République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie de Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

Proposé et dirigé par,

M^me^, *GEUNOUNE-TOBAL.S*

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bio procédés et pharmaceutique

Thème

Recherche d'activités biologiques chez une collection de souches microbiennes d'origines marine

Présenté par :

GASMI Soumia

AID Soumia

Soutenu le 24/06/2015 mois année devant le jury composé de :

M^me^ ARBIA ,W.	**MCA, UNIVERSITE DE MEDEA**	**Présidente**
M^me^ TASSISTE ,A.	**MCA, UNIVERSITE DE MEDEA**	**Examinatrice**
M^me^ *GEUNOUNE-TOBAL. S.*	**MAA, UNIVERSITE DE MEDEA**	**Promotrice**

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

Le présent travail a été effectué au niveau de ***Laboratoire d'EPSP de Medea et de hall technologie de*** *l'université de Dr YAHIA FARIS de MEDEA,* ***laboratoire bactériologie d'hôpital*** *de MEDEA.*

Nous tiens tout d'abord à remercier ma directrice de mémoire ***Dr GEUNOUNE.S,*** *de m'avoir donnée l'opportunité de faire un sujet passionnant, de m'avoir permise de découvrir le monde «* ***de recherche microbiologique »****, de nous 'avoir fait confiance tout au long de ce travail et de nous 'avoir toujours encouragée dans les travaux, notamment durant la correction de ce manuscrit. Nous avons eu vraiment un grand honneur de travailler sous votre direction.*

Nous vifs remerciements s'adressent au ***Mr. JEKOUNE halime****, le directeur du laboratoire* ***EPSP*** *de MEDEA, pour nous avoir fait confiance et m'avoir guidé tout au long de ces trois derniers mois* ***Mr. Ahmed*** *de pharmacie centrale d'hôpital de MEDEA MOHAMED BOUDIAFE.*

Nous remercions ***M^{m} TASSISTE.A, M^{m} ARBIA.W,*** *maitre de conférences classe A à l'université de MEDEA, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger merci vraiment pour toute réponse et explication qui nous données lors de manipulation.*

Nous souhaitons exprimer toute ma reconnaissance au ***Pr ABOUSSAOUDE.M*** *professeur à l'Université de MEDEA pour m'avoir accepté de faire partie d'invité.*

*Nous profitons aussi de ces pages pour adresser mes plus vifs et sincères remerciements à :**monsieurs Ghoulemme edin**, pour leur gentillesse et pour tous les aides et leur grande patience a coté de nos demande infinie et nous frères **G.Mohamed** pour leur aides aussi, **M^{elle} FERGANI.R** ingénieur de laboratoire d'hall technologique de MEDEA et notre coupines **B.wefâa**, **B.hayet**, **G.khadija***

La liste est longue mais il me tient particulièrement à cœur de remercier toutes les personnes qui m'ont consacrée une partie de leur temps et qui ont contribué de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

الملخص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

I. Partie bibliographique

1. Introduction

Chapitre 01 : la biodiversité du milieu marin

1. Introduction …….....1

2. La biodiversité du milieu marin ….....1

3. Présentation des espèces étudiées …….……...2

3.1 Modèle végétales (algue)….....2

3.1.1 Les algues…….……...2

3.1.2 Grande groupe des algue…….3

a. Les chlorophycées (Algues verte)……..……....3

b. Les rhodophycées (Algues rouges) …….……..3

c. Les phéophycées (Algues brunes) …….…….……...……4

3.2 Modèle animales …….…….……4

a. Les oursins …….……...4

b. Les escargots ……..…..…….5

4. La diversité des microorganismes marine ……..……..….5

a. Les bactéries ……...….6

b. Les polymères ……..7

c. Les enzymes ……..……..…..……...8

4.1 La diversité microbienne associée aux algues ……..…9

4.2 Microorganismes associés aux animaux ……..…….……..10

5. Intérêt de la recherche sur les bactéries
associées aux espèces marine ……..……..……..11

5.1 Intérêt de la recherche sur les bactéries

associées aux macro algues ……...……12
5.2 Intérêt de la recherche sur les bactéries ..
associées aux animaux marines…….……..…….....12

Chapitre 02 : généralités sur les Bacillus.

1. Taxonomie du genre *Bacillus*…….……...……..14
1.1 L'ordre des bacillales …….……...….14
1.2 Classification des bacillus …….……..……15
1.2.1 Classification phénétique …….…….…….15
1.2.1.1 Classification morphologique.…….…….....15
1.2.1.2 Classification physiologique .…….....15
1.2.2 Classification sérotypique (B. *cer.eus*) ……..…….……15

2. Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus* 16
3. Ecologie du genre *Bacillus*……16
4. Types bacillus les plus répondue ……..…..……17
4.1 Le groupe bacillus cereus ……..……...……17
4.2 *Bacillus cereus* ……..……17
4.3 *Bacillus anthracis* …… …….....17
4.4 *Bacillus subtilis* ……...……..18
5. Intérêts biotechnologiques des *Bacillus* …….……18

5.1 Les enzymes……..……..……..19
a. Les protéases …….……19
b. Les lipases …….…….……...19
c. Les cellulases …….…….....…….20
d. L'amylase …….....20
6. Production des composés antimicrobiens …….20

