

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique

جامعة غرداية

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



كلية علوم الطبيعة والحياة
وعلوم الأرض

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Université de Ghardaïa

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de
Master académique en Biochimie
Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

DAHMANE Soumia et DAOUDI Saadia

THEME

Contribution à l'étude des bactéries extrêmophiles
sporogènes isolées à partir des sols de trois régions
sahariennes: Adrar, In Amenas et El Méniâa

Membres du jury :

KEMASSI Abdellah	M.C.A	Univ. de Ghardaïa	Président
BELGHIT Said	M.C.B	Univ. de Ghardaïa	Examineur
BOURAS Nouredine	Professeur	Univ. de Ghardaïa	Rapporteur

Mai 2018

DEDICACES

Je dédie ce mémoire...

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi pour mener à bien mes études.

A mon cher père

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon bien être.

A mes frères et à mes belles sœurs.

Fatima Zohra, ALIA, Khalil, Ilias, Ahmed Ayoub.

A ma famille Dahmane

Ma tante chikha et toute sa famille

Mon oncle Aissa, Omer, Bachir, Dahmane

A ma chère binôme

Saadia, pour sa rigueur, son courage ainsi que sa patience à mon égard et surtout, sans laquelle ce travail n'aurait pas abouti.

A mes chères ami(e)s

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenir de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail.

A mon très cher père

*Abdallah, qui m'toujours soutenu et qui a été toujours présent pour
moi.*

*A la plus chère au monde, ma mère Daoudi Khaira qui m'a toujours
offert ses aides morales durant mes études.*

A mes frères : Omer, Yacine.

*A mes chères sœurs : Saida, Meriam, Bassma, Souhaila, Fadila que je l'aime
beaucoup.*

A mes grand-mère : Fatma .

A tout ma famille Daoudi .

*A mes chères amies : Djamilia, Dhia, Khaoula, Iman, soumia, chahla, Achoura,
chaima.*

*A toute la promotion de la 2ème Master biochimie Appliquée, ainsi que tous les
étudiants de la faculté des sciences de la
nature et de la vie .*

*Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi intervenues dans ma vie à un
moment ou à un autre et qui m'ont accompagné*

Et

Tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

Saadia

REMERCIEMENTS

Nous remercions en premier lieu, Dieu tout puissant de nous avoir aidé. Ce travail n'aurait pas abouti sans sa miséricorde et sa bénédiction, et nous l'implorons afin que notre modeste travail soit couronné de succès.

Nous remercions chaleureusement notre promoteur le professeur Noureddine BOURAS de l'université de Ghardaïa pour ses conseils, ses orientations, sa disponibilité constante et surtout pour sa patience inébranlable qu'elle a témoigné durant toute la période de la réalisation de ce travail.

Nous remercions vivement les membres de jury pour l'honneur qu'ils ont fait d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos sincères reconnaissances à nos enseignants du département : Biologie
Enfin nous remercions tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Nous remercions monsieur le responsable MOULAY Ali et toute l'équipe du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre, et le département de Biologie ainsi que tous mes collègues pour leur solidarité.

Soumia et Saadia

TABLE DE MATIÈRES

REMERCIEMENTS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES PHOTOS	
LISTE DES TABLEAUX	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1- Diversité microbienne du sol	3
2- Bactéries extrêmophiles du sol	4
3- Bactéries extrêmophiles	4
3-1- Historique et Terminologie	4
3-2- Propriétés des extrêmophiles	5
4- Milieux extrêmes et diversité bactérienne	6
4-1- Bactéries thermophiles et hyperthermophiles	6
4-1-1- Bactéries thermophiles	6
4-1-2- Bactéries hyperthermophiles	7
4-2- Milieux halophile et halotolérant	8
4-3- Milieux alcaline	9
4-4- Milieux acide	9
5- Importance biotechnologiques des microorganismes extremophiles	10
6- Endospore	10
6-1- Historique et définition de la spore	10
6-2- Structure des spores bactériennes	11
6-3- Structure de l'endospore	11
6-4- Phénomènes de sporulation et de germination	11
6-4-1- Sporulation	11
6-4-2- Germination	12
6-4-3- Résistance	13
6-5- Bactéries sporulées	13
6-5-1- Bactéries sporulées aérobies (Bacillus)	13
6-5-2- Bactéries sporulées anaérobies	13
7- Nomenclature des rangs taxonomiques	14
7-1- Domaine des <i>Eubacteria</i>	14
7-2- Phylum des <i>Firmicutes</i>	14
7-2-1- Historique et diversité des <i>Firmicutes</i>	14
7-3- Classe des <i>Bacilli</i>	15

7-4- Ordre des <i>Bacillales</i>	15
7-4-1- Caractéristiques des <i>Bacillales</i>	15
7-4-2- Intérêts biotechnologie des <i>Bacillales</i>	15
7-4-3- Famille des <i>Bacillaceae</i> et principaux genres	16
7-4-4- Distribution et diversité de <i>bacillaceae</i> à travers habitats différents	17
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1- Description du site d'isolement	18
2- Echantillonnage	18
3- Isolement des <i>Bacillales</i>	19
3-1- Préparation de milieu de culture	19
3-2- Traitement des échantillons	19
3-3- Ensemencement et conditions de culture	20
4- Purification et conservation des souches	20
5- Identification phénotypique	20
5-1- Caractérisation morphologique	21
5-1-1- Aspect macroscopique	21
5-1-2- Aspect microscopique	21
5-1-2-1- Examen à l'état frais	21
5-1-2-2- Coloration par bleu de méthylène	21
5-1-2-3- Coloration de Gram	21
5-1-2-4- Recherche de la spore	22
5-2- Caractérisation physiologique	22
5-2-1- Tolérance à la salinité	22
5-2-2- Croissance à différents pH	22
5-2-3- Croissance à différentes températures	23
5-2-4- Effet de la congélation	23
5-3- Caractérisation biochimique	23
5-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires	23
5-3-1-1- Test de catalase	23
5-3-1-2- Recherche de la nitrate réductase	23
5-3-2- Type respiratoire	24
5-3-3- Mannitol-mobilité	24
5-3-4- Citrate de Simmons	24
5-3-5- Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique	25
5-3-6- Système Api 20^E	26
6- Interprétation probabilistique de profil biochimique	28
6-1- Identification par <i>Excel Identification Program (EIP)</i>	28
6-2- Identification par <i>Bacterial Identification Program (BIPWin)</i>	29
6-3- Identification par <i>Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)</i>	30

CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION	
1- Résultats de l'isolement	31
2- Résultats de l'identification phénotypique	32
2-1- Caractérisation morphologiques	32
2-1-1- Aspect macroscopique	32
2-1-2- Aspect microscopique	33
2-1-2-1- Examen à l'état frais	33
2-1-2-2- Coloration par bleu de méthylène	34
2-1-2-3- Coloration de Gram	34
2-1-2-4- Recherche de la spore	35
2-2- Caractérisation physiologique	36
2-2-1- Influence de la salinité	36
2-2-2- Effet du pH	36
2-2-3- Effet de la température	36
2-2-4- Effet de la congélation	36
2-3- Caractérisation biochimique	37
2-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires	37
2-3-1-1- Test de la catalase	37
2-3-1-2- Nitrate réductase	37
2-3-1-3- Etude du type respiratoire	38
2-3-2- Test du mannitol-mobilité	38
2-3-4- Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons	39
2-3-5- Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique	39
2-3-6- Résultats de la plaque API 20^E	40
3- Interprétation probabilistique de profil biochimique	41
3-1- Identification par <i>Excel Identification Program</i> (EIP)	41
3-2- Identification par <i>Bacterial Identification Program</i> (BIPWin)	42
3-3- Identification par <i>Advanced Bacterial Identification Software</i> (ABIS online)	43
4- Discussion	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	49
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	50
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
1	Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) et photographie en Microscopie Electronique à Transmission d'une spore de <i>Bacillus subtilis</i> (MET). Echelle : 100 nm (Loison, 2013).	11
2	Formation d'une spore à partir d'une cellule végétative en croissance (Geneviève, 2008).	12
3	Carte topographique de l'Algérie, représente les trois régions des prélèvements.	18
4	Isolement et dénombrement des <i>Bacillales</i> extrêmophiles.	20
5	Photo d'une galerie Api 20 ^E non ensemencé.	26
6	Les résultats négatives et positives (virages colorés) de la plaque Api 20 ^E .	27
7	Tableau d'Excel Identification Programme (EIP).	29
8	Tableau d'Excel Identification Programme (BIPWin).	30
9	Programme d'identification (ABIS) en ligne.	30

LISTE DES PHOTOS

Photo N°	Titre	Page
1	Aspects macroscopiques des isolats sélectionnés sur milieux TSA après 7 jours d'incubation à 60 °C.	33
2	L'observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) e l'état frais de la souche T101.	34
3	Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de coloration par le bleu de méthylène de la souche T101.	34
4	Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de la coloration de Gram de la souche T101.	35
5	Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de la spore après coloration au vert malachite de la souche T101.	35
6	Résultat de la mise en évidence de catalase	37
7	Résultat du test de la recherche de la Nitrate réductase sur bouillon nitraté après 24 heures d'incubation à 30°C (avant (a) et après (b) l'ajout de réactifs NIT I et NIT II).	38
8	Résultat de la mise en évidence le test Mannitol- mobilité	38
9	Résultat du citrate de Simmons négatif.	39
10	Résultat du test VP (-) et du test RM (-).	39
11	Plaque Api 20 ^E ensemencée par la souche T101 (avant incubation).	41
12	Résultats des caractères biochimiques, de la plaque Api 20 ^E ensemencée par la souche T101 (après 3 jour d'incubation à 30°C).	41
13	Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (EIP)	42
14	Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (ABIS).	42
15	Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (BIPWin) .	43

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
1	Principaux taxons de micro-organismes du sol (Roger <i>et al.</i> , 2001).	03
2	Les principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).	06
3	Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de (Larsen, 1962) et de (Kushner, 1993).	08
4	Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiqula <i>et al.</i> , 2006).	09
5	Genres de la famille des Bacillaceae (Mandic-Mulec <i>et al.</i> , 2015).	16
6	Tableau de la lecture et l'identification de la plaque de lecture API 20 ^E .	27
7	Résultats de l'isolement de différentes conditions.	31
8	Résultats d'isolement des souches à 60°C du deux dilutions 10 ⁻¹ et 10 ⁻² .	31
9	Résultats de l'aspect macroscopique des souches.	32
10	Résume les gammes de toutes les conditions physico-chimiques permettant la croissance de la souche T101 avec les valeurs optimales.	36
11	Résultats de différentes tests biochimiques de la souche isolée T101.	40
12	Résultats de tests biochimiques dans la plaque API 20 ^E de la souche T101.	40
13	Résultats d'identification de la souche T101 par les programmes (EIP, ABIS online, BIPWin).	43

LISTE DES ABRÉVIATIONS

-	Négatif.
% p/v	pourcentage poids-volume.
%	Pourcentage.
+	Positif.
°C	Température en degré Celsius
ADH	Arginine-Dihydrolase .
ADN	Acide désoxyribonucléique.
AMY	Amygdaline.
API 20 ^E	Appareil et Procédés d'Identification 20 entérobactéries .
ARA	Arabinose.
ARNr 16S	Acide RiboNucléique ribosomale 16S.
ATP	Adénosine Tris Phosphate.
C	Cytosine.
CIT	Citrate.
Cl ⁻	Ion chlorure.
cm	Centimètre.
g	Gramme.
G	Guanine.
g/L	Gramme par litre.
GEL	Gélatine.
GLU	Glucose.
GN	Gélose nutritive.
h	heure.
H ₂ S	Sulfure d'Hydrogène.
H ₂ O	L'eau.
H ₂ O ₂	L'eau oxygénée.
HCL	Chlorure d'hydrogène.
HCO ₃	Hydrogénocarbonate.
IND	Indole.
INO	Inositol.
K ⁺	Ion potassium.
KCl	Chlorure de potassium.
Km	Killomètre.
LDC	Lysine decarboxylase.
M	Concentration molaire.
MAN	Mannose.
MEL	Melibiose.
MET	Microscopie Electronique à Transmission.
mg/mL	Milligramme/millilitre.
min	Minute.
mL	Millilitre.
mm	Millimètre.
Nm	Nano mettre.
Na ⁺	Ion sodium.
NaCl	Chlorure de sodium.
NaOH	Hydroxyde de Sodium.
nm	Nanomètre.

ODC	Ornithine decarboxylase.
ONPG	Ortho-nitrophényl- β -galactoside.
Ox	Oxydase.
pH	potentiel d'hydrogène.
RHA	Rhamnose.
RM	Rouge de méthyle.
S	Second.
SAC	Saccharose.
SO ₄ ²⁻	Ion sulfate.
SOR	Sorbitol.
TDA	L-tryptophane.
TSA	Tripticase soja agar.
URE	Urée.
UV	Ultra violet.
VP	Voges-Proskauer.
μ l	Microlitre.

Résumé

Cette étude est réalisée au laboratoire de l'Université de Ghardaia pour mettre en évidence la caractérisation phénotypique et biochimiques des souches bactériennes extrêmophiles sporogènes isolées à partir des sols des palmeraies de trois régions sahariennes: Adrar, In Amenas et El-Méniâa.

L'isolement des souches a été réalisé sur milieu de culture TSA (Trypticase Soja-agar) et les souches ont été incubées à différentes conditions physico-chimiques pendant 7 jours pour isoler les souches thermophiles, et pendant 60 jours pour isoler les souches alcalophiles et les halophiles.

Une pré-identification morphologique et biochimique de l'isolat T101 a indiqué que cette souche isolée est de Gram positif, et possède une forme bâtonnet, mobile, catalase +, et suggère qu'elle est peut être affiliée au genre *Bacillus* ou un autre genre proche.

Les paramètres physicochimiques (température, pH et concentration en NaCl de l'isolat T101) sont optimisés par la méthode classique, et les résultats obtenus ont montré que l'optimum de température est de 25°C, l'optimum de pH est de 7, et l'optimum de la concentration en NaCl est de 0 %.

Par ailleurs, nous avons utilisé la galerie API 20^E pour avoir une idée sur la classification de la souche T101 différents programmes ont été utilisés pour déterminer le pourcentage de similarité de la souche T101 avec les espèces répertoriées dans ces bases de données. Le programme EIP (Excel Identification Program) suggère que la souche T 101 est une *Bacillus sphaericus/fusiformis/badius* à 69,3%. Alors que le programme ABIS online identifie la souche comme *Bacillus coagulans* avec un score de probabilité de 68%. En revanche, l'identification par Bacterial Identification Program (BIP Win) suggère que la souche T 101 est une *Bacillus firmus* type à 100 %.

Mots clés : bactérie, physiologie, isolement, extrêmophiles, Sahara, palmeraie.

Summary

This study is carried out in the laboratory of the University of Ghardaia to highlight the phenotypic and biochemical characterization of sporogenic extremophilic bacterial strains isolated from the soils of palm groves of three Saharan regions: Adrar, In Amenas and El-Meniâa.

The isolation of the strains was carried out on TSA (Trypticase Soy agar) culture medium and the strains were incubated under different physico-chemical conditions for 7 days to isolate the thermophilic strains, and for 60 days to isolate the alkalophilic strains and halophiles.

Morphological and biochemical pre-identification of isolate T101 indicated that this isolated strain is Gram positive, and has a rod-like, motile, catalase + form, and suggests that it may be affiliated with the genus *Bacillus* or another genus close.

The physicochemical parameters (temperature, pH and NaCl concentration of the T101 isolate) are optimized by the conventional method, and the results obtained have shown that the temperature optimum is 25 ° C, the pH optimum is 7 and the optimum of the NaCl concentration is 0%.

In addition, we used the API 20E gallery to get an idea about the classification of the strain T101 different program were used to determine the similarity percentage of the T101 trash with the species listed in these databases.

The Excel Identification Program (EIP) suggests that the T 101 strain is 69.3% *Bacillus sphaericus* / *fusiformis* / *badiu*. While the ABIS online program identifies the strain as *Bacillus coagulans* with a probability score of 68%. On the other hand, Bacterial Identification Program (BIP Win) identification suggests that the T 101 strain is a 100% *Bacillus firmus* type1.

Key words: bacteria, physiology, isolation, extremophiles, Sahara, palm grove.

المخلص

أجريت هذه الدراسة في مختبر جامعة غرداية لتسليط الضوء على الخصائص المظهرية والبيوكيميائية للسلاسل البكتيرية المنتفخة القشرية المعزولة من تربة النخيل لثلاث مناطق صحراوية : أدرار، عين أمناس، والمنيعية.

أجريت العزلة للسلاسل على وسط استزراع (Trypticase Soja-agar) وحضنت السلاسل تحت ظروف فسيولوجية كيميائية مختلفة لمدة 7 أيام لعزل السلاسل المحبة للحرارة، ولمدة 60 يوماً لعزل السلاسل المحبة للوسط القاعدي والمحبة للملوحة.

أشار التوصيف المورفولوجي والكيميائي الحيوي لعزل T101 إلى أن هذه السلالة المعزولة هي موجبة لصبغة جرام، ولها شكل متشابه، شبيه بالعصيات، متحركة، الكاتلاز +، وتشير إلى أنه قد يكون منتسباً إلى جنس *Bacillus* أو جنس آخر قريب.

يتم تحسين العوامل الفيزيائية الكيميائية (درجة الحرارة، ودرجة الحموضة، وتركيز كلوريد الصوديوم للعزلة T101) من خلال الطريقة التقليدية، وقد أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن درجة الحرارة المثلى هي 25 درجة مئوية، ودرجة الحموضة المثلى هي 7 والتركيز الأمثل لكلوريد الصوديوم هو 0%.

علاوة على ذلك، استخدمنا لوحة API 20^E للحصول على فكرة حول تصنيف T101 وعبر برامج مختلفة التي تم استخدامها لتحديد النسبة المئوية للتشابه بين سلالات T101 والأنواع المدرجة في قواعد بيانات هذه البرامج.

يقترح برنامج تعريف (EIP) أن سلالة T101 هي *Bacillus sphaericus/fusiformis/badiu* بنسبة 69,3%. في حين أن برنامج (ABIS) عبر الإنترنت أن السلالة T101 هي *Bacillus coagulans* مع درجة احتمال 68%. من ناحية أخرى، يشير برنامج تعريف (BIPWin) إلى أن السلالة T101 هي *Bacillus firmus* type 1 مع درجة احتمال 100%.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا، الفسيولوجية، عزل، الظروف القسوى، الصحراء، تربة النخيل.

