

كلية علوم الطبيعة والحياة

وعلوم الأرض

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

Département : biologie



جامعة الجيلالي بونعامة –

خميس مليانة

Université Djilali
Bounaama
Khemis Miliana

قسم : البيولوجيا

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : science de la nature et de la vie

Filière : science biologique

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THEME

RECHERCHES DES MICRORGANISMES REPRODUCTRICES DES BIOMOLECULES DANS LA ZONE DE AIN DEFLA

Réalisé par :

✓ BOUZIANE WAFAA

✓ BELAKACEMI MANEL

Soutenu le 30/06/2024 devant le jury composé de :

Président(e)	Nabti D	MCB	U. Khemis Miliana	Président(e)
Promoteur	Amrouche Z	MCA	U. Khemis Miliana	Promoteur
Copromoteur	Chabane S	ING	U. Khemis Miliana	Copromoteur
Examineur	Cassasni L	MAB	U. Khemis Miliana	Examineur
Président(e)	Nabti D	MCB	U. Khemis Miliana	Président(e)

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude, avant tout à Dieu le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné le courage et la force pour mener à bout ce modeste travail.

Je remercie chaleureusement mon encadreur,

Dr Zouheir Amrouche pour avoir accepté de nous encadrer et nous diriger et pour la confiance Qu'il a mis en nous.

Ma Co-encadreur Mme Chabane safia pour ses judicieux conseils, ses directives précieuses, pour son soutien scientifique et moral au cours de la réalisation pratique et théorique de ce travail.

Nos Remerciements vont également aux membres de jury :

*Au président du jury Dr Nabti. D d'avoir accepté de présider ce jury
A notre examinateur merci pour votre contribution à enrichir ce travail
Pour avoir accepté ´ de juger ce travail.*

Aux personnels du laboratoire de Microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université ´ de khemis Miliana.

Aux et enseignants qui ont contribué ´ à notre formation universitaire.

MERCI

Dédicaces

Ce mémoire de fin d'études représente l'aboutissement d'un long parcours et d'un travail acharné. Derrière ce document se cachent des heures de recherche, d'analyse, de réflexion et d'écriture. Mais ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien et l'encouragement de nombreuses personnes. C'est pourquoi je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ceux qui ont contribué à sa réalisation.

A mes parents, chers papa et maman

Je vous remercie du fond du cœur pour votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et votre confiance en moi tout au long de ma vie. Vous avez toujours cru en mes capacités et m'avez encouragé à poursuivre mes rêves. Vos sacrifices et votre dévouement m'ont permis d'accomplir ce que je suis aujourd'hui.

A ma tante,

Je tiens à remercier chaleureusement ma tante, [nom de la tante], qui a accepté de co-encadrer ce mémoire. Son expertise, ses conseils avisés et sa patience ont été précieux pour moi tout au long de ce projet. Sa bienveillance et son encouragement m'ont permis de progresser et de me perfectionner.

A à ma famille

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mon fiancé, pour son soutien indéfectible et son encouragement tout au long de mes études. Sa présence et son soutien ont été des éléments essentiels qui ont contribué à ma réussite académique. Pendant les moments de doute et de stress a été une source de réconfort et de motivation. Ses encouragements constants et son soutien inconditionnel m'ont aidé à surmonter les défis et à persévérer dans mes efforts académiques.

Je remercie ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Vos paroles aimables et vos moments de partage m'ont permis de garder le moral et de me motiver dans les moments difficiles.

A tous ceux qui ont contribué à ce mémoire

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, notamment les enseignants, le personnel technique du laboratoire Mme nadjiba et Mme Affaf

Leurs connaissances et leur expertise m'ont été d'une grande aide dans mes recherches.

Wafaa

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents

Ma mère

Vous m'avez donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je vous porte. J'avoue vraiment que vous êtes pour moi la lumière qui me guide vers le chemin de la réussite. C'est à vous que je dois mon succès

En témoignage je vous offre ce Modest travail pour vous remercier vos sacrifices consentis et pour l'affection dont vous m'avez toujours témoignée

Mon père

L'épaule solide l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estim. et de mon respect

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu vous préserve et vous procure santé et longue vie

A mes frères et sœurs

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Puisse dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers

Ma tante Karima

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements pour le rôle important que tu a joué dans ma vie ou tu m'as appris la valeur de l'éducation depuis mon enfance. Je n'aurais pas pu réussir sans ton soutien.

Je tiens à remercier du fond du cœur pour tout le temps et les efforts que tu m'as consacrés.

Je ne peux pas exprimer suffisamment ma gratitude et mon appréciation pour tout ce que tu as fait pour moi.

À mes encadreurs *Mr amrouche I, et MME CHABANE* qui ne nous a rien lésiné sur leurs connaissances tout au long de cette période.

Enfin, et non des moindres, donnez cette humble œuvre à quiconque se donne la peine de la lire, que ce soit pour l'évaluer ou pour la critiquer ou pour en accroître l'apprentissage.

"واللهوهم ان الحمد V رب العالمين"

MANEL

Liste des abréviations :

Na : sodium

PDA : Potato-Dextrose-Agar

GN : gélose nutritive

Ox : oxydase

GN: Gélose Nutritive

Na Cl: chlorure de sodium

UFC: Unité formant colonie

BNT: milieu Bennet.

SAB: Gélose Sabouraud.

C2O: Dioxide de Carbone.

CaCo3: Carbonate de calcium.

T°: Temperature.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Echelle granulométrique de la texture du sol. (Siegenthaler, 2014)	6
Tableau 2: Les grands groupes des microorganismes du sol.....	12
Tableau 3: - Les principaux genres d'actinomycètes (Stanier et al 1966)	24
Tableau 4: Résultats des pourcentages de distribution des microorganismes champignons, actinomycètes et de bactéries a différents profondeurs.....	55
Tableau 5: Etude macroscopique des bactéries	58
Tableau 6: étude macroscopique des champignons.....	59
Tableau 7: tableau des resultat catalase et oxydase	63
Tableau 8: résultats de la coloration de gram, TSI et MANITOL.....	63
Tableau 9: Résultats des tests biochimiques de la Galerie.....	68

Liste des figures

Figure 1(b): Les différents types de sols	4
Figure 2: triangle texturale	6
Figure 3: Illustration des différentes structures dans le sol.....	7
Figure 4: la porosité totale	7
Figure 5: Composition du sol.....	9
Figure 6: Localisation des microorganismes du sol.....	11
Figure 7: Classification des organismes du sol selon	13
Figure 8: (A, B et C). Bactéries du sol (G : 40 × 10) (Hamlaoui et Lemkeddem., 2016).....	17
Figure 9: Les deux types de mycélium, cloisonné ou non	20
Figure 10: (A et B) Champignons du sol (MBL, 2013).....	21
Figure 11: Observation microscopique des actinomycètes du sol	22
Figure 12: Carte de localisation de la wilaya d'Ain Defla	33
Figure 13: Zone expérimentale de la faculté de Khemis Miliana	35
Figure 14: Méthodologie de travaux	36
Figure 15: Schéma récapitulatif de la préparation de dilution	37
Figure 16: Les différents milieux de culture coulés en boîte de pétri pour la préparation l'opération de l'ensemencement.....	38
Figure 17: microscope optique.....	43
Figure 18: Protocole de gram.....	44
Figure 19: Test de l'oxydase.....	45
Figure 20: observation de milieu ISP 7 avant et après développements.....	47
Figure 21: aspect de la croissance sur milieu gélose à l'amidon	48
Figure 22: Le premier isolat (a) est négatif pour l'hydrolyse de l'amidon, ce qui signifie qu'il ne produit pas l'enzyme amylase nécessaire pour dégrader l'amidon.	49
Figure 23: Galerie API 10S + API 20E	51
Figure 24: Application des disques d'antibiogramme	53
Figure 25: Distribution des microorganismes dans le sol	55
Figure 26: colonie sur milieu PDA et BNT	57
Figure 27: aspect des actinomycètes sur culture	58
Figure 28: Etude macroscopique des champignons.....	59
Figure 29: Aspect macroscopique des colonies des champignons sur milieu PDA	59
Figure 30: observation microscopique après coloration de Gram	61

Figure 31: Résultat test oxydase	62
Figure 32:Résultat du test oxydase (Photo originale,).	62
Figure 33: Résultats de test mannitol mobilité	Figure 34: résultats de test TSI
Figure 35:résultats de test de gélatinase.....	64
Figure 36: résultats de l'uréase	65
Figure 37: résultats de l'amylase	65
Figure 38: Résultat de test de pigmentation I	67
Figure 39: Résultats du test galerie API 20 E	68
Figure 40:resultat de l antibiogramme	71
Figure 41:Histogramme de résultat de l'antibiogramme en milieu gélosé des souches isolées (diamètre des zones d'inhibition en mm	73

Table des matières

INTRODUCTION	1
1 Chapitre I : Généralités sur les microorganismes du sol	4
1.1 Introduction	4
1.2 Définition	4
1.3 Propriétés physiques et chimiques du sol	5
1.3.1 La texture	5
1.3.2 La structure	6
1.3.3 PH	7
1.3.4 La matière organique	7
1.3.5 La porosité.....	7
1.3.6 L'humidité	8
1.3.7 La température.....	8
1.4 La composition du sol	8
1.4.1 La fraction organique morte	8
1.4.2 La fraction organique vivante du sol.....	9
1.4.3 Diversité des micro-organismes du sol	9
1.4.4 Les procaryotes	13
1.4.5 Rôle des microorganismes dans le sol	14
2 Chapitre II : Microorganismes et biomolécules.....	16
2.1 Introduction	16
2.2 Microorganismes	16
2.2.1 Biomolécules	16
Les biomolécules du sol sont des composés organiques produits par les organismes vivants du sol, y compris les microorganismes, les plantes et la faune du sol. Ces molécules jouent un rôle crucial dans de nombreux processus du sol et influencent sa fertilité, sa structure et son fonctionnement écologique.(.....)	
.....	16
2.3 Différents groupes de micro-organismes du sol	17
2.3.1 Les bactéries.....	17
2.4 Clostridium.....	17
2.4.1 Staphylococcus.....	18
2.5 Rôles des bactéries dans le sol	18

2.5.1	Les mycètes ou champignons	19
2.5.2	Caractéristiques	20
2.5.3	Classification.....	20
2.5.4	Le genre Aspergillus ;	21
2.5.5	Les moisissures.....	21
2.5.6	Les levures.....	21
2.6	Role des champignons dans le sol.....	21
2.6.1	Actinomycètes.....	22
2.6.2	Classification.....	23
2.6.3	Le genre Pseudomonas	24
2.6.4	Le genre Bacillus.....	25
2.6.5	Classification de Bacillus dans le monde microbien	25
2.6.6	Le groupe I.....	25
2.6.7	Croissance	26
2.6.8	Habitat.....	26
2.6.9	Écologie	26
2.6.10	Caractères cultureux.....	26
2.6.11	Le genre Streptomyces.....	27
2.6.12	Rôle des actinomycètes dans le sol	27
2.7	Importance des microorganismes du sol	27
2.7.1	Décomposition de la matière organique	27
2.7.2	Rôle dans les cycles biogéochimiques des éléments nutritifs	27
2.7.3	Formation et stabilité de la structure du sol.....	28
2.7.4	Interactions avec les plantes.....	28
2.7.5	Biodégradation et bio remédiation.....	28
2.8	Les effets des microorganismes sur la structure du sol.....	28
2.8.1	Les biomolécules	28
	Les biomolécules du sol sont des composés organiques produits par les organismes vivants du sol, y compris les microorganismes, les plantes et la faune du sol. Ces molécules jouent un rôle crucial dans de nombreux processus du sol et influencent sa fertilité, sa structure et son fonctionnement écologique.....	28
	Les biomolécules sont les principaux éléments de traitement de l'information de la matière vivante. La plus part de ces systèmes sont des polymères qui calculent leur propre structures en utilisant comme entrée des chaînes de caractères apparemment intégrées.....	29
2.8.2	. Principales enzymes produites dans le sol.....	29
2.8.3	Amylase	29
2.8.4	Gélatinase.....	29

L'uréase	30
2.8.5 Coagulase	30
2.8.6 Chitinase.....	30
2.8.7 Cellulases.....	30
2.8.8 Production de biomolécules protectrices	30
3 Chapitre III : Matériel et méthodes.....	33
3.1 Objectif de l'étude	33
3.2 Présentation de la zone D'étude.....	33
3.3 Climat	34
3.4 Zone expérimentale de la faculté de Khemis Miliana	34
3.5 Échantillonnage	34
3.6 Matériels et méthodes	36
3.7 Matériels et Milieux de culture.....	36
3.7.1 Matériels	36
3.7.2 Milieux et produits chimiques : (annexe II).....	36
3.7.3 Méthodes	36
3.8 Préparation des dilutions	37
3.9 Ensemencement	38
3.10 Isolement	39
3.11 Purification des isolats microbiens	39
3.12 Conservation	40
3.13 Identification de la microflore isolée du sol	40
3.14 Biodiversité morphologique.....	40
3.14.1 -Études macroscopiques	40
3.14.2 Champignons.....	41
3.14.3 Etude morphologique.....	42
3.14.4 Caractérisation macroscopique.....	42
3.14.5 Etude microscopique.....	42
3.14.6 Observation microscopique	42
3.14.7 Examen à l'état frais.....	42
3.15 Coloration de gram	43

3.15.1	Technique	43
3.15.2	Fixation	43
3.15.3	Lecture.....	44
3.16	Etude du type respiratoire	44
3.16.1	Test catalase	44
3.16.2	Test oxydase	44
3.17	Étude du métabolisme.....	45
3.17.1	Fermentation des sucres TSI	45
3.17.2	Test Mannitol mobilité	46
3.17.3	Croissance sur milieu ISP 7	46
3.17.4	Lecture.....	47
3.18	Croissance sur milieu ISP5	47
3.18.1	Principe.....	47
3.18.2	Technique	48
3.18.3	. lecture.....	48
3.19	Croissance sur milieu de l'amidon	48
3.19.2	Technique	48
3.19.3	Lecture.....	49
	FIGURE25 : Le premier isolat (a) est négatif pour l'hydrolyse de l'amidon, ce qui signifie qu'il ne produit pas l'enzyme amylase nécessaire pour dégrader l'amidon.	49
3.19.4	Recherche de l'amylase.....	49
3.20	Test d'urée indole	49
3.20.1	Principe.....	49
3.21	Test de gelatinase:	50
3.21.1	Principe.....	50
3.21.2	Technique	50
3.21.3	Identification biochimique par la Galerie api	51
3.21.4	L'antibiogramme	52
4	III. Résultats.....	55
4.1	Introduction	55
4.2	Résultats.....	55
4.2.1	l'isolement des microorganismes.....	55
4.3	Études macro et microscopique	56
4.3.1	II.1. Études macroscopique	56

4.3.2	II.2. Études microscopiques	60
4.3.3	-Identification biochimique	62
4.3.4	Croissance sur milieu gélose à l'amidon	65
4.3.5	Croissance sur milieu ISP7	66
4.4	Résultats de la galerie API	67
4.5	Resultat de l'antibiogramme	69
4.6	Isolement et identification des microorganismes	75
5	<i>Conclusion</i>	76
6	<i>Références bibliographiques</i>	78
7	<i>Sites internet</i>	84
	<i>Résumé</i>	85
	<i>Abstract</i>	85
	<i>المختصر</i>	86
8	<i>Annexes</i>	88

Introduction

INTRODUCTION

Introduction :

. Les bactéries peuplent tous les écosystèmes terrestres, y compris les sols où elles jouent des rôles écologiques essentiels. Dans les sols, les bactéries sont les acteurs majeurs de nombreux processus biogéochimiques tels que la décomposition de la matière organique, la minéralisation des nutriments, la fixation de l'azote atmosphérique ou encore la solubilisation des minéraux (**Philippot et al., 2013**).

Cette diversité fonctionnelle des bactéries de sol est étroitement liée à la richesse de leur équipement biochimique, c'est-à-dire à la nature et à la variété de leurs biomolécules.

Les biomolécules bactériennes, telles que les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides et les lipides, confèrent aux cellules microbiennes des propriétés uniques qui leur permettent de s'adapter à la grande diversité des environnements édaphiques (**Schimel, J et al., 2012**). Certaines jouent un rôle essentiel dans la fixation du carbone et de l'azote, d'autres participent à la résistance aux stress environnementaux, tandis que d'autres encore interviennent dans les interactions biotiques avec d'autres organismes du sol (**Hayat, R et al., 2010**).

Comprendre la nature et les fonctions de ces biomolécules bactériennes est donc crucial pour appréhender le fonctionnement des écosystèmes édaphiques et développer des applications biotechnologiques innovantes dans des domaines tels que l'agriculture durable,

La bio remédiation ou la production de biocarburants (**Vandenkoornhuyse, P et al., 2015**).

Bien que de nombreuses études aient été menées sur les communautés bactériennes des sols et leurs rôles écologiques, les connaissances sur la nature et les fonctions spécifiques des biomolécules bactériennes dans ces environnements restent encore parcellaires. Plusieurs questions clés demeurent ainsi à élucider :

Quelles sont les principales classes de biomolécules produites par les bactéries de sols et quelles sont leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles, comment ces biomolécules bactériennes varient-elles en fonction des conditions environnementales des sols (pH, teneur en matière organique, disponibilité en nutriments, et quel est le rôle dans les processus microbiologiques clés des écosystèmes édaphiques ?

Par ailleurs, de nombreuses biomolécules bactériennes présentent un fort potentiel d'applications biotechnologiques et microbiologie, notamment dans les secteurs de

l'agriculture, de l'environnement et de l'industrie.

Cependant, leur exploitation à grande échelle est encore limitée par des verrous technologiques et économiques.

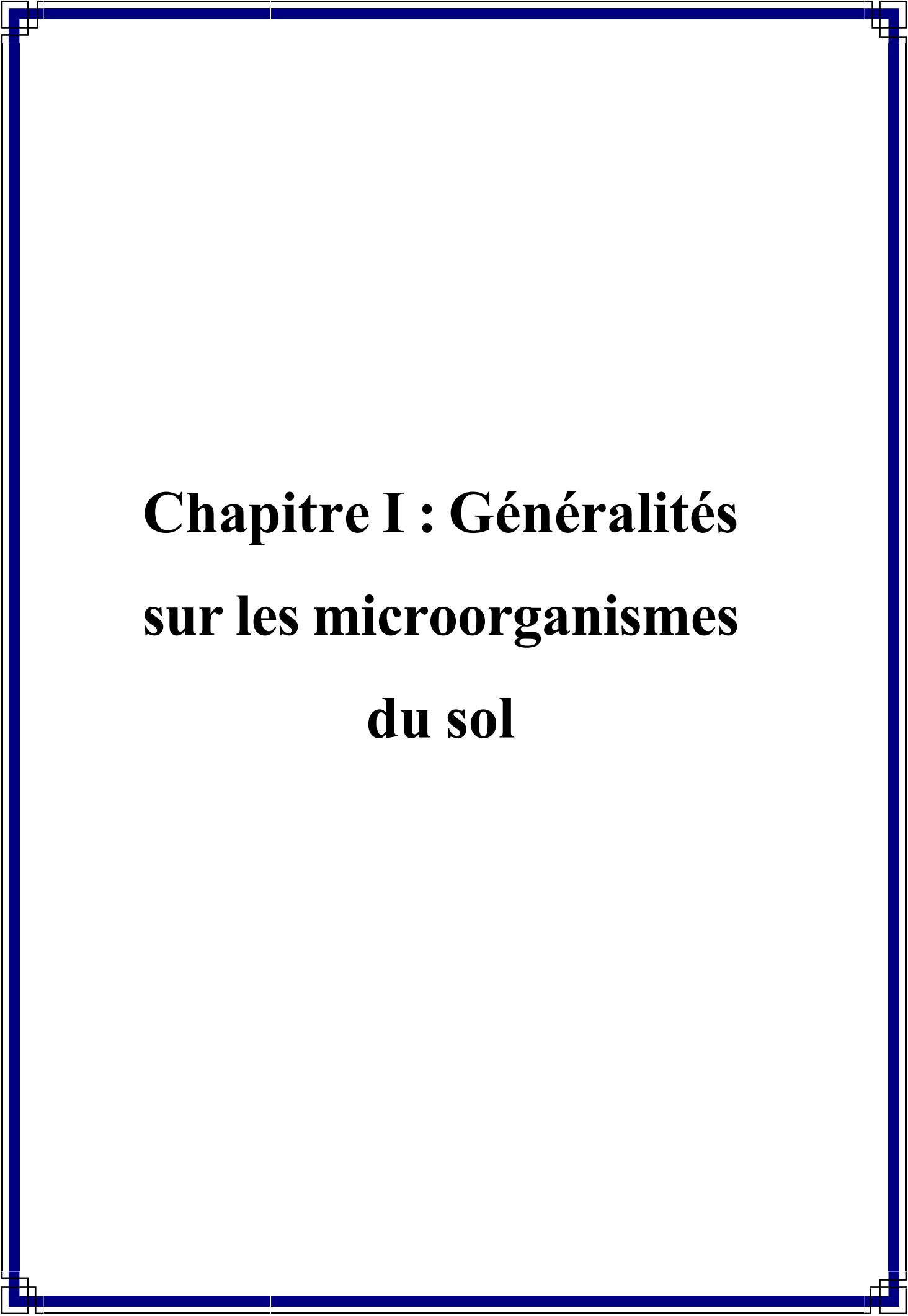
Les perspectives de valorisation de ces biomolécules bactériennes dans une optique de développement durable

Pour répondre à ces différentes interrogations, une approche pluridisciplinaire combinant microbiologie, biochimie, écologie microbienne et biotechnologie sera nécessaire.

Les avancées dans ces domaines pourraient permettre de mieux appréhender le rôle fondamental des bactéries de sols dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres et d'ouvrir de nouvelles voies pour une gestion plus durable des ressources naturelles.

Afin de bien mener notre étude, nous avons suivi le plan :

- Une partie théorique qui explique les notions relatives à la biologie de sol
- Une partie pratique qui tente à élucider la méthode suivie sur terrain et au laboratoire pour la mise en évidence de la méthodologie de caractérisation biologique du sol au laboratoire qui est basée sur la mesure de paramètres principaux :
- La classification



Chapitre I : Généralités sur les microorganismes du sol

1 Chapitre I : Généralités sur les microorganismes du sol

1.1 Introduction :

Le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organisme notamment les microorganismes et de composés chimiques et par la structure physique complexe (Wild 1993). C'est un milieu complexe composé de matières minérales, d'eau, d'air, d'organismes vivants et de matière organique. Les sols varient considérablement en fonction de leur Composition, de leur structure et de leurs propriétés physiques et chimiques, ce qui Détermine leur capacité à soutenir la croissance des plantes, à filtrer l'eau et à abriter une Biodiversité unique.

Il constitue la couche la plus externe marquée par le vivant de la croûte terrestre et joue un rôle crucial dans le maintien de la vie sur Terre. (Bardgett et al., 2014).

1.2 Définition :

Le sol est le produit de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre sous l'action de la vie (figure 1), de l'atmosphère et des échanges d'énergie qui s'y manifestent (Aubert et Boulaine, 1980, in Lozet et Mathieu, 2002).

Le sol n'est pas une entité simple, homogène et statique. C'est une entité naturelle, dont l'existence initiale ne dépend pas de l'homme (baise, 1995 et Gerad, 1998).



Figure 1: Texture de sol

Il est constitué de cinq composants majeurs :

- la fraction minérale ;
- La matière organique ;
- L'eau ;
- L'air et les organismes vivant matières s'organisent de manière de créer des vides occupent alors par l'air et l'eau.

Le sol est formé par la dégradation physique chimique et biologique des roches en petit particules (**Kerbab., 2010**).

