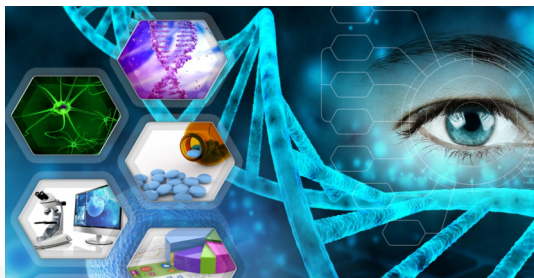


# Biotechnologie microbienne de l'environnement



Dr. NAS Fatima ep. RABEHI

Université Abou Bekr Belkaid  
-Tlemcen

Faculté SNV/STU

Département de Biologie

Email : *fatima.nas@univ-  
tlemcen.dz*

1.0

01-03-2024

# Table des matières

<b>I - Les procédés</b>	<b>3</b>
1. Introduction .....	3
2. Sélection des souches microbiennes productrices de molécules bioactives, conservation et inoculum .....	3
3. Criblage pour des molécules bioactives .....	5

# I Les procédés

## 1. Introduction

La biotechnologie microbienne s'intéresse aux microorganismes comme « outils » dans des procédés de fabrication, de transformation ou dégradation

Les microorganismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques qui se traduisent par la production de biomasse qui peut être utilisée en agroalimentaire comme des agents de saveur ou pour la transformation des matière première et la fermentation des aliments. Ils possèdent également des capacités hydrolytiques qui sont utilisés dans la dépollution des effluents urbains ou industriels. Les microorganismes sont également appliqués dans l'industrie chimique (la production des solvant), dans l'industrie pharmaceutique (production des antibiotiques, des vitamines, des acides aminés, des hormones, des antitumoraux, des anti-inflammatoires) ...

En biotechnologie microbienne, il est courant d'employer le terme fermentation pour définir la plupart des cultures et réactions microbiennes, bien qu'il ne s'agisse pas dans certains cas d'une fermentation au sens biochimique.

## 2. Sélection des souches microbiennes productrices de molécules bioactives, conservation et inoculum

Les produits microbiens d'intérêt biotechnologique comprennent :

- **Les cellules microbiennes elles mêmes** qui vont accomplir des réaction chimiques, comme exemples:
  - Les levures alimentaires destinés à la boulangerie, à la brasserie ou à la nourriture,
  - Les bactéries lactiques utilisées dans la fabrication du fromage.
- **Les métabolites élaborés par les cellules microbiennes**, comme exemples:
  - Les additifs alimentaires : aspartame
  - Les antibiotiques, les enzymes....

Les métabolites sont les produits intermédiaires du métabolisme. Il existe deux grandes classes de métabolites :

- **Les métabolites primaires** : ils sont **impliqués dans la phase de croissance** en raison du métabolisme énergétique (glucides, lipides, acides aminés, nucléotides, produits de fermentation,...). Les voies de biosynthèse sont en général simples.
  - Exemple : l'alcool (éthanol) produit pendant la fermentation avec la levure et les bactéries. La formation de l'éthanol est parallèle à la croissance.
- **Les métabolites secondaires** : Ils **ne sont pas indispensables au développement de l'organisme**, et n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale. Ils s'accumulent pendant

la période qui suit la phase de croissance active. Les voies de biosynthèse complexes et longues, spécifiquement à une espèce voire à une souche microbienne.

- Exemple : antibiotiques, toxines, enzymes.

### *Critères de sélections des souches microbiennes*

Les performances d'une culture en vue de la production des molécules bioactives dépend de la capacité d'atteindre certains objectifs majeurs (capacité technologique)

- Obtenir une croissance efficace qui permet d'aboutir une quantité importante de biomasse dans un état physiologique compatible avec la production.
- Maintenir la biomasse dans les conditions de production optimales le plus longtemps possible.
- Veiller à ce que les étapes de croissance et de production, ainsi que les étapes d'extraction et de purification, soient les moins coûteuses possibles.

La **souche de production** est le facteur le plus crucial pour le succès de tout procédés biotechnologiques entrepris. Elle doit présenter les propriétés suivantes

- avoir une croissance rapide et à grande échelle
- production des métabolites à grande échelle sur un intervalle de temps court
- croissance sur des milieux de culture disponibles et bon marché (non exigeante)
- avoir des propriétés biochimiques stables
- facile à manipuler génétiquement
- non pathogène et sans production de sous-produits nocifs

### *Moyens d'obtention des souches microbiennes*

Il y a deux moyens d'obtentions des microorganismes

Soit les obtenir déjà isolées et purifiées à partir des collections de microorganismes (ATCC ou IP) , ces collections fournissent des souches pour l'enseignement, la recherche et l'industrie.