INTRODUCTION

Les formes de vie sur terre sont innombrables, comme les environnements qui les abritent. Jusqu'au 20^{ème} siècle, on pensait que la vie n'était possible que dans un environnement «normal», c'est-à-dire là où les conditions sont compatibles avec la vie de l'homme. Puis, les chercheurs ont commencé à découvrir des organismes qui survivent dans des conditions hors de ces normes, dans des milieux caractérisés par des conditions physiques et/ou chimiques extrêmes (Peduzzi *et al.*, 2006).

L'étude des extrémophiles fournit de nouvelles clés à la compréhension des processus de la vie dans des conditions extrêmes et démêler les mécanismes développés par les systèmes biologiques afin d'y faire face. Ces connaissances acquises sont par la suite employées pour développer de nouveaux bioproduits et bioprocédés dans divers champs tels que les industries de produits chimiques, pharmaceutiques et alimentaires (Antranikian, 2009).

Les micro-organismes appelés "extrémophiles" sont spécifiquement adaptés à des milieu écologiques particuliers où ils se développent activement alors qu'ils ne survivent pas dans des conditions "ordinaires".

Parmi les micro-organismes qualifiés d'extrémophiles, on rencontre ceux qui vivent en présence de fortes concentrations de sel (halophiles), ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles, respectivement), et dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles, respectivement) ou sous pressions élevées (piézophiles) (Gomri, 2012).

L'existence de la vie dans les écosystèmes extrêmes a conduit à s'interroger sur les stratégies et les mécanismes cellulaires, moléculaires et génétiques mis en jeu par ces micro-organismes atypiques pour se maintenir dans de tels milieux, et la mise en évidence d'une extraordinaire biodiversité de ces formes de vie montre que l'inventaire de toutes les espèces vivantes sur terre n'est pas prêt à être fini (Nas, 2013).

L'Algérie est un pays riche par sa diversité écologique et géologique, il existe ainsi des écosystèmes extrêmes tels que les sebkhas, les sols sahariennes. Cependant, ces écosystèmes extrêmes n'ont été que très peu étudiés d'un point de vue biodiversité et ce n'est que récemment qu'on a commencé à s'intéresser aux micro-organismes habitants ces environnements locaux (Nas, 2013).

Notre travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie département de biologie, de l'université de Ghardaia.

L'objectif de ce présent travail est un screening des *Bacillales* extrémophiles isolées de trois régions sahariennes différentes (Adrar , In Amenas et El Méniâa) et la mise en évidence :

- ✓ la présence des bacilles extrémophiles et surtout thremophiles dans le sol du palmier.
- ✓ Caractérisation phénotypique et biochimiques des souches isolées.
- ✓ Identification des souches isolées par galerie API 20^E, et par galerie classique.

Cette étude est structurée en trois parties dont la première est un revue bibliographique traitant les extrémophiles et leurs biotopes, les *Bacillales* et leur 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.

1- Diversité microbienne du sol

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organismes (notamment les micro-organismes) et des composés chimiques et par une structure physique complexe (Wild, 1993). Le sol est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, de gaz et d'eau, à l'intérieur duquel se déroulent simultanément des phénomènes de dégradation et de synthèse. A cause de son hétérogénéité, il abrite des populations des micro-organismes² à des particularités biologiques et biochimiques très diverses (Ameur, 2014). Les organismes vivant du sol sont des bactéries, des champignons, des algues, les parties souterraines des plantes ainsi que des animaux très variés. Tous participent d'une manière ou d'une autre à la formation et à l'évolution de sol (Gobat *et al.*, 2003).

Les micro-organismes du sol sont représentés par quelques métazoaires, des protozoaires, des algues microscopiques, des champignons, des bactéries dont des actinomycètes, des cyanobactéries et des virus (Wild, 1993; Maier *et al.*, 2000). Une présentation des micro-organismes telluriques fondée sur des classifications traditionnelles et qui privilégie les caractéristiques trophiques des organismes et leurs activités est proposée par (Roger *et al.*, 2001) (Tableau 1).

Tableau1. Principaux taxons des micro-organismes du sol (Roger *et al.*, 2001).

Grands groupes	Taxons considérés comme importants dans le sol	Commentaires
Virus	V.M.T (virus de la mosaïque du tabac)	
Procaryotes photosynthétiques	- Cyanobactéries - Bactériés pourpres et vertes	Ex .cynophycées (algues)
Bactéries	- Pseudomonales chimio-autrophes - Pseudomonales chimio-hétérotrophes - Eubactériales - Protistes inférieurs	
Actinobactéries	- Mycobactériacés - Actinomycétacées (ou proactinomycètes) - Streptomycétacées - Actinoplanacées	Les actinobactéries sont des bactéries gram + a structure Végétative de type mycélien
Champignons	- Moisissures à plasmodium - Champignons à flagelle - Zygomycètes - Champignons supérieure - Champignons imparfaits	
Algue	- Algue verte - Euglémés - Algues jaunes diatomiées	Aussi dans les protozoaires

Protozoire	- Amibe - Testacés - Flagellés - Ciliés	
------------	--	--

2- Bactéries extrêmophiles du sol

Les *Bacteria* et les *Archaea* sont sous l'influence de paramètres environnementaux extrêmes qui se caractérisent par des fluctuations importantes de température, des radiations UV élevées, une faible teneur en nutriment et une faible teneur en eau (Andrew *et al.*, 2012).

Les bactéries du sol ont une grande variété de formes. Elles peuvent être mobiles ou immobiles et posséder ou non des formes de résistance (spores, kystes).

Chez les bactéries sporulantes deux genres principaux, *Bacillus* et *Clostridium* sont abondants dans le sol. Le genre *Bacillus*, très hétérogène, comprend des espèces anaérobies facultatives ou aérobies, alors que les *Clostridia* sont toutes des fermentaires anaérobies stricts. Les bactéries à Gram positif non sporulantes comprennent trois groupes principaux:

- Les bactéries lactiques fermentaires, donc anaérobies facultatives.
- Les bactéries méthanogènes, anaérobies strictes, utilisent le CO₂ comme accepteur final d'électrons et produisent du méthane.
- Les corynébactéries de forme très variable, intermédiaires entre les bactéries et le grand groupe des actinomycètes (Davet, 1996).

3- Bactéries extrêmophiles

3-1- Historique et Terminologie

Les micro-organismes appelés "extrêmophiles" sont spécifiquement adaptés à des milieux écologiques particuliers où ils se développent activement alors qu'ils ne survivent pas dans des conditions "ordinaires"; ceux qui se développent à des températures froides ou chaudes (psychrophiles et thermophiles, respectivement), et/ou dans des milieux très acides ou basiques (acidophiles et alcalophiles, respectivement) ou sous pressions élevées (piézophiles) (Gomri, 2012). Cette diversité des environnements auxquels les différents extrêmophiles se sont adaptés procure beaucoup d'occasions passionnantes à une série d'applications (Van den Burg, 2003).

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois, en 1974, par Mac Elory, dans un journal intitulé '*Some comments on the evolution of extremophiles*', il a été interprété par plusieurs façons pour enfin être associé aux micro-organismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes

caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie (Irwin et Baird, 2004).

Les premiers micro-organismes extrêmophiles isolés font partie des halophiles (du grec *halos*, sel), découverts dans un environnement qu'on croyait dépourvu de vie, d'où son nom: la mer morte. Ils vivent dans des concentrations en sels très élevées (Ben Abdallah, 2014).

Les chercheurs ne sont pas beaucoup intéressés à ces micro-organismes, jusqu'à la découverte beaucoup plus tardive, du 3^{ème} domaine du vivant, celui des *Archaea*. Les *Archaea* étaient même parfois considérées comme étant les seuls micro-organismes pouvant survivre dans ce genre d'écosystème. Cependant, de nombreuses études ont démontré qu'il existe, dans les autres domaines de la vie (*Bacteria* et *Eukarya*) des micro-organismes qui sont également capables de survivre dans des environnements extrêmes (Weber *et al.*, 2004).

A la fin des années soixante, Brock découvrit les premières espèces se développant à des températures de l'ordre de 70 °C dans des sources thermales du parc de Yellowstone aux Etats-Unis. En 1969, il isola en particulier *Thermus aquaticus* qui sera à la base de la découverte des ADN polymérase thermostables (Brock et Freeze, 1969).

De 1980 à 2000, le laboratoire de Stetter (université catholique de Louvain) isola plus de 50 nouvelles espèces appartenant à de nouveaux genres, voire de nouvelles familles. De ces travaux et de ceux consacrés à d'autres types d'environnements émergea le concept d'extrêmophile.

3-2- Propriétés des extrêmophiles

Les milieux extrêmes sont des zones écologiques dont les conditions physiques et chimiques sont très difficiles pour la vie des organismes qui sont adaptés à des biotopes normaux. Par contre, ces milieux sont favorables pour le développement des organismes extrêmophiles qui ont des capacités d'adaptation à ces environnements (Zettam, 2013).

Le pH intracellulaire de souches alcaliphiles sera inférieur à celui du milieu extérieur et inversement pour les espèces acidophiles. En revanche, pour certains paramètres, comme la température, la pression, les conditions du milieu extérieur s'imposent aux cellules dans leur globalité, membranes, milieu intérieur et totalité des constituants cellulaires. Ces constituants cellulaires devront être non seulement stables dans ces conditions, mais surtout, fonctionnels. La stabilité de chacune des biomolécules prise isolément et testée dans les conditions du milieu extérieur n'est toutefois pas toujours requise, du fait que le milieu intérieur peut bénéficier de l'effet de certains solutés organiques ou d'une protection au sein de complexes macromoléculaires (Yousfi, 2013).

4- Milieux extrêmes et diversité bactérienne

Les micro-organismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans les quelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel, hautes pressions et radiations) (Ben Abdalla, 2014). Au moins sept principaux biotopes naturels peuvent être reconnus quand un de ces trois facteurs se trouve dans l'extrême de la gamme comme le montre le tableau 2. (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995). Les habitats extrêmes sont ceux qui sont caractérisés par une forte température, pH élevé ou faible et une forte salinité.

Tableau 2. Principales caractéristiques des environnements extrêmes les plus étudiés (Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

Habitat	Température °C	pH	salinité (% p/v)
Eau douce alcaline de sources chaudes	> 60	> 7	< 6
Chaups acide sulfatares	> 60	< 3	< 6
Les boues anaérobies et le sol Géothermique	> 60	5 à 7	< 6
Zones acides riches en soufre et pyrite	< 50	< 3	< 6
Milieux alcalins carbonatés	< 50	> 8	< 6
Les lacs de la soudes	< 5	> 9	> 10
Les lacs hypersalins	< 50	5 à 8	> 10

4-1- Bactéries thermophiles et hyperthermophiles

La température est une variable importante dans chaque écosystème. La vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles sont des micro-organismes qui se développent à des températures relativement élevées, entre 45°C et 80°C. Les hyperthermophiles sont des thermophiles particulièrement extrêmes pour les quelles les températures optimales sont au-dessus de 80°C (Madigan et Martino, 2006).

4-1-1- Bactéries thermophiles

Thermophiles sont un groupe d'organismes caractérisés par leur capacité de vivre et s'épanouir en conditions exceptionnellement dures des températures. Pendant la décennie passée, les thermophiles ont produit du grand intérêt des perspectives de la science fondamentale et

appliquée. De point de vue biotechnologique, les thermophiles sont d'intérêt comme sources des enzymes uniques avec les propriétés peu communes, en tant qu'agents actifs dans la fermentation à hautes températures, dans des processus de traitement des déchets, et en lixiviation minérale (Brock, 1986; Kelly *et al.*, 1994 In Fandi *et al.*, 2012).

Les zones géothermiques les plus connues et bien étudiées sont en Amérique du Nord (Parc national de Yellowstone), l'Islande, la Nouvelle-Zélande, le Japon, l'Italie et l'ex-Union soviétique (Lund et John, 2007). Ces endroits sont généralement riches en produits chimiques réduits de l'intérieur de la terre, et donc, de nombreuses bactéries thermophiles sont des chimiolithotrophes, réagissant avec l'hydrogène et le fer ferreux (Amend *et al.*, 2003). En conséquence, l'extraction de l'énergie par oxydation des composés de soufre produit de l'acide sulfurique, ce qui rend souvent les eaux géothermiques très acides.

4-1-2- Bactéries hyperthermophiles

Les hyperthermophiles sont capables de la croissance entre 85°C et 113°C jusqu'ici et sont trouvés dans les environnements tels que les passages hydrothermiques qui peuvent être caractérisés par une large variété de conditions physico-chimiques. Bien que plus des secteurs diffus d'extrusion liquide géothermique puissent également se produire dans les environnements hydrothermales, ce ne sont généralement pas assez chauds pour permettre les hyperthermophiles survivent. Les marins hyperthermophile contiennent un certain nombre d'adaptations biochimiques pour résister, non seulement des températures (à 113°C), mais également à la présence des produits chimiques toxiques, au manque de lumière, au manque de l'oxygène, aux niveaux nutritifs bas et extrêmement à la pression (au moins à 110 MPa) (Hazem *et al.*, 2009).

De nombreuses bactéries hyperthermophiles sont également adaptées à l'acidité. En effet, les hyperthermophiles acidophiles extrêmes, avec un pH optimum de croissance égal ou inférieur à 3, produisent de l'acide sulfurique à partir de l'oxydation des minerais sulfurés. Une grande majorité des isolats thermophiles issus de ces eaux profondes sont des anaérobies chimiolithotrophes (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Pour éviter la dénaturation et la dégradation, les thermophiles présentent une variété d'adaptations cellulaires. Leurs lipides membranaires contiennent des acides gras saturés et linéaires ce qui n'est pas le cas pour les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes (Ulrih *et al.*, 2009).

4-2- Milieux halophile et halotolérant

Les micro-organismes vivants dans les environnements salins ou hypersalins, tels que le grand lac salé de l'ouest américain et la mer morte, sont divisés en :

- Ceux qui sont capables de se développer sans sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel, ce sont les micro-organismes halotolérants (Echigo *et al.*, 2005) par exemple l'espèce *Halobacillus salinus* qui a été isolée à partir d'un lac salé en Corée, cette espèce se développe sans sel et dans des milieux contenant plus de 23% de NaCl (Yoon *et al.*, 2003).
- Ceux qui ne se développent qu'en présence de sel, ce sont les micro-organismes halophiles (Tiquia *et al.*, 2007).

Des nombreuses définitions ont été données dans la littérature pour qualifier les termes halotolérant et halophile. La distinction entre les différents types a été faite en se basant sur les seuils des concentrations des sels requises ou tolérantes. Le terme « halophile » désigne les bactéries nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance. En revanche, le terme « halotolérant » signifie que les bactéries tolèrent différentes concentrations en sel durant leur croissance. Les bactéries nécessitant moins de 1 % (p/v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérées comme halophiles (Aissaoui, 2013).

Les micro-organismes nécessitant moins de 2 % (p /v) de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles (Ollivier *et al.*, 1994).

Larsen (1962) proposa quatre groupes de bactéries halophiles, par contre Kushner (1993) proposa une classification de bactéries halophiles en fonction de leur réponse au NaCl, en se basant sur leur croissance maximale. Cinq groupes ont été définis mentionnés dans le (Tableau 3).

Tableau 3. Différentes catégories des bactéries halophiles selon les définitions de (Larsen, 1962) et de (Kushner, 1993).

Classification de larsen (1962)		classification de kusner (1993)	
Catégories NaCl		Catégories NaCl	
Les non-halophiles	< 2%	Les non-halophiles	1%
Les halophiles légères	2 à 5%	Les halophiles légères	1 à 3%
Les halophiles modérées	5 à 50%	Les halophiles modérées	3 à 15%
Les halophiles extrême	20 à 30%	Les halophiles bord extrêmes	9 à 23%
		Les halophile extrêmes	15 à 32%

La propriété des micro-organismes halotolérants à s'adapter rapidement aux changements des concentrations extrêmes de sel, les rend meilleurs candidats pour la bio-prospection que leurs homologues halophiles qui dépendent strictement de la présence de sel (Shivanand et Jayaraman, 2009). Il y a différentes catégories selon la définition de Tiquila *et al.* (2007) comme le montre le (Tableau 4).

Tableau 4. Différentes catégories des bactéries halotolérantes (Tiquila *et al.*, 2007).

Catégories	NaCl
Légèrement halotolérants	6 à 8%
Modérément halotolérants	8 à 20%
halotolérantes	0 à 30%

4-3- Milieux alcalins

Les micro-organismes alcalophiles sont ceux qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9 avec un optimum entre 10 et 12, tout en montrant une croissance très faible près de la neutralité. Ces micro-organismes ne se trouvent pas seulement dans des habitats à pH neutre ou alcalin, mais ils peuvent exister aussi dans des habitats acides (Horikoshi, 1999).

Les alcalophiles sont souvent isolés des milieux naturels qui ont également tendance à avoir des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl); ceux-ci sont ainsi appelés haloalcalophiles (Gareeb et Setati, 2009).

Dans des conditions alcalines, les concentrations des ions d'hydrogène sont très faibles et les cellules ont des difficultés à utiliser l'ATP-synthase pour produire de l'énergie. Pour contourner ces problèmes, les micro-organismes pompent ces ions et exportent d'autres afin de maintenir leur intérieur à proximité de la neutralité. En outre, la paroi cellulaire des alcalophiles agit comme une barrière de défense contre les conditions environnementales extrêmes (Horikoshi, 2006).

4-4- Milieux acides

Les micro-organismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 (Morozkina *et al.*, 2010), ils colonisent des environnements acides alors que les acido-tolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre (Horikoshi, 1999). Les acidophiles existent dans les trois domaines de la vie (Baker-Austin et Dopson, 2007), certains acidophiles possèdent des mécanismes

qui leurs permettent de faire ressortir les protons intracellulaires pour garder le pH de leur cytoplasme proche de la neutralité donc leur protéines intracellulaires ne nécessitent pas de développer des mécanismes pour le maintien de leur stabilité alors que d'autres acidophiles, tel que *Acetobacter aceti*, ont un cytoplasme acide et possèdent des mécanismes qui expulsent les protéines intracellulaires à l'extérieur pour atteindre leur stabilité (Menzel et Gottschalk, 1985).

5- Importance biotechnologiques des micro-organismes extrêmophiles

On peut distinguer deux types d'applications différentes. La première repose sur l'utilisation directe des organismes. C'est le cas en particulier pour les applications liées à la bioremédiation (ensemble des procédés visant à la restauration d'un écosystème grâce à la stimulation des populations microbiennes indigènes ou à l'apport des populations adaptées) et à la biolixiviation (ou procédé dans lequel les microbes sont utilisés pour le traitement des minerais). Le second type d'applications repose sur l'utilisation des biomolécules issues des extrêmophiles; ce sont les enzymes, mais aussi les protéines, les lipides, les polymères, les extrêmolytes et une grande diversité de métabolites secondaires. L'ensemble constitué des cellules, des ressources génétiques et des biomolécules listées ci-dessous regroupe ce que nous qualifions au sens large d'actifs biotechnologiques (Quérellou et Guézennec, 2013).