1.3 Propriétés physiques et chimiques du sol :

Les propriétés et la structure du sol déterminent la taille, la forme et l'emplacement des pores du sol et donc leur accessibilité et leur disponibilité en eau et O₂. Et pour la teneur en matière organique et en certains composés chimiques, ainsi que le pH, déterminent la disponibilité de l'énergie et des éléments minéraux pour les organismes en décomposition (**Claire Marsden, 2015**).

L'effet de la composition minéralogique du sol sur la productivité du sol est double (**Karathanasis et al, 1985**) :

- d'une part influence les réactions chimiques responsables de l'absorption des nutriments,
- d'autre part affecte les propriétés physiques, contrôlant l'équilibre hydrique du sol et les conditions physiques du sol. En raison de leurs propriétés d'échange d'ions et de leur réactivité de surface, les minéraux du sol contrôlent l'équilibre ionique de la solution du sol dont dépend l'absorption des minéraux nécessaires à la croissance des plantes (**Kome et al, 2019 ; Karathanasis, 1985**)
- Un miroir de l'histoire des civilisations et des cultures.
- Les sols présentent diverses caractéristiques qui influencent leur fertilité, leur capacité de drainage et leur capacité à soutenir la vie végétale et animale. Voici quelques-unes des principales caractéristiques des sols :

1.3.1 La texture :

On détermine la texture du sol en fonction des pourcentages des argiles des limons et des sables qu'il contient on utilise pour cela un triangle des textures (**figure 03**) qui détermine par la taille et la proportion des particules de sable, de limon et d'argile.

Influe sur la structure, la perméabilité à l'air et à l'eau, et la capacité de rétention de l'eau.

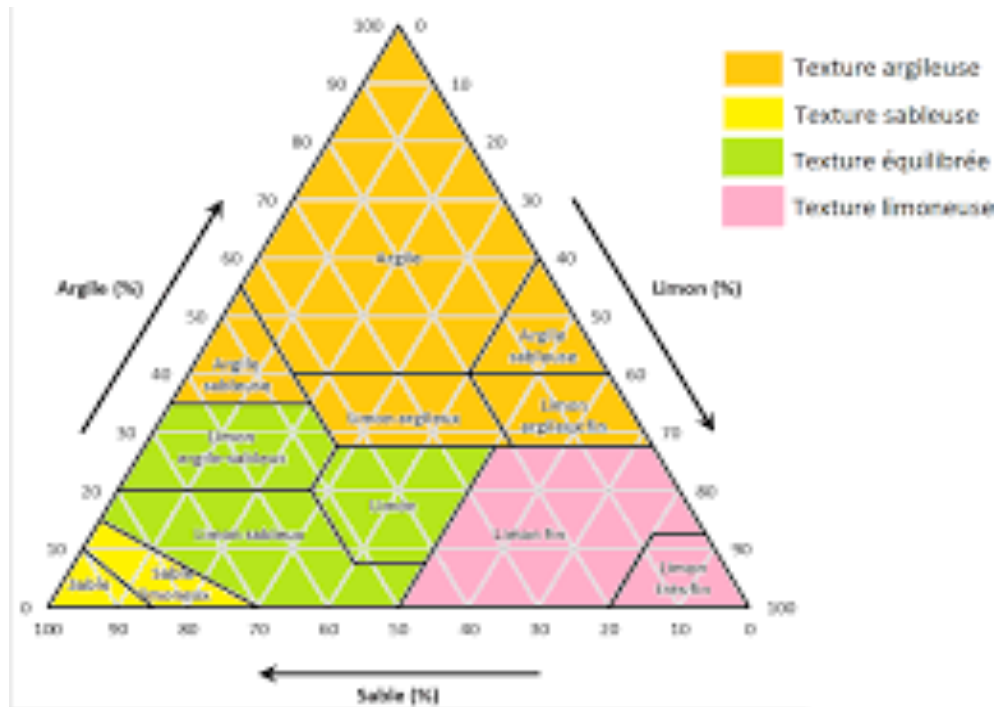


Figure 2: triangle texturale

Tableau 1: Echelle granulométrique de la texture du sol. (Siegenthaler, 2014)

Terre fine					Terre grossière	
Argile	Limon Fin	Limon grossier	Sable fin	Sable grossier	Graviers	Cailloux
< 2 μ m	2 – 20 μ m	20–50 μ m	50 – 200 μ m	0.2–2 mm	2 – 20 mm	> 20 mm

1.3.2 La structure :

Correspond à l'arrangement des particules minérales et de la matière organique, elle affecte la porosité, le drainage et la résistance à l'érosion

L'observation de différents types du sol, par la loupe binoculaire, permet de distinguer trois grandes structures. La structure est bonne si dans un sol sec exposé à la pluie, les agrégats n'éclatent pas sous l'action des gouttes (Devert, 1996). La figure 03 illustre 3 types de structures :



Figure 3: Illustration des différentes structures dans le sol

1.3.3 PH :

Le PH de la solution du sol modifie les équilibres entre la dissolution et la précipitation des carbonates ou la vitesse de nombreuses transformations chimiques (Clavet, 2003).

Le pH du sol mesure son acidité ou son alcalinité. Il influence la disponibilité des nutriments pour les plantes. La plupart des plantes prospèrent dans un sol légèrement acide à neutre, avec un pH compris entre 6 et 7.

- Mesure de l'acidité ou de l'alcalinité du sol
- Affecte la disponibilité des nutriments pour les plantes

1.3.4 La matière organique :

Elle provient de la décomposition des débris végétaux et animaux. La matière organique est essentielle pour la fertilité du sol, car elle fournit des éléments nutritifs aux plantes.

1.3.5 La porosité :

La porosité du sol mesure la quantité d'espaces vides (ou pores) entre les particules de sol. Ces pores sont cruciaux pour permettre la circulation de l'eau (**figure 04**), de l'air et des nutriments dans le sol, ainsi que pour favoriser la croissance des racines.

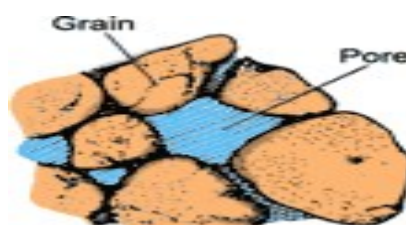


Figure 4: la porosité totale

1.3.6 L'humidité :

L'humidité du sol est difficile à définir, l'humidité du sol est l'eau qui se tient dans les espaces entre les particules du sol.

1.3.7 La température :

Le développement et la croissance racinaire, et de l'activité des microorganismes sont très dépendants de la température (**Calvet, 2003**).

La température du sol est un autre facteur physique important de la fonction biologique du sol.

1.4 La composition du sol:

1.4.1 La fraction organique morte

La fraction organique est constituée à plus de 80% de matière organique (MO) morte (tissus végétaux, résidus d'organismes) (**Djigal .M ., 2003**). La matière organique morte subit de nombreuses transformations dans le sol: elle est fragmentée, altérée chimiquement mais aussi biologiquement car, au cours de la minéralisation, elle sert de source de biodiversité du sol

- Présence d'organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les vers de terre et les insectes
- Contribue à la décomposition de la matière organique et au cycle des nutriments d'énergie pour les organismes vivants du sol. Certaines molécules non minéralisées vont subir une humification, c'est-à-dire une réorganisation en molécules plus ou moins complexes qui constituent les substances humiques.
-

1.4.2 La fraction organique vivante du sol

Des bactéries, des actinomycètes, des champignons mais aussi des racines ou encore la faune (protozoaires, nématodes, certains insectes, vers de terre), tous participent d'une manière ou d'une autre à la formation et à l'évolution du sol, en particulier de sa fraction organique (Gobat *et al.*, 2003).

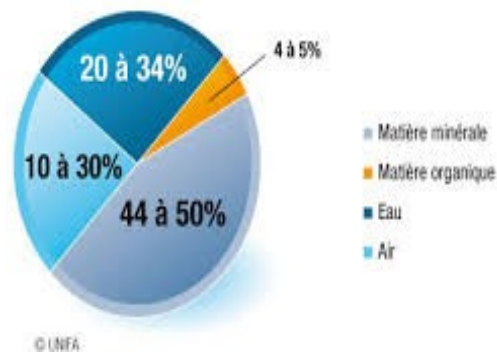


Figure 5: Composition du sol

1.4.3 Diversité des micro-organismes du sol

Trop souvent considéré comme un environnement minéral, le sol est aussi un lieu de vie. Il héberge une très forte diversité d'espèces (23 %), des vers de terre aux amibes qui participent à son fonctionnement et à la fourniture de services écosystémiques nécessaires à notre survie (production végétale, épuration des polluants etc.).

Parmi ces espèces, les microorganismes sont, sans conteste, les plus nombreux et les plus divers. Composées de bactéries et de champignons, ils assurent des fonctions essentielles comme.

- la biodégradation de la matière organique,
- la production de nutriments pour les plantes,
- la fixation d'azote, la dégradation des polluants, etc. (Kawamura-Sato *et al.* 2005).

Les microorganismes du sol sont le fondement de la biosphère de la Terre et jouent un rôle intégral et unique dans le cycle du carbone, d'azote, de soufre et de phosphore, ainsi que de divers métaux, et dans la décomposition de la litière. (Pambrun., 2005)

1.4.3.1 La microfaune

Dont la taille est comprise entre 200 μm et 1 cm, il regroupe essentiellement les nématodes et les protozoaires. Ils ont un impact très important sur les microorganismes du sol, et sur la minéralisation des nutriments (**Griffiths, 1994**). En plus des microorganismes, le sol héberge une population d'invertébrés et les organes souterrains des végétaux, dont les activités nutritionnelles régissent le fonctionnement de la microflore et régulent les flux d'énergie et de nutriments (**Bardgett et al., 1997**). Les invertébrés qui composent la faune du sol peuvent être différenciés selon leur taille en 2 groupes (**Swift et al., 1994, 1979**).

1.4.3.2 La microflore du sol :

La microflore est l'ensemble des organismes microscopiques dont l'observation directe ne fournit que peu, voire aucune information sur l'identité et la fonction. Pour les observer, les identifier et caractériser leurs fonctions, ces organismes nécessitent le recours à des méthodes culturales ou moléculaires. quatre groupes ont été reconnus dans le sol :

- ✓ les bactéries ,
- ✓ les champignons ,
- ✓ les algues microscopiques , et
- ✓ les protozoaires ,

Tous participent d'une manière ou d'une autre à l'évolution du sol , leur nombre et biomasse dans le sol dépassent souvent l'imagination les organismes vivants font-ils partie du sol ? nous incluons l'expression (avec ses organismes vivants) dans la définition générale du sol. ainsi, de notre point de vue, le sol est vivant et est composé de composants vivants et non vivants, avoir de nombreuses attractions (**Colman et al , 2004**)

Ces micro-organismes jouent des rôles essentiels dans de nombreux processus écologiques fondamentaux, notamment la décomposition de la matière organique, le cycle des nutriments, la formation de la structure du sol, la suppression des maladies des plantes et la promotion de la croissance végétale (**Paul, 2014**).

Le sol est, donc, un assemblage d'organismes extrêmement divers qui régulent les processus de décomposition de la matière organique et du cycle des nutriments (**Bardg et al., 1997**).

Les Bactéries et champignons sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques mais ils participent aussi à l'humification notamment par l'excrétion d'enzymes dans le sol ainsi qu'à la formation des complexes organo-minéraux. La densité des

bactéries peut aller jusqu'à 10^9 UFC par gramme de sol, les champignons microscopiques environ 10^5 UFC par gramme de sol (Pambrun, 2005).

Localisation des micro-organismes du sol

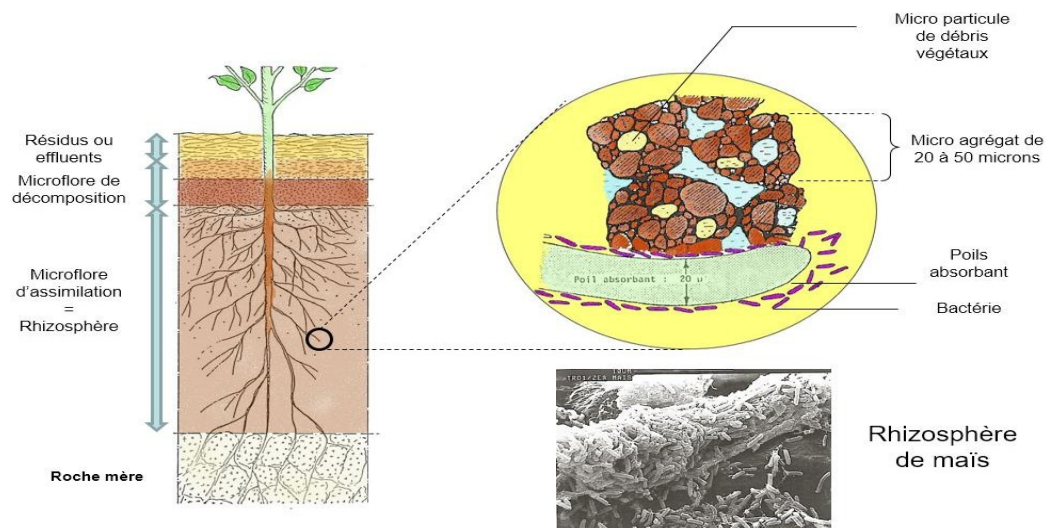


Figure 6: Localisation des microorganismes du sol

Les micro-organismes sont les acteurs clés du sol et constituent une composante essentielle de la biosphère (figure 6) et jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres. Ils participent à la décomposition de la matière organique, au cycle des nutriments, à la régulation du climat et à la protection des plantes contre les agents pathogènes. (Vander Heijden et al, 2016)

1.4.3.2.1 Les eucaryotes :

1.4.3.2.1.1 Les champignons :

Les champignons du sol ou mycètes sont des levures, des champignons supérieurs et surtout des moisissures des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Trichoderma*, mais à la différence des bactéries, ils sont toujours hétérotrophes et aérobies. Les champignons résistent mieux que les bactéries à la sécheresse, et supportent généralement bien les pH acides et se développent entre 10°C et 40°C ., dans de telles conditions, sont plus compétitifs que les bactéries pour l'exploitation d'un substrat. On ne doit pas, les considérer comme des organismes acidophiles.

En fait, ces organismes semblent pouvoir se développer dans des intervalles de pH environnementaux assez larges, beaucoup possèdent, d'ailleurs, une gamme d'enzymes capables d'attaquer un même substrat à des pH différents (Belgarbi-Dutron, 2012).

Un champignon se détermine par son mode de sporulation. Elles ont une forme définie, ronde ou ovale plus ou moins allongée. Leur taille varie de 2µm à plusieurs dizaines de µm. Elles se forment soit à l'intérieur d'un élément filamenteux plus ou moins renflé, soit à l'extérieur, fixées à l'extrémité ou sur les ramifications d'un filament ; elles peuvent encore être formées par des organes particuliers.

Tableau 2: Les grands groupes des microorganismes du sol

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasses (g/m²)
Bactéries	10 ⁸ -10 ⁹	40-500
Actinomycètes	10 ⁷ -10 ⁸	40-500
Champignons	10 ⁵ -10 ⁶	100-1500
Protozoaires	10 ³ -10 ⁴	varie

1.4.3.2.1.2 Algues

Les algues sont relativement rares dans le sol. Les groupes les plus courants sont les Chlorophycées. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les cyanobactéries prédominent dans les sols neutres et alcalins, tandis que les algues sont plus fréquentes dans les sols acides.

1.4.3.2.1.3 Les protozoaires

Les organismes primaires isolés du sol sont divers et prospèrent dans les surfaces humides, dans les couches d'eau entourant les particules.

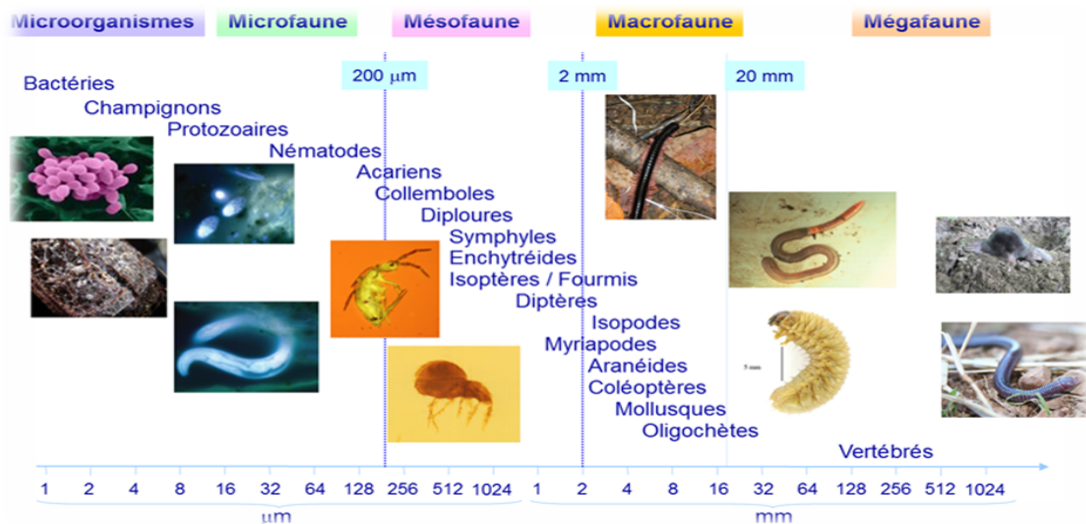


Figure 7: Classification des organismes du sol selon

1.4.4 Les procaryotes :

1.4.4.1 Bactéries :

Les bactéries sont les êtres les plus nombreux sur terre. Elles jouent des rôles importants dans le cycle des éléments nutritifs ; beaucoup vivent (figure 7) en association symbiotique avec des plantes, favorisant leur croissance et augmentant la fertilité des sols.

Les bactéries sont des cellules procaryotes de structure simple. Leur taille ne dépasse généralement pas 2 µm (Doubbia, 2007). Le cytoplasme de toutes les bactéries est entouré par une membrane plasmique externe revêtue ou non d'une paroi cellulaire rigide dont le composant majeur est un polymère complexe de sucres et d'acides aminés, appelé peptidoglycane, qui lui confère sa forme et sa rigidité. (Mathieu, 2020).

On distingue trois grands groupes de bactéries :

- Les bacilles, bactéries en forme de bâtonnets, souvent dotés de flagelles, structures filamenteuses qui font avancer l'organisme dans un mouvement de rotation et de bascule.
- Les Cocci, bactéries sphériques qui peuvent s'agglutiner pour former des chaînes (comme les streptocoques, responsables d'une infection de la gorge), ou comme des grains de raisin (staphylocoques).
- les spirilles ou spirochètes, bactéries en forme de spirale ou de virgule (*Treponema pallidum*, à l'origine de la syphilis), ou incurvée, les vibrions *Vibrio cholerae*. D'autres bactéries, les mycoplasmes, sont dépourvus de parois rigides, et par conséquent n'ont pas de forme déterminée. Certaines bactéries ont besoin d'oxygène, elles sont dites

aérobies (*Bacillus*, *Pseudomonas*...) ; d'autres ne peuvent pas survivre en milieu oxygéné, elles sont dites anaérobies.

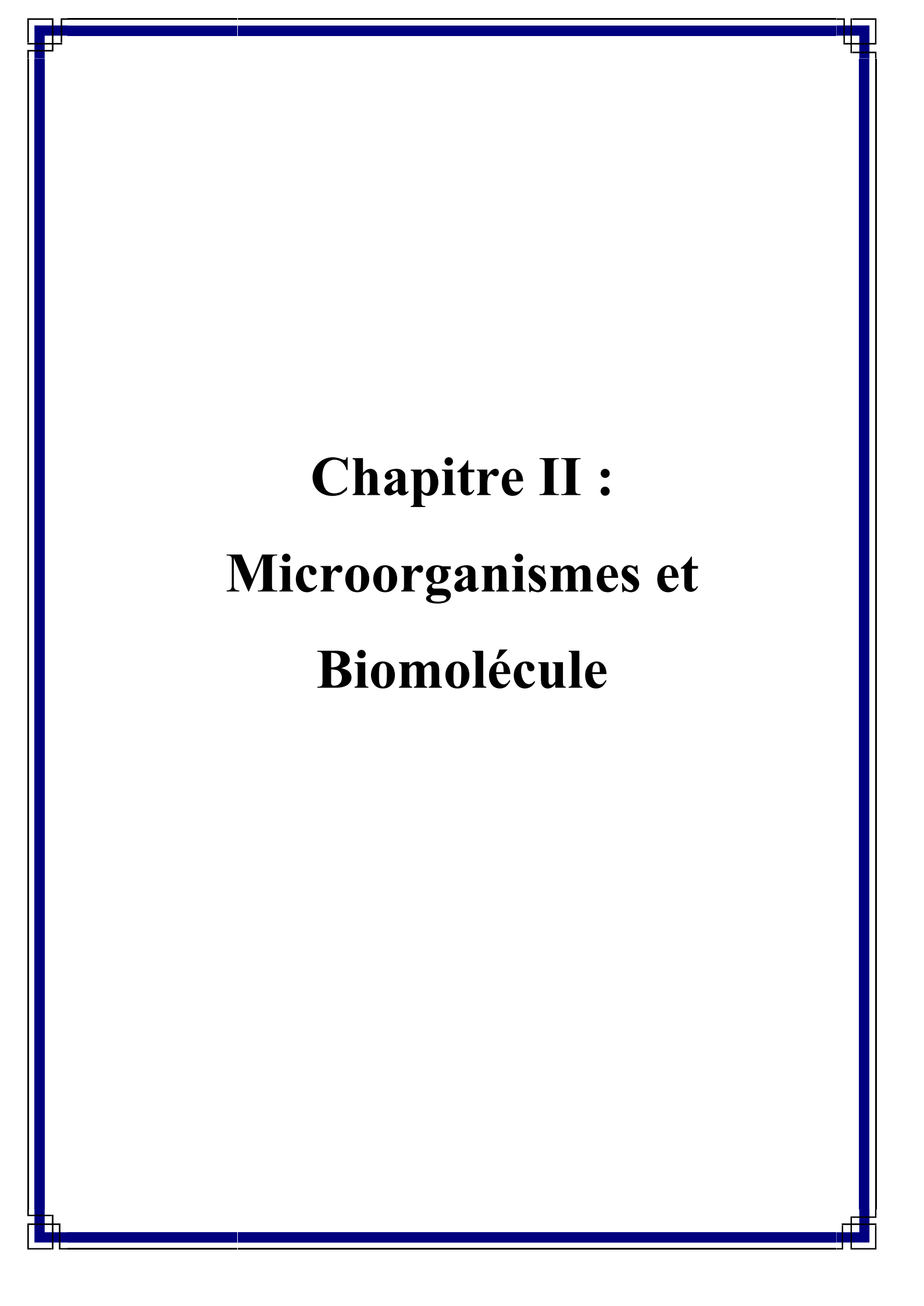
Les bactéries sont classées en bactéries autotrophe, utilisation de carbone sous forme minéral, et bactéries hétérotrophes utilisation de carbone sous forme organique (**Mathieu, 2020**).

Les cyanophycées : Les cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques capables de réaliser la photosynthèse oxygénique. Elles possèdent de la chlorophylle a et des phycobiliprotéines comme pigments photosynthétiques. Leur structure cellulaire est procaryote, sans noyau ni organites membranaires, mais elles présentent un système de membranes internes (thylakoïdes) où se déroule la photosynthèse. (**Whitton, 2012**).

1.4.5 Rôle des microorganismes dans le sol :

Les microorganismes jouent un rôle important à la fois dans la formation du sol et dans son fonctionnement (**Robert et al., 1992**). Parmi les rôles de la microflore dans les sols arides on peut citer les suivants :

- -L'activité biologique est un facteur important de la genèse et la formation des sols.
- -L'amélioration de la structure des sols, c'est ainsi que les champignons sont efficaces dans la stabilisation des agrégats de sol, car ils ont la capacité de lier les particules du sol via plusieurs mécanismes ;
- Les bactéries interviennent plutôt dans la stabilisation des particules de la taille des argiles et des limons
- Certains microorganismes (algues), forment de véritables croûtes protectrices contre l'érosion et l'évaporation, et favorisent l'installation des plantes ;
- La solubilisation des éléments minéraux indispensables à la vie des végétaux supérieurs (Ca, P, K)
- La fixation de l'azote et du carbone atmosphériques.



