces écosystèmes sont caractérisés par leur concentration totale en sels solubles qui constituent des combinaisons ioniques neutres de

différents cations et d'anions, ils sont représentés par les systèmes aquatiques et terrestres (**Akpolat et al., 2015 ; Naghoni et al., 2017**).

Parmi les milieux aquatiques naturels, on retrouve les lacs salins, marais salants, mers fermées comme la Mer Morte, le Grand Lac Salé aux États-Unis, ou encore les lacs hypersalins d'Afrique (lacs Magadi et Natron), d'Asie (Chine), et de l'Antarctique.

Les eaux sont considérées comme salées lorsque leur concentration en sels solubles dépasse 0.3% (p/v) et hypersalées lorsqu'elles présentent des concentrations salines supérieures à celle de l'eau de mer qui est d'environ de 3.5 % (p/v) (**DasSarma et DasSarma, 2012**). Dans la plupart de ces écosystèmes, le principal sel présent, en quantité quasi inépuisable est le chlorure de sodium (NaCl).

Ces habitats présentent souvent d'autres conditions extrêmes comme une alcalinité élevée, une forte exposition aux rayonnements solaires, une température variable, et une faible teneur en oxygène (**Ventosa et al., 2015**)

Selon leur origine, les eaux salées sont classées en deux types : thalassohalines et athalassohalines (**Oren, 2006**).

Les eaux thalassohalines proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, avec une composition ionique proche de celle-ci, dominée par le sodium (Na⁺) et le chlorure (Cl⁻), et un pH légèrement alcalin.

À l'inverse, les eaux athalassohalines résultent de la dissolution d'évaporites anciennes, et présentent une composition différente, riche en magnésium (Mg²⁺) et calcium (Ca²⁺).

Les milieux terrestres incluent les sols salins naturels, notamment ceux riches en chlorures ou en sulfates, ainsi que les zones arides où la salinité peut être concentrée par évaporation. Selon la première classification établie par **Richards (1954)**, un sol est qualifié de salin lorsque la conductivité électrique (CE) de son extrait de pâte saturée dépasse 4 000 µS/cm. Toutefois la classification du *World Reference Base for Soil Resources* (**WRB, 2007**) considère qu'un sol est salin à partir d'une conductivité électrique de 15 000 µS/cm, tandis que la classification de la *Soil Survey Staff* (**2010**) fixe ce seuil à 30 000 µS/cm.

III. Les mécanismes d'adaptation

Les milieux salins et hypersalins présentent une forte salinité et une faible activité d'eau, générant une pression osmotique importante qui peut provoquer la plasmolyse des cellules. Pour y faire face, les microorganismes halophiles maintiennent leur cytoplasme au moins en iso-osmose avec le milieu environnant et dans certains cas, même hyperosmotique lorsqu'une pression turgescence doit être maintenue. Étant donné que le transport actif d'eau est

énergétiquement coûteux, ces organismes utilisent des mécanismes d'osmorégulation reposant sur l'accumulation de solutés. Deux stratégies principales sont adoptées : l'accumulation de sels inorganiques comme le KCl (Salt-in strategy) et l'accumulation de solutés organiques compatibles (Compatible-solute strategy). Ces stratégies permettent de générer une pression osmotique interne tout en limitant la concentration en Na⁺ intracellulaire (Oren, 2006 ; Oren, 2008 ; Hänel et Müller, 2013).

III. 1. L'adaptation par accumulation de KCl (Salt-in strategy ou High salt-in)

Pour survivre en milieu hypersalin, certains microorganismes, principalement des *Archaea* halophiles extrêmes, adoptent une stratégie d'accumulation intracellulaire de KCl afin de prévenir la perte d'eau. Cette accumulation permet de maintenir une pression de turgescence adéquate en équilibrant la pression osmotique de part et d'autre de la membrane plasmique (Hänel et Müller, 2013).

La régulation ionique est assurée par l'action conjointe de divers systèmes de transport (Figure N° 1) : pompes ioniques, transporteurs couplés et autres protéines spécialisées (Melkikh et Seleznev, 2009).

La force motrice nécessaire à ces transports provient de plusieurs sources :

- la chaîne respiratoire qui expulse des protons lors du transfert d'électrons,
- les bactériorhodopsines et halorhodopsines, des protéines photoréactives produisant un gradient de protons sous l'effet de la lumière, et
- les ATP synthases, capables de synthétiser de l'ATP en utilisant un gradient de protons H⁺ inverse.

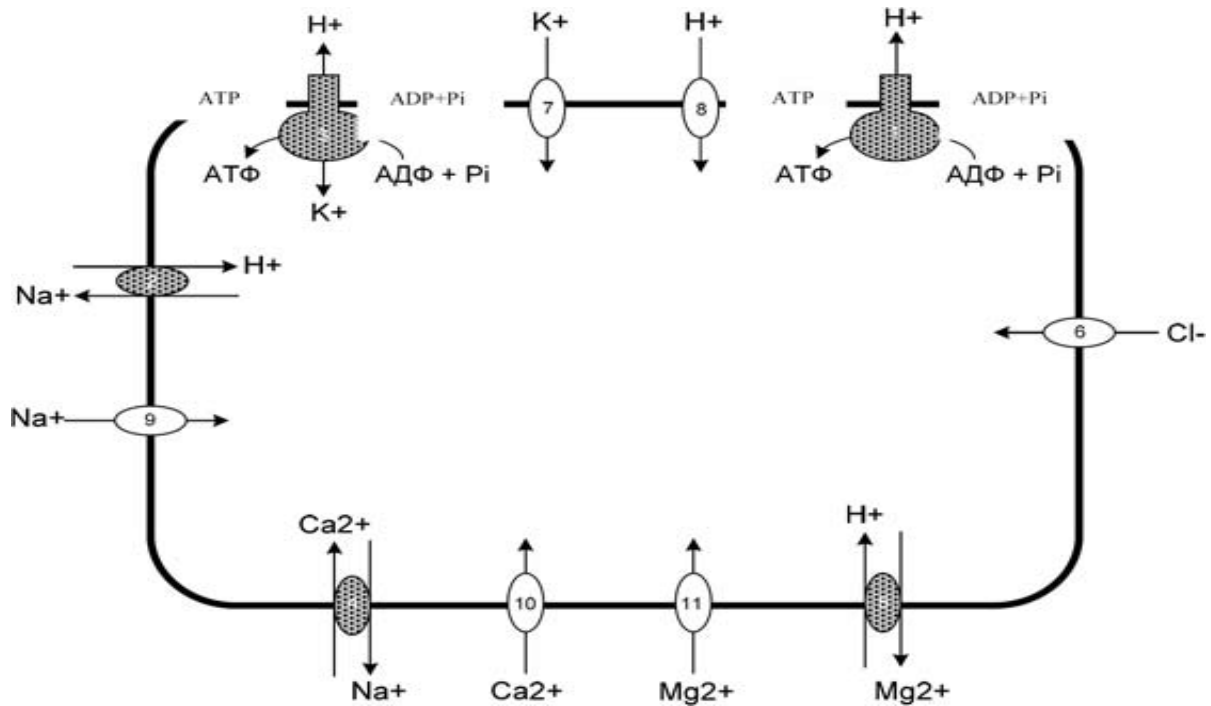


Figure N° 1 : Schéma du transport membranaire des ions dans les cellules d'archaea du genre *Halobacterium* (Melkikh et Seleznev, 2009).

1- H^+ - ATP synthase ; 2- Na^+/H^+ - antiporteur; 3- $H^+ K^+$ - pompe (système de transport dépendant de l'ATP) ; 4- échangeur Na^+-Ca^{2+} ; 5- échangeur $Mg^{2+} - H^+$; 6- flux passifs de chlore ; 7- flux passifs de potassium ; 8- flux passifs de protons ; 9- flux passifs de sodium ; 10- flux passifs de calcium ; 11- flux passifs de magnésium.

III. 2. L'adaptation par productions ou accumulation de solutés organiques (les osmoprotecteurs) : « Compatible-solute strategy » ou « Low salt-in »

Cette stratégie consiste à exclure le sodium et à accumuler des composés organiques hydrosolubles appelés « solutés compatibles ». Ces petites molécules, comme les polyols, sucres, acides aminés, bétaines et ectoines, sont soit synthétisées par la cellule, soit importées de l'environnement via des transporteurs spécifiques, sans perturber les processus métaboliques (Shivanand et Mugeraya, 2011).

Ce mécanisme est largement utilisé dans les trois domaines de vie *Archaea*, *Eucarya* et *Bacteria*. Il confère une plus grande flexibilité d'adaptation à la pression osmotique que l'accumulation de KCl. De plus, il nécessite peu de modifications de la machinerie enzymatique interne. Toutefois, la biosynthèse ou l'importation de ces solutés est énergétiquement coûteuse (Oren, 2002).

IV. Les bactéries du genre *Bacillus*

IV. 1. Taxonomie et caractéristique bactériologique du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient au domaine *Bacteria*, phylum *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*), classe *Bacilli*, ordre *Bacillales*, et famille *Bacillaceae* (Gupta *et al.*, 2020). Il regroupe un grand nombre d'espèces ubiquistes présentes dans les sols, l'eau, l'air et dans divers environnements extrêmes.

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bâtonnets, Gram positives, Catalase positives, capables de former des endospores résistantes, et peuvent être aérobies strictes ou anaérobies facultatives. La plus part des espèces sont mobiles par des flagelles péritriches. Certaines espèces ont une importance médicale (*B. cereus* : toxi-infections alimentaires ; *B. anthracis* : agent de l'anthrax), d'autres sont bénéfiques (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) comme agents de biocontrôle ou probiotiques (De Vos *et al.*, 2009).

IV. 2. Répartition écologique des espèces du genre *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont omniprésentes dans la nature, leur habitat primaire est le sol. Leurs capacités physiologiques et métaboliques leur permettent de coloniser également plusieurs autres écosystèmes tels que les habitats aquatiques, les plantes, les aliments, l'Homme, les animaux, les insectes, et même les environnements extrêmes, comme les déserts, l'Antarctique, les sources hydrothermales, les lacs salins et sodés, les marais salants et les mines de sels (Hong *et al.*, 2009 ; Klouche Khelil *et al.*, 2013 ; Roohi *et al.*, 2014 ; Aissaoui *et al.*, 2018 ; Arab *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021).

La première espèce halophile identifiée au sein du genre *Bacillus* est l'espèce *Bacillus halophilus* (Ventosa *et al.*, 1989), elle est capable de croître sur un large intervalle de concentration saline allant de 3 jusqu'à 30% (p/v) avec un optimum de croissance à 15% de sel (p/v). Cette espèce présente la particularité de produire une nucléase extracellulaire halophile dotée d'activités RNase et DNase, ce qui lui confère un intérêt biotechnologique notable (Berkeley *et al.*, 2002 ; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

Au fil des années, un grand nombre d'espèces halophiles et halotolérants du genre *Bacillus* ont été isolées, identifiées et caractérisées, Le tableau ci-dessous (Tableau N° 1) illustre la diversité et la répartition de quelques-unes de ces espèces identifiées.