7. Production des antibiotiques ……..….21

II. Partie expérimentales

Chapitre 01 : Matériels et Méthodes

I. Matériels ……..26
1. Milieu et solution ……...26
2. Petits matériel et verreries ……..26
3. grand matériel ……..26
4. Echantillonne biologique ……...26
4.1. Les sites d'échantillonnages ……..26
4.2.Récolte et conservation des échantillons……26
4.3.L'échantillonne biologiques ……..27
a. Les échantillons végétaux ……27
b. Les échantillons animaux…….27
II. Méthode ……..27
II.1. échantillonnage ……..27
1. Les Sites d'échantillonnages ……27
2. Récolte et conservassions …….27
II.2 Isolement et purification des espèces microbiennes ……28
2.1.1 Préparation de solution mères et de leurs dilutions ……28
a. Le sable…….28
b. Les espèces (algue, oursin, escargot) ……...28
2.1.2 L'ensemencement et la purification ……...29
2.1.3 Sélection des souches ……..29
3. Identification phénotypique des souches ……29
3.1 Caractères microscopique et macroscopique ……29
3.1.1 Caractérisation macroscopique des cultures ……...29
a. Aspect de colonies en surface sur milieu solide ……...29
3.1.2 Caractérisation microscopique ……...30
- L'observation par microscope photonique ……..30
  a. Observation de l'état frais …….30
  b. Observation à l'état fixé ……30
- La coloration simple au bleu méthylène……..30
- La coloration des Gram ……...31

4 Caractérisation biochimique ……31
4.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires……...31
- Cytochrome oxydase……31
- Catalase ……...31
- Nitrate réductase ……31

4.2 Test Mannitol-Mobilité …….32

4.3 Type respiratoire ……..32
5. Galerie classique ……32
a. Utilisation du citrate…….32
b. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron …….32
c. Recherche de la β-galactosidase ……..32
d. Recherche de l'uréase …….32
6. Dégradation des acides aminés …….33
- Utilisation du tryptophane ……...33
- recherche du tryptophane…….33
- Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase…….33
7. Système API 20^{E} ……33
8. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires …….34
8.1.1. Détermination de l'activité amylolytique…….34
8.1.2. Détermination de l'activité protéolytique…….34
8.1.3. Détermination de l'activité lipolytique ……..34
9. Mise en évidence des activités antimicrobiennes …….35
10. Etude de l'activité antifongique ……35
11. Conservation des souches ……..36
a. Conservation de courte durée ……..36
b. Conservation de longue durée …….36

Chapitre 02 :résultats et discussion

I. Résultats …….37

1. L'isolement et la purification ……37

2. Résultats de l'étude phénotypique des souches ……38
2.1 Caractérisation macroscopique et microscopique de souche ……..39

2.1.1 Etude microscopique ……..39

2.1.1.1 L'observation de l'état frais …….39
2.1.1.2 L'observation à l'état fixe ……39
2.1.2 Etude macroscopique ……41

3. caractérisation biochimique ……..43
3.1 les enzymes respiratoires …….44
4. galerie classique ……44
5. Galerie API 20 E ……..45

6. activité hydrolytique exo cellulaire ……45
7. activité antibactérienne ……48
8. Activité antifongique ……..50

9. sensibilité a les antibiotiques ……52

III. Discussion ……..…52-54

Conclusion générale ……..……..……..55

Perspective …….56-59

Annexe……..60

Références bibliographiques

الملخص:

في إطار البحث عن مركبات طبيعية جديدة ذات فعالية ببيولوجية , اتجهنا نحو البحر كمصدر غير مستغل و غني جدا بالعضويا ت المهجرية الفعالة غير المعرفة من قبل .

اهتممنا في بحثنا هذا بعزل مجموعة بكتيريا من نوع *Bacillus* عن طريق عينات بحرية إما حيوانية (قفذ البحر, الحلزون البحري) أو نباتية (الطحلب البني,الطحلب الأخضر,الطحلب الأحمر) ,رغم مرورنا بمراحل الدراسة المظهرية العينية و المجهرية و التحاليل البيوكيميائية بالنظام الكلاسيكي و نظام API 20 E, لم يكتمل تحديد نوع السلالات المعزولة.

كما اهتممنا بالنشاط البيولوجي بالنسبة للسلالات المعزولة و الذي كان حيث إنها اظهرت حاصل إنزيمي كبير الذي يبدو جليا جليا عند تسليط الضوء على نشاطها البيولوجي.

الكلمات المفتاحية: العزل,سلالة, *Bacillus*, العينات, النشاط البيولوجي,الطحالب البحرية,الحيوانات البحرية.

Résumé :

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels biologiquement actifs on oriente vers la mer comme source inexploitées et très riche des microorganismes actifs non identifiées.

Dans notre recherche nous sommes intéressés à isolé une collection de souches bactériennes de genre *Bacillus* a partir des échantillons marines soit animales (oursin, escargot) soit végétales (algue brun, algue vert, algue rouge).

L'identification de ses souches est reste incomplète malgré l'étape d'étude phénotypique ; macroscopique et microscopique, et biochimique par les analyses de système galerie classique et même APE 20 réalisé sur les isolats.

L'intérêt porté à ces quarante souches isolées est leurs grandes activités biologiques et leur baguage enzymatique important qui sont clairement apparaît lors de Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires, et biologique.

Mots clés : Isolement, souche, *Bacillus*, les échantillons, Activité biologique, les algues marines, les animaux marins**.**

Abstract:

Within the framework of the research for new biologically active natural compound, we orienting to the sea as untapped source and very rich in active microorganisms unidentified.

In our research we are interested for isolated a collection of strains of bacterial Bacillus genre from marine samples; animals (sea urchin, snail) or vegetable (green algae, red algae, brown algae).

The identification of this isolates is still incomplete despite the phenotypic study etap; Macroscopic and microscopic and biochemical by analyzes classical gallery system and even performed on the APE for 20 isolates.

Interest in these forty strains their major biological activities and their significant enzyme banding are clear when Highlighting extracellular hydrolytic activities, and biological.

Keywords: isolation, Bacillus, samples, biological activity, seaweed, marine animals.

Liste des abréviations et signes utilisés :

- : Négatif.

+ : Positif

Ω: oméga

µm : micromètre

% : pourcentage par cent

C °: température en dégrée Celsius.

API 20 E : Appareil et Procédés d'Identification 20 entérobactéries.

ARNr 16S: Acide RiboNucléique ribosomale 16S.

ATCC: American Type Culture Collection.

AIMS : l'Institut australien de science marine

B: *Bacillus*

CML: Census of Marine Life

EPS : exopolysaccharides

GEL : gélatine.
GLU : glucose.