6- Endospore

6-1- Historique et Définition de la spore

La première personne à avoir observé et décrit les spores bactériennes est probablement Perty (1852). Toutefois, les premiers à avoir détaillé la description d'une spore sont Ferdinand Cohn et Robert Koch en 1876, durant leurs travaux respectifs sur la stérilisation des matériaux organiques et l'anthrax (Abbas, 2014).

La sporulation est un phénomène naturel dans le cycle de croissance de certains groupes de bactéries telles que les espèces des *Bacillus* (Ponce *et al.*, 2008). Certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* et *Clostridium* ont la capacité de sporuler lorsqu'elles se trouvent dans des environnements de stress comme le manque des nutriments dans le milieu (Leggett *et al.*, 2012).

Les *Bacilles* thermophiles sont caractérisés par la formation rapide de spores. Le processus de sporulation est supposé être similaire à celui des Bacille mésophiles comme *Bacillus cereus* *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans* (Burgess *et al.*, 2010).

6-2- Structure des spores bactériennes

La structure et la composition chimique des spores bactériennes diffèrent considérablement de celles des cellules végétatives. Ces différences sont à l'origine des propriétés de résistances uniques des spores. Comme présentée sur la figure 1. La spore se compose de l'extérieur vers l'intérieur d'un exosporium, des tuniques internes, externes et crust (chez certaines espèces), d'une membrane externe, d'une membrane interne, d'un cortex, d'une membrane interne et d'un cœur (Achouri, 2017).

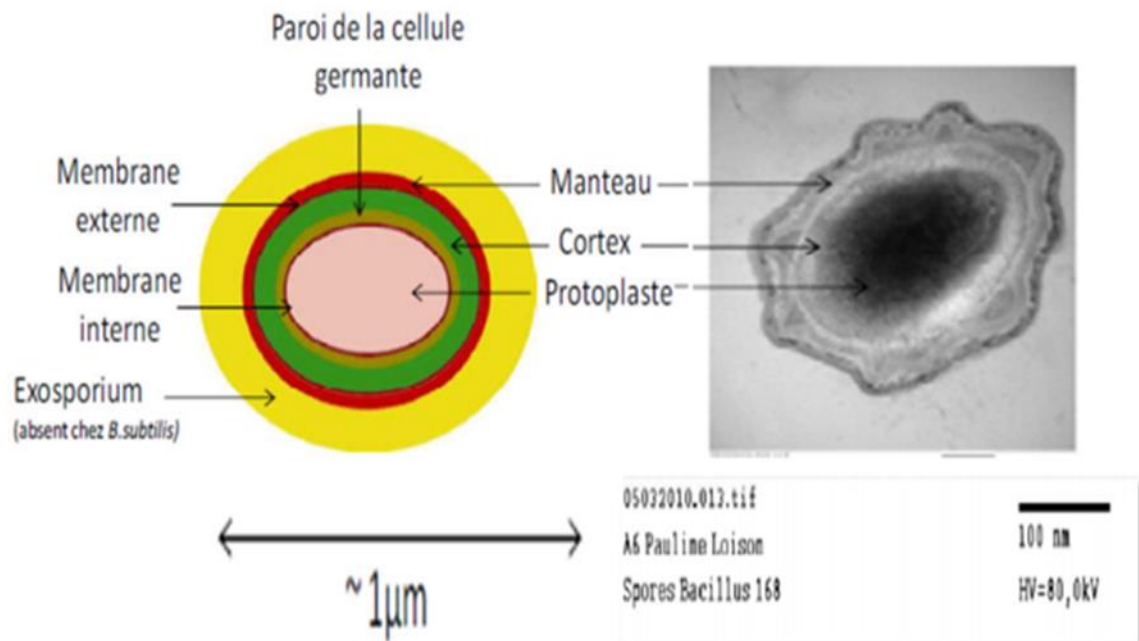


Figure 1. Schéma général de la structure de la spore bactérienne (l'échelle des différentes structures n'est pas respectée) et photographie en Microscopie Electronique à Transmission d'une spore de *Bacillus subtilis* (MET). Echelle : 100 nm. (Loison, 2013).

6-3- Structure de l'endospore

Les spores sont constituées d'un noyau, autrement connu sous le nom de protoplaste, qui contient le matériel nucléaire (génétique), entouré par la membrane corticale et le cortex, qui est à son tour enfermé dans le manteau de la spore. Certaines espèces, telles que *Geobacillus* sp. et *Bacillus cereus*, peuvent avoir une couche au-dessus du manteau de la spore appelée exosporium d'autres espèces telles que *B. cereus* peuvent avoir des appendices. La principale différence entre les espèces dans la structure des spores est la structure et le nombre des couches dans le manteau des spores, alors que le cortex et le noyau sont très similaires (Burgess *et al.*, 2010).

6-4- Phénomènes de sporulation et de germination

6-4-1- Sporulation

Certaines bactéries peuvent produire une spore pour se protéger contre des conditions environnementales difficiles. Cette spore est très résistante à la chaleur et protège le bagage génétique de la bactérie (Vignola, 2002).

La sporulation est un processus complexe qui implique une succession d'étapes qui est considérée comme étant très similaire entre bactéries aérobies et anaérobies facultatives sporulées (Burgess *et al.*, 2010). Il y a d'abord formation d'un filament axial de matériel nucléaire (phase 1), suivie de l'invagination de la membrane cellulaire isolant une partie de l'ADN et constituant le septum de la préspore (phase 2). La membrane continue à se développer et entoure la préspore d'une seconde enveloppe (phase 3). Le cortex se forme, ensuite, dans l'espace compris entre les deux membranes du calcium et de l'acide dipicolinique s'y accumulent (phase 4). Les protéines de la tunique sont alors formées autour du cortex (phase 5) et l'endospore arrive à maturité (phase 6). Finalement des enzymes lytiques détruisent le sporange libérant la spore (phase 7) (Figure 2) (Prescott *et al.*, 2010).

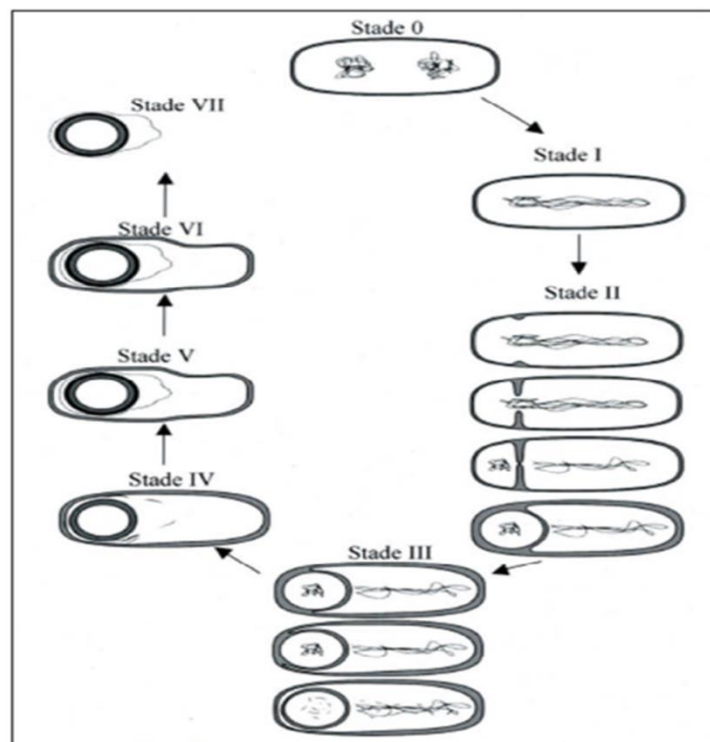


Figure 2. Formation d'une spore à partir d'une cellule végétative en croissance (Geneviève, 2008).

6-4-2- Germination

Trois étapes sont impliquées dans le processus de passage d'une spore à une cellule végétative : l'activation, la germination et la prolifération (Burgess *et al.*, 2010).

- a. **L'activation** : est un processus réversible qui prépare les spores à la germination. Pour pouvoir germer, la spore doit être activée par un agent comme la chaleur, l'acidité ou les produits chimiques (Burgess *et al.*, 2010). Par exemple, les spores de *Geobacillus stearothermophilus* se sont avérés être activées à des températures aussi élevées jusqu'à 110 °C, alors que les spores de *B. subtilis* auraient une plus faible température d'activation de 65 à 70°C (Burgess *et al.*, 2010).
- b. **La germination** : ce processus est caractérisé par le gonflement de la spore, la rupture ou l'absorption de la tunique, la perte de la résistance à la chaleur ou à d'autres agressions (Prescott *et al.*, 2010) et surtout à la libération des composants de mucopéptide et de l'acide dipicolinique de la paroi cellulaire. Ce dernier acide ne se trouve que dans les spores et pourrait avoir un rôle dans l'inactivation des enzymes de la cellule normale qui réapparaissent après germination (Jawetz, 1973).
- c. **La croissance** : le protoplaste de la spore synthétise de nouveaux composés, émerge des restes de la tunique sporale et donne naissance à une bactérie active (Prescott *et al.*, 2010).

6-4-3- Résistance

La spécificité des spores comparées aux cellules végétatives est leur remarquable résistance à la chaleur. Les spores de *B. subtilis* par exemple, peuvent survivre à une chaleur humide de 100 °C, avec une valeur de D (temps de réduction décimale, le temps nécessaire pour abaisser la population par un facteur 10) comprise entre 20 et 30 min selon les souches.

De plus, les spores sont approximativement 1000 fois plus résistantes à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide (Nicholson *et al.*, 2002).

6-5- Bactéries sporulées

6-5-1- Bactéries sporulées aérobies (*Bacillus*)

Les *Bacillus* sont des *bacilles* Gram+ (les cultures âgées peuvent apparaître Gram -), généralement mobiles, aptes à la sporulation. La spore ne prend pas la coloration de Gram, elle est sphérique ou ovale, déformante ou pas selon les espèces. Dans les cas douteux, une coloration spécifique peut être réalisée l'aptitude à la sporulation peut aussi être mise en évidence par le test de thermorésistance (10 minutes à 80°C). Les *Bacillus* sont catalases +, aérobies ou aéro-anaérobies. On les classe en fonction de la morphologie de la spore (étudiée par examen microscopique) ou en fonction de critères plus nombreux incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophile (classification numérique) (Guiraud, 2012).

6-5-2- Bactéries sporulées anaérobies

Les *Clostridium* sont des bacilles Gram +, souvent de grand taille, isolés ou en chaînette (les cultures âgées peuvent apparaître Gram -). Ces bactéries sont généralement mobiles. Elles sont capables de sporuler et la forme et la position de la spore a une grande importance taxonomique. Les *Clostridium* sont catalase – et anaérobies stricts. Cependant, quelques rares espèces sont aéro-tolérantes (Guiraud, 2012).

7- Nomenclature des rangs taxonomiques

- Le domaine : *Eubacteria*
- Phylum : *Firmicutes*
- La classe : *Bacilli*
- L'ordre : *Bacillales*
- Le genre : *Bacillus*
- la famille : *Bacillaceae*

Ces bactéries peuvent être classées en fonction de la morphologie de la spore, étudiée par examen microscopique ou en fonction de critères plus nombreux incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophilie, etc (Guiraud, 2012).

Si on considère la spore, on distingue :

- Groupe 1 : spore ovale non déformante à paroi épaisse (exemple : *B. subtilis*).
- Groupe 2 : spore ovale déformante à paroi épaisse (exemple : *B. stearothermophilus* et *B. polymyxa*).
- Groupe 3 : spore sphérique déformante (exemple : *B. pasteurii* et *B. sphaericus*) (Bouhafs et Bousseboua, 2016).

7-1- Domaine des *Eubacteria*

Les *Eubacteria* sont adaptées à la vie dans des conditions de vie extrêmes (forte salinité, haute température, faible pH, absence d'oxygène). Des conditions qui ressemblent à celles de la terre lors de l'apparition de la vie. Se sont des bactéries primitives (Yahiaoui, 2015).

7-2- Phylum des *Firmicutes*

7-2-1- Historique et diversité des *Firmicutes*

Le phylum *Firmicutes* (*Firmus cutis* : peau dure) a été décrit en 1978 par Gibbons et coll, comme regroupant les bactéries à Gram positif. Il a ensuite été divisé en deux initialement basée sur l'étude

des caractères phénotypiques, la classification des *Firmicutes* s'est ensuite trouvée bouleversée par l'utilisation des séquences du gène de l'ARNr 16S.

Ainsi, selon la seconde édition du *Bergey's Manual*, les *Firmicutes* se divisent en trois classes, *Bacilli*, *Clostridia* et *Mollicutes*, comprenant respectivement deux ordres et 17 familles, trois ordres et dix familles, cinq ordres et six familles (Alauzet, 2009).

Le phylum *Firmicutes* tel qu'il est décrit par Garrity en 2005 est un phylum hétérogène. Comme la plupart des phyla, il groupe des bactéries diverses du point de vue de leur physiologie (aérobies ou anaérobies, phototrophes, etc.) et de leur morphologie (bacilles, cocci). De façon plus exceptionnelle, on retrouve dans ce phylum des bactéries présentant différents types de paroi. En effet, même s'ils sont toujours désignés sous le nom de « groupe des bactéries à Gram positif à faible G+C % », les *Firmicutes* comprennent également des bactéries ayant une paroi de type Gram-négatif, c'est à dire possédant une membrane externe, et même des bactéries dépourvues de paroi.

En 2004 au phylum des *Firmicutes* sur la base d'une analyse phylogénétique des séquences protéiques de la phosphoglycérate kinase.

Cependant, les travaux de Ludwig et coll, (2009) ont rapidement ressorti cette classe des *Firmicutes* pour la transférer dans son phylum d'origine, les *Tenericutes*. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que l'on retrouve également une diversité au niveau de la structure du peptidoglycane des *Firmicutes* monoderms. En effet, le muropeptide varie considérablement, tant au niveau du type d'acide aminé en position 3 du pentapeptide qu'au niveau de la nature du pont interpeptidique (Alauzet, 2009).

7-3- Classe des *Bacilli*

Les *Bacilli* (pluriel: *bacille*) est une classe de bactéries se réfère à des bactéries qui ont une forme de tige contient deux ordres: *Bacillales* et *Lactobacillales* et le genre (*Bacillus*) et (*Lactobacillus*, *Pediococcus*). contiennent des coques et bâtonnets sporulents ou non.

7-4- Ordre des *Bacillales*

7-4-1- Caractéristiques des *Bacillales*

Les membres de l'ordre *Bacillales*, sont tous Gram positifs et sont généralement en forme de bâtonnet. Ils produisent également des endospores lorsque l'environnement devient difficile, le plus souvent mobiles (flagelles péritriches), chimiohétérotrophes, aérobies ou anaérobies facultatifs (Deng *et al.*, 2012).

7-4-2- Intérêts biotechnologie des *Bacillales*

Une application importante de nombreux membres de *Bacillales* sont leur capacité à sécréter diverses enzymes (par exemple des protéases, des amylases, des xylanases, des cellulases, lipases, etc.) qui ont été largement appliquées dans l'agriculture, horticulture, industrie et médecine (Sarethy *et al.*, 2011). Commercial l'intérêt pour ces bactéries a conduit à l'isolement de nouvelles souches de *Bacillales* provenant de divers environnements extrêmes (Sundararajan *et al.*, 2011; Stammen *et al.*, 2010).

Une variété des méthodes, tels que la caractérisation physiologique, la graisse cellulaire profilage acide, teneur en G-C, hybridation ADN-ADN, et analyse phylogénétique à base des gènes ribosomiaux, ont été utilisé pour l'identification des bactéries nouvellement isolées chez *Bacillales* (Deng *et al.*, 2012).

7-4-3- Famille des *Bacillaceae* et principaux genres

La famille des *Bacillaceae* comprend principalement des bâtonnets chimio-organophiles aérobies ou anaérobies facultatifs paroi cellulaire Gram-positive typique. La majorité des taxons au sein de la famille sont capable de former des endospores, bien que des exceptions sont trouvés. Les membres aérobies ou anaérobies facultatifs des *Bacillaceae* étaient, jusqu'au début des années 1990, positionnés dans le genre *Bacillus*, qui se trouvait à côté de les *clostridies* strictement anaérobies.

Depuis lors, d'importants changements taxonomiques ont eu lieu et par conséquent, la famille accueille maintenant des représentants du genre *Bacillus* et autres genres nouvellement formés avec apparentés nomenclature, des exemples étant *Paenibacillus* ("presque" *Bacillus*), *Geobacillus* et *Halobacillus* (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

Récemment, la famille des *Bacillaceae* englobe 62 genres (Tableau 5) composés d'au moins 457 espèces. De nouveaux genres sont continuellement décrits à la suite d'une description détaillée d'une pléthore de nouveaux isolats environnementaux divergents. En 2009, 31 genres appartenant aux *Bacillaceae* ont été répertoriés dans Manuel de Bactériologie Systématique de Bergey, seulement deux ans plus tard, Logan et Halket ont indiqué existence de 36 genres dans cette famille (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

Tableau 5. Genres de la famille des *Bacillaceae* (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

Genre	Année de proposition du genre
<i>Bacillus</i>	1872
<i>Marinococcus</i>	1984
<i>Virgibacillus</i>	1999
<i>Anoxybacillus</i>	2000
<i>Geobacillus</i>	2001
<i>Lentibacillus</i>	2002

<i>Alkalibacillus</i>	2005
<i>Caldalkalibacillus</i>	2006
<i>Viridibacillus</i>	2007
<i>Psychrobacillus</i>	2010
<i>Streptohalobacillus</i>	2011
<i>Caldibacillus</i>	2012
<i>Texcoconibacillus</i>	2013
<i>Jilinibacillus</i>	2014

7-4-4- Distribution et diversité de *Bacillaceae* à travers habitats différents

Distribution de l'habitat (biogéographie) et diversité des membres des *Bacillaceae* dans les habitats naturels et artificiels constituent une question écologique fondamentale. Ils ont été étudiée dans ce contexte depuis le premier isolement des bactéries du sol à la fin du 19^{ème} siècle.