Chapitre II :

Microorganismes et

Biomolécule

2 Chapitre II : Microorganismes et biomolécules

2.1 Introduction :

Les microorganismes sont des êtres vivants microscopiques qui jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques et écologiques. Ils comprennent les bactéries, les archées, les protistes, les virus et certains champignons microscopiques. Quant aux biomolécules, ce sont des molécules produites par les organismes vivants, qui constituent la base structurelle et fonctionnelle de la vie. Voici quelques informations clés sur ces deux sujets, avec des références scientifiques.

2.2 Microorganismes :

Les bactéries sont des procaryotes unicellulaires présents dans presque tous les environnements. Elles jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques et ont de nombreuses applications dans l'industrie (**Madigan, M et al ., 2018**).

- Les archées sont des procaryotes unicellulaires qui se distinguent des bactéries par leur structure cellulaire unique. Elles se trouvent souvent dans des environnements extrêmes
- Les protistes sont un groupe diversifié d'eucaryotes unicellulaires, certains étant des organismes photosynthétiques importants dans les écosystèmes aquatiques
- (**Cavicchioli, R , 2011**).
- Les virus sont des agents infectieux acellulaires qui ne peuvent se répliquer que dans des cellules hôtes. Ils sont impliqués dans diverses maladies mais ont également des applications en recherche et en thérapie génique (**Dimmock, N et al ., N2016**)

2.2.1 Biomolécules:

Les biomolécules du sol sont des composés organiques produits par les organismes vivants du sol, y compris les microorganismes, les plantes et la faune du sol. Ces molécules jouent un rôle crucial dans de nombreux processus du sol et influencent sa fertilité, sa structure et son fonctionnement écologique.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont les molécules porteuses de l'information génétique et essentielles à la synthèse des protéines.

- Les protéines sont des macromolécules formées d'acides aminés et impliquées dans pratiquement tous les processus cellulaires, comme les enzymes, les récepteurs, les structures(. **Watson , J et al. 2014**)
- Les lipides sont des molécules hydrophobes qui constituent les membranes cellulaires et jouent un rôle dans le stockage d'énergie .
- Les glucides (sucres et polysaccharides) fournissent de l'énergie et sont impliqués dans la structure et la signalisation cellulaire (**Varki, A et al., 2017**).

2.3 Différents groupes de micro-organismes du sol :

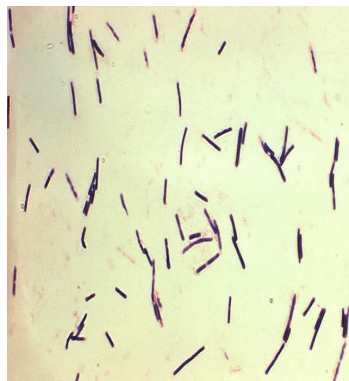
2.3.1 Les bactéries :

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires de type procaryotes contrairement aux protozoaires qui sont des eucaryotes (**Gobat, 2003**), sont ubiquitaires et peuvent être isolées. Elles forment tant au plan quantitatif qu'au plan fonctionnel le groupe majeur des microorganismes(figure 08) du sol (**MOREL, 1989**).

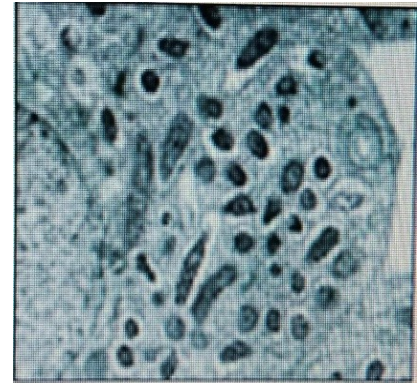
Les bactéries sont classées en bactéries autotrophes ; utilisation de carbone sous forme minéral, et bactéries hétérotrophes ; utilisation de carbone sous forme organique. (**Clement et al 2011**).Elles prolifèrent dans les milieux les plus riches en azote et peu acides, un milieu aéré à pH supérieur à 6. Elles sont surtout abondantes autour des racines de certaines plantes (graminées, légumineuses) au sein de la rhizosphère. (**Duchaufour, 2001**).



A. Azotobacter



B. Rhizobium



C. Clostridium

Figure 8: (A, B et C). Bactéries du sol (G : 40 × 10) (Hamlaoui et Lemkeddem., 2016).

2.4 Clostridium :

Clostridium est un genre bactérien regroupant des bacilles gram positifs anaérobies strictement et sporulés. Ils assurent généralement leur mobilité par des flagelles péritriches. Les cellules reproductives, dites forme végétative, ont la forme d'un bacille(figureA). Leurs endospores ont

une forme de quille ou de bouteille, ce qui les distingue des autres endospores bactériennes, Généralement de forme ovoïde. Les différentes espèces de *Clostridium* vivent dans les sols ou le tube digestif des animaux, humains inclus (**Kang et al., 2005**).

2.4.1 *Staphylococcus* :

Staphylococcus aureus est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,5 μm à 1,5 μm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture.

C'est une bactérie non mobile, sporulée et aérobie facultatif possédant une catalase. Les staphylocoques trouvés dans l'eau et sol proviennent principalement de la peau, de la bouche, du nez et de la gorge des baigneurs et occasionnellement d'une pollution fécale (**Chantigny et al., 2005**).

2.5 Rôles des bactéries dans le sol :

Les différents genres sont très inégalement représentés dans les divers types pédologiques. Parmi les Bactéries qui dominent souvent, on signalera plus particulièrement les *Pseudomonas* (**Alexander., 1961**), les bactéries sporulantes et notamment les *Bacillus* (**Holding et al, 1965**), les actéries corynéformes et notamment les arthrobacters (**Clark et al., 1967 , 1967**) qui ont relativement bien représentés les genres : *Clostridium*, *Achromobacter*, *Micrococci*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Sarcina*.

Les micro-organismes impliqués dans la fixation de l'azote (*Rhizobium*, *Clostridium*, *Azotobacter*, *Azotomonas*) et surtout ceux qui interviennent dans la nitrification (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) représentent, dans bien des cas, une faible fraction de l'ensemble des populations bactériennes (**Burges., 1965**); elles n'en jouent pas moins un rôle très important.

Bien qu'on ignore encore le rôle des *Myxobactéries fructifiantes* dans le sol, on peut penser qu'il n'est pas négligeable, car ces micro-organismes excrètent des enzymes extrêmement actives vis-à-vis des bactéries, notamment des bactéries Gram négatives et non pigmentées -, des Champignons et même des Nématodes (**Singhet et al, 1964 , 1963**).

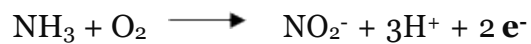
Les *Myxobactéries* cellulolytiques interviennent activement dans la dégradation des substances carbonées.

Les bactéries dans les sols peuvent être classées de plusieurs manières : sur la base de leurs caractéristiques (morphologie, métabolisme, ressources nutritives...), sur la base de leur

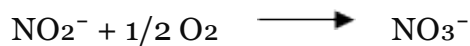
génome ou par grandes catégories de fonctions :

- **Les bactéries cellulolytiques** : elles dégradent la cellulose, qui est la molécule structurelle la plus abondante chez les végétaux.
- **Les bactéries pectinolytiques** : elles décomposent la pectine présente dans les parois cellulaires des plantes, pour produire des sucres simples et d'autres composés organiques.
- **Les bactéries ammonifiantes** : elles décomposent les matières organiques pour produire de l'ammoniac.
- **Les bactéries nitrifiantes** : elles oxydent l'ammoniac en nitrite, puis en nitrate selon les réactions chimiques suivantes :

1. Oxydation de l'ammoniac (NH₃) en nitrite (NO₂⁻) :



2. Oxydation du nitrite (NO₂⁻) en nitrate (NO₃⁻) :



- **Les bactéries fixatrices d'azote** : elles sont notamment les bactéries symbiotiques localisées dans la rhizosphère des plantes cultivées. (Virginie. R., 2018)

2.5.1 Les mycètes ou champignons :

Des eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires, comprenant des espèces macroscopiques (Macromycètes) et d'autres espèces microscopiques (Micromycètes)(figure 09), qui ont un aspect filamenteux ou lévuriforme. (Tabuc, 2007).

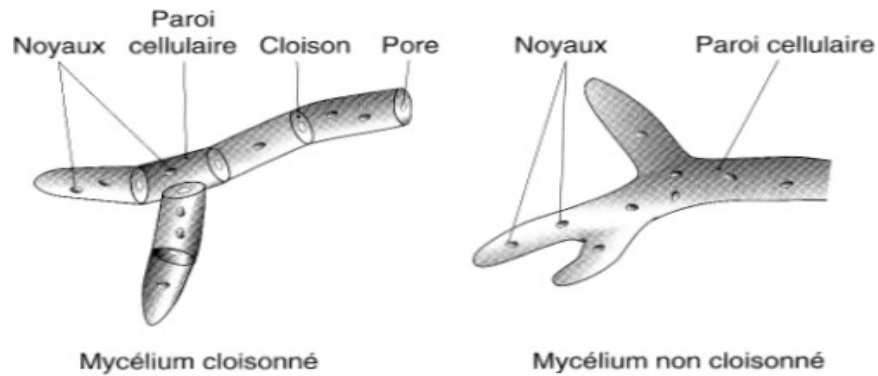


Figure 9: Les deux types de mycélium, cloisonné ou non

Les champignons du sol ou mycètes sont des levures, des champignons supérieurs et surtout des moisissures des genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Mucor*, *Trichoderma* (Soltner, 2005).

Tout comme les bactéries, les champignons sont présents dans le sol, (figure 9) l'eau et l'air. Le terme champignons englobe les cèpes, les morilles et autres espèces comestibles ou non qui sont constituées d'un chapeau et d'un pied.

2.5.2 Caractéristiques :

Ce sont des eucaryotes immobiles, aérobie stricte et rarement anaérobie, thallophytes, non chlorophylliens, chimio-hétérotrophe (Grigoriu et al., 1984)

2.5.3 Classification :

Les champignons comprennent quatre groupes (phylum) basés sur les différentes morphologiques de la reproduction sexuée (Evert et al, 2007) :

- **Les zygomycota** : produisent des zygospores dans des zygosporanges, sont sans flagelles (Yajuan et al, 2006).
- **Les ascomycota** : produisent des ascospores dans des asques.
- **Les basidiomycota** : les basidiospores sont produites sur des basides.
- **Les chytridiomycota** : produisent des cellules mobiles flagellées. Ils sont un groupe principalement aquatique dont c'est le seul groupe de champignons possédant des cellules reproductrices (zoospores et gamète) mobiles (Evert et al, 2007). De plus, lorsque la reproduction sexuée est inconnue, on parle de champignons imparfaits.
- **Les deuteromycota** : D'après (Bensmira et al., 2006) ils sont caractérisés par un thalle à mycélium septé ou unicellulaire (levures), une absence de reproduction sexuée connue et une reproduction asexuée par des conidiospores non

flagellé, parfois absente (mycélium stérile).



A. *Aspergillus* sp.



B. *Penicillium* sp.

Figure 10: (A et B) Champignons du sol (MBL, 2013)

2.5.4 Le genre *Aspergillus* ;

Constitué de plus de 300 espèces. Ces champignons sont ubiquitaires. Sur les matières organiques, les cultures se couvrent de spores qui se détachent et sont véhiculées par les vents (figure 10), les courants d'air aussi bien au niveau du sol que de la haute atmosphère. Le foin ou les grains moisissés sont très riches en spores.

2.5.5 Les moisissures :

Elles se présentent sous forme d'hyphes fongiques. Elles ont un rôle dans la stabilité des sols grâce à leurs liaisons avec les racines des plantes permettant l'enserrement des particules du sol ce qui fournit un environnement favorable à la croissance. On cite parmi les moisissures les plus rencontrées dans le sol : *Trichoderma lignorum*, *Mucor intermedius*, *Mortierella isabellina* (figure 11).

D'autres sont connues pour leur sécrétion d'exo enzymes qui hydrolysent la matière organique complexe (cellulose et lignine) et permettent la minéralisation du carbone, c'est le cas de *Phanerochaete* sp. (Adhya et al., 2018)

2.5.6 Les levures :

Ce sont la forme unicellulaire des champignons. Certaines variétés sélectives de levures favorisent la croissance des plantes par la suppression des agents pathogènes en synthétisant des antimicrobiens.

2.6 Rôle des champignons dans le sol :

Les champignons interviennent également dans la production de phytohormones, la solubilisation des phosphates, l'oxydation de l'azote et du soufre, la production de sidérophores (pour capter le fer) et la stimulation de la colonisation mycorhizienne des racines.

quelques souches sont des levures de biofertilisation. Parmi les espèces de levures les plus rencontrées dans le sol on cite :

Candida sp., *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Saccharomyces sp.* (Eman et al., 2008).

2.6.1 Actinomycètes :

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels. La grande majorité est d'origine tellurique. Ils sont également retrouvés dans des biotopes particuliers tels que les déserts chauds, les glaciers, les sites pollués par des hydrocarbures ou par des métaux lourds et les grottes naturelles (Lechevalier et al., 1981).

On peut définir les Actinomycètes comme des Eubactéries Gram positives à structure végétative de type mycélien (Stanier et al, 1966).page 23

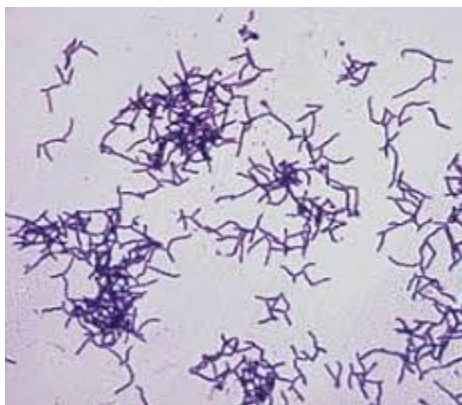


Figure 11: Observation microscopique des actinomycètes du sol.

Les Actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes donc ces micro-organismes, en effet, présentent des similitudes à la fois avec les Eubactéries et avec les Champignons.(figure 11)

Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le Bergey's manual (2007) renferme une seule classe : Actinobacteria,

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C%, allant de 51% chez certaines Corynebactéries à plus de 70% chez les genres Streptomyces et Frankia, (Ventura et al, 2007)(figure 12 et 13)



Figure 12 : La convergence morphologique des colonies du Champignon et de l'Actinomycète (Raper et Hopwood, in Stanier *et al*, 1966).

2.6.2 Classification :

On subdivise, en général, les Actinomycètes en quatre familles :

Tableau 3: - Les principaux genres d'actinomycètes (Stanier *et al* 1966)

Familles	Développent mycélien	Mode de reproduction	Acido-résistance	Autres caractères	Genres
Mycobactériacées	Transitoire limité	Scission binaire	+		<i>Mycobacterium</i>
Actinomycétacées (Proactino- des hyphes mycètes)	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	+ -	Aérobies	<i>Nocardia</i>
	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	-	Anaérobie	<i>Actinomyces</i>
Streptomycétacées	Extensif	Conidies	-	Conidies en chaînettes	<i>Streptomyces</i>
	Extensif	Conidies	-	Conidies isolées ou en groupe	<i>Micro- monospora</i>

Actinoplanacées	Extensif	Sporangiospores mobiles	-	Formation de sporange	Actinoplanes
-----------------	----------	-------------------------	---	-----------------------	--------------

2.6.3 Le genre *Pseudomonas* :

Les *Pseudomonas* appartiennent aux protéobactéries. Ce groupe englobe la majorité des espèces de bactéries phytopathogène : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* (**Schroth et al, 2006**).

Le groupe de *Pseudomonas* se compose de bâtonnet, gram négatif mobile non sporulant elles sont aérobies obligatoires, les *Pseudomonas* ont un métabolisme mésophile et chimio-organotrophe. Il est ubiquitaire et saprophyte de l'eau, des végétaux et des matières en décomposition (**Bossis et al, 2000**).

2.6.4 Le genre *Bacillus* :

Les *Bacillus* sont des bactéries à Gram⁺, appartenant à la famille des Bacillacées, de forme bacilles, elles sont aérobies ou anaérobies facultatifs, et tirent leur énergie de la respiration ou de la fermentation. Ces bactéries produisent des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables.

Elles jouent un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. L'espèce *Bacillus thuringiensis* se distingue des autres bacilles du groupe *cereus* par sa capacité à synthétiser et excréter des cristaux mortellement toxiques pour certains insectes. Ces cristaux agissent en détruisant les cellules de l'intestin moyen des larves des insectes atteints par ces toxines (**Kang et al, 2005**).

2.6.5 Classification de *Bacillus* dans le monde microbien :

Selon **Gordon et al. (2000)**, les espèces du genre *Bacillus* sont réparties en 3 groupes définis suivant la morphologie, la position et la déformation de la spore I

2.6.6 Le groupe I :

La clé de détermination des espèces du groupe I prend en compte la position de la spore qui est centrale ou terminale, sphérique ou ovoïde ne déformant pas la cellule. Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes

Le groupe IA :

Il est constitué des bacilles dont le diamètre est supérieur à 1µm et contenant des inclusions de poly-beta-hydroxybutyrate (*Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*)

Le groupe IB :

Rassemblant des Bacilles d'un diamètre inférieur à 1µm et dépourvus d'inclusions de poly-béta-hydroxybutyrate (*Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*)

Le groupe II :

Ce groupe est constitué des espèces à Gram variable, présentant une spore ovoïde, centrale ou terminale déformante (*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*)

Le groupe III :

Ce groupe est caractérisé par des bacilles à Gram variable et présentant une spore sphérique, déformante, terminale ou sub-terminale (*Bacillus fusiformis*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus sphaericus*)

2.6.7 Croissance :

Les bactéries du genre *Bacillus*, sont des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 °C, mais le genre contient également certains nombres d'espèces thermophiles avec température optimale plus de 65 °C. Au laboratoire, dans des conditions optimales de croissance, les espèces du genre *Bacillus* montrent des temps de génération d'environ 25 minutes (Todar, 2003).

2.6.8 Habitat :

L'habitat principal des *Bacillus* est le sol où ils jouent un rôle dans les cycles de carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologiques des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler à partir du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires (Tortora *et al*, 2003).

Les *Bacillus spp.* Sont également présentes dans l'air où ils viennent parfois contaminer les cultures en biotes de Pétri, en travaux pratiques de microbiologie, lorsque les consignes d'ensemencement ne sont pas parfaitement respectées (Camille, 2007).

2.6.9 Écologie :

Selon le microbiologiste Russe Winogradsky, les *Bacillus* appartiennent à la flore naturelle du sol. Ils deviennent métaboliquement actifs quand les substrats appropriés pour leur croissance sont disponibles. Ils forment des spores quand les éléments nutritifs sont épuisés. La formation des spores est associée avec la production d'antibiotiques (Todar, 2003).

2.6.10 Caractères cultureux :

Tous les *Bacillus* se développent sur tous milieux usuels non sélectifs. En bouillon, on observe un trouble floconneux avec un voile en surface ou des flocons qui sédimentent laissant le bouillon liquide dans le cas de *Bacillus anthracis*, les colonies

présentent une morphologie et une taille variable selon l'espèce, on obtient généralement des colonies assez volumineuses ayant tendance à s'étaler, plates, opaques à surface chagrinée, à bords un peu dentelés dans le cas de *Bacillus subtilis* (Jérôme *et al.*, 2004).

Les *Bacillus* présentent des types métaboliques variés et leur identification est complexe, cette dernière est basée sur les caractères biochimiques (Latour *et al.*, 1997)

2.6.11 Le genre *Streptomyces* :

Bactéries filamenteuses à Gram positif, formant un mycélium aérien ramifié, la Sporulation par fragmentation du mycélium aérien en spores, Productrices de nombreux antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines),

Les *Streptomyces* possèdent un large éventail d'enzymes, y compris des protéases, des lipases, des amylases, des cellulases, des chitinases, des xylanases, des pectinases, et bien d'autres encore. Cette diversité enzymatique leur permet de dégrader une variété de substrats organiques présents dans le sol, tels que les protéines, les lipides, les polysaccharides, les celluloses, les hémicelluloses, et les pectines.

2.6.12 Rôle des actinomycètes dans le sol :

Pendant longtemps, on a considéré que leur rôle dans le sol était négligeable, à cause de la lenteur de leur croissance et de leur faible pouvoir compétitif

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans les phénomènes de biodégradation et de transformation de la matière organique.

Ils peuvent dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries non-mycéliennes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, la chitine et les ligno-celluloses des plantes (Lechevalieret *al.*, 1981).

Il semble, au contraire, que leur action soit importante en raison de leur double aptitude:

1. Aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les Bactéries
2. Aptitude à produire des substances probiotiques, antibiotiques ou toxiques.

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes (50 à 75 %) des souches isolées sont productrices d'antibiotiques dont la streptomycine, la chlortétracycline, l'oxytétracycline, la cycloheximide).

2.7 Importance des microorganismes du sol :

2.7.1 Décomposition de la matière organique :

Les bactéries et les champignons sont les principaux agents de la décomposition des résidus

végétaux et animaux dans le sol. Ils sécrètent des enzymes extracellulaires (cellulases, protéases, lipases) qui dégradent les polymères organiques complexes (cellulose, lignine, protéines, lipides) en molécules simples assimilables.

2.7.2 Rôle dans les cycles biogéochimiques des éléments nutritifs :

Cycle de l'azote : Fixation de N_2 atmosphérique par les bactéries fixatrices (Rhizobium, Azotobacter), nitrification de l'ammoniac en nitrites (Nitrosomonas) puis nitrates (Nitrobacter) assimilables par les plantes.

- Cycle du phosphore : Minéralisation des phosphates organiques du sol par les enzymes des microorganismes.
- Cycle du soufre : Oxydation des composés soufrés par les bactéries sulfo-oxydantes (Thio-Bacillus).

2.7.3 Formation et stabilité de la structure du sol :

Les filaments fongiques et les sécrétions mucilagineuses des bactéries lient les particules de sol entre elles, favorisant la formation d'agrégats stables qui améliorent la structure du sol. Les champignons mycorhizes contribuent également à cette agrégation.

2.7.4 Interactions avec les plantes :

- Symbioses bénéfiques : Mycorhizes (champignons associés aux racines), fixation d'azote par les rhizobiums dans les nodosités racinaires des légumineuses.
- Pathogènes : Certaines bactérie (Agrobacterium, Erwinia) et champignons (*Fusarium*, *Pythium*) peuvent provoquer des maladies racinaires.

2.7.5 Biodégradation et bio remédiation :

De nombreux microorganismes du sol sont capables de dégrader des polluants organiques (hydrocarbures, pesticides, solvants) et des métaux lourds grâce à leurs enzymes et mécanismes de détoxification. Cela permet leur utilisation en bio remédiation des sols contaminés.

2.8 Les effets des microorganismes sur la structure du sol :

Dans les horizons humifères riches en calcium et en azote la forte activité biologique favorise la formation des biomolécules (notamment polysaccharides).

Ces biomolécules jouent le rôle principale dans l'édification des structures celles-ci sont composées par les acides humiques et les gels bactériens, à propriétés agglutinantes manquées (Chenu, 1989).

Le turnover des biomolécules forment le ciment des macros agrégat est beaucoup plus rapides que celui des constituants des micros agrégats (Duchaufour, 1991).

2.8.1 Les biomolécules :

Les biomolécules du sol sont des composés organiques produits par les organismes vivants du sol, y compris les microorganismes, les plantes et la faune du sol. Ces molécules jouent un rôle crucial dans de nombreux processus du sol et influencent sa fertilité, sa structure et son fonctionnement écologique.