GN : gélose nutritifs

IND : indole.
INO : inositole.
LDC : Lysine decarboxylase.

MRSA : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méticilline.

ODC: Ornithine decarboxylase.
Ox: Oxydase.
PCR: Polymerase Chain Reaction.
PDA: Ptatose Dextrose Agar.

PHA: poly β hydroxy alcanoates

R : résistante.
Rf : rapport frontal.
RHA : rhamnose.
S: sensible.
I: immediate**.**
SAC: saccharose.
SOR: sorbitol.
TDA : L-tryptophane.

URE : urée.
VP : Voges-Proskauer.

SARM : *Staphylocuccus aureus* resistance à la méthiciline

SASM : *Staphylocuccus aureus* sensible à la méthiciline

Liste des figures :

Figure 01 : chemin de réalisation de test API 20 E**…**……33

Figure 02 : Répartition des souches bactériennes isolées selon l'espèce marine……... 37

Figure 03: graphe représenté la retenue de chaque échantillon …….38

Liste des photos :

Photos 01 : photos de souche par la coloration de bleu méthylène …….39

Photos 02: coloration de Gram des souches…….39

Photos 03:photos de quelque souche isolée……41

Photos 04: tableau explicatif de lecteur d'activité enzymatique……..47

Photos 05: Activité antifongique……..51

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Médicaments d'origine marine déjà mis sur le marché……4

Tableau 02 : Exemples de molécules marines en cours d'évaluation dans le domaine de la santé……5

Tableau 03 : Classification morphologique du groupe *bacillus* ……18

Tableau 04 : Classification physiologique du groupe *bacillus* ……...19

Tableau 05: station d'échantillonnages ……..……..…. 26

Tableau 06 : Les échantillons végétaux …….…….....27

Tableau 07: Les échantillons animaux……..……..27

Tableau 08 :tableau résume les conditions de préparation des dilutions pour l'ensemencement…….28

Tableau 08 :tableau résume les conditions de préparation des dilutions pour l'ensemencement. (Suite)……29

Tableau 09 : les souches utilisé dans le test l'activité antibactérienne…….....35

Tableau 10 : tableau présenté la diffusivité des souches à partir l'espèce d'isolement……37

Tableau 11 : tableau présentant Les taux de bacilles associés à chaque espèce marine prélevée. ……..…… 38

Tableau 12: résultats d'étude microscopique……40

Tableau 13: résultats d'étude macroscopique des souches……41-42

Tableau 14: tableau des résultats de type respiratoire des isolats…….. 43

Tableau 15:tableau résume les résultats de galerie classique d'isolats……....44

Tableau 16: résultats de système API 20^{E}**…**……...45

Tableau 17 : les résultats d'activité enzymatique ex cellulaire…….....46

Tableau 18: Résultats de l'activité antibactérienne de nos souches……48

Tableau 19: résultats de l'activité antifongique……...50

Tableau 20 : les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ……..52

Tableau 21 : Tableau d'abréviation des souches et leur espèce de récoltes …….……..69

Tableau 22 : les antibiotiques utilisé pour les tests antibiogramme……75

Introduction :

La biodiversité est la variabilité de forme de vie sur terre. L'eau recouvre 70% de la surface du globe donc le milieu marin constitue la plus grande partie de la biosphère et contient par conséquent les formes de vie les plus diversifiées mais aussi les plus anciennes.

Le milieu marin représente un immense réservoir de molécules originales d'intérêt biologique et biotechnologies encore à ce jour non découvertes. Sur plus de 500 000 espèces marines identifiées, moins de 3 % de ces organismes marins ont fait à ce jour l'objet d'études en matière de potentialités biotechnologiques **(J. GUEZENNEC, C. DÉBITUS ; Substances naturelles en Polynésie française).**

Les composants bioactifs les plus connus issus de la biodiversité marine sont l'œuvre des microorganismes notamment : La plus grande diversité de la population bactérienne se présente au niveau des sédiments et des algues.

Notre travail a pour objectif la recherche d'éventuelles activités biologiques d'intérêt biotechnologique liées aux être microscopiques associés à certaines espèces marines a savoir : des algues, un oursin, escargots.

Le genre *Bacillus* possède un potentiel biotechnologique important, les bactéries du genre *Bacillus* en sont un exemple prometteur. Cela est dû à leur taux de croissance et leurs secrétions extracellulaires **(Schallmey et al ., 2004).**

Le genre *Bacillus* possède aussi des capacités physiologiques extraordinaires qui lui permettent de survivre dans une large gamme d'habitats extrêmes .il peut être thermophile, psychrophile, **acidophile, alcalophiles, halotolérant ou halophile (Awais et al ., 2007)**

L'isolement des espèces du genre *Bacillus* à partir des écosystèmes extrêmement éventuellement, la découverte nouvelles souches du point de vue taxonomique, pouvant avoir un potentiel de production élevé non encore exploité.

Et pour atteindre l'objectif voulu, ce travail de mémoire vise à :

- Isolement et caractérisation phénotypique des isolats.
- Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires (amylases, protéases, Cellulases et lipases).
- Mise en évidence l'activité biologique (antibactérienne, fongique) des isolats.
- Appliquer le système classique d'identification (galerie classique) et les nouveaux systèmes (API 20 E et CHB 50)

Dans le travail à présenter on 'a choisit des plages populeuses comme Boumerdas et les rochets (Bou Haroun) pour réaliser les prélèvements d'échantillons : le sable des plages, les algues, l'eau de mer, des animaux etc.

Cette recherche est réalisée dans nombreux laboratoires d'analyse au niveau de l'hôpital de Media, l' hall technologique, et l'institue EPSP.