Les méthodes utilisées pour étudier la diversité ont été utilisé pour toutes les bactéries du sol et traditionnellement inclus caractérisation phénotypique, l'application de la taxonomie dichotomique et numérique, et plus tard, des approches phylogénétiques moléculaires (initiées Il y a plus de 20 ans) qui reposent sur l'extraction directe de les acides nucléiques de l'habitat naturel (par exemple le sol), plutôt que d'isolats.

1- Description du site d'isolement

Le travail porte sur la caractérisation phénotypiques et biochimiques des souches bactériennes extrémophiles sporogènes isolées à partir des sols des palmeraies de trois palmeraies régions sahariennes: Adrar, In Amenas et El-Méniâa (Figure 3).

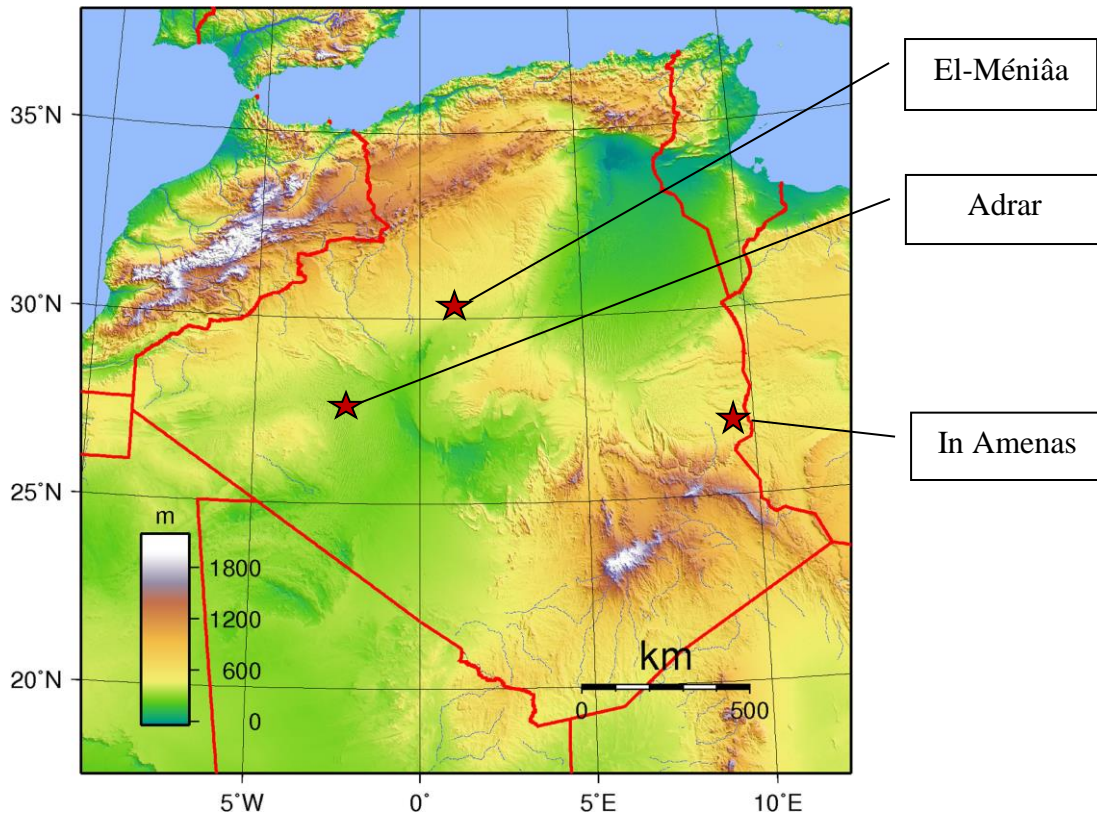


Figure 3. Carte topographique de l'Algérie, représente les trois régions des prélèvements.

2- Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés durant le mois de novembre 2017 à partir des palmeraies de trois régions sahariennes : Adrar, In Amenas et El-Méniâa.

Cinq échantillons au niveau du sol des palmeraies, ont été prélevés à une profondeur de 5-10 cm de la couche superficielle, à l'aide d'une spatule. Une quantité de 100-150 g du sol est recueillis dans des sachets, puis transportés au laboratoire sous une température ambiante.

- Trois échantillons de la région de El-Méniâa.
- Un échantillon de la région de In Amenas.
- Un échantillon de la région de Adrar.

3- Isolement des *Bacillales*

3-1- Préparation de milieu de culture

L'isolement des *Bacillales* est réalisé sur milieu de culture TSA (Trypticase Soja-agar), par simple dissolution des ingrédients du milieu de culture (une pesée 40 g de poudre TSA) dans un solvant (1000 mL d'eau), additionné par la nystatine (un antifongique) à raison de 1 g/mL.

L'incubation a été réalisée sous différentes conditions physico-chimiques :

- De température: 70, 65 et 60 °C.
- Du sel à 30 et 25% NaCl.
- Du pH par l'ajout de quelques gouttes de NaOH pour basifier le milieu à pH = 13.

La préparation du milieu de culture doit être sous une faible agitation (par un barreau magnétique) pour homogénéiser le milieu de culture, et la stérilisation est effectuée à l'autoclave (à 120°C pendant 20 minutes).

L'écoulement : le milieu après l'autoclavage est versé à l'état fondu (en surfusion: de 45°C à 50°C) dans les boîtes Pétri sous une hotte à flux laminaire et à côté d'un bec Bunsen pour éviter les contaminations.

Toujours, on retourne les boîtes de Pétri, pour empêcher la condensation de l'eau (accumulée sous le couvercle) de retomber sur la surface du milieu de culture. L'incubation dans une étuve se fait également dans cette position.

3-2- Traitement des échantillons

Dans le but d'isoler des *bacillales* extrémophiles caractérisés par une thermo-résistance de leurs spores, des dilutions décimales ont été préparées à partir de chaque échantillon jusqu'à la dilution 10^{-2} , ensuite cette dernière a été soumise à un traitement thermique afin de détruire toute forme végétative. Dans ces conditions, seules les bactéries capables de produire des spores (les bactéries sporogènes ou sporulantes) peuvent survivre. Pour cette raison, les échantillons dilués (placés dans les tubes à essai) ont été déposés dans un bain marie à une température de 80°C durant 15 min (Lynn *et al.*, 1999).

- Une solution mère 10^{-1} : 1 g du sol + 9 mL d'eau stérile.
- Dilution décimale 10^{-2} : 9 mL d'eau stérile + 1 mL de solution mère.

3-3- Ensemencement et conditions de culture

Des cultures ont été réalisées par l'ensemencement de 0,1 mL de chacune des solutions mères et de leurs dilutions, en surface du milieu de culture Trypticase Soja-Agar (TSA) coulé dans des boîtes de Pétri (Figure 4). Les boîtes seront incubées à différentes conditions physico-chimiques pendant 7 jours pour les thermophiles, et pendant 60 jours pour les alcalophiles et les halophiles.

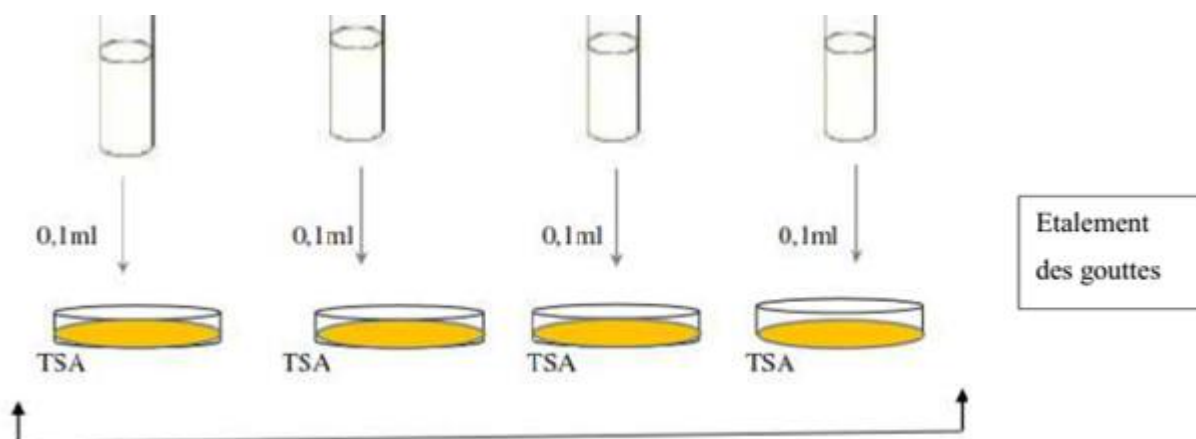


Figure 4. Isolement et dénombrement des *Bacillales* extrêmophiles.

4- Purification et conservation des souches

Après incubation, l'aspect des colonies ayant poussés sur le milieu de culture sont examinés. Selon la nécessité (si les boîtes contiennent plusieurs types de colonies), on procède à la purification de la souche en réalisant des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement (TSA).

Une fois la souche est purifiée, la recherche s'est orientée vers l'identification de l'isolat en suivant les recommandations faites par Logan *et al.* (2009) pour la taxonomie des *Bacillales*. La souche pure est conservée sur gélose nutritive inclinée à 4°C et à 37 °C.

5- Identification phénotypique

Selon les tests proposés par Logan *et al.* (2009) pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales*, Les souches pures sont soumises à une étude des différents caractères morphologiques, cultureux et physiologiques (biochimiques) dans le but d'avoir une identification jusqu'au genre.

5-1- Caractérisation morphologique

5-1-1- Aspect macroscopique

Cette étude consiste à l'observation directe à l'œil nu de l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu TSA après 48h d'incubation en tenant compte des critères suivants :

- La forme des colonies : rond, irrégulières, circulaire ou autres caractéristiques.
- La taille des colonies par une mesure de diamètre.
- La couleur.
- L'élévation : convexe, concave ou plate.
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ou autres caractéristiques.

5-1-2- Aspect microscopique

5-1-2-1- Examen à l'état frais

L'examen des bactéries à l'état frais se fait entre lame et lamelle. Sur lame propre et dégraissée, on étale une goutte de suspension réalisée dans l'eau physiologique à partir des colonies de 48-72h. Puis, on dépose une lamelle et on observe à l'objectif X100 à immersion (avec une goutte d'huile minérale). L'examen à l'état frais 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). Il est conseillé d'examiner des cultures jeunes (pas plus de 72h).

5-1-2-2- Coloration par bleu de méthylène

C'est une coloration très simple et rapide à effectuer qui permet de voir la forme et le groupement bactérien. Le prélèvement ayant été déposé sur une lame est fixé (un frottis est préparé et une fixation à la chaleur est réalisée). La lame est refroidi, puis quelques gouttes de bleu de méthylène (à 1% p/v, c'est-à-dire dissoudre 1 g de bleu de méthylène dans 100 mL d'eau distillée et bien mélanger) sont versées. Après 3-5 min, la lame est rincée (avec de l'eau distillée) et séchée (entre 2 feuilles de papier joseph). En fin, l'examiner à l'immersion (au X100) est réalisée. Cette technique permet la mise en évidence des endospores dans le corps bactérien à partir des cultures de 72h, par coloration du cytoplasme (et non de l'endospore) (Harley et prescott, 2002).

5-1-2-3- Coloration de Gram

Décrite par le médecin Hans Christian Joachim Gram (1884). Cette technique permet de diviser les bactéries en deux groupes : bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif (Yousfi, 2013).

Toutes les observations sont effectuées par un microscope photonique. 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 (2 fois 45 secondes), et de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration on le traitant avec de l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et en fait couler le solvant (alcool) sur le frottis 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 bactéries à Gram négatif seront incolores et les bactéries à Gram positif seront de violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 2 minutes à la fuchsine pour colorer les cellules à Gram négatif en rose (Singleton, 1999). Après un bref rinçage, on sèche le frottis au papier joseph et on l'examine à l'objectif en ajoutant quelques gouttes d'huile à immersion (grossissement X100) (Singleton, 1999).

5-1-2-4- Recherche de la spore

Recouvrir le frottis de vert de malachite pendant 20 min (en utilisant la chaleur). Puis, laver le frottis avec de l'eau, l'essuyer l'aide de papier joseph. Recouvrir ensuite la lame avec une solution de la fuchsine pendant 2 min. Par la suite, laver le frotis et le sécher de nouveau. Le frottis est donc prêt à être observé au microscope à l'objectif X100 avec de l'huile à immersion.

5-2- Caractérisation physiologique

La physiologie de la souche a été étudiée par l'estimation de la croissance (croissance +, pas de croissance -), sur milieu liquide de la bouillon nutritif, à différentes conditions physico-chimiques. La croissance de l'isolat (en forme de bâtonnet, à Gram positive, capable de former des spores) a été étudié pour les trois paramètres suivants : salinité, température et pH.

5-2-1- Tolérance à la salinité

L'évaluation de la croissance des souches en fonction de la salinité a été déterminée par la culture des souches sur le bouillon nutritif (5 g/L de peptone + extrait de viande 3 g/L dans 500 mL d'eau) à un pH 7, contenant des concentrations en NaCl de (0, 2, 4, 6, 8 et 10 %) dans chaque tube à vis qui contient de 5 mL de milieu incubé à 37°C pendant 48h.

5-2-2- Croissance à différents pH

L'évaluation de la croissance des souches en fonctions du pH a été déterminée par la culture des souches sur bouillon nutritif ajusté à des pH (5, 6, 7, 8 et 9) dans chaque tube contient de 5 mL de milieu incubé à 37°C pendant 48h.

5-2-3- Croissance à différentes températures

L'évaluation de l'effet de la température sur la croissance des souches a été effectuée par incubation à différentes températures (25, 37, 45 et 60 °C) des souches ensemencées sur un milieu liquide de bouillon nutritif, dans chaque tube contient de 5 mL de milieu incubé à pH 7 pendant 48h.

5-2-4- Effet de la congélation

Nous avons fait un stockage des souches dans un milieu de culture TSA à -18 °C (dans un congélateur) pendant une durée de 7 jours.

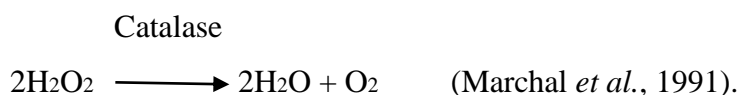
5-3- Caractérisation biochimique

Sur le plan biochimique, la caractérisation des souches a été réalisée par l'utilisation du système Api 20^E (Logan et Berkeley, 1984), et l'utilisation des autres techniques de la microbiologie classique pour la recherche de la catalase, mannitol - mobilité, la nitrate reductase et le type respiratoire.

5-3-1- Mise en évidence des enzymes respiratoires

5-3-1-1- Test de catalase

Le catalase est une enzyme qui permet la destruction de peroxyde formés au cours de réaction d'oxydation :



C'est une enzyme catalysant la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau (Leyral et Vierling, 2007). Le principe consiste à mettre en contact une colonie de la souche avec une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂). La présence de l'enzyme se traduit par un dégagement immédiat des bulles gazeuses.

5-3-1-2- Recherche de la nitrate réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates (NO₃⁻¹) en nitrites (NO₂⁻¹) par l'enzyme nitrate réductase. Il a été réalisé selon le protocole mentionné dans le *Bergey's Manuel of Systematics* (De Vos *et al.*, 2009). La souche est cultivée sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 24 à 48h, trois gouttes de chacun de réactif NIT I (0,8 g acide parasulfanilique en 100 mL acide acétique 5N) et NIT II (0,5 g diméthyl- α -naphthylamine en 100 mL acide acétique 5N),

appelés également réactifs de GRIESS I et II respectivement, sont ajoutées à la culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge (ou rose). En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a :

- Apparition de la coloration rouge (ou rose): les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la nitrate réductase.
- Absence de coloration rouge (ou rose): les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la nitrate réductase.

L'apparition de gaz dans la cloche de Durham indique la réduction des nitrates en azote gazeux.

5-3-2- Type respiratoire

Le test du type respiratoire a été effectué selon les recommandations de Guiraud (1998). Le milieu gélosé Viande-Foie (VF) réparti en tubes à vis et fins est ensemencé après une régénération (à 100 °C) et un refroidissement à l'aide d'une pipette Pasteur.

L'ensemencement est plongé au fond du tube, puis remonté en décrivant une spirale. Le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48h.

- La présence de la culture sur toute la hauteur du milieu de culture indique un type respiratoire de type aéro-anaérobie facultatif.
- Si la culture a lieu seulement en haut du tube elle indique que la bactérie est aérobie stricte.
- Si la culture est observée à 1 à 1,5 cm environ de la surface, l'isolat est considéré microaérophile.
- Si la culture est manifeste seulement au fond du tube cela suggère que la bactérie est anaérobie stricte.

5-3-3- Mannitol-mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur un milieu semi-solide : mannitol mobile par piqure centrale (Harley et Prescott, 2002). La mobilité de la bactérie est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur rouge au jaune (ou rouge jaunâtre) (Gerhardt *et al.*, 1994).

5-3-4- Citrate de Simmons

Ce test est réalisé sur le milieu citrate de Simmons, il est basé sur la capacité d'une bactérie à utiliser le citrate comme seule source de carbone suite à la présence de l'enzyme citrate perméase (Cheesbrough, 2006).

La pente gélosé du milieu de culture solide estensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse contenant une colonie et incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours.

- Citrate-positive: culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur du vert clair au bleu).
- Citrate-négative: pas de culture (coloration verte de milieu reste inchangée) (Marchal *et al.*, 1991).

5-3-5- Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

- **Principe**

Le milieu Clark-Lubs contenant du glucose (au début) permet l'étude des produits de fermentation de l'acide pyruvique. Les deux voies métaboliques étudiées sont : la formation d'acides organiques (réaction de rouge de méthyle) et la formation d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer) (Denis, 2007).

- Test RM (rouge de méthyle)

Le rouge de méthyle est un indicateur de pH avec un intervalle compris entre 6 (jaune) et 4,4 (rouge). Ce test permet la mise en évidence de la production des acides faibles (acide lactique, acide acétique, acide formique) à partir de substrat initial (le glucose) par la voie de fermentation d'acides mixtes

- Test VP (Voges-Proskauer)

Le test de Voges-Proskauer détecte la production d'acétoïne (= carbinol acétylé de méthyle), un produit naturel formé à partir d'acide pyruvique au cours de la fermentation du glucose. L'acétoïne en présence d'oxygène atmosphérique, est oxydé en diacétylé qui réagit avec l'alpha-naphtol pour produire un anneau rouge en surface du milieu liquide (Denis, 2007).

- **Technique**

Le milieu Clark et Lubs estensemencé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incubé 24h à 37°C.