Les biomolécules sont les principaux éléments de traitement de l'information de la matière vivante. La plus part de ces systèmes sont des polymères qui calculent leur propre structure en utilisant comme entrée des chaînes de caractères apparemment intégrées.

Les microorganismes du sol produisent une large gamme de biomolécules par des mécanismes complexes qui impliquent la biosynthèse, le métabolisme microbien et les interactions entre les micro-organismes *Protozoaire, champignons, levures*.

- Acides humiques et fulviques Ces composés organiques complexes résultent de la décomposition de la matière organique.
- Protéines et acides aminés Proviennent des organismes vivants et morts dans le sol.
- Polysaccharides Incluent la cellulose et l'hémicellulose, issus des débris végétaux.
- Lipides Présents dans les membranes cellulaires des microorganismes du sol.
- Acides nucléiques (ADN et ARN) Provenant des organismes vivants et morts.
- Lignine Un polymère complexe présent dans les parois cellulaires des plantes.
- Enzymes Catalysent diverses réactions biochimiques dans le sol. (Fundamentals of Soil Ecology (par D.C. Coleman et al. (2004).

Ces processus sont influencés par des facteurs environnementaux tels que la disponibilité des nutriments, la température, l'humidité et le pH du sol, ainsi que par la composition et la diversité de la communauté microbienne elle-même." (Insam, 1999).

2.8.2 . Principales enzymes produites dans le sol :

Il est probable que le sol contienne la majorité des enzymes produites par les végétaux, la microflore ou la microfaune ; cependant, seules certaines d'entre elles ont été identifiées jusqu'à présent. Nous présenterons ici quelques-unes des principales enzymes ou des complexes enzymatiques dont l'étude a servi de base à des recherches écologiques sur le sol : amylase, gélatinase, uréase, coagulase.

2.8.3 Amylase :

Produite par certaines espèces de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) et *Streptomyces*

2.8.4 Gélatinase :

1. Produite par les espèces de *Bacillus* et *Pseudomonas*

L'uréase :

C'est un enzyme qui hydrolyse l'urée en CO₂ et NH₃ et Produite par diverses bactéries *Proteus*, *Providencia*, certaines *Pseudomonas*

2.8.5 Coagulase :

Enzyme qui fait coaguler le plasma oxalaté ou citraté , et Produite par certaines espèces pathogènes de *Staphylococcus*. (Taylor et *al.*, 1991)

2.8.6 Chitinase :

La chitinase s'est avérée être une enzyme importante dans les outils de biocontrôle en agriculture ou enquêtes environnementales (**Jung et *al.* 2005**)

La bactérie *Virgibacillus marismortui* a été isolée de lacs peu profonds avec la capacité de produire de la chitinase (en absence de sel ainsi qu'en présence de haute salinité (25 à 30 % NaCl p/v). De telles souches peuvent être importantes à des fins de biocontrôle (**Essghaier et *al.* 2012**)

2.8.7 Cellulases :

Les cellulases sont connues comme des enzymes industriellement importantes dans le papier, l'agriculture, industries alimentaires et de blanchisserie. Une bactérie, *Halomonas sp.* Souche produit de la cellulase dans des conditions salines de 6 % de NaCl. L'activité maximale était à un pH de 7,1 (**Shivanand et *al.* 2013**).

2.8.8 Production de biomolécules protectrices :

Les micro-organismes halophiles appliquent deux stratégies principales en réponse à l'hyperosmolarité. Certains halophiles utilisent l'accumulation de sels dans le cytoplasme, appelés « sel dans ».mécanisme. Cette stratégie peut être trouvée chez les archées halophiles dans l'ordre Halanaerobiales .(**Ventosa et *al.* 1998**) et (**Antón et *al.*,2002**).

D'autres micro-organismes halophiles synthétisent des poids des composés osmorégulateurs connus sous le nom de solutés compatibles (**DaCosta et *al.* 1998**).

Il existe différentes classes de solutés compatibles, notamment les acides aminés et leurs dérivés (proline, glutamate, glutamine, ectoine et taurine), sucres (saccharose, tréhalose), méthylamines (glycine bêtaïne) et polyols (mannitol, érythritol, et glycérol) (**Oren et *al.*, 2002**)

Partie pratique

Chapitre III

Matériels et Méthode

3 Chapitre III : Materiel et methodes

3.1 Objectif de l'étude :

L'objectif de notre travail consiste à l'évaluation de la microflore du sol de la région de Khemis-Miliana ou a été a été réalisé un prélèvement du sol pour nous permettre une étude de la qualité microbiologique et la mise en évidence de la présence de biomolécules . Le travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la vie de l'université de Khemis-Miliana et au laboratoire de recherche production agricole et valorisation durable des ressources naturelles (PRAVDURN) durant la période de six mois depuis le mois de février jusqu' au mois de juin 2024.

3.2 Présentation de la zone D'étude :

Khemis Miliana est une ville d'Aïn Defla, située au nord de l'Algérie, à 190 km au sud-ouest d'Alger Elle est située à 20 km à l'est d'Aïn Defla, , 68 km de Blida, 50 km de Médéa et de 86 km de Chlef . Sa position centrale dans la wilaya et sa proximité avec les monts du Zaccar et la Métidja en font une zone d'étude intéressante. Les activités agricoles, l'élevage et l'industrie agroalimentaire offrent des sujets pour développement. Enfin (figure 12), les dynamiques sociales liées à l'urbanisation et aux mouvements de population constituent des

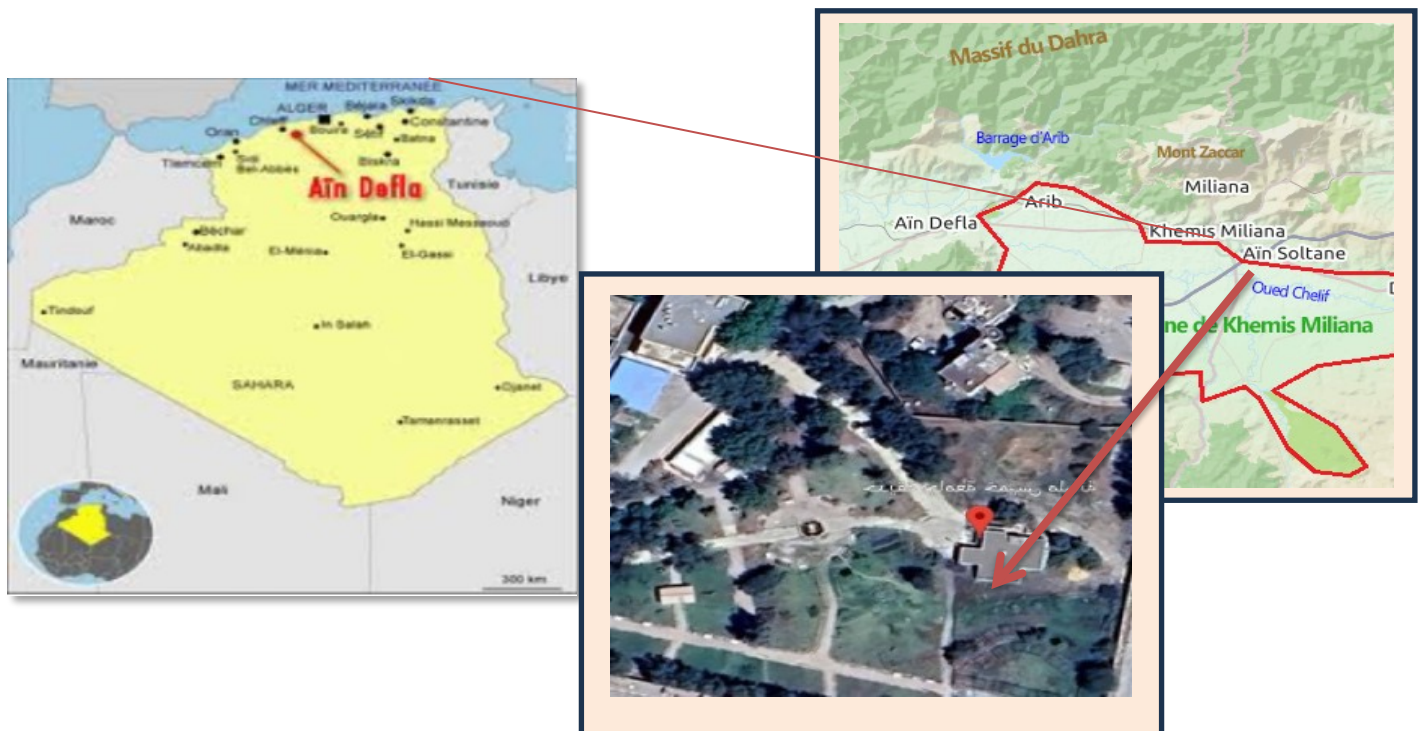


Figure 12: Carte de localisation de la wilaya d'Ain Defla

3.3 Climat :

La région de Khemis- Miliana, située dans les hautes plaines de la Métidja au nord de l'Algérie, connaît un climat semi-aride continental (**Sahnoune et al., 2013**) Les étés y sont chauds et secs, avec des températures maximales pouvant dépasser les 35°C (**Meddi et al., 2003**). Les hivers sont frais et humides, avec des températures minimales autour de 5°C et des précipitations sous forme de pluies (**Benmihoub, 2018**). La pluviométrie annuelle moyenne est d'environ 400 mm, avec une saison des pluies s'étalant de l'automne au printemps (**Halitim, 1988**).

Le climat est influencé par la proximité des monts du Zaccar au sud, créant un effet de foehn qui accentue la sécheresse estivale (**Azzazi et al., 2016**).

3.4 Zone expérimentale de la faculté de Khemis Miliana :

La zone expérimentale de la faculté de Khemis Miliana constitue de la zone d'étude elle est d'une superficie d'environ 5 hectares. La zone expérimentale est utilisée pour la recherche et l'enseignement en agriculture. C'est un outil précieux pour la recherche et l'enseignement en agriculture.

La zone expérimentale permet aux étudiants de se familiariser avec les pratiques agricoles et de mener des recherches sur les cultures et les techniques agricoles ,située a une altitude de 36°15'18.39'N et en Longitude 2° 14'26.52'E.

3.5 Échantillonnage :

Les échantillons ont été prélevés en date 25 /2/2024 à partir du site dans la région de khemis Miliana wilaya d'Ain Defla au niveau de la parcelle expérimentale de la faculté.

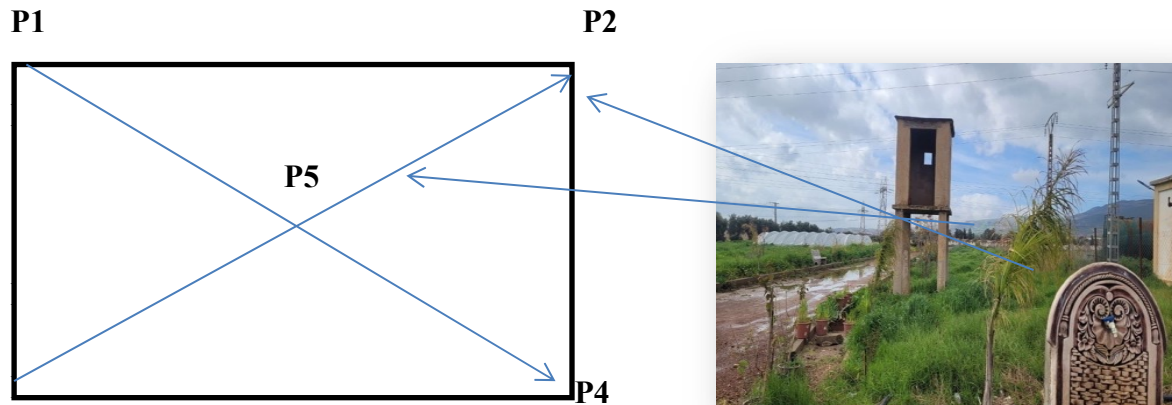


Figure 13: Zone expérimentale de la faculté de Khemis Miliana

L'échantillonnage de la zone d'étude est une étape importante pour la collecte de données. Trois types d'échantillons sont prélevés dans la zone d'étude (figure 13).

- Des échantillons de surface, prélevés à une profondeur de 0 à 05 cm
- Des échantillons de profondeur moyenne prélevés à une profondeur de 20 à 40cm.
- Des échantillons à une profondeur, de 40 à 60 cm

L'échantillonnage permettra de collecter des données sur les caractéristiques du sol sur toute la profondeur du profil du sol. Ces données permettront de mieux comprendre la qualité du sol, la disponibilité de l'eau. .

Pour chaque type d'échantillon, 10 à 20 échantillons seront prélevés aléatoire dans la zone d'étude.

La méthode d'échantillonnage permettra de collecter un échantillon représentatif du sol dans la zone d'étude. Le nombre d'échantillons à prélever est suffisant pour obtenir des résultats précis. Le prélèvement d'échantillons à des points aléatoires permettra de minimiser les biais dans les données collectées.

3.6 Matériels et méthodes :**3.7 Matériels et Milieux de culture :****3.7.1 Matériels :**

Verrerie courante et appareillage (Annexe I)

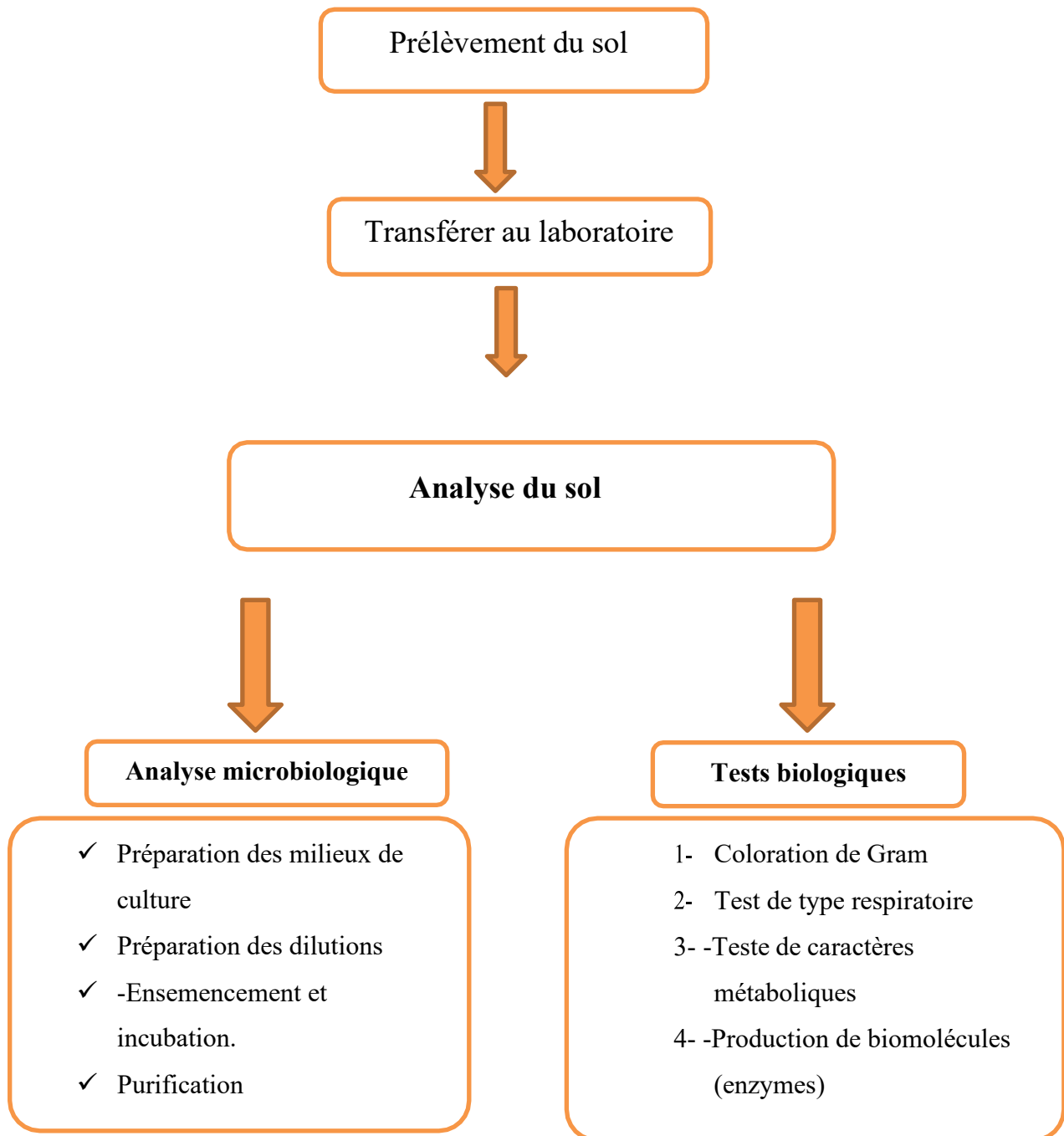
3.7.2 Milieux et produits chimiques : (annexe II)**3.7.3 Méthodes :**

Figure 14: Méthodologie de travaux

3.8 Préparation des dilutions :

La dilution est une méthode courante utilisée pour diminuer la concentration d'une solution (figure 15).

- Prélevez environ 1 grammes de sol et placez-le dans un tube stérile contenant 9 ml d'eau physiologique pour obtenir une suspension de base (10^{-1}),
- Agitez vigoureusement ou utilisez un agitateur pour bien disperser le sol dans la solution. Cela garantit que les micro-organismes sont libérés dans le liquide.
- Transférez 1 ml de la suspension de (10^{-1}) dans un premier tube contenant 9 ml d'eau physiologique, pour obtenir une dilution. 10^{-2} .

En prépre dans un portoir une série de 6 tubes.

- Prélever 1 ml de la dilution 10^{-1}
- transférer-le dans un autre tube à essai. Contenant 9 ml d'eau physiologique sterile
- Mélanger vigoureusement. La solution obtenue est une dilution 10^{-2} de l'échantillon de sol original. Répétez cette étape pour obtenir les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . 1

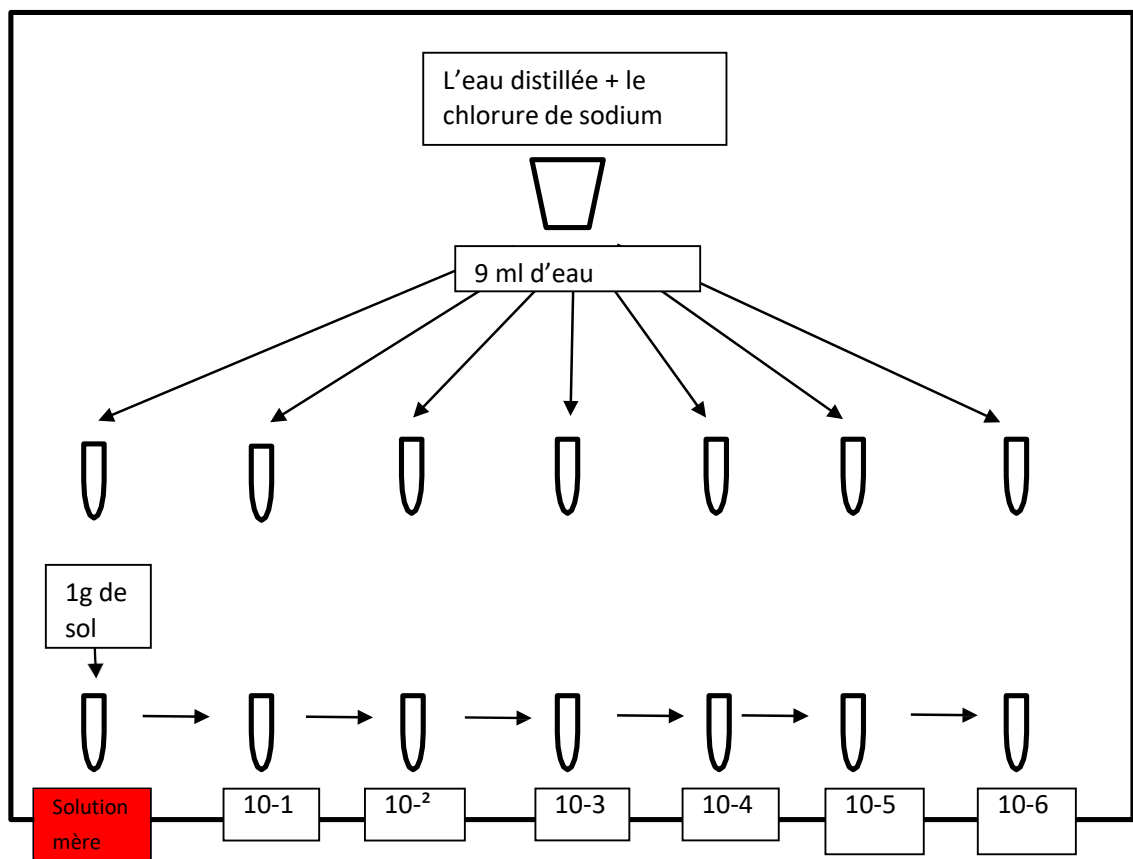


Figure 15: Schéma récapitulatif de la préparation de dilution



Photo A : Dilutions

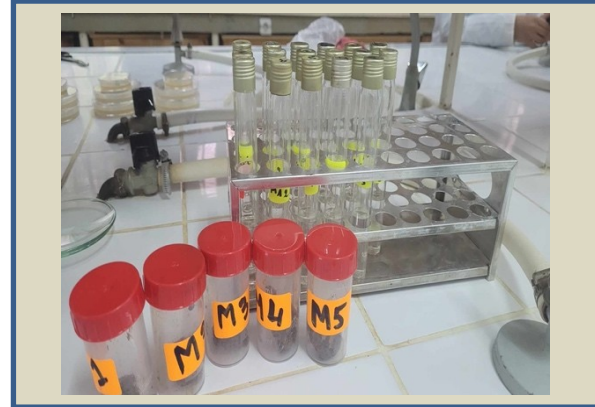


Photo b : Solution mère

3.9 Ensemencement :

Pour l'isolement et le dénombrement des microorganismes présents dans les échantillons de sols, une série de dilutions décimales a été préparée jusqu'à 10^{-6} pour chaque échantillon, comme décrit précédemment.



Figure 16: Les différents milieux de culture coulés en boîte de pétri pour la préparation l'opération de l'ensemencement

Ensuite, un volume de 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}) a été prélevé et ensemencé en surface sur des boîtes de Pétri contenant le milieu nutritif différents milieu Ont prélevé 0.1 ml de chacune des dilutions a été déposé, puis étalé uniformément avec un étaloir stérile par un mouvement de balayage et de rotation sur l'ensemble de la surface de la gélose (figure 16). Les colonies se développent sur la surface milieux de culture gélosés, en utilisant la technique

d'étalement par strie.

Les milieux utilisés sont la gélose Potato Dextrose Agar (milieu PDA) et la gélose Sabouraud, permettant la culture des champignons filamenteux et des levures, la gélose nutritive pour les bactéries hétérotrophes aérobies, et le milieu Benêt.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées à des températures et des durées appropriées pour chaque groupe microbien. L'incubation se fait à 37 °C pour les bactéries pendant 24 à 48 heures et 22 °C pour les champignons pendant 5 à 10 jours..

L'observation des colonies développées sur les différents milieux permet le dénombrement et l'isolement des souches microbiennes présentes dans les échantillons de sols étudiés, en vue de leur identification et caractérisation ultérieure.

3.10 Isolement :

La technique d'isolement consiste à prélever une colonie bien isolée à l'aide d'une anse de platine stérile, puis à l'étaler en stries serrées sur un milieu de culture approprié et frais. Après incubation des boîtes de Pétri ensemencées avec les dilutions de sols, les colonies microbiennes développées sur les différents milieux de culture.