Notre recherche est organisé selon le plan de travaille suivant :

- La première partie : fait référence à une revue bibliographique dans les chapitres :
  Chapitre 01 : la biodiversité du milieu marin
  Chapitre 02 : généralités sur groupe *Bacillus*
- La deuxième partie : expérimentale
  Chapitre 01 : Matériels et méthodes
  Chapitre 02 : résultats et discussions

1. Introduction :

La diversité biologique – ou la biodiversité – est le terme qui désigne toutes les formes de la vie sur Terre et les caractéristiques naturelles qu'elles présentent. La biodiversité dont nous sommes les témoins aujourd'hui et le fruit d'une évolution qui s'est façonnée pendant des milliards d'années, au gré de processus naturels et, de plus en plus, sous l'influence des êtres humains. Elle constitue la toile de la vie dont nous faisons intégralement partie et dont nous sommes totalement dépendants.

La biodiversité s'étend également aux différences génétiques à l'intérieur de chaque espèce. Il s'agit, par exemple, des différences entre des variétés de plantes cultivées et de races de bétail. Les chromosomes, les gènes, et l'ADN déterminent le caractère unique de chaque individu à l'intérieur de chaque espèce.

2. La biodiversité du milieu marin :

Les océans où a eu lieu la genèse de la vie couvrent plus de 70 % de notre planète. Dans certains écosystèmes, comme les barrières de corail, les experts estiment que la biodiversité est supérieure à celle des forêts tropicales. Les océans sont loin d'avoir livré tous leurs secrets. Le consortium d'étude de la vie marine (Census of Marine Life : CML), qui regroupe 300 scientifiques de 53 pays, a comptabilisé environ 200000 espèces de plantes et d'animaux vivants dans le milieu marin. Ce chiffre a dépassé les deux millions avant fin 2010. Pourtant, l'environnement marin, malgré sa spécificité chimique a reçu beaucoup moins d'attention que le milieu terrestre.

Cette diversité de vie et d'environnement est une vaste ressource largement inexploitée dont les applications potentielles pourraient être multiples dans de nombreux secteurs industriels. Tant la diversité des formes marines que l'adaptation de ces dernières à un environnement marin atypique et/ou à des conditions extrêmes (zones hydrothermales, sédiments des fonds sous-marins, lagunes hyper salines, suintements froids des marges continentales, continents arctique et antarctique, tapis microbiens, etc.) ouvrent des perspectives nouvelles pour le développement de nouvelles molécules bioactives : des enzymes, des polymères, des métabolites secondaires, de même que pour la mise en œuvre de nouveaux procédés industriels. **(Jean guezennec, cécile debitus,2005)**

L'intérêt des molécules marines se situe à deux niveaux : en premier lieu, ces organismes constituent fondamentalement des modèles moléculaires pour l'étude des mécanismes biologiques et parfois d'adaptation à des conditions environnementales ; en second lieu, ils permettent d'envisager la mise en évidence de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique. L'intérêt du milieu marin pour la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique reste donc très fort.

À titre d'exemples ***Tétrodoxine* 4 *et saxitoxine* 5**, plusieurs médicaments et un insecticide d'origine marine sont à ce jour sur le marché des exemples sont indiqué au (tableau n°01).

Tableau 01 : Médicaments d'origine marine déjà mis sur le marché (drugs marin *et bull. soc. Pharm. Bordeaux*, 1998, 137, 37-53).

Le produit	fonction	Origine
Les alginates	Hémostatique Refluxgastro-œsophagien	algues
Les céphalosporines	antibiotiques	champignons marins
La vidarabine	antiviral	Spongiaire
La cytarabine	antitumoral	Spongiaire
Le padan	insecticide largement utilisé au Japon	néréistoxine isolée d'un ver marin

Un antalgique, le ziconotide (2002), alcaloïde issu d'une ascidie Ecteinascidia turbinata (molécule plus connue sous le nom de ET743) ayant obtenu le statut de médicament orphelin pour le traitement de sarcomes,

Par ailleurs, d'autres molécules d'origine marine sont à ce jour à un stade avancé d'études cliniques (tableau n°02). **(Jean GUEZENNEC, Cécile DEBITUS,2005)**

Tableau 02 : Exemples de molécules marines en cours d'évaluation dans le domaine de la santé (drugs marin *et bull. soc. Pharm. Bordeaux*, 1998, 137, 37-53).

Le produit	Fonction	Origine
Déhydrodidemnine B (aplidine)	Antitumoral ; inhibe angiogenèse	*Aplidium albicans*
Methopsterosin	Inflammation : brûlures	*Corail*
KRN 7000b	Cancer	*Éponge*
IPL 576/092	Inflammation, asthme	*Éponge*
Squalamine lactate	Cancer	*Requin*
Dolastatine 10 NSC 376128	Antitumoral	*Dolabella auricularia (mollusque)*

3. Présentation des espèces étudiées

3.1 Modèle végétales (algue)

L'intérêt porté aux végétaux marins, en particulier les algues est en progression continue et ce pour différentes raisons. Les vertus des algues sont connues depuis longtemps, elles constituent une source importante des produits qui sont utilisées par l'homme, notamment par leur richesse en protéines, glucide, lipides, sels minéraux…etc. C'est pour cela que ces plantes sont utilisées dans plusieurs domaines tels que l'agriculture, la médecine…etc. **(zellal aicha,2012)**

3.1.1 Les algues

Les algues, organismes photosynthétiques, sont conventionnellement définies comme des végétaux peuplant le milieu aquatique, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres. Elles sont dépourvues de tige, de racine, de feuille ou de fleur, leurs appareils végétatifs relativement simples est appelé thalle **.**elle peuvent être fixé sur un support ou

libre, leur taille varie de moins d'un micromètre tel l'algue *Prochlorococcus* (0.5 m) à plusieurs dizaines de mètre pour les *Macrocystis* (60 m). **(guezzen abdedjeilil, 2014)**

Depuis des siècles, les algues marines sont utilisées par l'homme, en particulier dans les pays asiatiques, pour l'alimentation, la médecine et l'agriculture du fait de leur**s** richesses en minéraux et en polysaccharides. Dans les sociétés polynésiennes. L'utilisation et l'exploitation des algues marines ne sont pas toujours très connues du grand public alors qu'on les utilise quotidiennement. De plus, elles représentent une biomasse considérable avec environ 30 000 espèces identifiées, réparties en neuf embranchements eucaryotes, dont les plus connus sont les Chlorophyta, les Phaeophyta et les Rhodophyta.