- **Lecture**

Après incubation, 2 mL de milieu sont prélevés auxquelles on ajoute 1 à 2 gouttes du réactif RM. De même, 0,5 mL de KOH ou de NaOH (réactif VP 1) et 0,5 mL d'alpha-naphtol (réactif VP 2) sont ajoutés à un volume de 1 mL du milieu prélevé dans un autre tube stérile.

- Test RM

Si le milieu présente une coloration rouge le test RM est positif. Dans le cas où la couleur reste inchangé (généralement rest jaune), le test est négatif.

- Test VP

Si le milieu présente un anneau rouge, le test est positif. Un test négatif est caractérisé par une couleur jaune (c'est-à-dire pas d'anneau rouge).

5-3-6- Système Api 20^E

La galerie Api 20^E est un système simplifié et standardisé, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 20 tests biochimiques (Figure 5).

Cette galerie est recommandée pour l'identification des entérobactéries, mais nous avons utilisé les résultats de certains tests biochimiques pour l'identification des souches de *Bacillales* isolées.



Figure 5. Photo d'une galerie Api 20^E non ensemencé.

• Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'une pipete Pasteur, une colonie de 24h bien isolée sur milieu gélosé est prélevée.
- Une suspension bactérienne est mise dans 5 mL de l'eau physiologique stérile (ou de l'eau distillée stérile) puis vortexée.

• Inoculation et lecture de la galerie Api 20^E

Après incubation de 24 à 72h (à 37°C), les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés (Figure 6) ou révélés par l'addition de réactifs adéquats pour certains tests réactifs (comme le réactif de Kovaks).

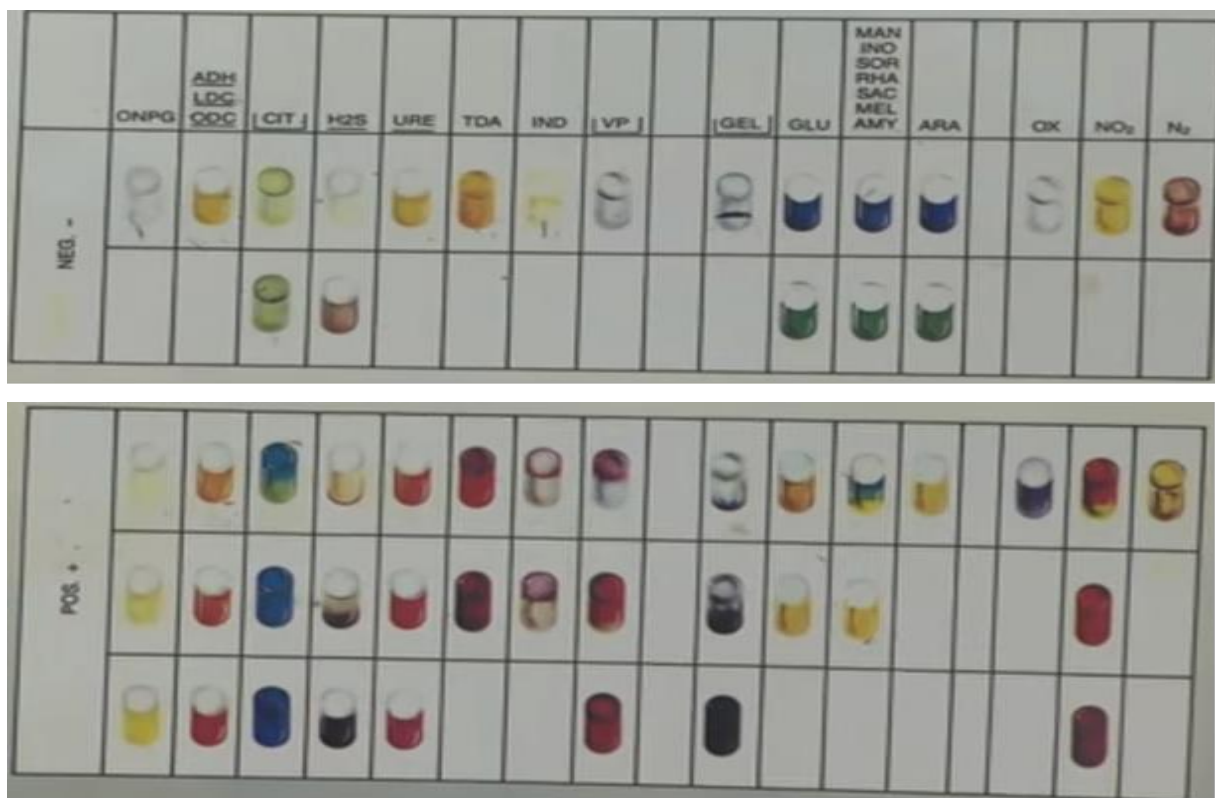


Figure 6. Résultats négatives et positives de la plaque Api 20^E (virages colorés).

La lecture de ces réactions est faite à l'aide du tableau de lecture (Tableau 6) et l'identification est effectuée par l'utilisation de plusieurs programmes : l'Excel Identification Programme EIP, BIPWin et ABIS online.

Tableau 6. Tableau de la lecture et l'identification de la plaque de lecture API 20^E.

Tests	Composants actifs	Réaction /Enzymes	Résultats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophénol- βD-Galactopyranosidase	- β - galactosidase (Ortho Nitro Phénol-βD-alactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Orange / rouge
LDS	L-lysine	Lysine Décarboxylase	jaune	Orange /rouge
ODS	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	jaune	Orange /rouge
CTT	Trisodium citrate	Utilisation du CITrate	Vert pal-jaune	Bleu-vert-bleu
H ₂ S	Sodium citrate	Production d'H ₂ S	Incolore-grisâtre	Dépôt noire-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange

			/rouge	
TDA	L-tryptophane	TriptophaneDisAminase	TDA immédiat Jaune Marron rougeâtre	
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	JAMES immédiat Incolore- Vert pale- Jaune- Rose	
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoine	VP1+VP2/10min Incolore- Rose pale- Rose -rouge	
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion pigment	Diffusion du pigment
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AML ARA	D-glucose D-mannitol Inositol D-sorbitol L-rhamnose D-saccharose D-melibiose Amygdaline L-arabinose	Fermentation –oxydation (GLUcose) Fermentation –oxydation (MANnitol) Fermentation –oxydation (INOsitol) Fermentation –oxydation (SORbitol) Fermentation –oxydation (RHAmnose) Fermentation –oxydation (SACcharose) Fermentation –oxydation (MELibiose) Fermentation –oxydation (AMYgdaline) Fermentation –oxydation (ARAbinose)	Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris Jaune-jaune gris

6- Interprétation probabilistique de profil biochimique

6-1- Identification par Excel Identification Program (EIP)

C'est un fichier Excel permettant l'identification d'une souche bactérienne à partir de son profil obtenu sur microgalerie d'identification API 20^E (Figure 7).

Figure 7. Tableau d'identification par Excel programme (EIP).

6-2- Identification par *Bacterial Identification Program (BIPWin)*

Le *Bacterial Identification Program* est un logiciel développé durant les années 90 au niveau de l'Université de Southampton (Grande-Bretagne), qui permet l'identification de différents groupes bactériens. La matrice d'identification utilisée dans ce programme est enregistrée sous forme de fichiers Excel. Une fois le programme est ouvert, l'emplacement de la matrice correspondante au type de galerie utilisée doit être indiqué en cliquant deux fois sur la matrice *Bacillales*. Le programme utilise directement, l'onglet est affiché avec une grille des résultats de la galerie API 20^E (Figure 8).

Bacterial Identification Program - TABLEAU D'IDENTIFICATION Api® 20 E V4.0 (bioMérieux® sa)

File Edit Tools Options Help

Matrix Results Identification Additional Tests

TABLEAU D'IDENTIFIC	ONPG	ADH	LEC	DEC	GIT	H2S	URE	TDA	IND	VP
<i>Abstraxibacter anatum</i>	9	9	0	0	66	0	9	0	0	9
<i>Bacillus anthracis</i>	85	0	0	0	75	0	0	0	0	50
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	1	1	50	1	1	1	1	99
<i>Bacillus cereus Type 1</i>	4	71	1	1	28	1	2	1	1	43
<i>Bacillus cereus Type 2</i>	1	52	1	1	54	1	2	1	1	30
<i>Bacillus cereus Type 3</i>	0	85	0	1	80	1	50	0	0	60
<i>Bacillus cereus Type 4</i>	0	2	0	1	99	14	0	0	0	99
<i>Bacillus circulans Type</i>	87	1	1	1	4	1	1	1	1	28
<i>Bacillus circulans Type</i>	80	2	0	0	30	4	4	0	4	30
<i>Bacillus coagulans Type</i>	73	19	1	1	1	1	1	1	1	57
<i>Bacillus coagulans Type</i>	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99
<i>Bacillus limos Type 1</i>	18	4	1	2	13	1	2	1	2	39
<i>Bacillus limos Type 2</i>	21	7	0	0	99	0	0	0	0	71
<i>Bacillus licheniformis Type 1</i>	98	0	1	0	25	0	30	0	0	25
<i>Bacillus licheniformis Type 2</i>	98	2	0	0	60	1	50	0	0	30
<i>Bacillus licheniformis Type</i>	99	91	1	1	48	1	15	1	1	83
<i>Bacillus licheniformis Type</i>	99	93	0	0	77	0	3	0	0	80
<i>Bacillus megaterium Type</i>	92	1	1	1	11	1	1	1	1	40
<i>Bacillus megaterium Type</i>	83	0	0	5	77	0	0	0	0	88
<i>Bacillus pasteurii Type</i>	43	56	6	0	93	0	18	0	0	99
<i>Bacillus pasteurii Type</i>	27	48	1	1	34	1	1	1	1	55
<i>Bacillus pasteurii Type 1</i>	99	1	1	1	40	1	1	1	1	86
<i>Bacillus pasteurii Type 2</i>	99	4	0	0	86	0	0	0	0	99
<i>Bacillus pasteurii Type</i>	1	1	1	1	3	1	1	1	1	3
<i>Bacillus pumilus Type</i>	1	0	0	0	60	0	25	0	0	43
<i>Bacillus pumilus Type</i>	12	1	1	1	23	1	32	1	1	17

Matrix File: C:\Users\VAIO\Desktop\Master Firmicutes\Api\Api 20E Bacille

Archive File

Figure 8. Tableau d'Excel Identification Programme (BIPWin).

6-3- Identification par *Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)*

ABIS en ligne est un outil de laboratoire pour l'identification bactérienne. Il est ouvert à l'usage du public (gratuit sur le net). Les résultats d'identification sont purement informatifs (Figure 9).

Les caractères métaboliques des micro-organismes peuvent varier au sein de l'espèce, par conséquent ne correspond pas entièrement aux modèles d'identification.

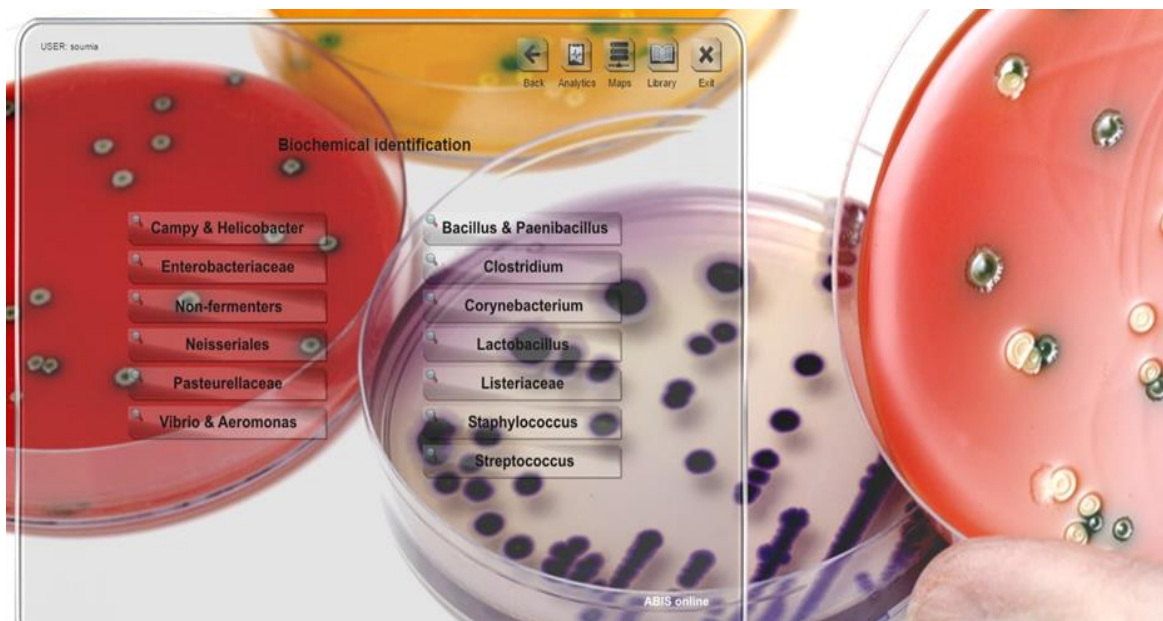


Figure 9. Programme d'identification ABIS en ligne.

1- Résultats de l'isolement

L'isolement des souches bactériennes est réalisé après avoir subi un traitement thermique à 80°C pendant 15 min. Les échantillons mère et les dilutions décimales ont été ensemencés sur le milieu TSA (Trypticase soja agar). Les résultats obtenus montre qu'aucune souche n'a été isolée dans certaines conditions extrêmes de température : à 70 et à 65°C (après 7 jours), et de salinité : en présence de 25% et de 30% de NaCl et de pH = 13 (même après 60 jours d'incubation), tableau 7.

Tableau 7. Résultats de l'isolement de différentes conditions.

Echantillons	Température			Salinité		pH
	70°C	65°C	60°C	30%	25%	13
1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-

(+) : Présence d'isolats, (-) : Absence d'isolats.

Echantillon 1: de El-Méniâa site (1). Echantillon 2: de El-Méniâa site (2). Echantillon 3: de El-Méniâa site (3). Echantillon 4: de Adrar. Echantillon 5: de In Amenas.

Plusieurs colonies (à Gram positif, qui ont une forme bâtonnet et capable de former des endospores) sont apparues après 7 jours d'incubation sur le milieu TSA à 60°C présentant des aspects microscopiques et macroscopiques différents. Nous avons obtenus quelques souches de *Bacillales* qui poussent dans les milieux incubés à 60 °C (Tableau 8).

Tableau 8: Résultats d'isolement des souches à 60°C du deux dilutions 10⁻¹ et 10⁻².

Echantillons	10 ⁻¹	10 ⁻²	Total
1	14	12	26
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	1	7	8

2- Résultats de l'identification phénotypique

L'identification phénotypique comprenant la morphologie des colonies, la forme, le Gram, la mobilité des souches et la production des endospores.

2-1- Caractérisation morphologiques

2-1-1- Aspect macroscopique

Les cultures obtenues sur les boîtes de Pétri sont observées à l'oeil nu pour caractériser la forme, la taille, l'aspect ainsi que la couleur des colonies (Badis *et al.*, 2006).

L'aspect macroscopique des souches sur milieu TSA montre des colonies de différente forme et taille (photo 1). Les résultats de l'examen macroscopique des souches sélectionnées à partir de In Amenas et El-Méniâa sont mentionnés dans le tableau 9.

Tableau 9. Résultats de l'aspect macroscopique des souches.

Souche	Taille	Forme	surface	Opacité	Relief	Elévation	Couleur
T101/10⁻¹	Petite (2 mm)	Punctiforme	Lisse et brillante	Opaque	Plate	Grasse	Crème
T101/10⁻²	Grosse (6 mm)	Lobée	Lisse et brillante	Translucide	Plate	Crémeuse	Crème
T51/10⁻¹	Petite (2 mm)	Ondulée	Lisse et brillante	Opaque	Plate	Crémeuse	Beige
T52/10⁻¹	Petite (2 mm)	Régulière	Lisse	Translucide	Plate	Sèche	Crème
T53/10⁻²	Petite (2 mm)	Régulière	Lisse	Transparente	Plate	Sèche	Crème

Les résultats sont conformes au traits généraux du genre *Bacillus* et autres genres proches, notamment les bacilles thermophiles décrits dans la littérature (Vos *et al.*, 2009) et (Madigan *et al.*, 2006).

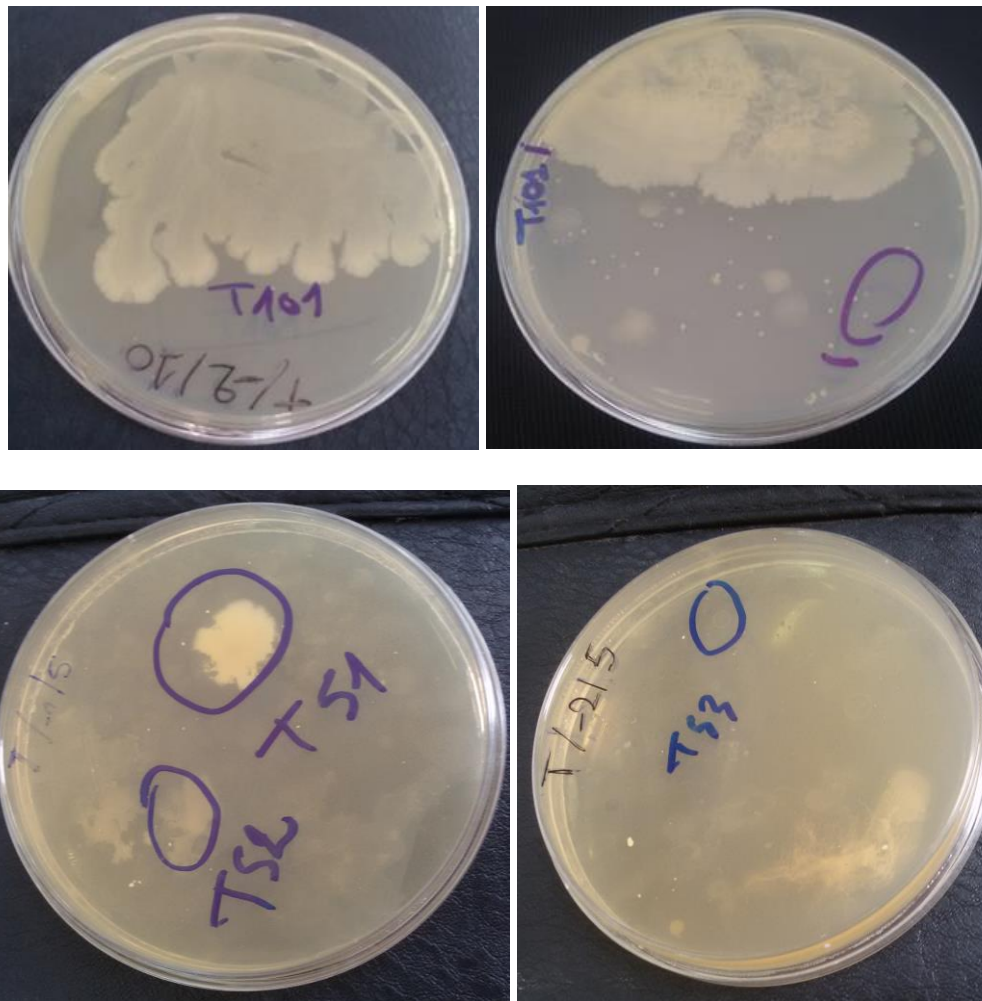


photo 1. Aspects macroscopiques des isolats sélectionnés sur milieu TSA après 7 jours d'incubation à 60 °C.

