

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Ghardaia



*Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre*

**Département de Biologie**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER**

En : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : -HARROUZI Toufik  
-BENSEMAOUNE Otmane

**Thème**

**Contribution à l'étude des *Bacillaceae* extrêmophiles isolés du sol rhizosphérique du palmier dattier de la région de Metlili W.Ghardaïa.**

Soutenu publiquement, le 22 /06 /2019 , devant le jury composé de :

M. BELGHIT Said.	Maitre de conférences B	Univ. Ghardaïa	Président
M. BOURAS Noureddine.	Professeur	Univ. Ghardaïa	Directeur de mémoire
M. IDER Sofiane	Maitre-Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur

**Année universitaire : 2018-2019**

## Remerciements

Tout d'abord, merci à Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force pour réaliser et accomplir ce travail.

Nous tenant également à présenter nos vifs remerciements à :

- Monsieur Professeur BOURAS Nouredine, à qui nous témoignons notre profonde gratitude d'avoir accepté l'encadrement de ce mémoire, nous avons eu vraiment un grand honneur de travailler sous sa direction.
- Monsieur BELGHIT Said, Maître de conférences classe B à l'université de Ghardaïa pour l'honneur d'accepter de présider ce jury.
- Monsieur IDER Sofiane Maître assistant classe A à l'université de Ghardaïa, d'avoir accepté d'examiner notre travail.
- M<sup>lle</sup>. DJMOUAI Nadjet pour leurs aides à réaliser ce travail.
- Monsieur KRIMAT Mohammed et ses étudiants (MEHAYA A. ; DJAANI H.) et (CHENINI S. ; EL GAROUI F. )
- M<sup>elle</sup> TELLI Alia et ses étudiants (TEGGAR M. ; GUESSOUM N.) pour leurs aides, leurs orientations et leurs conseils.
- Le responsable du magasin des laboratoires pédagogiques de l'université de Ghardaïa M. BEN HAMMOUDA Hicham pour sa gentillesse et sa patience.
- Les responsables des laboratoires de la faculté SNV-ST pour leurs aides et leurs orientations (MOULAY OMAR, MESSAITEFA, MOUALY ABDALLAH, GHEZAIL, HADJ KOUIDER ...).
- Le responsable du laboratoire des analyses médicales ESSALAM-Ghardaïa M.DAOUDI Yacine.
- Les personnels du laboratoire des analyses médicales de la clinique des Oasis à Ghardaïa.
- Tous les enseignants de la faculté et surtout de la spécialité Biochimie appliquée.
- Tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.
- Tous les amis(es) et les collègues de Biochimie appliquée et Ecologie et environnement de l'université de Ghardaïa.

*Merci ...*

# DEDICACE

*Je dédie ce travail :*

*A*

*Mes très chers parents*

*En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect que le Dieu les protège.*

*A*

*Les esprits de mes grandes pères et grandes mères, ma tante et mes oncles Djelloul et Semmane.*

*A*

*A mes très chers frères : Brahim et Youcef et ma très chère sœur et leurs familles sans exception.*

*A*

*Mon très cher frère Smail que Dieu le protège.*

*A*

*Tous les membres de la famille Ben Semaoune, Moulay Abdallah et Hamdane.*

*A*

*Tous mes amis(es) et mes collègues du travail.*

*Otmane*

# DEDICACE

*Je dédie ce travail :*

*A*

*Ma très cher Maman*

*En témoignage de mon profond amour et mon plus grand respect que le Dieu la protège.*

*A*

*Les esprits de ma grande mère, mes tantes et mes oncles.*

*A*

*A mes très chers amis : TOUFIK et MOHAMED DAOUDI et MOHAMED HANI et HAROUN et BRAHIM et leurs familles sans exception.*

*A*

*Ma très chère sœur AHLEM que Dieu la protège.*

*A*

*Tous les membres de la famille Harrouzi et Hani.*

*A*

*Tous mes amis(es) sans exception.*

*Toufik*

## Résumé :

L'étude des bactéries extrêmophiles fournit de nouvelles clés à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et connaître les différents mécanismes développés pour les supporter. Selon les conditions extrêmes, les microorganismes extrêmophiles peuvent être : thermophiles, halophiles, psychrophiles, alcalophiles, acidophiles ou piézophiles ou d'être polyextrêmophiles pour deux ou plusieurs facteurs.

Notre objectif est d'isoler des bactéries extrêmophiles appartenant à la famille des *Bacillaceae*, à partir du sol saharien de la région de Metlili (Sabkha), et étudier leur tolérance à différentes conditions de culture : salinité et température. Deux souches bactériennes thermophiles ont été isolées à 60 °C sur gélose nutritive après un traitement thermique dans un autoclave pendant 10 min à 120 °C pour éliminer toutes les formes végétatives. Les deux souches ont été choisies pour l'étude physiologique, biochimique et phylogénétique.

Les souches isolées N19 et B19 se présentent sous une forme de bâtonnet, mobile, à Gram positif, aérobic stricte, capable de former des endospores. Par ailleurs, elles sont tolérantes à des concentrations de NaCl de 0-4 % (p/v), aux pH de 5-9, et à des différentes valeurs de températures de 25-70°C.

L'identification biochimique des isolats par les tests classiques a montré qu'elles sont catalase positive, oxydase positive et ensuite par les galeries API 20E et API 50CHB, et après le traitement des résultats obtenues par les 2 programmes : *Excel Identification Program (EIP)*, et *ABIS online*, les résultats montrent que les souches appartiennent à différents types des espèces de *Bacillus* telle que (*Bacillus firmus*, *Bacillus cereus* 'groupe 2') et comme (*Brevibacillus brevis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus smithii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*) avec de pourcentage ou de probabilité différent.

Afin de bien identifier ces souches B19, N19, nous avons réalisé l'étude moléculaire pour les deux souches, par séquencer la partie génomique d'ADN 16S, et après traitement des résultats obtenues par le programme MEGA X, nous avons constaté que le pourcentage de similarité est de 98,9 % pour les deux souches avec l'espèce la plus proche *Geobacillus caldxylosilyticus*.

**Mots clés :** extrêmophiles, isolement, *Geobacillus*, identification moléculaire, *Bacillus*.

**Abstract:**

The study of extremophilic bacteria provides new keys to understanding the processes of life in extreme conditions and knows the different mechanisms developed to support them. Depending on the extreme conditions, extremophilic microorganisms may be: thermophilic, halophilic, psychrophilic, alkalophilic, acidophilic or piezophilic or polyextremophilic for two or more factors.

Our goal is to isolate extremophilic bacteria belonging to the *Bacillaceae* family, from the Saharan soil of Metlili region (Sabkha), and study their tolerance to different culture conditions: salinity and temperature. Two thermophilic bacterial strains were isolated at 60 ° C on nutrient agar medium after thermal treatment in an autoclave for 10 min at 120 ° C to remove all vegetative forms. Both strains were chosen for physiological, biochemical and phylogenetic study.

The isolated strains N19 and B19 are in the form of rods, mobile, Gram-positive, aerobically strict, capable of forming endospores. In addition, they are tolerant to concentrations of NaCl 0-4% (w / v), at pH 5-9, and at different temperature values 25-70 ° C.

The biochemical identification of the isolates by the classical tests showed that they are catalase positive, oxidase positive and then by the galleries API 20E and API 50CHB, and after the treatment of the results obtained by the 2 programs: Excel Identification Program (EIP) and ABIS online, the results show that the strains belong to different types of *Bacillus* species such as (*Bacillus firmus*, *Bacillus cereus* 'group 2') and as (*Brevibacillus brevis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus smithii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*) with percentage or different probability.

In order to clearly identify these strains B19, N19, we realized the molecular study for both strains, by sequencing the genomic portion of 16S DNA, and after processing the results obtained by the MEGA X program, we found that the percentage of similarity is 98.9% for both strains with the closely related species *Geobacillus caldoxylosilyticus*.

**Key words:** extremophiles, isolation, *Geobacillus*, molecular identification, *Bacillus*.

## ملخص:

توفر دراسة البكتيريا المحبة للأوساط القاسية مفاتيح جديدة لفهم عمليات الحياة في الظروف القاسية ومعرفة الآليات المختلفة التي تم تطويرها لتحملها. اعتمادًا على هاته الظروف القاسية، قد تكون الكائنات المجهرية شديدة القساوة: محبة للحرارة، محبة للملوحة، محبة للبرودة، محبة للأوساط القلوية، محبة للأوساط الحامضية أو محبة للأوساط ذات الضغط الجوي العالي أو متعددة التحمل لعاملين أو أكثر.

هدفنا هو عزل البكتيريا المحبة للأوساط القاسية التي تنتمي إلى عائلة العصويات، من تربة صحراوية في منطقة متليلي (السبخة) ، ودراسة مدى تحملها لمختلف ظروف الزراعة : الملوحة ودرجة الحرارة. تم عزل سلالتين من البكتيريا عند 60 درجة مئوية على وسط أجار مغذي بعد المعالجة الحرارية في الصاد الموصد لمدة 10 دقائق عند 120 درجة مئوية لإزالة جميع الأشكال الخضرية. تم عزل كلتا السلالتين للدراسة الفسيولوجية والكيميائية والجزئية.

السلالات المختارة N19 و B19 ظهرت في شكل عصيات، متحركة، موجبة الجرام، هوائية إجباريا، قادرة على تشكيل الأبواغ الداخلية. بالإضافة إلى ذلك ، تتحمل تراكيز كلوريد الصوديوم : 0-4٪ (وزن / حجم)، درجات pH: 5-9، درجات حرارة مختلفة 25-70 درجة مئوية].

أظهر التعرف الكيميائي الحيوي للعزلات من خلال الاختبارات الكلاسيكية أنها ذات catalase موجب، و oxydase موجب، ثم بواسطة مجموعة API 20E و API 50CHB ، وبعد معالجة النتائج التي تم الحصول عليها بواسطة البرنامجين *Excel Identification Program (EIP)* ، *ABIS online* ، توضح النتائج أن السلالات تنتمي إلى أنواع مختلفة من أنواع *Bacillus* مثل : (*Bacillus firmus*, *Bacillus cereus* 'groupe 2') و مثل (*Brevibacillus brevis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus smithii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*) و ذلك بنسب واحتمالات مختلفة.

من أجل تحديد انتماء هاتين السلالتين B19 و N19 بدقة، قمنا بتحليل الحمض النووي الخاص بهما، من خلال تسلسل الجزء الجيني من الحمض النووي S 16، وبعد معالجة النتائج التي حصل عليها برنامج MEGA X ، وجدنا أن نسبة التشابه والتطابق هي 98.9 ٪ لكلا السلالتين لأقرب الأنواع البكتيرية وهي *Geobacillus caldoxylosilyticus* .

**الكلمات المفتاحية:** المحبة للأوساط القاسية، العزل، *Geobacillus*، التحديد الجزيئي، *Bacillus*.

## LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
<b>1</b>	phylogénie des <i>Bacillus</i> de séquences du gène de l'ARN <sub>R</sub> 16s	<b>15</b>
<b>2</b>	Localisation du site d'échantillonnage : la région de Metlili (Sabkha) (Google Earth)	<b>17</b>
<b>3</b>	Protocole de dosage de la matière organique.	<b>19</b>
<b>4</b>	Ensemencement des solutions (10 <sup>-1</sup> ) mères et les dilutions (10 <sup>-2</sup> et 10 <sup>-3</sup> ) sur milieu GN.	<b>21</b>
<b>5</b>	Représentation schématique de la méthode de micro-dilution.	<b>25</b>
<b>6</b>	Protocole de Lorck (1948).	<b>26</b>
<b>7</b>	Détermination de type respiratoire sur milieu viande foie (Prescott, 2002).	<b>28</b>
<b>8</b>	Représentation schématique des résultats de la CMI.	<b>42</b>
<b>9</b>	Résultats d'identification de la souche B19 par <i>Excel Identification Program</i> .	<b>55</b>
<b>10</b>	Résultats d'identification par Excel Identification Program de la souche B19.	<b>55</b>
<b>11</b>	Résultats d'identification par <i>ABIS online</i> de deux souches B19 et N19.	<b>56</b>
<b>12</b>	Capture d'écran de 10 meilleurs résultats d'alignement de la souche B19 sur le site <i>EzBioCloud</i> .	<b>57</b>
<b>13</b>	Capture d'écran de 10 meilleurs résultats d'alignement de la souche N19 sur le site <i>EzBioCloud</i>	<b>58</b>
<b>14</b>	Dendrogramme indiquant la position des souches B19 basée sur leurs séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X	<b>59</b>
<b>15</b>	Dendrogramme indiquant la position des souches N19 basée sur leurs séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X	<b>59</b>
<b>16</b>	Dendrogramme de la position taxonomique de deux souches de <i>Geobacillus</i> isolées (B19 et N19) basé sur les séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X.	<b>60</b>



## LISTE DES PHOTOS

Photo N°	Titre	Page
<b>1</b>	Aspects macroscopiques de deux souches (B19 et N19) isolées sur GN après 9 jours d'incubation à 60°C (Photo prises avec un Smartphone : Condor P6 pro LTE).	<b>38</b>
<b>2</b>	Aspect microscopique de les souches sélectionnées <b>B19</b> et <b>N19</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	Exemple de résultat d'antibiogramme de la souche N19 et B19 vis-à-vis de différent antibiotiques	<b>42</b>
<b>4</b>	Résultat de test CMI pour la souche B19	<b>43</b>
<b>5</b>	Aspect de résultat positif (HCN+) obtenu pour les souches B19 et N19.	<b>43</b>
<b>6</b>	Résultat négatif de la solubilisation du phosphate inorganique obtenu pour les souches B19 et N19.	<b>44</b>
<b>7</b>	Résultat de test de la catalase.	<b>45</b>
<b>8</b>	Résultat du test d'oxydase.	<b>45</b>
<b>9</b>	Résultat de la recherche du type respiratoire (VF).	<b>46</b>
<b>10</b>	Résultat de la culture en anaérobiose.	<b>46</b>
<b>11</b>	Résultat de l'inoculation des galeries API 20E par les souches N19 et B19 après une incubation de 24 h à 37°C.	<b>48</b>
<b>12</b>	Résultat de l'inoculation de la galerie API 50 CHB par la souche N19 et B19 après incubation à 30°C pendant 48 heures (en oxydation).	<b>51</b>
<b>13</b>	Résultat de l'inoculation de la galerie API 50 CHB par la souche N19 et B19 après incubation à 30°C pendant 48 heures (en fermentation).	<b>51</b>
<b>14</b>	Test de Gélatinase.	<b>52</b>
<b>15</b>	Test d'amylase pour les deux souches N19 et B19.	<b>52</b>
<b>16</b>	Aspect de la souche B19 sur milieu RCV-saccharose.	<b>53</b>
<b>17</b>	Résultat de la culture en milieu Bushnell and Haas (BH).	<b>54</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
<b>1</b>	Les produits de la fermentation industrielle par les espèces <i>Bacillus</i>	<b>13</b>
<b>2</b>	Lecture de la galerie API 20 <sup>E</sup> .	<b>29</b>
<b>3</b>	Résultats des analyses physico-chimiques du sol.	<b>37</b>
<b>4</b>	Les résultats de l'isolement de différentes conditions.	<b>37</b>
<b>5</b>	Aspect macroscopique de B19 et N19 isolées à 60°C.	<b>38</b>
<b>6</b>	Résultats de la croissance de B19 et N19 sur milieu GN solide à différentes températures (avec un pH = 7 et [NaCl] = 0,3%).	<b>39</b>
<b>7</b>	Résultats obtenus lors du test de variation du pH de B19 et N19 sur un milieu GN solide (à T = 60°C et [NaCl] = 0,3%).	<b>40</b>
<b>8</b>	Résultats obtenus lors du test de variation du [NaCl] de B19 et N19 sur milieu GN solide (à T = 60°C et pH = 7).	<b>40</b>
<b>9</b>	Résultats de l'antibiogramme.	<b>41</b>
<b>10</b>	Résultats des tests biochimiques de la plaque API 20 <sup>E</sup> de les souches N19 et B19.	<b>47</b>
<b>11</b>	Résultats de tests biochimiques dans la plaque API CH50 en oxydation de la souche B19 après incubation à 37° C après 24h et 48h.	<b>49</b>
<b>12</b>	Résultats de tests biochimiques dans la plaque API CH50 en oxydation de la souche N19 après incubation à 37° C pendant 24h et 48h.	<b>50</b>
<b>13</b>	Résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques	<b>52</b>
<b>14</b>	Résultats de screening des métabolites secondaires de la souche B19.	<b>53</b>
<b>15</b>	Résultats des paramètres de Dégradation des hydrocarbures (Gasoil) et sécrétion des biosulfactants.	<b>54</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Symbole / unité</b>	<b>Signification</b>
%	Pourcentage
°C	Degré celsius
<i>ABIS</i>	<i>Advanced Bacterial Identification Software (online)</i>
ADH	Arginine dihydrolase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AEFB	<i>Aerobic, Endospore-Forming Bacteria</i>
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
API 20 <sup>E</sup>	analytical profile index 20 <sup>E</sup> : <i>enterobacteriaceae</i>
API 50 CHB	analytical profile index 50 : <i>Bacillus</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ARN <sub>R</sub> 16S	l'ARN ribosomique 16S
ATCC	American Type Culture Collection
BH	Bushnell and Haas
<i>BIPWin</i>	<i>Bacterial Identification Program</i>
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
BN	bouillon nutritif
C.O	Carbone organique
CE	la conductivité électrique
Clustal	multiple alignement program
ClustalW	CLUSTAL with a command line interface
cm	Centimètre
CMI ou MIC	Concentration Minimale Inhibitrice
dS/m	déci-siemens par mètre
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
<i>EIP</i>	<i>Excel Identification Program</i>
<i>EMBL</i>	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EPS	Exopolysaccharides
G+C%	pourcentage des bases azotés Guanine et Cytosine dans l'ADN
GEL	Gélatine
GLU	Glucose
GN	gélose nutritive
HCN	le cyanure d'hydrogène
INT	Iodonitrotétrazolium chloride
L	Litre
LDC	lysine décarboxylase
m	Mètre
MAL	Maltose

MAN	Mannitol
MCL	Composite Likelihood
MH	Muller Hinton
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
MO	matière organique
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ODC	ornithine décarboxylase.
ONPG	Orto-nitro-phényl-β-D- galactopyranoside
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentiel d'hydrogène
PTC	Phosphate tricalcique
PVK	Pikovskaya
q.s.p	Quantité suffisante pour
<i>RDP</i>	<i>Ribosomal Database Project</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RM	<i>Rouge de méthyle</i>
Rpm	Rotation par minute
sp.	Espèce
<i>Staph</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Staph aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ufc	Unité formant une colonie
<i>UniProt</i>	<i>Universal Protein Resource</i>
v/v	rapport volume/volume
VF	Viande foie
VP	Voges-Proskauer
μL	Microlitre

# SOMMAIRE

	Page
<b>AVANT-PROPOS</b>	
<b>DEDICACES</b>	
<b>RESUME</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>LISTE DES FIGURES</b>	
<b>LISTE DES PHOTOS</b>	
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	
<b>SOMMAIRE</b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>01</b>
<b>CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1- Sol</b>	<b>04</b>
<b>1-1- Diversité bactérienne</b>	<b>04</b>
<b>1-2- Caractéristiques physico-chimiques</b>	<b>05</b>
<b>1-2-1- Teneur en eau</b>	<b>05</b>
<b>1-2-2- Température</b>	<b>05</b>
<b>1-2-3- pH</b>	<b>06</b>
<b>1-2-4- Conductivité électrique</b>	<b>06</b>
<b>1-2-5- Dosage de carbone organique</b>	<b>06</b>
<b>2- Extrêmophiles</b>	<b>07</b>
<b>2-1- Bactéries dans les environnements extrêmes</b>	<b>08</b>
<b>2-2- Bactéries extrêmophiles</b>	<b>08</b>
<b>2-3- Bactéries thermophiles et hyperthermophiles</b>	<b>08</b>
<b>2-4- Endospore</b>	<b>08</b>
<b>2-4-1- Structure des endospores</b>	<b>09</b>
<b>2-4-2- Sporulation</b>	<b>09</b>
<b>2-4-3- Germination</b>	<b>10</b>
<b>2-4-4- Thermorésistance</b>	<b>10</b>
<b>2-4-5- Importance des bactéries sporulées</b>	<b>10</b>
<b>3- <i>Bacillales</i></b>	<b>11</b>
<b>3-1- Caractéristiques des <i>Bacillales</i></b>	<b>11</b>
<b>3-2- Classification des <i>Bacillales</i></b>	<b>11</b>
<b>3-3- Ecologie des <i>Bacillales</i></b>	<b>11</b>
<b>3-4- Pouvoir pathogène des <i>Bacillales</i></b>	<b>12</b>
<b>3-5- Intérêts biotechnologique des <i>Bacillales</i></b>	<b>12</b>
<b>3-6- Phylogénie des <i>Bacillales</i></b>	<b>14</b>

<b>CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
<b>1- Site d'isolement</b>	<b>17</b>
<b>2- Prélèvement des échantillons</b>	<b>17</b>
<b>3- Caractéristiques physico-chimiques du sol</b>	<b>17</b>
<b>3-1- Teneur en eau (Taux d'humidité%)</b>	<b>17</b>
<b>3-2- pH</b>	<b>18</b>
<b>3-3- Conductivité électrique</b>	<b>18</b>
<b>3-4- Dosage de carbone organique</b>	<b>18</b>
<b>4- Appareillage</b>	<b>20</b>
<b>5- Produits chimiques et milieux de culture</b>	<b>20</b>
<b>5-1- Produits chimiques</b>	<b>20</b>
<b>5-2- Milieux de culture</b>	<b>20</b>
<b>6- Isolement des <i>Bacillales</i></b>	<b>20</b>
<b>6-1- Préparation des dilutions décimales</b>	<b>20</b>
<b>6-2- Traitement thermique des échantillons</b>	<b>20</b>
<b>6-3- Ensemencement et conditions de culture</b>	<b>20</b>
<b>7- Purification et conservation</b>	<b>21</b>
<b>8- Identification phénotypique</b>	<b>21</b>
<b>8-1- Caractéristiques morphologiques</b>	<b>21</b>
<b>8-1-1- Aspect macro-morphologique</b>	<b>21</b>
<b>8-1-2- Aspect micro-morphologique</b>	<b>22</b>
<b>8-1-2-1- Examen à l'état frais</b>	<b>22</b>
<b>8-1-2-2- Coloration de Gram</b>	<b>22</b>
<b>8-2- Caractéristiques physiologiques</b>	<b>22</b>
<b>8-2-1- Effet de la concentration en NaCl</b>	<b>23</b>
<b>8-2-2- Effet du pH</b>	<b>23</b>
<b>8-2-3- Effet de la température</b>	<b>23</b>
<b>8-2-4- L'antibiogramme</b>	<b>23</b>
<b>8-2-5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)</b>	<b>24</b>
<b>8-2-6- Production de cyanure d'hydrogène</b>	<b>26</b>
<b>8-2-7- Solubilisation du phosphate sur le milieu solide</b>	<b>26</b>
<b>8-3- Caractéristiques biochimiques</b>	<b>27</b>
<b>8-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires</b>	<b>27</b>
<b>8-3-1-1- Recherche de la catalase</b>	<b>27</b>
<b>8-3-1-2- Recherche de l'oxydase</b>	<b>27</b>
<b>8-3-2- Type respiratoire</b>	<b>27</b>
<b>8-3-3- Culture en anaérobiose</b>	<b>28</b>
<b>8-3-4- Galerie API 20<sup>E</sup> (Bio Mérieux)</b>	<b>28</b>
<b>8-3-5- Galerie API 50 CH (Bio Mérieux)</b>	<b>29</b>
<b>8-3-6- Mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires</b>	<b>30</b>
<b>8-3-6-1- Recherche de l'Amylase</b>	<b>30</b>
<b>8-3-6-2- Recherche de la Gélatinase</b>	<b>30</b>

<b>8-3-7- Mise en évidence de métabolites secondaires</b>	<b>30</b>
<b>8-3-8- Production des Exopolysaccharides</b>	<b>33</b>
<b>8-3-9- Capacité de dégradation des hydrocarbures (Gasoil) (Sécrétion des biosulfactants)</b>	<b>33</b>
<b>8-4- Tentative d'identification de l'espèce bactérienne</b>	<b>34</b>
<b>8-4-1- Identification par <i>Excel Identification Program</i> (EIP)</b>	<b>34</b>
<b>8-4-2- Identification par <i>Advanced Bacterial Identification Software</i> (ABIS <i>online</i>)</b>	<b>34</b>
<b>9- Identification génotypique</b>	<b>34</b>
<b>9-1- Séquençage d'ADN ribosomique 16S</b>	<b>34</b>
<b>9-2- Analyse phylogénétique</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>1- Résultats d'analyses physico-chimiques</b>	<b>37</b>
<b>2- Résultats de l'isolement</b>	<b>37</b>
<b>3- Résultats de l'identification phénotypique</b>	<b>38</b>
<b>3-1- Résultats de l'identification morphologiques</b>	<b>38</b>
<b>3-1-1- Aspect macroscopique</b>	<b>38</b>
<b>3-1-2- Aspect microscopique</b>	<b>38</b>
<b>3-1-2-1- Examen à l'état frais</b>	<b>38</b>
<b>3-1-2-2- Coloration de Gram</b>	<b>38</b>
<b>3-2- Résultats des tests physiologiques</b>	<b>39</b>
<b>3-2-1- Effet de la température</b>	<b>39</b>
<b>3-2-2- Effet du pH</b>	<b>40</b>
<b>3-2-3- Effet de la concentration en NaCl</b>	<b>40</b>
<b>3-2-4- Résultats de L'antibiogramme</b>	<b>41</b>
<b>3-2-5- Détermination de CMI</b>	<b>42</b>
<b>3-2-6- Production de cyanure d'hydrogène</b>	<b>43</b>
<b>3-2-7- Solubilisation du phosphate sur le milieu solide</b>	<b>44</b>
<b>3-3- Résultats des tests biochimiques</b>	<b>44</b>
<b>3-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires</b>	<b>44</b>
<b>3-3-1-1- Recherche de la catalase (test de catalase)</b>	<b>44</b>
<b>3-3-1-2- Recherche d'oxydase (test d'oxydase)</b>	<b>45</b>
<b>3-3-2- Type respiratoire</b>	<b>45</b>
<b>3-3-3- Culture en anaérobiose</b>	<b>46</b>
<b>3-3-4- Résultats de la galerie API 20<sup>E</sup></b>	<b>47</b>
<b>3-3-5- Résultats de la galerie API CH 50</b>	<b>48</b>
<b>3-3-6- Résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques</b>	<b>52</b>
<b>3-3-7- Résultats de criblage chimique</b>	<b>53</b>
<b>3-3-8- Production des Exopolysaccharides</b>	<b>53</b>
<b>3-3-9- Dégradation des hydrocarbures(Gasoil) (Sécrétion des biosulfactants)</b>	<b>54</b>
<b>4- Tentative d'identification de l'espèce bactérienne</b>	<b>55</b>
<b>4-1- Identification par <i>Excel Identification Program</i> (EIP)</b>	<b>55</b>
<b>4-2- Identification par <i>Advanced Bacterial Identification Software</i> (ABIS)</b>	<b>55</b>

<b>online)</b>	
<b>5- Résultats de l'étude moléculaire</b>	<b>56</b>
<b>5-1- Analyse phylogénétique</b>	<b>58</b>
<b>6- Discussion</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>69</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>72</b>
<b>ANNEXES</b>	



# **INTRODUCTION**

L'étude des bactéries telluriques a longtemps été limitée à la capacité des bactériologistes à recréer *in vitro* des conditions optimales à la croissance microbiennes. Généralement, il est admis que moins de 10% de la microflore environnementale est accessible en culture au laboratoire (Anne, 2005). Le développement des techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de la molécule d'ARN ribosomique 16S a permis de d'identifier les bactéries d'un environnement donné. De plus, de nouveaux taxons ont été découverts, c'est le cas par exemple des écosystèmes extrêmes (sol, sédiments, etc.). Par conséquent, les caractéristiques écologiques et physiologiques de ces bactéries restent encore à élucider. Or, il est particulièrement difficile de simuler au laboratoire les conditions physico-chimiques d'écosystèmes extrêmes tels que les sols sahariens.