Les algues présentent un appareil végétatif peu évolué (sans racine, ni tige, ni feuille) mais elles jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre écologique du milieu aquatique. Elles sont les principales responsables de la production primaire (l'évaluation de celle-ci pour le phytoplancton permet de déterminer les lieux de pêche favorable), elle synthétise la matière organique nécessaire qui constitue la source alimentaire d'une grande partie de la faune marine, elles dégagent directement l'oxygène utilisé par les espèces marines, elles présentent un support d'alevins de nombreux poissons, des mollusques, de crabes et autres espèces. Elles permettent également l'amélioration, la clarification, la récupération des éléments nutritifs en suspension et l'auto-épuration de l'eau car certaines macro-algues libèrent des substances bactéricide telles que les acides gras, les chlorophyllides, les terpènes et les phénols. De point de vue économique, elles présentent actuellement une source nutritionnelle et un produit à valeur montante. Elles sont utilisées en agriculture comme engrais et fourrage, dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Agar, alginates, carraghénanes sont des produits extraits d'algues), dans le textile et dans d'autres domaines.

3.1.2 Grande groupe des algues

a. Les chlorophycées (Algues verte)

Qui jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont des formes très variées, uni ou pluricellulaires. Leur plaste sont colorées en vert .la photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures.

b. Les rhodophycées (Algues rouges)

Les rhodophycées sont des organismes pluricellulaires d'origines marines divisées en deux grands groupes, en fonction de leur cycle de reproduction : les bangiophycées et les floridéophycée. Ils trouvent de nombreuse applications comme agent texturants, filmogènes ou émulsifiants dans de nombreux domaines de l'industrie agroalimentaire ou pharmaceutiques. Pour sa constituent polysaccharides complexes les mieux connus sont les agars et les carraghénanes. **(zellal aicha,2012)**

c. Les phéophycées (Algues brunes) :

De structure généralement pluricellulaires et de dimension très variables, la majorité de ces algues vivent en milieu marin et présente une couleur brunâtre résultant de l'association de pigment dominant à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine. **(guezzen abdedjeilil, 2014)**

3.2 Modèle animales

a. Les oursins :

L'oursin est un animal marin. Il fait partie du groupe des *échinodermes*. C'est le groupe d'animaux dont le squelette est recouvert de piquants. L'oursin est ambulacraire. C'est à dire qu'il possède des ambulacres. Un ambulacre est un tube mobile terminé par une ventouse permettant la locomotion des oursins ou des étoiles de mer**.**

Il existe des oursins mâles et des oursins femelles. En période de reproduction, généralement au printemps,

• les oursins femelles libèrent des *sécrétions orangées* qui contient des *ovules*,

• les oursins mâles des *sécrétions blanchâtres* qui contiennent des *spermatozoides*.

Plusieurs espèces de bactéries seraient responsables de la maladie de "l'oursin chauve" (bald-sea-urchin disease) et seraient au moins responsables du déclin de la population de *Psammechinus microtuberculatus* de Port-Cros (Var) dans les années 90. *Psammechinus microtuberculatus* et *Paracentrotus lividus* vivent souvent associés.

Le gastéropode *Eulima monterosatoi* et le copépode *Astrocheres violaceus* sont deux parasites de cette espèce.

Quelquefois commercialisées avec celles des autres oursins comestibles (*Paracentrotus lividus*) les gonades sont de bonne qualité mais de trop petite taille. Les blessures

accidentelles par les piquants d'oursins de *Psammechinus microtuberculatus* sont bénignes. L'extraction rapide des piquants en évitant de les briser et l'immersion de la partie atteinte plusieurs fois par jour dans du vinaigre afin de solubiliser le calcaire sont en général suffisantes. *Psammechinus microtuberculatus* est un bon indicateur de la qualité des écosystèmes des fonds sous marins en Méditerranée. Cette espèce semblerait être à l'origine de dommages dans les bancs d'huîtres.

b. Les escargots :

L'escargot, encore appelé limaçon ou colimaçon est un mollusque gastéropode pulmoné du genre Hélix. Il a été, à travers les siècles, l'objet de nombreuses attentions ; tour à tour animal mythique et symbolique, déifié ou objet du diable. Apprécié en cuisine, il l'est aussi en médecine, domaine dans lequel on n'a cessé depuis l'Antiquité de lui attribuer de multiples propriétés. C'est alors principalement l'*Helix pomatia* (escargot de Bourgogne) qui est utilisé, mais également l'*Helix aspersa* ou encore l'escargot de mer : *Helix maritima*.

Avec le temps la diversité d'emploi des escargots en thérapeutique va s'amoindrir pour tendre vers la fabrication de spécialités dont les propriétés sont reconnues et prouvées et même se diriger vers des utilisations insoupçonnées.

Les écrits de l'Antiquité dévoilent de multiples utilisations des animaux en général, et des escargots en particulier à des fins thérapeutiques. L'animal entier ou en partie est présenté comme possédant des propriétés aussi diverses qu'étonnantes.

D'aussi loin que remontent les écrits, on retrouve l'escargot dans la pharmacopée.

Prescrit dans l'Antiquité comme remède à de nombreux maux, il est un peu mis à l'écart au Moyen-âge pour cause de symbolique ambiguë.

Mais le petit mollusque n'a pas dit son dernier mot et, avec les progrès de la science, ses propriétés thérapeutiques vont se préciser.

Ainsi, au XIXe siècle fleurissent les spécialités à base de limaçon, indiquées principalement dans les affections bronchiques telles que la toux.

Les chercheurs du XXe siècle poursuivent dans ce sens avec la mise au point de l'hélicidine.