Tableau N° 1 : Répartition de quelques espèces halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus*

Espèces	Habitats d'isolement	Concentration de NaCl pour croissance (%)	Références
<i>B. krulwichiae</i>	Sol salin (Japon)	0-14%	Yomoto <i>et al.</i>, 2003
<i>B. oshimensis</i>	Sol salin d'Oshima (Japon)	0-20 (opt 7%)	Yomoto <i>et al.</i>, 2005
<i>B. isabeliae</i>	Etang salé (Island)	1-14 % (opt 4 à 6%)	Albuquerque <i>et al.</i>, 2008
<i>B. iranensis</i>	Lac hypersalin d' Aran-Bidgol (Iran)	2.5 - 15% (opt 5-7.5%)	Bagheri <i>et al.</i>, 2012
<i>B. persicus</i>	Lac hypersalin d' Aran-Bidgol (Iran)	0.5 - 10% (opt 2.5%)	Didari <i>et al.</i>, 2013
<i>B. licheniformis</i>	Lac salin à Sambhar (Inde)	3 - 15% (opt 10%)	Gaur, 2015
<i>Bacillus spp</i>	La Grande Sebkhha d'Oran	0 - 20% (opt 0%)	Nas <i>et al.</i>, 2021

IV. 3. Potentiel biotechnologiques des espèces du genre *Bacillus*

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* possèdent une diversité de propriétés biologiques qui les rendent particulièrement intéressantes pour des applications biotechnologiques. Outre leur capacité à sporuler et leur croissance rapide, ces bactéries sont reconnues pour leur polyvalence métabolique. Bien que certaines soient pathogènes pour l'être humain, la majorité des espèces sont bénéfiques et forme un groupe fort utile dans différents domaines (**Danilova et Sharipova, 2020 ; Su *et al.*, 2021**).

En agriculture, de nombreuses espèces de *Bacillus* agissent comme promoteurs de croissance végétale (PGP) grâce à leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique, à solubiliser le phosphate insoluble et à produire des phytohormones. Elles peuvent également jouer le rôle de biofertilisants ou d'agents de biocontrôle en stimulant la résistance des plantes ou en inhibant la croissance de pathogènes. Par ailleurs, ces bactéries sont capables de synthétiser une large gamme de métabolites secondaires bioactifs tels que les sidérophores, des enzymes industrielles (protéases, amylases, cellulases, lipases), ainsi que des composés aux propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antitumorales et immunosuppressives

(Sansinenea et Orti, 2011; Nabti *et al.*, 2013 ; Klouche Khelil *et al.*, 2013; Aissaoui *et al.*, 2018 ; Nas *et al.*, 2021 ; Saibi *et al.*, 2022).

Certaines espèces sont capables de produire un autre type de composés, les biosurfactants, qui sont des molécules amphiphiles possédant des propriétés émulsifiantes, moussantes et détergentes. Parmi ceux-ci, on trouve des glycolipides, des lipopeptides, des lipopolysaccharides et des glycoprotéines. Ils possèdent un large éventail d'applications industrielles potentielles dans les domaines de la bioremédiation, de la santé, de l'industrie pétrolière et agroalimentaire (Makkar *et al.*, 2011 ; Ighilahriz *et al.*, 2024).

Cette richesse métabolique confère aux *Bacillus* un rôle central dans le développement de solutions durables en biotechnologie verte et pharmaceutique.

V. Les biosurfactants

V. 1. Généralités sur les biosurfactants

Les biosurfactants sont définis comme des molécules amphiphiles composée de parties lipophiles (non polaires) et hydrophiles (polaires) favorisant la présence d'interfaces entre des fluides de polarités différentes. La queue hydrophobe est généralement composée de peptides, de protéines ou d'acides gras saturés ou insaturés, alors que la partie polaire est généralement constituée de l'une des structures suivantes : acides aminés, peptides anioniques ou cationiques et glucides (Liepins *et al.*, 2021 ; da Silva Marinho *et al.*, 2022).

Ce sont des agents tensio-actifs synthétisés principalement par des microorganismes (Bactéries, levures, champignons) bien que certaines plantes puissent aussi en produire. Ils améliorent l'assimilation des composés insolubles dans l'eau, tels que les hydrocarbures, en réduisant la tension de surface et en favorisant leur émulsification. Cela facilite l'adhésion microbienne aux gouttelettes d'hydrocarbures et leur assimilation ultérieure. Ils peuvent être des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Gaur *et al.*, 2022).

Leur capacité à réduire la tension inter-phasique varie selon leur structure chimique. Ils peuvent être classés en deux groupes principaux en fonction de leur poids moléculaire : les biosurfactants de faible poids moléculaire (glycolipides et lipopeptides) et les biosurfactants de poids moléculaire élevé (polysaccharides, lipopolysaccharides, protéines et lipoprotéines). Les biosurfactants de faible poids moléculaire sont plus efficaces pour réduire la tension superficielle, tandis que les biosurfactants de poids moléculaire élevé sont plus efficaces pour stabiliser les émulsions huile-eau (Pardhi *et al.*, 2022). Les différences chimiques dans la

structure moléculaire sont directement liées à leurs activités biologiques et à leurs applications (Albasri *et al.*, 2024).

Pour une biosynthèse optimale, le milieu de culture doit fournir les nutriments nécessaires, notamment les glucides et les lipides comme sources de carbone, ainsi que les composés azotés comme sources d'azote pour soutenir un métabolisme microbien efficace. Cette synthèse microbienne s'effectue soit par fermentation en milieu solide, soit par fermentation en milieu liquide (Vieira *et al.*, 2021).

V. 2. Applications biotechnologiques des biosurfactants

En termes d'écologie et de fonctionnalité, les biosurfactants présentent plusieurs avantages par rapport aux tensioactifs synthétiques en raison de leur nature biodégradable, de leur faible toxicité et de leur capacité à agir comme agents antimicrobiens et peuvent être synthétisés à partir de substrats durables et peu coûteux (Ambaye *et al.*, 2021 ; Jahan *et al.*, 2022).

Ils biosurfactants présentent également une efficacité et résistance élevée aux conditions extrêmes de températures, de pH et de salinité, ce qui les rend particulièrement efficaces pour des applications industrielles et environnementales (Jimoh et Lin, 2019).

En agriculture, ils améliorent la solubilité des composés hydrophobes, favorisent la biodégradation des polluants et jouent un rôle de biopesticides ou d'agents antifongiques. En médecine, ils présentent des propriétés antimicrobiennes, antivirales, anticancéreuses et immunomodulatrices. En cosmétique et dans l'agroalimentaire, ils sont utilisés comme agents émulsifiants, moussants et stabilisateurs de texture. Ils améliorent également la conservation des produits et la distribution des ingrédients actifs. En environnement et industrie pétrolière, ils facilitent la biodégradation des hydrocarbures, la récupération améliorée du pétrole et le nettoyage des déversements.

Matériel et Méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (**L.A.M.A.A.B.E.**) de l'université Abou Bakr Belkaid (Tlemcen).

I. Origine, revivification et vérification de la pureté des souches

Les isolats utilisés pour cette étude ont été isolés en février 2014 et identifiées par Dr. NAS Fatima à partir des échantillons d'eau prélevés d'un écosystème hypersalin « la grande Sebka d'Oran ». Ils portent les codes : LMB3051, LMB3057, LMB3073, LMB3077, LMB3088 et LMB3093. Ils sont affiliés au genre *Bacillus* (**NAS et al., 2022**).

Leur conservation a été effectuée à -20°C sur Bouillon Nutritif à 10% de NaCl (p/v) additionné de 25 % de glycérol (v/v).

A partir des cultures conservées, 200 µL ont été inoculés dans 5 mL de Bouillon Nutritif additionné de 10 % de NaCl (p/v). Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C jusqu'à l'apparition d'un trouble. Des repiquages ont été effectués par la suite sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) afin de vérifier la pureté des isolats.

Des observations microscopiques après coloration de Gram ont été réalisées dans le but de vérifier la morphologie cellulaire et le type de Gram.

Les isolats ont été conservés à nouveau à 4°C sur Gélose Nutritive inclinée supplémentée de 10 % de NaCl (p/v), et à -20°C sur Bouillon Nutritif contenant 10% de NaCl (p/v) et 25% (v/v) de glycérol.

II. Screening de la production des biosurfactants

II. 1. Préparation des surnageants et des culots

A partir des cultures pures de 24 heures, 100 mL de Bouillon Nutritif à 10% de NaCl ont été inoculé. Après 5 jours d'incubation à 37°C sous agitation à 180 rpm, chaque suspension a été centrifugée à 10000 t/min à 4°C pendant 30 minutes, et les différents surnageants ont été récupérés. Les culots ont été récupérés et lavés deux fois avec du tampon salin (**voir annexe**), puis suspendu dans le même tampon.

II. 2. Méthodes de screening des biosurfactants

II. 2. 1. Recherche du pouvoir hémolytique des isolats

L'évaluation du pouvoir hémolytique des isolats a été réalisée par leur ensemencement sur une Gélose Nutritive enrichie à 5 % de sang humain. La lecture des résultats se fait après 24 à 48 heures d'incubation à 37 °C. Une hémolyse complète de l'hémoglobine se manifeste

par l'apparition d'une zone transparente autour des colonies, caractéristique de l'hémolyse bêta. En revanche, une hémolyse partielle entraîne la formation d'une zone moins claire et verdâtre autour de la culture, correspondant à une hémolyse alpha (**Carrillo *et al.*, 1996**).

II. 2. 2. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte)

Ce test a été réalisé selon la méthode de **Mohanram *et al.* (2016)**, 20 microlitres d'huile d'olive ont été déposés sur une lame microscopique, puis celle-ci a été laissée en équilibre pendant 2 heures. Par la suite, 10 μ L de surnageant ont été ajoutés à la surface de l'huile et laissés au repos pendant 2 à 3 minutes. La présence de biosurfactants dans le surnageant se manifeste par l'effondrement de la goutte, tandis qu'un résultat négatif est caractérisé par une goutte conservant sa forme arrondie.

Une solution de SDS à 10 % et de l'eau distillée ont été utilisées respectivement comme contrôle positif et négatif.

II. 2. 3. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile)

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Youssef *et al.* (2004)**. Une boîte de Pétri a été remplie avec 20 mL d'eau distillée, puis 20 μ L d'huile y ont été ajoutés. Ensuite, 10 μ L de surnageant de culture ont été déposés à la surface de l'huile. La présence de biosurfactants dans le surnageant se traduit par un déplacement de l'huile en formant une zone de clarification.

Une solution de SDS à 10 % et de l'eau distillée ont été utilisées respectivement comme témoin positif et négatif.

II. 2. 4. Test en microplaque (Optical distortion grid assay)

L'activité de surface de chaque souche peut être évaluée qualitativement à l'aide du test en microplaque, mis au point et breveté par **Cottingham *et al.* (2005)**. Ce test repose sur la modification de la distorsion optique induite par les tensioactifs dans une solution aqueuse. En l'absence de tensioactifs, l'eau pure déposée dans un puits hydrophobe conserve une surface plane. En revanche, la présence de tensioactifs entraîne un effet de mouillage sur les bords du puits, conférant à la surface du liquide une forme concave semblable à une lentille divergente.