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols désertiques et les sources chaudes, exploitées pour leurs bienfaits, notamment thérapeutiques. Cependant, ces écosystèmes n'ont été que très peu étudiées d'un point de vue biodiversité, et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser à l'isolement de ces bactéries à partir ces environnements extrêmes locaux et les recherches publiés concernant le sujet sont encore très rares (Bouanane-Darenfed *et al.*, 2011).

Parmi les bactéries de la flore microbienne variée dans le sol, les bactéries sporulées (les *Bacillales*). La majorité d'entre elles sont des saprophytes du sol, constituent un groupe de bactéries qui est d'une valeur considérable comme producteurs d'antibiotiques et d'autres composés thérapeutiques importants. Ils semblent jouer un rôle majeur dans le cycle de la matière organique dans l'écosystème tellurique (Buckley et Schmidt, 2002). Elles sont abondantes au niveau de la rhizosphère par exemple qui leur fournit les éléments nécessaires à leur croissance, ce qui nous a orientés dans notre étude à choisir de prélever les échantillons à partir de la rhizosphère d'un palmier dattier.

Au sein du laboratoire de microbiologie de l'université de Ghardaïa, notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche ayant pour objectif d'un screening des souches extrémophiles (thermophiles et halophiles) qui appartient à l'ordre des *Bacillales*, du sol oasien de Metlili (la région de Sabkha).

Pour cela nous adopterons la démarche expérimentale suivante:

- Isolement des *Bacillales* sporogènes à partir de 2 échantillons du sol oasien.

- Identification et caractérisation phénotypique des souches isolées.
- Caractérisation physiologique et moléculaire pour identifier les souches isolées.

Notre travail s'articule en trois parties dont la première est une revue bibliographique traitant le sol et ses extrémophiles, l'ordre *Bacillales* et son importance en biotechnologie. La seconde partie rapporte la méthodologie détaillée du travail, et la troisième partie expose nos résultats obtenus comparés et discutés suivie d'une conclusion et des perspectives.

**CHAPITRE I**  
**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1- Sol

Il existe plusieurs définitions du sol en raison de la complexité de sa composition, et des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques. Par exemple, pour le géologue et l'ingénieur, le sol est une roche finement fragmentée (White, 2006). L'hydrologue peut voir le sol comme un réservoir de stockage de l'eau affectant l'équilibre d'un bassin, tandis que l'écologue peut être intéressé uniquement aux propriétés du sol qui influent sur la croissance et la distribution des plantes et des animaux (White, 2006). L'agriculteur est naturellement préoccupé par les nombreuses façons de l'influence du sol sur la croissance des cultures et la santé de ses animaux, bien que souvent l'intérêt ne s'étend pas au-dessous d'une profondeur de sol de 15 à 20 cm. Le sol soutient la croissance de nombreuses plantes et animaux, et ainsi fait partie de la biosphère (White, 2006).

Le sol est constitué de cinq composants majeurs : fraction minérale, matière organique, eau, air et organismes vivants (Faugier, 2010). Les matières organiques et minérales s'organisent de manière à créer des vides (des pores) alors occupés par l'air et l'eau (Faugier, 2010).

Toutefois, si l'on considère les relations symbiotiques, le sol peut être défini comme la partie superficielle de la terre qui présente les conditions essentielles pour des animaux, des plantes, et la vie microbienne. Bien que très hétérogène et variable en fonction de la profondeur et l'emplacement de régions géographiques distinctes, le sol est formé d'environ 25 % d'air, 25 % d'eau, et 50 % de matières solides. Cette dernière est divisé en 45 % de minéraux (sable, limon et argile) et 5 % de matière organique : MO (4,5 % de matière organique inerte et 0,5 % d'organismes vivants) (Maheshwari, 2010).

### 1-1- Diversité bactérienne du sol

Le fonctionnement de certains systèmes biologiques, dans l'écosystème, dépend de l'interaction de trois facteurs généraux : l'environnement, la structure de la communauté biologique (la biodiversité) et l'activité biologique (la fonction). Le rôle de la diversité, en particulier des micro-organismes, et la relation entre la diversité microbienne et la fonction est en grande partie mal connu. L'application des techniques de biologie moléculaire a montré que les communautés microbiennes, en particulier dans le sol, sont très complexes (Torsvik *et al.*, 1990; Ritz *et al.*, 1997) et de comprendre cette relation n'est pas toujours simple (Insam et Rangger, 1997).

Le sol représente un habitat favorable pour diverses populations de microbes. Le rôle intrinsèque du sol dans les écosystèmes terrestres a un effet direct sur la croissance des

plantes et la qualité du sol. Cette fonction a entraîné une attention particulière accordée à l'amélioration de la croissance des plantes à l'aide de micro-organismes efficaces dans l'agriculture durable (Faugier, 2010; Maheshwari, 2010; Boulekzaz et Bouderbala, 2015; Abdesselam et Latache, 2017; Youcef-Ali, 2014).

## **1-2- Caractéristiques physico-chimiques du sol**

Les propriétés du sol sont affectés par l'humidité, la concentration en O<sub>2</sub>, la profondeur du sol, le pH et la température (Kuske *et al.*, 2002; Maheshwari, 2010).

### **1-2-1- Teneur en eau**

L'eau circule est retenue dans le sol par le réseau des pores. Ces pores sont occupés par un réseau aqueux discontinu (sauf quand le sol est saturé), portant des substances inorganiques ou organiques dissoutes avec une phase gazeuse (Faugier, 2010). Dans le sol, les processus biologiques et chimiques sont influencés par l'augmentation de l'humidité (Gouin, 1974).

La disponibilité de l'eau fournit une matrice souple dans lequel les bactéries peuvent fonctionner. Pour les communautés bactériennes, contrairement aux plantes et d'animaux, l'eau à l'extérieur des cellules fournit souvent des activités essentielles pour la survie des bactéries. Les cellules bactériennes possèdent la plus grande capacité de contrôler l'eau extracellulaire, principalement via les rejets de polymères extracellulaires (Cullimore, 2010).

Une baisse de l'activité microbienne à de faibles niveaux d'humidité du sol peut s'expliquer par une diffusion limitée de substrats solubles et une mobilité réduite (Eldor, 2007).

### **1-2-2- Température**

De nombreux processus physiques, chimiques et biologiques dans le sol sont influencés par la température. L'augmentation de la température favorise la minéralisation de la matière organique (MO) et la décomposition des résidus végétaux par l'augmentation des taux de réactions physiologiques, en accélérant la diffusion des substrats solubles dans le sol. Une augmentation de la température peut également induire un changement dans la composition de la communauté microbienne. Tandis que les taux de diffusion moléculaire sont augmentés avec l'augmentation de la température, la solubilité des gaz dans la solution du sol est diminuée, ce qui ralentit l'activité microbienne (Eldor, 2007).

Parmi les facteurs qui affectent le taux de réchauffement du sol, l'intensité et la réflexion de l'irradiation solaire (Eldor, 2007).

### **1-2-3- pH**

Le pH du sol a une influence sur un certain nombre de facteurs (influençant l'activité enzymatique microbienne), comme l'ionisation et la solubilité de la matière inorganique et organique du sol (Eldor, 2007).

L'acidité du sol est généralement liée à une augmentation de la quantité de cations biologiquement toxiques comme  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  (Alexander, 1980; Foy, 1984; Insam et Rangger, 1997), à une réduction de la biomasse microbienne et également à une diminution du taux de décomposition de la matière organique (Insam et Rangger, 1997).

### **1-2-4- Conductivité électrique**

Les principaux ions dans les eaux d'irrigation sont  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$  avec de faibles concentrations de  $\text{K}^+$  et  $\text{NO}_3^-$ . La concentration totale de sels dissous (appelé également le risque de salinité) est mesurée par la conductivité spécifique, qui est la conductivité électrique (CE) de l'eau. La conductivité électrique CE de la plupart des eaux d'irrigation se situe entre 0,15 et 1,5 dS/m (déci-siemens par mètre), ce qui correspond approximativement à 1,5 -15 mmol de l'anion (-) ou de cation (+) libre par litre. Dans le sol, cet ion est concentré 2 à 20 fois en raison de l'évapotranspiration, et par conséquent de nombreuses cultures connaissent une réduction du rendement grâce à un stress osmotique (White, 2006).

Dans la rhizosphère, les quantités et les types de substrat sont différents de ceux de la masse du sol et conduisent à la colonisation par les différentes populations de bactéries, champignons, protozoaires et nématodes. D'autres facteurs physico-chimiques sont l'acidité, l'humidité et les éléments nutritifs, la conductivité électrique, et le potentiel d'oxydo-réduction (Maheshwari, 2010).

### **1-2-5- Dosage de carbone organique**

La matière organique (MO) du sol provient de débris de plantes, les résidus d'animaux et des excréments déposés sur la surface (ces éléments sont mélangés avec les éléments minéraux). La MO morte est colonisée par une variété d'organismes du sol, surtout des micro-organismes, qui tirent leur énergie pour la croissance de l'oxydation de molécules organiques complexes (le substrat) (White, 2006).

La quantité de MO du sol est mesurée par la combustion d'un échantillon de sol dans un four pour convertir le carbone en  $\text{CO}_2$ , qui est ensuite mesuré par chromatographie gazeuse ou par piégeage dans une solution alcaline, et titrage. La MO peut être oxydée par digestion humide dans un mélange d'acide sulfurique et de bichromate de potassium, et

l'excès de dichromate de potassium titré par le sulfate d'ammonium ferreux, communément appelé la Walkely-Black méthode (Nelson et Sommers, 1996; White, 2006).

## **2- Extrêmophiles**

Pour définir un environnement extrême, il faut d'abord définir un environnement non extrême (ou un environnement normal). Il n'existe pas une définition exacte ou stricte d'un environnement normal mais on peut supposer qu'il peut avoir comme facteurs une température comprise entre 4 à 40°C, un pH de 5 à 8,5 et une salinité entre celle des eaux douces et de l'eau de mer, donc un environnement extrême est caractérisé par des facteurs se situant en dehors de ces limites (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995; Nas, 2013).

Les environnements extrêmes englobent une haute température, une pression élevée, une concentration élevée en sel, une faible température, pH extrêmes, concentration en éléments nutritifs élevées, et un manque de la disponibilité de l'eau, et également des conditions ayant des niveaux élevés de rayonnements nocifs, des concentrations exagérées en métaux lourds et des composés toxiques comme des solvants organiques (Arora *et al.*, 2013; Nas, 2013).

Ces environnements sont colonisés par des organismes que l'on appelle extrêmophiles. On distingue les extrêmophiles stricts, qui requièrent des conditions extrêmes pour leur survie, leur développement et leur multiplication; et les extrêmophiles modérés (ou extrêmotolérants) qui tolèrent des conditions extrêmes mais sont aussi capables de croître dans des conditions plus modérées (Besse, 2016). Dans la plupart des environnements, plusieurs conditions extrêmes peuvent coexister et les colonisateurs sont alors appelés poly-extrêmophiles. Les poly-extrêmophiles ont donc développés différents mécanismes leur permettant de s'adapter aux multiples conditions auxquelles ils doivent faire face (Besse, 2016). Les conditions extrêmes affectent la structure de tous les composants cellulaires : membranes, systèmes de transport, solutés internes, acides nucléiques et protéines.

Il existe des environnements extrêmes où la température est très élevée. Ces environnements sont souvent retrouvés à proximité de zones volcaniques, ainsi que les sources d'eau chaude sont des environnements où la température peut être supérieure à 100 °C (Besse, 2016).



## **2-1- Bactéries dans les environnements extrêmes**

La croissance et la survie d'une bactérie sont caractérisées par plusieurs facteurs physico-chimiques, biotiques et abiotiques. Cela signifie qu'un biotope, pour un micro-organisme, est déterminé par une gamme pour chaque facteur permettant la croissance et la survie (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995; Benabdallah, 2014).

## **2-2- Bactéries extrêmophiles**

Les thermophiles et alcalophiles sont deux exemples d'extrêmophiles. Les autres groupes comprennent, barophiles, psychrophiles, acidophile, et micro-organismes halophile (Arora *et al.*, 2013).

## **2-3- Bactéries thermophiles et hyperthermophiles**

Les procaryotes thermophiles et hyperthermophiles vivent à des températures optimales de croissance de l'ordre de 60°C et 80°C, respectivement. Ces micro-organismes sont retrouvés généralement dans des habitats géothermiques naturels largement répandus sur notre planète et souvent associés à des zones tectoniques actives (Benabdallah, 2014). Les thermophiles et les hyperthermophiles colonisent les environnements où la température est respectivement élevée et très élevée, et ont un optimum de croissance généralement supérieur à 50 °C pour les thermophiles et à 80 °C pour les hyperthermophiles (Irwin et Baird, 2004; Besse, 2016).

## **2-4- Endospore**

Les cellules bactériennes sont généralement vues comme les cellules végétatives, mais certains genres de bactéries ont la capacité de former des endospores, structures qui essentiellement protègent le génome dans un état dormant quand les conditions sont défavorables. Des endospores (à ne pas confondre avec les spores formées par la reproduction des champignons : exospores) permettent à des bactéries de survivre de longues périodes sans nourriture ni eau, ainsi que l'exposition aux produits chimiques, aux températures extrêmes et même aux rayonnements (Parker *et al.*, 2018).

La formation d'une endospore est un mécanisme de survie bactérienne lorsque les conditions de croissance sont préjudiciables pour la forme végétative (comme le manque de nourriture, mais aussi la présence de biocides et d'autres conditions physiques et chimiques nuisibles). La structure des endospores est unique et confère à la spore un haut niveau de résistance aux biocides (Denyer *et al.*, 2011).

L'endospore bactérienne n'est pas une structure de reproduction (chaque cellule forme, durant la sporulation, une seule spore dans des conditions défavorables). La spore peut

persister pendant une très longue période et ensuite, sur la stimulation appropriée, donne lieu à une seule cellule bactérienne (germination) (Ryan et Ray, 2014).

#### **2-4-1- Structure des endospores**

Les endospores sont des cellules différenciées qui possèdent une structure très différente de celui de la cellule végétative (dans lequel ils sont formés). La structure de l'endospore est beaucoup plus complexe (par la présence de nombreuses couches entourant un noyau central) que celle de la cellule végétative. La couche externe est l'exosporium composé de protéines; suivie par les manteaux de spores, qui sont également des matières protéiques mais avec une haute teneur en cystéine. Parmi les principales caractéristiques de l'endospore est la présence d'acide dipicolinique et des concentrations élevées de cations de calcium. Le noyau est également partiellement déshydraté, contenant seulement 10-30% de la teneur en eau de la cellule végétative (Kayser *et al.*, 2005).

L'intérêt de la déshydratation est d'augmenter la résistance à la chaleur et aux produits chimiques. En outre, le pH de l'endospore est d'environ 1 unité de moins que le cytoplasme de la cellule végétative et contient des concentrations élevées de protéines spécifiques basiques qui se lient étroitement à l'ADN (pour assurer une protection contre les adduits d'ADN). Ces protéines spécifiques fonctionnent également comme une source d'énergie pour la croissance ou la germination d'une nouvelle cellule végétative de l'endospore (Denyer *et al.*, 2011).

#### **2-4-2- Sporulation**

Le phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique qui peut être variable selon les espèces bactériennes (Meyer *et al.*, 2004).

Le processus commence par la formation d'un septum végétatif dans la cellule bactérienne. Le septum divise la cellule d'une façon asymétrique, une séparation de l'ADN de la cellule mère (dans la préspore). La préspore, qui forme le noyau de l'endospore, est séparée de la cellule-mère par une deuxième membrane; et essentiellement est une copie de la cellule. Un cortex se forme progressivement autour de la préspore en fixant des cations de calcium et l'acide dipicolinique. Une protéine '*spore coat*' se forme alors autour de l'écorce tandis que l'ADN de la cellule mère se désintègre. L'endospore est libéré après la désintégration de la cellule-mère, complétant la sporulation (Parker *et al.*, 2018).

### **2-4-3- Germination**

Bien que des endospores puissent rester dormantes pendant des décennies, ils peuvent revenir à une cellule végétative très rapidement. L'activation du processus peut se produire par l'élimination de l'inducteur de stress à l'origine de la sporulation. Au cours de la germination, plusieurs phénomènes sont observés : la perte de propriétés de résistance, la perte de calcium-dipicolinate, une dégradation des protéines spécifiques, une absorption de l'eau, et une synthèse de l'ARN et l'ADN et de nouvelles protéines (Denyer *et al.*, 2011). La germination mène à une nouvelle cellule végétative du même génotype que la cellule qui a produit la spore (Meyer *et al.*, 2004; Ryan et Ray, 2014).

### **2-4-4- Thermorésistance**

Les endospores de certaines espèces bactériennes peuvent résister aux valeurs de pH et de température extrêmes, y compris de l'eau bouillante, pour des périodes de temps surprenantes. La résistance thermique est due à la faible teneur en eau et la présence d'une grande quantité d'une substance que l'on trouve uniquement dans les spores, le calcium dipicolinate. Il s'agit notamment d'une membrane de spores, un cortex épais composé d'une forme spéciale de peptidoglycane, une couche riche en cystéine, kératine, protéine de structure insoluble, une couche externe et lipoprotéines liés aux glucides (Ryan et Ray, 2014).

La résistance de ces spores à la chaleur est la qualité la plus importante d'un point de vue médical (intérêt clinique) et industriel (intérêt agro-alimentaire), puisque les procédures de stérilisation thermique nécessitent de très hautes températures pour les éliminer de manière efficace (Bonney *et al.*, 2002).

### **2-4-5- Importance des bactéries sporulées**

La stérilisation à la vapeur ou à la chaleur sèche peut être contrôlée par l'utilisation d'indicateurs biologiques ou chimiques par des bandelettes de test qui changent de couleur après avoir rencontré des conditions satisfaisantes. Ces indicateurs sont largement disponibles. Habituellement, les spores de *Geobacillus* ou espèces de *Bacillus* (ou autres genres apparentés) sont utilisés pour vérifier l'efficacité de l'autoclavage (Bond *et al.*, 1991; Goldman et Green, 2009).

### **3- Bacillales**

#### **3-1- Caractéristiques des Bacillales**

Le genre de l'ordre des *Bacillales* comporte des genres à Gram positif, en bâtonnets sporogènes et généralement mobiles. Ces bacilles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs (Denis *et al.*, 2011).

#### **3-2- Classification des Bacillales**

Gibbons et Murray (1978) décrit la division *Firmicutes* englobant toutes les bactéries Gram-positives avec un taux faible en G+C mol % (alors que les *mollicutes* ont été placés dans une division distincte). La classe *Bacilli* comprend principalement les ordres *Bacillales*, les *Clostridiales*, et *Lactobacillales*. L'ordre de *Bacillales* se compose principalement de la famille des *Bacillaceae* (qui contient le genre type : *Bacillus*), *Alicyclobacillaceae*, *Listeriaceae*, *Paenibacillaceae*, *Pasteuriaceae*, *Planococcaceae*, *Sporolactobacillaceae*, *Staphylococcaceae* et *Thermoactinomycetaceae* (Matsuo *et al.*, 2006; De Vos *et al.*, 2009).

Par la suite, le genre principal *Bacillus* a subi d'importantes modifications taxinomiques. A partie d'uniquement deux espèces : *Bacillus anthracis* et *Bacillus subtilis*, le nombre a changé à une vitesse incroyable (jusqu'à 146 espèces dans la cinquième édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*). Dans la sixième édition, le nombre est réduit à 33 espèces; et dans la septième édition le nombre est réduit à 25, et dans la huitième édition à uniquement 22 espèces bien définies (Arora *et al.*, 2013).

Les études fondées sur l'analyse comparative des séquences de gènes d'ADN<sub>R</sub> 16S de différentes espèces de *Bacillus* révèlent cinq groupes phylogénétiquement distincts (Ash *et al.*, 1991). Une caractérisation au niveau génotypique et phénotypique de certaines espèces de *Bacillus* ont mené à la création de plusieurs nouveaux genres comme *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Virgibacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Geobacillus*, *Aneurinibacillus*, *Gracibacillus*, *Marinibacillus*, etc. (Joung et Cote, 2002; Stackebrandt et Swiderski, 2002). Aujourd'hui, plus de 200 espèces de bactéries aérobie sporogènes (AEFB : *Aerobic, Endospore-Forming Bacteria*) attribués à environ 25 genres ont été validement publiés (Arora *et al.*, 2013).

#### **3-3- Ecologie des Bacillales**

De nombreuses espèces *Bacillales* sont très répandues dans la nature, et présentes dans le sol et dans la décomposition des matières végétales et animales (Collins *et al.*, 2004). La plupart de ces espèces sont saprophytes. Ce sont des germes telluriques que l'on rencontre

également dans l'eau et l'air, ainsi que dans des produits alimentaires (laits en poudre, produits farineux, épices, etc.).

*Bacillus anthracis*, agent du charbon, est abondamment présent dans le sol qui constitue le réservoir principal. C'est un pathogène obligatoire de l'homme et des animaux (et les animaux malades disséminent le germe). *Bacillus cereus* est largement répandu dans la nature, le sol et l'air, et les aliments. Les autres *Bacillus* présents dans l'environnement (sol, air, etc.) peuvent être présents au niveau de la peau ou des muqueuses. Ils peuvent souiller les cultures, mais aussi comme pathogènes pour des sujets fragiles, comme après ou durant les interventions chirurgicales (Denis *et al.*, 2011).

### **3-4- Pouvoir pathogène des *Bacillales***

L'importance de *Bacillus* dans le domaine de la médecine a été signalée depuis l'identification de *B. anthracis* par Pasteur et Koch comme l'agent causal de la maladie du charbon à la fin des années 1800. Cependant, le genre dans son ensemble est considéré comme relativement favorable en termes de maladies humaines et animales par rapport à d'autres genres à Gram-positif, telles que *Staphylococcus* et *Streptococcus*. *Bacillus cereus* et les autres espèces relativement proches comme *B. weihenstephanensis* peut être responsable de maladies gastro-intestinales causées par la contamination des aliments ou des produits laitiers. De plus, dans des rares occasions, *B. cereus* peut être un agent pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés (Kotiranta *et al.*, 2000; Schoeni et Wong, 2005; Goldman et Green, 2009). Plusieurs espèces de *Bacillus* sont associées à l'intoxication alimentaire, comme *B. cereus*, et moins fréquents, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *B. sphaericus* (Turnbull, 1997; Collins *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'opinion publique est informée par l'utilisation de *B. anthracis* dans les actes et les menaces de bioterrorisme (Schneider *et al.*, 2004; Goldman et Green, 2009).

### **3-5- Intérêts biotechnologique des *Bacillales***

Le genre *Bacillus* a joué un rôle crucial dans l'établissement d'un large éventail de procédés de fermentation industrielle, qui dans certains cas ont remplacé les anciens processus chimiques (comme par exemple, dans la fabrication de la riboflavine). Plusieurs produits commerciaux sont synthétisés par les espèces de *Bacillus* comme plusieurs antibiotiques (principalement des peptides), vitamines et enzymes industrielles et alimentaires (Schallmeyer *et al.*, 2004; Goldman et Green, 2009). Le tableau 1 présente les principaux procédés de fermentation industriels qui utilisent les espèces de *Bacillus* (Stein, 2005; Goldman et Green, 2009).

Une autre importante de cette catégorie de bactéries, les protéines humaines et les vaccins (Ferreira *et al.*, 2005). Presque tous ces processus ont été développés à l'aide de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Brevibacillus brevis* (Ferreira *et al.*, 2005; Meima *et al.*, 2004; Terpe, 2006; Udaka et Yamagata, 1993-1994; Vary, 1994; Westers *et al.*, 2004).

