

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 : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : BEDJADJ Safaa
BENMASSAOUD Chahinez

Thème

**Contribution à l'étude des *Bacillales* halophiles d'un échantillon de
Hammam Zelfana (Ghardaia)**

Soutenu publiquement, le, devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------------|-------------------------|----------------|--------------|
| M. BELGHIT Said | Maitre de conférences B | Univ. Ghardaïa | Président |
| Mme. MAIDI Leila | Maitre-Assistante B | Univ. Ghardaïa | Examinatrice |
| M. BOURAS Nouredine | Professeur | Univ. Ghardaïa | Promoteur |

Année universitaire : 2019-2020

AVANT-PROPOS

Nos remerciements tout d'abord le bon Dieu qui nous 'a donné le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à Monsieur le Professeur Noureddine BOURAS de l'université de Ghardaïa d'avoir accepté de diriger ce travail, et pour son aide très précieuse ainsi que pour ses orientations et ses observations enrichissantes ainsi que pour ses nombreux conseils et son soutien tout au long de ce mémoire.

Nos remerciements doivent également s'adresser aux membres du jury qui nous ont honorés en acceptant d'examiner ce travail.

A monsieur Said BELGHIT Maitre de conférences B pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

A madame Leila MAIDI, Maitre assistante A d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous associons à nos remerciements toute l'équipe du laboratoire pédagogique de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre à l'université de Ghardaia, et le département de Biologie.

Enfin toute notre sympathie et nos remerciements vont également à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A ma très chère maman qui a été à mes côtés et m'a soutenu tout au long de ma vie.

A mon cher père qui a sacrifié toute sa vie pour que ma vision devienne ce que je suis.

À mon cher frère et à mes charmantes sœurs.

De même, à mon encadreur M. Bouras qui m'a soutenu dans ce travail.

Ainsi à mes chers amis, et tous les étudiants de ma promotion.

A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci à tous.

Safaa

A mes très chers parents en témoignage de mon amour et mon respect

Je suis reconnaissante pour les soutiens qui les a apportés et tous les sacrifices pour mon éducation et mon bien être.

A mes chers frères et sœurs Abdelouahab, Bouchra, Souhila, Abd salam et Abdelhak.

A le mari de ma soeur, Mahmoud et ma nieces Assil et Siline que le dieu les protège.

A mes grands parents, et tous les membres de la famille Ben Messaoud et Bouchareb.

A notre encadreur qui a essayé de nous aider et de répondre à tous les besoins

A ma chère binôme Safaa pour son courage, son existence avec moi dans les moments de Joies et le Sagacité les moments de pleurer et de rire qui nous partageons.

Aussi a ses parents M. Bouhafes et Md Ben Amrane que le Dieu le progrès.

A M.Yahiya Hassen et sa fille Djihad de m'aider et de m'encourager

A mes amies et mes collègues en témoignage des souvenirs que nous avons passé ensemble.

Enfin à toutes les personnes qui m'ont donné, au moins par un mot, la force espérer.

Chahinez

ملخص

دراسة الأنواع الميكروبية المحتملة للظروف القاسية تفتح الباب امام البحث وفهم آليات التكيف وطريقة النمو في إطار الظروف غير المواتية و القاسية التي تواجهها الكائنات الحية الدقيقة والتي قد تكون : محبة الحرارة، محبة للملوحة، محبة البرودة، محبة للأوساط الحامضية، محبة للأوساط القاعدية أو محبة للضغط الجوي العالي. الهدف الرئيسي المخصص لهذا العمل هو عزل بكتيريا مالكة للأبواغ ومحبة للظروف القاسية من عينة تربية مأخوذة من منطقة زلفانة .

تم عزل السلالات من وسط أجار مغذى بإضافة كلوريد الصوديوم بتركيز 15%، ولمدة 20 يوم وهذا بعد معالجة حرارية في حمام مائي لمدة 15 دقيقة في درجة 100 درجة مئوية للقضاء على الخلايا الأعاشية. بعد التعرف المورفولوجي للسلالة المختارة F1 والتي لها شكل عصيات، وجدت أنها قادرة على تشكيل الأبواغ وموجبة الغرام. يشير التوصيف الفيزيولوجي للعزلة انها تتحمل العيش في تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (0؛0,5؛1؛1,5؛2؛2,5؛%) (وزن/حجم). النتائج توضح مبدئيا ان السلالة من عائلة العصويات التي تملك ابواغ.

الكلمات المفتاحية : بكتيرية محتملة للظروف القاسية ،أبواغ، عزل، محبة للملوحة، تعريف تصنيفي، *Bacillales* .

Résumé :

L'étude des espèces bactériennes extrémophiles ouvre des pistes de recherche pour renforcer la compréhension des mécanismes d'adaptation et des processus de développement dans des conditions défavorables. Selon les conditions extrêmes, les microorganismes peuvent être : thermophiles, halophiles, psychrophiles, acidophiles, basophiles ou piézophiles.

L'objectif principal assigné à ce travail est d'isoler des bactéries extrémophiles sporogènes, à partir des soles de la région de Zelfana.

Après un traitement thermique dans un bain marie pendant 20 minutes à 100°C pour éliminer les formes végétatives, l'isolement des souches a été réalisé d'un milieu gélose nutritive en présence de 15% de NaCl pendant 20 jours d'incubation.

Après l'identification morphologique d'une souche choisie (F1) qui est capable de former les endospores, de Gram positif et qui présente une forme en bâtonnet.

L'identification physiologique de l'isolat montre qu'elle est tolérante à des concentrations de NaCl suivantes : [0, 0, 5, 1, 1, 5, 2, 2,5% (p/v)].

Les résultats de cette étude montrent que la souche isolée appartenant à l'ordre de *Bacillales*.

Mots clés : les bactériennes extrémophiles, sporogènes, isolement, halophiles, identification, *Bacillales*.

Abstract

The study of extremophilic bacterial species opens up gates of research to understanding the mechanisms of adaptation and developmental growth under unfavorable conditions. Depending on the extreme conditions, the microorganisms can be: thermophiles, halophiles, psychrophiles, acidophiles, alkaliphiles or piezophiles.

The main objective assigned to this work is to isolate extremophilic spore-forming bacteria from soil samples from the region of Zelfana.

After heat treatment in a water bath for 20 minutes at 100 ° C to eliminate the vegetative forms, the isolation of the strains was carried out from a nutrient agar medium in the presence of 15% NaCl for 20 days of incubation.

After the morphological identification of a selected strain (F1) which is capable of forming endospores, and Gram positive, and has a rod shape.

Physiological identification of the isolate shows that it is tolerant to the following NaCl concentrations: [0, 0, 5.1, 1, 5.2, 2.5% (w / v)].

The results of this study show that the isolated strain belonging to the order of *Bacillales*.

Key words: extremophilic bacterial species, sporogens, isolation, halophiles, identification, *Bacillales*.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

DEDICACES

ملخص

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES FIGURES

LISTE DES PHOTOS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABRÉVIATIONS

INTRODUCTION

1

CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Sol 3

1-1- Définition 3

1-2- Diversité bactérienne du sol 3

1-3- Distribution des microorganismes dans le sol 3

1-4- Rôles des microorganismes dans le sol 3

2- Eau 4

2-1- Définition 4

| | |
|---|----|
| 2-2- types et ressources de l'eau | 4 |
| 2- 3- Diversité bactérienne de l'eau | 4 |
| 2- 4- Rôles des microorganismes dans l'eau | 4 |
| 3- Milieux extrêmes | 4 |
| 3-1- Effet de salinité | 5 |
| 3-2- Métallo-résistance bactérienne | 5 |
| 3-3- les extrémophiles | 6 |
| 3-4- Microorganismes halophiles et halotolérants | 6 |
| 4- Spore bactérienne | 7 |
| 4-1- Structure des spores | 7 |
| 4-2-Sporulation et germination | 8 |
| 4-2-1- Formation des spores | 8 |
| 4-2-1- 1- Etapes de sporulation | 8 |
| 4-2-2- Germination | 9 |
| 4-3- Bactéries sporulées | 10 |
| 5- Les <i>Bacillales</i> | 10 |
| 5-1- Classification et caractéristiques des <i>Bacillales</i> | 10 |
| 5-2- Habitat et écologies | 11 |
| 5-3- Pathogénicité | 11 |
| 5-4- Importance biotechnologique des <i>Bacillus</i> | 11 |

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

| | |
|---|----|
| 1- Site d'isolement | 13 |
| 2- Prélèvement des échantillons | 13 |
| 3- Appareillage | 14 |
| 4- Milieux de culture et produits chimiques | 14 |
| 4-1- Milieux de culture | 14 |
| 4-2- Pigments | 15 |
| 4-3- Produits chimiques | 15 |
| 5- Isolement des <i>Bacillales</i> | 15 |
| 5-1- Préparation des dilutions décimales | 15 |
| 5-2- Traitement des échantillons | 16 |
| 5-3- Ensemencement et conditions de culture | 16 |
| 6- Purification et conservation | 16 |
| 6-1- Purification des souches | 16 |
| 6-2- Conservation des souches | 17 |
| 7- Identification phénotypique | 18 |
| 7-1- Caractéristiques morphologiques | 18 |
| 7-1-1- Aspect macro-morphologique | 18 |
| 7-1-2- Aspect micro-morphologique | 19 |
| 7-1-2-1- Coloration de Gram | 19 |
| 7-1-2-2- Coloration de spores | 20 |

| | |
|---|----|
| 7-2- Caractéristiques physiologiques | 20 |
| 7-2-1- Détermination de la concentration minimale en NaCl | 20 |
| 8- Détermination de la résistance aux métaux lourds | 21 |

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

| | |
|---|----|
| 1- Résultats de l'isolement et purification | 23 |
| 2- Résultats de l'identification phénotypique | 23 |
| 2-1- Résultats de l'identification morphologiques | 23 |
| 2-1-1- Aspect macroscopique | 24 |
| 2-1-2- Aspect microscopique | 25 |
| 2-1-2-1- Coloration de Gram | 25 |
| 2-1-2-2- Recherche de la spore | 26 |
| 2-2- Résultats des tests physiologiques | 26 |
| 2-2-1- la concentration minimale en NaCl | 27 |
| 3- Résultat de la concentration minimale inhibitrice des métaux | 27 |
| 4- Discussion | 29 |

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

32

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

| Figure N° | Titre | Page |
|-----------|---|------|
| 1 | Spore de <i>Bacillus cereus</i> observée par microscopie électronique en transmission | 8 |
| 2 | Cycle de sporulation et germination de <i>B. subtilis</i> | 9 |
| 3 | schéma explique les dilutions décimales. | 16 |
| 4 | Schéma de la purification des colonies bactériennes. | 17 |
| 5 | Schéma de l'effet de la concentration du NaCl sur la croissance bactérienne. | 21 |
| 6 | schéma de l'effet des métaux lourds sur la croissance bactérienne. | 22 |

LISTE DES PHOTOS

| Photo N° | Titre | Page |
|----------|---|------|
| 1 | Localisation des sites d'étude de la région de Zelfana (Google Earth). | 13 |
| 2 | Photographies des sites de prélèvements (A : El-hssai (eau) B : El-ouad (sol)). | 14 |
| 3 | Les milieux de culture de la conservation des <i>Bacillales</i> halophiles isolées. | 18 |
| 4 | (A) Isolement de la souche F1, (B) La souche F1 après la purification. | 23 |
| 5 | Aspects macroscopiques des isolats sélectionnés sur GN après 15 jours d'incubation à 37 °C. | 25 |
| 6 | Observation microscopique de la coloration de Gram à l'immersion (GX100) | 26 |
| 7 | observation microscopique de la coloration de spore (G×100). | 26 |
| 8 | L'effet de la salinité sur la croissance de la souche. | 27 |

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau N° | Titre | Page |
|------------|---|------|
| 1 | Distribution des microorganismes en fonction du sol | 3 |
| 2 | Les catégories des métaux lourds et leurs quantités en mg/kg dans un sol non pollué. | 5 |
| 3 | Classification des extrémophiles. | 6 |
| 4 | Différentes catégories des bactéries halotolérantes. | 7 |
| 5 | Différentes catégories des bactéries halophiles. | 7 |
| 6 | Classification des bactéries selon la forme de la spore. | 10 |
| 7 | les caractéristiques du genre <i>Bacillus</i> . | 10 |
| 8 | la Pathogénicité et l'habitat des <i>Bacillus</i> . | 11 |
| 9 | l'intérêt biotechnologique des <i>Bacillus</i> . | 12 |
| 10 | La composition de milieu de culture gélose nutritive ordinaire (CONDA). | 15 |
| 11 | La composition de milieu de culture bouillon nutritif (Indicia). | 15 |
| 12 | Les aspects macroscopiques des différentes souches isolées à 10% NaCl. | 24 |
| 13 | Les concentrations minimales inhibitrices (mg/mL) des métaux lourds pour la <i>Bacillus</i> sp. | 27 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------------------|---------------------------------|
| ARNr 16S | Acide Ribonucléique Ribosomique |
| <i>B.</i> | <i>Bacillus</i> |
| BN | Bouillon nutritive |
| C° | Degré Celsius |
| Cl ⁻ | ion chlorure |
| Cm | Centimeter |
| CO ₂ | dioxyde de carbone |
| CO ₃ ⁻² | ion carbonate |
| E | Echantillon |
| GN | Gélose nutritive |
| g/L | Gramme sur litre |
| HCO ₃ ⁻ | ion bicarbonate |
| mL | Millilitre |
| Mm | Millimètre |
| NaCl | chlorure de sodium |
| NH ₄ ⁺ | Ammonium |
| p/v | Poids / volume |
| pH | potentiel d'hydrogène |
| PO ₄ ³⁻ | Phosphate |
| SO ₃ ²⁻ | ion sulfate |
| SO ₄ ²⁻ | ion sulfate |
| sp. | Espèce |

| | |
|---------------|-------------|
| VF | Viande foie |
| μL | Microlitre |

INTRODUCTION

Introduction

Au cours de l'évolution de la terre, un certain nombre d'écosystèmes ont été formés. Ces derniers se différencient par la grande variété des facteurs physico-chimiques qui composent notre environnement (Van den Burg, 2003). Les microorganismes vivent en milieux extrêmes, au cours de l'évolution, ils ont développé des stratégies adaptatives très variées pour survivre dans des conditions extrêmes telles que des milieux à forte salinité, acidité ou alcalinité, ou bien à températures élevées (Peduzzi *et al.*, 2006).