Cependant les découvertes ne s'arrêtent pas là : en effet l'*Helix pomatia* contient une lectine marqueur de tissus métastatiques et certains escargots marins sécrètent des neurotoxines dont les dérivés semblent être de puissants analgésiques.

L'escargot, gardant toujours une part de mystère, recèle peut-être d'autres propriétés utiles pour la médecine future. Et même si tel n'était pas le cas, les récentes découvertes au sujet de ce petit animal prouvent au moins qu'il n'était pas inutile de s'y intéresser.

4. La diversité des microorganismes marins

Les avancées considérables de la biologie moléculaire au cours de ces dernières années rendent désormais possible, et surtout plus accessible, l'étude des écosystèmes microbiens. De nombreuses études ont en effet montré que les techniques classiques de biologie, telles que les mises en culture sur milieux à caractère plus ou moins sélectif, ne permettaient d'accéder qu'à 0,1 % à 1 % des espèces microbiennes présentes dans les écosystèmes marins. Cela signifiait également qu'une proportion très importante de métabolites microbiens d'intérêt biotechnologique pouvait échapper à toute investigation. Cette ressource inexploitée et peu connue à ce jour pourrait se révéler être le principal gisement de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique lors des prochaines décennies. De fait, on peut donc considérer que l'un des enjeux majeurs de la recherche en matière de biotechnologie marine, et plus spécifiquement au niveau des micro-organismes, porte aussi sur le développement de méthodes d'identification, de caractérisation et d'analyse de la fraction dite incultivable. **(Jean GUEZENNEC, Cécile DEBITUS,2005)**

Les micro-organismes et en particulier les bactéries ne sont « responsables » que de 16 % des brevets pris au cours de ces dernières années sur des molécules d'origine marine. Cependant, il y a fort à penser que ce pourcentage ira sans nul doute croissant au regard :

- des spécificités liées aux bactéries, en l'occurrence, une accessibilité à la ressource sans dépendances environnementales et géopolitiques ;
- du développement d'outils permettant une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens ;
- du fait que de plus en plus d'études récentes attribuent la synthèse des molécules actives plus aux bactéries associées qu'aux organismes « hôtes ».

Le développement de la microbiologie des communautés microbiennes associées aux animaux marins (invertébrés en particulier mais aussi les algues) mérite effectivement une attention particulière. Ces communautés peuvent présenter diverses formes d'association : épibiontes, symbiontes, pathogènes, et concerner différents tissus dont certains très spécialisés (trophosomes de certains annélides des sources hydrothermales).

a. Les bactéries

Parmi les potentialités de valorisation des micro-organismes les plus répertoriées dans une littérature relativement abondante sur le sujet, il va s'agir de différencier (si cela est possible) ce qui relève de l'usine cellulaire que constitue le fonctionnement de la cellule bactérienne par elle-même des éléments constitutifs de cette même cellule et des métabolites primaires ou secondaires.

• ***Production de métabolites secondaires***.

Cette notion de métabolites secondaires est très large allant de la biosynthèse d'antibiotiques, de vitamines, de précurseurs de vitamines et d'antibiotiques, alcools et acides organiques de bas poids moléculaire, stérols, pigments, etc.

• Biosynthèse *d'autres métabolites*

Au rang desquels il convient de citer les glycoconjugués incluant les exo-polysaccharides (EPS), les glycoprotéines ou encore protéoglycannes, sans oublier les polyamines et poly β hydroxyalcanoates (PHA) ou polyesters biodégradables.

• Les *« constituants cellulaires »* que sont alors les lipides complexes (sphingolipides, phospholipides, glycolipides, céramides, éthers de glycérol, etc.), les protéines, les peptides, les lipopolysaccharides (LPS), etc.

• Les *enzymes (endo et/ou exocellulaires)*, qu'il s'agisse d'enzymes de synthèse et/ou de modifications.

Tout comme pour les algues, parmi les molécules les plus attrayantes d'un point de vue développement industriel s'inscrivant dans le court et moyen terme, il convient de noter en tout premier lieu les polymères bactériens et plus spécifiquement les *polysaccharides*.

- **Les polymères :**

Les *polysaccharides* peuvent être définis comme de longues molécules formées de l'enchaînement de motifs similaires, en l'occurrence de glucides appelés couramment sucres. Ces polysaccharides représentent une famille de biopolymères dont la diversité de structure offre un large spectre de propriétés fonctionnelles. Outre l'intérêt connu depuis de nombreuses années de ces biopolymères dans divers domaines comme l'exploitation pétrolière, l'agro-alimentaire en tant qu'agents de texture, l'agrochimie, les industries du papier, les scientifiques et les industriels s'intéressent de plus en plus aux activités biologiques de ces molécules et à leurs applications dans le domaine thérapeutique.

Ces macromolécules peuvent trouver de telles applications soit à l'état natif soit après des modifications visant à conférer à ces polysaccharides les activités recherchées, soit encore à mettre leur forme en adéquation avec des applications thérapeutiques.

Initialement dominé par les gommes d'origine végétale et algale, le marché s'ouvre actuellement très largement aux polysaccharides bactériens. Ces derniers présentent quelques atouts comme l'absence de dépendance vis-à-vis d'aléas climatiques, écologiques et politiques pouvant affecter la qualité, De plus, les possibilités d'agir sur les conditions de fermentation (sources de carbone, température, aération, pH, etc.) en vue d'optimiser la production, d'assurer la traçabilité, mais aussi de modifier le polymère produit, jouent en faveur de la fermentation bactérienne.cespolymères présentent enfin un degré de régularité de structure plus important et peuvent être extraits et purifiés sans mettre en œuvre des conditions drastiques. Les inconvénients de ces polymères bactériens restent liés aux micro-organismes eux mêmes, à leur manipulation et conservation, ainsi qu'à la production de métabolites secondaires associés à la fermentation.