**Tableau 1.** Les produits de la fermentation industrielle par les espèces *Bacillus* (Goldman et Green, 2009).

Produit (en anglais)	Les espèces de <i>Bacillus</i>	Application industrielle
Riboflavin	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire, pharmaceutique
Purine nucleosides	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire
Poly- $\gamma$ -glutamic acid	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire, pharmaceutique, aliments des animaux
D-ribose	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i>	Alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, aliments des animaux
Thaumatococin	<i>B. subtilis</i>	Alimentaire, pharmaceutique
Polyhydroxybutyrate	<i>B. megaterium</i>	plastique
Streptavidin	<i>B. subtilis</i>	Les microréseaux
2-actyl-1-pyrroline	<i>B. cereus</i>	Alimentaire
Enzyme (en anglais)	Les espèces de <i>Bacillus</i>	Application industrielle
$\alpha$ -Acetolactate decarboxylase	<i>Bacillus</i> sp.	Boissons
$\alpha$ -Amylase	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Alimentaire, le papier, l'amidon, du textile, de la brasserie
$\beta$ -Amylase	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <sup>b</sup> , <i>B. cereus</i> , <i>B. megaterium</i>	Le textile
Alcaline phosphatase	<i>B. licheniformis</i>	Détergent
Cyclodextrin glucanotransferase	<i>Paenibacillus macerans</i> <sup>c</sup> , <i>B. megaterium</i> , <i>Bacillus</i> sp.	Alimentaire, pharmaceutique et cosmétique
$\beta$ -Galactosidase	<i>G. stearothermophilus</i> <sup>a</sup>	Alimentaire, Boissons
$\beta$ -Glucanase	<i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Boissons
$\beta$ -Glucosidase	<i>Bacillus</i> sp.	brassage de la bière
Glucose isomerase	<i>B. coagulans</i> , <i>B. acidipullulyticus</i> , <i>B. deramificans</i>	l'amidon
Glucosyl transferase	<i>B. megaterium</i>	l'amidon
Glutaminase	<i>B. subtilis</i>	La saveur
Galactomannase	<i>B. subtilis</i>	Aliments pour animaux, boissons
$\beta$ -Lactamase	<i>B. licheniformis</i>	pharmaceutique
Lipases	<i>Bacillus</i> sp.	Détergent
Neutral (metallo-) protease	<i>B. lentus</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thermoproteolyticus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Alimentaire, détergent
Penicillin acylase	<i>Bacillus</i> sp.	pharmaceutique
Pullulanase	<i>Bacillus</i> sp., <i>B. acidopullulans</i>	L'amidon, Alimentaire, les boissons
Alcaline (serine-) protease	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. amylosaccharicus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>	Textiles, détergents
Urease	<i>Bacillus</i> sp.	Les analyses, Boissons
Xylanases	<i>Bacillus</i> sp.	La cuisson, les aliments pour animaux, des boissons, de la brasserie, Alimentaire
Insect pathogen	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>Paenibacillus popilliae</i> <sup>d</sup> , <i>Paenibacillus lentimorbuse</i> <sup>e</sup>	Agriculture
Fermentation	<i>B. natto</i>	Alimentaire
Animal probiotic	<i>B. licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> var <i>toyoi</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. cereus</i>	les aliments pour animaux
Aqua probiotic	<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>P. polymyxa</i> , <i>Bacillus</i> sp.	les aliments pour animaux

<sup>a</sup> Anciennement *B. stearothermophilus*; <sup>b</sup> anciennement *B. polymyxa*; <sup>c</sup> anciennement *B. macerans*; <sup>d</sup> anciennement *B. popilliae*; <sup>e</sup> anciennement *B. lentimorbuse*;

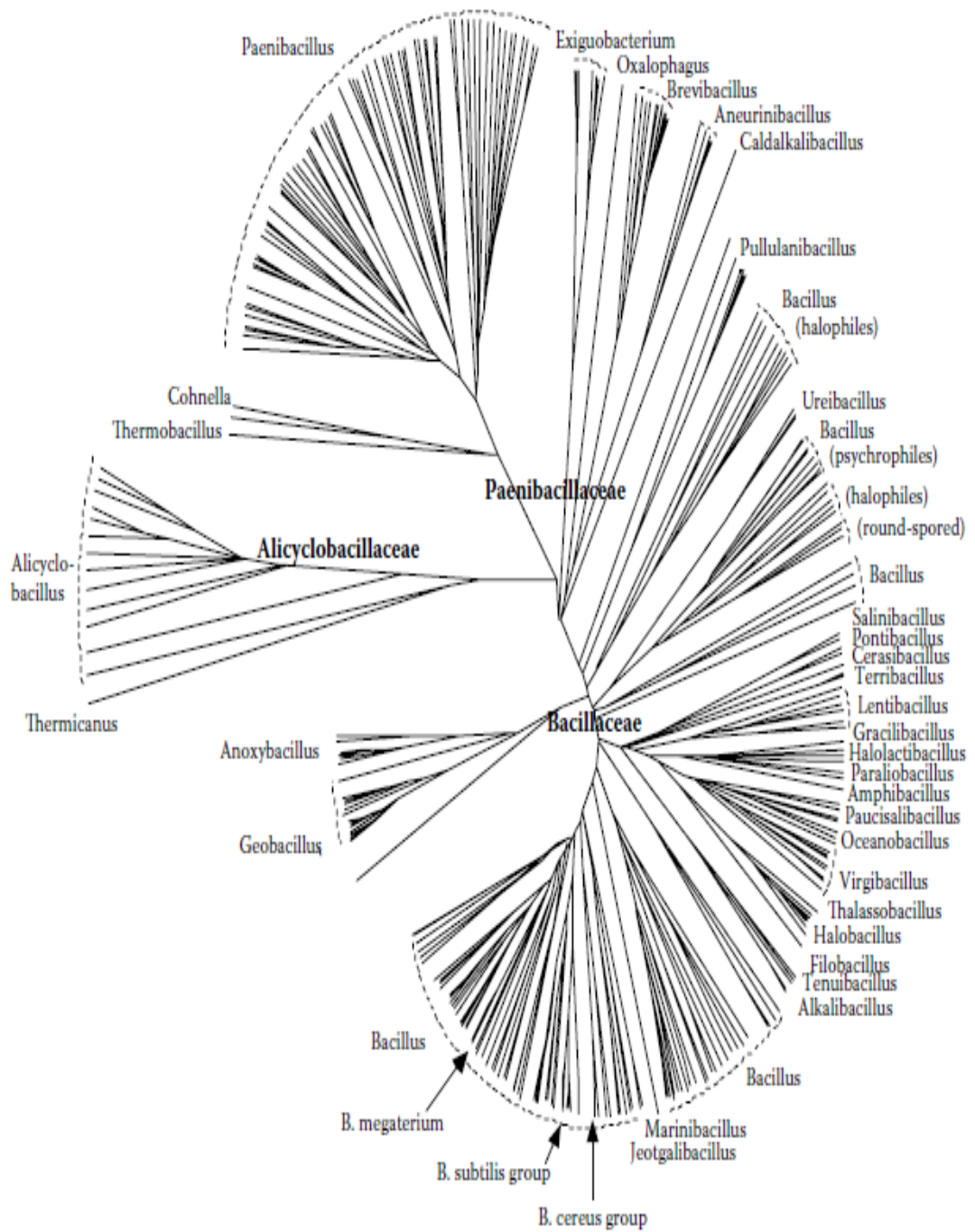
### 3-6- Phylogénie des *Bacillales*

Il s'agit de l'étude des bactéries par plusieurs techniques telles que l'hybridation d'acide nucléique et les technologies basées sur la PCR et le séquençage. L'identification repose également sur des comparaisons de séquences (Blasting et alignements) de régions génomiques hautement conservées telles que l'ARNr 16S ou l'ARNr 18S, ou sur des RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou pourcentage de GC dans l'ADN.

Une identification génotypique fiable nécessite des bases de données dotées d'informations exactes et complètes sur des séquences obtenues auprès d'un grand nombre de taxons. Parmi les bases de données de séquences de gènes couramment utilisées, on compte : GenBank, *Ribosomal Database Project (RDP)*, *European Molecular Biology Laboratory (EMBL)*, et *Universal Protein Resource (UniProt)* (Boulekzaz et Bouderbala, 2015).

Un arbre phylogénétique basée sur des séquences d'ARN 16S, comprend les genres de *Bacillales*, est présenté (figure 1). Ces regroupements (arbres phylogénétiques) sont obtenues à partir de comparaisons de séquences de gènes (Wayne *et al.*, 1987; De Vos *et al.*, 2009).

Les séquences d'ADN GenBank pour les espèces souches types ont été alignées avec ClustalW (Higgins *et al.*, 1994 ; Goldman et Green, 2009). Un arbre phylogénétique a été construit à partir de la matrice de distance ClustalW avec l'application PHYLIP (Felsenstein, 1989 ; Goldman et Green, 2009) et visualisées avec PhyloDraw (figure 1). Les espèces mentionnées fréquemment dans le texte sont indiqués. Le "groupe" de *B. subtilis* est composé de 14 espèces, dont *B. licheniformis*, qui sont étroitement liés à *B. subtilis*. Le "groupe" de *B. cereus* se compose de six espèces, dont *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, qui sont étroitement liés à *B. cereus* (Goldman et Green, 2009).



**Figure 1.** La phylogénie des *Bacillus* de séquences du gène de l'ARN<sub>R</sub> 16s (Goldman et Green, 2009).

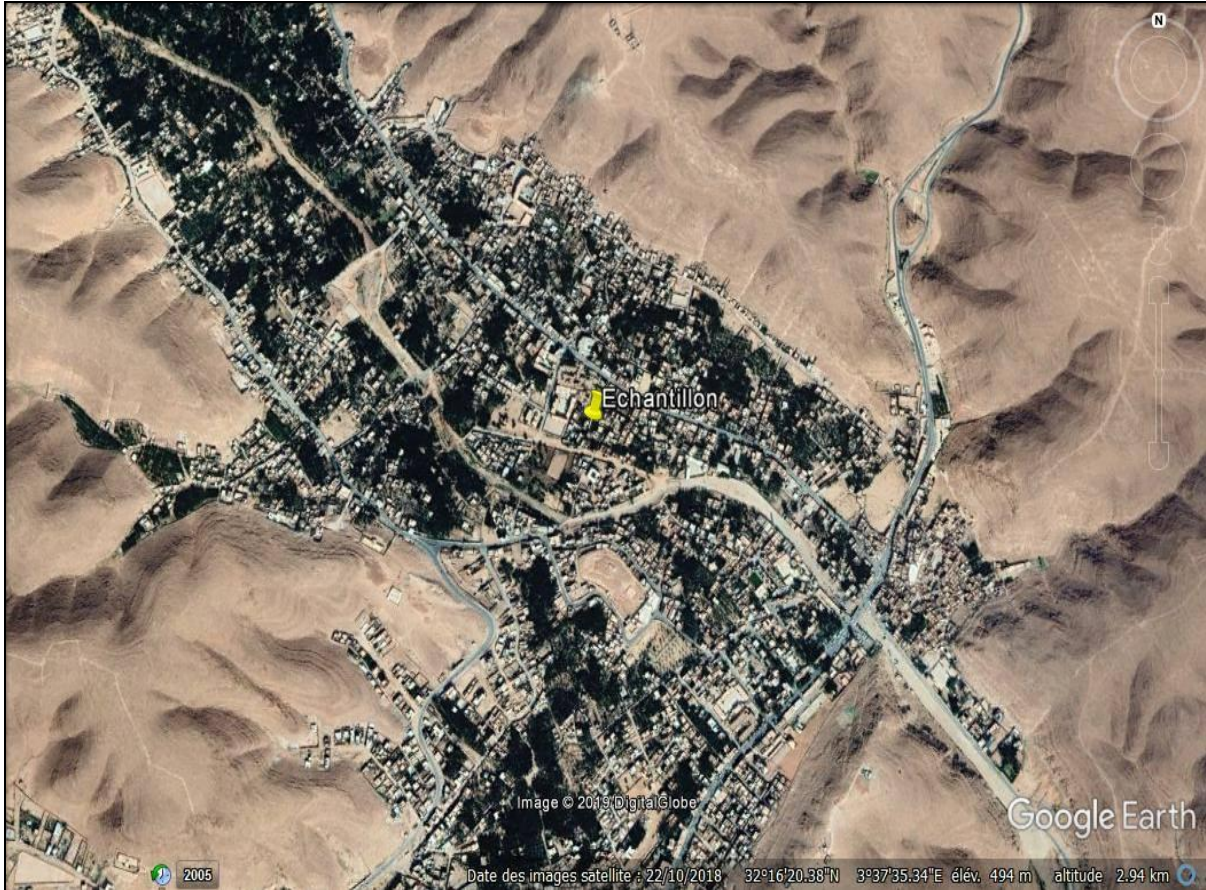


# **CHAPITRE II**

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1- Site d'isolement

Les souches de *Bacillales* faisant, l'objectif de cette étude, ont été isolées durant le mois d'octobre 2018 à partir de deux échantillons du sol oasisien de Metlili (région de Sabkha) (Figure 2).



**Figure 2.** Localisation du site d'échantillonnage : la région de Metlili (Sabkha) (*Google Earth*).

## 2- Prélèvement des échantillons

Deux échantillons (A et B) ont été prélevés aléatoirement après élimination de vingt premiers centimètres du sol de surface (à gauche et à droite d'un pied du palmier dattier) dans la région de Sabkha (Metlili, Ghardaïa). Ces 2 échantillons ont été ensuite transportés le plus rapidement possible au laboratoire dans des sachets en plastique.

## 3- Caractéristiques physico-chimiques du sol

### 3-1- Teneur en eau (Taux d'humidité %)

C'est la quantité d'eau contenue dans un sol. Elle est mesurée par rapport à la quantité de terre sèche contenue dans ce sol, et exprimée en pourcent. La méthode consiste à sécher

l'échantillon du sol à l'étuve à 105°C jusqu'à un poids constant, la différence du poids avant et après séchage correspond à la quantité d'eau (ITA., 1975).

$$\% \text{ Humidité du sol} = (\text{masse humide} - \text{masse sec}) / \text{masse sec} \times 100$$

### 3-2- pH

Une quantité de 20 g du sol séché de chaque échantillon a été homogénéisé avec 50 mL d'eau distillée stérile. Ce mélange doit être agité durant 2 minutes par un agitateur magnétique (marque Stuart, vitesse 3). L'électrode du pH-mètre a été insérée directement dans chaque échantillon pour avoir une mesure directe (Institut de Génie Rural, 1973).

### 3-3- Conductivité électrique

La conductivité électrique d'un sol est considérée comme un indicateur de sa salinité, plus un sol est salin, plus il devient conductible. Pour déterminer la conductivité électrique d'un échantillon du sol, 10 g de ce dernier sont ajoutés à 50 mL d'eau distillée, le mélange est agité pendant 30 min puis laissé décanter. La mesure de la conductivité électrique (CE) est ensuite effectuée à l'aide d'un conductimètre à partir du surnageant (Hardi et Doyle, 2012).

### 3-4- Dosage de carbone organique

Le dosage de la matière organique (MO) est réalisé par la méthode de Walkley et Black (avec quelques modifications) :

Le dosage de la MO est réalisé indirectement à partir de dosage du carbone organique. Le taux de MO est calculé par l'équation : % MO = %C x 1,72 (le carbone organique est estimé à 58% de la MO).

$$C \% = \frac{0.39(10 - v.t)}{p}$$

$p$ : poids de la prise de terre en g.

$v$ : volume versés de solution de sel de Mohr avant le virage de couleur.

$t$ : la concentration de sel de Mohr ( $t = \frac{10}{T}$ ).

$T$ : ml versé de solution de sel de Mohr pour le témoin avant le virage de couleur.

La détermination du carbone organique est basée sur l'oxydation du carbone organique par le bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique (Mathieu *et al.*, 2003).

### Préparation des solutions :

- Solution d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,25 mol/L :

Dans une fiole jaugée de 2000 mL contenant environ 900 mL d'eau déminéralisée, ajouter lentement 28 mL d'acide sulfurique, et ajuster le volume, puis homogénéiser la solution.

- Solution de Bichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{CrO}_7$ ), 0,1666 mol/L:

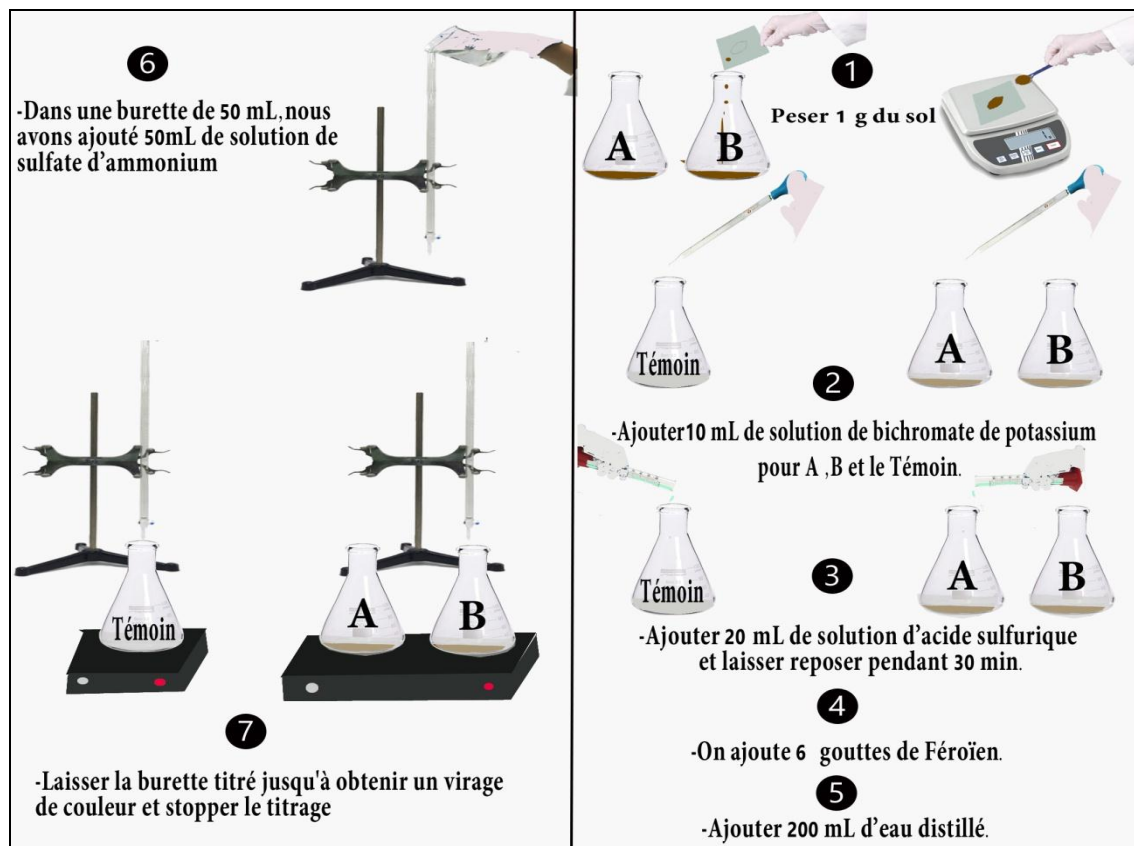
Dans une fiole jaugée de 1000 mL contenant environ 700 mL d'eau déminéralisée, dissoudre 49 g de bichromate de potassium, puis Ajuster au volume et homogénéiser la solution.

- Solution de sulfate d'ammonium-fer (II) hexahydraté ( $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ) = sel de Mohr, 0,5 mol/L:

Dans une fiole jaugée de 2000 mL contenant environ 1000 mL de solution d'acide sulfurique, dissoudre 392,160 g de sel Mohr. Ajuster au volume avec la solution d'acide sulfurique, puis homogénéiser la solution (cette solution se conserve au maximum 2 semaines).

- Féroïen (indicateur rédox) :

Dans une fiole jaugée de 100 mL contenant environ 90 mL d'eau déminéralisée, dissoudre 0,974 g de sel Mohr et 1,485 g de phénantroline  $1^{-10}$ . Ajuster au volume, puis homogénéiser la solution.



**Figure 3.** Protocole de dosage de la matière organique.

## **4- Appareillage**

Voir Annexe 1.

## **5- Produits chimiques et milieux de culture**

### **5-1- Produits chimiques**

Voir Annexe 2.

### **5-2- Milieux de culture**

Plusieurs milieux de cultures ont été utilisés dans cette étude comme par exemple : GN (gélose nutritive), BN (bouillon nutritif), PVK (Pikovskaya), RCV Saccharose, etc.

Voir Annexe 4.

## **6- Isolement des *Bacillales***

### **6-1- Préparations des dilutions décimales**

Dans le but d'isoler des *Bacillales*, des dilutions décimales ont été préparées à partir de chaque échantillon par l'ajout successif de 1 mL de la solution précédente à 9 mL d'eau de robinet (il est recommandé d'utiliser l'eau physiologique stérile) jusqu'à l'obtention de la dilution recherchée (Geng *et al.*, 2004).

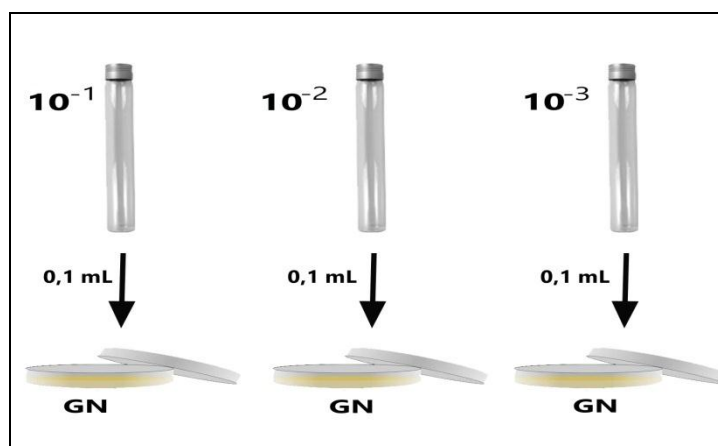
### **6-2- Traitement des échantillons**

Puisque on s'intéresse au *Bacillales*, l'isolement est donc basé sur les caractéristiques de la thermorésistance de leur endospores. Les deux échantillons analysés ont subi un traitement thermique à 120°C pendant 10 minutes (un demi-cycle de l'autoclavage) dans le but d'éliminer la totalité des formes végétatives, et donc isoler que les genres bactériens qui possèdent des endospores.

### **6-3- Ensemencement et conditions de culture**

Les solutions mères et les dilutions sont ensemencées sur milieu GN (Figure 4) et incubés sous différentes conditions :

- milieu GN, incubé à 60°C pendant 9 jours.
- milieu GN en présence de 10% NaCl, incubé à 60°C pendant 9 jours.



**Figure 4.** Ensemencement des solutions ( $10^{-1}$ ) mères et les dilutions ( $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) sur milieu GN.

Le milieu GN est coulé dans les boîtes de Pétri (de 90 mm). A l'aide d'une micropipette on dépose 100  $\mu$ L de la solution mère et de chaque dilution sur la surface du milieu de culture (deux essais pour chaque dilution). Les pipettes Pasteur en forme d'un râteau ont été utilisées pour étaler cet inoculum uniformément sur la surface de la gélose.

## 7- Purification et conservation des souches

Les colonies à différents aspects macroscopiques et microscopiques sont sélectionnées et purifiées par repiquages successifs (pour obtenir des souches pures, avant de réaliser les études physiologiques, biochimiques et moléculaires).

Les souches isolées des *Bacillales* (thermophiles) sont ensemencées par des stries sur la pente des tubes à essai contenant de la gélose nutritive inclinée, puis incubées à 60°C pendant 3 à 5 jours pour assurer une bonne croissance, avant d'être conservés à 4°C.

## 8- Identification phénotypique

Selon les tests proposés par Logan *et al.* (2009) pour la description des souches de l'ordre des *Bacillales*, les souches pures sont soumises à une étude des différents caractères morphologiques, culturels et biochimiques dans le but de leur identification.

### 8-1- Caractéristiques morphologiques

#### 8-1-1- Aspect macro-morphologique

L'examen macroscopique des cultures bactériennes est le premier examen effectué après l'isolement, il consiste à observer directement, à l'œil nu, l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu GN après 24 à 48 heures d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- ✓ La taille des colonies : par mesure de diamètre.

- ✓ La forme des colonies : circulaire, filamenteuse, irrégulière, ronde, étoilée, etc.
- ✓ Le relief : plane, élevée, convexe, bombée, bossue, volcanique, etc.
- ✓ Le bord : régulier, ondulé, lobé, dentelé, filamenteux, bouclé, etc.
- ✓ L'aspect : duveteux, poudreux, granuleux, etc.
- ✓ La consistance : molle, élastique, cartonnée, rigide, etc.
- ✓ La couleur de la culture (colonie).
- ✓ L'opacité : les colonies sont soit opaques et ne laissent pas passer la lumière, translucides en laissant passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers ou transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers) (Ripert, 2013).

### **8-1-2- Aspect micro-morphologique**

#### **8-1-2-1- Examen à l'état frais**

Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de regroupement et de leur mobilité éventuelle (Girard et Rougieux, 1967).

L'examen des bactéries à l'état frais se fait entre lame et lamelle. Il est préférable d'examiner des cultures jeunes (24 à 36 h).

#### **8-1-2-2- Coloration de Gram**

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au Violet de Gentiane; il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 90%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 2 à 3 secondes.

Seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau courante. À ce stade les cellules Gram négatives seront incolores, et les cellules Gram positives de couleur violette. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la Fushine pour colorer les cellules Gram négatives en couleur rose (Singleton, 1999). Après un bref rinçage, on sèche le frottis au buvard et on l'examine à l'objectif en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion (grossissement X 100).

### **8-2- Caractéristiques physiologiques**

La croissance des souches bactériennes a été étudiée pour les trois paramètres suivants (salinité, température et pH), sur gélose nutritive pour le suivi des croissances (croissance: +, pas de croissance: -).

### **8-2-1- Effet de la concentration en NaCl**

L'évaluation de la croissance des souches bactériennes en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive (dans des boîtes de Pétri de 45 mm), contenant des concentrations en NaCl de (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10%) après incubation à 60°C durant 48 heures.

### **8-2-2- Effet du pH**

L'évaluation de la croissance des souches en fonctions du pH a été déterminée par la culture des souches sur gélose nutritive (dans des boîtes de Pétri de 45 mm) ajusté à des pH : 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 par des solutions de NaOH (2N) et HCl (2N). L'incubation a été effectuée à 60°C pendant 48 heures.

### **8-2-3- Effet de la température**

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a été effectuée par incubation à différents température (15, 25, 30, 37, 45, 55, 60, 65, 70 et 75°C) des souchesensemencée sur gélose nutritive à pH 7 pendant 48 heures.

### **8-2-4- Antibiogramme**

L'antibiogramme définit *in vitro* la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. On utilise largement la méthode des disques, qui permet de voir le diamètre d'inhibition de croissance autour des disques imprégnés d'antibiotiques. Cette méthode standardisée donne de bons résultats en pratique (Vedel, 2005).

Trente (30) disques de celluloses imprégnées d'antibiotique ont été utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme :

Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10), Amikacine (AK 30), Gentamicine (GEN 10), Kanamycine (K 30), Tobramycine (TOB 10), Aztréonam (ATM 30), Ceftazidime (CAZ 30), Céfotaxime (CTX 30), Chloramphénicol (C 30), Clindamycine (CD 2), Colistine (CL 25), Céfoxitine (CX 30), Erythromycine (E 15), Imipénème (IPM 10), Acide nalidixique (NA 30), Pipiraciline (PI 100), Ofloxacine (OF 5), Oxacilline (OX 5), Pénicilline (P 10), Ticarcilline + acide clavulanique (TCC 75/10), Ticarcilline (TIC 75), Tétracycline (TE 30), Teicoplanine (TEC 30), Vancomycine (VA 30), Triméthoprime + Sulfaméthoxazoe (COT 25), (HLG 120), (HLS 300), Acide fusidique (FC 10), Rifampicine (R 5) et Fosfomycine (FO 200).

Les disques des antibiotiques sont de la marque Cypress.



**a- Mode opératoire préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture jeune de 18 à 24 h (sur boîte de Pétri), préparer une suspension (de 1 à 2 colonies isolées dans 2 mL de l'eau physiologique).
- Ajuster l'opacité à une concentration de  $10^6$  bactéries/mL ( $10^6$  CFU/mL), équivalente à la turbidité d'un tube 0,5 de la gamme de Mc Farland.

**b- Ensemencement :**

- Couler la gélose MH (Mueller-Hinton) dans une boîte de Pétri.
- Prélever 2 ou 3 gouttes de la suspension bactérienne préparée, et les déposer à la surface de la gélose, puis les étaler avec un râteau.
- S'assurer que la surface de la gélose est bien séchée (après 10 à 15 min), et y déposer les disques de celluloses imprégnées d'antibiotique correspondant à l'aide d'une pince en appuyant légèrement.
- Placer la boîte de Pétri à basse température + 4°C pendant 15 à 30 minutes afin de permettre aux antibiotiques de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier.
- Retirer la boîte du réfrigérateur et la placer dans l'incubateur, à la température optimale de la croissance du germe à étudier (45°C) pendant 24 h (Vedel, 2005).

**8-2-5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La CMI (la concentration minimale inhibitrice) est définie comme la plus petite concentration d'un composé antimicrobien qui inhibe la croissance d'une souche après une période d'incubation appropriée. Elle est déterminée *in vitro* par des dilutions en gélose ou en bouillon. Les bactéries cibles sont testées pour leur capacité à montrer une croissance visible sur une série de boîtes de Pétri contenant milieu gélosé (dilution en gélose) ou sur des microplaques (micro-dilution en bouillon) contenant des dilutions appropriées de l'agent antimicrobien (antibactérien dans ce cas-là). L'observation est réalisée après 24h d'incubation, la plus faible concentration dans laquelle il n'y a pas de croissance visible du germe cible correspond à la CMI (Khanna *et al.*, 2011).

**Méthode de microplaque en milieu liquide :**

Dans le but de déterminer l'activité antibactérienne et la CMI de la souche bactérienne (si elle est capable de produire des métabolites secondaires bioactifs), des pré-cultures ont été préparées par l'ensemencement de 50 mL de Muller Hinton (MH) liquide (dans des Erlenmeyers de 250 mL), incubées à une température de 30°C pendant 72 h avec une agitation de 150 rpm. Cette pré-culture (après 3 jours d'incubation) est utilisée pour

ensemencer les Erlenmeyers (de 50 mL de MH dans des erlenmeyers de 250 mL) considérés comme des cultures.