Selon les conditions extrêmes auxquels les microorganismes extrêmophiles sont confrontés, ils peuvent être thermophiles, psychrophiles, alcalophiles (alkaliphiles), acidophiles, piézophiles halophiles ou halotolérants (Irwin et Baird, 2004).

Parmi ces microorganismes, on trouve les bactéries halophiles et halotolérantes du genre *Bacillus* qui sont adaptées aux conditions hypersalines (Margesin et Schinner, 2001). Les halophiles et les halotolérants présentent une grande diversité phylogénétique dans les trois domaines des êtres vivants : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Oren, 2002).

Les membres du phylum *Firmicutes* sont hautement divers aux niveaux physiologique et morphologique, ils sont capables d'habiter une grande variété d'environnements, parmi lesquels: les milieux hypersalins. La famille des *Bacillaceae* appartient à ce phylum, elle est très importante; ainsi que 21 genres incluant des espèces halophiles obligatoires (Ludwig *et al.*, 2008).

Le sel est fait parti des facteurs agissant sur les populations microbiennes dans l'eau et le sol. L'équilibre de sel dans ces milieux est affecté par la pénurie de la pluie et la forte évaporation principalement dans les régions arides et semi-arides (Hachicha, 2007). L'Algérie est un pays écologiquement très diversifié, recelant de nombreux environnements extrêmes représentés par les chotts, les Sebkhas et le désert (Kharroub, 2007).

Le Sahara algérien est un grand et important désert, il est plus chaud dans le monde entier. Il est considéré comme une immense réserve écologique, notamment la diversité de la microflore bactérienne colonisant ce milieu extrême (Bioud et Matarfi, 2017).

Dans le laboratoire de microbiologie à l'université de Ghardaïa, notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche ayant pour objectif d'un screening des souches

extrêmophiles halophiles qui appartient à l'ordre des *Bacillales*, du sol saharien de la région de Zelfana.

Pour cela nous avons suivi la démarche expérimentale suivante:

- ✓ Isolement des *Bacillales* halophiles.
- ✓ Caractérisation macromorphologique des isolats.
- ✓ Caractérisation micromorphologique des isolats.
- ✓ Etude de la métallo-résistance de quatre métaux à différentes concentrations sur la croissance des bactéries isolées.

La première partie de ce manuscrit sera proposée une revue bibliographique sur le sol et l'eau aussi ses microorganismes extrêmophiles, l'ordre *Bacillales* et son importance biotechnologique.

La deuxième partie, représente le travail pratique qui indique les différentes techniques utilisées.

La troisième partie, évoque les résultats comparés et discutés dans le travail; suivie par une conclusion et des perspectives générales.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Le Sol

1-1- Définition

Le sol est défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre (NF ISO 15799, 2004). Il est composé de trois phases : solide, liquide et gazeuse. Leurs proportions sont variables en fonction de l'état hydrique et des contraintes mécaniques. Le sol est constitué de cinq composants majeurs : fraction minérale, matière organique, eau, air et organismes vivants (Alexander, 1977).

1-2- Diversité bactérienne du sol

Le sol est un environnement hétérogène complexe qui contient une grande variété de communautés et d'espèces bactériennes (Daniel, 2005). La population microbienne s'élève à des valeurs comprise entre 10^6 et 10^9 bactéries par gramme de sol (Artiola-Fortuny et Fuller, 1982). Les bactéries (Archaébactéries et Eubactéries), de champignons (levures et moisissures), actinomycètes (actinobactéries), d'algues et de protozoaires, sont les micro-organismes qui entrent dans la composition des sols (Bousseboua, 2005).

1-3- Distribution des microorganismes dans le sol

Tableau 1 : Distribution des microorganismes en fonction du sol (Alexander, 1994).

| Profondeur (cm) | Organismes/g de sol ($\times 10^3$) | | | | |
|-----------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------|-------------|--------|
| | Bactéries aérobies | Bactéries anaérobies | Actinobactéries | Champignons | Algues |
| 3-8 | 7800 | 1950 | 2080 | 119 | 25 |
| 20-25 | 1800 | 379 | 245 | 50 | 5 |
| 35-40 | 472 | 98 | 49 | 14 | 0,5 |
| 65-75 | 10 | 1 | 5 | 6 | 0,1 |
| 135-145 | 1 | 0,4 | - | 3 | - |

1-4- Rôles des microorganismes dans le sol

Les micro-organismes telluriques jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement et la structure des sols, dans les cycles de l'azote et du carbone, dans la biodisponibilité des éléments nutritifs, dégradation des polluants organiques et rétention de polluants métalliques (INRA, 2008).

2- L'Eau

2-1- Définition

L'eau ou l'oxyde dihydrogène (H₂O), une substance qui existe abondamment en phase solide, liquide et gazeuse sur la surface terrestre et dans l'atmosphère (Storm, 2008). C'est un élément indispensable pour activités biologique et le constituant le plus important des êtres vivants (70 % de leurs poids en moyenne) (Aissaoui, 2013).

2-2- Types et les ressources de l'eau

Il existe deux types d'eau, salée et douce, le premier se trouve dans les océans et les mers (97,2 %). La deuxième est répartie entre les glaciers, les nappes souterraines et les lacs (In Dictionary of Public Health, 2007).

Il existe deux types d'eau douce qui sont les eaux souterraines et les eaux de surface. Les eaux souterraines sont habituellement à l'abri des sources de pollution, elles sont donc d'excellente qualité physico-chimique et microbiologique par rapport aux eaux de surface (Mebarki, 1982).

2-3- Diversité microbienne de l'eau

Les milieux lotiques, composés de microorganismes phototrophes (micro-algues et cyanobactéries) et hétérotrophes (bactéries, champignons et protozoaires). Certaines conditions environnementales peuvent favoriser en premier lieu la colonisation des algues vertes (forte intensité lumineuse) ou des bactéries hétérotrophes (faible intensité lumineuse) (Roeselers *et al.*, 2007).

2-4- Rôles des microorganismes dans l'eau

Les microorganismes lotiques jouent un rôle clé dans différents processus écologiques, comme la production primaire, la dégradation de la matière organique ou encore le recyclage des nutriments (Battin *et al.*, 2003). Les microorganismes phototrophes profitent des nutriments issus de ces processus de minéralisation pour leur développement comme (CO₂, PO₄³⁻, NH₄⁺, SO₄²⁻) (Chrost, 1992; Zheng *et al.*, 2002).

3- Milieux extrêmes

Les milieux extrêmes sont des zones écologiques dont les conditions physicochimiques (température, pH, salinité, teneur en eau et pression) sont difficiles

pour la vie des organismes qui sont adaptés à des biotopes normaux. Pourtant ces environnements sont favorables pour le développement des organismes extrémophiles (Zettam, 2013).

3-1- Effet de salinité

La salinisation est le mécanisme d'accumulation des sels minéraux solubles dans le sol. Ces sels sont constitués d'une combinaison d'anions (Cl^- , SO_3^{2-} , CO_3^{2-} , HCO_3^-) et d'une combinaison de cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) (Tanji, 2002). Ce phénomène est identifié comme une cause majeure de la dégradation des terres, particulièrement dans les zones arides et semi-arides (Calvet, 2003).

Les sols salés "halomorphes" sont caractérisés par une concentration en sels solubles supérieure à 0,2 % (p/v) (Kharroub, 2007). Le taux de salinité a une grande influence sur l'évolution de la microflore du sol, l'augmentation de la quantité fait diminuer le nombre de microorganismes (Dari, 2013).

La présence de sel dans le sol modifie certaines propriétés de l'eau à la cellule microbienne (la disponibilité, l'activité...) qui cause une modification sur le volume cellulaire, la pression de turgescence qui constitue la force mécanique nécessaire à l'élongation de la cellule durant la croissance (Csonka, 1989). Certains microorganismes extrémophiles sont capables d'équilibrer la pression osmotique du milieu et de résister à l'effet de la dénaturation provoqué par le sel (Grant *et al.*, 2001).

3-2- Métallo-résistance bactérienne

Les métaux lourds ou d'éléments-traces métalliques (ETM) sont des composants stables très persistants, qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques (Croteau *et al.*, 2005; De Forest *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Les catégories des métaux lourds et leurs quantités en mg/kg dans un sol non pollué (Haouchine et Leham, 2016; Beveridge, 1989).

| Catégorie | Les métaux lourds | Les quantités en mg/kg |
|--|-------------------|------------------------|
| Aucune fonction biologique ou physiologique. Toxiques à très faibles concentrations | Cadmium (Cd) | 0,01 - 3,6 |
| | Plomb (Pb) | 1,2 - 71,5 |
| Cofacteurs indispensables pour la | Nickel (Ni) | 3,4 – 771 |

| | | |
|--|-----------|------------|
| stabilisation ou la conformation de certaines protéines. Toxiques à haute concentration | Zinc (Zn) | 6,6 - 40,3 |
|--|-----------|------------|

La résistance microbienne aux métaux est hétérogène que se soit sur le plan génétique (elle peut être codée par le chromosome ou le plasmide) soit biochimique (mécanismes de résistances) (Rouch *et al.*, 1997). Certains microorganismes ont la tolérance ou la résistante à la toxicité des métaux lourds, ils sont ainsi devenus capables de survivre dans des milieux hautement pollués (Gadd, 1992).

3-3- Les extrêmophiles

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois par Mac Elroy en 1974. Un extrêmophile est considéré comme étant un organisme dont les conditions de croissance optimales sont situées en dehors des environnements qualifiés de normaux (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995). La notion d'extrêmophiles est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes. Elles sont réparties dans des différentes classes selon les facteurs physiques et chimiques qui caractérisent leur milieu de développement : les halophiles, les thermophiles, les psychrophiles, les acidophiles, les basophiles et les piezophiles (Alber *et al.*, 2001; Van den Burg, 2003).

Tableau 3 : Classification des extrêmophiles (Van den Burg, 2003).

| Types | Caractéristiques de croissance |
|---------------|--|
| Thermophiles | Température > 80°C : hyperthermophiles 60-80°C : thermophiles |
| Psychrophiles | Température < 15°C |
| Halophiles | Concentration élevée de sel |
| Alcalophiles | pH > 9 |
| Acidophiles | pH < 2-3 |
| Piezophiles | Haut pression |

3-4- Microorganismes halophiles et halotolérants

Le mot halophile est composé de deux parties « *Halos* = sel » et « *phil* = aime ». Les halophiles sont un groupe de microorganismes qui vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre (Das Sarma, 2001). Les milieux extrêmes tels que les écosystèmes hypersalins contenant des concentrations en sel dix fois plus élevée que celles de l'eau de mer (3,5% de NaCl) (Marthenda-Egea et Bonete, 2000; Oren, 2010; Litchfield, 2011; Delgado-Garcia *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2013).