Pour réaliser ce test, 100 μ L de chaque surnageant ont été déposés dans les puits d'une microplaque à 96 puits. L'observation est effectuée en plaçant une feuille quadrillée sous la plaque. En présence de biosurfactant, la déformation concave de la surface du liquide provoque une distorsion de l'image de la grille située en dessous.

II. 2. 5. Indice d'émulsion (E₂₄)

L'indice d'émulsion a été déterminé selon le protocole de **Andreolli et al. (2023)**, il permet de vérifier la capacité des isolats à émulsionner une phase hydrophobe (huile) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 2 mL de surnageant de culture avec 2 mL d'huile. Trois substrats ont été utilisés pour ce test : L'huile de table, l'huile d'olive brute et l'essence normale.

Les deux phases (huile / surnageant de culture) ont été vortexées pendant 5 minutes puis laissées reposer pendant 24h.

Le calcul de l'E₂₄ a été effectué selon la formule suivante : **E₂₄ = (he / ht) x 100**

Où he : hauteur de l'émulsion.

ht : hauteur totale du mélange.

II. 2. 6. BATH assay

Le test d'adhérence bactérienne aux hydrocarbures (BATH) consiste à rechercher l'hydrophobicité des cellules bactériennes. Il a été effectué selon le protocole décrit par **Mohanram et al. (2016)** avec une légère modification.

Le culot cellulaire récupéré lors de la section (**II. 1.**) a été resuspendu dans un tampon salin (voir annexe) jusqu'à atteindre une DO de 0.5 à 600 nm. Ensuite, deux mL de cette suspension bactérienne ont été transférés dans un tube à essai, auxquels 100 µL d'huile d'olive ont été ajoutés

Le mélange a été soumis à une agitation au vortex pendant 3 minutes, puis laissé au repos pendant 1 heure pour permettre la séparation des phases. Après décantation, la phase aqueuse a été soigneusement récupérée, en évitant toute perturbation de la phase huileuse, et sa densité optique a été mesurée à 600 nm.

Ce protocole permet de mesurer l'hydrophobicité cellulaire en évaluant la diminution de la densité optique de la phase aqueuse, reflétant ainsi l'adhérence des cellules bactériennes à la phase hydrocarbonée.

Le pourcentage d'adhérence a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Le pourcentage d'adhérence} = [1 - (\text{DO}_2/\text{DO}_1)] \times 100$$

dont : DO₁ : la densité optique de la suspension bactérienne initiale.

DO₂ : la densité optique de la phase aqueuse récupérée.

III. Nature biochimique des biosurfactants

La nature biochimique des biosurfactants produits par les isolats a été déterminée avec les techniques suivantes :

III. 1. Recherche des glycolipides

La présence de glycolipides a été évaluée en mélangeant 1mL de phénol à 5% avec 1 mL de surnageant de culture, suivi de l'ajout progressif de 2 à 5 mL d'acide sulfurique. Le développement d'une coloration orangée indique la présence de glycolipides (**Ellaiah et al., 2002**).

III. 2. Recherche des lipopeptides

Pour détecter la présence des lipopeptides, un millilitre de surnageant de culture, préalablement chauffé à 70 °C, a été mélangé avec 10 gouttes de solution de NaOH à 1 M. Ensuite, des gouttes de solution de sulfate de cuivre à 1 % ont été ajoutées progressivement. L'apparition d'un anneau violet ou rose au niveau de l'interface des phases indique la présence de lipopeptides (**Jamal et al., 2012**).

III. 3. Recherche des phospholipides

Pour la détection des phospholipides, 10 gouttes d'acide nitrique ont été ajoutées à 1 mL de surnageant préalablement chauffé à 70 °C. Ensuite, une solution de molybdate d'ammonium à 5 % a été ajoutée goutte à goutte. La formation d'une coloration jaune, suivie éventuellement d'un précipité jaune, indique la présence de phospholipides (**Okpokwasili et Ibiene, 2006**).

Résultats et Discussion

I. Résultats

I. 1. Observation microscopique des isolats

L'observation des cellules fixées des isolats, après coloration de Gram a été effectuée à objectif 100 à immersion, elle a montré que les cellules de tous les isolats possèdent la forme bâtonnet avec un type de paroi à Gram positif (**Figure N° 2**).

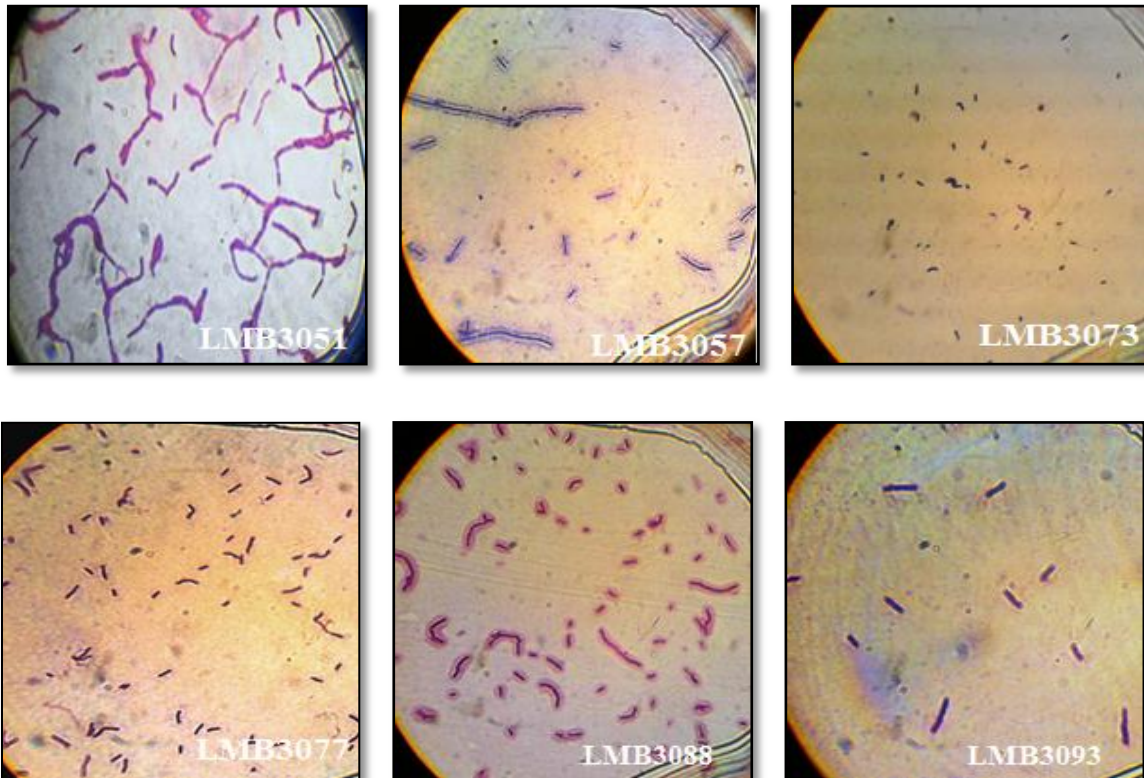


Figure N° 2 : Photos des résultats de l'examen microscopique après coloration de Gram des isolats après 24 heures d'incubation à 37°C sur Gélose Nutritive à 10% de NaCl (p/v) (Objectif 100 à immersion).

I. 2. Screening de l'activité biosurfactant

I. 2. 1. Test d'hémolyse

Le pouvoir hémolytique des isolats sélectionnés a été recherché sur gélose au sang. Le résultat obtenu est illustré dans la **figure N° 3**, il révèle que tous les isolats possèdent un pouvoir hémolytique positif. Les zones hémolytiques obtenues autour de la culture sont claires à bords nets indiquant une hémolyse bêta. La souche LMB3088 avait montré le pouvoir hémolytique le plus important par rapport aux autres isolats.

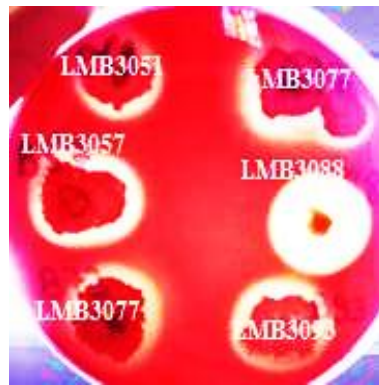


Figure N° 3: Résultat de la recherche du pouvoir hémolytique des isolats sur gélose au sang après 48 heures d'incubation à 37°C.

I. 2. 2. Drop collapse test (test d'effondrement de la goutte)

Les résultats du test de drop collapse sont illustrés à la **figure N° 4**. Ce test est jugé positif lorsque l'ajout d'un surnageant de culture à une goutte d'huile entraîne une extension du diamètre de la goutte supérieure à 1 mm, comparativement au témoin négatif qui est l'eau distillée. L'augmentation du diamètre observé est relative à la quantité de biosurfactant contenue dans le surnageant.

Les résultats obtenus révèlent que l'ensemble des six souches étudiées ont présenté une activité positive à ce test. Les isolats LMB3088 et LMB3093 avaient le meilleur résultat, avec une goutte élargie de 2 mm par rapport à la goutte engendrée par l'eau distillée.

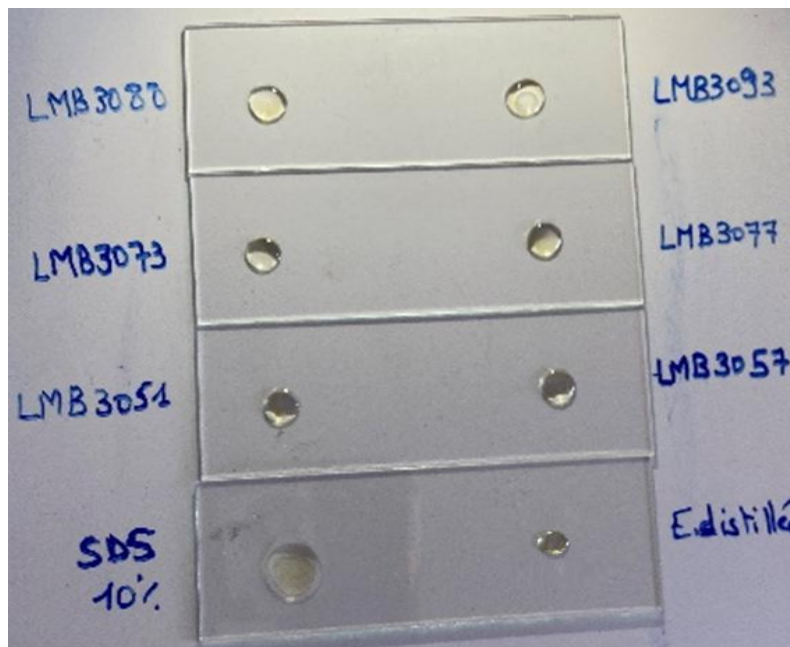


Figure N° 4 : Résultats du Drop collapse test des isolats avec contrôle négatif (eau distillés) et contrôle positif (SDS 10%).