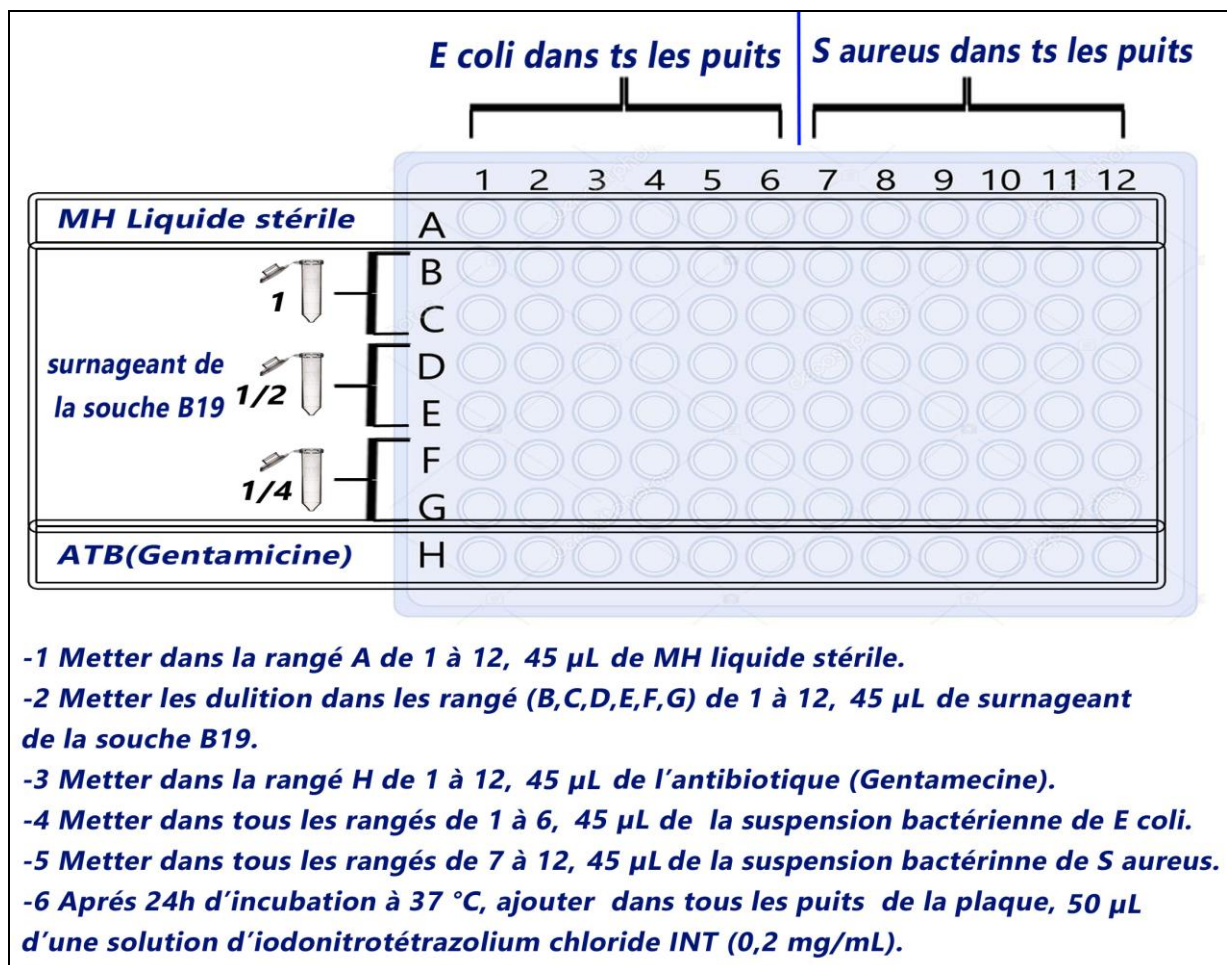
Après une période d'incubation de 5 jours, un volume de 2 mL est prélevé dans des Eppendorfs stériles, et la biomasse bactérienne est éliminée par centrifugation à une vitesse de 12000 rpm pendant 10 min. Plusieurs dilutions (1, 1/2, 1/4) ont été réalisées à partir de surnageant obtenu (qui contient éventuellement des métabolites bioactifs).

Préparation dans des tubes à essai stérile des suspensions bactériennes contenant  $10^6$  UFC/mL de souches références à étudier (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

Préparation dans un tube à essai 10 mL du milieu de culture MH liquide stérile.

Préparation de la solution d'antibiotique (gentamicine 1 mg/mL et 2 mg/mL), dissous dans l'eau distillée stérile.

Préparation de la solution d'iodonitrotétrazolium chloride 'INT' (0,2 mg/mL) dissous dans l'eau distillée stérile, initialement de couleur jaune, qui est un indicateur de la croissance bactérienne après sa réduction en formazane de couleur rouge rosé.



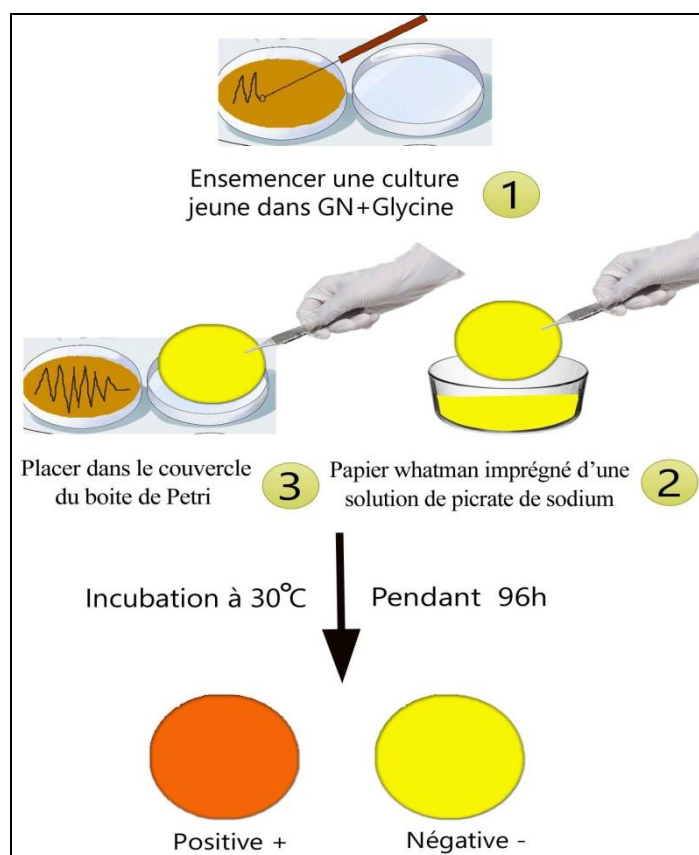
**Figure 5.** Représentation schématique de la méthode de micro-dilution.

### 8-2-6- Production de cyanure d'hydrogène

La production d'HCN (le cyanure d'hydrogène) a été recherchée suivant le protocole de Lorck (1948). Sur une gélose nutritive additionnée de 4,4 g/L de glycine préalablement filtrée (Microfiltration).

Les isolats bactériens sont ensemencés par stries.

Un disque de papier Whatman N°2 saturé en picrate alcalin (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé dans les couvercles des boîtes, ces dernières sont scellées avec du parafilm et incubées inversées à 30°C durant 96 h. Le virage de la couleur du papier Whatman du jaune vers l'orange (ou le marron) indique la production de l'HCN.



**Figure 6.** Protocole de Lorck (1948).

### 8-2-7- Solubilisation du phosphate sur le milieu solide

La capacité des souches bactériennes à libérer le phosphore soluble a été testée sur milieu Pikovskaya (PVK) solide (Pikovskaya, 1948) contenant 0,07% de phosphate tricalcique (PTC) comme seule source de phosphore. L'ensemencement par touche est réalisée (4 point dans chaque boîte de Pétri) à la surface de la gélose PVK. Après 10 jours d'incubation à 30°C, la solubilisation du phosphate a été mise en évidence par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie. Les diamètres des halos de solubilisation qui entourent

les souches bactériennes ont été mesurés (halo + colonie). Les résultats ont été exprimés par calcul de l'efficacité de solubilisation (Nguyen *et al.*, 1992) par la formule suivante :

$$\text{Efficacité de la solubilisation \%} = (\text{diamètre de halo} / \text{diamètre de colonie}) \times 100$$

### **8-3- Caractéristiques biochimiques**

#### **8-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires**

##### **8-3-1-1- Recherche de la catalase**

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



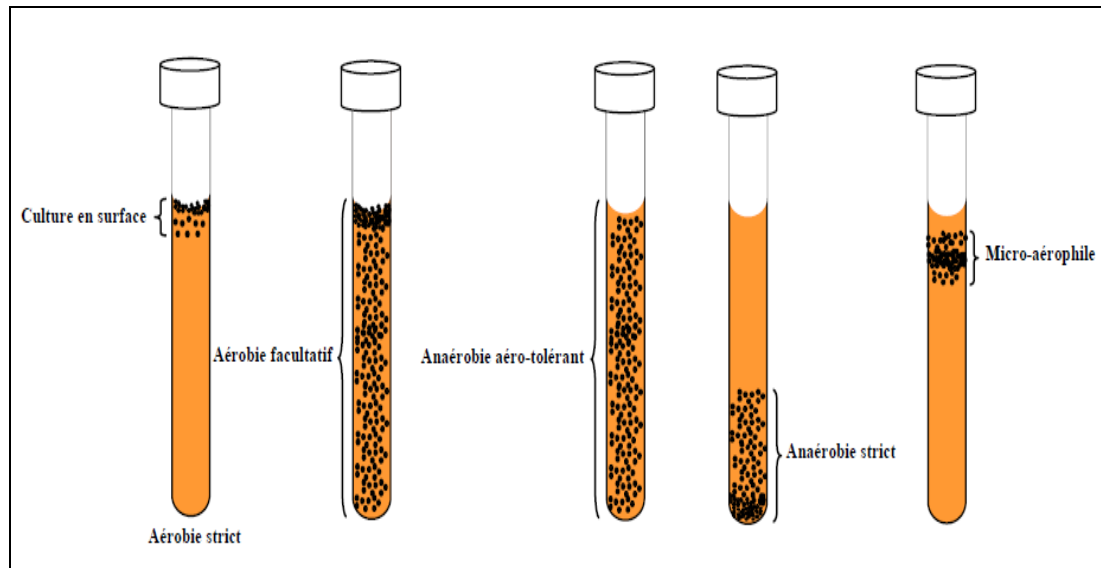
- Déposer une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes sur une lame (ou directement sur la culture bactérienne), et émulsionner un peu de la colonie.
- Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène : et donc le test catalase est positif; et s'il n'y a pas de bulles : le test catalase est négatif (Delarras, 2007).

##### **8-3-1-2- Recherche de l'oxydase**

A partir d'une culture jeune ensemencée sur le milieu GN, une colonie est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur puis mise en contact avec un disque d'oxydase (Haimedea, de diamètre de 6 mm). Les bactéries produisant l'enzyme, oxydent le réactif afin de former un composé violet. La couleur du papier devient alors violette après 30 à 60 secondes, si la couleur persiste pendant 15 minutes environ, le test est oxydase positif (Delarras, 2014).

##### **8-3-2- Type respiratoire**

La mise en évidence du type respiratoire des souches (Figure 7) est réalisée selon le protocole de Guiraud (1998), sur une gélose profonde viande foie (VF) (Annexe 4) coulés dans des tubes à vis. Au moment de l'emploi, la gélose est régénérée (par chauffage au bain marie bouillant à 100°C pendant 30 minutes), puis maintenue en surfusion à 45°C. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur qui est plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemercer uniformément le milieu semi-solide. Après refroidissement (immédiat) et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures.



**Figure 7.** Détermination de type respiratoire sur milieu viande foie (Prescott, 2002).

### 8-3-3- Culture en anaérobiose

Une anaérobiose sans oxygène peut être facilement réalisée en utilisant un récipient fermé dans lequel on place une bougie allumée à côté des boîtes de Pétri ou des tubes de milieux de culture. Le récipient est fermé et la bougie s'éteint au bout de quelques instants en ayant consommé de l'oxygène et libéré du dioxyde de carbone (Guiraud et Galzy, 1980). Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 heures. Lorsqu'il y a une croissance, la bactérie est dans ce cas-là anaérobic strict.

### 8-3-4- Galerie Api 20<sup>E</sup> (Bio Mérieux)

La galerie API 20<sup>E</sup> comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés (par l'addition des réactifs) et la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture. L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification par *Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)* et *Excel Identification Program (EIP)*.

✓ Préparation de la galerie :

- Répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

✓ Préparation de l'inoculum :

- Introduire environ 5 mL d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.
- Avec la pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé.

- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

✓ Inoculation de la galerie API 20<sup>E</sup> :

Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, remplir tubes et cupules des tests CIT, VP et GEL.

\* Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.




























\* Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LCD, ODC, URE et H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine (ou sirop de paraffine).

\* Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 18 à 24 heures.

✓ Lecture :

Après incubation, la lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture ci-dessous :

**Tableau 2.** Lecture de la galerie API 20<sup>E</sup>.

Microtube	Substrat :	Caractère recherché :	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Beta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S		Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif chlorure de fer III		 
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter une goutte de réactif Kovacs	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de VP1 et VP2 Attendre 10 minutes		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase		Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Nitrate réductase		<b>Lecture indirecte</b> Ajouter 1 goutte de NIT1 et NIT2 et zinc éventuellement		

### 8-3-5- Galerie Api 50 CH (Bio Mérieux)

Le milieu API 50 CHB medium destiné à l'identification du genre *Bacillus* et germes apparentés est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation et ou l'oxydation de 49 sucres. La bactérie à tester est mise en suspension dans le milieu CHB/E (voir Annexe 4) puis inoculée dans chaque tube de la galerie. Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à des acides organiques qui provoquent le virage de

l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification de la bactérie à l'aide des logiciels et des programmes d'identification.

### **8-3-6- Mise en évidence des enzymes extracellulaires**

Les isolats sont soumis à une recherche de différents enzymes extracellulaires à 30°C pendant 1 à 2 jours.

#### **8-3-6-1- Recherche de l'Amylase**

La présence de l'activité amylolytique est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon. Après incubation de 48 h, les colonies sont recouvertes par une solution de Lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre les zones contenant de l'amidon se colorent en brun-marron (Fooladi *et al.*, 2010).

#### **8-3-6-2- Recherche de la Gélatinase**

La présence de l'activité gélatinolytique est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à gélatine. Après incubation de 48 h, les colonies sont recouvertes par une solution de Frazier (voir Annexe 3). L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre les zones contenant de gélatine (et donc, l'absence de la gélatinase) se forme d'un halo transparent (Fooladi *et al.*, 2010).

### **8-3-7- Mise en évidence de métabolites secondaires**

L'objectif de cette partie est de tester les substances (éventuellement bioactives) à partir d'une culture liquide (filtrat de culture ou surnageant) des bactéries étudiées. Le filtrat peut être analysé directement ou après extraction (par des solvants organiques) (Khanna *et al.*, 2011).

- Dans le but de chercher les métabolites secondaires secrétés par la souche bactérienne, des pré-cultures de la souche ont été préparées par l'ensemencement dans des 3 Erlenmeyers stérile de 250 mL contenant 50 mL de bouillon nutritif, incubées à une température de 30°C pendant 96 heures sous agitation de 150 rpm.
- Une suspension bactérienne d'un volume de 20 mL est placée dans un tube à essai stérile.
- Une suspension bactérienne d'un volume de 50 mL est prélevée dans des bouteilles de centrifugeuse stérile. La biomasse bactérienne (le culot) est écartée par centrifugation à une vitesse de 4000×g pendant 10 min.
- Un volume de 50 mL est mis dans une ampoule à décanter puis ajouter 100 mL d'acétate d'éthyle.

- Agiter l'ensemble, et de temps en temps dégazer en ouvrant le robinet et en maintenant l'ampoule à décanter tête en bas. Les substances à extraire initialement dans le mélange aqueux est alors transférée dans le solvant d'extraction et laisser à décanter pour récupérer la phase organique.
- Replacer l'ampoule à décanter sur son support et retirer le bouchon. Deux phases liquides décanter. Récupérer la phase organique dans un bécher en ouvrant le robinet de l'ampoule, puis en le fermant avant que l'autre solvant ne coule. Récupérer l'autre phase organique dans un autre récipient en ouvrant de nouveau le robinet.
- Peser l'ampoule de rota-vapeur vide.
- évaporer la phase organique par Rota-vapeur a 150 rpm, 50°C pendant 20 min.
- Après le séchage, ajouter 10 mL du méthanol pour récupérer la phase organique.

### **Criblage chimique**

Le but de ces tests est de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires dans la suspension bactérienne de B19 et les substances organiques récupérer.

#### **i. Tanins**

Un volume de 1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) est mélangé avec quelques gouttes d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  (1%). Le mélange est incubé pendant 15 min à 50°C.

La présence des alcaloïdes est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noire.

#### **ii. Flavonoïdes**

##### **a. Anthocyanes**

Un volume de 1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) puis ajouter 1 mL d'HCl (2N) et 1 mL d'hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Une coloration rouge en milieu acide et bleu violacée en milieu basique témoigne de la présence d'anthocyanes.

##### **b. Réaction à la cyanidine**

Un volume de 1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) on ajoute 1 mL d'éthanol chlorhydrique (éthanol 95°, eau distillée et acide chlorhydrique R en volume égale de 5 mL) en suite copeaux de magnésium et 1 mL d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration sur la couche du surnageant d'alcool isoamylique indique la présence des flavonoïdes.

- Une coloration rose-orangé indique la présence des flavones flavones.
- Une coloration rose-violacé indique la présence des flavanones.



- Une coloration rouge indique la présence des flavonols et flavanonols. On effectue la réaction de la cyanidine sans ajouter des copeaux de magnésium et on chauffe pendant 10 min au bain mariné. En présence des leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacé; les catéchols donnent une teinte brune-rouge.

### **iii. Coumarines**

1 mL d'extrait bactérien (extrait organique récupéré et filtrat de culture) on ajoute 1,5 mL d'NaOH (10%) puis une agitation. L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des coumarines.

### **iv. Quinones libres**

1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) plus quelques gouttes d'NaOH (1%) développe une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet, révèle la présence des quinones libres.

### **v. Alcaloïdes**

5 mL d'acide chlorhydrique (1%) plus 1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture), le mélange est chauffé au bain marie puis on divise en deux volume égaux. Un volume est traité par 5 gouttes de réactif de Mayer (1,36 g HgCl<sub>2</sub>; 5 g KI; eau distillée q.s.p 100 mL), l'autre par 5 gouttes de réactif de Wagner (2 g KI; 1,27 g d'iode; eau distillée q.s.p 100 mL).

La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

### **vi. Terpénoides**

5 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) est ajouté à 2 mL de chloroforme et 3 mL d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase indique la présence des terpénoides.

### **vii. Saponosides (Test de mousse)**

Dans un tube à essai, 10 mL de l'extrait (extrait récupérer ou suspension bactérienne) est agité énergétiquement pendant 15 secondes, puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistance supérieur à 1 cm indique la présence de saponosides.

### **viii. Stéroïdes**

Dans un tube à essai, on introduit 1 mL d'anhydride acétique à 1 mL d'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) puis on ajoute 0,1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive.

### **ix. Composés réducteurs**

Leur détection consiste à traiter 1 mL de l'extrait (extrait organique récupéré et filtrat de culture) avec 2 mL de l'eau distillée et 2 mL de la liqueur de Fehling puis les tubes sont chauffés au bain marie à 40°C. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

### **8-3-8- Production des Exopolysaccharides (EPS)**

Des ensemencements sont réalisés par repiquage de la bactérie étudiée, à l'aide d'une anse à platine on ensemence en stries dans les boîtes de Pétri contenant le milieu RCV-saccharose (voir Annexe 4). Ce milieu est utilisé pour l'isolement et la sélection des souches bactériennes productrices d'exopolysaccharides (EPS), il est très riche en saccharose (20 g/L) de manière à stimuler la production des EPS. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 10 jours, les colonies bactériennes dites productrices d'EPS sont reconnaissables par leurs aspect gommeux et visqueux.

### **8-3-9- Capacité de dégradation des hydrocarbures (Gasoil)**

Afin de confirmer et d'estimer la production de biosurfactants par les souches sélectionnées, nous avons réalisé le test d'émulsifiations qui consiste à mélanger 3 mL de culture bactérienne avec 2 mL de gasoil (60/40 v/v).

A partir des échantillons bactériens, 1 mL est prélevé puis mélangé à 9 mL de milieu minéral d'enrichissement Bushnell and Haas (BH) (voir Annexe 4). Le milieu est additionné de pétrole (gasoil) comme seule source de carbone. Le mélange est agité énergiquement pendant 2 min, et incubé à 30°C sous agitation pendant 24h à 7 jours (culture bactérienne) (Lahreche et Bouhamida 2017).

Nous avons prélevé quelques colonies dans un tube contient 3 mL de milieu Bushnell Haas et on a ajouté 2 mL de gasoil (stérilisé par filtration).

Incubation pendant 24 h.

Puis mesuré l'index d'émulsion' : E24.

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut ou le gasoil) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 mL du milieu de culture (de fermentation) avec 2 mL de pétrole brute (gasoil) dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3min. Puis après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de (E24) selon la relation à après.

Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Puis le calcul d'E24 est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion.

Après 24 heures on mesure la hauteur de l'émulsion et on calcule l'E24 :

$$E24 = (he / ht) \times 100$$

- **he**: hauteur d'émulsion.

- **ht**: hauteur total.

#### **8-4- Tentative d'identification des espèces bactériennes :**

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API par la souche choisie sont introduits dans plusieurs programmes d'identification.

##### **8-4-1- Identification par *Excel Identification Program (EIP)* :**

Il s'agit d'un fichier Excel permettant l'identification d'une souche bactérienne à partir de son profil obtenu sur micro-galerie d'identification API CH50.

##### **8-4-2- Identification par *Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)***

*ABIS* en ligne est un outil de laboratoire pour l'identification bactérienne. C'est ouvert pour l'usage public, mais son utilisation, exige encore un nom de l'utilisateur. Cela sera utilisé pour imprimer les résultats.

#### **9- Identification géotypique**

##### **9-1- Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S**

Le séquençage d'un ADN, consiste à déterminer la succession des nucléotides qui le composent. La méthode de séquençage de Maxam-Gilbert utilise des produits chimiques pour rompre l'ADN et déterminer sa séquence. Par ailleurs, Frederick Sanger a mis au point la seconde méthode, de Maxam et Gilbert. Le séquençage par la méthode de Sanger est devenu la méthode de choix dans ce présent travail, les amplifias d'ADN sont purifiés à partir du gel d'agarose par l'utilisation d'un kit (InstaGene Matrix (BIO-RAD, cat.no:732-6030)), séquencés par le laboratoire (MACROGEN, Holland) par l'application de la technologie de séquençage (ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type)).

NB : Le protocole d'extraction d'ADN est mentionné sur site de Macrogene.

##### **La programmation du Thermocycleur**

La PCR est réalisée par l'utilisation d'un thermocycleur DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD), programmé comme suite :

Dénaturation initial : 95 °C pendant 5 minutes 1 cycle

Dénaturation : 95 °C pendant 30 seconds

Hybridation : 55 °C pendant 30 seconds 35 cycles

Extension : 72 °C pendant 90 seconds

Extension finale : 72 °C pendant 7 minutes 1 cycle

## **9-2- Analyse phylogénétique**

Dans le but de déterminer le degré d'homologie (de similitude) des souches isolées, le BLAST N, programme incorporé dans la base de données *EzBioCloud*, est utilisé. Ce programme permet de repérer des séquences nucléotidiques et la comparaison entre un ou plusieurs gènes. Ensuite, des alignements multiples ont été performés grâce au programme CLUSTAL W program (Higgins *et al.*, 1996 in Tifrit ,2016) afin de générer un fichier téléchargeable et exploitable par les logiciels d'analyse phylogénétique. Dans cette étude le programme MEGA X software (Tamura *et al.*, 2013 in Tifrit ,2016) est utilisé pour construire un arbre phylogénétique interactif et estimer la distances évolutive en se basant sur le principe de *neighbor joining method* (Weisburg *et al.*, 1991 in Tifrit ,2016). La méthode *Composite Likelihood (MCL)* est appliquée pour apprécier la distance évolutive entre l'ensemble des paires de séquences avec une valeur de 1000 bootstrap (Felsenstein, 2004 in Tifrit ,2016).

# **CHAPITRE III**

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

## 1- Résultats des analyses physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des sols ont été étudiées car elles possèdent une influence importante sur les propriétés biologiques des sols comme la diversité et la distribution des microorganismes. Les caractéristiques physico-chimiques des échantillons analysés (A et B) sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 3):

$$C\% = \frac{0.39(10 - 14.5 \times 0.55)}{1} / C\% = 0.789 / M.O\% = \frac{100}{58} C\%,$$

$$M.O\% = 0.789 \times 1.724 / M.O\% = 1.36$$

**Tableau 3.** Résultats des analyses physico-chimiques du sol.

Échantillon	A	B
<b>Caractéristique</b>		
<b>Teneur en eau (Humidité %)</b>	1,343	2,788
<b>pH</b>	8,78	8,33
<b>Conductivité électrique (µS/cm)</b>	275	862
<b>Matière organique (M.O %)</b>	1,36	1,36
<b>Carbone organique (%)</b>	0,789	0,789

## 2- Résultats de l'isolement

Après un traitement thermique à 120 °C (pendant 10 min), l'échantillon mère et les dilutions décimales ont été ensemencés et incubés sous différentes conditions (Tableau 4):

- Milieu GN incubé à 60 °C pendant 9 jours.
- Milieu GN en présence de 10% NaCl et incubé à 60 °C pendant 9 jours.

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4.

**Tableau 4.** Les résultats de l'isolement de différentes conditions.

Echantillon	Température 60°C						Température 60°C + 10% NaCl					
	10 <sup>-1</sup>		10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-1</sup>		10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>	
<b>A</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(B19)	(N19)										
<b>B</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Il est à noter qu'aucun isolat bactérien n'a été isolé dans les milieux de culture incubés en présence de 10% NaCl à une température de 60°C, et donc apparemment pas de bactérie thermo-halophile dans les échantillons analysés.

### 3- Résultats de l'identification phénotypique

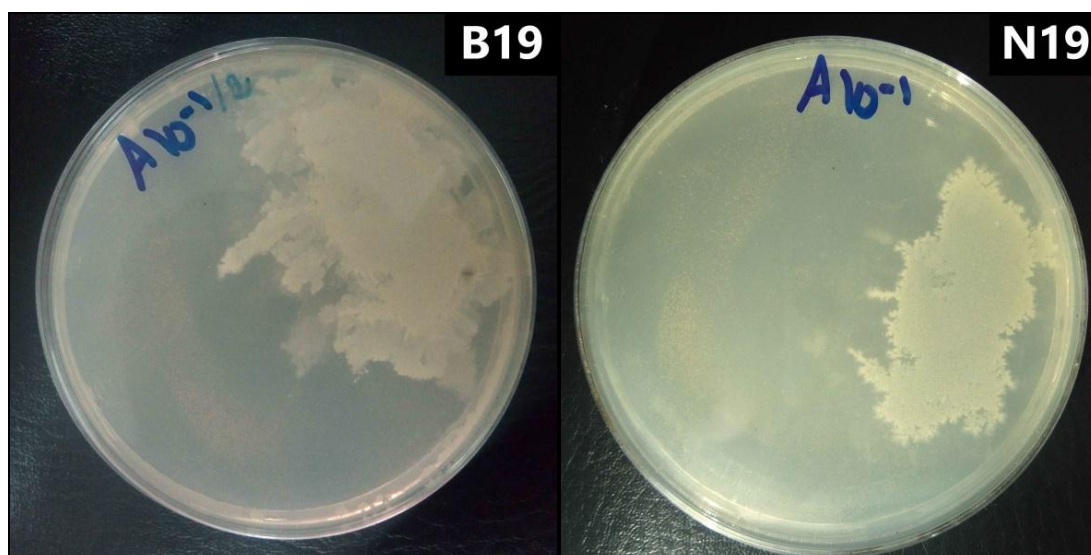
#### 3-1- Résultats de l'identification morphologiques

##### 3-1-1- Aspect macroscopique

Deux souches bactériennes ont été isolées sur milieu GN à partir de la solution mère de l'échantillon A (après une période d'incubation de 9 jours à 60°C) (photo 1 Ces dernières sont désignées selon un code composé de lettre et de numéros de (B19 et N19) (Tableau 5).