2-1-2- Aspect microscopique

La détermination de la morphologie, l'arrangement cellulaire, la mobilité ainsi que le Gram de la souche T101 ont été réalisés sur des souches jeunes. En revanche, la formation des spores a été observée sur des cultures âgées.

2-1-2-1- Examen à l'état frais

L'observation microscopique de l'isolat T101, après 7 jours d'incubation à 60°C sur le milieu TSA montre qu'il se présente sous forme d'un petit bâtonnet régulier mobile (photo 2).

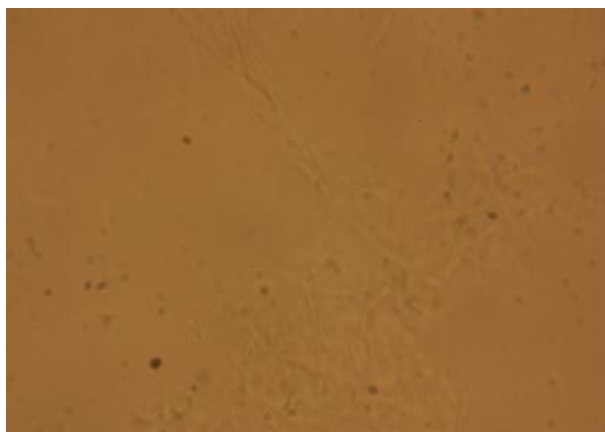


Photo 2. L'observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de l'état frais de la souche T101.

2-1-2-2- Coloration par bleu de méthylène

L'observation des cellules fixées après coloration par bleu de méthylène, montre que les colonies isolés et purifiés à partir de la souche T101 sont bacilles et la coloration permet la mise en évidence des endospores dans le corp bactérien (photo 3).

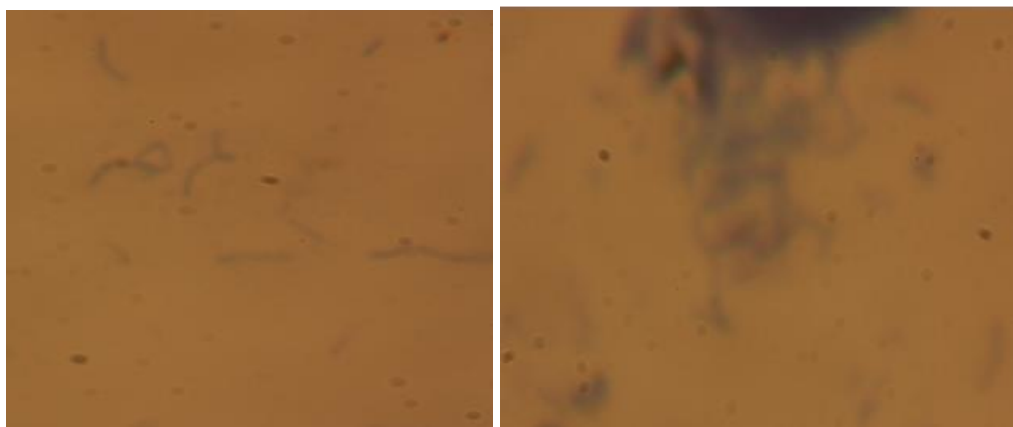


Photo 3. Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de coloration par le bleu de méthylène de la souche T101.

2-1-2-3- Coloration de Gram

La coloration de Gram d'une culture jeune a révélé que l'isolat T101 cultivée pendant 7 jours sur le milieu TSA à 60°C, révèle que les cellules sont des bacilles à Gram positif aux extrémités arrondies (photo 4).

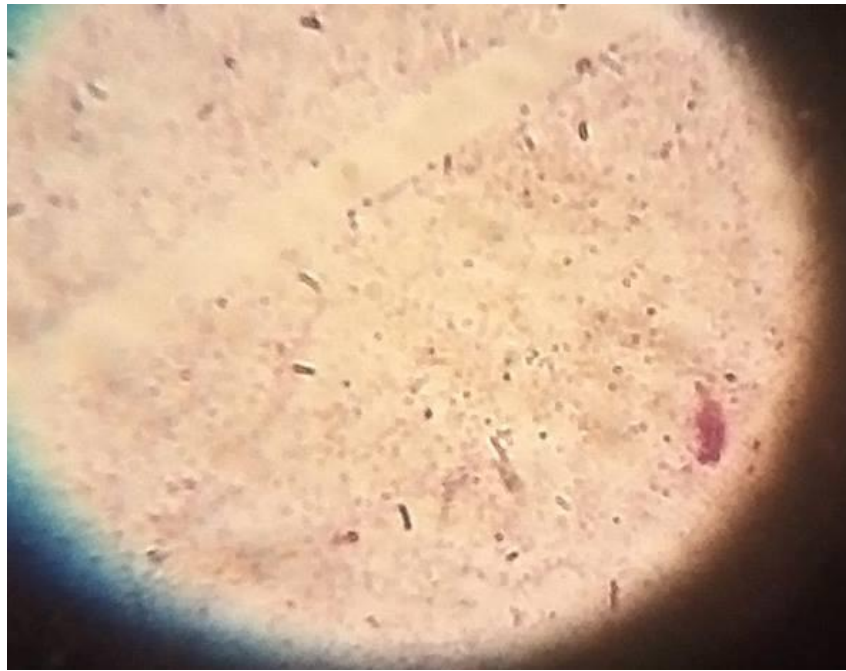


Photo 4. Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de la coloration de Gram de la souche T101.

2-1-2-4- Recherche de la spore

L'observation des cellules fixées après coloration par vert de malachite, montre également que les cellules se présentent sous forme d'un corps coloré à peine en vert à l'intérieur de la cellule, et donc la présence de la spore (photo 5).



Photo 5. Observation au microscope optique (grossissement X100 à immersion) de la spore après coloration au vert malachite de la souche T101.

2-2- Caractérisation physiologique

Les résultats obtenus de la caractérisation physiologique de l'isolat T101 se traduisent par la présence ou l'absence de la croissance.

2-2-1- Influence de la salinité

La souche isolée T101 cultivée sur bouillon nutritif (dans des tubes à vis) est incubée à 37°C durant 48 heures présente une croissance variant entre 0% et 10% (p/v) de NaCl (Tableau 10).

2-2-2- Effet du pH

L'intervalle de pH permettant la croissance de la souche T101 cultivée sur bouillon nutritif se situe entre 5 et 9 (Tableau 10).

2-2-3- Effet de la température

Dans le but de rechercher la température optimale de croissance, l'isolat T101 est incubé à pH 7 à différentes températures: 25, 37, 45 et 60°C. Le résultat obtenu révèle que la souche T101 est capable de croître de 25°C à 60°C. Les résultats de l'effet de la température sont mentionnés dans le tableau 10.

2-2-4- Effet de la congélation

Nous avons observé une croissance de l'isolat T101 sur le milieu de culture TSA même après une période d'incubation d'une semaine à -18 °C (dans un congélateur) (Tableau 10).

Tableau 10. Résume les gammes de toutes les conditions physico-chimiques permettant la croissance de la souche T101 avec les valeurs optimales.

	Concentration de NaCl (%)
Gamme	0 - 10 %
Optimum	0%
	pH de croissance
Gamme	5 – 9
Optimum	7
	Température de croissance (°C)
Gamme	25°C - 60°C
Optimum	25°C
	Congélation
La souche T101 résiste à la congélation pendant une semaine à -18°C.	

Il ressort de ces résultats que la souche T101 est capable de croître à des concentrations de NaCl allant de 0 à 10% (p/v) avec un optimum à 0 %, et à un pH situant entre 5 et 9 avec un optimum de croissance de pH 7, et à des températures comprises entre 25 et 60°C avec un optimum autour de 25°C, et à une congélation à -18°C.

2-3- Caractérisation biochimique

Les résultats des tests biochimiques de l'isolat T101 sont rassemblés dans le Tableau 11, et sont traduits par observation d'un changement de couleur (test positif) ou d'absence de changement de couleur (test négatif).

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

2-3-1-1- Test de la catalase

Le résultat du test de la catalase a montré que la souche isolée T101 est catalase positive (la réaction se traduit par le dégagement immédiat de bulles d'oxygène). Ce résultat confirme l'affiliation à priori de ses souches aux bactéries du genre *Bacillus* ou apparenté (Photo 6).



Photo 6. Résultat de la mise en évidence de catalase.

2-3-1-2- Nitrate réductase

Le test de nitrate réductase étudiée pour la souche T101 est positif. donc la souche possède la nitrate réductase et l'absence de coloration rouge indique que le nitrate est réduit par la bactérie jusqu'au stade azote (Photo 7).

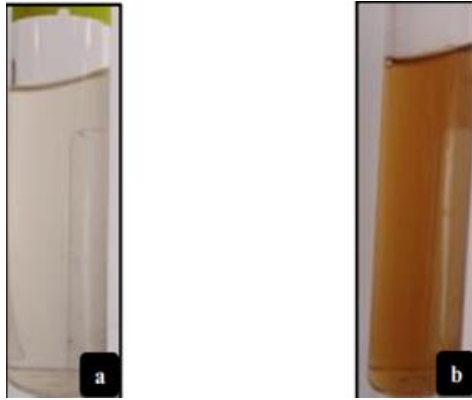


Photo 7. Résultat du test de la recherche de la Nitrate réductase sur bouillon nitraté après 24 heures d'incubation à 30°C (avant **(a)** et après **(b)** l'ajout de réactifs NIT I et NIT II).

2-3-1-3- Etude du type respiratoire

La mise en évidence du type respiratoire de la souche T101 sur une gélose profonde viande foie (VF), La culture de la souche T101 a montré une croissance à la surface qu'elle est aérobie stricte.

2-3-2- Test du mannitol-mobilité

C'est une gélose molle conditionnée en tubes et qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche. La souche qui a fermenté le mannitol a été matérialisée par un virage du milieu au jaune. La culture sur le milieu mannitol-mobilité provoque un virage de l'indicateur coloré et à envahi tout le milieu, cela indique que la souche T101 fermente le mannitol et confirme qu'elle est mobile (Photo 8).



Photo 8. Résultat de la mise en évidence le test Mannitol- mobilité

2-3-4- Utilisation de citrate sur le milieu au citrate de Simmons

Le résultat observé montre que la souche T101 n'a pas assimilé le citrate comme seule source de carbone et d'énergie, et le test est donc négatif (coloration verte de milieu reste inchangée) (Photo 9).



Photo 9. Résultat du citrate de Simmons négatif.

2-3-5- Recherche des métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

La souche T101 réagit négativement au test du rouge de méthyle, indicateur de la production d'acides mixtes, et également au test du Voges-Proskauer, indicateur de la production d'acétoïne par fermentation du glucose (Photo 10).



Photo 10. Résultat du test VP (-) et du test RM (-).

Tableau 11. Résultats de différentes tests biochimiques de la souche isolée T101.

Caractéristiques biochimiques	Résultats
Recherche de la catalase	+
Réduction de nitrate	+
Type respiratoire	Aérobie stricte
Mannitol mobilité	+
Utilisation de citrate	-
Recherche de métabolite formé à partir de l'acide pyruvique	VP (-) RM (-)

(+) : Présence de croissance. (-) : Absence de croissance.

2-3-6- Résultats de la plaque API 20^E

Les tests biochimiques ont été réalisés par l'utilisation de la plaque Api 20^E. Les résultats des différents caractères biochimiques de la souche T101 par la galerie sont résumés dans le tableau 12 et les virages colorés sont montrés dans la photo 11 et 12.

Tableau 12. Résultats de tests biochimiques dans la plaque API 20^E de la souche T101.

Tests du système API 20 ^E			
ONPG	+	GEL	+
ADH	+	GLU	-
LDC	+	MAN	+
ODC	+	INO	-
CTT	-	SOR	-
H2S	-	RHA	-
URE	+	SAC	-
TDA	-	MEL	-
IND	-	AMY	-
VP	-	ARA	-

ONPG: Ortho Nitro Phényl-βD-Galactopyranosidase. ADH: Arginine dihydrolase. LDC: Lysine Décarboxylase. ODC: Ornithine Décarboxylase. CTT: Citrate. H2S: Sodium Thiosulfate. URE: Uréase. TDA: Tryptophane Désaminase. IND: Production d'Indole. VP: Voges-Proskauer (Production d'acétoïne).

GEL: Gélatine. GLU: D-glucose. MAN: D-mannitol. INO: Inositol. SOR: D-sorbitol. RHA: L-rhamnose. SAC: D-saccharose. MEL: D-melibiose. AMY: Amygdaline. ARA: L-arabinose.



Photo 11. Plaque Api 20^Eensemencée par la souche T101 (avant incubation).



Photo 12. Résultats des caractères biochimiques, de la plaque Api 20^Eensemencée par la souche T101 (après 3 jour d'incubation à 30°C).

3- Interprétation probabilistique de profil biochimique

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API 20^E avec la souche T101 sont introduits dans la grille des résultats du Programme (EIP), Programme (ABIS online) et le (BIPWin).

Lors de l'introduction du grille d'identification, les programmes engendre une comparaison entre les résultats de la souche T101 avec la matrice disponible sur les banques de données de *Bacillus* sont montré dans le tableau 13.

3-1- Identification par *Excel Identification Program (EIP)*

Excel Identification Program (EIP) suggéré que la souche T101 est une *Bacillus sphaericus*/*Bacillus fusiformis*/*Bacillus badius* à une probabilité de 69,3% (Photo 13).

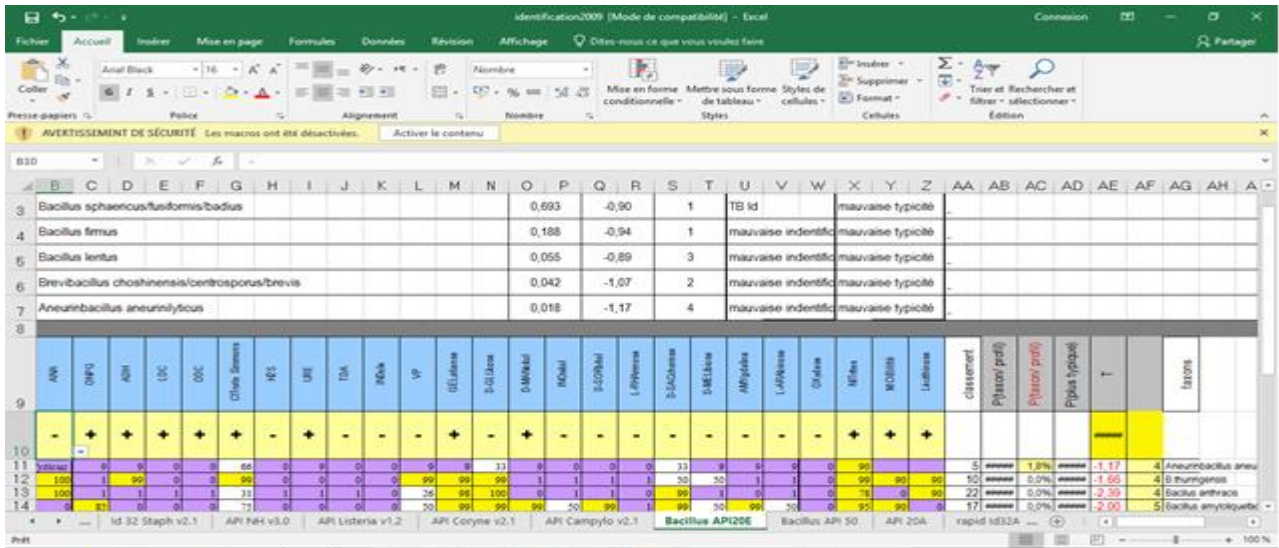


Photo 13. Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (EIP).

3-2- Identification par *Advanced Bacterial Identification Software (ABIS online)*

ABIS online identifie la souche isolée T101 comme *Bacillus coagulans* à une probabilité de 68%, et comme *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus glucanolyticus* à une probabilité de 67% (Photo 14).

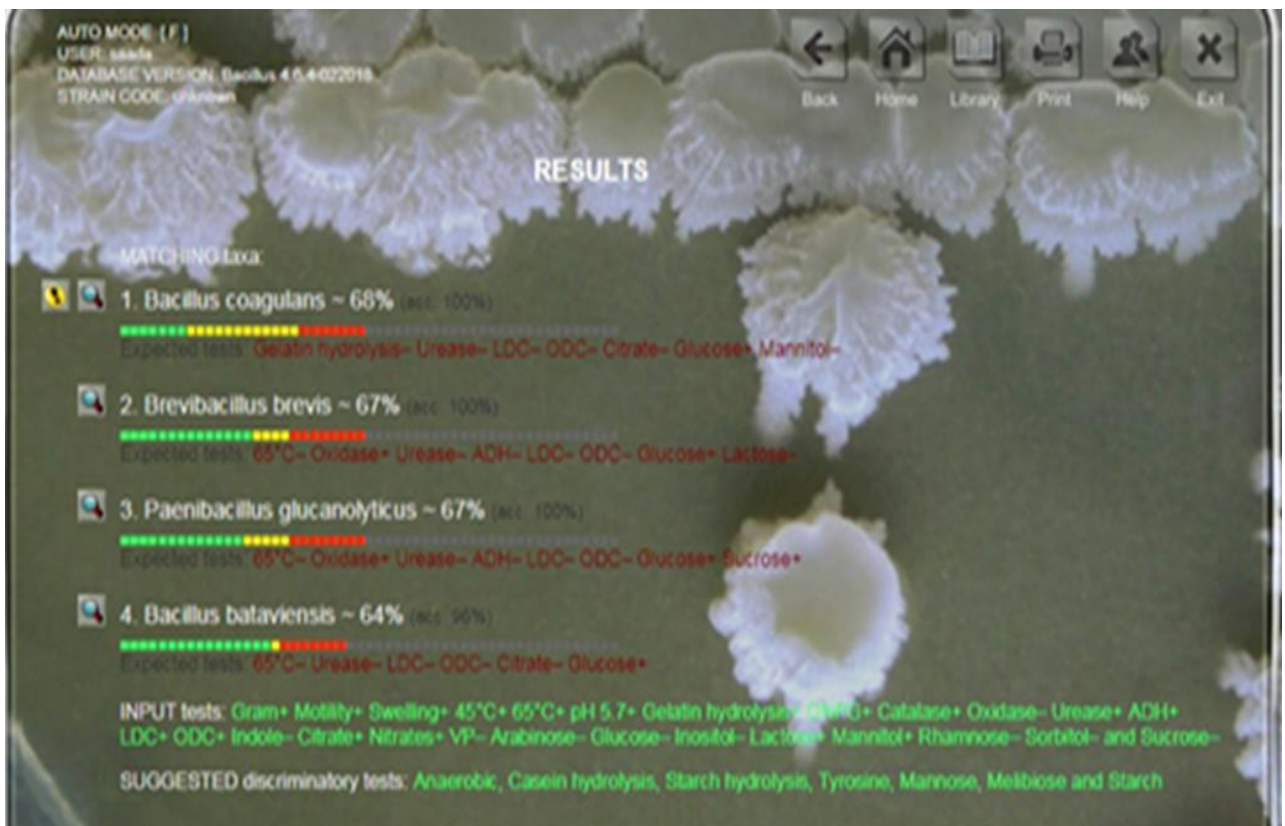


Photo 14. Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (ABIS).