Une observation minutieuse permet de distinguer des colonies présentant des caractéristiques morphologiques distinctes (forme, taille, couleur, texture, etc.) sur chaque. Pour chaque type de colonie, plusieurs isollements sont réalisés afin d'obtenir des cultures pures.

Après incubation, une colonie isolée issue de ces stries est à nouveau repiquée sur milieu frais afin de confirmer la pureté de l'isolat (Cappuccino et al., 2014).

Cette procédure d'isolement est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention de cultures pures pour chaque morphotype observé.

Les isolats purs sont ensuite conservés sur milieu gélosé incliné ou en suspension dans un milieu liquide additionné de glycérol à 20% pour leur préservation à long terme à -80°C (Sambrook et al., 2001).

3.11 Purification des isolats microbiens :

Après l'isolement, il est crucial d'obtenir des cultures microbiennes pures exemptes de contamination pour permettre une caractérisation fiable.

La purification a été effectuée en répétant le processus de repiquage par stries d'épuisement sur milieu frais jusqu'à l'obtention de colonies bien isolées et morphologiquement uniformes (Madigan et al., 2015).

Les colonies isolées ont ensuite été prélevées et transférées dans un milieu liquide approprié pour permettre leur multiplication.

Après l'incubation, une goutte de cette culture a été examinée au microscope afin de vérifier l'absence de contaminants et la pureté morphologique des cellules (**Cappuccino et al., 2014**).

Des repiquages successifs ont été réalisés jusqu'à l'obtention de cultures pures. Une fois purifiées, les souches seront réservées à la conservation (**Sammartino, 2018**).

La conservation assure la stabilité génétique et physiologique des isolats pour une utilisation ultérieure en toute sécurité (**Malik, 1990**).



3.12 Conservation :

Une fois les isolats microbiens purifiés, leur conservation à long terme est cruciale pour permettre leur utilisation ultérieure.

- ❖ Pour la conservation sur milieu gélosé incliné, chaque isolat a été strié sur un tube contenant un milieu gélosé approprié, généralement de la gélose nutritive. Après incubation permettant la croissance, les tubes ont été scellés avec du parafilm et conservés à 4°C. Cette méthode permet de maintenir les cultures viables pendant plusieurs mois grâce à la réduction du métabolisme à basse température (**Downes et al., 2001**).
- ❖ Pour la conservation dans des bouillons nutritifs, chaque isolat a été cultivé dans un milieu liquide jusqu'à l'obtention d'une culture dense. Ensuite, un cryoprotecteur tel que le glycérol a été ajouté à une concentration finale de 15 à 20% (v/v) avant la répartition dans des tubes et la congélation. Cette méthode assure une conservation à long terme des isolats, avec une meilleure protection contre les dommages cellulaires liés à la congélation (**Malik, 1990**).

3.13 Identification de la microflore isolée du sol :

3.14 Biodiversité morphologique :

3.14.1 -Études macroscopiques :

L'observation macroscopique des colonies microbiennes développées sur les milieux de culture gélosés constitue une étape cruciale pour leur identification présomptive. Dans cette étude, les boîtes de Pétri ensemencées avec les isolats ont été examinées attentivement après incubation. Plusieurs critères ont été pris en compte pour caractériser l'aspect macroscopique des colonies selon les recommandations de (Madigan *et al.*, 2015).

La forme des colonies (circulaire, irrégulière, filamenteuse, etc.), leur taille, leur relief (lisse, plissé, ombiliqué, etc.), leur texture (muqueuse, sèche, poudreuse, etc.) et leur pigmentation ont été soigneusement notés.

- ✓ Pour les colonies fongiques, une attention particulière a été portée à l'apparence du mycélium aérien, sa couleur et sa texture (cotonneuse, poudreuse, veloutée) comme décrit par Klich (2002) pour le genre *Aspergillus* et Lechevalier & Lechevalier (1967)
- ✓ Pour les actinomycètes la présence de structures de fructification ou de spores a également été examinée.
- ✓ Concernant les colonies bactériennes, leur opacité, leur aspect muqueux ou sec, ainsi que leur pigmentation ont été évalués conformément aux critères décrits par Claus & Berkeley (1986) pour le genre *Bacillus*.

Ces observations macroscopiques minutieuses ont permis une première discrimination des isolats en groupes morphologiques distincts, guidant les étapes ultérieures d'identification par des tests biochimiques et moléculaires.

Actinomycètes Après incubation, les colonies d'actinomycète morphologiquement distinct ont été prélevées sur les boîtes de gélose ISP. Ensuite, on purifie ces colonies par la méthode des stries répétées puis incubées à 30°C pendant 10 jours Les boîtes à culture pure sur milieu ISP ont été conservées à 4° C.

3.14.2 Champignons :

La conservation des souches ont été effectuée à 4 °C dans le milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Méthode présente un intérêt de conserver l'aspect des colonies et l'utilisation de la souche par repiquage directe mais elle nécessite des repiquages fréquents, tous les 6 mois environ.

3.14.3 Etude morphologique :

Plusieurs auteurs ont pu déterminer les genres des actinomycètes et les champignons à partir des caractéristiques morphologiques comme dont les travaux de (AOUICHE et al., 2012) Ce sont permis d'identifier le genre par simple observation macroscopique et microscopique des souches.

3.14.4 Caractérisation macroscopique

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation (aspect des colonies et des leurs revers, la taille et la couleur).

3.14.5 Etude microscopique

3.14.6 Observation microscopique :

L'observation de l'aspect microscopique des colonies obtenue est effectuée par l'examen à l'état frais et la coloration de Gram.

3.14.7 Examen à l'état frais :

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement (Bousseboua H., 2002). L'observation est réalisée comme suit :

Une petite goutte d'eau distillée stérile est déposée au centre d'une lame stérile ; une partie d'une colonie bactérienne pure est prélevée à l'anse et dissociée dans la goutte ; une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air ; l'observation microscopique est réalisée à l'objectif X40 puis X100, (Joffin et al., 2005)



Figure 17: microscope optique

3.15 Coloration de gram :

3.15.1 Technique :

La coloration de Gram est une technique de coloration différentielle fondamentale en microbiologie, permettant de distinguer deux grands groupes de bactéries selon la composition de leur paroi cellulaire. Cette méthode, mise au point par le microbiologiste danois Hans Christian Gram en 1884, repose sur la capacité des bactéries à retenir ou non le colorant violet de gentiane après un traitement à l'alcool (**Beveridge, 2001**).

3.15.2 Fixation :

Déposez sur une goutte d'eau physiologique une culture bactérienne sur une lame de microscope.

- Étalez la goutte en une couche mince sur la lame (l'étalement).
- Laissez sécher à l'air puis passez la lame à travers la flamme d'un bec Bunsen deux à trois fois pour fixer les bactéries (fixation thermique).

- la préparation fixée est couvrée avec du violet de gentiane et laissez agir pendant environ 1 minute après lavée à l'eau, ajoutez du lugol (iode) sur la lame, ce qui agit comme mordant. Le lugol aide à fixer le violet de gentiane dans les parois cellulaires. Laissez agir pendant 1 minute, Rincez brièvement avec de l'alcool (10-20 secondes). Cela va décolorer les cellules Gram négatif, mais pas les Gram positif,

Appliquez de la fuchsine pour environ 1 minute. Puis rincer

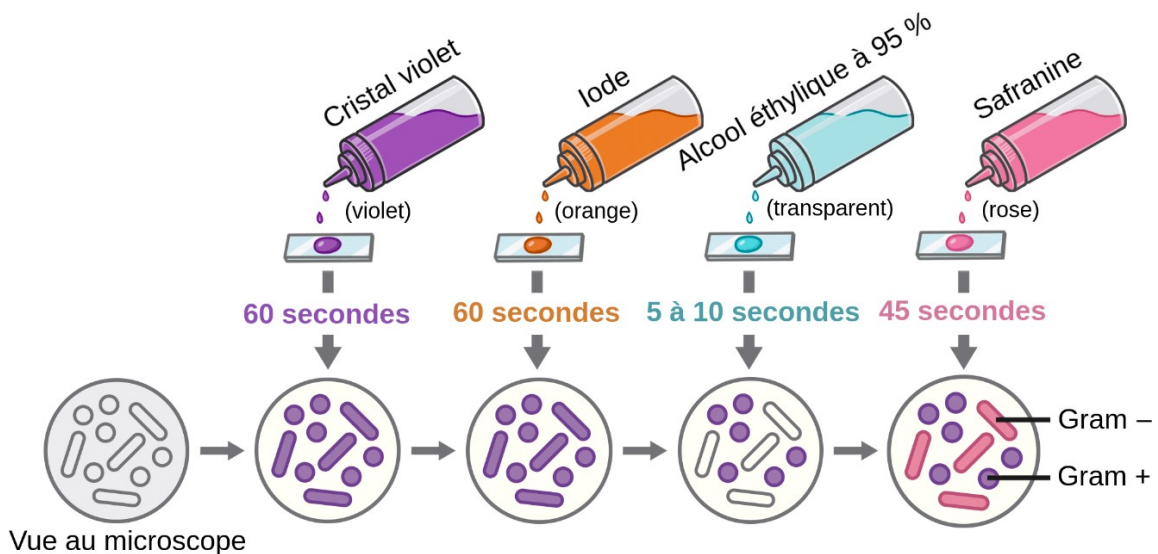


Figure 18: Protocol de gram (Beveridge, 2001).

3.15.3 Lecture :

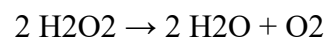
L'étape de la coloration secondaire permet de colorer les cellules Gram négatif en rose, tandis que les Gram positif restent violets. Après coloration, les bactéries Gram-positives apparaissent en violet foncé, tandis que les Gram-négatives sont teintées en rouge ou rose par le colorant de contraste. Cette différenciation offre une première identification présomptive des bactéries et guide les investigations ultérieures.

3.16 Etude du type respiratoire :

3.16.1 Test catalase :

3.16.1.1 Principe :

Le principe repose sur la capacité de la catalase, présente chez certaines bactéries, à décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène gazeux selon la réaction suivante .Le test de la catalase est une méthode biochimique couramment utilisée en microbiologie pour détecter la présence de l'enzyme catalase chez les bactéries.



3.16.1.2 Technique :

La technique consiste à déposer une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 3% sur une culture bactérienne fraîche ou une colonie isolée.

Déposez une goutte de peroxyde d'hydrogène .Prélevez une colonie de bactéries à tester avec une anse stérile. Etalez la colonie sur une lame de microscope propre.

3.16.1.3 Lecture :

La présence de bulles d'oxygène indique une réaction positive. Si aucune bulle n'apparaît, le test est négatif.

3.16.2 Test oxydase :

3.16.2.1 Principe :

Le principe repose sur la capacité de ces enzymes à transférer des électrons de la bactérie vers un accepteur artificiel d'électrons. Le test de l'oxydase est une méthode d'identification biochimique utilisée pour détecter la présence de cytochromes oxydases dans certaines bactéries.

3.16.2.2 Technique :

- Appliquez une goutte de réactif d'oxydase sur la colonie bactérienne.
- Prélevez une colonie de bactéries à tester à l'aide d'une anse stérile et déposez-la sur le réactif

3.16.2.3 Lecture :

Si la bactérie est positive pour l'enzyme cytochrome oxydase, la zone en contact avec le réactif prendra une couleur violet dans les 10 à 30 secondes suivant l'application de la colonie et l'absence de la coloration : oxydase négatif



Aspect du test négatif



Aspect du test positif

Figure 19: Test de l'oxydase

Les bactéries aérobies strictes ou certaines bactéries anaérobies facultatives possèdent généralement des cytochromes oxydases impliqués dans leur chaîne respiratoire aérobie. Un test oxydase positif est donc attendu pour ces groupes bactériens. En revanche, la plupart des bactéries anaérobies strictes, incapables de respirer l'oxygène, ne contiennent pas ces enzymes et donneront un résultat négatif (Madigan et al., 2015).

Le test de l'oxydase est rapide, simple et peu coûteux à réaliser. Il fournit une caractérisation préliminaire des capacités respiratoires des bactéries isolées, complémentaire au test catalase, et oriente leur identification ultérieure par d'autres méthodes.

3.17 Étude du métabolisme :

3.17.1 Fermentation des sucres TSI :

3.17.1.1 Principe :

C'est la mise en évidence de la fermentation des sucres (lactose, saccharose, glucose)

3.17.1.2 Technique :

Ensemencer par piqure centrale avec pipette pasteur stérile on ferme le tube et l'incuber à 37°C pendant 24 heures

3.17.1.3 Lecture :

La fermentation des sucres se manifeste par l'acidification du milieu et entraîne un changement de la couleur vers le jaune (*Massad, 1999*).

3.17.2 Test Mannitol mobilité:

3.17.2.1 Principe

Les tubes mannitol sont ensemencés par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur, puis incubés à 30°C pendant 24h, l'utilisation du mannitol se manifeste par le virage de la couleur de l'indicateur de pH, du rouge au jaune et la mobilité se manifeste par un trouble toute au tour de la piqure centrale (*annexe4*). (*Joffin et al., 2006*).

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur, Il est utilisé pour l'étude de deux caractères qui sont :

- La fermentation du mannitol : lors de l'utilisation du mannitol il y a acidification du milieu et l'indicateur du pH (le rouge de phénol).
- La mobilité : s'exprime par l'apparition d'un trou au milieu dû à la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement.

3.17.2.2 Technique :

- Réaliser une piqure centrale à travers le milieu, à l'aide d'une pipette Pasteur contenant quelques gouttes de la suspension bactérienne ;
- Incuber à l'étuve à 37°C durant 18 à 24 heures.

3.17.2.3 Lecture :

- **Mannitol positif** : virage du milieu au jaune (acidification) :
- **Mannitol négatif** : Le milieu garde sa couleur initiale (rouge) :
- Culture dans toute la gélose (trouble) et diffusion à partir de la piqure : bactérie mobile.
- Culture le long de la piqure seulement et pas de diffusion : bactérie immobile.

3.17.3 Croissance sur milieu ISP 7 :

Le milieu ISP7 (milieu à la tyrosine) est utilisé pour caractériser les actinomycètes, particulièrement les Streptomyces, en évaluant deux propriétés clés qui sont la production de pigments mélanoides et la capacité à dégrader la tyrosine

3.17.3.1 Principe :

- La tyrosine sert de substrat pour la tyrosinase, une enzyme produite par certains actinomycètes
- La dégradation de la tyrosine et l'oxydation des produits résultants peuvent conduire à la formation de pigments mélanoides

3.17.3.2 Technique :

- Inoculation de la culture sur le milieu ISP7
- Incubation à 28°C pendant 7 à 14 jours

3.17.4 Lecture :

- Observation régulière de la croissance et des changements de coloration

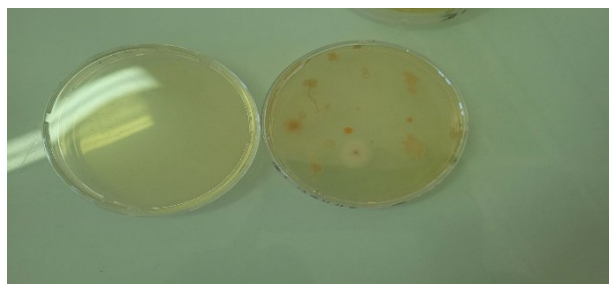


Figure 20: observation de milieu ISP 7 avant et après développements

3.18 Croissance sur milieu ISP5 :

Le milieu ISP5, également connu sous le nom de milieu glycérol-asparagine, est un milieu de culture important utilisé dans le cadre du projet international Streptomyces (International Streptomyces Project). Le milieu ISP5 est principalement utilisé pour évaluer la production de pigments solubles par les actinomycètes, en particulier les Streptomyces, observer les caractéristiques de croissance et la morphologie des colonies et fournir des données standardisées pour la classification et l'identification des espèces d'actinomycètes.

3.18.1 Principe :

- Le glycérol sert de source de carbone

- L'asparagine fournit une source d'azote
- La composition favorise la production de pigments solubles

3.18.2 Technique :

- Inoculation de l'organisme sur le milieu ISP5
- Incubation à 28°C pendant 7 à 14 jours
- Observation régulière de la croissance et de la pigmentation :

3.18.3 . lecture :

Positif : Diffusion de pigments colorés dans le milieu (jaune, orange, rouge, bleu, vert, etc.)

Les Caractéristiques de la croissance :

- Morphologie des colonies (taille, forme, texture, couleur)
- Vitesse de croissance
- Production de mycélium aérien et de spores

Négatif : Absence de pigments diffusibles

3.19 Croissance sur milieu de l'amidon :

3.19.1.1 Principe :

Le test de l'amidon avec lugol est une méthode simple et couramment utilisée pour détecter la présence d'amidon.

3.19.2 Technique :

Après ensemencer les souches (19 souches) et les incuber à 24 heures à 37 C° on ajoute quelque goutte de solution de lugol à l'échantillon

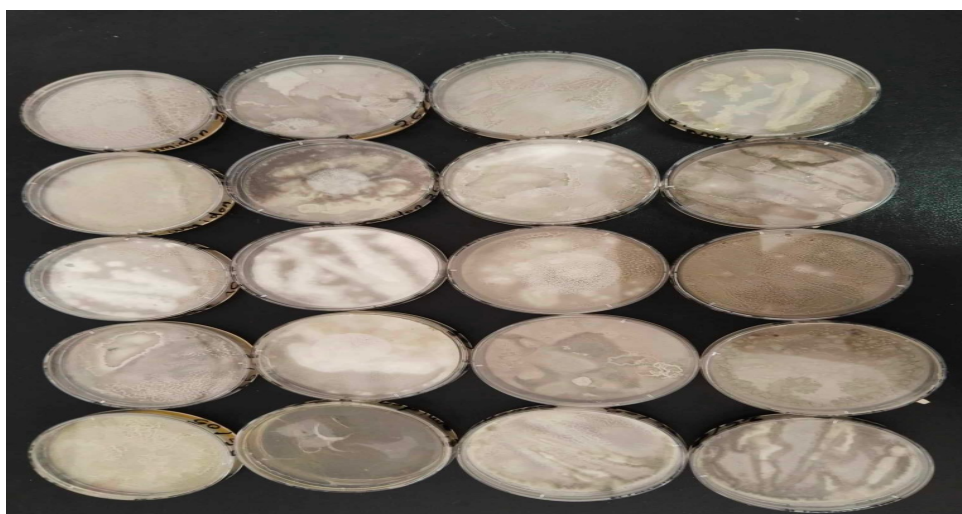


Figure 21: aspect de la croissance sur milieu gélose à l'amidon

3.19.3 Lecture :

Observez le changement de couleur. La présence d'amidon se manifeste par un changement de couleur de l'échantillon vers le bleu-noir.

Couleur bleu noire : présence d'amidon confirmée

Aucune réaction (pas de changement de couleur) : absence d'amidon

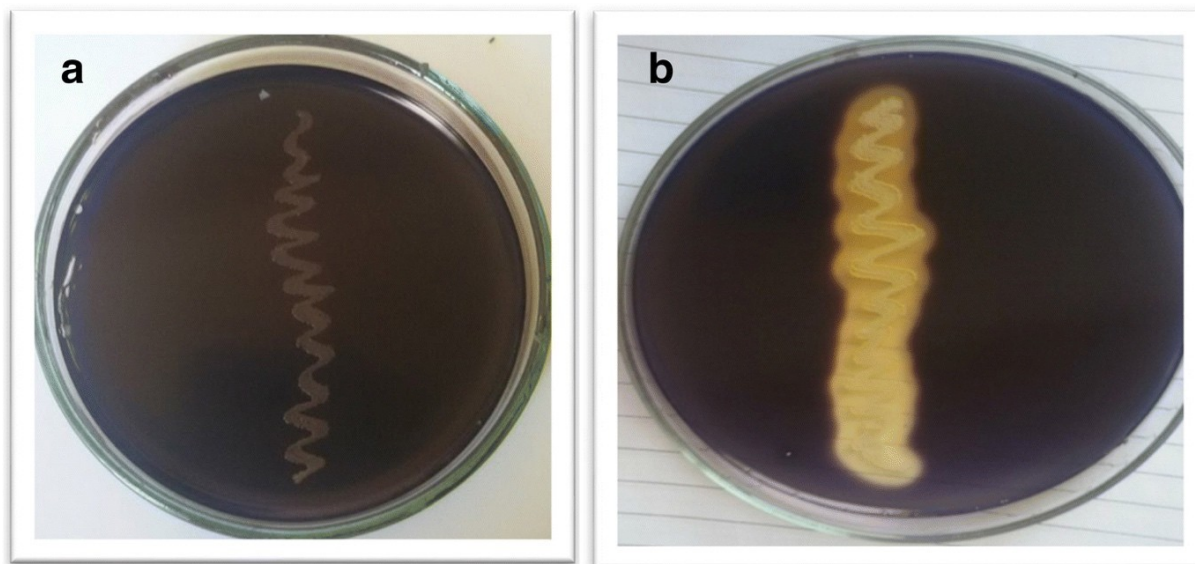


Figure 22: Le premier isolat (a) est négatif pour l'hydrolyse de l'amidon, ce qui signifie qu'il ne produit pas l'enzyme amylase nécessaire pour dégrader l'amidon.

3.19.4 Recherche de l'amylase :

3.19.4.1 Principe :

Le test de l'amidon avec lugol est une méthode simple et couramment utilisée pour détecter la présence d'amidon.

3.19.4.2 Technique :

Après ensemencer les souches (19 souches) et les incuber à 24 heures à 37 C° on ajoute quelque goutte de solution de lugol à l'échantillon.

3.19.4.3 Lecture :

Observez le changement de couleur. La présence d'amidon se manifeste par un changement de couleur de l'échantillon vers le bleu-noir.

. Couleur bleu noire : présence d'amidon confirmée

. Aucune réaction (pas de changement de couleur) : absence d'amidon

3.20 Test d'urée indole :

3.20.1 Principe :

Le milieu urée-indole per et de mettre en évidence trois caractères : l'uréase l'indole et la TDA. L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. L'ammoniac alcalinise le milieu et entraîne le virage du rouge de phénol (indicateur du pH) au rose-rouge. L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, le tryptophane.

Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs. Le tryptophane désaminase (TDA) est une enzyme qui dégrade (désamination) le tryptophane en acide indole-pyruvique. En présence du perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indole-pyruvique donne un précipité brun-noir caractéristique.

3.20.1.1 Technique :

- Mettre 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne dans le milieu urée-indole.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.
- virage de la couleur : indique une réaction positive
- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs pour la mise en évidence de l'indole.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de perchlorure de fer (réactif de TDA) pour la mise en évidence du tryptophane désaminase.

3.20.1.2 Lecture :

- Virage du milieu au rose-rouge : uréase positive.
- Le milieu a une teinte jaune : uréase négative.

Après ajout du réactif de Kovacs :

- Formation d'un anneau rouge à l'interface : indole positif.
- Absence d'anneau rouge (anneau marron) : indole négatif.

Après ajout du perchlorure de fer (réactif de TDA) :

- formation d'un précipité brun-noir : bactérie TDA positive.
- Coloration jaune : bactérie TDA négative.

3.21 Test de gélatinase:

3.21.1 Principe :

Pour détecter l'enzyme gélatinase

3.21.2 Technique :

A l'aide d'une micropipette on prend une suspension bactérienne et on vaensemencer par l'addition 1ml de la suspension dans le tube qui contient le milieu « gélose». Incubation à 37 °C pendant 24 heures.

3.21.2.1 Lecture :

- Si le milieu est un peu solide : résultats positifs et donc la gélatinase dégrade la gélatine
- Si le milieu reste liquide : résultats négatifs

3.21.3 Identification biochimique par la Galerie api :

La galerie API est la première galerie miniaturisée d'identification biochimique de bactéries.

Elle remplace les galeries traditionnelles en tubes, apportant un nombre plus important de caractères et donc une meilleure identification, une standardisation, une approche différente de la méthode d'identification avec une approche probabiliste.