I. 2. 3. Oil spreading test (test de diffusion de l'huile)

Le test oil spreading est considéré comme positif, lorsqu'il y a une dispersion de la plage d'huile à la surface d'eau après l'ajout du surnageant bactérien contenant le biosurfactant. Les résultats obtenus montrent que les 6 isolats étaient positifs, avec un meilleur résultat obtenu par le surnageant de l'isolat LMB3073 qui a pu déplacer la plage de l'huile avec un diamètre de 6,5 cm (**Figure N° 5**).

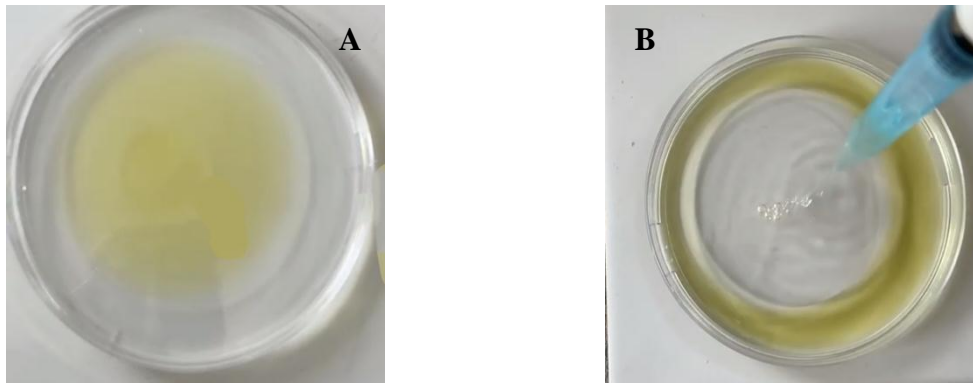


Figure N° 5 : Résultats du Oil spreading test. **A.** Oil spreading obtenu avec l'eau distillée (témoin négatif) ; **B.** Oil spreading obtenu avec le surnageant de l'isolat LMB3073.

I. 2. 4. Test de microplaque (Optical distortion grid assay)

La **figure N° 6** présente les résultats obtenus lors de l'évaluation de la production de biosurfactants par la méthode de microplaque. Les surnageants issus de l'ensemble des isolats ont donné des résultats positifs, caractérisés par une apparence concave et une image de grille déformée. Le témoin négatif (eau distillée) a montré une surface non déformée.



Figure N° 6 : Résultats obtenus par le test de microplaque

I. 2. 5. Indice d'émulsion (E_{24})

Ce test a été réalisé en utilisant trois substrats : l'huile de table, l'huile d'olive brute et l'essence normale. Un résultat positif se manifeste par la formation d'une émulsion stable entre les phases aqueuse et huileuse, caractérisée par l'apparition d'une mousse (Figure N° 7) qui doit se stabiliser pendant au moins 24 heures avant d'être soumise à la mesure.

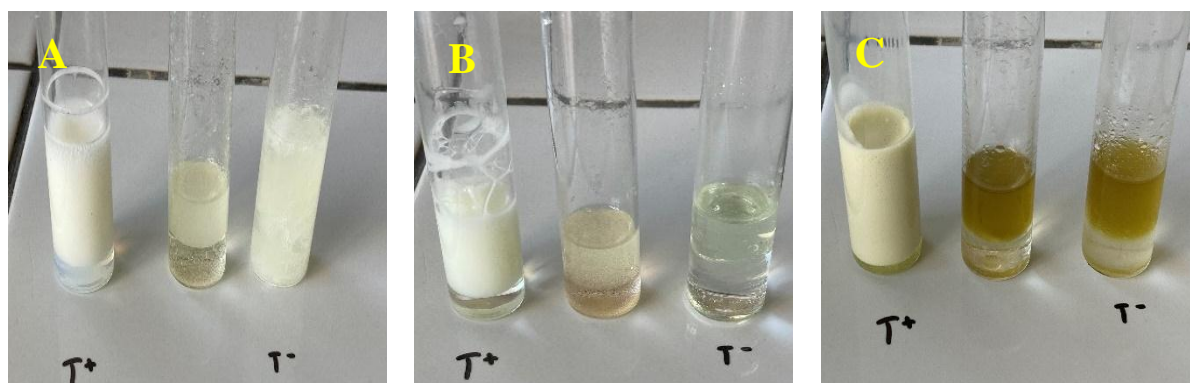


Figure N° 7 : Résultats du test d'émulsion (E_{24}). **A** : Huile de table avec le surnageant de LMB3077. **B** : Essence avec le surnageant de LMB3051. **C** : Huile d'olive avec le surnageant de LMB3073. **T+** : SDS à 10%, **T-** : Eau distillée.

Les résultats de l'indice d'émulsion E_{24} sont présentés dans la **figure N° 8**. Ils indiquent que l'ensemble des surnageants testés ont présenté un indice d'émulsion supérieur ou égal à 50% pour chacun des substrats hydrophobes utilisés, à l'exception du surnageant de l'isolat MB3051 qui a donné un indice de 47,62% vis-à-vis l'huile de table.

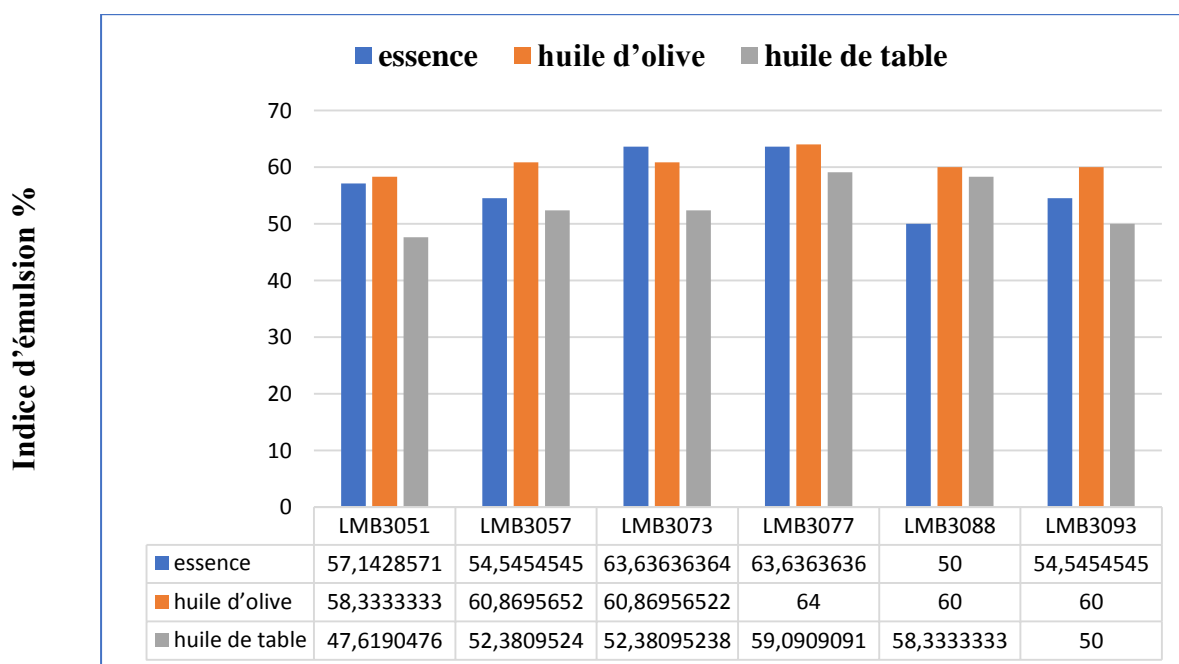


Figure N° 8: Indice d'émulsion (E_{24}) des isolats.

À partir de l'histogramme, il apparaît que les surnagants des isolats LMB3057, LMB3073, LMB3077, LMB3088 et LMB3093 ont présenté un pouvoir émulsifiant supérieur à 50 % avec les trois substrats testés. Le surnagent de l'isolat LMB3077 s'est distingué par les meilleurs indices d'émulsion, atteignant 63,64 % avec l'essence, 64 % avec l'huile d'olive et 59,09 % avec l'huile de table.

Ainsi, les résultats obtenus suggèrent que l'huile d'olive et l'essence sont globalement les substrats les mieux émulsionnés par les biosurfactants issus de l'ensemble des isolats, comparativement à l'huile de table. Toutefois, une exception est observée avec le surnagent de l'isolat LMB3088, qui a montré les meilleurs indices d'émulsion avec l'huile d'olive et l'huile de table.

I. 2. 6. BATH assay

Les résultats obtenus par le test BATH ont mis en évidence des pourcentages d'adhérence supérieurs à 50 % (**Figure N° 9**), traduisant une forte hydrophobicité de surface des cellules bactériennes. Cela reflète une grande affinité de nos isolats pour l'huile, suggérant ainsi une production potentielle de biosurfactants.

La meilleure adhérence cellulaire a été notée avec la souche LMB3077 (58.57%) suivi par la souche LMB3073 (55.55%), et la souche LMB3088 (54.81%).

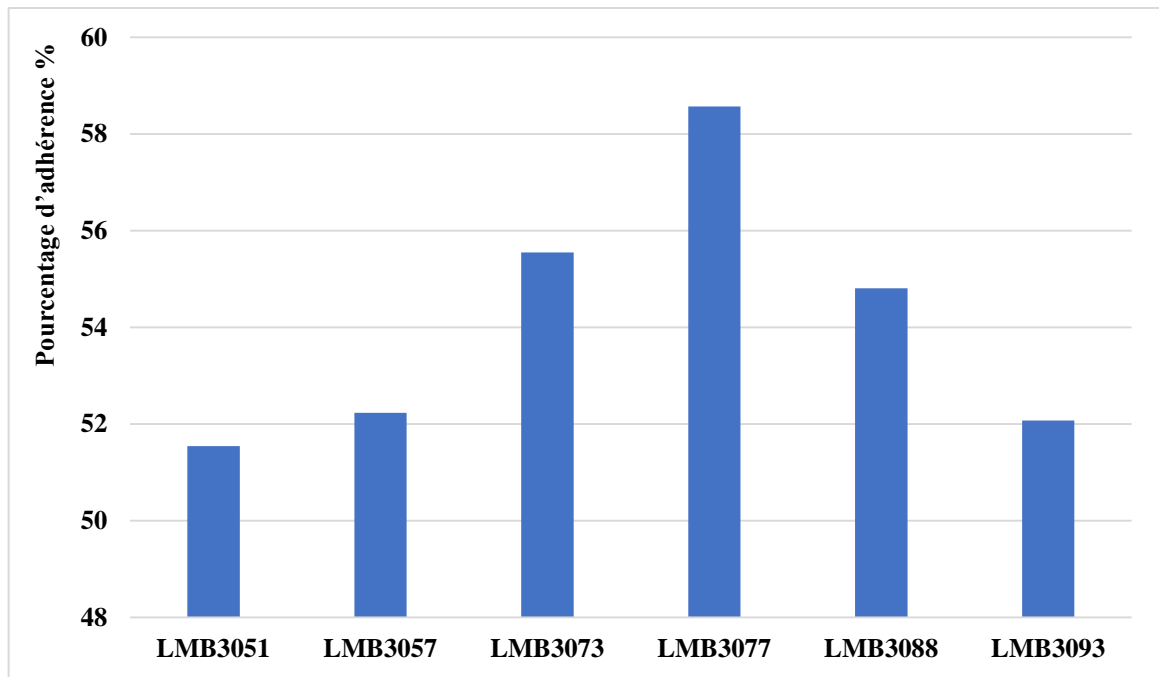


Figure N° 9 : Pourcentages d'adhérence obtenus par les isolats.