Lorsqu'on dépasse les 100 g/L en sels, les milieux deviennent extrêmes et inhibent la croissance d'une grande majorité des microorganismes (Rodriguez-Valera, 1988). Les halophiles extrêmes se développent en présence d'une concentration de sel entre 20% et 30% et exigent un minimum de 12% à 15% de sel pour la croissance (Khallef, 2019) (Tableau 4).

Il existe également une catégorie de microorganismes non halophiles mais capables de tolérer des concentrations élevées de NaCl, et ils sont définis comme halotolérants ou extrêmement tolérants (Horikoshi, 2011), et le classement de Tiquila *et al.* (2006) est généralement utilisé par plusieurs auteurs (Tableau 4).

Tableau 4 : Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiquila *et al.*, 2006).

| Catégories | NaCl |
|-----------------------------|-----------|
| Légèrement halotolérantes | 6 à 8% |
| Modérément halotolérantes | 18 à 20 % |
| Les halotolérantes extrêmes | 0 à 30%. |

D'autres classement existent également dans la littérature scientifique; comme le classement de Ollivier *et al.* (1994) et de Amoozegar *et al.* (2009).

Tableau 5 : Différentes catégories des bactéries halophiles (Ollivier *et al.*, 1994; Amoozegar *et al.*, 2009).

| Catégories | NaCl |
|-----------------------|----------|
| Légèrement halophiles | 2 - 5% |
| Halophiles modérés | 5 - 20% |
| Halophiles extrêmes | 20 - 30% |

4- Spore bactérienne

Les spores de bactéries (endospores) ont été étudiées pour la première fois par Cohn, Tyndall et Koch dans le dernier quart du 19e siècle (Nicholson W.L, 2002).

Les bactéries ont la capacité de former des spores qui peuvent résister à des conditions extrêmes de hautes pressions hydrostatiques, et de températures élevées ou basses, aux radiations ainsi qu'aux agents chimiques (Nicholson *et al.*, 2000 ; O'Connor *et Halvorson*, 1961).

4-1- Structure des spores bactériennes

Les endospores sont constituées d'un noyau, autrement connu sous le nom de protoplaste, qui contient le matériel nucléaire, entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau de la spore. Selon Knott (1995), L'acquisition de la résistance des spores est indissociable de la formation des spores qui dépend de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales de sporulation. (Kherbouche E, 2014)

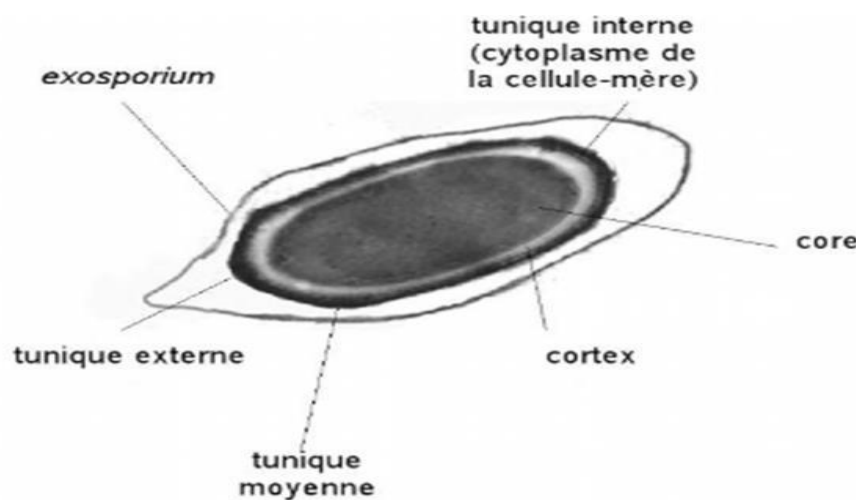


Figure 01 : Spore de *Bacillus cereus* observée par microscopie électronique en transmission (Dromigny, 2008).

4-2- Sporulation et germination

Le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation et la germination (O'Connor et Halvorson, 1961).

4-2-1- Formation des spores

La sporulation est un processus complexe qui est déclenché chez les bactéries pouvant former des spores lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance par la diminution ou l'absence de nutriments ou bien en situation de stress (Barill *et al.*, 2012).

4-2-1-1- Etapes de sporulation

Stade 1 : Le premier changement visible consiste dans la conversion de nucleus compact en un filament chromatique axial qui s'étend sur presque toute la longueur de la cellule.

Stade 2 : une division cellulaire asymétrique s'amorce avec croissance interne d'une double structure membranaire qui forme un septum transversal subpolaire et partage la cellule en deux parties inégales : l'une, petite qui donnera naissance à la spore; l'autre, plus important et correspondant à la cellule végétative qui port la spore embryonnaire, est appelé sporange.

Stade 3 : le septum localise une zone lisse, transparent, entièrement autonome, comprenant un appareil nucléaire, un cytoplasme et une double membrane continue, l'une cytoplasmique, l'autre préfigurant la future paroi, c'est la pré-spore.

Stade 4 à 6 : dans le sporange, la pré-spore va murir progressivement en s'entourant d'un certain nombre de téguments ou enveloppes.

Au cours de la maturation, c'est la double membrane sporale et les cortex forment entre les faces interne de la double membrane, la tunique sporale et l'exosporium qui se disposent à l'extérieure (Meyer *et al.*, 2004).

4-2-2- Germination

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives et devient finalement une cellule végétative.

Ce processus de transformation se déroule en 3 étapes:

Activation : la spore pour germer, doit être activée par un agent capable de léser la tunique sporale afin de lever la dormance. Cet agent indispensable au développement du phénomène peut être mécanique (choc), physique (chaleur) et chimique (acidité).

Initiation : la germination ne débutera ensuite qu'en présence des conditions favorable d'hydratation et de métabolites effecteurs comme l'alanine, l'adénosine, ou des ions inorganique (magnésium) qui pénètrent à travers la tunique endommagée et déclenchent un processus autolytique (le peptidoglycane sporal est détruit en quelque minute, libérant le dipicolinate de calcium. Après l'élimination de la barrière corticale, la spore s'imbibe d'eau, gonfle et perdre sa résistance à la chaleur (Meyer *et al.*, 2004).

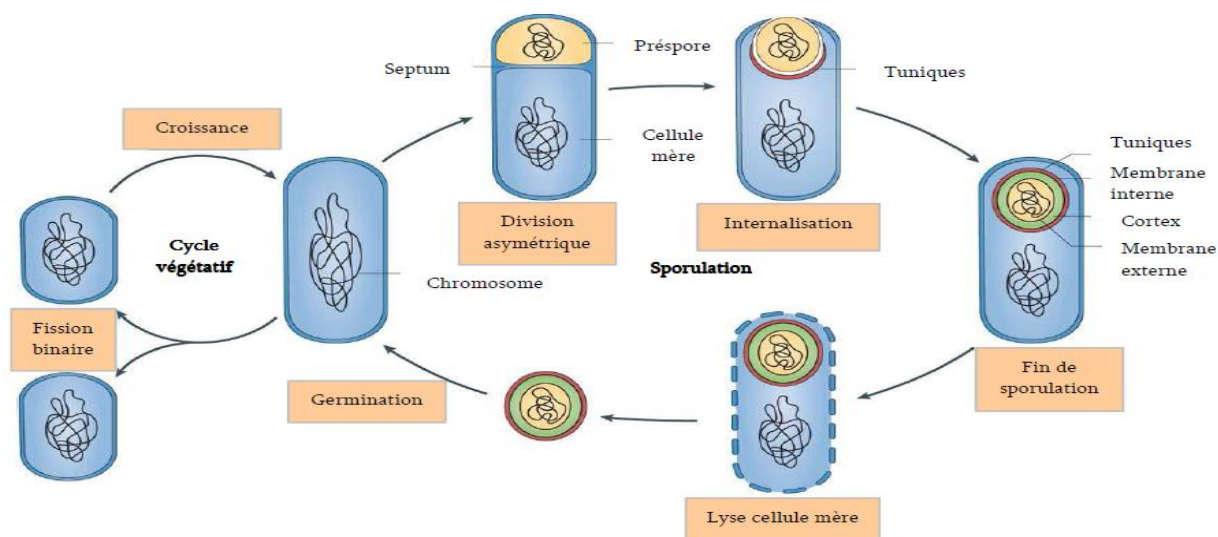


Figure 02 : Cycle de sporulation et germination de *B. subtilis* (McKenney *et al.*, 2013).

4-3- Bactéries sporulées

Ces bactéries peuvent être classées en fonction de la morphologie de la spore (Guiraud, 2003), on distingue les groupes suivants :

Tableau 6 : Classification des bactéries selon la forme de la spore (Guiraud, 2003).

| Groupe | Forme de spore | Exemple |
|----------|--------------------------------------|--|
| Groupe 1 | ovale non déformante à paroi épaisse | <i>B. subtilis</i> |
| Groupe 2 | ovale déformante à paroi épaisse | <i>B. stearothermophilus</i> <i>B. polymyxa</i> |
| Groupe 3 | sphérique déformante | <i>B.pasteurii</i> <i>B.sphaericus</i> |

5- Les Bacillales

5-1- Classification et Caractérisation des Bacillales

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*, l'ordre de *Bacillales*, la classe des *Bacilles* et le phylum des *Firmicutes*. Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont largement distribués dans différents écosystèmes grâce à leur capacité à former des endospores résistantes aux changement de conditions (Harwood *et al.*, 2018).

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été basée auparavant sur leur capacité à sporuler et leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques (Bron *et al.*, 1999). La première étude taxonomique complète a été publiée par Smith *et al.* (1952) sur le genre *Bacillus* basée sur une comparaison entre 1134 isolats représentant plus de 150 espèces (Claus et Fritze, 1989; Priest, 1993).

Les *Bacillus* désigne un genre de bactéries qui comprend différents bacilles aérobies et aéro-anaérobies facultatifs, à Gram positif, sous formes des bâtonnés capable de former les endospores. (Gugliandolo *et al.*, 2003).

Aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S (Maughan et Van der Auwera, 2011).

Tableau 7 : les caractéristiques du genre *Bacillus* (Sherwood et willey,2013).

| Genre | Dimensions (µm) et morphologie | Contenu en GC (mol. %) | Taille du génome (Mb) | Exigence oxygène | Autre caractères distinctifs |
|-----------------|---|------------------------|-----------------------|--------------------------|--|
| <i>Bacillus</i> | 0,5-2,5 × 1,2-10; bâtonnets droits, flagelles péritriches, forment des endospores | 32-69 | 4,2-5,4 | Aérobies ou facultatifs. | Catalase positifs chimioorganotrophes. |

5-2- Habitat et écologies

Les *Bacillus* sont des germes ubiquitaires de l'environnement. Ayant une grande résistance grâce à la formation des spores. Ils sont rencontrés dans des niches écologiques très variées (des sols, eaux douces, eaux de mers, plantes, etc.) (Emanuel *et al.*, 2009).

5-3- Pathogénicité

Certaines souches des *Bacillaceae* sont non pathogènes pour l'homme, d'autres provoquent des infections et peuvent parfois causer la mort (Parry *et al.*, 1983). *Bacillus cereus*, peut se multiplier dans les aliments et y produire une entérotoxine qui provoque des diarrhées (Drobniowski, 1993; Jackson *et al.*, 1995). *Bacillus anthracis* est le pathogène le plus virulent du genre *Bacillus* (Turnbull *et al.*, 1992).

D'autres souches de ce genre sont pathogènes pour certaines catégories d'insectes ou de parasites: elles sont utilisées par le secteur agronomique dans la lutte biologique (Krieg *et al.*, 1981).

Tableau 8 : la Pathogénicité et l'habitat des *Bacillus* (Cheikh Rouhou, 2006).

| Bactérie | Pathogénicité | Habitat |
|-------------------------|---|---|
| <i>B. subtilis</i> | une intoxication alimentaire | surface du sol. |
| <i>B. licheniformis</i> | toxi-infections alimentaires et des infections oculaires | sol et plante |
| <i>B. cereus</i> | provoque des infections chez l'homme dont dans la pneumonie et la méningite | dans la nourriture (lait, céréales et le riz) |
| <i>B. anthracis</i> | l'agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax. maladie animale | |

| | | |
|-------------------------|---|--|
| | contagieuse) touchant principalement les mammifères (y compris l'homme) | |
| <i>B. thuringiensis</i> | insecticides pour certains lépidoptères, coléoptères et diptères détruisant les cellules de l'intestin moyen de la larve de l'insecte | dans l'air, l'eau, le feuillage des végétaux et dans les sols. |

5-4- Importance biotechnologique des *Bacillus*

Les bactéries du genre *Bacillus* sont très utilisées pour des applications en biotechnologie grâce à son omniprésence dans la nature ainsi que sa diversité métabolique et génétique, la production des substances antimicrobiennes et des insecticides (Bron *et al.*, 1999), des enzymes tell que les hydrolases, les protéases et les nucléases de glycoside des halophiles ont été analysées comme candidats pour des applications industrielles dans différent champs (Marthenda-Egea et Bonete, 2000; Oren, 2010; Litchfield, 2011; Delgado-Garcia *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2013), la lutte biologique contre les ravageurs dans l'agriculture (Souza *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006).