3-3- Identification par *Bacterial Identification Program* (BIPWin)

Le programme BIPWin identifie la souche isolée T101 comme *Bacillus firmus* type1 à une probabilité de 100% (Photo 15).

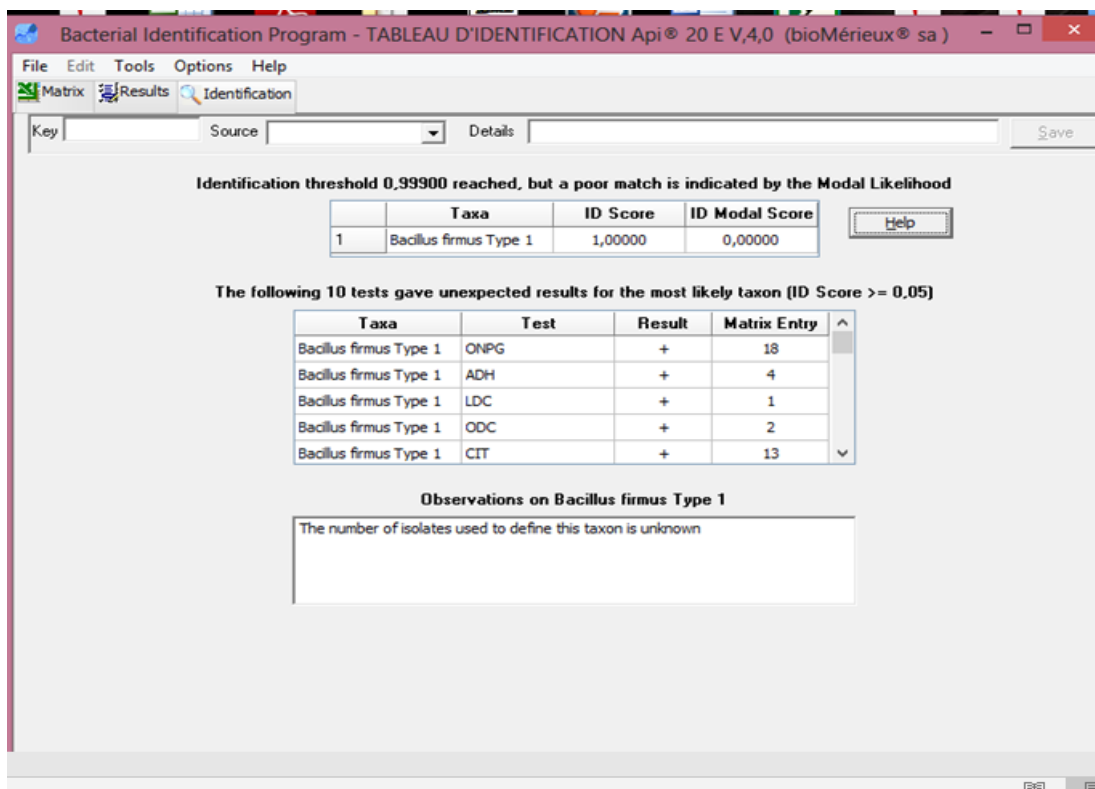


Photo 15. Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche T101 Par le programme (BIPWin) .

Tableau 13. Résultats d'identification de la souche T101 par les programmes (EIP, ABIS online, BIPWin).

Programme	Bactérie	Score d'identification
EIP	<i>Bacillus sphaericus, Bacillus fusiformis, Bacillus badius</i>	69,3%
ABIS online	<i>Bacillus coagulans</i>	68%
	<i>Brevibacillus brevis, Paenbacillus glucoanolyticus</i>	67%
BIP Win	<i>Bacillus firmus</i> type1	100%

4- Discussion

L'objectif de ce présente travail est un screening des *Bacillales* extrêmophiles isolés de trois régions sahariennes différentes (Adrar , In Amenas et El-Méniâa). Pour identifier les isolats on se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, culturales et biochimiques.

Dans le but d'isoler des *bacillales* extrêmophiles caractérisés par une thermo résistance de leur spores, les échantillons a été soumise à un traitement thermique afin de détruire toute les formes végétatives.

En effet, cette stratégie a fait preuve d'une grande efficacité. En observant les boites de Pétri lors du screening, un nombre important des colonies de *Bacillus* ou genres apparentés a été obtenu. Ce constat est on accord avec les résultats de Hamilton *et al.* (1999) qui rapportent un pourcentage allant à 95% de réussite du traitement thermique comme stratégie d'isolement du genre *Bacillus* et genres apparentés.

Le screening à été réalisé sur le milieu TSA à la base de critères morphologiques et microscopique, c'est-à-dire bâtonnets et Gram positif capable de former des spores (Beric *et al.*, 2012), a l'instar de ces critères, la souche est retenue et ont fait l'objet :

- D'une étude des caractéristiques morphologiques.
- D'une étude des caractéristiques culturales.
- Et enfin une étude des caractéristiques biochimiques.

Selon le *Bergey's manual of systematic bacteriology*, les caractéristiques décrites précédemment représentent les traits typiques des espèces appartenant au genre *Bacillus* ou apparentés.

Le milieu TSA utilisé pour l'étude d'une large panoplie des micro-organismes thermophiles aérobies appartenant à plusieurs groupes taxonomiques (*Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*, etc.) (Gomri, 2012).

Le criblage primaire des bactéries extrêmophiles (*bacillales*) à 60°C sur le milieu de culture TSA a permis l'isolement de 34 souches. Un nombre de 26 souches ont été isolées du sol saharien de la région d'El-Méniâa et un nombre de 8 souches ont été isolées du sol saharien de la région In Amenas.

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).

Tous les souches sélectionnées sont des bactéries à des aspects différents capables de pousser à 60°C pendant 7 jours sur milieu TSA, de forme régulière, ondulée, plate et lisse, de couleur beige, Crème et de diamètre entre 2 et 6 mm. Ces aspects macroscopiques différents des

colonies isolées des deux régions El- Méniâa et In Amenas. 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.

La souche choisie dans ce travail pour l'étude morphologique, physiologique et biochimique est la T101. L'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique a montré que le isolat T101 est des bacilles à Gram positif et une observation microscopique à l'état frais suivie par une identification phénotypique a permis de révéler que la souche isolée du sol de In Amenas se présente sous forme de petit bâtonnet régulier mobile, à extrémités arrondies.

L'isolat T101 est mobile, catalase positive, et capable de former les endospores, et le type respiratoire aérobie stricte incapable de se développer en absence de dioxygène O₂, c'est le cas de la plupart des isolats bactériens thermophiles et hyperthermophiles (Nazina *et al.*, 2001; Khalil, 2002).

Par ailleurs, la plupart des bactéries aérobies formatrices d'endospores décrites sont chimioorganotrophes appartenant à divers groupes phylogénétiques. Elles sont capables de se développer sur des milieux usuels et simples comme la gélose nutritive ou la gélose trypticase soja. Cependant, certains isolats, particulièrement ceux issus des environnements pauvres en nutriments, comme les sources chaudes terrestres, ont une croissance médiocre sur ces milieux de culture «standard», en raison de l'inadaptabilité de ces milieux (pH, salinité et composition du milieu) (Logan et Allan, 2008).

D'autre part, nous avons remarqué que la souche T101 a fermenté le mannitol ce qui engendre la formation des acides mixtes (acidification du milieu) et qui a été matérialisée par un virage de la coloration rouge au jaune. En ce qui concerne la mobilité, nous avons observé que la bactérie a diffusé à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, ce qui révèle la présence de flagelles, et donc cette bactérie est mobile.

Ainsi que pour le test citrate de Simmons qui est un milieu synthétique où la seule source de carbone est le citrate. Seules les bactéries autotrophes sont capables de croître en présence de citrate comme seule source de carbone minérale et d'alcaliniser le milieu mais dans ce travail on montre la souche T101 n'a pas de croissance et elle est incapable d'utiliser le citrate comme seule source de carbone, et donc la bactérie est hétérotrophe et nécessite une source de carbone organique (comme la majorité absolue des *Bacillales*).

Des études antérieures ont montré la capacité des bactéries thermophiles à croître sur le glucose et/ou les autres sucres comme unique source de carbone et d'énergie, c'est le cas des espèces du genre *Geobacillus*. Les sources organiques et inorganiques d'azote (sels d'ammonium, urée et acides aminés) sont également utilisées (Nazina *et al.*, 2001; Marchant *et al.*, 2002).

L'étude physiologique de la souche sur milieu TSA à différentes conditions physico-chimiques (salinité, pH et température) montre que la souche T101 pousse à un intervalle de 0% à 10% NaCl. Selon les définitions de Larsen (1962) et de Kushner (1993) la souche T101 est considérée respectivement, une bactérie d'halophiles légères et modérées. C'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs et halotolérants isolés à partir des différents habitats salins tels que les lacs salés, les aliments salés et les estuaires d'eau (Ventosa *et al.*, 1989; Arahall *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2004) et qui ont été affiliés au genre *Bacillus* comme par exemple l'espèce *Bacillus bagoriensis* isolée à partir d'un lac de soude au Kenya (Vargas *et al.*, 2005), l'espèce *Bacillus okhensis* isolée à partir d'un lac salé en Inde (Nowlan *et al.*, 2006), et l'espèce *Bacillus solisalis* isolée à partir d'un sol salé autour du lac salé de Yuncheng en Chine (Liu *et al.*, 2009) ou peut être affilié à d'autres genre proche du *Bacillus*.

L'intervalle de température explorée varie de 25 à 60°C. L'isolat T101 tolère des variations de températures de 25 à 60°C et sont aussi capables de croître à 60°C (Tableau 10). Il s'agit donc d'une bactérie thermotolérante comme les *Geobacillus* spp.

Des études antérieures ont montré les résultats obtenus de la température de croissance des bacilles thermophiles est 25 à 45°C elle est inférieure à leur température optimale de croissance 60°C. Ces résultats confirment ceux obtenus par les autres études (Batahri, 2015; Benyahia; 2013, Chouiti; 2013).

L'évaluation de la croissance de la souche T101 à différents pH (5 à 9) montre que la souche tolère des pH alcalins (c'est une bactérie de acido-alcalinophile), ce qui a été déjà montré par Fritze (1996) qui a confirmé que les espèces du genre *Bacillus* ou apparentés sont capables de se développer à des pH alcalins tels que *Bacillus pantothenicus* qui croît à un pH optimum de 9. Ces résultats sont en corrélation avec les observations de Ventosa (1990), qui a isolé une espèce du genre *Bacillus* à partir d'un lac salé au Japon *Bacillus halophilus* qui pousse à des pH de 6 à 8 avec un optimum de 7.

Pour les autres tests biochimiques, ils ont été réalisés en utilisant la galerie API 20^E. En se basant sur leur réponse aux différents tests physiologiques et biochimiques, ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification. Plusieurs études ont montré que les meilleurs tests pourraient être réalisés avec des plaques API 20^E qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie des *Bacillales* (De vos *et al.*, 2009).

D'après les données ainsi obtenues par le système API 20^E, nous pouvons déduire les caractéristiques suivantes pour la souche isolée T101 possèdent la β -galactosidase, l'arginine dihydrolase, la gélatinase, l'uréase, l'enzyme qui dégrade le mannitol, la lysine décarboxylase,

l'ornithine décarboxylase. En revanche, nous avons remarqué l'absence de tryptophane désaminase et il y a pas production d'indole et le H₂S.

L'isolat T101 est incapable de dégrader le glucose, le rhaminose, le saccharose, le melibiose, l'amygdaline, le sorbitol, l'inositol et l'arabinose.

La souche étudiée n'a pas la capacité de produire l'acétoïne et n'a pas la capacité a dégrader le citrate comme source de carbon.

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API 20^E avec la souche T101 sont introduits dans la grille des résultats des programmes Bip Win, EIP et ABIS online pour l'interprétation probalistique de profil biochimique.

Lors de l'introduction du gille d'identification, les programmes engendre une comparaison entre les résultats de la souche T101 avec la matrice disponible sur les banques de données de *Bacillus*.

Le programme BipWin est suggère que la souche T101 est une *Bacillus firmus* type1 avec un score d'identification de 100%. Tifirt (2016) à utilisé le programme BipWin qui a permis l'identification de la souche isolée à partir le Oued Mekerra de Sidi Bel Abbès comme étant *Bacillus subtilis* avec un score d'identification égale à 0,99949 (99%).

Les programmes EIP et ABIS online sont suggeré que la souche T101 est une *Bacillus sphaericus* ou *B. fusiformis* ou *B. badius* ou *B. coagulans* avec un score d'identification de 69,3% et 68% respectivement.

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 des spores de résistance dans les conditions défavorables.

La majorité des taxons au sein de la famille *Bacillaceae* sont capable de former des endospores, bacilles à Gram positif, aérobies stricte et catalase positive. Nous supposons que notre souche T101 positionnés dans le genre *Bacillus*.

Les thermophiles ont, au cours de l'évolution, développé des stratégies adaptatives très variées. Ils présentent de ce fait un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant non seulement de survivre dans des conditions extrêmes, mais aussi de se développer souvent de manière optimale dans des niches écologiques extrêmes. Les propriétés singulières de certaines de ces biomolécules suscitent de ce fait l'intérêt des chercheurs (Guezennec, 2002).

Les travaux publiés par Oliver *et al.* (2015), sur les environnements thermophiles tels que les sols désertiques, montrent une diversité remarquable des taxons microbiens.

Les travaux publiés par Oliver *et al.* (2016), sur les classification et caractéristiques de la souche de *Thermoactinomyces* qui a été isolée à partir d'un échantillon de Sebkhah de la région de Thamelahat en Algérie. Cet isolat est un bacille à Gram positif, aérobic, thermophile, appartenant à l'ordre des *Bacillales*. Cette souche s'est développée dans des milieux liquides à des valeurs de pH de 5,6 à 8,6, mais une croissance optimale s'est produite à un pH de 7,2 et de croissance de température comprise entre 40 et 65°C.

L'identification par les programmes BipWin, EIP et ABIS online sont des probabilités et la meilleure identification utilisé le séquençage du gène codant la sous-unité 16S RNA offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région persiste très stable et à l'abri des mutations (Emanuel *et al.*, 2009). De nombreuses études ont accordé une importance spéciale à l'identification génétique des bactéries (Adley *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans les micro-organismes thermophiles et hyperthermophiles, le genre *Bacillus* est considéré parmi les principaux éléments dans le domaine de la biotechnologie grâce à sa capacité de produire et sécréter des différentes molécules et en grande quantité telles que les enzymes extracellulaires, les antibiotiques, les polysaccharides et d'autres molécules de nature diverse.

Notre étude a confirmé que la bactérie T101 résisté le traitement thermique à 80 °C pendant 15 min à cause de presense des spores. A partir du 34 isolats parmi les différents échantillons de sol des trois régions sahariennes (Adrar, In Amenas et El Méniâa) et à travers l'observation macroscopique et microscopique a révélé que la souche présentent des critères de sélection des *Bacillus* c'est-à-dire des bâtonnets à Gram positif capable de former des spores, possédant la catalase et aussi a été révélé l'étude physiologique sur états frais qu'il s'agit de souche halophile modéré a extrêmement halotolérante, mésophile a légèrement thermotolérante, sporogène.

Les testes biochimiques et les programmes (EIP), (ABIS online) et (BIPWin) jouer un rôle majeur dans la détermination de l'identité et du type de bactéries T101.

Pour nos perspectives de recherches au futur:

- l'étude phylogénétique des souches.
- Identification de la souche par le séquençage de ARN16S.
- Nous comptons aussi dans l'avenir optimiser les paramètres de culture des souches afin d'améliorer leur production de biomolécules à potentiel biotechnologique important.
- La recherche et la purification et l'analyse des enzymes produits par isolat pour l'utilisation en biotechnologie.
- La recherche de nouvelles espèces à partir de la même source qui a étudié (les trois région saharien) .

A

- **Adley, C., Khalil, A., Camila, M., Kamila, O., Vijayalakshmi, V. (2009).** - Design of specific DNA primers to detect the *Bacillus cereus* group species. Sensors Applications Symposium. 9:17-19.
- **Aissaoui, N. (2013).** - Etude de molécules d'antibiotiques bio synthétisées par une bactérie extrêmophiles issue d'une sebkha Algérienne d'El-Goléa, mémoire de diplôme d'Etat de Master en Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie.
- **Amend, J.P., Rogers, K. L., Shock, E. L., Gurrieri, S. and Inguaggiato, S., (2003).** - Energetics of chemolithoautotrophy in the hydrothermal system of Vulcano Island, southern Italy. *Geobiology*; 1: 37-58.
- **Ameur, H. (2014).** Effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de *Streptomyces* et de plantes d'intérêt agricole sur sol salé ou aride, mémoire de diplôme d'Etat de l'obtention du diplôme de doctorat en Microbiologie, université de Sétif 1, Algérie.
- **Abbas, A. A. (2014).** Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*, mémoire de diplôme d'Etat de l'obtention de doctorat en Biotechnologie et Microbiologie, université d'Avignon et pays de Vaucluse.
- **Achouri, Y. (2017).** Isolement et caractérisation microbiologique des bactéries formant des spores à partir du lait UHT, mémoire de diplôme d'Etat de l'obtention de master en technologie des industries agro-alimentaires, universite Abou bekr belkaid- Tlemcen, Algérie.
- **Andrew, F., Layton, A., Mailloux, B., Culligan, P., Williams, D., Smartt, A., Sayler, G., Feighery, J., McKay, L., Knappett, P., Alexandrova, E., Arbit, T., Emch, M., Escamilla, V., Ahmed, K. M., Alam, Md. J., Streatfield, P. K., Yunus, M., van Geen, A. (2012).** - Comparison of fecal indicators with pathogenic bacteria and rotavirus in rural Bangladesh groundwater. *Science of the Total Environment*, 431, 314-322.
- **Arahal, D. R., Marquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H. & Ventosa, A. (1999).** - *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *Int J Syst Bacteriol* 49, 521–530.