- **Les enzymes :**

Dans l'industrie chimique, les enzymes constituent déjà des produits de spécialité importants. Il est à noter qu'à ce jour près de 90 % des enzymes commercialisées sont d'origine microbienne. La plus grande part de la valeur est actuellement produite par la vente d'enzymes utilisées en formulation avec des détergents pour les lessives, et le marché le plus important reste à ce jour celui des applications domestiques. De nouveaux produits pourraient résulter de découvertes d'enzymes nouvelles aux propriétés supérieures (quelle que soit l'origine de l'organisme concerné), mais également d'améliorations issues d'ingénierie moléculaire.

D'autres percées peuvent résulter de l'amélioration des procédés de production visant à réduire le coût des enzymes. Les enzymes utilisées dans des « process » agroalimentaires (incluant aliments et boissons) ont sensiblement le même niveau de marché que les additifs enzymatiques pour détergents, mais présentent une croissance plus marquée. Toutefois, la demande dans ce secteur continue de croître et le marché des enzymes est en progression constante. La croissance du marché sur ce domaine des enzymes est estimée à près de 11 % par an pour les années à venir.

Il existe naturellement un lien fort entre l'habitat des micro-organismes et la présence potentielle d'enzymes innovantes. Les meilleurs exemples en sont donnés par la découverte d'enzymes thermostables associées aux bactéries thermophiles et

hyperthermophiles des écosystèmes hydrothermaux profonds ou, à l'opposé, celle d'enzymes spécifiques trouvées dans l'estomac des manchots du continent antarctique.
Bon indicateur de la réalité polynésienne, les Australiens de l'Institut australien de science marine (AIMS) ont découvert dans du mucus de corail irradié des bactériesdéveloppant des enzymes anti-oxydantes avec des applications potentielles dans le cas de la maladie d'alzheimer.

En termes de métabolites secondaires et plus spécifiquement de molécules bioactives, les micro-organismes sont à ce jour très peu exploités (16 % des brevets au cours de ces dernières années). Cette faible exploitation est liée à plusieurs paramètres ayant trait tant au niveau actuel de connaissance de la microflore bactérienne, qu'aux difficultés éventuelles de mise en culture et fermentation (extraction-purification des métabolites), mais aussi aux faibles rendements obligeant à passer par la chimie de synthèse ou d'hémisynthèse. Par ailleurs, il est important de souligner la nécessité de préserver les souches et les isolats.

4.1 La diversité microbienne associée aux algues :

Comme tout organisme eucaryote, les macroalgues marines vivent en association directe avec des bactéries, qui colonisent leurs surfaces ou qui, pour certains, sont même intégrées dans leurs tissus pariétaux. Les bactéries marines hétérotrophes sont également reconnues comme les acteurs clés du recyclage de la biomasse algale.

Parmi les études existantes sur les interactions entre les microorganismes et les eucaryotes sessiles marins ; celles concernant la diversité microbienne associé aux coraux et aux éponges sont les plus importante.

En comparaison, les autres surfaces comme celle des macro algues n'ont pas reçu autant d'intérêt et de nombreux systèmes d'interaction ne demandent qu'à être explorée, de ce fait l'étendue de la diversité des hôtes sessiles pouvant héberger une communauté microbiennes distincte peut avoir un impacte remarquable sur notre vue actuelle de la diversité microbienne marine globale.

Il n'existe que peut d'exemples de bactérie marines isolées à partir de macroalgues et étudiées pour des éventuelles de propriétés industrielles, pharmaceutique .plusieurs *pseudoalteromonas* nichant sur les thalles de macroalgues ont montré ce type d'activité.

*P .atlantica,*isolé d'une algue rouge échantillonéeau japon, est capable de dégrader les polysaccharides des algues rouges (agar) *p.ulvae* et *p.tunicata* sont des bactéries marines présente à la surface de l'algue verte *Ulva lactuca* .Ces bactéries ont la capacité de diminuer l'adhésion de nombreux organismes salissants et d'inhiber la germination des spores de cette algue verte, mais aussi ceux de l'algue rouge *polysiphonia* sp. pour la bactérie *P .tunicata*, leur pouvoir antisalissure est due a la production d'un pigment bactéricide jaune ,appartenant à la classe des alcaloïdes.

La bactérie marine hétérotrophe *Zobellia galactanivorans*. La plupart des *Zobellia* ont été isolés en association avec des macroalgues, et leur comportement varie de bactérie symbiotique à algicide. *Z. galactanivorans* a été isolé d'une algue rouge, *Delessaria sanguinea* pour son aptitude à dégrader la plupart des polysaccharides majeurs des macroalgues.

Il existe encore de nombreuse autre substances d'intérêt chez les bactéries marines associées aux algues, des genres *pseudoalteromonas* ou autres.les recherches sont au début, et celles concernant les péptides de substance pigmentées ou non de bactérie marines paraissent d'autant plus nécessaires que leurs composés semblent avoir un impacte potentiellement important dans les interactions biologiques.

4.2 Microorganismes associés aux animaux marins

Toutes surfaces inertes ou vivantes immergée en eau de mer est rapidement colonisées par des bactéries, formant par une suite de mécanismes initialement physicochimiques, une communauté complexes appelée bio film. Le développement de la microbiologie des communautés microbiennes associées aux animaux marins (invertébrés en particulier mais aussi les algues) mérite effectivement une attention particulière. Ces communautés peuvent présenter diverses formes d'association : épointes, symbiontes, pathogènes, et concerner différents tissus dont certains très spécialisés (trophosomes de certains annélides des sources hydrothermales). **(Anne postec,2005)**

Une étude de 2003 présente l'analyse de la diversité microbienne associée à l'appareil digestif d'une crevette *Rimicaris exoculata* récoltée sur le site atlantique Rainbow. La diversité mise en évidence était relativement faible, et les séquences sont affiliées à trois groupes principaux : les ε-*Proteobacteria* (48,8%), les *Entomoplasmatales* (23,3%) et le nouveau phylum *Deferribacteres* (26,6%). Ces microorganismes pourraient être impliqués

dans la production primaire de matière organique, dans la bioremédiation des métaux et la détoxication du tube digestif (Zbinden & Cambon-Bonavita 2003).