Les *Bacillus* présentent plusieurs intérêts d'ordre médical, agronomique et pharmaceutique et industriel (Carr, 1983; Gordon *et al.*, 1973; Hara et Veda, 1982; Parry *et al.*, 1983), et la majorité absolue des souches et espèces des *Bacillaceae* sont non pathogènes pour l'homme (Parry *et al.*, 1983).

Tableau 9 : l'intérêt biotechnologique des *Bacillus* (Cheikh Rouhou, 2006).

| Bactérie | Les intérêts | | |
|-------------------------|---|---|--|
| | Agronomique | Industriel | Pharmaceutique |
| <i>B. subtilis</i> | Production des enzymes protéases cellulases employés dans les industries agroalimentaires | Amylases utilisés dans l'industrie du pain | Produire des antibiotiques comme bacitracine |
| <i>B. licheniformis</i> | lutte contre certains microorganismes fongiques pathogènes attaquant les récoltes de maïs | production de coenzymes | produire de la proticine et de l'acide poly-y-glutamique |
| <i>B. halodurans</i> | Production des enzymes protéase, la cellulase et l'amylase | Produire d'enzymes alcalins xylanase β -galactosidase | |

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODE

1- site d'isolement

Les prélèvements d'échantillons sont réalisés le 27 janvier 2020 dans la région de Zelfana (wilaya de Ghardaïa), et précisément dans trois sites : El-ouad, Hamam Elbaraka et El-hssai (photo 2).

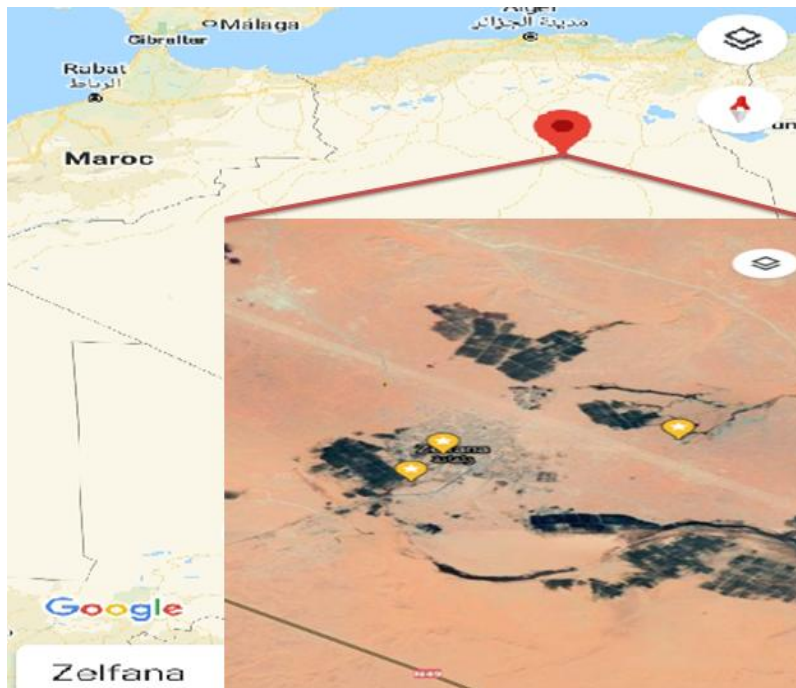


Photo 1 : Localisation des sites d'étude de la région de Zelfana (Google Earth).

2- Prélèvement des échantillons

- Premier échantillon : sol saharien (partie non rhizosphérique).
- Deuxième échantillon : sol (partie rhizosphérique de la plante de *Tamarix*).
- Troisième échantillon : eau de Hammam Zelfana.
- Quatrième échantillon : eau de puits (forage).

Les échantillons d'eau sont prélevés dans des flacons en verre stériles, et les échantillons de sol sont prélevés après une élimination d'environ de 15 cm de la surface du sol, également dans des flacons en verre stériles.



Photo 2: Photographies des sites de prélèvements (A : El-hssai (eau) B : El-ouad (sol)).(Bedjadj et Ben messaoud ,2002).

3- Appareillage

- Hotte (BioBase)
- Autoclave (Hirayama).
- Agitateur magnétique chauffant.
- Agitateur incubateur (Thermo Scientific).
- Congélateur (IRIS Sat).
- Réfrigérateur.
- Bain-marie (WiseBath).
- Balance de précision (OHAUS).
- Etuve (Raypa Trade).
- Vortex Agitateur (Dragon Lab).
- Microscope (Novac).

4- Milieux de culture et produits chimiques

4-1- Milieux de culture

- Le milieu utilisé pour l'isolement est la gélose nutritive ordinaire (GN).

Tableau 10. La composition de milieu de culture gélose nutritive ordinaire (CONDA).

| Composants | Concentration (g/L) |
|---|---------------------|
| Peptone | 3 |
| Extrait de viande | 3 |
| Agar bactériologique | 18 |
| pH final : $7,3 \pm 0,2$ (à 25 °C) | |
| La stérilisation est réalisée à l'autoclavage à 120°C /30min. | |

❖ Milieu bouillon nutritif :

Tableau 11. La composition de milieu de culture bouillon nutritif (Indicia).

| Composants | Concentration (g/L) |
|--|---------------------|
| Peptone | 5 |
| Extrait de viande | 3 |
| pH final : $6,8 \pm 0,2$ (à 25 °C) | |
| La stérilisation est réalisée à l'autoclavage à 120 °C /30min. | |

4-2- Pigments :

- Fushine
- Lugol (1%) (RAL).
- Violet de gentiane (1%) (RAL).
- Vert de malachite (5%) (LMR).

4-3- Produits chimiques:

- Ethanol (Acros).
- Huile à immersion (OPTIKA).

5- Isolement des *Bacilalles*

5-1- Préparations des dilutions décimales

Les suspensions ont été obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère avec un volume de diluant égal à neuf (9) fois le volume prélevé de la suspension mère et en répétant cette opération sur chaque dilution préparée jusqu'à l'obtention d'une série de dilutions décimales, une série de dilutions allant à 10^{-5} est effectuée appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture (journal officiel de la republicque algerienne , 2016).

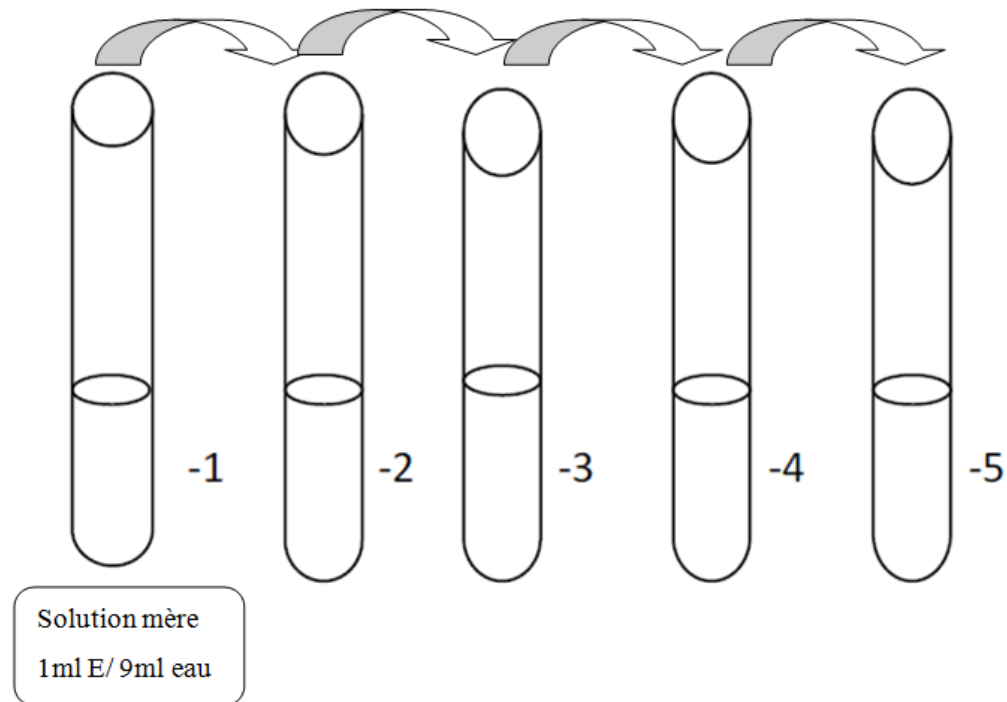


Figure 3 : Schéma explicatif des dilutions décimales.

5-2- Traitement des échantillons :

Puisqu'il s'agit d'une étude pour isoler les *Bacillales*, l'isolement est donc basé sur les caractéristiques de la thermorésistance de leurs spores, les échantillons analysés ont subi un traitement thermique à 100 °C pendant 10 min (Durand, 2014), pour l'élimination de toutes les cellules végétatives, et donc seules les bactéries capables de produire des spores (sporogènes) peuvent survivre.

5-3- Ensemencement et conditions de culture

Les solutions mères et les dilutions sont ensemencées sur milieu GN (gélose nutritive) à base de 10 % et 15 % de NaCl, l'incubation est effectuée à 37 °C durant 15 à 20 jours.

Le milieu GN est coulé dans les boîtes de Pétri (de 90 mm). Grâce à une micropipette, 0,1 mL (100 µL) de différentes dilutions déposées dans les boîtes de Pétri, sont par la suite étalées à la surface de la gélose grâce à une pipette Pasteur en forme d'un râteau.

6- Purification et conservation des souches

6-1- Purification des souches

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur la gélose nutritive, jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes. La technique consiste à prélever quelques colonies à partir des géloses utilisées, à l'aide d'une anse de platine (ou pipette Pasteur) stérile, qu'on dispose à la surface de la gélose et l'ensemencement se fait par la méthode des stries.

Les boîtes de Pétri sont mis en incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures (Bousseboua, 2003).

Après l'incubation de chaque boîte ensemencée, les colonies d'aspects différents sélectionnés doivent être présentées les caractéristiques du *Bacillales*.

Chaque colonie choisie est purifié sur milieu gélose nutritif par repiquages successifs (pour la réalisation des études physiologiques et biochimiques).

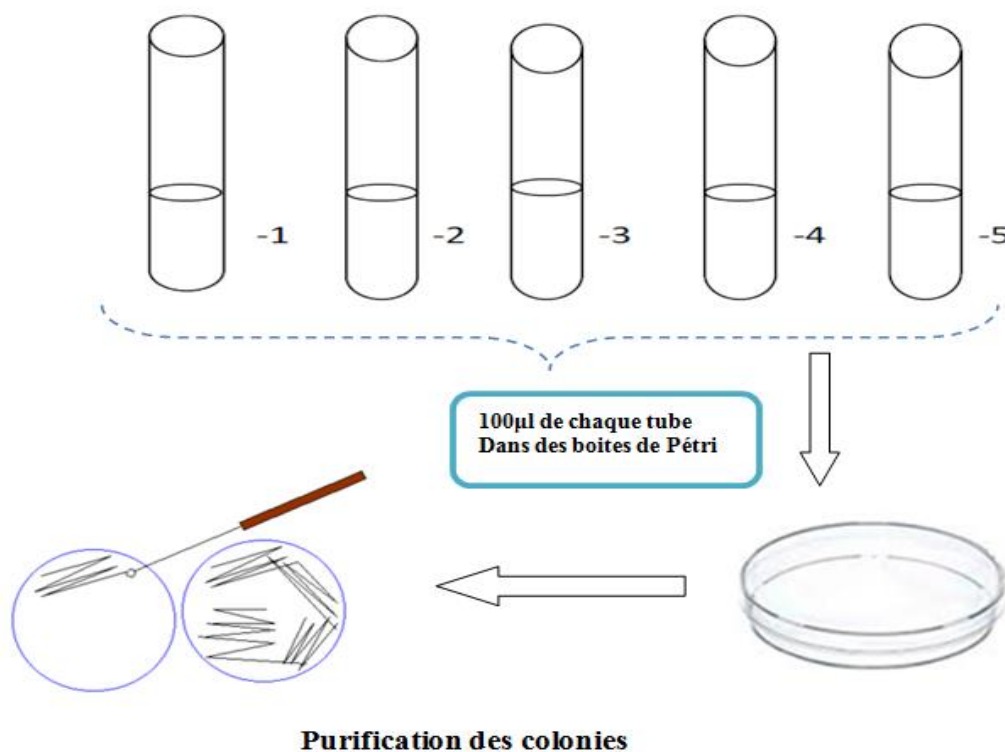


Figure 4 : Schéma de la purification des colonies bactériennes.