Figure 23: Galerie API 10S + API 20E

3.21.3.1 Technique :

-**Préparation de la galerie** : Répartir un peu d'eau dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.

-Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.

-Déposer la galerie de façon stérile dans la boîte Inoculation de la galerie. .

-Ensemencer la galerie avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée.

Sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule. Tenir la boîte, légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles.

-Pour les caractères encadrés (CIT, VP, GEL) : remplir entièrement la cupule (tube et orifice) mise en aérobiose.

-Pour les autres caractères, ne remplir que le tube.

Pour les caractères soulignés (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE) : remplir l'orifice de la cupule avec de l'huile de vaseline stérile mis anaérobiose (Substrats spécifiques de la galerie API 20^E (annexe)

Pendant l'incubation, le métabolisme des glucides par exemple produit des acides organiques qui font virer les indicateurs du pH. La lecture de galerie a été faite après 24 h d'incubation à 30°C, en notant les virages du négatif au positif de chaque puits.

3.21.4 L'antibiogramme :

L'antibiogramme sert à orienter le schéma thérapeutique, à étudier la résistance aux ATB des souches isolées et à faciliter la surveillance épidémiologique de la résistance. L'antibiogramme est réalisé par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé de Mueller-Hinton

3.21.4.1 Principe :

Est un test utilisé pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne à divers antibiotiques.

3.21.4.2 Technique :

Après la préparation des suspensions bactériennes dans le bouillon nutritif pour chaque souche (19 souches) et incubation à 37 °C pendant 24 heures

Par micropipette on prend une suspension bactérienne de chaque solution de la souche et on la transfère dans une boîte pétrie contenant le milieu MH

Flamber la pipette pasteur et former le rateau passez le rateau doucement sur la surface de la gélose pour répartir uniformément les bactéries.

3.21.4.3 Application des disques d'antibiogramme :

Utilisez des pincettes stériles pour disposer les disques d'antibiotiques sur la surface de la gélose. Assurez-vous de placer les disques à égale distance les uns des autres et à au moins 24 mm du bord de la boîte. Incubez les boîtes de pétri à 35 -37 °C pendant 16 à 18 heures.

3.21.4.4 Lecture :

Les zones d'inhibition sont mesurées en millimètres et comparées aux standards pour déterminer la sensibilité ou la résistance :

Sensibilité : grande zone d'inhibition.

Résistance : petite ou absence de zone d'inhibition. aucun effet antimicrobien.

Sur cette image, de nombreuses bactéries se développent jusqu'au disque, bien que la pelouse de bactéries soit légèrement éclaircie. Il n'y a pas d'effet antimicrobien enregistrable.

Résistance ou repousse potentielle

Un rayon est nettement éclairci, même si de nombreuses colonies s'y développent. Il pourrait s'agir de colonies de bactéries résistantes ou d'une repousse de bactéries suite à la décomposition de l'agent antimicrobien. Dans tous les cas, ce test serait normalement répété en laboratoire car il n'y a pas de zone d'inhibition manifeste enregistrable.

On discerne une zone d'inhibition, mais elle est très petite et quelques colonies se développent autour de la plaque. Si on devait avoir une certitude, cette ambiguïté conduirait à un nouveau test. Il n'y a pas de zone manifeste ici.

Véritable zone d'inhibition.

Il y a ici une zone manifeste avec seulement quelques petites irrégularités aux contours. La zone exempte de bactéries serait mesurée sur son diamètre et correspondrait à la taille de la zone.

Chapitre IV :

Résultats et discussion

III. Résultats :

4

4.1 Introduction :

Dans ce chapitre nous allons présenter, discuter et interpréter les résultats des analyses microbiologiques du sol de la zone expérimental afin de déterminer les différents groupes des microorganismes qui sont présent et d'apprécier la biodiversité du sol et mettre en évidence les biomolécules qui sont produites par ces microorganismes tels que les enzymes .Les résultats s'appuient sur l'isolement de 19 souches

4.2 Résultats

4.2.1 l'isolement des microorganismes

Tableau 4: Résultats des pourcentages de distribution des microorganismes (champignons, d'actinomycètes et de bactéries) à différentes profondeurs.

Profondeur	Champignons (%)	Actinomycètes (%)	Bactéries (%)
Surface (0-10 cm)	50-70	10-20	70-90
Médiant (10-20 cm)	20-40	20-30	50-70
Profond (>30 cm)	5-20	30-40	40-60

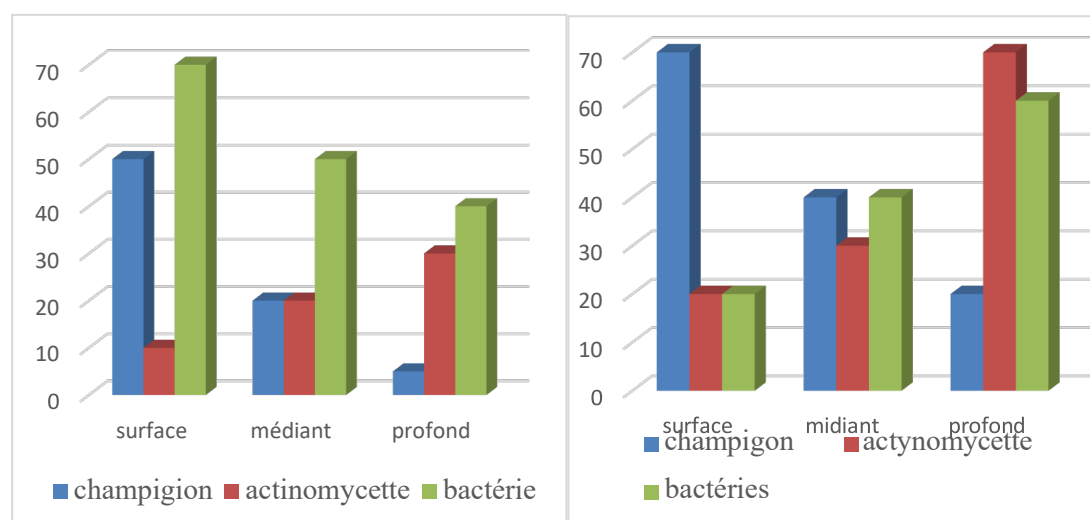


Figure 25: Distribution des microorganismes dans le sol

La distribution verticale des microorganismes dans le sol révèle une stratification marquée des communautés microbiennes. En surface (0-10 cm), on observe une prédominance des bactéries (environ 70%) et des champignons (50%), tandis que les actinomycètes sont faiblement représentés (10%). Cette répartition évolue significativement avec la profondeur. Dans la zone médiane (10-20 cm), la proportion de bactéries diminue à 50%, celle des champignons chute à 20%, alors que les actinomycètes augmentent à 20%. Dans les couches profondes (>30 cm), cette tendance s'accroît : les bactéries ne représentent plus que 40% de la population microbienne, les champignons déclinent à 10%, tandis que les actinomycètes prolifèrent jusqu'à 30-35%. Cette stratification reflète l'adaptation des microorganismes aux gradients environnementaux du sol, notamment en termes d'oxygène, de nutriments et d'humidité. Les bactéries, ubiquistes mais sensibles aux variations des conditions du milieu, dominent à toutes les profondeurs tout en diminuant progressivement. Les champignons, principalement aérobies et dépendants de la matière organique fraîche, sont confinés aux couches supérieures. Les actinomycètes, plus adaptés aux conditions oligotrophes et moins sensibles aux variations d'oxygène, augmentent leur prévalence avec la profondeur. Cette répartition souligne l'importance de considérer la dimension verticale dans l'étude des écosystèmes microbiens du sol et leurs rôles dans les cycles biogéochimiques.

4.3 Études macro et microscopique :

4.3.1 II.1. Études macroscopique :

Plusieurs isolats microbiens sont obtenus à partir des échantillons du sol des différents points prospectés.

- ❖ L'isolement des actinomycètes : sur milieu PDA GN la plupart des colonies des différentes souches sont filamenteuses ont poussé de façon abondante ou modérée.
- ❖ L'isolement des champignons à partir des sols a permis d'obtenir une croissance fongique sur le milieu PDA avec une densité de croissance qui décroît de la dilution la plus faible vers la dilution la plus forte.
- ❖ L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées a permis de classer les microorganismes en trois types : bactéries, actinomycète, champignons.

Une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après (*Joffin et al., 2001*), les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies : punctiforme, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies par la mesures du diamètre : petite ; moyenne ou grande taille.
- La pigmentation : couleur de la colonie.
- L'élévation : bossue, convexe, plane.
- L'opacité : opaque, translucides, transparente
- Aspect : lisse, rugueuse, sèche.

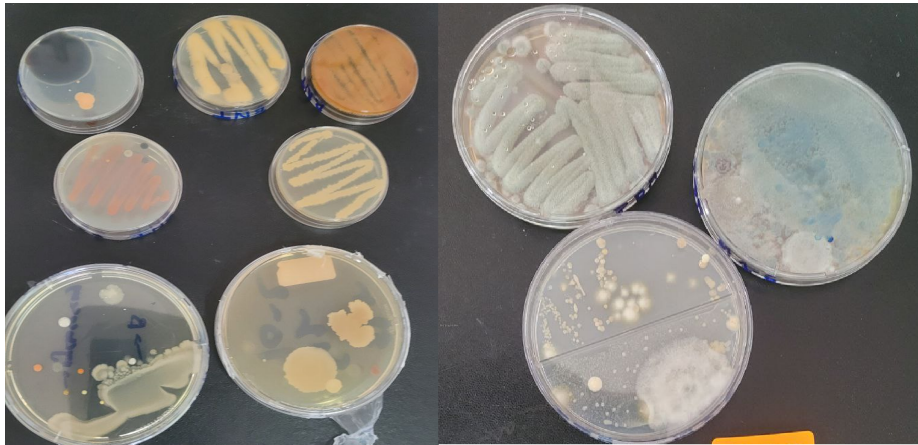


Figure 26:colonie sur milieu PDA et BNT

4.3.1.1 Actinomycètes

Selon Bendob (2015) Il y'a formation du mycélium aérien et du mycélium de substrat avec filaments très fins considères. Selon la couleur du mycélium nous avons divisé en 4 groupe : blanc, brun, rouge orange, avec un groupe vert grisâtre.

Selon Bougrid et Karabi le mycélium aérien est forme de chaines courtes de spores ovales et d'autres souches présentes un mycélium aérien forme de chaines régulières et courtes des pores cocodès.

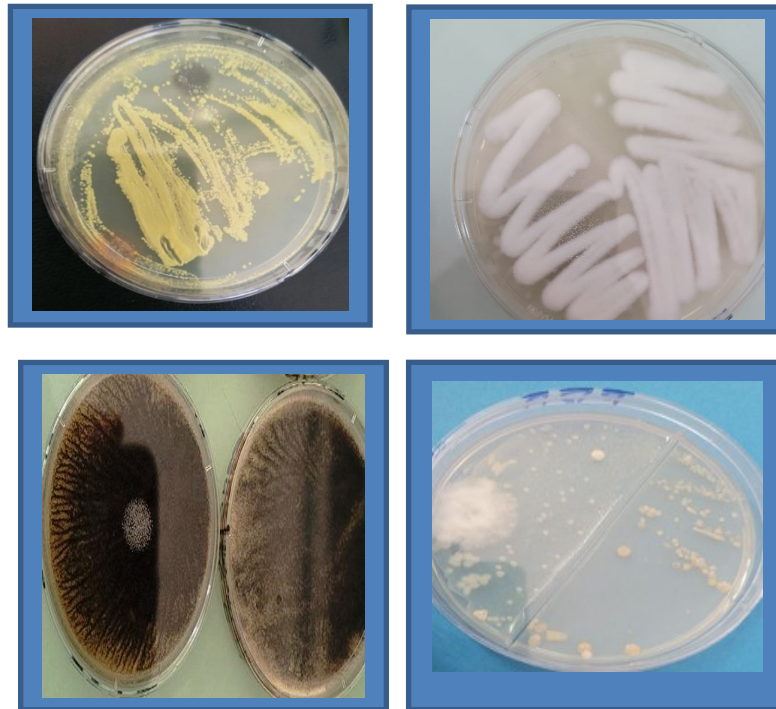


Figure 27: aspect des actinomycètes sur culture

4.3.1.2 !-Les bactéries :

Tableau 5: Etude macroscopique des bactéries .

Colonies	Forme de colonies	Bords des colonies	Elévation	Texture
Crème à jaunâtre	Grandes, irrégulières	Ondulés à lobés	Plate à convexe	Sèche, rugueuse
Translucide à opaque	Petites, rondes	Entiers, réguliers	Plate	Lisse, brillante
Blanche à colorée	Petites, crayeuses	Irréguliers, dentelés	Bombée à pulvérulente	Poudreuse à crayeuse
Vert	Moyennes à grandes, rondes	Entiers, réguliers	Plate à légèrement convexe	Lisse, brillante

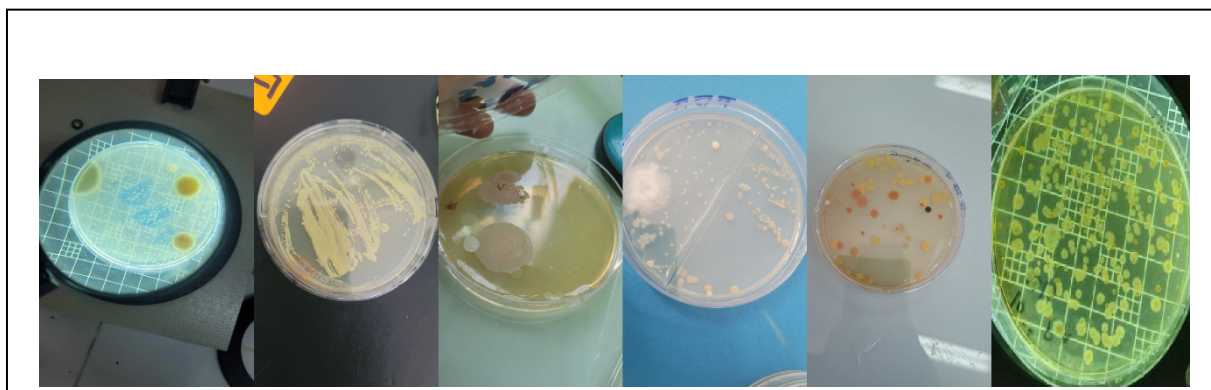


Figure 28: Etude macroscopique des champignons

4.3.1.3 Les champignons :

Tableau 6: étude macroscopique des champignons.

mycelium	Texture	La Taille	La Forme	L'aspect
Noir	Couche Mince	Grand	Ronde	Filamenteuse
Vert	Epaisse	Moyenne	Ronde	Rondie
Blanche et noire	Couche Mince	Grande	Ronde	Rigeux
Blanche	Epaisse	Moyenne	Filamenteuse	Liss

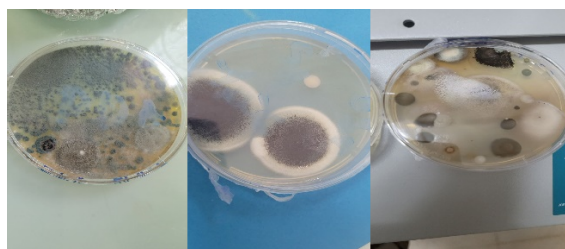


Figure 29: Aspect macroscopique des colonies des champignons sur milieu PDA

4.3.2 II.2. Études microscopiques

4.3.2.1 2.1- Coloration de Gram :

La coloration de Gram est une technique clé en bactériologie permettant de différencier deux grands groupes bactériens selon la structure de leur paroi cellulaire : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les bactéries Gram-positives retiennent le colorant cristal violet lors de la décoloration à l'alcool, apparaissant ainsi violettes au microscope. Leur paroi est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycanes.

A l'inverse, les bactéries Gram-négatives se décolorent à l'alcool mais captent la coloration de contraste*++++++*+complexe est constituée d'une fine couche de peptidoglycanes entourée d'une membrane externe.(figure 27)

D'après ces résultats, les 8 isolats étudiés appartiennent au groupe des bactéries à Gram positif. Cela suggère qu'ils possèdent des parois riches en peptidoglycanes et dépourvues de membrane externe.

Cette coloration apporte donc une première indication sur la structure pariétale de ces isolats, orientation utile pour leur identification et la compréhension de leurs propriétés.

L'examen microscopique de la préparation après coloration de Gram a révélé la présence de bacilles à Gram négatif et positif

. Les bactéries observées se présentent sous forme de bâtonnets allongés, colorés en rose clair et en mauve caractéristique typique des microorganismes. Ces bacilles sont visibles soit isolés, soit arrangés en courtes chaînettes, et sont distribués de façon relativement homogène sur le champ microscopique. L'absence d'autres morphologies ou types de coloration suggère une culture pure.

La taille des bacilles observés est compatible avec celle de nombreuses espèces bactériennes d'intérêt clinique ou environnemental . La qualité de la préparation, caractérisée par un bon contraste et une coloration uniforme, permet une interprétation fiable de ces observations. Ces résultats, bien que préliminaires, orientent vers l'identification d'une espèce bactérienne à, potentiellement appartenant aux familles des de Pseudomonadaceae Gram négatif et Bacillus Gram positif , nécessitant des tests biochimiques et moléculaires complémentaires pour une identification précise.

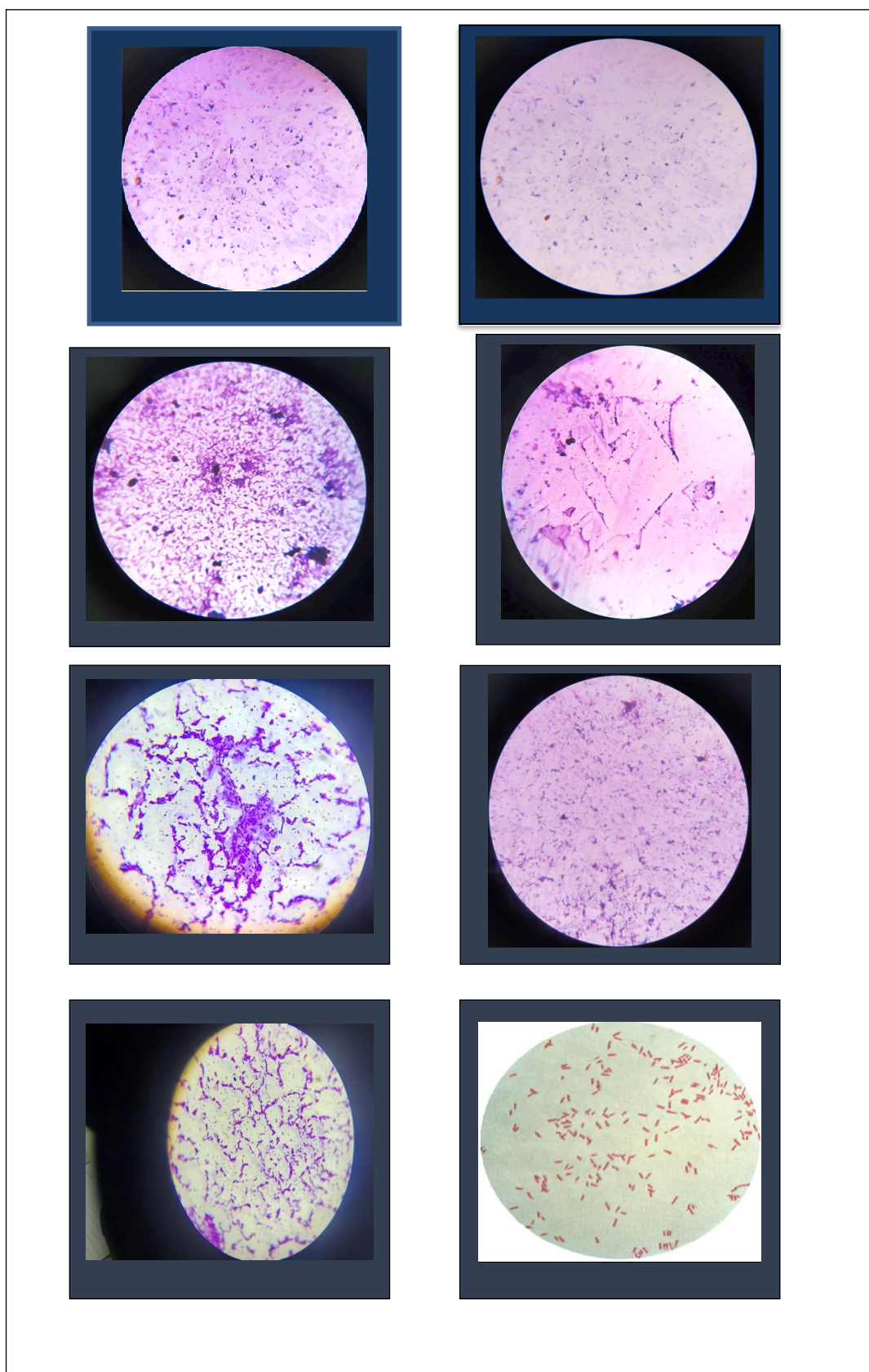


Figure 30:observation microscopique après coloration de Gram

4.3.3 -Identification biochimique :

Les tests biochimiques effectués pour l'identification des isolats /S 1,S2, S3, S5 S 6 S 7 et S 8 et leurs résultats sont résumés dans le tableau 07

4.3.3.1 Résultat test catalase :

Suite à l'ajout de peroxyde d'hydrogène nous a remarqué la présence des bulles d'oxygénase qui prouve que la bactérie possède la catalase .



Figure 31: Résultat test oxydase

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour l'orientation des bactéries gram-, permettant de différencier si elle est entérobactéries (oxydase négative) ou non entérobactérie (oxydase positive) (tortora et al., 2003). Le résultat de test oxydase des souches bactériennes est présenté dans le tableau dans la majeure partie positive ce qui nous a menés à réaliser API 20 NE (destiné à l'identification des non entérobactéries).

4.3.3.2 Teste oxydase :



Figure 32:Résultat du test oxydase (Photo originale),.

A. Témoin (-) ; B. Après l'ajout de la souche

Tableau 7: tableau des resultat catalase et oxydase

Isolats Test	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉
CATALASE	+	+	-	+	+	+	-	-	+
OXYDAS	+	-	+	+	+	-	+	+	-

Tableau 8: résultats de la coloration de gram, TSI et MANITOL

Souche	Test gram	TSI	Mannitol
Souche1	+	+	-
Souche2	+	-	+
Souche3	+	-	+
Souche4	+	-	+
Souche5	+	-	+
Souche6	-	-	+
Souche7	+	-	+
Souche8	-	+	
Souche9	+	+	+



Figure 33: Résultats de test mannitol mobilité



Figure 34: résultats de test TSI

Tableau 9: résultat de test enzymatique

	Urée indole	Gélatine	L'amidon
souche1	-	-	-
souche2	-	+	+
souche3	-	+	-
souche4	+	-	-
souche5	+	+	-
souche6	-	+	-
souche7	-	+	-
souche8	+	+	-
souche9	+	-	-

**Figure 35: résultats de test de gélatinase**

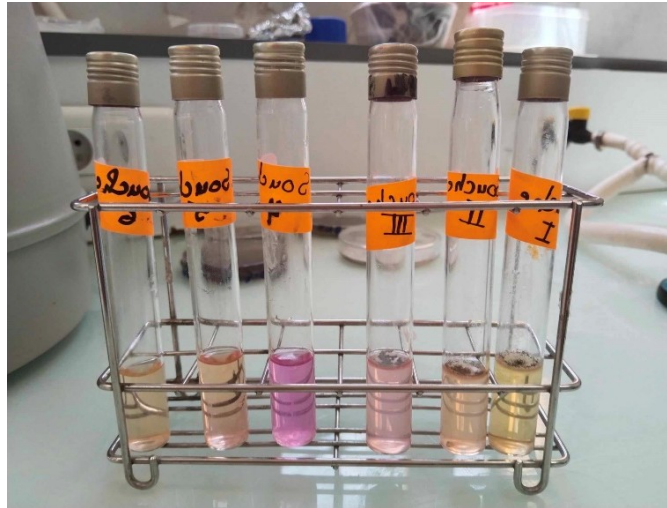


Figure 36: résultats de l'uréase



Figure 37: résultats de l'amylase

4.3.4 Croissance sur milieu gélose à l'amidon :

Certaines souches ont bien dégradé l'amidon après ajout de lugol ; résultats positifs sont traduits par coloration violette.