I. 3. Nature biochimique des biosurfactants produits

La nature biochimique des biosurfactants produits a été révélée par des techniques colorimétriques, dont les résultats sont présentés dans **tableau N° 2** et la **figure N° 10**.

Tableau N° 2 : Nature biochimique du biosurfactant produit avec les différents isolats.

	LMB3051	LMB3057	LMB3073	LMB3077	LMB3088	LMB3093
Glycolipides	+	+	+	+	+	+
Lipopeptides	-	+	+	+	+	+
Phospholipides	+	+	+	+	+	+

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les biosurfactants produits par les isolats sont de nature glycolipidique, lipopeptidique et phospholipidique, à l'exception de l'isolat LMB3051, il produit des biosurfactants de nature glycolipidique et phospholipidique.

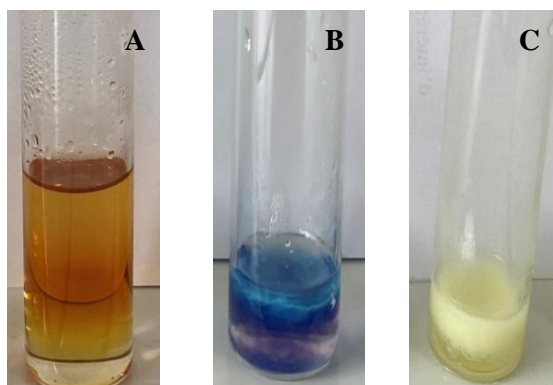


Figure N°10 : Résultats de la révélation chimique de la nature du biosurfactant. A : présence de glycolipides. B : présence de lipopeptides. C : présence de phospholipides

II. Discussion

Cette étude a été menée dans le but de rechercher la production de biosurfactants par des isolats halotolérants appartenant au genre *Bacillus*. Ces isolats ont été isolés, à partir de la grande sebkha d'Oran, et identifiés par Dr. NAS F. (NAS *et al.*, 2021).

Le potentiel biotechnologique de ces isolats a déjà été évalué pour leur capacité à synthétiser des métabolites secondaires présentant des propriétés antibactériennes et antifongiques, ainsi que pour la production d'extrêmoenzymes. Les résultats obtenus ayant révélé un potentiel particulièrement prometteur (NAS *et al.*, 2021 ; NAS, 2022), ce qui nous a encourager à explorer également leur aptitude à produire des biosurfactants en raison des propriétés biotechnologiques prometteuses de ces molécules.

Les biosurfactants sont des agents tensioactifs d'origine microbienne, produits afin de faciliter l'assimilation de composés hydrophobes tels que les hydrocarbures. Ils agissent en favorisant l'attachement des cellules microbiennes aux hydrocarbures, en augmentant leur

solubilité dans l'eau et en facilitant leur diffusion à l'intérieur de la cellule microbienne. Ces molécules amphiphiles peuvent être intracellulaires, extracellulaires ou associées à la surface cellulaire, elles appartiennent à diverses classes telles que les glycolipides, lipopeptides, lipopolysaccharides ou acides gras. Grace à leur capacité à modifier les propriétés inter-faciales, à induire la formation d'émulsion, la séparation de phases, la solubilisation, le mouillage, la détergence et la réduction de viscosité, ces molécules trouvent de nombreuses applications dans divers procédés industriels et biotechnologiques (**Kubicki et al., 2019 ; Plaza et al., 2020 ; Sohail et Jamil, 2023**).

La majorité des méthodes de criblage de biosurfactants reposent sur les effets physiques induits par les agents tensioactifs, notamment leur capacité à modifier les propriétés inter-faciales. Ces approches incluent des tests simples, comme la mesure de la tension superficielle, l'indice d'émulsion ou encore la dispersion d'huile (oil spreading). Par ailleurs, la capacité des microorganismes à interagir avec des surfaces hydrophobes peut être exploitée à travers des méthodes telles que l'adhésion sur hydrocarbures (BATH test) ou l'activité hémolytique. En fonction de l'objectif de l'étude, les tests de criblage peuvent fournir des résultats qualitatifs (présence/absence) ou quantitatifs (concentration, activité). Dans le cadre d'un premier screening, les méthodes qualitatives s'avèrent généralement suffisantes pour sélectionner les souches les plus prometteuses (**Walter et al., 2010**).

Dans le cadre de notre étude, la recherche de biosurfactants a été réalisée à partir du surnageant de culture, ciblant les biosurfactants extracellulaires. Pour ce faire, cinq tests de criblage ont été employés : le test d'hémolyse, le test d'effondrement de goutte (drop collapse assay), le test de dispersion d'huile (oil spreading assay), la méthode de distorsion optique en microplaque (optical distortion grid assay), ainsi que la mesure de l'indice d'émulsion à 24 heures (E24). Par ailleurs, l'adhésion des cellules aux hydrocarbures a été évaluée à l'aide du test BATH (Bacterial Adhesion To Hydrocarbons).

Le test d'hémolyse, réalisé sur gélose au sang, a révélé que l'ensemble de nos isolats présentent une activité β -hémolytique, cela indique une lyse complète des globules rouges provoquant une zone claire entourant la culture. Ce test constitue un outil de criblage préliminaire couramment utilisé pour détecter la production de biosurfactants, en raison de sa simplicité, de son faible coût et de sa mise en œuvre rapide (**Banat, 1993 ; Yonebayashi et al., 2000**). Historiquement, l'activité hémolytique de la surfactine, un biosurfactant produit par *Bacillus subtilis*, a été mise en évidence par **Bernheimer et Avigad (1970)**, posant ainsi les bases de l'utilisation de ce test. **Carrillo et al. (1996)** ont par la suite établi une forte corrélation entre l'activité hémolytique et la production de biosurfactants, recommandant

l'utilisation de la gélose au sang comme méthode de criblage primaire. Toutefois, plusieurs études ont mis en évidence des limites importantes : d'une part, ce test peut écarter certains bons producteurs de biosurfactants ne présentant pas d'activité hémolytique, générant ainsi des faux négatifs ; d'autre part, des composés non biosurfactants peuvent provoquer l'hémolyse, entraînant des faux positifs (Youssef *et al.*, 2004 ; Satpute *et al.*, 2009 ; Walter *et al.*, 2010).

Ainsi, bien que le test d'hémolyse demeure un outil utile dans le criblage initial, il ne saurait être utilisé seul. Il doit être associé à aux test Oil Spreading, Drop Collapse et l'indice d'émulsion (E₂₄) pour confirmer la capacité des souches à produire des biosurfactants (Stella *et al.*, 2023 ; Rizvi *et al.*, 2024).

Les tests de diffusion d'huile (*oil spreading assay*), d'effondrement de goutte (*drop collapse assay*) et de microplaque (*optical distortion grid assay*) ont révélé des résultats positifs pour l'ensemble des surnageants testés. Le test de diffusion d'huile indique la présence de propriétés tensioactives dans les surnageants, tandis que le test d'effondrement de goutte et celui de microplaque sont indicatifs de l'activité de mouillage de surface (Sohail et Jamil, 2023 ; Rizvi *et al.*, 2024). Ces observations confirment que les surnageants présentent des caractéristiques typiques des biosurfactants, suggérant ainsi que les souches étudiés représentent de bonnes candidates pour la production de biosurfactants.

En ce qui concerne l'indice d'émulsion (E₂₄), il constitue une méthode indirecte couramment utilisée pour évaluer la production de biosurfactants. Le principe repose sur l'hypothèse selon laquelle, si le surnageant de culture contient un biosurfactant, celui-ci sera capable d'émulsifier les hydrocarbures présents dans la solution testée (Guerra *et al.*, 2018 ; Devi et Jha, 2020). Dans cette étude, trois substrats hydrophobes ont été utilisés : l'essence, l'huile de table et l'huile d'olive. Les résultats obtenus ont révélé que les surnageants des isolats testés présentaient une activité émulsifiante positive ($\geq 50\%$), à l'égard d'au moins l'un des substrats testés, ce qui traduit une bonne stabilité des émulsions formées avec les substrats hydrophobes testés. Le surnageant de l'isolat LMB3077 a obtenu les meilleurs indices avec l'huile d'olive (64 %), l'essence (63,64 %), et l'huile de table (59,09 %), ce qui démontre une grande efficacité d'émulsion. Ces résultats sont cohérents avec les propriétés attendues des biosurfactants, qui sont capables de réduire la tension inter-faciale et de stabiliser les émulsions. L'exception observée avec l'isolat LMB3051, dont l'indice avec l'huile de table est légèrement inférieur à 50 %, pourrait être liée à une plus faible production ou à une composition moins efficace du biosurfactant produit par cet isolat pour ce type de substrat.

Le test BATH a révélé des pourcentages d'adhérence cellulaire > 50 % pour tous les isolats, indiquant une forte hydrophobicité ce qui confirme l'affinité de leurs cellules par rapport au substrat hydrophobe. Ce caractère est généralement corrélé à une production active de biosurfactants, car ces composés modifient la nature de la paroi cellulaire en la rendant plus apte à interagir avec les phases organiques (**Plaza et al., 2020 ; Sohail et Jamil, 2023**). LMB3077, une fois encore, s'est démarqué avec la valeur la plus élevée (58,57 %), renforçant l'hypothèse selon laquelle cet isolat est l'un des plus performants en termes de production de biosurfactants.

Dans certains cas, certaines souches bactériennes présentent des résultats positifs au test BATH, tandis que les tests de drop collapse et oil spreading donnent des résultats négatifs. Cette divergence peut s'expliquer par la capacité de ces cellules bactériennes fortement hydrophobes à agir elles-mêmes comme biosurfactants sans produire de biosurfactants extracellulaires (**Sohail et Jamil, 2023**).

L'analyse colorimétrique réalisée sur les différents surnagants a révélé que la majorité de nos isolats produisent des biosurfactants appartenant aux classes : glycolipides, phospholipides et lipopeptides. Toutefois, une exception a été observée pour l'isolat LMB3051, qui ne produit que des glycolipides et des phospholipides. Cette diversité dans la composition biochimique des biosurfactants est particulièrement intéressante, car elle conditionne non seulement leurs propriétés tensioactives telles que la réduction de la tension superficielle ou l'activité d'émulsion, mais également leurs applications potentielles dans divers domaines tels que l'industrie, la bioremédiation et la pharmaceutique.