6-2- Conservation des souches

Les *Bacillales* halophiles isolées sont ensemencées par des stries sur la pente de la gélose nutritive inclinée (dans des tubes à essai).

L'incubation est effectuée à 37 °C pendant 3 à 5 jours pour assurer une bonne croissance, avant d'être conservés à 4 °C.

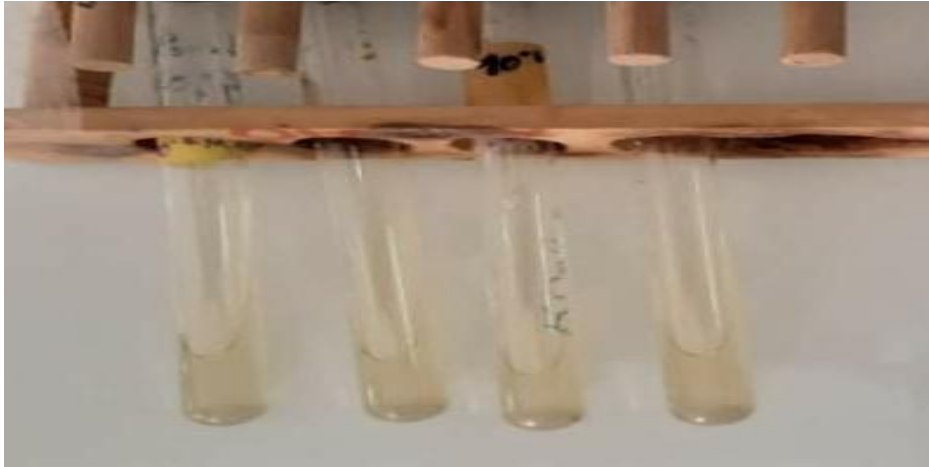


Photo 3 : Les milieux de culture de la conservation des *Bacillales* halophiles isolées.

7- Identification phénotypique

Pour décrire les isolats de l'ordre des *Bacillales*, les souches pures ont été étudiées par différents caractères : culturels, morphologiques et biochimiques pour l'identification bactérienne, selon les tests suggérés par Logan *et al.* (2009).

7-1- Caractéristiques morphologiques

7-1-1- Aspect macro-morphologique

L'observation macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation. Elle consiste à observer directement à l'œil nu, qui servira de moyen d'orientation pour une reconnaissance plus approfondie est basée sur les critères suivants :

La taille : elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant le micromètres oculaires.

La forme: dentelés, déchiquetés, irréguliers, etc.

Relief : surface bombée, demi-bombée, plate, etc.

L'aspect de la surface : la surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, etc.

La consistance : au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches (on obtient difficilement des suspensions homogènes), ou encore muqueuses.

La couleur et/ou pigment : certaines colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). En revanche, des bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractérisé à la colonie (rose, jaune, rouge, etc.), pendant que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu (Avril, 2007).

Les critères culturels des souches sont obtenus sur milieu GN de 10% de NaCl après 12 jours d'incubation à 28 °C.

7-1-2- Aspect micro-morphologique

7-1-2-1- Coloration de Gram

La morphologie et l'arrangement cellulaire sont déterminés par la technique de coloration de Gram découverte par Hans Christian Joachim Gram en 1884 modifiée par Dussault (1955).

Cette coloration permet de mettre en évidence les propriétés structurales de la paroi bactérienne et diviser les espèces bactériennes en deux groupes : bactéries à Gram positif (apparaissent en couleur violettes) et bactéries à Gram négatif (apparaissent en couleur rose).

Cette méthode se déroule en plusieurs étapes :

- 1. Coloration au Violet de Gentiane :** un frottis fixé à la chaleur plongé pendant une minute au violet de Gentiane, il est ensuite rincé rapidement à l'eau courante.
- 2. Mordançage au Lugol :** traite le frottis par une solution de Lugol et laissez agir le même temps que le violet de Gentiane, et de nouveau rincé rapidement.
- 3. Décoloration (rapide) à l'alcool :** versez goutte à goutte l'éthanol 95% sur la lame. 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 à Gram- seront incolores, les cellules à Gram+ violettes.
- 4. Contre coloration à la Fushine:** Mettez la lame pendant 30 secondes à la Fushine pour colorer les cellules Gram- présentés en rose.

Après un bref rinçage sécher le frottis au buvard et observer à l'immersion au grossissement X 100 (Singleton, 1999).

7-1-2-4- Coloration de spores

Les spores des souches isolées sont recherchées après le traitement thermique, Une observation microscopique à l'immersion après la coloration de Gram permet de visualiser les endospores, les cellules végétatives sont colorées en violet et les endospores apparaissent rosées ou non colorées.

En réalité, les colorants de la coloration de Gram ne peuvent pas pénétrer les spores, car il est protégé par leurs enveloppes (Delarras, 2014).

La coloration des spores bactériennes utilise la solution de verte malachite à 5% et 0,5% de safranine (Sumarsih, 2004), la technique de coloration des spores la plus couramment utilisée est la procédure de coloration de Schaeffer-Fulton :

- ✓ Préparation un frottis fixé à la chaleur.
- ✓ La solution de verte malachite est appliquée sur un frottis fixé et chauffé à la vapeur pendant 5 min.
- ✓ Rincé le frottis fixé dans l'eau pendant 30 secondes afin que la tache verte malachite soit éliminée des parties cellulaires autres que les endospores.
- ✓ Une contre-coloration est appliquée au frottis par le colorant safranine pour colorer les cellules végétatives.

L'observation des spores se fait par le microscope au grossissement X100

Cette technique permet de visualiser les spores en couleur verte et rose ou rouges dans les cellules végétatives (Geeta et Mehrotra, 2009).

7-2- Caractéristiques physiologiques

7-2-1- Détermination de la concentration minimale en NaCl

L'effet de la concentration en NaCl sur la croissance de la souche a été déterminé selon la méthode décrite par Joshi *et al.* (2008).

La culture bactérienne est préparée sur bouillon nutritif (BN) sur l'erenmeyer et centrifugée à 200 rpm pendant 48 heures.

Après la centrifugation ajouter 0,1 mL de la suspension bactérienne dans des tubes à vis contenant un milieu BN à une concentration en NaCl allant de 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 % (p/v), respectivement.

L'incubation de la souche bactérienne a été faite à 37 °C durant 4 et 8 jours.

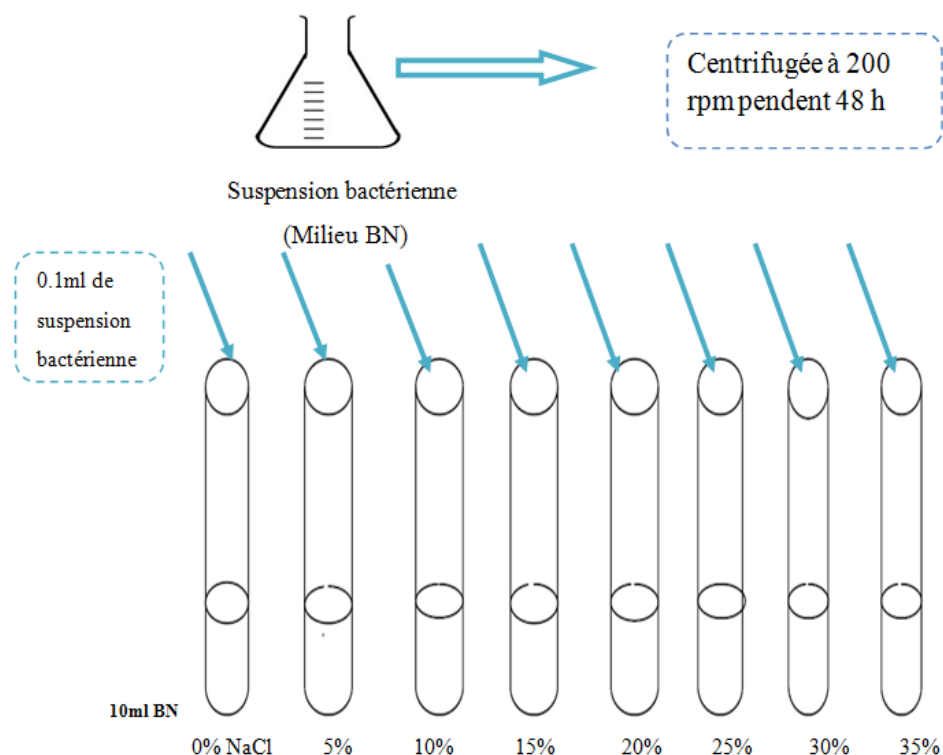


Figure 5: Schéma de l'effet de la concentration du NaCl sur la croissance bactérienne.

8- Détermination de la résistance aux métaux lourds

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux a été évaluée pour la souche isolée par la méthode de dilution en milieu liquide (bouillon nutritive) à base de 20% de NaCl.

Des solutions mères de plusieurs éléments métalliques : Chrome (Cr), Cuivre (Cu), Zinc (Zn) et Aluminium (Al) contenant 300 mg de métaux lourds et 30 mL d'eau distillée.

Prendre 10 mL de solution mère et le mettre dans le premier tube à vis (10^4), puis prendre 2 mL de solution mère et diluer avec 18 mL d'eau distillée dans un récipient, prendre 10 mL du récipient et le mettre dans le deuxième tube à vis (10^3), en utilisant la même manière de dilution jusqu'à le cinquième tube (10^1).

Ajouter dans chaque tube 0,1 mL de suspension bactérienne qui est déjàensemencée dans un milieu liquide BN à base de 20% de NaCl.

Après l'incubation à 37 °C durant 24 heures, on observe la turbidité dans les tubes.

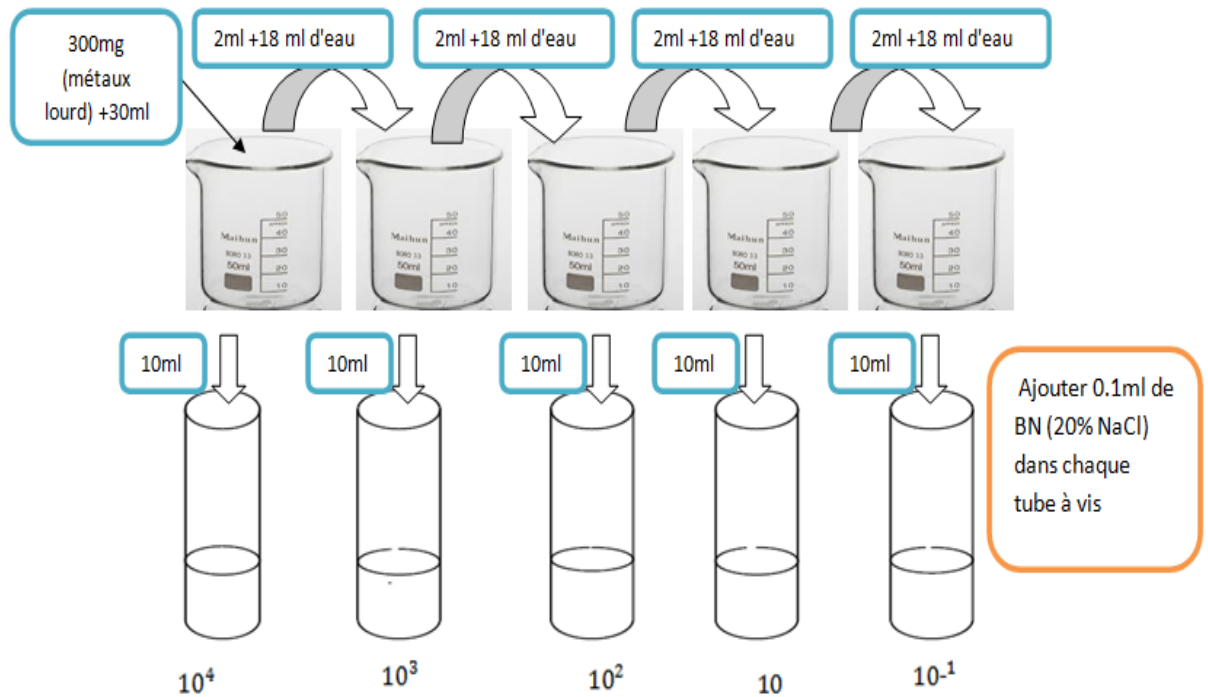


Figure 7 : schéma de l'effet des métaux lourds sur la croissance bactérienne

CHAPITRE III
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1- Résultats de l'isolement et purification

Après un traitement thermique à 100 °C pendant 10 min, la solution mère et les dilutions décimales ont été ensemencés sur un milieu gélose nutritive à base de 15 % NaCl (pour les échantillons eau et sol) et 10% NaCl (pour l'échantillon sol) et incubées pendant 15 à 20 jours.