B

- **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2006).** - Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales (Arabia et Kabile). *Inoscien.tech.* 23: 3037.

- **Baker-Austin, C. and Dopson, M. (2007).** - Life in acid: pH homeostasis in acidophilic, Trends in Microbiology, 15: 165-171.
- **Batahri, N. I. (2015).** - Propriété d'adhésion et pouvoir enzymatique des bacilles thermophiles isolés du lait liquide et en poudre, Mémoire De Diplôme D'état De Magister En Microbiologie, Université De Tlemcen, Algérie.
- **Ben Abdalla, A.M. (2014).** - Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkha D'Oran (caractérisation phénotypique), Mémoire de Diplôme d'Etat de Master en Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie.
- **Bouhafs, M. et Bousseboua, A. R. (2016).** - Recherche et identification des *bacilles* thermophiles facultatifs en industrie laitière, mémoire de diplôme d'Etat de Master en Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie.
- **Brock, .T. D., (1986). Kelly, R. M., Peeples, T. L., Halo, S. B., Rinker, K. R., Duffaud, G. D (1994) in: Fandi Khalid., Massadeh Muhanad., Laatsch Hartmut. (2012).** - LC-MS/MS Profihing-based Metabolite Screening of thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs. International Conference on Applied Chemistiy and Pharmaceutica! Sciences.
- **Brock, T.D., et Freeze, H., (1969).** - *Thermus aqualicus* genre. And non sporulating extreme thermophile. J. Bacterioi., 98 p. 289-297.
- **Burgess, S.A., Lindsay, D., and Steve, H. Flint.(2010)** - Thermophilic *bacilli* and their importance in dairy processing. International journal of food microbiology 144.2: 215-225.

C

- **Chouiti, F. (2013).** - Recherche et caractérisation des *bacilles* thermophiles dans le lait pasteurisé de vache et le lait recombinaé, mémoire de diplôme d'Etat de Master en Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie.
- **chesbrough, H. (2006).** - Open Innovation : a new paradigm for understanding industrial innovation, in open innovation /Resarching anew paadign, oxford univerity press, H, chesbroug, w .vanhoverbeke and j. west, Eds, p. 1-12.
- **Cilia, V., Lafay, B., and Christen, R. (1996).** - Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. Mol. Biol. Evol., 13, 451–461.
- **Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S. Jr., Bult, C. et Fields, C. (1995).** - Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokalyotic taxa. Int. 1. Syst. Bacteriol. 45: 595 - 599.

D

- **Davet, P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétal. INRA. (ed.), Paris.
- **Denis, F., Ploy, M.C., Martin, C., Bingen, E. et Quentin, R., (2007).** Bactériologie médicale Techniques usuelles. Elsevier Masson, Paris, France.
- **Deng, A. H., Sun, Z. P., Zhang, G. Q., Wu, J., Wen, Y. (2012).** Rapid discrimination of newly isolated *Bacillales* with industrial applications using Raman spectroscopy. Laser physics letters. Volum 9. Number 9.
- **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, 2 Méditation., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume Three. 63-67.

E

- **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.

F

- **Fritze, D. (1996).** - *Bacillus* haloalkaliphilus sp. nov. Internation Journal of Systematica Bacteriology, 98 -101.

G

- **Gareeb, A.P. and Setati, M.E. (2009).** - Assessment of alkaliphilic haloarchaeal diversity in Sua pan evaporator ponds in Botswana. African Journal of Biotechnology; 8: 259-267.
- **Garrity, G. M. et Holt, J. G. (2001).** - The road map to the manual. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Springer, New York. 1: 119 - 141.
- **Geneviève, F. (2008).** - Détection rapide de spores de *Bacillus cereus* par hybridation in situ en fluorescence. Thèse présenté à l'Université Laval Québec.
- **Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R. (1994).** - Methodes for General and Molecular Bacteriology. Washing ton, DC :American society for Microbiolog.
- **Girard, H., Rougieux, R. (1967).** - Techniques De Microbiologie Agricole. 2eme édition DUNOD PARIS 215 p.

- **Gobat, J. M., Aragno, M. et Matthey, W. (2003).** - Le sol vivant. Bases de pédologie – Biologie des sols. 2e éd. revue et augmentée. Coll. Gérer l'environnement. Les Presses de l'Université de Montréal Volume. 57, numéro 2-3.

- **Gomri, M. A. (2012).** - Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des souches bactériennes aérobies thermophiles isolées à partir de sources thermales terrestres de l'Est algérien. université mentourl-constantine Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (JNATAA) Département de Biotechnologie alimentaire.

- **Guezennec, J. (2002).** - Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest. J. md. Microbiol. Biotechnol. 29: 204-208.

- **Guiraud, J.P. (2012).** - Microbiologie alimentaires, collection Industries agroalimentaires.

- **Guiraud, J.P (1998).** - Microbiologie des principaux produits alimentaires ;in Guiraud J.P. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. pp: 136-139.

H

- **Hamilton, L. M., Kelly, C. T., Fogarty, W. M. (1999).** Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. Biotechol Lett 21: 111- 5.

- **Harley, J. P. et Prescott, L. M. (2002).** - Laboratory Exercises in Microbiology, Fifih-Edn. 449 p.

- **Hazem, A., Al-Quadani, F., Tahani, K. Y. (2009).** - Characterization of Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS7I. European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X Vol.31 No.2, pp. 280-288.

- **Horikoshi, K., (2006).** Alkaliphiles: Genetic Properties and Applications of Enzymes. Springer, Berlin, Germany.

- **Horikoshi, K. (1999).** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63: 735–750.

I

- **Irwin, J. A., Baird, A. W. (2004).** - Extremophiles and their application to veterinary medicine. Irish Veterinary Journal. Volume 57 (6).

J

- **Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A. (1973).** Microbiologie médicale. Paris. p : 254.

K

- **Khalil, B. (2002).** - Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* species from thermal ponds in Jordan. Pakistan journal of biological sciences 5(11): 1272-1273.
- **Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M. et Schmidt, T. M. (2000).** - rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1328 - 1333.
- **Koch, R., (1876).** - Founded on the course of development of *Bacillus anthracis*. The etiology of anthrax. In: Carter KC. Greenwood press ; p.1 - 17.
- **Kristjansson, J.K., Hreggvidsson, G.O., (1995).** Ecology and habitats of extremophiles. World Journal of Microbiology and Biotechnology; 11:17-25.
- **Kushner, D.J., (1993).** - Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton, CRC Press.

L

- **Larsen, H., (1962).** - Halophilism. In: Vreeland R.H. and Hochstein L. I. (ed) The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton, CRC Press .
- **Leyral, G. and Vierling, E., (2007).** - Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques. Wolters Kluwer ,France.
- **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.
- **Loison, P. (2013).** - Etude de la spore de *Bacillus subtilis*: caractérisation des structures impliquées dans sa résistance. Université de Bourgogne.
- **Logan, N.A., Allan, R.N. (2008).** - Aerobic, endospore-forming bacteria from antarctic geothermal soils in microbiology of extreme soils. Soil Biology; 13: 155-173.
- **Logan, N. A. et Berkeley, R. C. W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using API system. 1. Gen. Microbiol. 130 : 1871 - 1882.
- **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.
- **Ludwig, W., Schleifer, K.H. and 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. and Whitman W.B. (ed): Bergey's manual of systematic bacteriology vol 3, 2n EDT. Springer, New York, USA.

- **Lund, E. and John, W., (2007).** - Characteristics, development and utilization of geothermal resources. Q. Bull; 28: 1-9.

- **Lynn, k ., Feranandez, A., Aida, M., Sedbrook, j., Jasaka ,M., Masson, P. and Barton, M.K.(1999).** - The Pinheadizwille gen acts pleiotropically in Avabidopsis developpent and has overlopping function withe the argonaute gene. development, 126, 1-13 .

M

- **Madigan, M.T. and Martino, J.M., (2006).** Brock Biology of Microorganisms, 11th ed.; Pearson Education. Upper Saddle River, NJ, USA. 136.

- **Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba. (2000).** - Environmental microbiology, p. 79-82. Microorganisms in surface soils. In. Acadimic press. A Harcourt sciencead technology company. Canada.

- **Mandic-Mulec, I., Stefanic, P., Van Elsas, J. D. (2015).** - Ecology of *Bacillaceae*. Patrick Eichenberger, New York University, New York, NY, and Adam Driks, Loyola University Medical Center, Maywood, 7, 24.

- **Marchal, N., Bourdon, J-L., Richard, Cl. (1991).** - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries. 3éme Ed., Doin éditeurs, Paris.

- **Marchant, R., Banat, I. M., Rahman, T.J., Berzano, M. (2002).** - The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. Environmental Microbiology 4, 595–602.

- **Martínez-Murcia, A. J., Anton, A. I., and Rodriguez-Valera, F. (1999).** - Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 601–610.

- **Menzel, U. and Gottschalk, G. (1985).** - The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid, Archives of Microbiology, 143: 47-51.

- **Morozkina, E. V., Slutskaya, E. S., Fedorova, T. V., Tugay, T. I., Golubeva, L. I. and Koroleva, O. V. (2010).** Extremophilic microorganisms: Biochemical adaptation and biotechnological application. Appl. Biochem. Microbiol., 46: 1-14.

N

- **Nas, F. (2013).** -Étude de molécules antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrêmophile B1 isolée d'une sebkha d'EL Goléa (Algérie), Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en Microbiologie Appliquée, Université de Tlemcen, Algérie.

- **Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunvaka, V.V., Osipov, C.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V. (2001).** -Taxonomic study of aerobic thermophilic *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. thermoleovorans*, *G.kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int., J., Syst., Evol., Microbiol., 51:433-446.

- **Nicholson, W.L., Law, J.F., (1999).** - Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of *Bacillus spp.* with reference to *B-subtilis* strain 168. Journal of Microbiological Methods 35, 13-21.

- **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. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 56: 1073–1077.

O

- **Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L. and Mah, R. A. (1994).** - Anaerobic bacteria from hypersaline environments. Microbiology Reviews 58, (1), 27-38.

- **Oliver, K. I., Gomri, M. A. Pierneef, R., Marc, W. Van Goethem, V., Kharroub, K., Don, A., Thulani, P., Bezuidt, M. (2016).** - Draft genome sequence of *Thermoactinomyces sp.* strain AS95 isolated from a Sebkhah in Thamelah, Algeria. Microbiology Reviews.

P

- **PERTY, (1852).** - Zur Kenntnis kleinster Lebensformen. (Quoted by Matzschita 1902, and by Migula, 1897, System der Bakterien).

- **Ponce, C. R., Lomber, S.G., Born, R. T. (2008).** - Integrating motion and depth via parallel pathways. *Neurosci.* P. 216 - 223.

- **Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (2010).** - Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088.

Q

- **Quérellou, J., Guézennec, J. (2013).** - Biotechnologie des extrmophile. 7200092269 - cerist //193.194.76.5.

R

- **Roger, P. et J. L. Garcia. (2001).** - Introduction à la microbiologie du sol. Acad. Press Inc. 15-32.

S

- **Sarethy, I. P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S. K., Gupta, V. and Gupta, S. (2011).** - Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38:769 – 790.

- **Satyanarayana, T., Raghukumar, C. and Shivaji, S., (2005).** - Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*; 89: 78-90.

- **Shivanand, P. and Jayaraman, G., (2009).** - Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* ; 10: 1088-1094.

- **Singleton, P., (1999).** - Spore heat Resistance Correlated with water content, wet density, and protoplast/ sporoplast volume ratio. *Journal of bacteriology* 150(2), 870-877.

- **Stackebrandt, E. et Goebel, B. M. (1994).** - Taxonomie note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Baeteriol.* 44 : 846 - 849.

- **Sundararajan, S., Kannan, C. N., Chittibabu, S. (2011).** - *Biosci. Bioneng.* 111. 128 – 133.

- **Stammen, S., Muller, B. K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E, Jahn, D. (2010).** *Appl. Environ. Microbiol.* 76 4037 – 4046.

T

- **Tifrit, A. (2016).** - Isolement et caractérisation des bactéries à intérêts biotechnologiques à partir de niches écologiques Algérienne, mémoire de diplôme d'Etat de l'obtention du diplôme de doctorat en Microbiologie, Université de Chlef, Algérie.

- **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.

U

- **Ulrih, N.P., Gmajner, D. and Raspor, P., (2009).** - Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology* ; 84:249-260.

V

- **Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K et Swings, J. (1996).** - Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60 : 407 - 438.

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

- **Vargas, V. A., Delgado, O. D., Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2005).** - *Bacillus bogoriensis* sp. nov., a novel alkaliphilic halotolerant bacterium isolated from a Kenyan soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 899–902.

- **Ventosa, A., Garcia, M. T., Kamekura, M., Onishi, H., and Ruiz-Berraquero, F. (1990).** - *Bacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 401-405.

- **Vignola, C. L. (2002).** - Science et technologie du lait. Transformation du lait. 3^{ème} édition. Canada.

W

- **Weber, A. P. M., Oesterhelt, C., Gross, W., Brautigam, A., Imboden, L. A., Krassovskaya, I. (2004).** - EST-analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. 55: 17-32.

- **Wild, A. (1993).** - Soils and environment. An introduction, pp. 281. In. Cambridge price editions. Cambridge University press, Cambridge.

- **Wu, X.Y., Mark, J., Walkerb, M. H., James, C. (2006).** - Development of a groupspecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *Journal of Microbiological Methods*. 64,107-119.

Y

- **Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T. K. and Park, Y. H. (2004).** - *Bacillus hwajinpoensis* sp. nov. and an unnamed *Bacillus* genom-species, novel members of *Bacillus* rRNA group 6 isolated from sea water of the East Sea and the Yellow Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 803-808.

- **Yoon, J. H., Kang, K. H. and Park, Y. H. (2003).** - *Halobacillus salinus* sp. nov., isolated from a salt lake on the coast of the East Sea in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 687–693.

- **Yousfi, A. (2013).** - contribution a l'étude de la biodiversite des *Bacillus* extrêmophiles isolés de la source thermale de hammam debagh Guelma (griffon D), mémoire de diplôme d'Etat de Master en Microbiologie, Université de Tlemcen, Algérie.

Z

- **Zettam, M. R. (2013).** - Contribution A L'etude De La Biodiversite Des *Bacillus* extremophiles Isoles De La Source Thermale De Hammam Debagh -Guelma- (Griffon B) -Screening D'activites Antimicrobiennes, Mémoire De Diplôme D'état De Magister En Microbiologie, Université De Tlemcen, Alger.

Annexe 1 : Matériel utilisé

• Equipement

- Etuve (RAYPA)
- Autoclave (HIRAYAMA)
- Four Pasteur (WISECUBE)
- PH mètre
- Agitateur- plaque-chauffante
- Vortex (DRAGON LAB)
- Microscope optique (SMART)
- Balance (OHAUS)
- Bec Bunsen
- Réfrigérateur (IRIS SAT)
- Bain marie (WISEBATH)

• Verrerie :

- Erlenmeyer de : 250 mL et 500 mL
- Becher de: 100 mL, 250 mL et 500 mL
- Fiole jaugée
- Flacons en verre de 250 mL
- Boite de Petrie en plastique
- Pipette Pasteur
- Pipette graduées
- Anse de platine
- Tubes à essais
- Lames et lamelles
- Pincés

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

TSA (Trypticase Soja-agar)	
Poudre déshydraté	40 g
Nystatine	1 g
Eau distillée	1000 mL

Gélose nutritive	
gélose	23 g
Eau distillée	1000 mL

Bouillon nutritif	
Peptone	5 g/L
Extrait de viande	3 g/L
Eau distillée	1000 mL

Viande-Foie (VF)	
Base viande foie	30,0 g
Glucose	2,0 g
Agar	6,0 g
Eau distillée	1000 mL / pH = 7,0

Mannitol mobilité	
Peptone tryptique de viande	20 g
Agar	4,0 g
Mannitol	2,0 g
KNO ₃	1 g
Rouge de phénol à 1 %	4 mL
Eau distillée	1000 mL / pH = 7,6-7,8

Citrate de Simmons	
Ammonium dihydrogenophosphate	1 g
Phosphate de dipotassique	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate de sodium	2 g
Sulfate magnésium	0,2 g
Bleu de bromothymol	0,08 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL / pH = 6,8

Milieu Clarck et Lubs	
Peptone trypsique	05 à 07 g
Eau distillée	1000 mL / pH = 7

Eau physiologie	
NaCl	9 g
Eau distillée	1000 mL

Annexe 3 : Réactifs utilisés

Violet de gentiane au cristal	
Violet de gentiane	10 g ou 5 g
Phénol	20 g
Ethanol à 0.95	100 cm ³
Eau distillée	1000 mL

Lugol	
Iode	5 g
Iodure de potassium	10 g
Eau distillée	1000 mL
Flacon brun	

Fuchsine	
solution de fuchsine saturée à alcool.	10 mL
L'eau distillée	90 mL

Bleu de méthylène (à 1%)	
bleu de méthylène	1 g
L'eau distillée	100 mL

Réactif NIT I	
Acide sulfanilique	8 g
Acide acétique 5N	1000 mL
	Conserver le réactif A à température ambiante pendant 3 mois, dans l'obscurité

Réactif NITII	
dimethyl- α -naphthylamine	6 g
Acide acétique	1000 mL
	Réactif B Conserver entre 2 et 8 ° C pendant 3 mois, dans l'obscurité

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

Réactif de vert de malachite à (1%)	
Vert de malachite	1 g
L'eau distillée	100 mL

- **L'alcool:** Ethanol.
- **NaOH**
- **NaCl**
- **H₂O₂**
- **zinc**