Les substances tensioactives peuvent être classées en deux grandes catégories. La première regroupe les composés de faible poids moléculaire, capables de réduire efficacement la tension superficielle, mais dont la capacité à stabiliser les émulsions est souvent limitée. Ces composés, désignés sous le terme de biosurfactants, incluent notamment les lipopeptides, les glycolipides et certaines protéines (**Neu, 1996**). La seconde catégorie correspond aux macromolécules qui, bien qu'elles n'affectent que faiblement la tension superficielle, possèdent un fort pouvoir de stabilisation des émulsions ; ces substances sont appelées bioémulsans ou bioémulsifiants, et comprennent principalement des polysaccharides et des lipoprotéines (**Smyth et al., 2010**).

Par conséquent, nos isolats semblent produire à la fois des biosurfactants et des bioémulsifiants, puisque leurs produits ont la capacité de réduire significativement la tension superficielle tout en assurant une bonne stabilité des émulsions.

Les espèces de *Bacillus* sont particulièrement connues pour la synthèse de lipopeptides tels que la lichenysine, de surfactine, de complexe protéique-lipidique et de subtilisine (Varjani et Upasani, 2017). Elazzazy *et al.* (2015) ont observé dans leur étude que les isolats produisant des lipopeptides ont présenté une capacité d'émulsion plus élevée.

À la lumière des résultats obtenus, nos isolats montrent une performance élevée dans l'ensemble des tests de criblage effectués, un pouvoir émulsifiant important ainsi qu'une diversité biochimique notable des composés produits.

Contrairement à la majorité des souches étudiées dans la littérature, qui proviennent généralement de milieux pollués (Nayariseri *et al.*, 2018 ; Rani *et al.*, 2020 ; Andreolli *et al.*, 2023), les isolats étudiés dans notre travail proviennent d'un environnement salin non pollué. Cette particularité confère à notre étude un intérêt particulier, dans la mesure où peu de travaux ont documenté l'aptitude de microorganismes issus de sites non contaminés à produire des biosurfactants.

De plus, la plupart des études décrivent la production de ces composés en conditions standards. Notre recherche met en évidence la capacité de nos isolats à synthétiser des biosurfactants à une salinité élevée de 10% de NaCl (v/v) avec un indice d'émulsion supérieur à 50%, contrairement aux résultats rapportés par Zargar *et al.* (2022), qui ont observé une diminution significative de l'activité émulsifiante lorsque la concentration en sel dépasse 2 %, avec un indice d'émulsion passant de 47,9 % à la concentration de 0 % de sel à seulement 22 % entre 4 et 8 % de sel. Ces résultats suggèrent une meilleure tolérance à la salinité et une efficacité élevée de nos biosurfactants dans des environnements extrêmes, soulignant leur potentiel pour des applications en milieux hypersalins.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion générale

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence le potentiel de production de biosurfactant chez six isolats halotolérantes appartenant au genre *Bacillus*, isolées à partir de l'écosystème hypersalin « la grande Sebkhah d'Oran ».

Les différents tests de criblage réalisés (hémolyse, drop collapse, oil spreading, test en microplaque, indice d'émulsion E_{24} et test BATH) ont révélé un potentiel important pour la production de biosurfactants, en particulier pour les isolats LMB3077, LMB3088 et LMB3073, bien qu'ils proviennent d'un habitat non contaminé par les hydrocarbures.

Ces isolats ont démontré un pouvoir émulsifiant élevé, dépassant les 50 %, même en présence d'une salinité élevée (10 % NaCl), ce qui témoigne de la robustesse et de la stabilité de leurs composés tensioactifs dans des conditions extrêmes.

Par ailleurs, l'analyse biochimique des surnageants, réalisée à l'aide de techniques colorimétriques, a révélé une nature chimique diversifiée des biosurfactants produits, incluant des lipopeptides, des glycolipides et des phospholipides.

Cette hétérogénéité structurale pourrait expliquer leur double fonctionnalité : la réduction de la tension superficielle et la stabilisation d'émulsions, suggérant ainsi la coproduction de biosurfactants et de bioémulsifiants.

La singularité de cette étude réside dans l'origine des isolats, issus d'un environnement naturel hypersalin non contaminé par les hydrocarbures, contrairement à la majorité des souches décrites dans la littérature, généralement isolées de milieux contaminés par les hydrocarbures. De plus, leur capacité à maintenir une activité biosurfactante élevée en conditions hypersalines représente un atout considérable pour des applications en biotechnologie environnementale, notamment en milieux extrêmes.

Les résultats obtenus ouvrent ainsi la voie à plusieurs perspectives de recherche :

- Optimisation des conditions de production, afin d'améliorer les rendements de production, par l'optimisation des milieux de culture (carbone, azote, oligo-éléments), des paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité) et l'utilisation de substrats à faible coût (déchets agro-industriels).
- Extraction des biosurfactants produits et caractérisation de leur structure chimique complète par des techniques de chimie analytique tels que la HPLC, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GCMS), la spectroscopie infra-rouge à transmission de Fourier (FTIR), afin de déterminer leurs propriétés physico-chimiques et comprendre leurs mécanismes d'action.

Conclusion et Perspectives

- ✚ Tester les applications biotechnologiques de ces biosurfactants tels que la bioremédiation de sites pollués, la récupération du pétrole ou l'application comme agents stabilisateurs d'émulsions pour des produits alimentaires ou cosmétiques, vue leur propriétés tensioactives et émulsifiantes importantes.
- ✚ Tester d'autres activités biologiques de ces molécules activité antimicrobienne, antivirales, anticancéreuses.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., Cherif, A., & Klouche-Khelil, N. (2018). Antibacterial potential of 2,4-Di-tert Butylphenol and Calixarene-based prodrugs from thermophilic *Bacillus licheniformis* isolated in algerian hot spring. *Geomicrobiology Journal*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>.
2. Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., & Caglayan, P. (2015). Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheepskins containing red and yellow discolorations. *Journal American Leather Chemists Association*, 110, 211-220.
3. Albasri, H. M., Almohammadi, A. A., Alhazmi, A., Bukhari, D. A., Waznah, M. S., & Mawad, A. M. M. (2024). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* bacterium isolated from Uhud mountain. *Frontiers in microbiology*, 15, 1358175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1358175>.
4. Ambaye, T. G., Vaccari, M., Prasad, S., & Rtimi, S. (2021). Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102090>.
5. Andreolli, M., Villanova, V., Zanzoni, S., D'Onofrio, M., Vallini, G., Secchi, N., & Lampis, S. (2023). Characterization of trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine strain *Rhodococcus* sp. SP1d and its potential for environmental applications. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02128-9>
6. Arab, M., Bakour, S., Lalaoui, R., Aissaoui, N., Nas, F., Hoceini, A., Fournier P. E., Klouche-Khelil, N. (2018). Diversity of aerobic *Bacilli* analysis using molecular and culture-based approaches in debagh hot spring. *Geomicrobiology Journal*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.152093>.
7. Bagheri, M., Didari, M., Amoozegar, M. A., Schumann, P., Sánchez-Porro, C., Mehrshad, M., & Ventosa, A. (2012). *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(4), 811–816. <https://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.030874-0>.
8. Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* SP. *Biotechnology Letters*, 15(6), 591–594. <http://doi.org/10.1007/bf00138546>.
9. Bargiela, R., Korzhenkov, A. A., McIntosh, O. A., Toshchakov, S. V., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., & Golyshina, O. V. (2023). Evolutionary patterns of archaea

- predominant in acidic environment. *Environmental microbiome*, 18(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40793-023-00518-5>.
10. **Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., & De Vos, P. (2002).** Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives. © Blackwell Science Ltd.
 11. **Bernheimer, A. W., & Avigad, L. S. (1970).** Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology*, 61(3), 361–369. <http://doi.org/10.1099/00221287-61-3-361>.
 12. **Boetius, A., Anesio, A. M., Deming, J. W., Mikucki, J. A., & Rapp, J. Z. (2015).** Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nature reviews. Microbiology*, 13(11), 677–690. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3522>.
 13. **Bowers, K. J., Mesbah, N. M., & Wiegel, J. (2009).** Biodiversity of poly-extremophilic Bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems*, 5(1), 9. <http://doi.org/10.1186/1746-1448-5-9>.
 14. **Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giuletta, A. M. (1996).** Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 12(1), 82–84. <https://doi.org/10.1007/BF00327807>.
 15. **Chandra, R., Sharma, P., Yadav, S., & Tripathi, S. (2018).** Biodegradation of Endocrine-Disrupting Chemicals and Residual Organic Pollutants of Pulp and Paper Mill Effluent by Biostimulation. *Frontiers in microbiology*, 9, 960. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00960>.
 16. **Christopher, F. C., Ponnusamy, S. K., Ganesan, J. J., & Ramamurthy, R. (2019).** Investigating the prospects of bacterial biosurfactants for metal nanoparticle synthesis - a comprehensive review. *IET nanobiotechnology*, 13(3), 243–249. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5184>.
 17. **Cottingham MG, Bain CD, Vaux DJT (2004).** Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates. *Lab Invest* 84(4):523–529. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700054>.
 18. **da Silva Marinho, P. S., da Silva, R. R., & de Luna, J. M. (2022).** Biosurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, 11(12), <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>.
 19. **Danilova, I., & Sharipova, M. (2020).** The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in microbiology*, 11, 1782. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>.