A partir des échantillons du sol et de l'eau prélevés au niveau de différents sites de la région de Zelfana, quatre souches bactériennes ont été isolées à partir de l'échantillon de sol, en revanche aucune souche n'a été isolée à partir de l'échantillon de l'eau.

L'isolement et la purification d'une seule souche isolée a été effectué sur la gélose nutritive GN (Photo3).

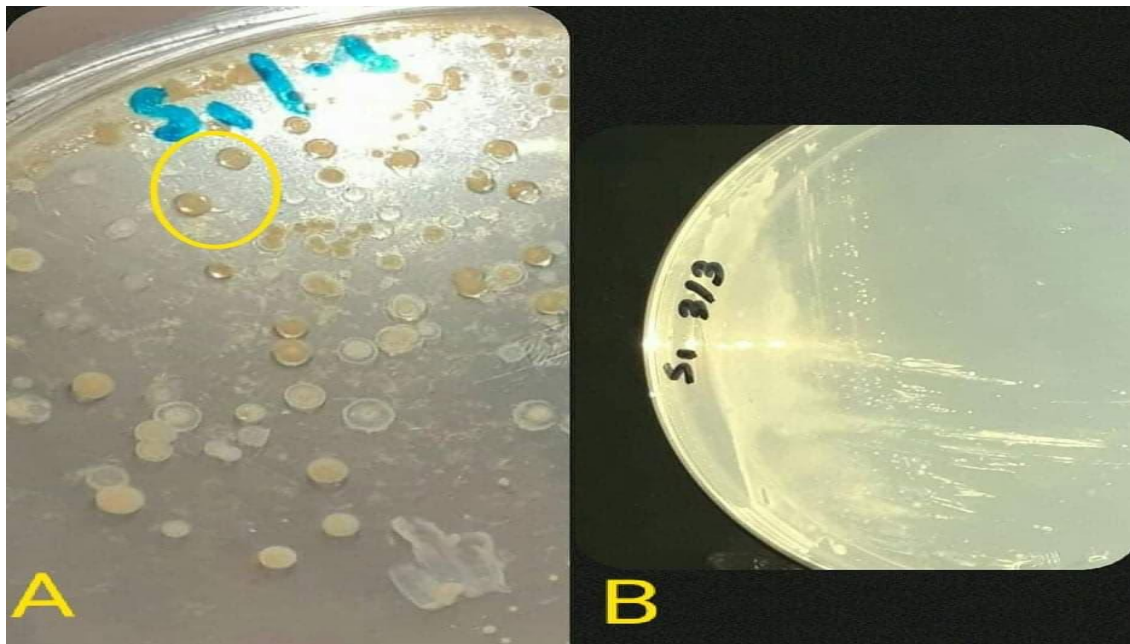


Photo 4: (A) Isolement de la souche F1, (B) La souche F1 après la purification. (Bedjadj et Ben messaoud ,2002).

2- Résultats de l'identification phénotypique

2-1- Résultats de l'identification morphologiques

2-1-1- Aspect macroscopique

Les caractères macroscopiques des souches obtenues sont déterminés sur le milieu GN après 15 jours d'incubation à 37 °C (photo 4), les souches sélectionnées ayant des aspects différents et capables de pousser à 10% de NaCl.

Ces dernières sont désignées selon un code composé de lettre et de numéros (de F1 jusqu'à F4) (tableau 9).

Tableau 12. Les aspects macroscopiques des différentes souches isolées à 10% NaCl.

| Souche | Taille | Forme | Aspect | Relief | Opacité | Couleur | Consistance |
|--------|---------------------|-----------|-----------------------|--------|-------------|--|--------------|
| F1 | Petite (3mm) | Régulière | Lisse et brillante | Plate | Opaque | Crème | Crémeuse |
| F2 | Petite (3 mm) | Régulière | Lisse et brillante | Plate | Translucide | Transparente avec un point blanc | Crémeuse |
| F3 | Petite (2 mm) | Régulière | Lisse et brillante | Bombé | Opaque | Orange | Crémeuse |
| F4 | Moyen (2 cm) | Régulière | Filamenteuse | Bombé | Translucide | Vert foncé | Filamenteuse |

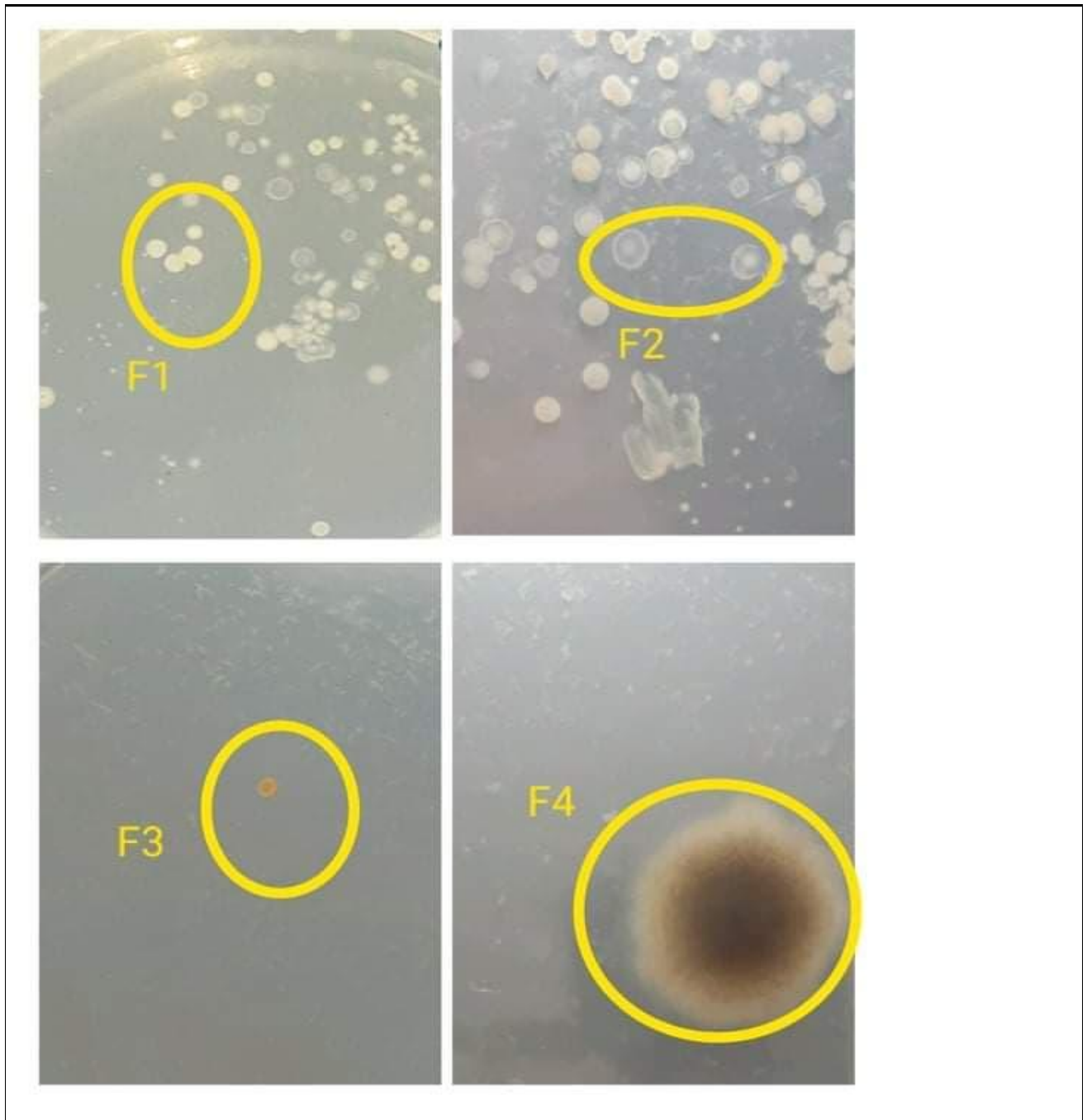


Photo 5: Aspects macroscopiques des isolats sélectionnés sur GN après 15 jours d'incubation à 37 °C.(Bedjadj et Ben messaoud ,2002).

2-1-2- Aspect microscopique

Une seule souche a été sélectionnée (parmi les 4 isolats obtenus); et qui a subi des étapes de purification.

2-1-2-1- Coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram sur des colonies développées sur milieu GN et

l'observation microscopique aux grossissements (G X100) avec l'huile à immersion, nous avons constaté que la souche étudiée est un bacille à Gram positif (photo 5).

La souche F1 a été donc retenue selon les critères suivants : une souche à Gram positif capable de former des spores sous formes de bâtonnets.

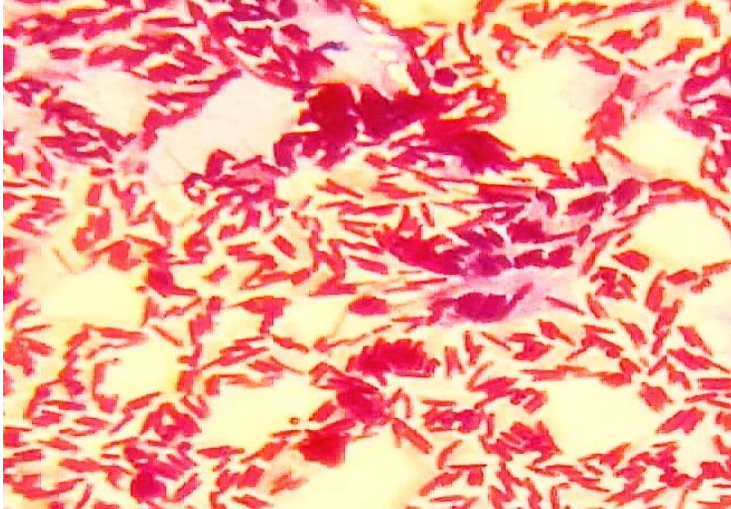


Photo 6: Observation microscopique de la coloration de Gram à l'immersion (GX100) (Bedjadj et Ben messaoud ,2020).

2-1-2-2- Recherche de la spore

La coloration de spores par le colorant vert de malachite est réalisée a permis de visualiser des spores à l'intérieur des bacilles ou parfois se trouvent libres à l'extérieur des bacilles qui apparaît en couleur verte (photo 7).

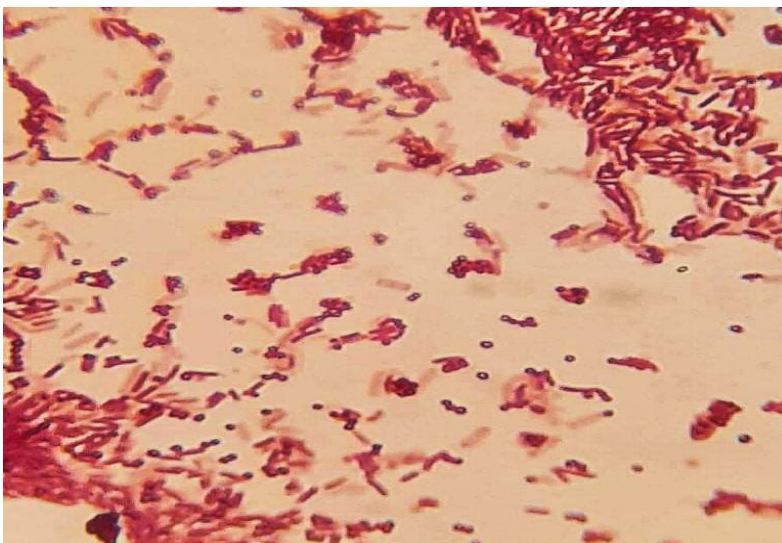


Photo 7: Observation microscopique de la coloration de spores (GX100) (Bedjadj et Ben messaoud ,2020).

2-2- Résultats des tests physiologiques

2-2-1- la concentration minimale en NaCl

La souche F1 a cultivée sur un milieu liquide bouillon nutritif à une gamme de salinité qui varie de 0 à 35 % (p/v). (dans des tubes à vis) est incubée à 37 °C durant 4 et 8 jours. L'optimum de croissance était de 20% de NaCl (p/v) (photo 10).