**Tableau 5.** Aspect macroscopique de B19 et N19 isolées à 60°C.

Souche	Taille (cm)	Forme	Aspect	Relief	Opacité	Couleur	Consistance
<b>B19</b>	4,5	irrégulière	Lisse et brillante	plate	Semi transparente	beige	crémeuse
<b>N19</b>	3,5	irrégulière	Lisse et brillante	plate	Semi transparente	beige	crémeuse



**Photo 1.** Aspects macroscopiques de deux souches (B19 et N19) isolées sur GN après 9 jours d'incubation à 60°C (Photo prises avec un Smartphone : Condor P6 pro LTE).

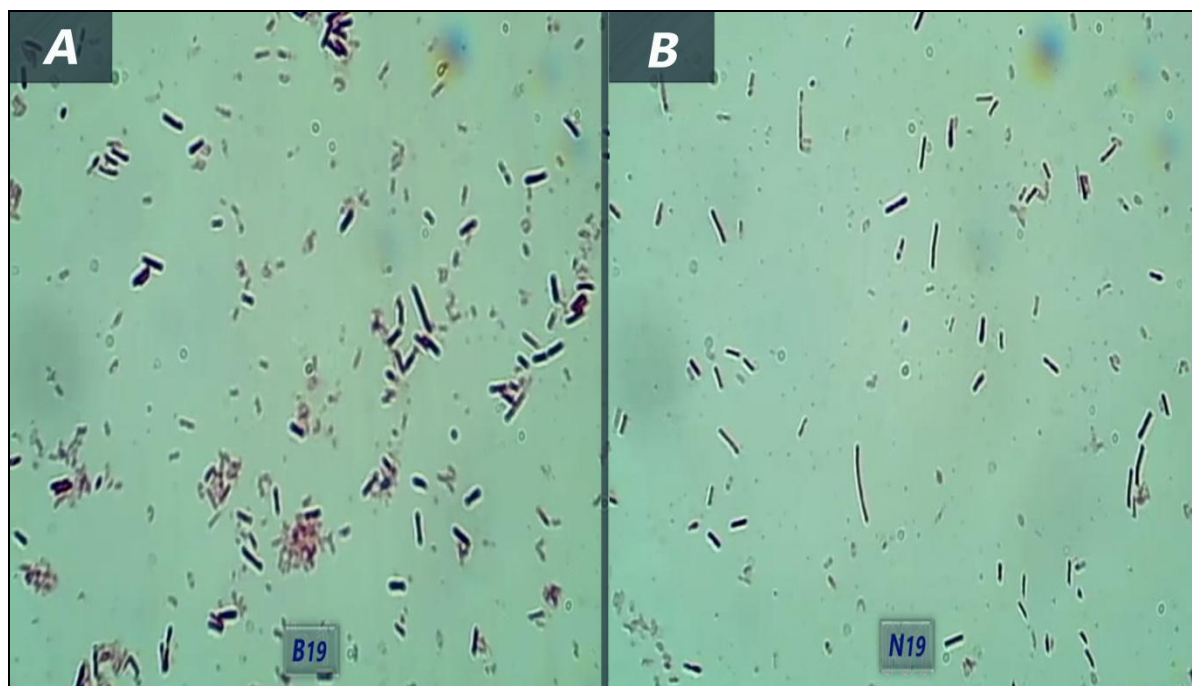
##### 3-1-2- Aspect microscopique

###### 3-1-2-1- Examen à l'état frais

L'observation, au microscope optique, de l'état frais montre que les cellules de 2 souches sont en forme de bâtonnets.

###### 3-1-2-2- Coloration de Gram

L'observation des frottis fixés, après coloration de Gram, des souches révèle que les cellules sont des bacilles à Gram positif (Photo 2).



**Photo 2.** Aspect microscopique de les souches sélectionnées **B19** et **N19** :

**A** et **B** : Coloration de Gram de la souche **B19** et **N19**.

(Observation par microscope optique G×100 à immersion).

### 3-2- Résultats des tests physiologiques

#### 3-2-1- Effet de la température

L'étude de la variation de la température de croissance de B19 et N19 a été faite sur un milieu GN solide, après une incubation de 24 heures à : 5°C, 15°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 60°C, 65°C, 70°C et 75°C. Les résultats de l'observation sont présentés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Résultats de la croissance de B19 et N19 sur milieu GN solide à différentes températures (avec un pH = 7 et [NaCl] = 0,3%).

Souches	N19	B19
Températures		
5°C	-	-
15°C	-	-
25°C	+++	+++
30°C	+++	+++
37°C	+++	+++
45°C	++	++
60°C	++	++
65°C	++	++
70°C	+	+
75°C	-	-

(-) : absence de croissance, (+) : faible croissance, (++) : bonne croissance, (+++) : très bonne croissance.



### 3-2-2-Effet de pH

L'étude de variation du pH a été effectuée pour les deux souches de B19 et N19 inoculées dans un milieu GN solide à T = 60°C avec différentes valeurs de pH : 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 et 12.

La lecture des résultats a été faite comme cité précédemment et les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7):

**Tableau 7.** Résultats obtenus lors du test de variation du pH de B19 et N19 sur un milieu GN solide (à T = 60°C et [NaCl] =0,3%).

La Souche pH	N19	B19
3	-	-
4	-	-
5	+	+
6	++	++
7	+++	+++
8	++	++
9	+	+
10	+	+
11	-	-
12	-	-

(-) : absence de croissance, (+) : faible croissance, (++) : bonne croissance, (+++) : très bonne croissance.

### 3-2-3-Effet de la concentration en NaCl

L'influence de la concentration du NaCl sur la croissance de B19 et N19 a été étudiée pour des concentrations allant de 1% à 10%. Après incubation à 60°C pendant 48 heures, la lecture des résultats a été effectuée et notée comme précédemment décrit dans le tableau suivant (Tableau 8):

**Tableau 8.** Résultats obtenus lors du test de variation du [NaCl] de B19 et N19 sur milieu GN solide (à T = 60°C et pH = 7).

Souche NaCl %	N19	B19
1	+++	+++
2	++	++
3	+	+
4	+	+
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-

(-) : absence de croissance, (+) : faible croissance, (++) : bonne croissance, (+++) : très bonne croissance.

### 3-2-4-Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme a été réalisé pour les souches N19 et B19 vis-à-vis de 30 antibiotiques de différentes familles. La mesure du diamètre des zones d'inhibition pour chacun des antibiotiques testés permet de caractériser chaque souche comme étant sensibles ou résistantes. Les résultats de mesure des zones d'inhibitions sont mentionnés dans le Tableau 9.

**Tableau 9.** Résultats de l'antibiogramme.

Famille	ATB (en µg)	Diamètre de zone d'inhibition (cm)	
		Souche N19	Souche B19
<b>Aminopénicilline</b>	Amoxicilline + acide clavulanique (AMC 10/20)	-	-
<b>Aminosides</b>	Amikacine (AK 30)	-	-
	Gentamicine (GEN 10)	-	-
	Kanamycine (K 30)	-	-
	Tobramycine (TOB 10)	5	-
	Gentamicine haute niveau (HLG 120)	-	-
	Streptomycine haute niveau (HLS 300)	-	-
<b>Monobactame</b>	Aztréonam (ATM 30)	-	-
<b>Céphalosporine 3<sup>ème</sup> génération</b>	Ceftazidime (CAZ 30)	1,2	-
	Céfotaxime (CTX 30)	-	-
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol (C 30)	-	-
<b>Lincosamides</b>	Clindamycine (CD 2)	-	-
<b>Polypeptide</b>	Colistine (CL 25)	3,4	-
<b>Céphamycines</b>	Céfoxitine (CX 30)	-	-
<b>Macrolides</b>	Erythromycine (E 15)	-	-
<b>Carbapénème</b>	Imipénème (IPM 10)	-	-
<b>Quinolones 1<sup>ère</sup> génération</b>	Acide nalidixique (NA 30)	0,8	-
	Pipiraciline (PI 100)	-	-
<b>Fluoroquinolone</b>	Ofloxacine (OF 5)	-	-
<b>Pénicillines</b>	Oxacilline (OX 5)	4	-
	Pénicilline (P 10)		
<b>Carboxypénicillines</b>	Ticarcilline + acide clavulanique (TCC 75/10)	-	-
	Ticarcilline (TIC 75)	-	-
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline (TE 30)	-	-
<b>Glycopeptides</b>	Teicoplanine (TEC 30)	-	-
	Vancomycine (VA 30)	-	-
<b>Sulfamides</b>	Triméthoprime + Sulfaméthoxazoe (COT 25)	-	-
<b>Fusidanines</b>	Acide fusidique (FC 10)	-	-
<b>Rifamycines</b>	Rifampicine (R 5)	3,8	-
<b>Divers</b>	Fosfomycine (FO 200)	-	-

(-) : très sensible

Un exemple d'antibiogramme de la souche N19 est montré dans la Photo 3.

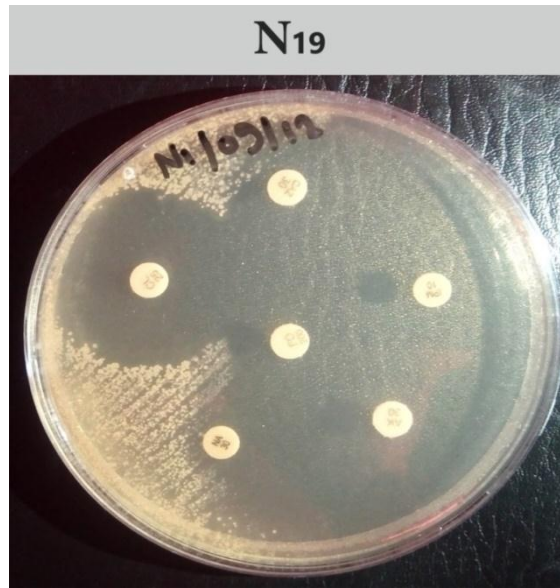


Photo 3. Exemple de résultat d'antibiogramme de la souche N19 et B19 vis-à-vis de différent antibiotiques.

**3-2-5-Détermination de la CMI**

Pour la méthode des micro-dilutions une plaque de 96 puits a été inoculée pour déterminer l'activité antimicrobienne de la souche B19. Un exemple des résultats obtenus est montré dans la Figure 8 et Photo 4.

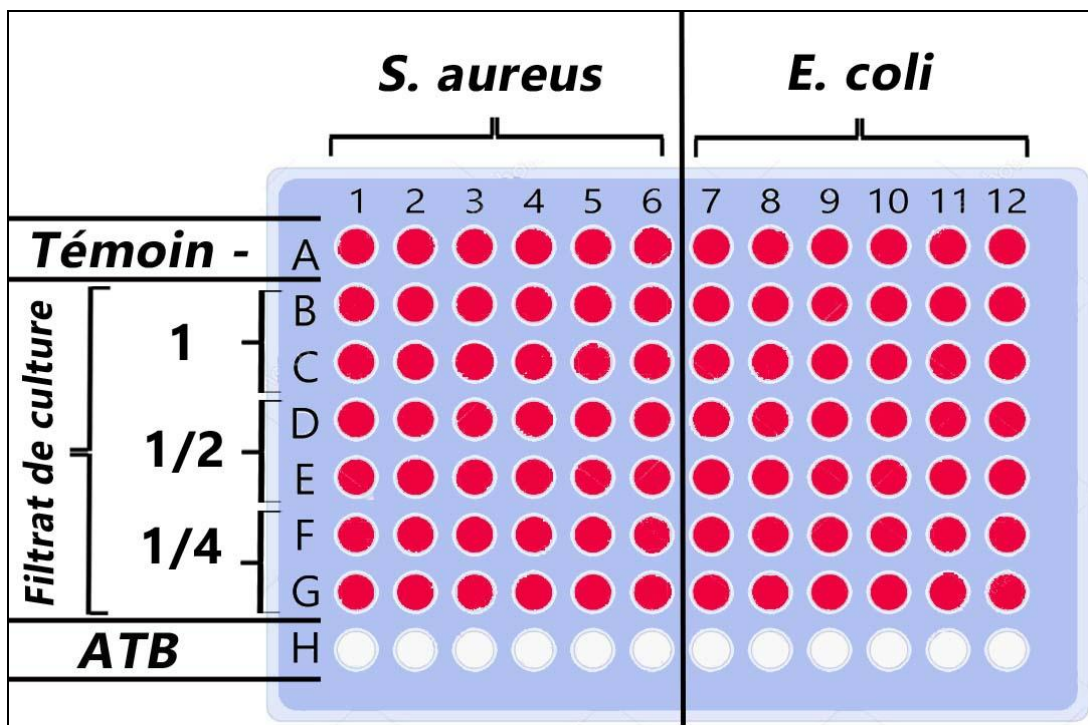
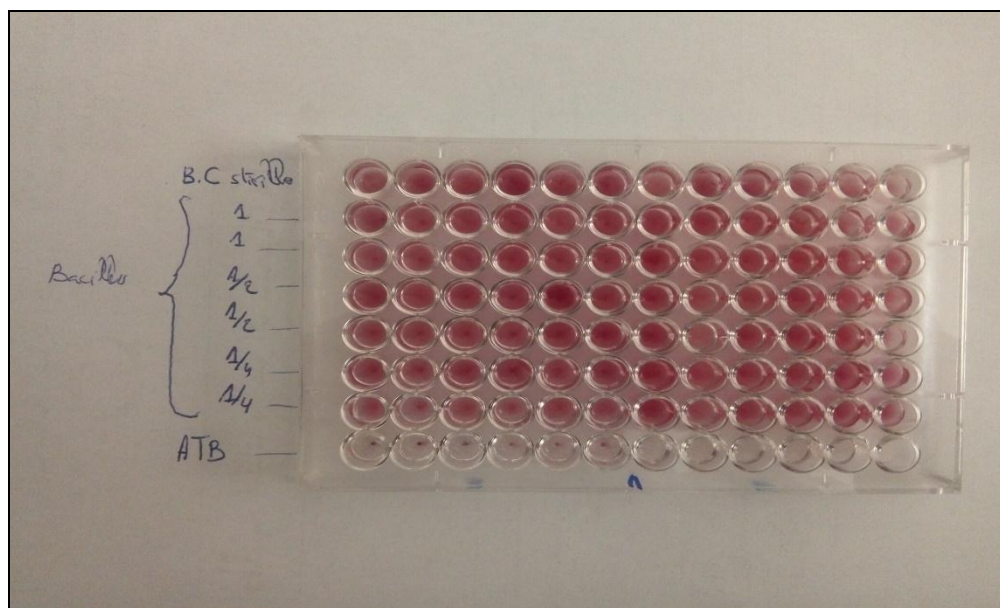


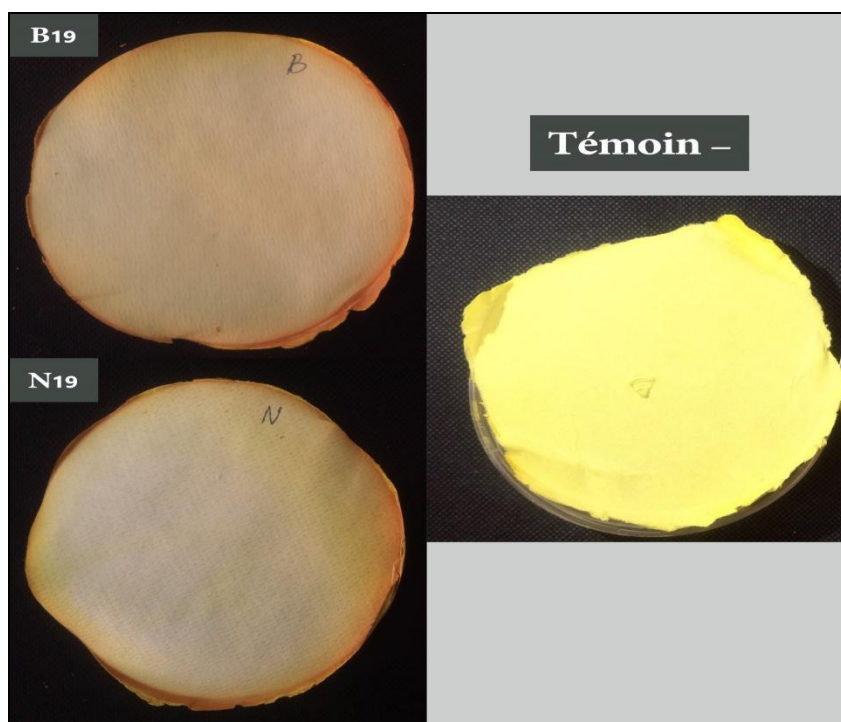
Figure 8. Représentation schématique des résultats de la CMI.



**Photo 4.** Résultat de test CMI pour la souche B19.

### 3-2-6-Production de cyanure d'hydrogène

Le cyanure d'hydrogène est l'un des produits impliqués dans l'élimination de divers agents phytopathogènes. Le virage de la couleur du papier Watman du jaune à l'orange (ou le marron) est un indicateur de la production de l'HCN. Les deux souches N19 et B19 testés, sont révélés productrices de l'HCN. (Photo 5).

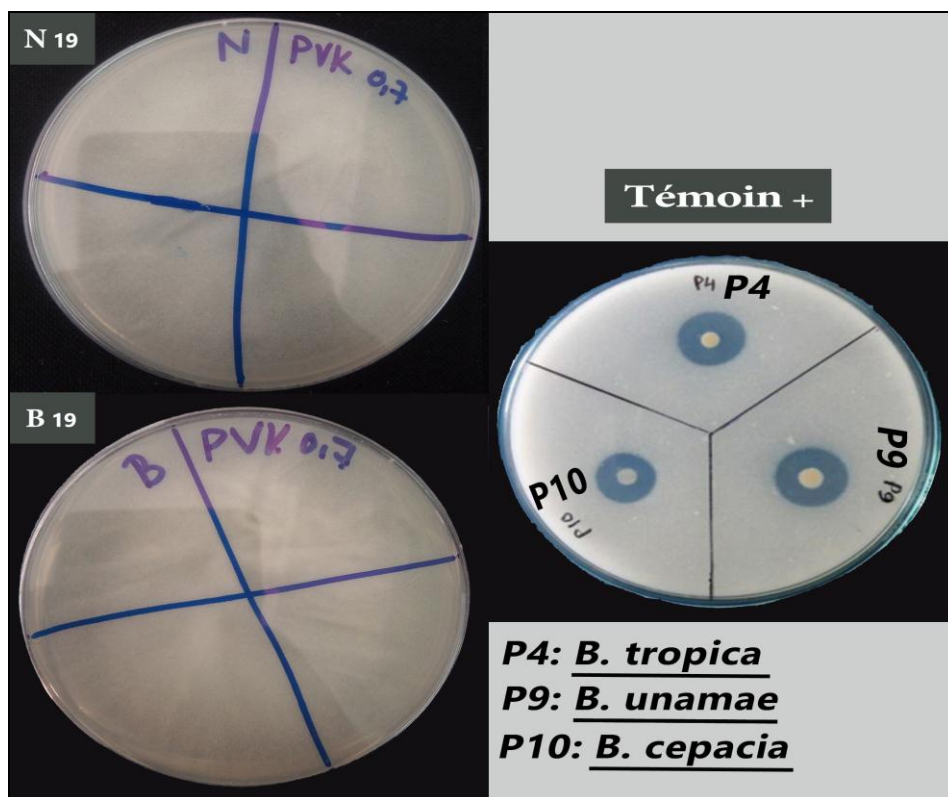


**Photo 5.** Aspect de résultat positif (HCN+) obtenu pour les souches B19 et N19.

### 3-2-7-Solubilisation du phosphate sur le milieu solide

La capacité des isolats microbiens à solubiliser le phosphate inorganique a été testée sur le milieu de culture solide PVK (Pikovskaya) contenant du phosphate tricalcique comme seule source de phosphore. Le pouvoir des bactéries à solubiliser le phosphate peut être visuellement remarqué par la production d'une zone claire autour des colonies bactériennes.

Après une période d'incubation de 10 jours à 30°C, les isolats N19 et B19 n'ont pas produit une zone claire autour de leurs colonies ce qui reflète l'absence de solubilisation de phosphate tricalcique (**Photo 6**), et donc la capacité de ces deux isolats à solubiliser le phosphate.



**Photo 6.** Résultat négatif de la solubilisation du phosphate inorganique obtenu pour les souches B19 et N19. Le témoin positif est obtenu par 3 souches qui solubilisent le phosphate (Ghosh *et al.*, 2015).

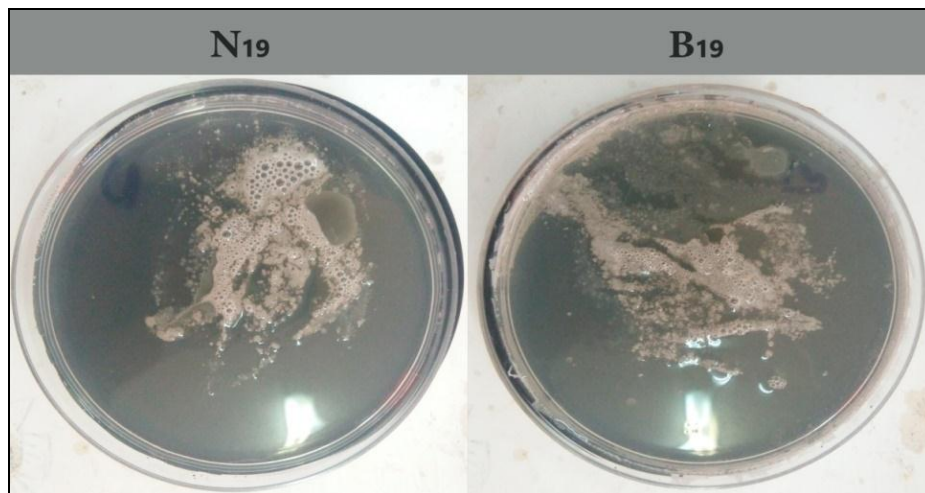
## 3-2- Résultats des tests biochimiques

### 3-2-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires

#### 3-3-1-1- Recherche de la catalase (test de la catalase)

Les résultats du test de la catalase pour l'étude du type respiratoire ont montré que les deux souches isolées N19 et B19 sont catalase positives; la réaction se traduit par le

dégagement immédiat de bulles d'oxygène (O<sub>2</sub>). Ce résultat confirme l'affiliation à priori de ses souches aux bactéries du genre *Bacillus* (Photo 7).



**Photo 7.** Résultat de test de la catalase.

### 3-3-1-2- Recherche d'oxydase (test d'oxydase)

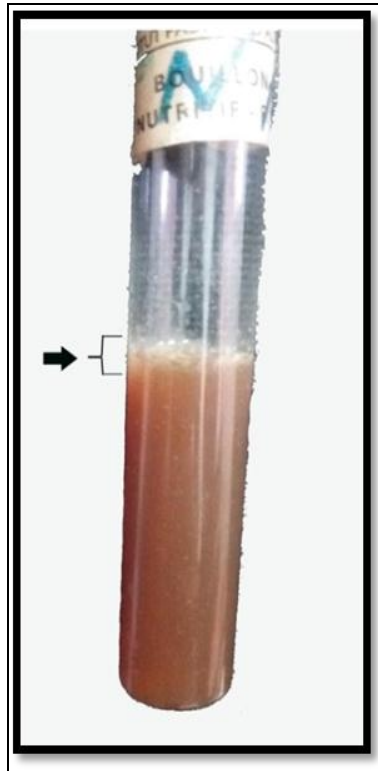
La couleur du disque en papier devient alors violette après 30 à 60 secondes, et si la couleur persiste pendant 15 minutes environ, le test est considéré oxydase positif (Photo 8).



**Photo 8.** Résultat du test d'oxydase.

### 3-3-2- Type respiratoire

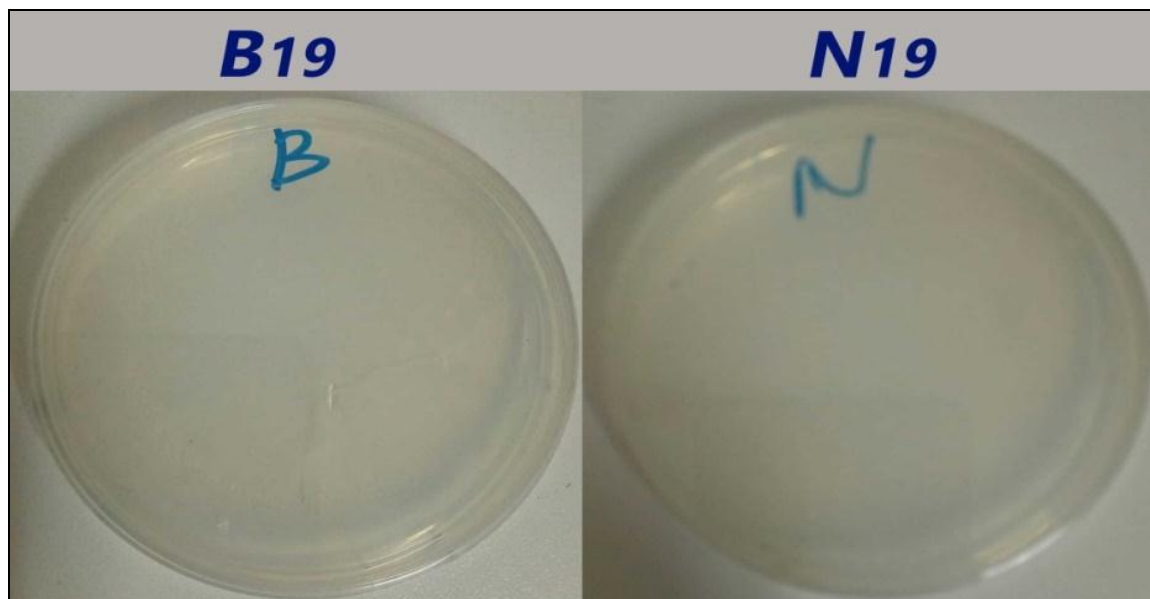
La mise en évidence du type respiratoire de les souches N19 et B19 sur une gélose profonde viande foie (VF), a montré une croissance à la surface du milieu de culture, ce qui nous mène à dire que les deux souches sont aérobie Stricte (photo 9).



**Photo 9.** Résultat de la recherche du type respiratoire (VF).

### 3-2-2- Culture en anaérobiose

Aucune souche bactérienne n'a poussée dans les milieux incubés à un milieu dépourvu d'O<sub>2</sub> (Photo 10), ce qui signifie que ces deux souches ne tolèrent pas l'absence de l'oxygène.



**Photo 10.** Résultat de la culture en anaérobiose.

### 3-2-3- Résultats de la galerie API 20<sup>E</sup>

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation de la plaque Api 20<sup>E</sup>. Les résultats des différents caractères biochimiques de la souche N19 et B19 par la galerie (après une période d'incubation de 24 heures à 37°C) sont résumés dans le Tableau 10 et les virages colorés sont montrés dans la photo 11.