L'étude de la croissance microbienne sur milieu gélosé à l'amidon a révélé des résultats significatifs concernant la capacité des souches isolées à utiliser l'amidon comme source de carbone. Après une période d'incubation de 48 à 72 heures à 30°C, les colonies bactériennes

présentant une activité amylolytique ont été identifiées grâce à la formation de zones claires autour des colonies, suite à l'ajout d'une solution d'iode. Parmi les souches testées, 60% ont montré une activité amylolytique positive, avec des halos d'hydrolyse variant de 5 à 15 mm de diamètre. Les souches les plus performantes, notamment S3 et S7, ont présenté des zones de clarification supérieures à 12 mm, indiquant une forte production d'enzymes amylolytiques. Ces résultats suggèrent un potentiel intéressant pour l'exploitation de ces microorganismes dans des applications biotechnologiques liées à la dégradation de l'amidon, telles que la production de bioéthanol ou d'enzymes industrielles. De plus, la diversité des profils d'activité amylolytique observée parmi les souches étudiées souligne la richesse enzymatique de la microflore du sol de Khemis Miliana.

4.3.5 Croissance sur milieu ISP7 :

L'utilisation du milieu ISP7 permet d'observer plusieurs caractéristiques clés des actinomycètes. Premièrement, la production de pigments mélanoides se manifeste par une coloration brune à noire du milieu autour des colonies, tandis que son absence indique un résultat négatif (**Shirling et al., 1966**). Deuxièmement, la dégradation de la tyrosine est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies, son absence signalant un résultat négatif (**Goodfellow et al., 2010**). Les caractéristiques de croissance, telles que la morphologie des colonies (taille, forme, texture), la vitesse de croissance et la production de pigments diffusibles autres que mélanoides, fournissent des informations supplémentaires pour l'identification (**Kämpfer, 2012**). Il est important de noter que ces résultats peuvent varier en fonction des conditions d'incubation et de l'âge de la culture, comme l'ont souligné (**Barka et al., 2016**) dans leur revue sur l'écologie des actinobactéries. L'interprétation de ces résultats, en conjonction avec d'autres tests biochimiques et moléculaires, permet une caractérisation plus précise des espèces d'actinomycètes (**Goodfellow et al., 2012**).

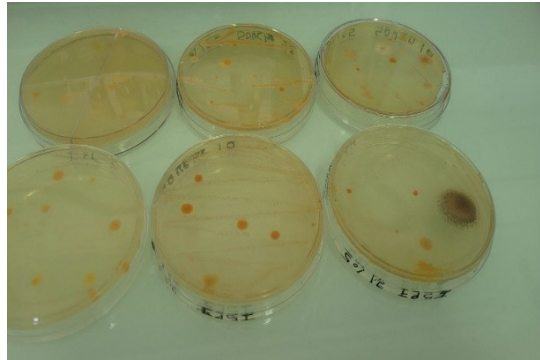


Figure 38: Résultat de test de pigmentation I

La production de pigments et les caractéristiques de croissance aident à la différenciation et à l'identification présomptive des espèces

Les résultats sont généralement comparés avec ceux obtenus sur d'autres milieux ISP pour une caractérisation plus complète

4.4 Résultats de la galerie API :

Les résultats de l'identification bactérienne par la galerie API (Systèmes d'Identification Analytique)

- Ces résultats biochimiques, combinés au code numérique obtenu, permettent d'identifier présomptivement la souche comme étant *Streptococcus salivarius* selon la base de données API.

Cependant, une confirmation par d'autres méthodes comme le séquençage d'ADN serait recommandée pour une identification définitive





Figure 39: Résultats du test galerie API 20 E

L'identification présomptive selon la base de données API10s et 20E : a permis de d'identifier un pourcentage de 99,9%). (Tableau 9)

Tableau 10: Résultats des tests biochimiques de la GalerieAPI 20 E pour l'identification des souches.

	<i>S1</i>	<i>S2</i>	<i>S3</i>	<i>S4</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>
Coloration de gram	+	+	+	+		
<i>ONPG</i>	*	+**	—	—	—	+
<i>ADH</i>	+	+	+	+	—	—
<i>LDC</i>	+	—	—	+	—	—
<i>ODC</i>	+	—	—	+		—
<i>CIT</i>	+	+	+	+	+	—
<i>H2S</i>	—	—	—		—	—
<i>UREE</i>	—	—	—		—	—
<i>TDA</i>	—	—	—	—	—	—
<i>INDOLE</i>	—		—	—	—	—
<i>VP</i>	—	—	+	+	—	+
<i>GEL</i>		+	+	+	+	+
<i>GLU</i>	—	+	—	—	+	+
<i>MAN</i>	—		—	—	—	—
<i>INO</i>	—	—	+	+	—	+
<i>SOR</i>		+	+	+	+	+
<i>RHA</i>	—	+	—	—	+	+
<i>SAC</i>	—	—	—	—	+	+
<i>MEL</i>		+	—	—	+	—
<i>AMY</i>	+	+	—	—	+	+
<i>ARA</i>	+	+	—	—	+	+
<i>OX</i>	+	+		+	—	+

Test positif +. Test négatif _

4.5 Resultat de l'antibiogramme :

Colonne 1	OF5	ceftazi dine	Kana mycin e	Rifam ycine	Penici ling	Fusdic acid	Cepha lexine	Cefoxl istime	Clindamy cine
S1	35	R	15	R	18	18	25	R	R
S2	30	10	27	23	R	16	25	29	R
S 3	30	R	30	21	30	15	3	28	19
S4	39	R	34	20	19	R	R	32	R
S 5	42	R	28	22	R	21	27	25	R
S6	32	2	32	23	18	21	3	25	R
S 7	34	10	28	11	26	17	28	60	18
S8	R	R	R	22	33	23	28	25	14
S 9	R	R	16	16	R	13	R	R	30

La détermination du genre est effectuée selon la clef, proposée par (Muthuvel et al.,2013)

Sensible : Si la zone d'inhibition ≥ 15 mm

Résistante : S'il n'y a pas de zone d'inhibition

Intermédiaire : Si le diamètre de zone d'inhibition < 15 mm

Le tableau montre les diamètres des zones d'inhibition (en mm) pour 9 souches bactériennes testées contre 9 antibiotiques différents.

4.5.1.1 Observations générales :

Sensible : Si la zone d'inhibition ≥ 15 mm

Résistante : S'il n'y a pas de zone d'inhibition

Intermédiaire : Si le diamètre de zone d'inhibition < 15 mm

Les résultats de l'antibiogramme réalisé sur neuf souches bactériennes contre neuf antibiotiques différents révèlent des profils de sensibilité variés. L'antibiotique OF5 s'est montré généralement efficace, avec des zones d'inhibition allant de 30 à 42 mm pour la plupart des souches, à l'exception des souches 8 et 9 qui présentent une résistance. La ceftazidine a montré une efficacité limitée, avec cinq souches sur neuf présentant une

résistance. La kanamycine a démontré une bonne efficacité contre la majorité des souches, sauf pour la souche 3 qui présente une zone d'inhibition de seulement 3 mm. La rifamycine et la pénicilline ont montré des efficacités variables selon les souches. L'acide fusidique et la céphalexine ont généralement présenté des zones d'inhibition modérées, tandis que le cefoxlistime s'est révélé efficace contre la plupart des souches, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 60 mm pour la souche 7. La clindamycine s'est avérée largement inefficace, avec une résistance observée dans sept souches sur neuf. Les souches 8 et 9 ont montré des profils de multirésistance préoccupants, étant résistantes à plusieurs des antibiotiques testés. Ces résultats soulignent l'importance d'une surveillance continue de la résistance aux antibiotiques et la nécessité d'une approche personnalisée dans le choix des traitements antibiotiques.

- La sensibilité varie considérablement entre les souches pour les antibiotiques.
- Certains antibiotiques tels que ceftazidine semblent largement inefficaces.
- D'autres (de la familles de kanamycine, Rifamycine) montrent une efficacité variable.

Points notables :

- OF5 semble être efficace contre la plupart des souches, sauf les souches 8 et 9.
- La clindamycine est largement inefficace, ne montrant une activité que contre 3 souches.
- La cefoxlistime présente une efficacité relativement bonne, avec un point d'interrogation pour la souche 8.

Résistances multiples :

- La souche 9 semble être la plus résistante, ne montrant que de faibles zones d'inhibition pour quelques antibiotiques.
- La souche 1 montre également une résistance significative à plusieurs antibiotiques.

Sensibilités notables :

- La souche 3 semble être la plus sensible, montrant des zones d'inhibition pour tous les antibiotiques testés.

Cette analyse fournit un aperçu des profils de résistance et de sensibilité des souches testées. Pour une interprétation clinique précise, il faudrait comparer ces résultats aux valeurs seuils standardisées pour chaque antibiotique.

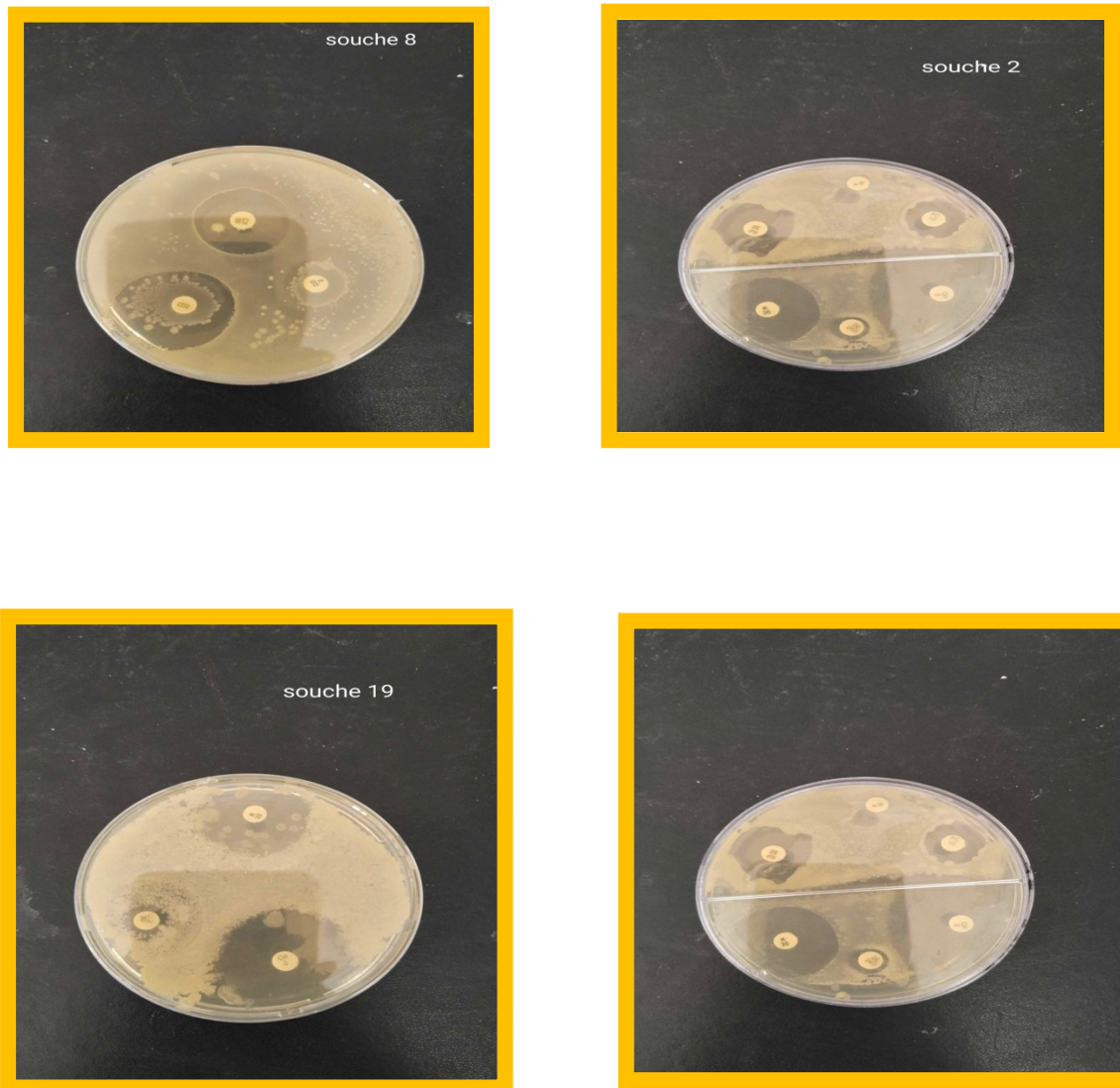


Figure 40: resultat de l'antibiogramme

- ✓ La détection d'une sensibilité diminuée aux pénicillines est effectuée en routine à l'aide d'un disque d'oxacilline (1 µg ou 5 µg) selon les critères suivants : oxa 1 µg ³ 11 mm ou oxa 5 µg ³ 18 mm, souche sensible aux pénicillines ; oxa 1 µg < 11 mm ou oxa 5 µg < 18 mm, sensibilité diminuée à la pénicilline G et/ou amoxicilline à confirmer par la détermination des CMI. La résistance à haut niveau aux pénicillines par production de bêta-lactamase est extrêmement rare. Elle est détectée par une technique chromogénique.
- ✓ Remarques : selon les antibiotiques, la corrélation entre CMI et diamètres est parfois difficile à établir. En cas de doute sur les résultats obtenus par diffusion en milieu gélosé, il y a lieu de déterminer les CMI par une méthode de référence ou toute méthode ayant montré, pour les antibiotiques concernés, son équivalence avec la méthode de référence. (1) Pour *Campylobacter* spp., une absence de zone d'inhibition autour des disques de b-lactamines, aminosides, macrolides ou quinolones traduit une résistance de haut niveau. (2) Compte tenu des conditions d'incubation (anaérobiose ou microaérobiose), les diamètres des zones d'inhibition autour des disques d'aminosides sont toujours réduits.
- ✓ Seule la détermination de la sensibilité à l'érythromycine est judicieuse. La diffusion en milieu gélosé n'est pas recommandée pour tester la sensibilité à l'amoxicilline de *Helicobacter pylori* car pour l'instant, quelques souches de sensibilité diminuée (CMI > 0,1 mg/L) ont été décrites, mais il ne paraît pas utile de conditionner l'utilisation de l'amoxicilline aux résultats d'un test in vitro.

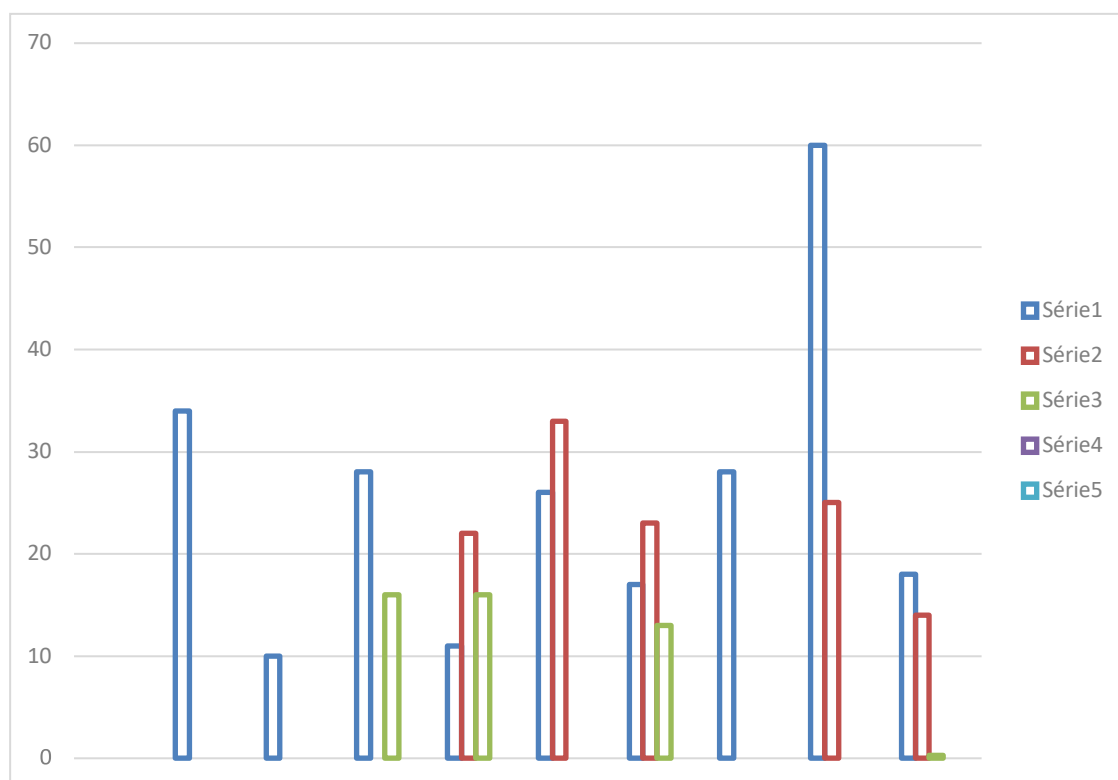
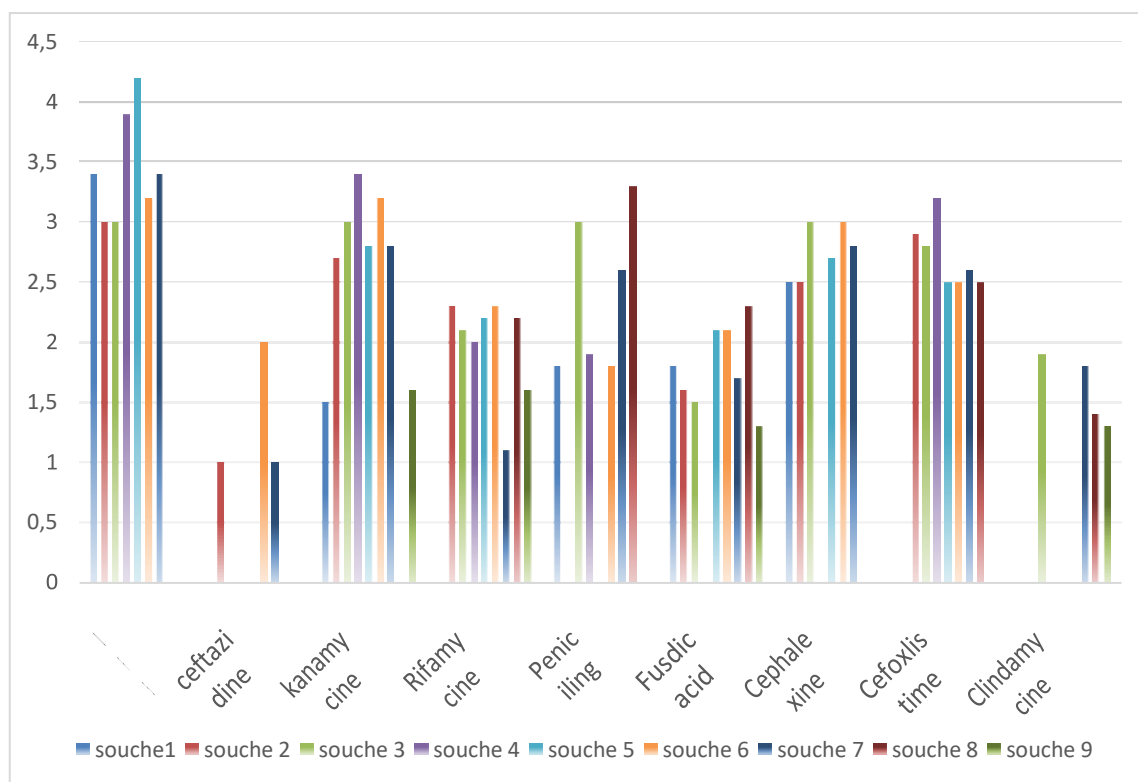


Figure 41: Histogramme de résultat de l'antibiogramme en milieu gélosé des souches isolées (diamètre des zones d'inhibition en mm)

L'observation d'une croissance des souches fongiques sur la boîte ensemencée par la dilution 10^{-4} et une faible croissance pour la boîte ensemencée par la dilution 10^{-2} , alors qu'aucune croissance n'a été observée pour les boîtes ensemencées par les dilutions 10^{-6}

L'antibiogramme réalisé sur neuf souches bactériennes différentes révèle une hétérogénéité marquée dans la sensibilité aux antibiotiques testés. L'antibiotique OF5 se distingue par son efficacité globale, démontrant une activité inhibitrice significative sur la majorité des souches, à l'exception notable de la souche 9. En revanche, la ceftazidime présente une efficacité limitée, voire nulle, sur l'ensemble des isolats. La kanamycine, la rifamycine et la céfoxlistime montrent une efficacité modérée mais variable selon les souches. La pénicilline et l'acide fusidique présentent des profils d'activité irréguliers, tandis que la céfalexine maintient une bonne efficacité sur un large spectre de souches. La clindamycine, quant à elle, s'avère peu efficace sur la majorité des isolats. Cette diversité de réponses souligne l'importance cruciale des tests de sensibilité individuels, mettant en lumière la complexité de la résistance aux antibiotiques. L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques a mis en évidence une résistance marquée à la famille des β -lactamines (pénicillines et céphalosporines) pour la majorité des 8 isolats testés. Une résistance partielle aux quinolones et à certains aminosides a aussi été observée.

Néanmoins, plusieurs souches se sont révélées sensibles à des antibiotiques comme l'acide nalidixique, la streptomycine, la gentamicine, le chloramphénicol ou l'amoxicilline/acide clavulanique. Ces résultats soulignent l'importance d'un usage raisonné des antibiotiques et la nécessité de surveiller l'émergence de résistances dans les populations microbiennes environnementales.

En conclusion, cette étude a permis d'isoler et de caractériser partiellement la diversité microbienne présente dans les sols étudiés, mettant en évidence la présence de genres bactériens et fongiques d'intérêt. Des analyses complémentaires par des approches moléculaires seraient utiles pour une identification définitive des souches. L'antibiogramme a souligné l'importance de surveiller l'émergence de résistances aux antibiotiques de ces microorganismes environnementaux.

4.6 Isolement et identification des microorganismes

Au total, 19 souches isolées à partir des échantillons de sol. parmi les quelles 09 ont été étudiées. L'observation macroscopique des colonies a révélé une diversité de formes, tailles, pigmentations et textures. Certaines colonies étaient punctiformes, d'autres irrégulières ou filamenteuses. Les couleurs observées variaient du blanc au noir en passant par le vert et l'orangé. Des critères comme l'élévation, l'opacité et la rugosité ont également été notés.

Des tests d'identification biochimique classiques ont ensuite été réalisés sur 09 isolats représentatifs. Parmi ces tests, on peut citer la recherche d'activités enzymatiques (oxydase, catalase, gélatinase), la fermentation de sucres (glucose, mannitol, etc.), la décarboxylation d'acides aminés, la production d'indole ou encore l'hydrolyse de l'urée. Les profils obtenus ont orienté vers plusieurs genres bactériens comme *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Streptococcus*, ainsi que des champignons filamenteux de type *Penicillium*.

Pour l'isolat présumé de *Pseudomonas*, une galerie API 10S ET 20 E a confirmé cette identification à 99,9%.