0 jour



après 4 jours



après 8 jours

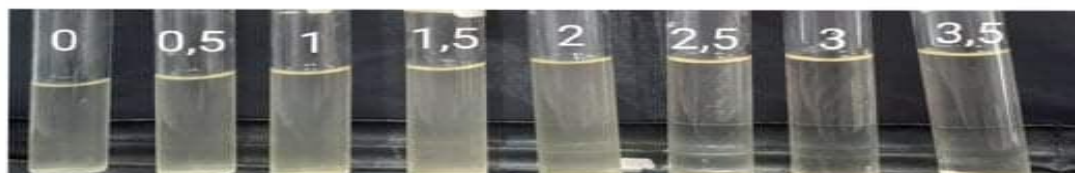


Photo 8 : L'effet de la salinité sur la croissance de la souche. (Bedjadj et Ben messaoud ,2020).

3- Résultat de la concentration minimale inhibitrice des métaux

Les résultats de Haouchine et Leham (2016) qui ont testé la résistance de la souche *Bacillus* sp. isolée aux différents métaux par la méthode de dilution en milieu liquide qui est le Bouillon Brain Heart infusion BHIB (annexe III).

Après 24h d'incubation à 37 °C, les CMI sont déterminées à partir des tubes contenant les plus faibles concentrations métalliques ne présentent pas un développement bactérien (absence de trouble).

Tableau13. Les concentrations minimales inhibitrices (mg/mL) des métaux lourds pour la *Bacillus* sp. (Haouchine et Leham, 2016).

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| Métaux lourds (mg/mL) | <i>Bacillus</i> sp. CMI |
| Dichromates de potassium | 2,5 |
| Sulfates de zinc | 10 |
| Sulfates d'aluminium | 5 |
| Sulfates de cuivre | 3,125 |

Discussion

Le sujet traité dans ce travail se base sur le screening des *Bacillales* halophiles d'un environnement saharien de la région de Zelfana, wilaya de Ghardaïa.

Ces dernières années, les études relevant le concept de biodiversité de la microflore halophile et halotolérantes se sont multipliées. L'objectif de cette étude, l'isolement et la caractérisation d'une souche nommée F1 qui provient de ces échantillons.

Le traitement thermique permet d'éliminer les cellules végétatives et garder seulement les bactéries sporulées (TIFRIT A, 2016). La spore donne aux bactéries des propriétés de résistance à différents facteurs tandis que les cellules végétatives sont sensibles à la haute température (Gould, 1977).

L'isolement a été réalisé sur la gélose nutritive (GN), ce milieu permet à cultiver pratiquement toutes les espèces bactériennes, mais d'une manière non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise.

Le milieu GN permet donc à toutes les souches bactériennes de pouvoir pousser à condition qu'elles soient non exigeantes ou peu exigeantes, autrement dit que les souches peuvent pousser sur un milieu minimum (basique), qui n'apporte que les éléments essentiels à leur développement (Guillaume, 2004).

Le genre *Bacillus* représente un large nombre de microorganismes couramment isolés du sol et du sol rhizosphériques (Liu *et al.*, 2012; Mc Spardden-Gardener, 2004).

Dans ce travail, quatre isolats ont été isolées du sol saharien de la région Zelfana sur milieu GN à température de 37 °C dans lequel deux souches sont isolées en présence de 15% de NaCl.

Les quatre souches poussent en présence de 10% de NaCl. Ainsi, Ait Kaki (2014) à isolé 39 isolats de *Bacillus* à partir de différents sites, neuf souches sont isolées du site d'Ain M'lila, quatre du site d'El-oued El Athmany et vingt-six de la rhizosphère de *Calendula officinalis*.

En outre, l'isolement de 124 isolats halophiles modérés et halotolérants parmi eux 102 sont des *Bacillus* isolées à partir d'une zone humide située dans la Base Loukkos au Maroc (Berrada *et al.*, 2012).

L'étude phénotypique et l'identification préliminaire des souches sélectionnées basée essentiellement sur la présence de sept critères différents, les colonies isolées sont

différentes, de forme régulière, plate et bombé légèrement convexes avec une couleur crème, orange et d'autre vert, de diamètre qui varie entre 2 mm à 2 cm (tableaux 9).

Ces résultats indiquent que le sol étudié est riche d'une flore bactérienne diversifiée et confirme l'existence de plusieurs espèces bactériennes dans le sol du désert malgré les conditions difficiles qui le caractérisent (Ruyin *et al.*, 2014).

L'étude détaillée de la souche sélectionnée F1 montre qu'elle est lisse et brillante, avec une taille de 3 µm, et la coloration de Gram inique que la souche doit être classé avec les bactéries à Gram positif et.

Les endospores colorée avec le verte malachite par le procédé de chauffage, cette solution puissante est capable de pénétrer dans les endospores (Sumarsih, 2004; Geeta et Mehrotra, 2009). La coloration des spores bactériennes effectuée sur la souche sélectionnée F1 permet de visualisée des spores libres et également en d'hors du corps bactérien. Ce résultat montre que cette souche est capable de former les endospores. D'un point de vue microscopique, la bactérie possède une forme bacillaire. La souche bactérienne examinée présentent l'aspect macroscopique et microscopique typique du genre *Bacillus* (Emanuel *et al.*, 2009).

La caractérisation physiologique montre que la souche F1 est capable de pousser à des différents concentrations de NaCl allant de 0 jusqu'au 20% (p/v). En revanche, à des concentrations de 25 et 35 % (p/v) de NaCl, la souche n'a montré aucune croissance.

La souche a poussé à 0 % de NaCl. Donc selon Echigo *et al.* (2005) elle peut être classée dans la catégorie des bactéries halotolérantes car elle pousse dans un milieu exempt de chlorure de sodium, elle ne nécessite pas le NaCl pour sa croissance mais elle est capable de pousser en sa présence.

La tolérance de la souche étudiée à des concentrations supérieures à 20%, indique que cette souche appartienne au groupe des halotolérants extrêmes (Tiquia *et al.*, 2007). Par contre, aucune croissance n'a été détectée à 30% (p/v) de NaCl. En effet, la plupart des espèces bactériennes connues sont des halophiles modérées ou des halotolérantes.

La plupart des bactéries halotolérantes et halophiles isolées appartenant au genre *Bacillus* et qui sont généralement des modérées comme par exemple *Bacillus okhensis*

qui tolère des concentrations de NaCl de 0 à 10% (Nowlan *et al.*, 2006), *Bacillus solisalsi* qui tolère des concentrations de NaCl allant jusqu'à 15% (Liu *et al.*, 2009) et *Bacillus persepolensis* qui nécessite des concentrations allant de 5 à 20% (Amoozegar *et al.*, 2009).

À cause de La pandémie planétaire du Covid-19 et au confinement, malheureusement les résultats de la métallos-résistance n'ont pas été réalisés. Donc, nous avons présenté ici quelques résultats obtenus avec des souches très proches d'un point de vue phylogénétique (taxonomique).

D'après les résultats de Haouchine et Leham (2016), les valeurs des CMI des métaux obtenues par la souche *Bacillus* sp. sont : 10 mg/mL (62,08 mM) de sulfates de zinc, et les travaux de Cheng et Li (2009) et de Zahoor et Rahmane (2009) sur des souches de *Bacillus* sp. ont rapporté des CMI de zinc variant entre 0,8 mg/mL et 0,7 mg/mL respectivement. Par ailleurs, Zahoor et Rahman (2009) ont indiqué la résistance d'une souche de *Bacillus* sp. isolée à partir d'effluents industriels, à des concentrations de soit 4,8 mg/mL de chrome VI. Plusieurs auteurs ont approuvé la résistance des souches de *Bacillus* sp. au chrome (Camargo *et al.*, 2005)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

Le but de cette étude est d'isoler des souches extrêmophiles appartenant à l'ordre des *Bacillales*, à partir des différents environnements extrêmes que recèle le territoire algérien. Les échantillons sont prélevés à partir du sol de la région de Zelfana (Ghardaïa). Après un traitement thermique, quatre souches (F1, F2, F3, F4) ont été isolés sur milieu GN à une concentration de 15% de NaCl. La souche F1 a été choisie pour l'observation microscopique, cette dernière présente des critères de du genre *Bacillus* ou autres genres proche : des bâtonnets, à Gram positif et capable de former des endospores.

L'étude physiologique de la souche F1 a permis de conclure qu'il s'agit d'une souche tolérante à des concentrations de NaCl (0, 5, 10, 15,20 %) (p/v).

Les microorganismes extrêmophiles ont une grande capacité d'adaptation à des conditions très dures pour vivre (Demirjan *et al.*, 2001). De nombreuses équipes de recherche dans le monde s'intéressent à ces extremophiles (Aguilar *et al.*, 1998).

Parmi les environnements les plus extrêmes existants au monde, les écosystèmes hyper-salins et les sources thermales sont les plus connus et étudiés (Baati *et al.*, 2008). Les extrêmophiles possèdent des possibilités d'application dans plusieurs domaines : l'industrie de produits chimiques, l'agriculture, pharmaceutiques, et en plus dans la pétrochimie et la bioremédiation (Antranikian, 2009).

Ces microorganismes présentent l'avantage d'être un modèle particulier pour l'étude structurale et fonctionnelle des molécules biologiques telles les protéines en particulier les enzymes et l'étude des mécanismes d'adaptations à ces conditions extrêmes (Cava *et al.*, 2009 ; Jr et Adams, 2008 ; López-García., 2005). Il est important de rappeler que les espèces et les souches de *Bacillus* représentent un potentiel biotechnologique très important (Schallmeyer *et al.*, 2004).

Les perspectives de cette étude:

La détermination de l'identité de bactéries F1 par des tests biochimique et des logiciels d'identification disponibles sur internet.

L'étude phylogénétique de la souche par le séquençage du gène 16S rRNA.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- Aguilar A., Ingemansson T. and Magnien E. (1998).** Extremophile microorganisms as cell factories: support of the European Union. *Extremophiles Rev* 2, pp: 367- 373.
- Aissaoui, A. (2013).** *Evaluation du niveau de contamination des eaux de barrage hammam Grouz de la région de Oued Athmania (wilaya de Mila) par les activités agricoles* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Alber S., Vossenber J., Driessen A and Konings W, (2001).** Bioenergetics and solute uptake under extreme conditions, *Extremophiles*, 5: 285-294.
- Al-talib H., Syamimi N. I. M. N., Yaziz H., Zulkafi N. F., Adani N. A., Rashidi A. I. N., Murugaiah C., Shaari S. A. (2016).** PotassiumAluminium Sulphate (Alum) Inhibits Growth of Human Axillary Malodor-Producing 59-63.Skin Flora *in Vitro. J. Clinic. Health Sci.*
- Alexander M.... (1977).** Introduction to soil microbiology, second edn. *United States of America: John Wiley & Sons, Inc.*
- Alexander, M. (1994).** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York(USA).
- Amoozegar M. A., Sánchez-Porro C., Rohban R., Hajighasemi M. and Ventosa A. (2009).** *Bacillus persepolensis* sp. Nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2352–2358.
- Anonyme. (2007).** Dictionary of Public Health. Oxford University Press. Ed. John M.Last. Oxford Reference Online
- Antranikian, G. (2009).** Extremophiles and biotechnology. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John, W., & Sons, Ltd.Chichester.
- Artiola-Fortuny J. &Fuller W.H., (1982).** Adsorption of some monohydroxybenzene derivatives by soils. *Soil Science*, **133**: 218-22.
- Avril J.L Fauchère J.L. (2007).** Cours de bactériologie DCEM1, Faculté de médecine de nantes, page: 36.
- Baati H., Guermazi S., Amdouni R., Gharsallah N., Sghir A., Ammar E.(2008).** Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles Rev*12 pp: 505–518.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., EL Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. (2012).** Sporulation boundaries and spore formation kinetics of

Bacillus spp. As a function of temperature, pH and Aw. Food Microbiology. **32**(1). p: 79-86-869.

Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Hansen CM (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. Nature 426. : 439-442.

Berrada, I. (2012). Etude de la biodiversité des bactéries telluriques halophiles au niveau du Bas Loukkos (Marais salants & Marecage de Beggara).

Beveridge T.J., (1989). Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. 147-171.:43, Annual review of microbiology.

Bioud R, Matarfi I, (2017). Évaluation de la biodiversité bactérienne d'un sol dunaire du sud Algérien (Région de Biskra), Université des Frères Mentouri Constantine, pages 2 -21.

Bousseboua H., (2005). Eléments de microbiologie. Campus-Club, Algérie, (2ème Edition), 179- 919.

Bousseboua, H. (2003). Cours de microbiologie générale. Université Mentouri Constantine. Page : 28-12 ISSN : 9947-0-0192-3.

Bron S., Meima R., Diji J. M. V., Wipat A. and Harwood C. R. 1999. Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd Edition. Eds. Demain A. L. and Davies J. E., ASM Press. Washington, D.e. 392-416.