**Tableau 10.** Résultats des tests biochimiques de la plaque API 20<sup>E</sup> de les souches N19 et B19.

<b>Tests du système API 20<sup>E</sup>, La souche N et B</b>			
<b>Test</b>		<b>N19</b>	<b>B19</b>
<b>ONPG</b>	β-Galactosidase	-	+
<b>ADH</b>	Arginine Dihydrolase	-	-
<b>LDC</b>	Lysine Décarboxylase	-	-
<b>ODC</b>	Ornithine Décarboxylase	-	-
<b>CTT</b>	Utilisation de Citrate	-	-
<b>H2S</b>	Production d'H <sub>2</sub> S	-	-
<b>URE</b>	Uréase	-	-
<b>TDA</b>	Tryptophane désaminase	-	-
<b>IND</b>	Production d'Indole	-	-
<b>VP</b>	Production d'Acétoïne (Voges Proskauer)	-	-
<b>GEL</b>	Gélatinase	+	+
<b>GLU</b>	fermentation / oxydation (Glucose)	-	-
<b>MAN</b>	fermentation / oxydation (Mannitol)	-	-
<b>INO</b>	fermentation / oxydation (Inositol)	-	-
<b>SOR</b>	fermentation / oxydation (Sorbitol)	-	-
<b>RHA</b>	fermentation / oxydation (Rhamnose)	-	-
<b>SAC</b>	fermentation / oxydation (Saccharose)	-	-
<b>MEL</b>	fermentation / oxydation (Melibiose)	-	-
<b>AMY</b>	fermentation / oxydation (Amygdalin)	-	-
<b>ARA</b>	fermentation / oxydation (Arabinose)	-	-

(-) Négative, (+) Positive





**Photo 11.** Résultat de l'inoculation des galeries API 20E par les souches N19 et B19 après une incubation de 24 h à 37°C.

### 3-2-4- Résultats de la galerie API CH 50

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation d'un deuxième type de galerie, il s'agit de la plaque Api CH50 par deux méthodes (en oxydation, sans ajouter l'huile de paraffine et en fermentation par l'ajout de l'huile de paraffine dans les puits). Les résultats des différents caractères biochimiques de la souche N19 et B19 après incubation à 37°C après 48h sont résumés dans le tableau 11 et le tableau 12, et les virages colorés sont présentés dans les photos 12 et 13.

**Tableau 11.** Résultats de tests biochimiques dans la plaque API CH50 en oxydation de la souche B19 après incubation à 37° C après 24h et 48h.

<b>Tests du système API CH50, La souche B19</b>					
<b>Test</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>Test</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
1. Glycerol	+	+	26. Salicin	-	-
2. Erythritol	-	-	27. D-Cellobiose	-	-
3. D-Arabinose	-	-	28. Maltose	-	-
4. L-Arabinose	-	-	29. D-Lactose (bovine origin)	-	-
5. D-Ribose	+	-	30. D-Melibiose	-	-
6. D-Xylose	-	-	31. Sucrose (D-Saccharose)	+	+
7. L-Xylose	-	-	32. Trehalose	-	-
8. D-Adonitol	-	-	33. Inulin	-	-
9. Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	34. Melezitose	-	-
10. Galactose	-	-	35. D-Raffinose	-	-
11. D-Glucose	+	+	36. Starch (amidon)	-	-
12. D-Fructose	+	+	37. Glycogen	-	-
13. D-Mannose	+	+	38. Xylitol	-	-
14. L-Sorbose	-	-	39. β-Gentiobiose	-	-
15. Rhamnose	-	-	40. D-Turanose	-	-
16. Dulcitol	-	-	41. D-Lyxose	-	-
17. Inositol	-	-	42. D-Tagatose	-	-
18. Mannitol	+	+	43. D-Fucose	-	-
19. Sorbitol	-	-	44. L-Fucose	-	-
20. Methyl-α D-Mannopyranoside	-	-	45. D-Arabitol	-	-
21. Methyl-α D-Glucopyranoside	-	-	46. L-Arabitol	-	-
22. N Acetylglucosamine	-	-	47. Potassium Gluconate	-	-
23. Amygdalin	-	-	48. Potassium 2-Ketogluconate	-	-
24. Arbutin	-	-	49. Potassium 5-Ketogluconate	-	-
25. Aesculin	-	+	50. D-Lyxose	-	-

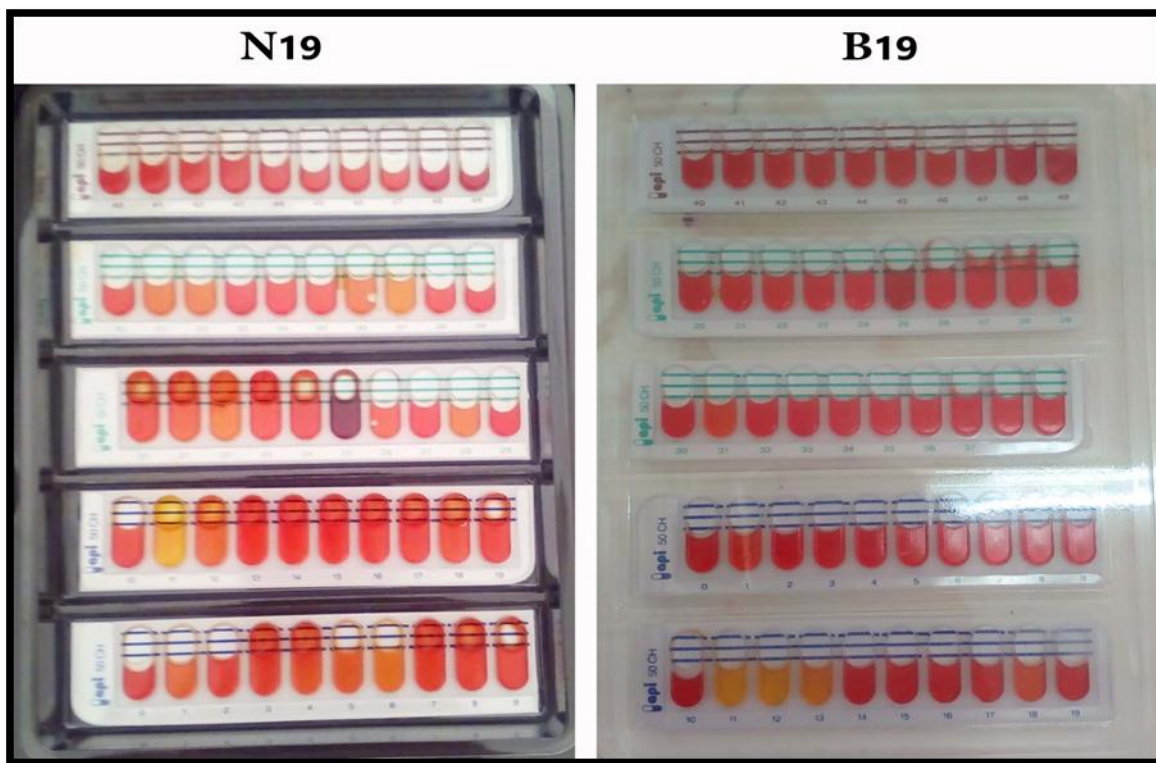
(-) Négative, (+) Positive

**Tableau 12.** Résultats de tests biochimiques dans la plaque API CH50 en oxydation de la souche N19 après incubation à 37° C pendant 24h et 48h.

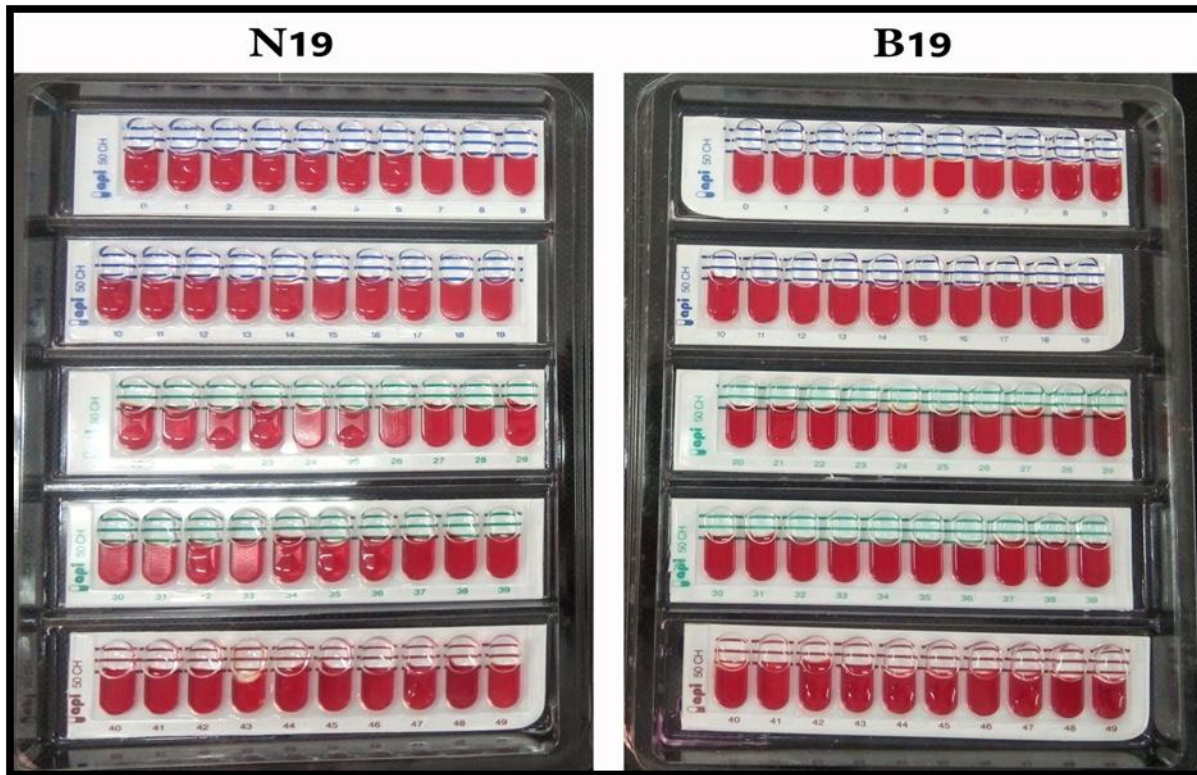
Tests du système API CH50, La souche N19					
Test	24h	48h	Test	24h	48h
1. Glycerol	-	-	26. Salicin	-	-
2. Erythritol	-	-	27. D-Cellobiose	-	-
3. D-Arabinose	-	-	28. Maltose	+	+
4. L-Arabinose	-	-	29. D-Lactose (bovine origin)	-	-
5. D-Ribose	-	-	30. D-Melibiose	-	-
6. D-Xylose	+	+	31. Sucrose (D-Saccharose)	+	+
7. L-Xylose	-	-	32. Trehalose	+	+
8. D-Adonitol	-	-	33. Inulin	-	-
9. Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	34. Melezitose	-	-
10. Galactose	-	-	35. D-Raffinose	-	-
11. D-Glucose	+	+	36. Starch (amidon)	+	+
12. D-Fructose	+	+	37. Glycogen	+	+
13. D-Mannose	-	-	38. Xylitol	-	-
14. L-Sorbose	-	-	39. β-Gentiobiose	-	-
15. Rhamnose	-	-	40. D-Turanose	-	-
16. Dulcitol	-	-	41. D-Lyxose	-	-
17. Inositol	-	-	42. D-Tagatose	-	-
18. Mannitol	-	-	43. D-Fucose	-	-
19. Sorbitol	-	-	44. L-Fucose	-	-
20. Methyl-α D-Mannopyranoside	-	-	45. D-Arabitol	-	-
21. Methyl-α D-Glucopyranoside	-	-	46. L-Arabitol	-	-
22. N Acetylglucosamine	+	+	47. Potassium Gluconate	-	-
23. Amygdalin	-	-	48. Potassium 2-Ketogluconate	-	-
24. Arbutin	-	-	49. Potassium 5-Ketogluconate	-	-
25. Aesculin	-	+	50. D-Lyxose	-	-

(-) Négative, (+) Positive

Il est à signaler que tous les résultats de la galerie CH50 obtenus en fermentation (avec l'ajout de l'huile de paraffine) sont négatif pour les deux souches testées B19 et N19.



**Photo 12.** Résultat de l'inoculation de la galerie API 50 CHB par la souche N19 et B19 après incubation à 30°C pendant 48 heures (en oxydation).



**Photo 13.** Résultat de l'inoculation de la galerie API 50 CHB par la souche N19 et B19 après incubation à 30°C pendant 48 heures (en fermentation).

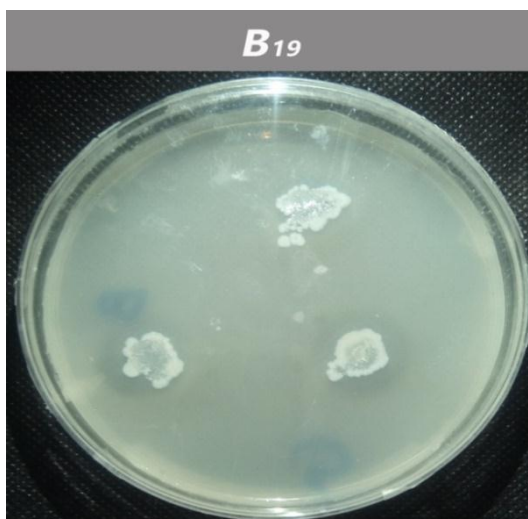
### 3-3-5- Résultats de la mise en évidence des activités enzymatiques

Les activités amylolytique et gélatinolytique ont été mises en évidence en utilisant les milieux : gélose a amidon, gélose a Gélatine, voir (**Photo 14**) et (**Photo 15**), les résultats sont mentionnés dans le tableau 13.

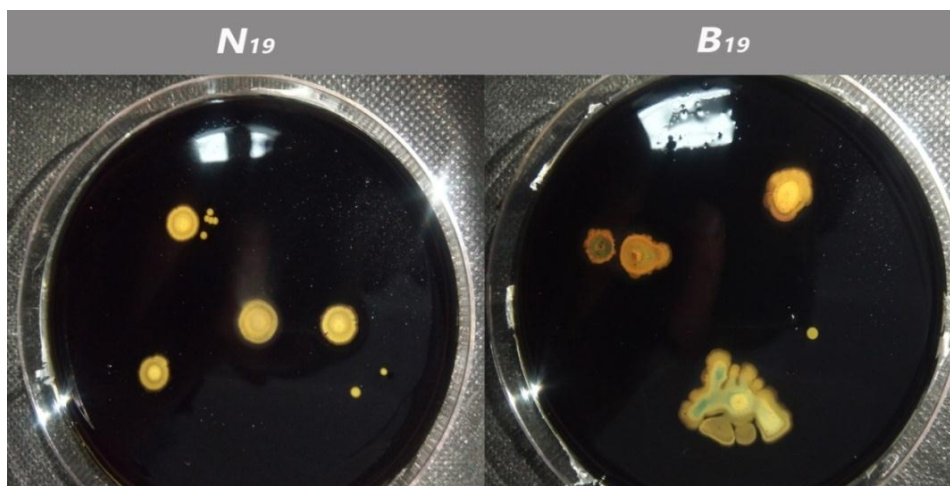
**Tableau 13.** Résultats de la mise en évidence les activités enzymatiques

Test	Test d'amidon	Test de Gélatine
Souche		
<b>B19</b>	-	+
<b>N19</b>	-	-

(-) Négative, (+) Positive



**Photo 14.** Test de Gélatinase.



**Photo 15.** Test d'amylase pour les deux souches N19 et B19.

### 3-3-7- Résultats du criblage chimique

Le but de ces tests est de mettre en évidence la présence de certains métabolites secondaires dans l'extrait bactérien et le filtrat de culture de la souche B19. Les résultats sont présentés dans le **tableau 14**.

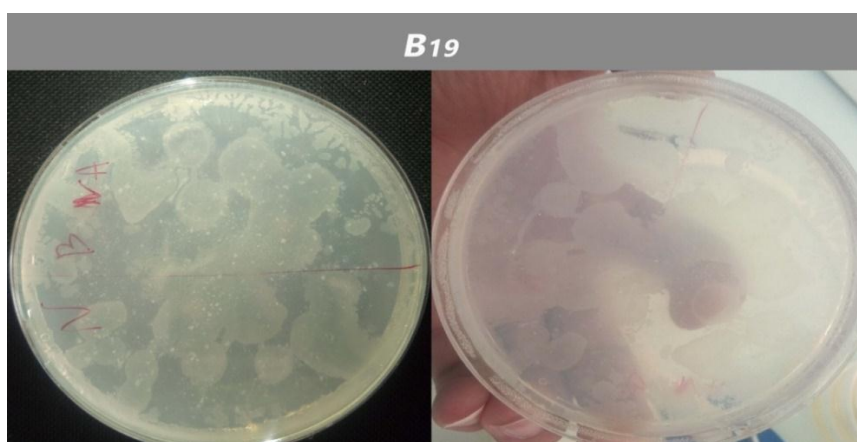
**Tableau 14.** Résultats de screening des métabolites secondaires de la souche B19.

Test	Souche	B19	
		Extrait	Filtrat
<b>Tanins</b>		-	-
<b>Flavonoïdes :</b>			
<b>Anthocyanes</b>		-	-
<b>Anthocyanes</b>		-	-
<b>Réaction à la cyanidine</b>		-	-
<b>Coumarines</b>		-	+
<b>Quinones libres</b>		-	+
<b>Alcaloïdes</b>		-	-
<b>Terpénoides</b>		-	-
<b>Saponosides</b>		-	-
<b>Stéroïdes</b>		-	-

(-) Absence, (+) Présence

### 3-3-8- Production des exopolysaccharides

Nous avons remarqué l'absence de l'aspect gélatineux pour la souche B19 cultivée sur milieu RCV-saccharose à 30°C pendant 10 jours, ce qui nous permet de confirmer que la souche B19 ne produit pas les exopolysaccharides (Photo 16).



**Photo 16.** Aspect de la souche B19 sur milieu RCV-saccharose.

### 3-3-9- Dégradation des hydrocarbures (Gasoil) et sécrétion des biosulfactants

**Tableau 15.** Résultats des paramètres de Dégradation des hydrocarbures (Gasoil) et sécrétion des biosulfactants.

souche		30°C
<b>N19</b>	Hauteur Total	37.25
	Hauteur émulsifié	00
	<b>Index E24 %</b>	00
<b>B19</b>	Hauteur Total	38.67
	Hauteur émulsifié	00
	<b>Index E24 %</b>	00

Culture en milieu Bushnell and Haas (BH) (Photo 17).



**Photo 17.** Résultat de la culture en milieu Bushnell and Haas (BH).

#### 4- Tentative d'identification de deux espèces bactériennes

##### 4-1- Identification par Excel Identification Program (EIP)

Le programme *Excel Identification Program (EIP)* suggère que la souche B19 appartient à l'espèce est une *Bacillus firmus* à une probabilité de 88,9% (Figure 9).

résultats		Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité
1	Bacillus firmus	0,889	0,48	0	Excellente Id	Bonne typicité
2	Aneurinibacillus aneurinilyticus	0,108	0,29	0	mauvaise indentifica	Bonne typicité
3	Brevibacillus non réactive	0,002	-0,18	0	mauvaise indentifica	mauvaise typicité
4	Bacillus smithii	0,000	-0,16	2	mauvaise indentifica	mauvaise typicité
5	Breibacillus agri	0,000	-0,36	3	mauvaise indentifica	mauvaise typicité

**Figure 9.** Résultats d'identification de la souche B19 par *Excel Identification Program*.

Le même programme (*EIP*) suggère que la souche N19 appartient à l'espèce *Bacillus cereus* 'groupe 2' à une probabilité de 46,8% (Figure 10).

API 50 CHB V4.0		Proba	typicité	Incompa.	Test sur proba	Test sur typicité
1	Bacillus cereus 2	0,468	0,52	0	Bonne Id	TB typicité
2	Bacillus anthracis	0,443	0,50	0	Bonne Id	TB typicité
3	Bacillus mycoides	0,078	0,37	0	mauvaise indentifica	Bonne typicité
4	Bacillus firmus	0,010	0,38	0	mauvaise indentifica	Bonne typicité
5	Bacillus cereus 1	0,001	0,05	0	mauvaise indentifica	mauvaise typicité

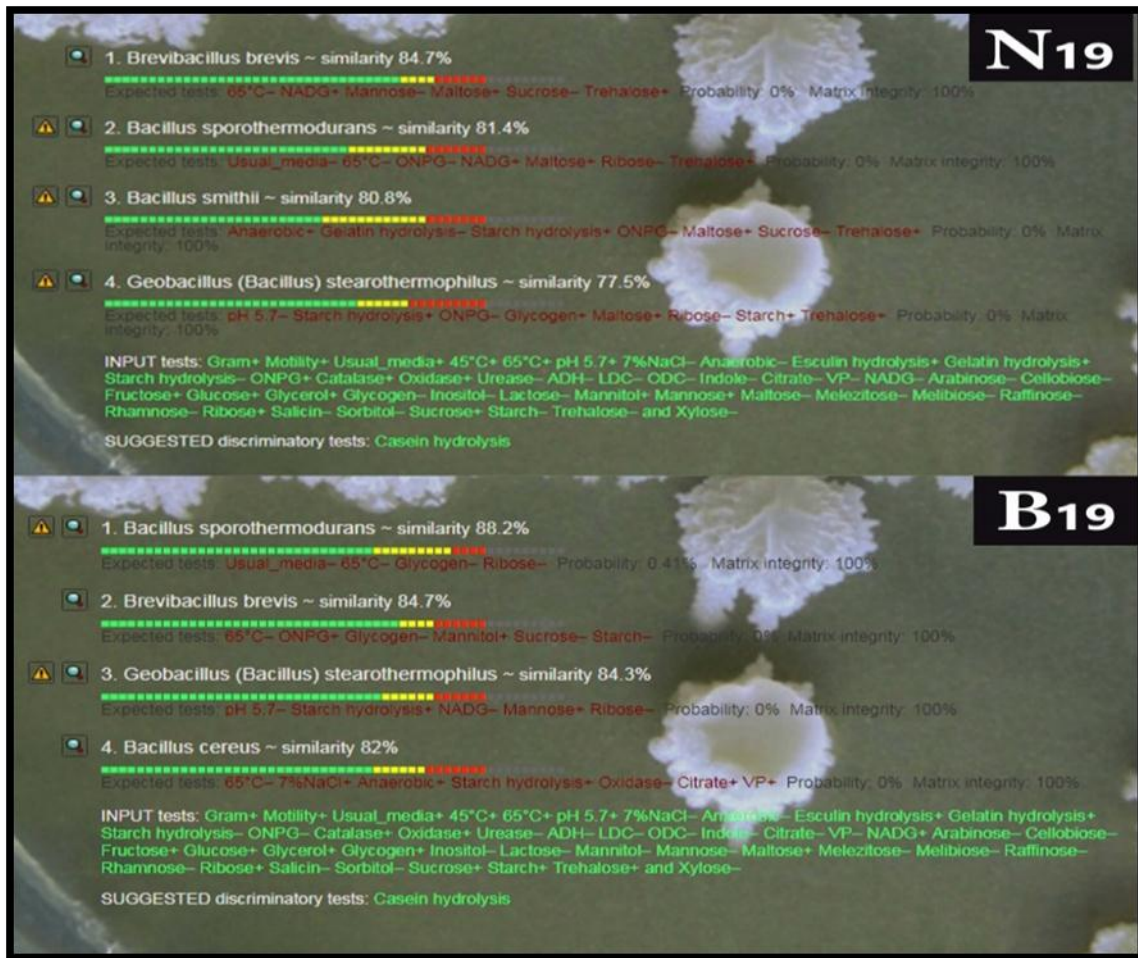
**Figure 10.** Résultats d'identification par Excel Identification Program de la souche B19.

##### 4-2- Identification par *Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)*

ABIS online identifie la souche isolée N19 été identifié come *Brevibacillus brevis* à une probabilité de 84,7%, et comme *Bacillus sporothermodurans* à une probabilité de 81,4%, et comme *Bacillus smithii* à une probabilité de 80,8%, et comme *Geobacillus stearothermophilus* à une probabilité de 80,8%.

De plus, la souche B19 été identifié comme *Bacillus sporothermodurans* à une probabilité de 88,2%, et comme *Brevibacillus brevis* à une probabilité de 84,7%, et comme *Geobacillus stearothermophilus* à 84,3 % et comme *Bacillus cereus* à 82 % (Figure 11).





**Figure 11.** Résultats d'identification par *ABIS online* de deux souches B19 et N19.

## 5- Résultats de l'étude moléculaire

Le séquençage de l'ARNr 16S a été réalisé pour les deux souches thermophiles isolées de la région de Sabkha (Metlili). Les séquences d'ARNr 16S de deux souches bactériennes étudiées reçues de laboratoire MACROGEN (Holland) sont données dans l'annexe 4.

Les séquences d'ARNr 16S obtenues ont été alignées et comparées avec les séquences des souches-types (espèces) des bactéries contenues dans la base de données génomique *Eztaxon-e* (*EzBioCloud*). Ceci afin de connaître le degré de similitude (similarité) et de déterminer l'identité taxonomique de chaque souche étudiée. Les résultats de BLAST montrent la relation entre la requête Query (la séquence étudiée) et les meilleurs sujets c'est-à-dire les espèces les plus proches (les séquences issues de la base de données *EzBioCloud*) complémentaires. Ainsi, les résultats des séquences consensus blastées de deux souches et les souches apparentées à celles-ci sont présentés dans les Figures 12 et 13.