20. **DasSarma, S. & DasSarma, P. (2012).** Halophiles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd), NewYork. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>.
21. **De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes. 2nd ed (Vol. 3). USA : Springer.
22. **Devi, S. P., & Jha, D. K. (2020).** Screening of Bacteria Isolated from Refinery Sludge of Assam for Hydrocarbonoclastic Activities. Journal of Pure and Applied Microbiology, 14(2), 1453-1465. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.2.43>.
23. **Didari, M., Amoozegar, M. A., Bagheri, M., Mehrshad, M., Schumann, P., Spröer, C., & Ventosa, A. (2013).** *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(Pt 4), 1229–1234. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.042689-0>.
24. **Dutta, B., & Bandopadhyay, R. (2022).** Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00252-w>.
25. **Echigo, A., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., & Usami, R. (2007).** *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (5), 1081–1085. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64830-0>.
26. **Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., & Usami, R. (2005).** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 1(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-8>.
27. **Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016).** Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World journal of microbiology & biotechnology*, 32(8), 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>
28. **Elazzazy, A. M., Abdelmoneim, T. S., & Almaghrabi, O. A. (2015).** Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 22(4), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.018>.
29. **Ellaiah, P., Prabhakar, T., Sreekanth, M., Taleb, A. T., Raju, P. B., & Saisha, V. (2002).** Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(9), 1083–1086.s

30. **Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022).** Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>.
31. **Gaur, A. (2015).** Isolation and Characterization of Halotolerant *Bacillus* sp. with extra Cellular A-Amylase production Potential from Sambhar salt lake, India; *International Research Journal of Environment Sciences*. 4(6), 7-10.
32. **Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., Chang, J. S., Yong Ng, H., Wong, J. W. C., & Kim, S. H. (2022).** Production of biosurfactants from agro- industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresource technology*, 343, 126059. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126059>.
33. **Guerra, A. B., Oliveira, J. S., Silva-Portela, R. C. B., Araújo, W., Carlos, A. C., Vasconcelos, A. T. R., Freitas, A. T., Domingos, Y. S., de Farias, M. F., Fernandes, G. J. T., & Agnez-Lima, L. F. (2018).** Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. *Environmental pollution*, 235, 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.014>.
34. **Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018).** Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS microbiology reviews*, 42(3),353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>.
35. **Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014).** Extremophiles: an overview of microorganism from extreme environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371-380. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00258.7>.
36. **Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020).** Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.
37. **Hänelt, I., & Müller, V. (2013).** Molecular mechanisms of adaptation of the moderately halophilic bacterium *halobacillus halophilus* to its environment. *Life (Basel, Switzerland)*, 3(1), 234–243.
38. **Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M. K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., & Cutting, S. M. (2009).** *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal

- tract. Research in Microbiology, 160(2), 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.11.002>.
39. **Horikoshi K. (2008)**. Past, present and future of extremophiles. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12(1), 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0127-5>
40. **Ighilahriz, K., Benchouk, A., Belkebir, Y., Seghir, N., & Yahi, L. (2024)**. Production of biosurfactant by *Bacillus megaterium* using agro-food wastes and its application in petroleum sludge oil recovery. *Journal of environmental health science & engineering*, 22(2), 413–424. <https://doi.org/10.1007/s40201-024-00919-9>.
41. **Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., & Alexandridis, P. (2020)**. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>.
42. **Jamal, P., Wan Nawawi, W. M. F., & Alam, Md. Z. (2012)** Optimum medium components for biosurfactant production by *Klebsiella pneumoniae* WMF02 utilizing sludge palm oil as a substrate. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (1), 100-108.
43. **Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019)**. Enhancement of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Production Through the Optimization of Medium Composition and Its Application for Biodegradation of Hydrophobic Pollutants. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(3), 724–743. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2847-7>.
44. **Klouche Khelil, N., Aissaoui, N., Nas, F., Cayol, J. L., & Ghellai L. (2013)**. A novel halotolerant bacterium isolated from El Goléa Lake in Algeria and antimicrobial potential of this strain. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 3: 825-834.
45. **Kubicki, S., Bollinger, A., Katzke, N., Jaeger, K. E., Loeschke, A., & Thies, S. (2019)**. Marine Biosurfactants: Biosynthesis, Structural Diversity and Biotechnological Applications. *Marine drugs*, 17(7), 408. <https://doi.org/10.3390/md17070408>.
46. **Kumar, A., Singh, R. P., & Singh, R. (2020)**. Soil pH management for sustainable agriculture. In *Soil Acidity and Plant Growth* (pp. 63–84). Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0969-4_4.
47. **Larsen, H. (1962)**. Halophilism. In: the Bacteria: a treatise on structure and function. Stanier R. C. ed., *Academic press*, New York. 4: 297-342.
48. **Liepins, J., Balina, K., Soloha, R., Berzina, I., Lukasa, L. K., & Dace, E. (2021)**. Glycolipid Biosurfactant Production from Waste Cooking Oils by Yeast: Review of

- Substrates, Producers and Products. *Fermentation*, 7(3), 136.
<https://doi.org/10.3390/fermentation7030136>.
49. **MacElroy, R. D. (1974)**. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6(1),74-75.
50. **Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011)**. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), 5.
<https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>.
51. **Melkikh, A. V., & Seleznev, V. D. (2009)**. Model of active transport of ions in archaea cells. *Bulletin of mathematical biology*, 71(2), 383–398.
<https://doi.org/10.1007/s11538-008-9366-6>.
52. **Mohanram, R., Jagtap, C., & Kumar, P. (2016)**. Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Marine pollution bulletin*, 105(1), 131–138.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.040>.
53. **Mondol, M. A. M., Shin, H. J., & Islam, M. T. (2013)**. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine Drugs*, 11(8), 2846–2872. <http://doi.org/10.3390/md11082846>.
54. **Mucsi, M., Borsodi, A. K., Megyes, M., & Szili-Kovács, T. (2024)**. Response of the metabolic activity and taxonomic composition of bacterial communities to mosaically varying soil salinity and alkalinity. *Scientific reports*, 14(1), 7460.<https://doi.org/10.1038/s41598-024-57430-2>.
55. **Nabti, E. H., Mokrane, N., Ghouli, M., Manyani, H., Dary, M., & Megias, M. G. (2013)**. Isolation and Characterization of Two Halophilic *Bacillus* (*B. licheniformis* and *Bacillus* sp) with Antifungal Activity. *Journal of Ecology of Health & Environment*, 1(1), 13–17. <http://doi.org/10.12785/jehe/010102>.
56. **Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M. A., Cretoiu, M. S., Stal, L. J., Etemadifar, Z., Shahzadeh Fazeli, S. A., & Bolhuis, H. (2017)**. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Scientific reports*, 7(1), 11522.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11585-3>.
57. **Nas, F. (2022)**. Recherche de souches extrêmophiles du genre *Bacillus* productrices de composés antimicrobiens issues de la Grande Sebkhah d'Oran. Thèse de doctorat, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
58. **Nas, F., Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Mosbah, A., Arab, M., Abdelwahed, S., & Klouche-Khelil, N. (2021)**. A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary

- metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran. *International Microbiology*, 24(3), 455–470. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
59. **Nayariseri, A., Singh, P., & Singh, S. K. (2018).** Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*, 14(6), 304–314. <http://doi.org/10.6026/97320630014304>
 60. **Neu, T. R. (1996).** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, 60(1), 151–166. <http://doi.org/10.1128/mr.60.1.151-166.1996>
 61. **Okpokwasili, G. C., & Et Ibiene, A. A. (2006).** Enhancement of Recovery of Residual Oil Using a Biosurfactant Slug. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 453–456.
 62. **Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 56–63. <http://doi.org/10.1038/sj/jim/7000176>
 63. **Oren, A. (2006).** Life at High Salt Concentrations. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. 2:263-282. https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_9.
 64. **Oren, A. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-4-2>.
 65. **Pardhi, D. S., Panchal, R. R., Raval, V. H., Joshi, R. G., Poczai, P., Almalki, W. H., & Rajput, K. N. (2022).** Microbial surfactants: A journey from fundamentals to recent advances. *Frontiers in microbiology*, 13, 982603. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.982603>.
 66. **Plaza, G., & Achal, V. (2020).** Biosurfactants: Eco-Friendly and Innovative Biocides against Biocorrosion. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2152. <https://doi.org/10.3390/ijms21062152>.
 67. **Quesada E., Bejar V., Valderrama M. J. and Ramos-Cormenzana A. 1987.** Growth characteristics and salt requirement of *Halobacterium salinarum* in a defined medium. *Current Microbiology*, 16, 21-25.
 68. **Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015).** Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907–7913. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>

69. **Rani, K., Sangwan, S., Singh, S., Sharma, P., Kaur, H., & Sindhu, M. (2020).** Biosurfactant production by bacteria retrieved from hydrocarbon polluted environment. *International Journal of Chemical Studies*, 8(4), 1059–1065. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i4h.9744>.
70. **Richards, L. A. (1954).** Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. US Salinity Lab., US Department of Agriculture Handbook 60 California, USA.).
71. **Rizvi, H., Singh, V., & Ashish. (2024).** Screening and characterization of biosurfactant-producing strains in contaminated soil. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 18(2), 1074–1084. <http://doi.org/10.22207/JPAM.18.2.24>.
72. **Roohi, A., Ahmed, I., Khalid, N., Iqbal, M., & Jamil, M. (2014).** Isolation and phylogenetic identification of halotolerant/halophilic bacteria from the salt mines of Karak, Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16: 564–570.
73. **Saibi, A. N. E., Nas, F., Arab, M., Aissaoui, N., Boukeroui, Y., & Klouche-Khelil, N. (2022).** Antimicrobial and Enzymatic Profiling of Halophilic and Halotolerant Bacteria from a Hypersaline Lake The Great Sebkhha of Oran, Northwestern Algeria, *Geomicrobiology Journal*, 39 (9), 816–831. <https://doi.org/10.1080/01490451.2022.2079777>.
74. **Salwan, R., & Sharma, V. (2020).** Overview of extremophiles. Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. 3-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00001-0>.
75. **Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011).** Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33 (8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>.
76. **Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022).** Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.
77. **Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010).** Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127–144. <http://doi.org/10.3109/07388550903427280>.
78. **Scheffer, G., & Gieg, L. M. (2023).** The Mystery of Piezophiles: Understudied Microorganisms from the Deep, Dark Subsurface. *Microorganisms*, 11(7), 1629. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071629>.

79. **Shivanand, P., & Mugeraya, G. (2011).** Halophilic bacteria and their compatible solutes– osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100 (10), 1516-1521.
80. **Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019).** Biosurfactant production : emerging trends and promising strategies. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>.
81. **Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2010).** Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3687–3704). http://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_290.
82. **Sohail, R., & Jamil, N. (2023).** Microbial Biosurfactant Screening: Diversity in Assessment Methods. *Advancements of Microbiology*, 62, 145–155. <https://doi.org/10.2478/am-2023-0013>.
83. **Soil Survey Staff (2010).** Keys to Soil Taxonomy, 11th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
84. **Stella , N. C., Clare , E. C., Gladys , A. C., Nonyelum , A. V., Nkiru, M. A., & Amaechi, E. I. (2023).** Isolation and Screening of Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated Soils in Awka, Southeast, Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 33(10), 9. <https://doi.org/10.9734/mrji/2023/v33i101407>.
85. **Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020).** *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial cell factories*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.
86. **Thakur, N., Singh, S. P., & Zhang, C. (2022).** Microorganisms under extreme environments and their applications. *Current research in microbial sciences*, 3, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100141>.
87. **Tiquia, S. M., Masson, S. A., & Devol, A. (2006).** Vertical distribution of nitrite reductase genes (*nir S*) in continental margin sediments of the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 464–475. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00173.x>
88. **Torres, M. J., Brandan, C. P., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., and Audisio, M. C. (2017).** Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*, 105, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.12.001>.
89. **Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017).** Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232, 389–397. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>.

90. **Ventosa A., Garcia M. T., Kamekura M., Onishi H. and Ruiz- Berraquero F. (1989).** *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Systematic Applied Microbiology*, 12: 162–165.
91. **Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R. T. (2015).** Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current opinion in microbiology*, 25, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.002>.
92. **Vieira, I. M. M., Santos, B. L. P., Ruzene, D. S., & Silva, D. P. (2021).** An Overview of Current Research and Developments in Biosurfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017>
93. **Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010).** Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
94. **WRB IUSS Working Group. (2007).** World Reference Base for Soil Resources 2006, first update. *World Soil Resources Reports* N°. 103. FAO, Rome.
95. **Yonebayashi, H., Yoshida, S., Ono, K., & Enomoto, H. (2000).** Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery process. *Sekiyu Gakkaishi*, 43(1), 59–69.
96. **Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004).** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>.
97. **Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., & Nakajima, K. (2005).** *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 907–911. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63488-0>.
98. **Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., Nakajima, K., & Suemori, A. (2003).** *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1531–1536. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02596-0>.
99. **Zargar, A. N., Mishra, S., Kumar, M., & Srivastava, P. (2022).** Isolation and chemical characterization of the biosurfactant produced by *Gordonia* sp. IITR100. *PloS one*, 17(4), e0264202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264202>.