Soit les isoler à partir des habitats naturelles (sol, eau, matières organiques...). Pour cela, il faut envisager des moyens rapides et efficaces pour les isoler en utilisant des techniques reposant sur la combinaison en une seule étape **l'isolement** de la souche et **la mise en évidence de la propriété recherchée** (*Techniques de screening ou le criblage*)

### *Conservation des souches*

La conservation des souches microbienne a pour objectifs de

- garder leurs pureté
- garder les cultures vivantes sans multiplication
- conserver leurs propriétés d'origine

Deux facteurs sont pris en considération lors de la sélection d'une méthode de conservation pour une culture donnée.

- La durée de conservation souhaitée (conservation à court terme et à long terme)
- La nature de la culture à préserver

## Préparation de l'inoculum

En microbiologie, l'inoculum est un échantillon du matériel contenant des microorganismes utilisée pour initier une culture.

Pour la biotechnologie, l'inoculum constitue l'ensemble de la biomasse nécessaire pour ensemer un fermenteur de production de grande capacité.

Le nombre de cellules microbiennes ou de spores utilisés pour inoculer de grandes quantités de milieu de production dans un fermenteur doit être suffisant pour compléter la fermentation en un minimum de temps.

## 3. Criblage pour des molécules bioactives

Plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre pour le criblage des molécules bioactives , en effet, on adapte la technique selon l'activité biologique recherchée

### 💡 *Fondamental : Stratégies de criblages des antimicrobiens*

Pour le criblage des antimicrobiens, la technique adaptée dépend du fait d'utiliser directement la souche (**Tests d'antagonisme**) ou bien l'extrait après sa production sur le milieux de culture et son extraction.

Dans le cas d'utilisation de la souche d'intérêt directement, parmi les techniques les plus réalisées :

- La technique de cylindre d'agar
- La technique de stries croisées

Dans le cas d'utilisation des extraits, des surnageants ou de filtrats, les techniques les plus utilisées sont :

- La technique des puits
- La technique des disques en papier
- La technique d'empoisonnement du milieu de culture

## ⚙ Méthode : Technique de cylindre d'agar (Agar plug diffusion method)

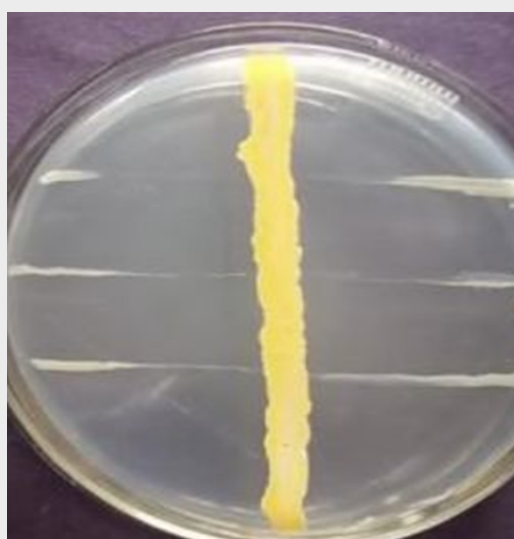


Technique de cylindre d'agar (Agar plug diffusion method)

### Principe

- Ensemencer la souche d'intérêt en stries serrées sur le milieu gélosé adéquat,
- Incuber à température et temps idéaux pour sa croissance
- Prélever de cylindres d'agar de 6 mm de diamètre à l'aide d'un emporte pièce, et les déposer à la surface du milieu gélosé (Muller Hinton , Sabouraud) préalablement ensemencé par les germes test,
- Maintenir les boîtes à 4 °C pendant 2h avant l'incubation
- Incuber à température et temps idéaux pour les germes test et mesurer les zones d'inhibition formées (24h à 37 °C pour les bactéries et 48 à 72 h à 25 °C pour les champignons).