Species	Accession	Similarity (%)	Count	Taxonomy	Score
<i>Parageobacillus caldxylosilyticus</i>	NBRC 107762(T)	98.90	16/1456	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Geobacillus galactosidasius</i>	CF1B(T)	98.14	25/1346	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	94.4
CM002692_s	NUB3621	97.73	33/1456	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Parageobacillus toebii</i>	NBRC 107807(T)	97.53	36/1456	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	F84b(T)	97.21	39/1400	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus;Geobacillus thermodenitrificans	94.7
<i>Parageobacillus thermantarcticus</i>	DSM 9572(T)	97.18	41/1455	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	NBRC 107763(T)	96.91	45/1456	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Saccharococcus thermophilus</i>	ATCC 43125(T)	96.80	46/1439	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	100.0
<i>Geobacillus icigianus</i>	G1w1(T)	96.48	46/1305	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	88.2
<i>Geobacillus lituanicus</i>	N-3(T)	95.88	60/1456	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	100.0

**Figure 12.** Capture d'écran de 10 meilleurs résultats d'alignement de la souche B19 sur le site *EzBioCloud*.

Species	Accession	Accession	Similarity (%)	Count	Taxonomy	Score
<i>Parageobacillus caldxylosilyticus</i>	NBRC 107762(T)	BAW001000028	98.83	17/1459	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Geobacillus galactosidasius</i>	CF1B(T)	AM408559	98.22	24/1345	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	94.4
CM002692_s	NUB3621	CM002692	97.67	34/1459	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Parageobacillus toebii</i>	NBRC 107807(T)	BDAQ01000034	97.46	37/1459	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Parageobacillus thermantarcticus</i>	DSM 9572(T)	FR749957	97.12	42/1458	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> subsp. <i>calidus</i>	F84b(T)	EU477773	97.07	41/1400	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus;Geobacillus thermodenitrificans	94.7
<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>	NBRC 107763(T)	BAWP01000055	96.85	46/1459	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Parageobacillus	100.0
<i>Saccharococcus thermophilus</i>	ATCC 43125(T)	X70430	96.74	47/1442	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	100.0
<i>Geobacillus icigianus</i>	G1w1(T)	KF631430	96.32	48/1305	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	88.2
<i>Geobacillus lituanicus</i>	N-3(T)	CP017692	95.82	61/1459	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Geobacillus	100.0

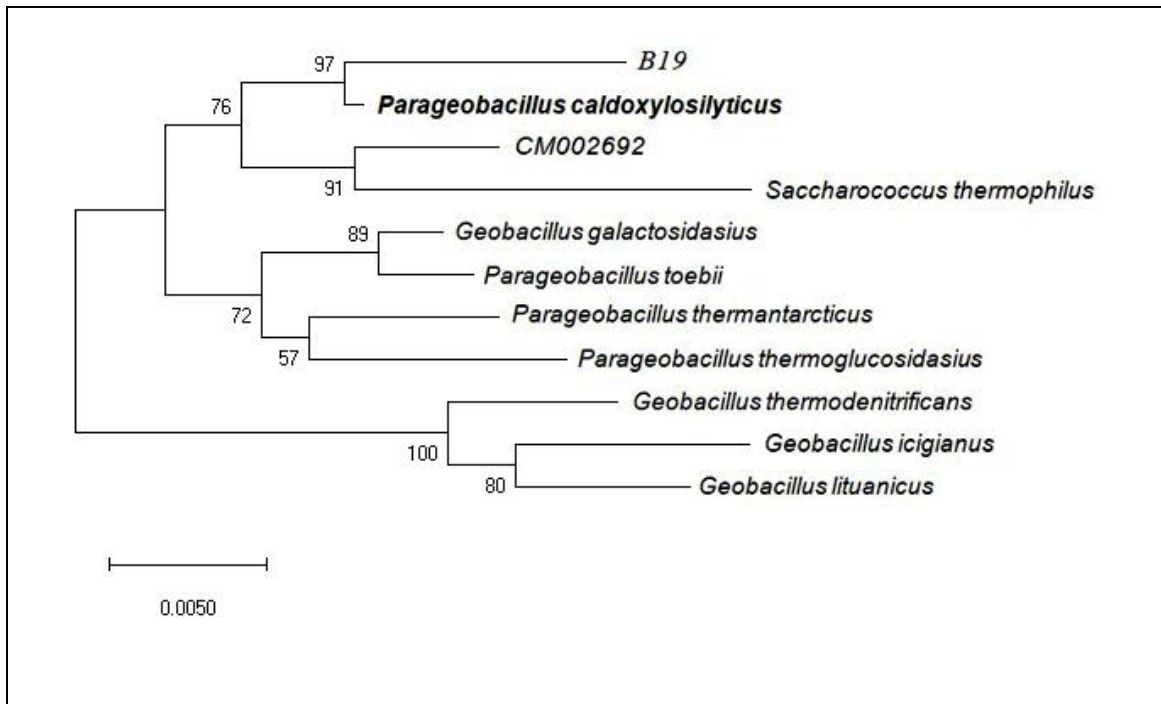
**Figure 13.** Capture d'écran de 10 meilleurs résultats d'alignement de la souche N19 sur le site *EzBioCloud*.

Les résultats obtenus montrent que les deux souches isolées sont très proches de l'espèce *Geobacillus caldxylosilyticu*, avec 98,90% de similitude pour la souche B19 et 98,83% de similarité pour la souche N19.

### 5-1- Analyse phylogénétique

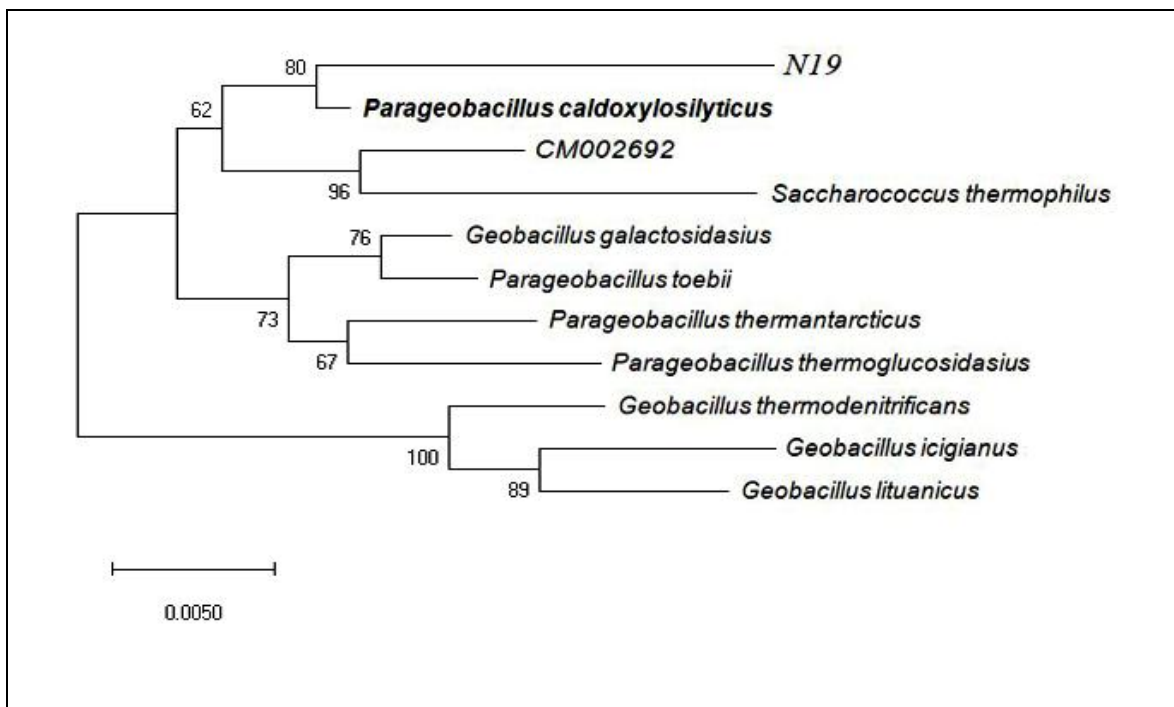
La construction de l'arbre phylogénétique interactif des souches B19 et N19 a été réalisée en estimant les distances évolutives entre l'ensemble des paires de séquences avec une valeur de 1000 bootstraps par le programme MEGA X.

La souche B19 est assignée au genre *Geobacillus* (auparavant *Parageobacillus*). Elles forment une lignée distincte dans l'arbre phylogénétique (Figure 14). De plus, elle se sépare nettement des souches types connues du genre *Geobacillus*.



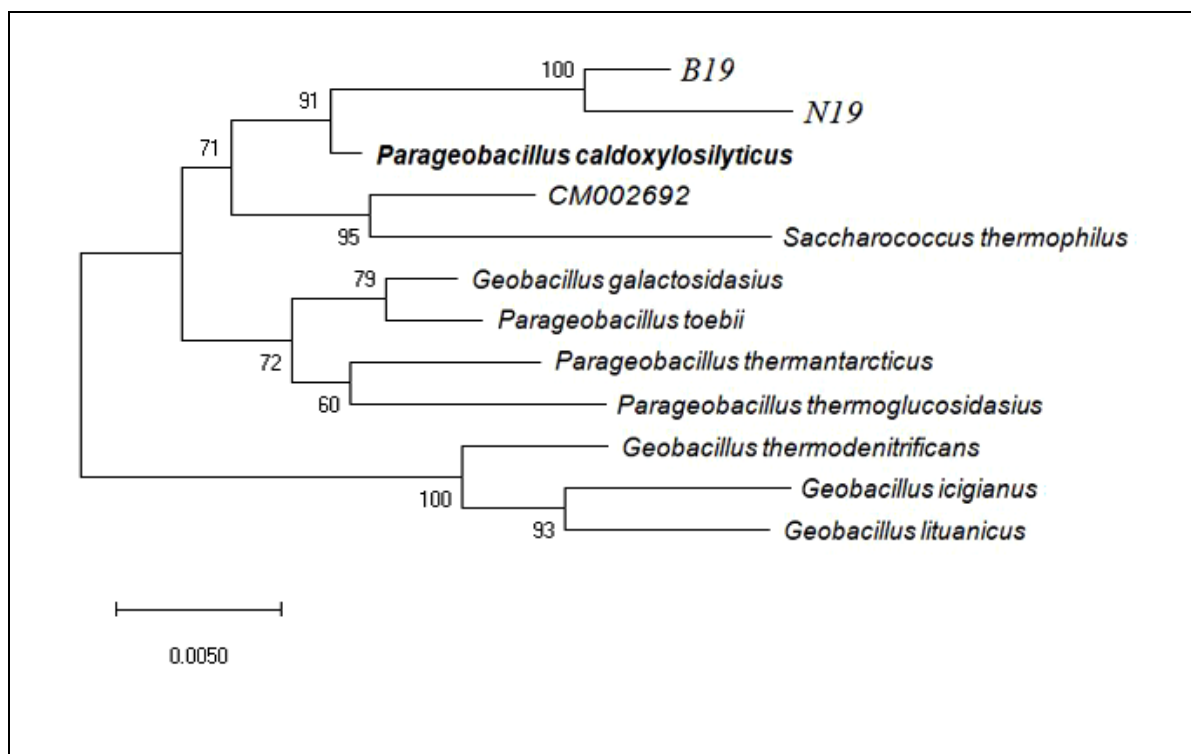
**Figure 14.** Dendrogramme de la position taxonomique de souches B19 basé sur les séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X.

La souche N19 est assignée au genre *Geobacillus*, et elle forme une lignée distincte dans l'arbre phylogénétique (Figure 15). Cette souche étudiée se sépare clairement des autres espèces connues du genre *Geobacillus*.



**Figure 15.** Dendrogramme de la position taxonomique de souches N19 basé sur les séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X.

Le résultat obtenu pour les deux souches est présenté dans la Figure 16 pour montrer la relation phylogénique entre les deux souches isolées.



**Figure 16.** Dendrogramme de la position taxonomique de deux souches de *Geobacillus* isolées (B19 et N19) basé sur les séquences d'ARNr 16S par le logiciel MEGA X.

## Discussion

La stratégie abordée par ce travail repose sur le screening des bactéries extrêmophiles appartenant au *Bacillales* à partir d'échantillons du sol saharien prélevés d'une palmeraie de la région de Metlili (Sabkha) à Ghardaïa.

Les caractéristiques physico-chimiques influencent fortement les propriétés biologiques des sols. Des relations étroites ont d'ailleurs été mises en évidence entre celles-ci et les propriétés biologiques, et ceci aussi bien pour la microflore que pour la faune (Chaussod *et al.*, 1986, Vekemans *et al.*, 1989).

Un taux d'humidité de l'ordre de 2,788% pour l'échantillon (A) favorisé par un taux de teneur en eau de 27,88% par rapport au l'échantillon (B) qui a enregistré un taux d'humidité de l'ordre de 1,343% et un teneur en eau de l'ordre de 14,33%. Cette faible

teneur en eau peut s'expliquer d'une part par : l'aridité du climat (le taux d'évaporation est supérieur à celui des précipitations) (Bedjadj, 2011).

Les résultats obtenus concernant la conductivité électrique qui est de 275  $\mu\text{S}/\text{cm}$  pour l'échantillon (A) et 862  $\mu\text{S}/\text{cm}$  montrent que le sol (A) est non salé et le sol (B) est légèrement salé selon l'échelle de Durand J.H. (1983). En effet, la salinité affecte un milliard d'hectares de terre dans le monde majoritairement localisés dans les régions arides et semi-arides. La conductivité électrique définit la quantité totale en sels solubles correspondant à la salinité globale du sol, elle dépend de la teneur et de la nature des sels solubles présents dans ce sol (Guessoum, 2001). Les espèces microbiennes sont affectées à des degrés variables par la salinité (Dellal et Halitin, 1992).

Dans les régions arides, les sols sont généralement alcalins ( $7,5 < \text{pH} < 8,7$ ) (Aubert, 1978).

Un pH alcalin pour les deux échantillons : 8,78 pour (A) et 8,33 pour (B).

En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques, la teneur en matière organique l'ordre 1,36% pour les deux échantillons (A) et (B). Selon (Aubert, 1978), le sol où nous avons pris nos échantillons est moyennement riche en MO.

Le nombre dans le sol est énorme à condition que les conditions de vie, notamment l'approvisionnement alimentaire, sont adaptés. Le nombre de bactéries sont estimées par l'observation de la croissance des colonies sur des milieux nutritifs spéciaux qui ont été inoculés avec des gouttes d'un sol très dilué (dilution de la suspension de la méthode de la plaque). Si la bactérie ne peut être mise en culture, la dilution la plus élevée qui conserve des organismes viables est enregistré et utilisé pour calculer la taille de la population d'origine (nombre le plus probable (NPP) méthode) (White, 2006).

Les bactéries du sol, en dehors de leurs multiples interactions, vont réagir avec d'autres organismes tels que les végétaux pour assurer des bénéfices réciproques représentés principalement par un métabolisme énergétique qui va favoriser la multiplication du microbiote tellurique.

Les végétaux, en sécrétant dans le milieu extérieur des exsudats racinaires, vont 'réveiller' les bactéries qui vont croître et atteindre de fortes populations dans la zone rhizosphérique (jusqu'à  $10^{10}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de sol : entre 10 milliards et 1000 milliards !), bien plus que dans le sol environnant (Boulekzaz et Bouderbala, 2015).

Pour l'isolement sélectif, le choc thermique constitue une stratégie de base pour la sélection des bactéries sporulées qui permet l'élimination des formes végétatives, et les

formes sporulées se développent même dans les conditions défavorables (Lynn *et al.*, 1999).

Les deux échantillons analysés ont subi un traitement thermique à 120°C pendant 10 minutes (un demi-cycle de l'autoclavage) dans le but d'éliminer la totalité des formes végétatives, et donc isoler que les genres bactériens qui possèdent des endospores.

L'isolement a été réalisé sur gélose nutritive et deux souches ont été retenues à 60 °C sur milieu GN.

C'est le cas des isolats appartiennent à des bactéries thermophiles, qui poussent de façon optimale à des températures allant jusqu'à 60 °C, (Madigan *et al.*, 2006).

L'observation macroscopique après 9 jours d'incubation à 60 °C sur GN a permis l'observation deux colonies différentes, de forme irrégulière, dentelé, plate et lisse légèrement convexes avec un aspect visqueux, de couleur beige, jaunâtre et de diamètre entre 3,5 et 4,5 cm. Ces résultats sont de très haute importance car Ils confirment l'existence d'espèces bactériennes à l'état de la vie active dans le sol saharien malgré toutes les conditions difficiles qui le caractérisent. Ces espèces doivent alors être d'une résistance élevé et d'une spécificité remarquable pour pouvoir survivre dans de telles conditions (Ruyin *et al.*, 2014).

Les deux souches ont été choisies dans ce travail pour l'étude morphologique, physiologique et biochimique, sont nommés B19 et N19. Lors de l'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique à l'état frais suivie par une identification phénotypique a permis de révéler que les deux souches se présentent sous forme de bacilles longs, droits à extrémités arrondies et regroupés sous formes libres, à Gram positifs et mobiles.

Les résultats de test respiratoire de la catalase a montré que les deux souches analysée sont de catalase positive, et les deux souches ne pousse pas dans un milieu dépourvu de O<sub>2</sub>, donc, elles sont aérobie stricte. Ces résultats sont conformes au traits généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature (De Vos *et al.*, 2009).

L'étude physiologique des deux souches B19 et N19 sur milieu solide GN à différents conditions physico-chimiques (salinité, pH, et température) montre que les souches isolée

du sol pousse à des concentrations de 0 à 4% NaCl et elle peut être considérée comme halophile modérée selon Kushner (1978).

L'intervalle de température explorée varie de 25 à 70 °C. Les deux souches B19 et N19 sont capable de croître dans ces variations de températures. Elle s'agit donc d'une souche thermotolérante (Mégraud, 2011),

Concernant l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, l'antibiogramme a été réalisé pour les souches N19 et B19 vis-à-vis de 30 antibiotiques de différentes familles.

Les résultats de mesure des zones d'inhibitions révèlent que la souche B19 est très sensible vis-à-vis tous les antibiotiques testés, par ailleurs pour la souche N19 est signalé comme résistant au acide nalidixique (NA 30) et ceftazidime (CAZ 30) avec une zone d'inhibition de 0,8 et 1,2 cm respectivement, et faiblement résistant, au tobramycine (TOB 10), Colistine (CL 25), Oxacilline (OX 5) et Rifampicine (R 5), avec une zone d'inhibition varié entre 3,4 et 5 cm.

Pour la méthode des micro-dilutions une plaque de 96 puits a été inoculée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et l'activité antimicrobienne de la souche B19, une croissance bactérienne des souches de référence testés ont été marqué par l'apparition de la couleur rouge, donc le filtrat de culture de la souche B19 n'a pas d'effet antimicrobienne.

Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un composé volatile antimicrobien à large spectre impliqué dans le contrôle biologique des maladies des racines par *Pseudomonas fluorescens* associée aux plantes, il est produit en quantités différentes par différente espèces de *Pseudomonas*, mais aussi par d'autres bactéries (Weisskopf, 2013).

Les résultats obtenus après incubation montrent que les deux isolats B19 et N19 sont capable de produire l'HCN.

La capacité des isolats microbiens à solubiliser les phosphates a été testée sur le milieu de culture PVK (Pikovskaya) solide contenant du phosphate tricalcique comme seule source de phosphore.

Après une incubation de 10 jours à 30°C, les isolats B19 et N19 n'ont pas produit une zone claire autour de leurs colonies ce qui reflète aucune solubilisation de phosphate tricalcique.



L'étude biochimique des deux souches montre qu'elles possèdent la catalase et une oxydase positive donc elles sont biochimiquement identiques. Auparavant, il a été également signalé que les espèces du genre *Bacillus* soient connues par leur importante production de plusieurs types d'enzymes, et plusieurs processus industriels utilisent ces espèces pour la production d'enzymes commerciales (McConnell *et al.*, 1986).

D'après les données ainsi obtenues par le système API 20<sup>E</sup>, nous pouvons déduire les caractéristiques suivantes pour les deux souches isolée B19 et N19 :

- ✓ La souche B19 possède la  $\beta$ -galactosidase, la Gélatinase et pour la souche N19 produire que la Gélatinase mais pas de la  $\beta$ -galactosidase.
- ✓ Les deux souches n'ont pas la capacité de produire l'acétoïne, l'indole, sulfide d'Hydrogène, arginine dihydrolase, désaminase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, et aussi n'ont pas utilisé du Citrate ni d'hydrolyse de l'urée,
- ✓ Elles ne peuvent pas de se développer en utilisant le mannitol, le saccharose et l'amygdaline comme seule source de carbone tandis qu'elles ne fermentent pas le glucose, l'inositol, le sorbitol, le rhamnose, le mélibiose et l'arabinose.

Par ailleurs, la capacité à utiliser les différentes sources d'hydrates de carbone par les deux souches sélectionnées a été réalisée en utilisant la galerie API 50 CHB.

Selon les résultats obtenus, il en ressort que les deux souches sont capables d'assimiler le glucose, fructose, sucrose, aesculin. La souche B19 en plus elle est capable d'assimiler aussi le glycérol, mannose, et le mannitol, et concernant la souche N19 se diffère par l'assimilation de la xylose, N-Acétyleglucosamine, l'amidon, maltose, glycogène, et le tréhalose. Ces résultats sont en accord avec ceux émis par Logan et Berkeley, (1984), qui ont décrit un système pour l'identification rapide et précise d'isolats de *Bacillus* à l'aide d'une matrice de résultats de tests utilisant les galeries API 20E et API 50CHB. Néanmoins, il est à signaler que cette identification préliminaire des deux souches a été complétée par l'analyse du gène de la sous-unité ribosomique 16S (ARNr 16S).

Il est à signaler que tous les résultats de la galerie CH50 obtenus en fermentation (avec l'ajout de l'huile de paraffine) sont négatif pour les deux souches testées B19 et N19, donc les deux souches n'ont pas la capacité d'assimiler les sources d'hydrates de carbone en anaérobiose.

En se basant sur leur réponses aux différents tests physiologiques et biochimiques, ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* des études réalisées ont montré que les meilleures reproductions des tests pourrait être réalisée avec des plaques API qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus* (De vos *et al.*, 2009).

Les deux isolats étudiés ne possèdent pas une activité amylolytique. Et l'activité gélatinolytique n'est pas présente chez la souche N19 mais active dans la souche B19.

Le criblage chimique de B19 se fait pour l'extrait bactérien après extraction, et le filtrat de culture, les résultats montrent que seul les coumarines et les quinones libres sont présentes dans le filtrat de culture. Les autres critères biochimiques (les tanins, flavonoïdes, cyanidine, alcaloïdes, terpénoïdes, saponosides, et stéroïdes) n'ont pas révélé dans l'extrait organique et le filtrat de culture de la souche B19.

Les deux souches bactériennes sont cultivées sur milieu RCV- saccharose, elles ne possèdent pas l'aspect gélatineux après dix jours d'incubation à 30°C, donc nous avons déduire que B19 et N19 ne produit pas les exopolysaccharides.

Lahreche et Bouhamida (2017) ont isolées une souche de genre *Bacillus* qui a la capacité de dégrader le gazoil avec un index d'émulsion E24 de 44,28%.

De nombreuses espèces de *Geobacillus* ont été isolées de champs pétrolifères et plus particulièrement de puits de pétrole profonds. Sans surprise, ces organismes montrent des capacités bien développées pour dégrader une gamme d'hydrocarbures de différentes longueurs de chaîne\_(Banat et Marchant 2011).

La capacité de tous les *Geobacillus spp.* de dégrader de telles molécules n'a pas fait l'objet de recherches approfondies.

L'absence d'activité déclarée de dégradation des alcanes n'implique pas nécessairement l'incapacité de l'organisme à exercer cette activité, mais peut simplement indiquer qu'elle n'a pas été examinée. Nous pouvons donc dire que la dégradation des hydrocarbures est une capacité répandue des membres du genre *Geobacillus*, mais peut ne pas être universelle. Il y a eu peu de rapports sur la gamme d'hydrocarbures utilisés par certains organismes (Banat *et al.*, 2004).

Marchant *et al.*, (2002) ont examiné l'aptitude des isolats de sol de *G. caldoxylosilyticus*, *G. toebii* et *G. thermoleovorans* à utiliser une gamme d'alcanes allant du pentane au

nonadécane, y compris l'hexane, l'heptane, le dodécane, l'hexadécane et l'octadécane, ainsi que les hydrocarbures polyaromatiques, naphthalène, anthracène et kérosène.

Une caractéristique d'autres bactéries dégradant les hydrocarbures est la capacité de produire des molécules biosurfactantes cela peut rendre les hydrocarbures plus susceptibles de se dégrader. Il y a cependant, aucun cas de *Geobacillus spp.* produisant des biosurfactants, et nous n'avons jamais observé de preuves d'une telle production dans aucune de nos cultures (Banat et Marchant 2011).

Selon les différents programmes utilisés pour déterminer le pourcentage de similarité pour les souches B19 et N19 avec les espèces répertoriées dans ces bases de données. Le programme *Excel Identification Program (EIP)* suggère que la souche B19 appartient à l'espèce est une *Bacillus firmus* à une probabilité de 88,9%.3. Alors que le programme ABIS online a identifié la souche B19 comme *Bacillus sporothermodurans* à une probabilité de 88,2%, et comme *Brevibacillus brevis* à une probabilité de 84,7%, et comme *Geobacillus stearothermophilus* à 84,3 % et comme *Bacillus cereus* à 82%.

Concernant la souche N19 Le programme *Excel Identification Program (EIP)* suggère que la souche N19 appartient à l'espèce *Bacillus cereus* 'groupe 2' à une probabilité de 46,8%. Alors que le programme ABIS online a identifié la souche N19 comme *Brevibacillus brevis* à une probabilité de 84,7%, et comme *Bacillus sporothermodurans* à une probabilité de 81,4%, et comme *Bacillus smithii* à une probabilité de 80,8%, et comme *Geobacillus stearothermophilus* à une probabilité de 80,8%.

Les résultats obtenus montrent que notre souche appartient à l'ordre des *Bacillales* et la famille des *Bacillaceae*. Les caractères distinctifs de cette famille sont la formation de spores de résistance dans les conditions défavorables et la forme bacillaire. Nous supposons que notre souche fait partie de l'un des 51 genres qui composent cet ordre familles. Puisqu'il s'agit de bacilles à Gram positif, aérobies stricte ayant une catalase et capables de former des spores, nous sommes probablement dans le genre *Bacillus*.

Enfin, la résistance à la température demeure l'un des principaux paramètres recherchés par les acteurs de la biotechnologie (Hashemi *et al.*, 2010). En outre, ce critère de choix a considérablement encouragé les chercheurs à isoler des microorganismes, capables de produire des enzymes d'un grand intérêt industriels (Shukla et Brett, 2013).

Malgré que les analyses phénotypiques soient importantes en taxonomie microbienne, et qu'elles soient généralement faciles à étudier et bien significatives vu que les critères phénotypiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables, il est difficile de déterminer l'identité des souches et de les rassembler dans le genre *Bacillus*, néanmoins les résultats obtenus sont prometteurs et prouvent qu'on est sur la bonne voie. De nombreuses études suggèrent que le genre *Bacillus* constitue un genre hétérogène, d'un point de vue phénotypique, que la plupart des autres genres bactériens (Claus et Berkeley, 1986) et que les espèces appartenant à ce genre sont en augmentation continue et sont difficiles à identifier par les méthodes traditionnelles fondées sur les caractéristiques phénotypiques (Woese, 1987).

Pour comparer les résultats d'identification phénotypique, avec une identification génotypique pour les deux souches B19 et N19. Le séquençage de l'ARNr 16S a été fait pour confirmer que les deux souches appartiennent à la famille de *Bacillaceae*. Les résultats obtenus montrent que les deux souches isolées sont très proche de l'espèce *Geobacillus caldxylosilyticu* (Ahmad *et al.*, 2000) (Fortina *et al.*, 2001) avec 98,90% de similitude pour la souche B19 et 98,83% de similarité pour la souche N19.

Le genre *Geobacillus* a été identifié pour la première fois (Nazina *et al.*, 2001).

# **CONCLUSION**

Les bactéries en milieux extrêmes et en particulier, les microorganismes présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale.

Les objectifs de cette étude consistaient à l'isolement de souches performantes appartenant à la famille des *Bacillaceae*, isolées, identifiées et répertoriées à partir des différents environnements extrêmes que recèle dans notre région. Les échantillons sont prélevés à partir du sol oasien dans la région de Sabkha (Metlili, Ghardaïa).

Après un traitement thermique, deux (02) souches N19 et B19 ont été isolés sur milieu GN à 60 °C, l'observation macroscopique et microscopique a révélé que les souches présentent des critères de des *Bacillus* c'est-à-dire des bâtonnets à Gram positif, mobile, capable de former des spores.

L'étude physiologique de la souche nous a permis de conclure qu'ils sont des souches tolérantes à des concentrations de NaCl [0, 2, 4% (p/v)], aux pH acides et alcalins [5, 6, 7, 8, 9, 10], et à des différentes valeurs de températures [25, 30, 37, 45, 60, 70 °C].