Calvet, R. (2003). Le sol : propriétés et fonctions. Volume 1. France Agricole Editions.

Camargo F.A.O., Okeke B.C., Bento F.M., Frankenberger W.T. (2005). Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate. *Appl. soil Eco.* 29: 193-202.

Carr, J. G. (1983). Microbes 1 have known: a study of those associated with fermented products.1. *Appl. Bacteriol.* 55: 383 -402.

Cava F., Hidalgo A and Berenguer J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles Rev* 13, pp: 213–231.

Cheikh Rouhou, M. (2006). Évaluation des classifications phylogénétiques des Bacillaceae basées sur les gènes de l'opéron *rrn* et de gènes de ménage.

Cheng G, LI X. (2009). Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated from soils of iron mineral area. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:483–487.

Chrost RJ .(1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Chrost RJ (ed) Microbial enzymes in aquatic environments. p29-59

- Chróst RJ (1992).** Significance of bacterial ectoenzymes in aquatic environments. In *The Dynamics and Use of Lacustrine Ecosystems*. Springer Netherlands: 61-70.
- Claus D. and Fritze D. 1989.** Taxonomy of *Bacillus*. In: *Biotechnology Handbook, Bacillus*. 1st Edition. Ed. Harwood, C.R Plenum Press. New York. Pp. 5-26.
- Croteau M.N., Louma S.N., Stewart A.R. (2005).** Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1511–1519.
- Csonka L N. 1989.** Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology Reviews* 53: 121-147.
- Daniel R. (2005).** The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3:470-8
- Das S, Jean J-S, Kar S, Liu C-C. 2012.** Changes in Bacterial Community Structure and Abundance in Agricultural Soils under Varying Levels of Arsenic Contamination. *Geomicrobiology Journal* 30. 635-44.
- Dari, R. (2013).** Dénombrement de la biomasse microbienne des sols arides exemple d'un sol salé sous deux types de cultures. Université Kasdi Merbah-Ouarla, 52p.
- Das Sarma S. (2001).** Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-9.
- DE Forest D.K., Brix K.V., Adams W. J. (2007).** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicol.*, 84 : 236–246.
- Delerras C. (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier, p. 31-70-126-143-145.
- Delgado-Garcia M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-Gonzalez C, Contreras-Esquivel J, Rodriguez-Herrera R. (2012).** Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *J Sci Food Agric*.
- Demirjian D., Moris-Varas F. and Cassidy C. (2001).** Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5:144-151.
- Dromigny Eric. (2008).** *Bacillus cereus*. Edition Lavoisier. p : 43.
- Durand, L. (2014).** *Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires* (Doctoral dissertation).
- Dussault H.P. (1955).** An improved technique for staining red halophilic bacteria. *J Bacteriol* 70:484–485.

- Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kamekura M. and Usami R. (2005).** Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm) *Saline Systems*, 1:8.
- Emanuel G., Lorrence H. G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRCpress. USA. 13: 978-0-8493-9365-5.
- Gadd G.M. (1992).** «Metals and microorganisms: A problem definition». *FEMS Microb.Lett.*100 :197-204.
- Geeta, S., & Mehrotra, R. S. (2009).** Principle of microbiology.
- Gould, G. W. (1977).** Recent advances in the understanding of resistance and bacterial spores. dormancy in *The Journal of Applied Bacteriology* 42 (3): 297-309.
- Grant W.D., Kamekura M., McGenity T.J, and Ventosa A., (2001).** Order I *Halobacteriales* Grant and Larsen 1989b, 495vp. In: Boone D.R., Calstenholz R.W., Garrity G.M. (Ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. I, 2nd Ed)*.Springer-Verlag, Berlin.
- Guillaume, P.Y. (2004).** *Les milieux de cultures* 32.
- Guiraud J.P. (2003).** Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. pp :136-139.
- Hachicha M. (2007).** Les sols salés et leur mise en valeur en Tunisie. *Sécheresse*; 18 (1) : 45-50.
- Haouchine, T., & Leham, K. (2016).** *Isolement de bactéries résistantes aux métaux lourds et évaluation de leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Horikoshi K (2011).** Extremophiles Handbook. Heidelberg: Springer.
- Harwood CR, Mouillon J-M, Pohl S, Arnau J. 2018.** Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiology Reviews* 42: 721–738.
- INRA(2008).** Institut Nationale de la Recherche Agricole
- Irwin J. A., Baird A. W. (2004).** Extremophiles and their application to veterinary medicine. *Irish Veterinary Journal.* Volume 57 (6).
- Joshi A.A., Kanekar P.P., Kelkar A.S., Shouche Y.S., Vani A.A., Borgave S.B. and Sarnaik S.S. (2008).** Cultivable bacteria diversity of alkaline Lonar lake India. *Microbial Ecology*; 55:163.–172.

Journal officiel de la republique algerienne. (2016). 63 page 15.

Jr F-E-J and Adams M-W-W. (2008). The impact of extremophiles on structural genomics *Extremophiles Rev.*12, pp: 39–50.

KHALLEF Sakina. (2019). Etude de la flore bactérienne halophile cultivable des zones humides de Ouargla (Algérie), Université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU, page 13.

Kharroub K. (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. P. 194.

Kherbouche El-Houaria (2014). Influence D'un Traitement A Ultrason Sur La Thermorésistance De Spores De Bacilles Sp. Isolées De Poudre De Lait. *Biologie Moléculaire Et Cellulaire .Microbiologie Univ Aboubekr Belkaid Tlemcen.*

Kermanshahi R. K., Ghazifard A., Tavakoli A. (2007). Identification of bacteria resistant to heavy metals in the soils of isfahan province. *Iranian J. of Sci. & Technol.*, 31-38.

Kristjansson J.K., Hreggvidsson G.O. (1995). Ecology and habitats of extremophiles. *World J. of Microbiol. and Biotech.*, 11:17-25.

Litchfield CD. (2011). Potential for industrial products from halophilic Archaea. *J Int Microbiol Biotechnol* 38: 1635-1647.

Liu H., Zhou Y., Liu R., Zhang K. Y. and Lai R. (2009). *Bacillus solisalsi* sp. nov., a halotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from soil around a salt lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1460–1464.

Liu, X., Ren, B., GAO, H., Liu, M., Dai, H., Song, F., Yu, Z., Wang, S., Hu, J., Kokare, C.R. and Zhang, L. (2012). Optimisation for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLOS one*7 (5).

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. and Ventosa A., (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 59:2114-2121.

López-García P (2005). Extremophiles. In: M. Gargaud et al., (Ed.): *Lectures in Astrobiology*, Vol. I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 657–679.

Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2008). Revised road map to the phylum *Firmicutes*. In: de Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd edn, *The firmicutes*. Springer, New York. Pp. 1–13.

- Margesin R. and Schinner F. (2001).** Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 11.
- Marhuenda-Egea F.C, Bonete M.J. (2000).** Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Curr Opin Biotechnol* 13: 385-389.
- McKenney, P. T., A. Driks, et al. (2013).** "The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat." *Nature Reviews. Microbiology* **11**(1): 33-44.
- McSpadden-Gardener, B.B. (2004).** Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.in agricultural systems. *Phytopathology*. 94: 1252-1258.
- Mebarki A. (1982).** Le bassin du Kebir Rhumel, Ressources en eaux et aménagement en Algérie, Thèse doctorat 3ème cycle, Université de Nancy II, 303p.
- Meyer A, DEIANA J, BERNARD A (2004).** cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés Broché. Doin france 430.
- Moreno M.L, Pérez D, Garcia M.T, Mellado E. (2013).** Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life* 3: 38-51.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. and Setlow P., (2000).** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 64:548-572.
- Nicholson W.L (2002).** Roles of Bacillus Endospores In The environment CMLS, Cell. Mol. Life Sci. Vol. 59, page 410.
- NF ISO 15799 (X31-603) – Qualité des sols – Lignes directrices relatives à la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol, 2004.**
- Nowlan B., Dodia M. S., Singh S. P. and Patel B. K. C. (2006).** *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1073–1077.
- O'Connor, R., Halvorson, H., 1961.** L-Alanine Dehydrogenase : A Mechanism Controlling The Specificity Of Amino Acid-Induced Germination Of *Bacillus Cereus* Spores. *Journal Of Bacteriology* 82, 706_713..
- Ollivier B., Caumette P., Garcia J. L. and Mah R. A. 1994.** Anaerobic bacteria from hypersalin environments. *Microbiology Reviews* 58, (1), 27-38.
- Oren A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology and application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 28:56-63.

- Peduzzi R., Tonolla M., Boucher-Rodoni R. (2006).** Milieux extrêmes : Conditions de vie en milieu alpin et milieu marin, Actes et contributions scientifiques : 9.
- Prescott W et Sherwood W (2013).** Microbiologie, De Boeck supérieur, 4:599.
- Rodriguez-Valera, F. 1988.** Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In Halophilic Bacteria. 1988; vol. 1, pp 3-30. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Roeselers G, Van Loosdrecht MCM, Muyzer G (2007).** Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecology* 54: 578-585.
- Rouch D.A., BROWN N.L (1997).** Copper-inducible transcriptional regulation at twopromoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant *pco*. *Microbiol.*, 143 (4): 1191-202.
- Ruyinliu Liu, Ke Li, Hongxun Zhang, Junge Zhu and Devraj Joshi . (2014).** Spatial Distribution of Microbial Communities Associated with Dune Landform in the Gurbantunggut Desert, China. *Journal of Microbiology* 52, no. 11 898–907.
- Schallmeyer M., Singh A., and Ward O . (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1-17.
- Singleton, P. (1999).** Bactériologie. 4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages.
- Smith N. R., Gordon R. E. and Clark F. E. 1952.** Aerobic spore-forming bacteria. *U.S. Dept. Agr. Monogr.* No16. Washington, D.C. USA.
- Storm Dunlop. (2008).** Dictionary of Weather. Oxford University Press. Reference Online.
- Sumarish S. (2004).** Test Activities lipolytic Some Bacteria Results Isolation of the Port of Tanjung Perak and Lipase Production of Selected Strain (Surabaya: JIPTUNAIR).
- TIFRIT Abdelkarim (2016).** Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algériennes, Université Hassiba Benbouali de Chlef, page 47.
- Tiquia S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian S., Ismail M., Sahly R., Shim J., Singh S. and Murray K. S. (2007).** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southeastern Michigan. *Environmental Technology*, Vol. 28. 297-307.
- Tiquia S. M., Davis D., Hadid H., Kasparian I., Sahly Shim S. and Murray K. S., 2006.** Halophilic and halotolerant bacteria from river waters and shallow groundwater along the rouge river of southern Michigan. *Environment Technology*; 28: 297-307.

Van den Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6:213-218.

Zahoor A., Rehman A. (2009). Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *J. Environ. Sci.*, 21: 814-20.

Zettam, M. R. (2013). Contribution à l'étude de la biodiversité des *Bacillus* extrémophiles isolés de la souche thermale de Hammam Debagh-Guelma-(Griffon B) *k-N*-screening d'activités antimicrobienne, Université ABOUBEKR BELKAW Tlemcen, page 3.

Zheng T, Hong H, Wang F, Maskaoui K, Su J, Tian Y. (2002). The distribution characteristics of bacterial β -glucosidase activity in Taiwan strait. *Marine Pollution Bulletin* 45: 168-176.

ANNEXES

Annexe I : Réactifs

➤ Réactifs

| | |
|--------------------|---|
| vert de malachite | Vert de malachite 5 g |
| | Eau distillée 100 mL |
| violet de Gentiane | 1g de violet de gentiane. |
| | 10 mL d'alcool absolu. |
| | 90 mL de l'eau phénique à 1%. |
| Lugol | 1 g d'iode. |
| | 2 g d'iodure de potassium. |
| | 300 mL d'eau distillée. |
| La fuchsine | 10 mL de solution de fuchsine saturée à alcool. |
| | 90 mL d'eau distillée. |

Annexe II : Petit matériel

➤ Petit matériels

- Anse de platine
- Barreaux magnétiques
- Bec Bunsen
- Béchers
- Boites pétri
- Eprouvettes graduées
- Erlenmeyer
- Fioles
- Flacons
- Lames et lamelles

- Micropipettes
- Pipettes Pasteur
- Pince en bois
- Portoirs de tubes
- Tubes à essai (10 et 20 mL)
- Spatule

Annexe III : Milieux de culture

Bouillon Brain Heart infusion (BHIB)

| | |
|---|---------|
| Protéose peptone | 10 g |
| Infusion cervelle de veau | 12,5 g |
| Infusion cerveau de bœuf | 5 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Phosphate disodique | 2,5 g |
| Glucose | 2 g |
| Eau distillée | 1000 mL |
| pH=7, autoclave à 120°C pendant 20 min. | |