Cependant, des techniques moléculaires seraient nécessaires pour une identification définitive au niveau de l'espèce. Des tests d'assimilation de divers substrats carbonés ont également été réalisés, révélant des profils métaboliques distincts entre les isolats pour le glucose, le mannitol, le sorbitol ou encore le saccharose.

5 Conclusion :

Ce mémoire présente une étude microbiologique détaillée réalisée sur des échantillons de sols prélevés dans la région de Khemis Miliana en Algérie. L'objectif principal était d'isoler, d'identifier et de caractériser les différents microorganismes cultivables (bactéries, champignons, actinomycètes) présents dans ces sols à différentes profondeurs.

Après échantillonnage, des séries de dilutions ont été réalisées etensemencées sur différents milieux sélectifs et non-sélectifs. Au total, 08 souches microbiennes ont pu être isolées et purifiées. Leur identification a été effectuée par une combinaison de techniques classiques en microbiologie : observation des caractères morphologiques (macro et microscopiques), tests biochimiques (catalase, oxydase, fermentation des sucres, etc.), galeries API et milieux d'identification spécifiques.

Parmi les isolats, plusieurs genres bactériens ont été identifiés de manière présomptive comme *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptococcus*. Des champignons filamenteux du genre *Penicillium* ont également été mis en évidence. La caractérisation phénotypique des souches a révélé des profils enzymatiques variés (amylases, gélatinases, uréases, etc.) et des résistances notables aux antibiotiques, notamment la famille des β -lactamines.

Les enzymes amylase, gélatinase et uréase représentent des biomolécules essentielles, illustrant la diversité et la spécificité des catalyseurs biologiques. Leur étude approfondie a non seulement élargi notre compréhension des processus biochimiques fondamentaux, mais a également ouvert la voie à de nombreuses applications dans les domaines médical, industriel et biotechnologique. Ces enzymes, chacune avec ses caractéristiques uniques, démontrent l'incroyable efficacité et précision des systèmes biologiques. Alors que nous continuons à explorer leurs mécanismes et à optimiser leur utilisation, ces biomolécules promettent de jouer un rôle crucial dans le développement de nouvelles thérapies, de procédés industriels plus durables et d'innovations biotechnologiques, soulignant ainsi leur importance continue dans la recherche scientifique et les avancées technologiques.

En conclusion, ce travail a permis d'explorer les biomolécules et de caractériser une partie de la microflore cultivable des sols de cette région d'Algérie, ouvrant des perspectives intéressantes pour la valorisation de cette biodiversité microbienne.

Bibliographie

6 Références bibliographiques :

- 1- Al-Thawadi, S. M. (2011). Ureolytic bacteria and calcium carbonate formation as a mechanism of strength enhancement of sand. J. Adv. Sci. Eng. Res, 1(1), 98-114.
- 2- Ameer H. (2014). effet d'osmoprotecteurs naturels sur la restauration de croissance de streptomyces et de plantes d'intérêt agricole sur sols aléouaride .Mémoire Doctorat
.Université Ferhat Abbas Sétif1.
- 3- Anonyme 1.(2015). <http://coursexosup.blogspot.com/2015/06/mortiers-beton.html>
- 7- Anonyme 2.(2012).
<https://www.infociments.fr/sites/default/files/article/fichier/SB-OA-2012-4.pdf>
- 8- Azzazi, M., Chibane, F., & Mouaden, M. (2016). Étude du climat de la région de Khemis Miliana. Revue des Energies Renouvelables, 19(3), 423-434.
- 9- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(1), 1-43.
- 10- Bastrzyk, A., Fiedot-Toboła, M., Polowczyk, I., Legawiec, K., & Płaza, G. (2019). Effect of a lipopeptidebiosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 174, 145-152.
- 11- Benmihoub, A. (2018). Variabilité du climat et production végétale dans la région de Khemis-Miliana (Algérie). Thèse de doctorat, Université de Blida.

- 12- Bennett, V., Jackson, V. A., Rivers, T., Relf, C., Horan, P., & Tubrett, M. (2005). Geology and U Pb geochronology of the Neoproterozoic Snare River terrane: tracking evolving tectonic regimes and crustal growth mechanisms. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 42(6), 895- 934.
- 13- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*, 76(3), 111-118.
- 14- BOUDMEGH et al. (2007) ; BENDOUB et al 2015 , BENLEGHRI et al (2021) ; BOUBAKER (2021) ; BOUGRID et al (2014) ; KARABI (2016) ; MESSAOUDI (2013) ; OULBACHIR (2010) ; SACI et SAFANE (2015) ; BENHAMIDA (2016) ; MENASRI
- 15- Boumaraf B.(2013). Caractéristiques et fonctionnement des sols dans la vallée d'oued Righ, Sahara nord oriental , Algérie. Mémoire Doctorat . Université De Reims Champagne-Ardenne.Belgique.
- 16- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A laboratory manual* (10th ed.). Pearson.
- 17- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual* (10th ed.). Pearson.
- 18- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual* (10th ed.). Pearson.
- 19- Cavicchioli, R. (2011). *Archaea: Molecular and Cellular Biology*. ASM Press.
- 20- Dimmock, N. J., Easton, A. J., & Leppard, K. N. (2016). *Introduction to Modern Virology* (7th ed.). Blackwell Publishing
- 21- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(
- 22- Goodfellow, M., & Fiedler, H. P. (2010). A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), 119-142.
- 23- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K. I., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Eds.). (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer Science & Business Media.
- 24- Gottschalk, G. (1986). *Bacterial metabolism* (2nd ed.). Springer-Verlag.
- 25- Halitim, A. (1988). Sols des plaines de la Mitidja: Étude de leur répartition et leur utilisation. OPU.

- 26- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598.
- 27- Insam, H. (1999). Microbes in forest ecosystems. *Microbial Ecology*, 38(1), 30-42. [invalid URL removed]
- 28- Kämpfer, P. (2012). Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370 emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 1455-1767). Springer.
- 29- Keeling, P. J., & del Campo, J. (2017). Marine protists: diversity, dynamics and environmental drivers. *Molecular Ecology*, 26(17), 4513-4527
- 30- Madigan M et Martinko J, (2007). *Biologie des micro-organismes*, Note de synthèse. Unité d'enseignement et de recherche de biologie, Paris, 45p.
- 31- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- 32- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- 33- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- 34- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- 35- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). Pearson.
- 36- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson. [
- 37- Madigan, M. Tet al Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2018). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- 38- Malik, V. S. (1990). *Microbial genetics: Principles and practice*. John Wiley & Sons.
- 39- Maron D et Ames B, (1983). Revised methods for the salmonella mutagenicity test.
- 40- Meddi, M., & Hubert, P. (2003). *Gestion des ressources naturelles et de l'environnement*. Editions Dar El Gharb.
- 41- MekkiF. (2017) *Etude géologique et environnementale de la Sebkha de Nâama*:

- 42- Messaoudi O. (2013) .contribution à la caractérisation de souche d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolée de la Sebkha De Kandasa (Bechar) . Mémoire de Magistère .Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen . Algérie.
- 43- Michel C., (2011). Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissena polymorpha* indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN. Grade de docteur en Géosciences et Ressources Naturelles. Université Pierre et Marie Curie, 192p.
- 44- modèle de fonctionnement d'un système endoréique sous climat aride (Algérie Sud-ouest). Mémoire de Magistère . Université d'Oran2 .Algérie..
- 45- Mortelmans K et Zeiger E., (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res*455: 29-60.
- 46- *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- 47- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman and Company.
- 48- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman and Company.
- 49- Nessler F., (2013). Etude de génotoxicité. Mémoire de Master. Institut Pasteur de Lille, Paris, 40p.
- 50- Pernin C., (2003). Epandage de boues d'épuration en milieu sylvo-pastoral .Etude des effets in situ et en mésocosmes sur la mésofaune du sol et la décomposition d'une litière de chêne liège. Mémoire de magistère, Paris, 220p.
- 51- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 789-799.
- 52- Pillière F et Falcy M., (1991). Exposition aux produits chimiques génotoxique. Fiche medico- technique. Institut National de recherche et de sécurité, Paris, 330- 336.
- 53- Pr. C.J. SOUSSY. Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor, 94010 Créteil Cedex Tél. : 01.49.81.28.31 - Fax. : 01 49 81 28 39 E-mail : claudesoussy@hmn.ap-hop-paris.fr Membres (en 2004) j.d. cavallo, h. chardon, c. chidiac, p. choutet, p. courvalin, h. dabernat, h. drugeon, l. dubreuil, f. goldstein, v. jarlier, r. leclercq, M.H. NICOLAS-CHANOINE, A. PHILIPPON, C. QUENTIN,

- B. ROUVEIX, J. SIROT, C.-J. SOUSSY Ce document peut être téléchargé depuis le site Internet de la Société Française de Microbiologie
- 54- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2003). Microbiology (6th ed.). McGraw-Hill.
- 55- Rodier J., (1996). L'analyse de l'eau; eaux naturelles, eaux résiduelles, eaux de mer.
- 56- Saci K. , Safane A. (2015) .isolement des souches actinomycètes d'un sol agricole contaminé par l'herbicide apyros et étude de leur capacité à le dégrader . Mémoire Master
.université frères Mentouri Constantine .Algérie.
- 57- Sahnoune, M., Belhamra, M., & Zerdani, I. (2013). Analyse de la variabilité des précipitations dans la région semi-aride de Khemis-Miliana (Algérie). Revue Agrobiologia, 3(1), 391-400.
- 58- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 59- Sammartino, M. (2018). Procédures et techniques de laboratoire pour l'étude des microorganismes. Éditions Tec & Doc.
- 60- Schimel, J. P., & Schaeffer, S. M. (2012). Microbial control over carbon cycling in soil. Frontiers in Microbiology, 3, 348.
- 61- Sébastien L., (2000). Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale. these de doctorat de l'Université de Metz, 130p.
- 62- Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16(3), 313-340.
- 63- Taylor, 1991 ; Lev et al. 1995 ; Lin et Brown, 1997).R. Gupta et N.K. Chaudhury. « Entrapment of biomolecules in sol–gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects » Biosensors and Bioelectronics, vol 22 ,2007, p. 2387–2399
- 64- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. New Phytologist, 206(4), 1196-1206.
- 65- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., ... & Seeberger, P. H. (2017). Essentials of Glycobiology (3rd ed.). Cold Spring Harbor

Laboratory Press.

- 66- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2014). Molecular Biology of the Gene (7th ed.). Pearson
- 67- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the Cyanobacteria. In B. A. Whitton (Ed.), Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time (pp. 1-13). Springer.
- 68- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2011). Prescott's Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill.
- 69- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2011). Prescott's Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill.
- 70- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2011). Prescott's Microbiology (8th ed.). McGraw-Hill.

7 Sites internet :

(1)-<http://www.ademe.fr/partenaires/boues/pages/fl4.htm>. (20/05/2016).

(2)- [http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/infos/actu/d/botanique-nanoparticules- argent-menace-ecosystemes-44990/](http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/infos/actu/d/botanique-nanoparticules-argent-menace-ecosystemes-44990/)(15/04/2016).

(3)-<http://www.journaldelascience.fr/sante/articles/forte-dose-les-nanoparticules-de-dioxyde- de-titane-pourraient-endommager-le-cerveau-2365>

(4)-<http://copublications.greenfacts.org/fr/nanoparticules-argent/index.htm>.(12/05/2016)

Résumé

Les micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les champignons sont d'importantes sources de biomolécules à haute valeur ajoutée utilisées dans divers secteurs industriels (agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, etc.). Cette revue explore les principales biomolécules microbiennes et leurs applications. Cette étude porte sur l'isolement et l'identification de micro-organismes producteurs de biomolécules (bactéries et champignons) à partir d'échantillons de sols prélevés dans une parcelle d'une ferme d'expérimentation de la faculté des sciences de la nature et de la terre à l'université de Khemis Miliana. Au total, 19 souches ont été isolées. Les isolats ont été caractérisés par des observations macroscopiques (forme, taille, couleur des colonies) et microscopiques. Par la suite, des tests biochimiques (oxydase, catalase, utilisation de substrats, etc.) et des galeries d'identification (API) ont permis l'identification présomptive des souches. Parmi les bactéries isolées, les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* ont été identifiés. Un champignon du

Abstract

Microorganisms such as bacteria, yeasts, and fungi are important sources of high-value biomolecules used in various industrial sectors (food, pharmaceutical, cosmetic, etc.). This review explores the main microbial biomolecules and their applications.

This study focuses on the isolation and identification of biomolecule-producing microorganisms (bacteria and fungi) from soil samples collected in the SNV faculty area in Khemis Miliana. A total of 19 strains were isolated.

The isolates were characterized by macroscopic observations (colony form, size, color) and microscopic observations. Subsequently, biochemical tests (oxidase, catalase, substrate utilization, etc.) and identification galleries (API) allowed presumptive identification of the strains.

Among the isolated bacteria, the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* were identified. A fungus of the genus *Penicillium* was also highlighted. Complementary studies on the antibiotic sensitivity of the bacterial isolates showed a significant resistance to the beta-lactam family. This study allowed the isolation and identification of different microbial strains from soils,

تعتبر الكائنات الدقيقة مثل البكتيريا والخمائر والفطريات مصادر مهمة للجزيئات الحيوية عالية القيمة المستخدمة في قطاعات صناعية مختلفة (الغذائية والصيدلانية والتجميلية، إلخ). تستكشف هذه المراجعة الجزيئات الحيوية الميكروبية الرئيسية وتطبيقاتها

تركز هذه الدراسة على عزل وتحديد هوية الكائنات الدقيقة المنتجة للجزيئات الحيوية (البكتيريا والفطريات) من عينات التربة المجمعة في منطقة كلية العلوم الطبيعية والحياة بخميس مليانة. تم عزل ما مجموعه 19 سلالة

تم توصيف العزلات من خلال الملاحظات المجهرية (شكل المستعمرة ، الحجم ، اللون) والملاحظات المجهرية. بعد ذلك ، سمحت الاختبارات بالتعرف الأولي على السلالات (API) البيوكيميائية (أوكسيديز ، كاتاليز ، استخدام المواد المتراسة ، إلخ) وقواعد معلومات التعريف

من بين البكتيريا المعزولة ، تم تحديد أجناس البكتيريا القولونية والزائفة. تم أيضًا تسليط الضوء على فطر من جنس البنسليوم. أظهرت دراسات تكميلية حول الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات البكتيرية مقاومة كبيرة لعائلة بيتا-لاكتام

سمحت هذه الدراسة بعزل وتحديد هوية سلالات ميكروبية مختلفة من التربة ، والتي يمكن استغلالها محتملاً لإنتاج الجزيئات الحيوية ذات الاهتمام. ستكون هناك حاجة إلى مزيد من التحاليل لتأكيد هوية السلالات وتوصيف قدراتها على إنتاج الجزيئات الحيوية المحددة

الجزيئات الحيوية وتطبيقاتها

إنزيمات صناعية (الأميليز ، البروتيز ، الليباز) - تستخدم في المنظفات والمنتجات الزراعية الغذائية وإنتاج الوقود الحيوي 1.

الأحماض العضوية (حمض الستريك ، الحمض اللاكتيك ، حمض الخليك) - تستخدم كمواد حافظة ، ومواد حامضية ، ومركبات وسيطة

Annexes

8 Annexes :

Matériel et méthode

Matériels

- Boites pétri
- Becher
- Pipettes graduées - Eprouvette graduée
- Tubes à essai
- Lames et Lamelles
- Micropipette 1000 µl /100µl/250µl
- Assiette en plastique
- Spatule - Anne de platine
- Les cuves - Portoirs
- Papier aluminium-

Becher de 50 ml,25 ml

Pipette (10 ml,1 ml).

Erlenmeyer500ml.

Tubesà essais.

Autoclave.

Balance électrique.

Compteur de colonies.

Balance électrique

Vortex

Bec bunsen

***Les appareils utilisés :**

- Balance Analytique - Plaque chauffante
- Etuve - Agitateur a barreau magnétique
- Spectrophotomètre.
- Microscope optique

Produits chimiques (annexe)

Eau distillé - Lugol - violet de gentiane - Huile - Fuscine - Alcool - Carbonate de calcium CaCO_3 - Eau physiologie

5g

Milieux de culture

a) Milieu de culture des champignons (PDA) d'après Davet et al. (1985) :

Pomme de terre.....	200g.
Glucose.....	20g.
Agar-agar.....	20g

Milieu de culture ISP7

Glycérol.....	15 g/L
L-Tyrosine.....	0,5 g/L
L-Asparagine.....	1,0 g/L
K_2HPO_4	0,5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L
NaCl	0,5 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L
Agar.....	20 g/L
Eau distillée.....	1 L

PH final 7,2-7,4

Milieu GN

Extrait de levure	2g
Peptone.....	6g
Extrait de viande.....	1g
NaCl	

Milieux ISP5 :

- Glycérol..... 10 g/L
- L-Asparagine..... 1 g/L
- K2HPO4..... 1 g/L
- Traces de sels minéraux (MgSO4, FeSO4, etc.)
- Agar..... 20 g/L
- PH final 7,0-7,

Milieux de culture PDA

- Pomme de terre..... 200g.
- Glucose..... 20g.
- Agar-agar

b) Milieu de culture Gélose nutritive

- Extrait de viande..... 1g
- Extrait de levure 2g
- Peptone 10g
- Agar-agar..... 15g



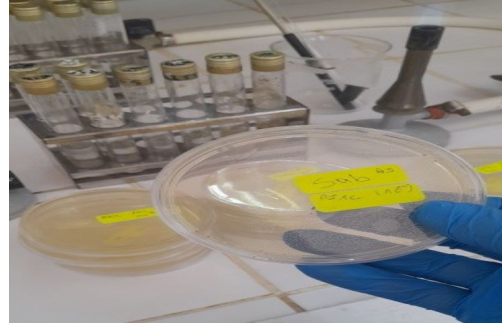
Preparation les
dilution



Collation les
milieux dans les



Incubateur



Etiquettes



Appareil de comptage les colonies

Types de milieux de culture .

Substrats	Significations	Caractère
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	B-galactosidase
ADH/LDC/ODC	Arginine,lysine,ornithine	Argenine-déhydrogenase Lysine-décarboxylase Ornithine-écarboxylase
CIT	Citrate de simons	Utilisation des citrates
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S
TDA	Tryptophane	Tryptophane-désaminase
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétonine
GEL	Gélatine	Gélatinase

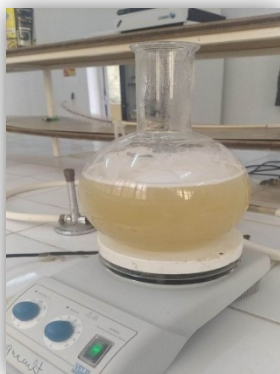
L'échantillonnage



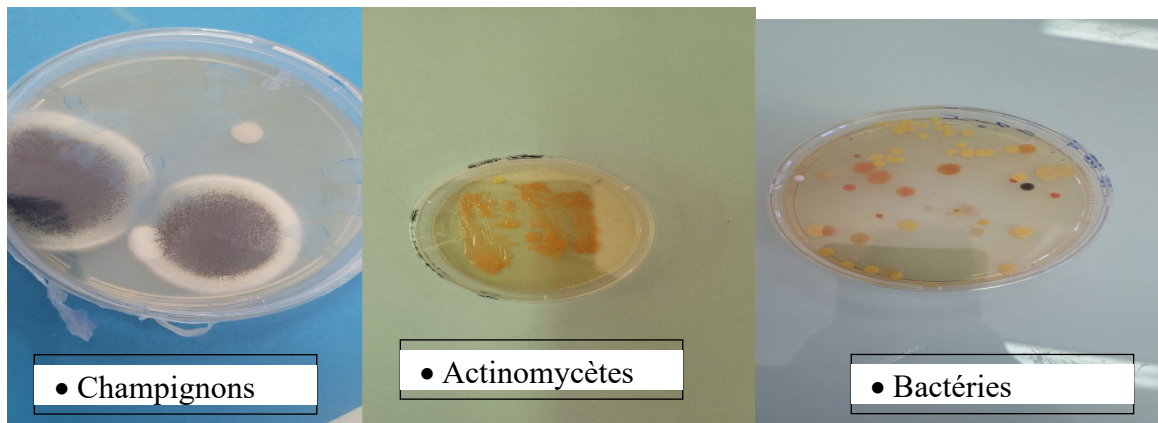
1. Préparation des milieux des cultures :



Préparation de milieu PDA



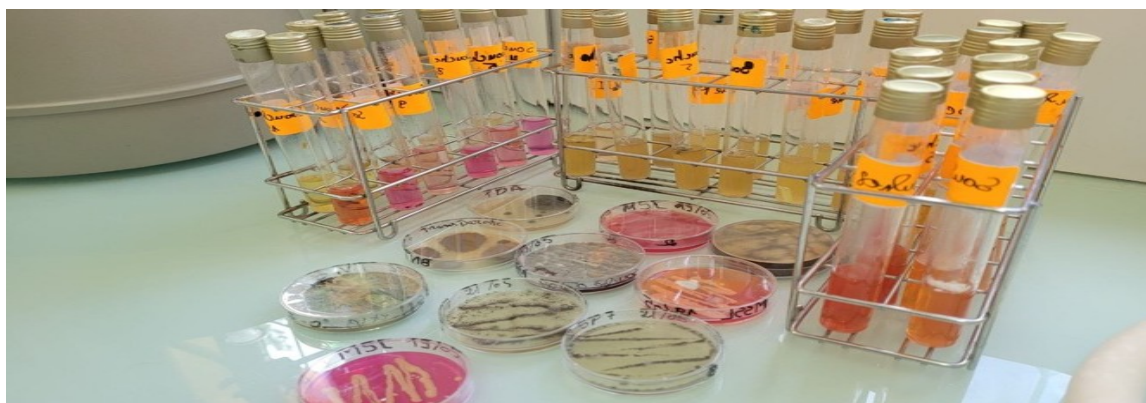
Préparation de milieu SAB



. Purification et conservation (repiquage) :

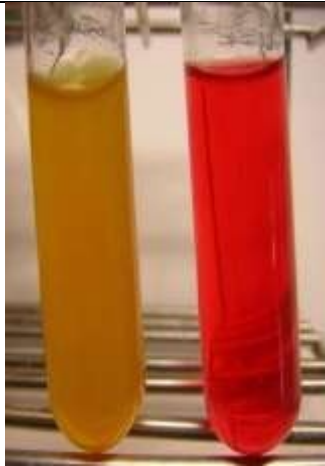
Les colonies répondant aux caractéristiques des bactéries sont repiquées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu d'isolement caractéristique par la méthode de stries.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.



Tests uree indol/manitol

Tableau . Caractères biochimiques de la Galerie Classique (Azaizia et Selaimia, 2013).

Milieu	Technique d'ensemencement	Caractères Recherchés	Lecture	Figure
TSI (Triple-Sugar-Iron)	- Ensemencer le milieu à l'aide d'une anse stérile par des stries longitudinales au niveau de la pente et par une piqûre centrale dans le culot. -Incuber les tubes ensemencés à 37°C pendant 24 h.	Fermentation du Glucose, Lactose, Saccharose. -Production de : Gaz et H₂S.	-Virage de la couleur vers le jaune : Glucose, Lactose, Saccharose sont positifs (+). –Formation de tache noire : (H₂S+). –Bulles de Gaz dans le culot : (Gaz+).	
Mannitol Mobilité	-Le milieu est ensemencé par piqûre centrale unique. -Incuber pendant 24 h à température optimale.	-Mannitol. -Mobilité.	- Apparition de couleur jaune : mannitol(+). - le milieu reste rouge: mannitol(-). -Formation d'une voile autour de la piqûre : les	

			Bactéries Sont mobiles.	
--	--	--	----------------------------	--

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20^E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test sinécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
AD H LD C OD C	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture directe Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		

IND	Pyruvate de sodium	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe Lecture indirecte dans la cupule GLU		
NO2- / N	Nitrates (NO3)	Nitrate réductase	Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de 1		