## ⚙ Méthode : Technique de stries croisées (Cross streak method)



Technique de stries croisées (Cross streak method)

### Principe

- Ensemencer la souche d'intérêt en un seul strie sur le milieu gélosé adéquat,
- Incuber à température et temps idéaux pour permettre la croissance (et production)
- Ensemencer les germes cibles en stries perpendiculaires (sur la même boîte),
- Incuber à température et temps idéaux pour les germes cibles
- Mesurer les zones d'inhibition formées entre les bords de strie du souche productrice et des stries des germes cibles

## ⚙ Méthode : Technique des puits (Agar well diffusion method)

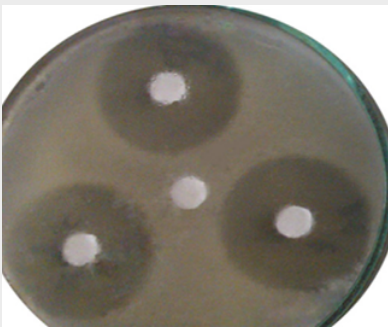


Technique des puits (Agar well diffusion method)

### Principe

- Ensemencer germes cibles en stries serrées à la surface du milieu gélosé adéquat,
- Creuser des puits (6 mm de diamètre) dans la gélose à l'aide d'un emporte pièce
- Remplir les puits avec (50-100  $\mu$ L) du surnageant, l'extrait ou le filtrat
- Maintenir les boîtes à 4 °C pendant 2h avant l'incubation
- Incuber à température et temps idéaux pour les germes cibles
- Mesurer les diamètres zones d'inhibition formées.

## ⚙ Méthode : Technique des disques en papier (disc diffusion method)

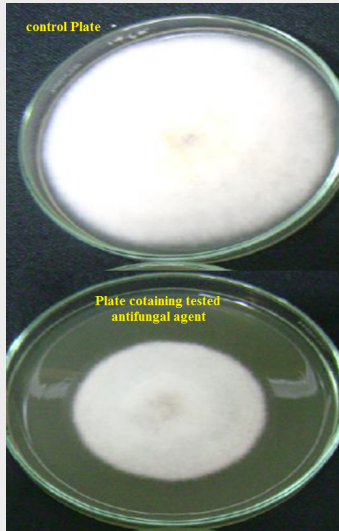


Technique des disques en papier (disc diffusion method)

### Principe

- Imbiber des disques de papier Whatman (N1) préalablement stérilisés à l'aide d'une micropipette et laisser sécher.
- Déposer les disques chargés, aseptiquement, à la surface de la gélose préalablement ensemencées par les germes cibles
- Maintenir les boîtes à 4 °C pendant 2h avant l'incubation
- Incuber à température et temps idéaux pour les germes cibles
- Mesurer les diamètres zones d'inhibition formées.

## ⚙️ Méthode : Technique d'empoisonnement du milieu de culture (Poisoned food method)



Technique d'empoisonnement du milieu de culture (Poisoned food method)

### Principe

Elle est principalement utilisée pour évaluer l'effet antifongique contre les moisissures

- Incorporer le surnageant (filtrat ou extrait) dans la gélose en surfusion à une concentration déterminée.
- Homogénéiser, puis verser le milieu dans des boîtes de Pétri.
- Inoculer la gélose par un disque de mycélium (5 mm de  $\Phi$ ) en le déposant au centre de la plaque.
- Inoculer une boîte contrôle (gélose sans surnageant) par un disque de mycélium de la même culture.
- Incuber dans des conditions adaptées à la souche fongique testée.
- Mesurer les diamètres de croissance fongique dans les boîtes de contrôle et d'échantillon.
- L'effet antifongique est estimé par le taux d'inhibition de la croissance mycélienne (%) selon la formule suivante :  $T = (Dc - Ds) 100 / Dc$ 
  - $T$  : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne en %.
  - $Dc$  : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne sur la boîte contrôle
  - $Ds$  : Le diamètre (en mm) de la zone de la croissance mycélienne sur la boîte contenant le surnageant

## 💡 Fondamental : Stratégies de criblages des enzymes

Les enzymes sont induites par la **présence d'un substrat**, de ce fait, les microorganismes producteurs d'enzymes sont recherchés dans les habitats où les substrats à hydrolyser sont abondants

### Exemple:

- Les microorganismes producteurs de cellulases sont recherchés dans les sols forestiers riches en cellulose.
- Les producteurs de lactase dans les produits laitiers

## ⚙️ Méthode

Pour mettre en évidence l'activité enzymatique d'une souche, il faut utiliser des milieux gélosés contenant le substrat spécifique de l'enzyme.

On peut utiliser :

- Directement, la souche isolée (ensemencement par spot ou en une seule strie).
- L'extrait enzymatique obtenu d'une culture sur milieu liquide en utilisant les techniques **des puits** ou des **disques en papier**.



### Remarque

---

L'extrait enzymatique peut être obtenu :

- Soit après centrifugation de la culture (le surnageant) ou après filtration (le filtrat) dans le cas où l'enzyme est **extracellulaire**
- Soit en récupérant les cellules après destruction (chimique, physique ou enzymatique) dans le cas où l'enzyme est **intracellulaire**