Les deux souches sont très sensibles vis-à-vis 28 sur 30 antibiotiques testés, elles produisent le cyanure d'hydrogène et elles ne solubilisent pas le phosphate inorganique, et après utilisations des galeries de l'identification (API20E, API 50 CHB), les résultats obtenus sont traités par les deux programmes : Excel Identification Program (EIP) ABIS online, (EIP) montre qu'elles appartiennent au : (*Bacillus firmus*, *Bacillus cereus* 'groupe 2') et comme (*Brevibacillus brevis*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus smithii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus*) avec de pourcentage ou de probabilité différent.

Enfin, par l'étude moléculaire (ARNr 16S), ce qui a confirmé que les deux souches B19 et N19 appartient à la famille des *Bacillaceae*, le genre *Geobacillus*, les deux souches isolées sont très proche de l'espèce *Geobacillus caldxylosilyticu* avec 98,90% et 98,83% de similarité respectivement.

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint et assez satisfaisant, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de non disponibilité de matériels et de moyens.

Nous comptons aussi dans l'avenir optimiser les paramètres de culture des souches afin d'améliorer leur production des biomolécules à potentiel biotechnologique important.

En plus, vu l'importance des souches sur le plan de la production d'enzymes extracellulaires et qui ont peut-être un potentiel biotechnologique, la purification de ces enzymes constitue une autre excellente perspective.

Aussi il faut comprendre et modéliser les interactions entre ces souches et les communautés microbiennes rhizosphériques présents dans ces milieux extrêmes et étudier leurs rôles dans ces environnements et leurs différentes interactions possibles entre elles.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



## Références bibliographiques

- **Abdesselam N., Latache N. (2017).** Identifications et caractérisations des bactéries isolées à partir de différents sols, mémoire de master, université de Tlemcen, Algérie
- **Ahmad, S., R. K. Scopes, G. Rees, et B. K. C. Patel. (2000).** *Saccharococcus caldxylosilyticus* sp. nov., an obligately thermophilic, xylose utilizing, endo- spore forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:517–523.
- **Alexander M. (1980).** Effects of acidity on microorganisms and microbial processes in soils. In: Hutchinson TC, Havas M (eds) *Effects of acid precipitation on terrestrial ecosystems*. Plenum Press, New York, pp 363-374
- **Anne P, (2005).** Diversité de populations microbiennes thermophiles d’une cheminée hydrothermale océanique : cultures d’enrichissement en bioréacteur et isolement d’espèces nouvelles, thèse de doctorat, Université de province (AIX-MARSEILLE I).
- **Arora D. K., Das S., Sukumar M., (2013).** *Analyzing Microbes Manual of Molecular Biology Techniques*, Edition Springer, p 352.
- **Ash C, Farrow AE, Wallbanks S, Collins MD. (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol* 13:202–206
- **Aubert G, (1978).** *Méthodes D’analyses Des Sols*. Edit : C.R.D.P., Marseille, 191p.
- **Banat IM et Marchant R. (2011).** *Geobacillus* activities in soil and oil contamination remediation. “Endospore-forming Soil Bacteria”. Niall A Logan & Paul De Vos (Editors). *Soil Biology series 27* (Springer). Chapter 13, pp 259-270. ISBN 978-3-642-19576-1.
- **Banat IM, Marchant R, Rahman TJ (2004).** *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:2197–2201.
- **Bedjadj S., (2011).** Contribution à l’étude des caractéristiques microbiologique des sols dans la région d’Ouargla (cas de l’exploitation de l’université d’Ouargla), Université d’Ouargla, Algérie, p 58.
- **Benabdallah A. M. (2014).** Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhia D’Oran (caractérisation phénotypique), mémoire Master, université de Tlemcen.

- **Besse A., (2016).** Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles, thèse pour obtenir le grade de docteur du muséum national d'histoire naturelle, Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227.
- **Bond, W.W., Ott, B.J., Franke, K., McCracken, J.E. (1991).** Effective Use of Liquid Chemical Germicides on Medical Devices, Instrument Design Problems, in Disinfection, Sterilization and Preservation, 4<sup>th</sup> ed. Block, S.S., Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, PA,.
- **Bonnefoy C., Françoise G., Guy L., Evelyne V-B, (2002).** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, édition Doin, p 245
- **Bouanane-Darenfed, A., Fardeau, M.-L., Gre' goire, P., Joseph, M., Kebbouche-Gana, S., Benayad, T., Hacene, H., Cayol, J.-L. & Ollivier, B. (2011).** *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. a new thermophilic anaerobic, xylanolytic bacterium isolated from an Algerian hot spring. *Curr Microbiol* 62, 826–832.
- **Boulezkaz W.,Bouderbala M.,(2015),** Caractérisation des bactéries isolées d'un sol destiné à la culture céréalière Approches phénotypique et Bioinformatique, Mémoire de Master, Université des FrèresMentouri Constantine.
- **Buckley, D.H., Schmidt, T.M., (2002).** *In:* Staley, J.T., Reysenbach, A.L. (Eds.), *Exploring the Biodiversity of Soil: A Microbial Rainforest. Biodiversity of Microbial Life.* Wiley-Liss, New York, NY, pp. 183–208.
- **Chaussod R. et Nicolardot B. (1986).** Relation entre les caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. *Sciences du sol* .24 :213-226
- **Claus D. et Berkeley C. W. (1986).** The Genus *Bacillus*. *In:* Sneath PHA ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams and Wilkins, Baltimore,.1105-1139.
- **Collins C. H., Lyne Patricia M., Grange J. M., Falkinham III J. O., (2004).** Collins and Lyne's Microbiological Methods, 8th ed, edition Arnold, p 456.
- **Cullimore D. Roy, (2010).** Practical Atlas for Bacterial Identification, 2<sup>nd</sup> edition, edition Taylor and Francis Group, p 295.
- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. The Firmicute.* Springer. New York. Volume 3. 63-67.

- **Delarras C (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques, Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- **Delarras C, (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 741 p.
- **Dellal A., Halitim A., (1992).** Activités microbiologiques en conditions salines : cas de quelques sols salés de la région de Relizane (Algérie). Cahiers Agricultures, 1, pp : 335-340.
- **Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen É., Quentin R., (2011).** Bactériologie médicale Techniques usuelles, Edition Elsevier Masson, p 631.
- **Denyer Stephen P., Hodges Norman, Gorman Sean P., Gilmore Brendan F., (2011).** Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology, 8<sup>th</sup> edition, edition Blackwell, p 513.
- **Durand JH. (1983).** Les sols irrigables. PUF, Paris, 339 p
- **Eldor Paul A., (2007).** Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry, 3rd edition, edition Elsevier, p 514.
- **Faugier A., (2010).** Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphère », thèse de doctorat, l'école centrale de Lyon.
- **Felsenstein J. (2004).** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.
- **Felsenstein, J. (1989).** PHYLIP — Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5:164–166
- **Ferreira, L.C.S., R.C.C. Ferreira, W. Schumann. (2005).** *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. An. Acad. Bras. Ciênc, 77:113–124.
- **Fooladi J., et Sajjadian A. (2010).** Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable  $\alpha$ - amylase producing strain. *Iran. J Microbiol.* 2 (1): 49-53.
- **Fortina, M. G., D. Mora, P. Schumann, C. Parini, P. L. Manachini, and E. Stackebrandt. (2001).** Reclassification of *Saccharococcus caldxylosilyticus* as *Geobacillus caldxylosilyticus* (Ahmed *et al.*, 2000) comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2063–2071.
- **Foy CD. (1984).** Physiological effects of hydrogen, aluminium and manganese toxicities in acid soil. In: Adams F (ed) Soil acidity and liming. Am Soc Agron, Madison, pp 57-97

- **Ghosh R. , Barman S. , Mukherjee R. et Mandal N. (2015).** Role of phosphate solubilizing Burkholderia spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbiological Research*. 183. 10.1016/j.micres.2015.11.011.
- **Gibbons, N.E. et R.G.E. Murray. (1978).** Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 28: 1–6.
- **Goldman E., Green L. H., (2009).** Practical Handbook of MICROBIOLOGY, 2<sup>nd</sup> edition, edition Taylor & Francis Group, p 853.
- **Gouin D., (1974).** l'influence de l'inondation d'un sol sur les bactéries telluriques actives dans le cycle de l'azote". Thèse présentée à l'institut national de la recherche scientifique (eau) comme exigence partielle de la maîtrise des sciences (eau) université du Québec.
- **Guessoum A., (2001).** L'effet de l'irrigation sur la salinité du sol dans la région de Saada - Biskra., Thèse Ing, Agro, Univ Batna., 50 P. Institut Technologique Agricole, Mostaganem, 78 p.
- **Guiraud J. et Galzy P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, édition l'usine. 119p.
- **Guiraud, J.P. (1998).** Techniques d'analyses microbiologiques : Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, France.
- **Hardie, M., & Doyle, R. (2012).** Measuring soil salinity. In *Plant Salt Tolerance*, edition Humana Press, pp. 415-425.
- **Hashemi, M., Razavi, S. H., Shojao, S. A. (2010).** Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Biosci. Bioeng.* 110, 333-337.
- **Higgins, D., J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22:4673–4680.
- **Insam Heribert, Rangger Andrea. (1997).** Microbial Communities, Functional Versus Structural Approaches, Edition *Springer*, p 263.
- **Institut de Génie Rural, (1973).** Travaux pratiques Guide de laboratoire. Suisse, 50 p.
- **Irwin, J.A., Baird, A.W. (2004).** Extremophiles and their application to veterinary
- **ITA, (1975).** Laboratoire du sol : méthodes d'analyses physiques et chimiques du sol. Institut technologique agricole. Mostaganem. 78p.

- **Joung KB, Cote JC. (2002).** Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *J Appl Microbiol* 92:97–108
- **Kayser Fritz H., Bienz Kurt A., Eckert Johannes, Zinkernagel Rolf M., (2005).** Medical Microbiology, Edition Thieme, Stuttgart, New York, p 698.
- **Khanna M., Solanki R. and Lal R. (2011).** Selective isolation of rare *actinomycetes* producing novel antimicrobial compounds, *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. Vol. 2, Issue 3, 357-375.
- **Kotiranta, A., K. Lounatmaa, M. Haapasalo. (2000).** Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.*, 2:189–198.
- **Kristjansson J. K. and Hreggvidsson G. O. (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 17-25.
- **Kushner D.J. (1978).** Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J (ed) *Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press London, pp 317-368.
- **Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM, Belnap J , . (2002).** Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and in the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol* 68:1854–1863
- **Lahreche R., Bouhamida A., (2017).** Capacité de biodégradation du gasoil par des bactéries autochtones isolées de sols contaminés, mémoire de Master, université de Ghardaïa.
- **Logan N.A., Berkeley RCW (1984).** Identification of *Bacillus* strains using the API system. *J. Gen. Microbiol.* 130:1871-82.
- **Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kaampfer, P., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., Rabinovitch, L., Ventosa, A, (2009).** Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59:2114-2121.
- **Lorck, H., 1948.** Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Plant Physiol* 1:142-146.
- **Lynn. *Process Biochemistry*, (1999), 35 (1999) 27–31.**
- **Madigan M.T. et Martino J.M.,( 2006).** *BrockBiology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> edition. Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA
- **Maheshwari Dinesh K., (2010).** *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Edition Springer, p 445.

- **Marchant R, Banat IM, Rahman TJ, Berzano M (2002).** The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environ Microbiol* 4:595–602.
- **Mathieu, C., Pieltain, F., et Jeanroy, E. (2003).** Analyse chimique des sols: Méthodes choisies. Edition Tec & doc, p 376
- **Matsuo, Y., A. Katsuta, S. Matsuda, Y. Shizuri, A. Yokota and H. Kasai. (2006).** *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenens* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of Thermoactinomycetaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2837–2842. *medicine. Ir. Vet. J.* 57, 348–354.
- **McConnell D. J., Cantwell B. A., Devine K. M., Forage A. J., Laoide B. M., O’Kane C., Ollington J. F. and Sharp P. M. (1986).** Genetic engineering of extracellular enzyme systems of *Bacilli*. *Annual New York Academy of Science*, 469, 1–17.
- **Mégraud F. (2011).** De l’agent infectieux à l’hôte-bactériologie : Physiologie bactérienne, pouvoir pathogène des bactéries. *Cours PCEM 2*: 1-6.
- **Meima, R.B., J.M. van Dijl, S. Holsappel, S. Bron. (2004).** Expression systems in *Bacillus*. In *Protein Expression Technologies: Current Status and Future Trends*, Ed. F. Baneyx, pp. 199–252. Wymondham, U.K.: Horizon Bioscience.
- **Meyer A., Deiana J., Bernard A., (2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigées, 2<sup>ème</sup> édition, édition Doin, p 430.
- **NAS F, (2013).** Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrêmophile B1 isolée d’une sebkhah d’EL-Goléa (Algérie), Mémoire Magister, Université de Tlemcen.
- **Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigo-ryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev, and M. V. Ivanov. (2001).** Taxonomic study of aerobic thermophili bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:433–446.

- **Nelson D. W. , Sommers L. E. . (1996).** Total carbon, organic carbon and organic matter in, Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. (Ed. D. L. Sparks) Soil Science Society of America Book Series No. 5, pp. 961–1010.
- **Nguyen,C ., Yan W., Le Tacon F., Lapyire F. (1992).** Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotiv and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *laccaria bicolor* (Maire) PDOrton, Plant Soil 143,193-199.
- **Parker Nina, Schneegurt Mark, Thi Tu Anh-Hue, Forster Brian M., Lister Philip, (2018).** Microbiology, edition OpenStax Rice, p 1307.
- **Prescott, L. M., Harley, J. P. Klein, D. A. (2002).** Microbiology, 5<sup>th</sup> edition, edition McGraw-Hill. 1026p.
- **Ripert, Christian. (2013).** Mycologie médicale. Edition Lavoisier. p: 327.
- **Ritz K, Griffiths BS, Torsvik VL, Hendriksen NB . (1997).** Broad-scale approaches to the determination of microbial community structure: analysis of soil and bacterioplankton community DNA by melting profiles and reassociation kinetics. FEMS Lett .
- **Ruyin liu, L., Ke, L., Hongxun, Z., Junge, Zhu. and DevRaj, J. (2014).** Spatial Distribution of Microbial Communities Associated with Dune Landform in the Gurbantunggut Desert, China. Journal of Microbiology 52, no. 11 898–907.
- **Ryan Kenneth J., Ray C. George, (2014).** SHERRIS MEDICAL MICROBIOLOGY, 6<sup>th</sup> edition, edition McGraw-Hill Education, p 994.
- **Schallmey, M., A. Singh, O.P. Ward. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Can. J. Microbiol., 50:1–17.
- **Schneider, K.R., M.E. Parish, R.M. Goodrich, T. Cookingham. (2004).** preventing foodborne illness: *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*, University of Florida (FSHN04-05 <http://edis.ifas.ufl.edu/FS103>).
- **Schoeni, J.L. and A. Wong. (2005).** *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. J. Food Prot., 68:636–648.
- **Shukla, P. P., Brett, I. (2013).** Advances in Enzyme Biotechnology. Springer India, 147-165.
- **Singleton P. (1999).** Bactériologie.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
- **Stackebrandt et E, Swiderski J (2002).** From phylogeny to systematics: the dissection of the genus *Bacillus*. In: Berkeley R, Heyndrickx M, Logan NA, De Vos P (eds) Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom

- **Stein, T. (2005).** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol., 56:845–857.
- **Terpe, K. (2006).** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol., 72:211–222.
- **Tifrit A., (2016).** Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes. Thèse Doctorat troisième cycle, Université Hassiba Benbouali de Chlef.
- **Torsvik VL, Gokoyer J, Daae FL. (1990).** High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol 56: 782-787
- **Turnbull, P. C. B. (1997).** The role of the *Bacillus* genus in infection. Culture 18: 5–8.
- **Udaka, S. , H. Yamagata. (1993-1994).** Protein secretion in *Bacillus brevis*. Antonie van Leeuwenhoek, 64:137–143.
- **Vary, P. (1994).** Prime time for *Bacillus megaterium*. Microbiology, 140:1001–1013.
- **Vedel G (2005).** Simple method to determine  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. Journal of antimicrobial chemotherapy. 56(4): 657-664.
- **Vekemans, Xavier, Godden, B, Penninckx, Michel. (1989).** Factor analysis of the relationships between several physico-chemical and microbiological characteristics of some Belgian agricultural soils. Soil Biology and Biochemistry. 21. 53-58. 10.1016/0038-0717(89)90010-2.
- **Verkermans X, Godden B, Penninckx M (1989).** Factor analysis of the relationships between several physico-chemical and microbiological characteristics of some Belgian agricultural soils. (Soil, Biol Biochem ,21,53,58.)
- **Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E. Stackebrandt, M.P. Starr and H.G. Trüper. (1987).** Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 37: 463–464.
- **Weisskopf L. (2013).** The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. In A. Méndez-Vilas (eds.), Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, pp 1352-1363.



- **Westers, L., W. Westers, W.J. Quax. (2004).** *Bacillus subtilis* as a cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1694:299–310
- **White Robert E., (2006).** Principles and Practice of Soil Science, 4<sup>th</sup> edition, edition Blackwell Science, p 363.
- **Woese C. R., Magrum L. J. and Fox G. E. (1978).** *Archaeobacteria. Journal of Molecular Evolution*, 11: 245-251.
- **Woese, C. R. (1987).** Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221- 271.
- **Youcef-Ali M, (2014).** Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones Arides, Thèse Doctorat troisième cycle, Université Constantine 1.

# **ANNEXES**

## **Annexe 1: Appareillage**

- Agitateur magnétique (Stuart).
- Agitateur rotatif (Jenway).
- Agitateur-Incubateur (MaxQ6000)
- Appareil photo (Smartphone Condor p6).
- Autoclave (Hirayama).
- Bain-marie (WiseBath).
- Balance de pesée (OHAUS).
- Centrifugeuse (Sigma).
- Chauffe ballon (Medline).
- Conductivité-mètre (Jenway).
- Congélateur (IRIS Sat).
- Etuve (memmert).
- Hotte (BioBase)
- Microscope photonique (Micros).
- PH-mètre (OHAUS).
- Rota-vapeur (Heidolp).
- Vortex Agitateur (Stuart).

## **Annexe 2: Produits chimiques**

- Acetic anhydride (Fluka).
- Acide chlorhydrique (SIGMA-ALDRICH).
- Acide sulfurique (SIGMA-ALDRICH).
- Agar powder (BIOCHEM).
- Alcool 90° (Elias ParaPharm).
- Alcool isoamylique (VWR CHEMICALS).
- Amidon (VWR CHEMICALS).
- Ammonium iron (II) sulfate hexahedrate(BIOCHEM).
- Ammonium sulfate (BIOCHEM).
- Bichromate de potassium (BIOCHEM).
- Calcium chloridedihydrate(VWR CHEMICALS).
- Calcium sulfate dehydrate (BIOCHEM).
- Chloroforme (SCHARLAU).

- Chlorure de fer III (LMR).
- Chlorure de sodium (SEROLUX).
- Ethanol (Acros).
- Ethyle d'acétate (BIOCHEM).
- Extrait de levure (CONDA).
- Extrait de viande (CONDA).
- $\text{FeCl}_3$ (SIGMA-ALDRICH).
- Fuschine (RAL).
- Gelatin from Porcine skin (SIGMA-ALDRICH).
- Huile à immersion (OPTIKA).
- Hydroxyde de sodium (Prolabo).
- Liquide de Lugol (RAL).
- Magnesium powder(BIOCHEM).
- Magnesium sulfate heptahydrate(SIGMA-ALDRICH).
- Mercury (II) Chloride(BIOCHEM).
- Peptone bactériologique (Liofilchem).
- Peroxyde d'hydrogène (Cooper).
- Phénanthroline hydrochloride (BIOCHEM).
- Potassium hydroxyde (SIGMA-ALDRICH).
- Potassium iodique (SIGMA-ALDRICH).
- Potassium phosphate dibasic (SIGMA-ALDRICH).
- Potassium phosphate monobasic (SIGMA-ALDRICH).
- Poudre de zinc (Prevest).
- Réactif de Kovacs (Pronadisa).
- Réactif de Kovacs (RAL).
- Réactif TDA (RAL).
- Réactifs de Voges-Proskauer (VP I et VP II) (DIMED).
- Rouge de Phénol (BIOCHEM).
- Sodium hydroxide (VWR CHEMICALS).
- Sodium phosphate dibasic dihydrate(SIGMA-ALDRICH).
- Sucrose (BIOCHEM).
- Tryptone (Conda).
- Violet de gentiane phéniqué (RAL).

### Annexe 3: Réactifs

#### ➤ Réactifs

Réactif de Kovacs	
N-amyl/isoamyl alcool	150 mL
Acide hydrochlorique concentré	50 mL
P-diméthylaminobenzaldéhyde	10 g

Réactif de Vogues Proskauer (VP I)	
$\alpha$ -naphthol	6 g
Alcool éthylique à 95%	100 mL
VP II	
Hydroxyde de potassium	40 g
Eau distillé	100 mL

Réactif de Frazier	
Chlorure mercurique	15 g
Acide chlorohydrique	20 mL
Eau distillée	1000 mL

### Annexe 4: Milieux de culture

#### ➤ Milieu gélose nutritive (GN):

**Tableau x1.** Composition du milieu de culture gélose nutritive (CONDA).

Composant	Concentration (g/L)
Peptone	3
Extrait de viande	3
Chlorure de sodium	3
Agar bactériologique (agar agar)	18
pH final : 7,3 $\pm$ 0,2 à 25 °C	

- Milieu bouillon nutritif (BN):

**Tableau x2.**Composition du milieu de culture bouillon nutritif (Indicia).

Composant	Concentration (g/L)
Peptone	5
Extrait de viande	3
pH final : $6,8 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	

- Milieu Pikovskaya (PVK)

**Tableau x3.**Composition du milieu de culture Pikovskaya (1948).

Composant	Concentration (g/L)
$\text{Ca}_3\text{HPO}_4$	0,7
Glucose	10
NaCl	0,2
KCl	0,295
$\text{FeCl}_3$	0,003
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0,373
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,41
Extrait de levure	3
Agar bactériologique	20
pH final : $6,9 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$	

- Milieu Amylase

**Tableau x4.**Composition de la gélose nutritive (amidon à 1%).

Composant	Concentration (g/L)
Extrait de viande	3
Peptone	5
Amidon de riz	10
Agar agar	15
Eau distillée	1 L
pH	7,5
<b>Solution de Lugol : Iode: 1 g, Iodure de potassium : 2 g, Eau distillée : 20 mL.</b>	

➤ Milieu Gélatinase

**Tableau x5.** Composition de la gélose nutritive (gélatine à 1,5%).

<b>Composant</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Extrait de viande	3
Peptone	5
Gélatine	15
Agar agar	15
Eau distillée	1 L
pH	7,5
<b>Solution de Frazier : HgCl<sub>2</sub>: 15 g, HCl: 20 g, Eau distillée : 1 L.</b>	

➤ Milieux de culture Bushnell-Hass

**Tableau x6.** Composition de milieux de culture Bushnell-Hass (ATLAS, 2005)

<b>Milieux de culture Bushnell-Hass</b>	
<b>Composant</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,02 g
Eau distillée	1 L
pH	7,5

**Préparation de milieu**

L'huile (hydrocarbure) filtré et stérilisé et ajouté de manière aseptique 10,0 mL d'huile stérile à 990,0 mL de Bushnell-Hass stérile et refroidi. Mettre le mélange dans un récipient de mélangeur stérile. Mélanger à faible vitesse pour minimiser l'incorporation d'air dans le milieu.

**Utilisation**

Pour la culture et l'énumération des bactéries hydrocarbonoclastes.

- Milieu Mueller-Hinton (MH)

**Tableau x6.**Composition de Milieu Mueller-Hinton (MH) (Liofilchem).

Composant	Concentration (g/L)
Extrait de bœuf	2
Amidon	1,5
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Agar agar	15
Eau distillée	1 L
pH	7,3 ± 0,1

- Milieu viande foie (VF)

- **Tableau x7.** Composition de Milieu viande foie (VF).

Composant	Concentration (g/L)
Extrait de viande	10
Peptone	20
Extrait de levure	10
Glucose	05
Agar agar	15
Eau distillée	1L
pH	7,6

- Milieu Api 50 CHB/E

**Tableau x8.**Composition de Milieu Api 50 CHB/E (bioMérieux).

Composant	Concentration (g/L)
Sulfate d'ammonium	2
Extrait de levure	0,5
Tryptone (origine bovine/porcine)	1
Phosphate disodique	3,22
Phosphate monopotassique	0,12
Solution d'oligo-élément	10 mL
Rouge de phénol	0,17
Eau déminéralisée	1 L
pH	7,4-7,8à 20-25°C



➤ Milieu RCV-Saccharose

**Composition du milieu RCV-saccharose :**

**Solution I :** (solution élément) :

ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,43 g.

MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: 1,30 g.

NaMO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O: 0,75 g.

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 2,80 g.

CuSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,026 g.

CoSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,07 g.

H<sub>2</sub>O Qsp: 1000 mL

**Solution II** (solution super-salt):

CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O: 2 g.

MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 2 g.

FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 2 g.

EDTA: 0,4 g.

Solution I: 20 mL.

H<sub>2</sub>O Qsp: 1000 mL.

**Solution III** (Tampon phosphate):

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 40 g.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 60 g.

H<sub>2</sub>O Qsp: 1000 mL.

Ces solutions sont stérilisées séparément par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

Pour la confection du milieu RCV-saccharose, il suffit de mélanger :

Solution II: 50 mL.

Solution III: 15 mL.

Extrait de levure: 0,1 g.

Saccharose: 20 g.

Agar agar: 15 g.

H<sub>2</sub>O Qsp: 1000 mL.

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 et la stérilisation se fait par autoclavage à 110 °C pendant 20 min.

## Annexe 5: Séquences

- La séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche B19.

ACCGTTAAAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGAACAGGAGCTTGCTCTTGTTCCGGTTA  
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCGTAAGACCGGGATAACTCCG  
GGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAAGACCGCATGGTCTTTGGTTGAAAGG  
CGGCTTCGGCTGTCACTTACGGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA  
CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG  
ACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCCGGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGC  
TCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTTCGAATAGGGCCGGTACGGTGACGGTACCTA  
ACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGTAGGGGGCGAG  
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAA  
GAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC  
AGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTA  
GAGGGGTCAAACCCCTTAGTGCTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA  
CGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCCTGACAA  
CCCTGGAGACAGGGCGTTCCTCCCTTCGGGGGGACAGGGTGACAGGTGGTGCATGGTT  
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTCGC  
CCCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGGGACTGCCGGTGACAAACCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCC  
GCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAA  
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA  
CACCACGAGAGCTTGCAACACCTCGAAGTCGGTGAGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGC  
CGCCGATGGTGTTCACCGAG

- La séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche N19.

CGGGGGGGGCTGCTATACATGCAGTCGAGCGGACCGAACAGGAGCTTGCTCTTGTTCC  
GGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCGTAAGACCGGGATA  
ACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACACCAAAGACCGCATGGTCTTTGGTT  
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTACGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGATTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTCTT  
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTCTTCGG  
ATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAGAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACGGT  
GACGGTACCTAACGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCCT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGCCATTGGAAACTGGGGG  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC  
GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG  
ATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGGTCAAACCCTTTAGTGCTGTAGCTAACCGCTTAAG  
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG  
GTCTTGACATCCCCTGACAACCCTGGAGACAGGGCGTTCGCCCTTCGGGGGGACAGG  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC  
CGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCCTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGGGG  
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCTGCGAACCCGCG  
AGGGGGAGCCAATCCCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCC  
TGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCC  
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCCTCACACCACGAGAGCTTGCAACACCCGAAGTCGG  
TGAGGTAACCCGCAAGGGAGCCAGCCGCCGATTGGTTGTTCAATT