Références bibliographiques

100. **Zhao, H., , Li, J., , Zhang, Y., , Lei, S., , Zhao, X., , Shao, D., , Jiang, C., , Shi, J., , & Sun, H., (2018).** Potential of iturins as functional agents: safe, probiotic, and cytotoxic to cancer cells. *Food & function*, 9(11), 5580–5587. <https://doi.org/10.1039/c8fo01523f>.
101. **Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H., & Jin, M. (2017).** Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 5951– 5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>.

Annexe

Composition des milieux de culture et solutions**Gélose nutritive**

Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	10g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000mL

pH =6,8-7,4

Bouillon Nutritif

Peptone	20.0g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	10 g
Eau distillée	1000mL

pH = 7,2 ± 0,2.

Gélose au sang

Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	02g
Chlorure de sodium	10g
Agar	20g
Eau distillée.....	1000mL
5% de sang humain	5mL

pH =6,8-7,4

Les solutions**Tampon salin**

K ₂ HPO ₄	16.9 g
KH ₂ PO ₄	7,3 g
Eau distillée	1000mL

Solution SDS 10%

SDS.....	10 g
Eau distillée	100mL

Tableau : Les hauteurs de l'émulsion et les hauteurs totales des mélanges pour les 3 substrats testés avec les différents surnageants

	LMB3051	LMB3057	LMB3073	LMB3077	LMB3088	LMB3093
Essence	he : 1,2	he : 1,2	he : 1,4	he : 1,4	he : 1	he : 1,2
	ht : 2,1	ht : 2,2	ht : 2,2	ht : 2,2	ht : 2	ht : 2,2
Huile d'olive	he : 1,4	he : 1,4	he : 1,4	he : 1,6	he : 1,5	he : 1,5
	ht : 2,4	ht : 2,3	ht : 2,3	ht : 2,5	ht : 2,5	ht : 2,5
Huile de table	he : 1	he : 1,1	he : 1,1	he : 1,3	he : 1,4	he : 1,1
	ht : 2,1	ht : 2,1	ht : 2,1	ht : 2,2	ht : 2,4	ht : 2,2

ملخص

المواد السطحية الحيوية (Biosurfactants) هي جزيئات ذات طبيعة مزدوجة المحبة للماء والدهنية، تُنتج من قبل الكائنات الدقيقة، وتُعرف بخواصها الخافضة للتوتر السطحي، وقابليتها للتحلل البيولوجي، وانخفاض سُُمِّيَّتها. تحظى هذه المركبات باهتمام متزايد لتطبيقاتها المتنوعة في المجالات الصناعية والبيئية والصيدلانية والغذائية. ويُعد جنس *Bacillus* من بين أبرز الأجناس البكتيرية المعروفة بقدرتها على إنتاج أنواع متعددة من المواد السطحية الحيوية، بما في ذلك اللبوبيبتيدات، اللبوكوليبيدات، والفوسفوليبيدات.

في هذا السياق، يهدف هذا العمل إلى دراسة قدرة ستة عزلات بكتيرية محبة للملوحة وتنتمي إلى جنس *Bacillus*، تم عزلها من النظام البيئي عالي الملوحة في السبخة الكبرى لوهران، على إنتاج المواد السطحية الحيوية. وقد تم استنبات العزلات المدروسة في وسط مغذٍ مُدعَّم بـ 10% من كلوريد الصوديوم (NaCl).

تم تطبيق عدة اختبارات غريبة على الراشح الناتج عن عملية الزرع، لتقييم إنتاج المواد السطحية الحيوية، شملت: اختبار التحلل الدموي على الوسط المغذي بالدم، واختبار انهيار القطرة (Drop Collapse)، واختبار انتشار الزيت (Oil Spreading)، واختبار الانحراف البصري في الأطباق الدقيقة، بالإضافة إلى مؤشر الاستحلاب (E₂₄) وفي نفس الوقت، تم إجراء اختبار ارتباط البكتيريا بالهيدروكربونات (BATH) باستخدام الخلايا. لتقدير الخاصية الكارهة للماء للخلايا. وأخيراً، أجريت تحاليل لونية كيميائية لتحديد الطبيعة الكيميائية الحيوية للمواد السطحية الحيوية المنتجة.

أظهرت النتائج أن جميع العزلات أبدت نشاطاً حاداً للدم، مما يدل على حدوث تحلل تام لخلايا الدم الحمراء، وهو ما يتوافق مع إنتاج المواد السطحية الحيوية. كما كشفت اختبارات انهيار القطرة، وانتشار الزيت، والانحراف البصري عن نشاط خافض للتوتر السطحي ملحوظ لدى جميع العزلات.

تجاوزت مؤشرات الاستحلاب (E₂₄) نسبة 50% لدى غالبية العزلات، مع نتائج مرتفعة بشكل خاص للعزلات LMB3077، LMB3088، وLMB3073، حتى عند تركيز ملحي مرتفع يبلغ 10% من NaCl. وأظهر اختبار BATH أن الخلايا تمتلك خاصية كارهة للماء تفوق 50%، ما يدل على ميل كبير للارتباط بالمواد الكارهة للماء.

أما التحليل الكيميائي فقد بيّن أن العزلات المختبرة تُنتج الغليوكوليبيدات، واللبوبيبتيدات، والفوسفوليبيدات، وذلك باختلاف السلالة. وتشير هذه النتائج إلى أن العزلات المدروسة، المستخرجة من بيئة غير ملوثة وذات ملوحة عالية، قادرة على إنتاج مواد سطحية حيوية مستقرة وفعالة في ظروف ملوحة قاسية، مما يمنحها إمكانيات واعدة للتطبيق في التكنولوجيا الحيوية البيئية، لا سيما في مجالات المعالجة الحيوية واستخلاص النفط في البيئات المالحة.

الكلمات المفتاحية: المواد السطحية الحيوية، البكتيريا المحبة للظروف القاسية، جنس *Bacillus*، سبخة وهران، الإمكانيات البيوتكنولوجية.

Abstract

Biosurfactants are amphiphilic molecules of microbial origin, known for their surface-active properties, biodegradability, and low toxicity. These compounds are of growing interest for various industrial, environmental, pharmaceutical, and food-related applications. The *Bacillus* genus, in particular, is renowned for its ability to produce various types of biosurfactants, including lipopeptides, glycolipids, and phospholipids.

In this context, the present study aims to explore the biosurfactant production capacity of six halotolerant bacterial strains affiliated to the *Bacillus* genus, isolated from the hypersaline ecosystem of the Great Sebkhah of Oran.

The strains were cultured in nutrient broth supplemented with 10% of NaCl. Several screening tests were applied to the culture supernatants to assess biosurfactant production: hemolysis test on blood agar, drop collapse test, oil spreading test, microplate optical distortion test, and emulsification index (E₂₄). In parallel, the Bacterial Adhesion To Hydrocarbons (BATH) test was carried out using the pellet, to estimate cell surface hydrophobicity. Finally, colorimetric analyses were conducted to characterize the biochemical nature of the biosurfactants produced.

The results showed that all isolates exhibited positive hemolytic activity, indicating complete red blood cell lysis, consistent with biosurfactant production. The drop collapse, oil spreading, and microplate tests revealed significant surface activity in all isolates. The E₂₄ emulsification indices exceeded 50% for the majority of the strains, with particularly high results for isolates LMB3077, LMB3088, and LMB3073, even at a high salinity of 10% NaCl. The BATH test showed cell hydrophobicity levels above 50%, indicating a strong affinity of the cells for hydrophobic phases. Biochemical analysis revealed the production of glycolipids, lipopeptides, and phospholipids, depending on the strain.

These findings suggest that the studied isolates, originating from an hypersaline environment, are capable of producing stable and active biosurfactants under extreme salinity conditions. This gives these compounds strong potential for environmental biotechnology applications, particularly for bioremediation or oil recovery in saline environments.

Keywords: biosurfactants, extremophilic bacteria, *Bacillus* genus, Sebkhah of Oran, biotechnological potential.

Résumé

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles d'origine microbienne, reconnues pour leurs propriétés tensioactives, leur biodégradabilité et leur faible toxicité. Ces composés présentent un intérêt croissant pour diverses applications industrielles, environnementales, pharmaceutiques et alimentaires. Le genre *Bacillus*, en particulier, est réputé pour sa capacité à produire divers types de biosurfactants, notamment les lipopeptides, glycolipides et phospholipides.

Dans ce contexte, ce travail vise à explorer la capacité de production de biosurfactants par six souches bactériennes halotolérantes affiliées au genre *Bacillus*, isolées à partir de l'écosystème hypersalin de la grande Sebkhah d'Oran.

Les souches étudiées ont été cultivées dans un bouillon nutritif supplémenté à 10 % de NaCl. Plusieurs tests de criblage ont été appliqués sur les surnageants issus de la culture, afin d'évaluer la production de biosurfactants : test d'hémolyse sur gélose au sang, test d'effondrement de goutte (drop collapse), test de diffusion d'huile (oil spreading), test de distorsion optique en microplaque et indice d'émulsion (E₂₄). En parallèle, le test d'adhérence bactérienne aux hydrocarbures (BATH) a été réalisé en utilisant le culot, pour estimer l'hydrophobicité cellulaire. Enfin, des analyses colorimétriques ont permis de caractériser la nature biochimique des biosurfactants produits.

Les résultats ont montré que l'ensemble des isolats présentent une activité hémolytique positive, indiquant une lyse complète des globules rouges, compatible avec une production de biosurfactants. Les tests drop collapse, oil spreading et microplaque ont révélé une activité tensioactive notable pour tous les isolats. Les indices d'émulsion E₂₄ ont dépassé les 50 % pour la majorité des souches, avec des résultats particulièrement élevés pour les isolats LMB3077, LMB3088 et LMB3073, même à une salinité élevée de 10 % de NaCl. Le test BATH a montré une hydrophobicité cellulaire supérieure à 50 %, traduisant une forte affinité des cellules pour les phases hydrophobes. L'analyse biochimique a mis en évidence la production de glycolipides, lipopeptides et phospholipides, selon les souches testées.

Ces résultats suggèrent que les isolats étudiés, issus d'un environnement non pollué et hypersalin, sont capables de produire des biosurfactants stables et actifs dans des conditions extrêmes de salinité. Cela confère à ces composés un fort potentiel pour des applications en biotechnologie environnementale, notamment pour la bioremédiation ou la récupération pétrolière en milieux salins.

Mots clés : biosurfactants, bactéries extrémophiles, genre *Bacillus*, Sebkhah d'Oran, potentiel biotechnologique.