D'autres travaux de Lopez-Garcia *et al.* ont analysé la diversité microbienne associée aux tubes chitineux du vestimentifère *Riftia pachyptila* (Lopez-Garcia *et al.* 2002). Des populations microbiennes denses ont été observées en microscopie. Seules des séquences d'ARNr 16S de bactéries ont été détectées. Celles-ci étaient affiliées aux ε-*Proteobacteria* (68%), aux δ-, α- et γ-*Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia*, au groupe *Cytophaga Flavobacterium-Bacteroides* et à la division candidate. La séquence de l'endosymbionte de *R. pachyptila* affiliée aux γ-*Proteobacteria* n'a pas été détectée.

L'objet d'une étude de la diversité moléculaire associée aux sécrétions muqueuses de l'animal. Les banques de clones étaient dominées par la présence de séquences affiliées aux ε-*Proteobacteria*. Des phylotypes appartenant aux *Cytophaga-Flavobacteria* et aux *Verrucomicrobia* étaient aussi largement représentées. Des séquences relatives aux *Fusobacteria*, aux bactéries vertes non sulfureuses, aux *Firmicutes*, aux γ- et δ-*Proteobacteria* ont également été détectées. Ces microorganismes seraient impliqués dans la production primaire, le recyclage de matière organique et la détoxication du microhabitat chez *P. palmiformis*.

On peut prendre comme exemple le cas d'oursin est associées par des bactéries provoquées dans le cas de pénétration par leur piquants soit :

-Bactéries aspécifiques : les plus fréquentes : staphylocoque doré, streptocoque pyogène ; Clostridium perfringens plus rare.

-Bactéries spécifiques : Erysipelothrix rhusiopathiae, Mycobacterium marinum, Vibrions (V. vulnificus).

5. Intérêt de la recherche sur les bactéries associées aux espèces marine :

La résistance croissante des bactéries envers les antibiotiques existants est un problème majeur dans le monde entier.une des manières d'empêcher cette résistance est l'élaboration de nouvelles composées par l'isolement de nouveaux antibiotique d'origine marine soit algale ou animales. **(guezzen abdedjeilil, 2014)**

Depuis presque un siècle les chercheures et les microbiologistes spécialement ont prouvés que les bactéries aquatiques sont plus nombreuses sur la surface solide contenant l'échantillon qu'en suspension cette états des bactéries associés a un surface appelé biofilm il joue un rôle clés dans tous les écosystèmes. Cette association des microorganismes sur le

support dans notre cas l'algue l'escargot ou n'importe surface immergé dans l'eau de mer est suivi et caractérisé par un accroissement par division de ces bactéries.

Par conséquent, **(stéphanie salaun, 2009)** il devient important de mieux connaitre la diversité et l'écologie des communautés microbiennes marine associées aux surfaces, dans le but de découvrir entre autres des composés biologiquement actifs, potentiellement biocides ou bactériostatique.

Outre sa remarquable utilité dans le domaine de la santé publique, la chimiodiversité marine peut procurer des informations essentielles dans les domaines de l'environnement et de l'écologie.

5.1 Intérêt de la recherche sur les bactéries associées aux macroalgues :

Parmi les organismes marins, les algues sont source riche en composée bioactifs.

Récemment, les chercheurs ont indiqué que les composés extraits d'algues marines montrent diverses activités biologiques à savoir : des activités antioxydants, antimicrobienne et anti-inflammatoire. **(guezzen abdedjeilil, 2014)**

Les avancées conceptuelles et technologiques récentes sur la microbiologie des surfaces marines organiques ont mis en évidence la production d'un panel de composés bioactifs encore inconnus, et produit aussi bien par l'hôte que par les membres de la communauté microbienne associée à la surface. Beaucoup de problèmes biologiques, chimiques et/ou physiques pourraient ainsi être résolus par le développement de nouveaux biotechnologies marins qui doivent naturellement y faire face.les investigations sur les modèles naturels pertinents représentent une voie plus directe à la découverte de métabolites utiles.

Les bactéries présentes à la surface des macroalgues marines jouent un rôle protecteur en émettant dans l'eau de mer environnante des composés qui aident à la prévention des salissures extensives des surfaces.ces composés émis peuvent également avoir des applications industrielles et médicales .la facilité relative de à cultiver en forte biomasse ces bactéries épiphytes, qui produisent des composés actifs, comparée aux autre bactéries planctoniques ,suggère que les bactéries associées aux algues peuvent être utiles dans les applications de bioprocédés, comme la production de composés antimicrobiens ou antisalissure.

5.2 Intérêt de la recherche sur les bactéries associées aux animaux marines :

Le genre de *pseudoalteromonas* est un groupe de bactéries marines appartenant a la classe des *y-proteobactéria*,et dont les recherches sur les produits naturels et le domaine des sciences de l'écologie microbienne ont fortement augmenté depuis la dernière décennie, il semble que ce soit l'un des des genres bactériens montrent clairement des propriétée pharmacologiques et écologiques intéressantes et innovantes .les souches bactériennes étudiées sont principalement isolées d'échantillons d'eau de mer, des sédiments, de tunicier, de poisson ou rarement des algues.les espèces pigmentées de ce genre ont montré leur capacité à produire un panel de composés de faible ou fort poids moléculaire, avec des activité antimicrobien, antifongiques et pharmacologique ment utiles.

Plusieurs travaux de recherche ont rapporté la présence de composés antimicrobiens d'origine protéique synthétisés et sécrétés par des Pseudoalteromonas associées à des mollusques bivalves marins. Romanenko et al. (2008) ont identifiés une Pseudoalteromonas isolé chez le mollusque bivalve Anadara Broughtoni dans la mer du japon. **(Anne postec,2005)**

1. Taxonomie du genre *Bacillus* :

Le genre *Bacillus* appartient à la famille de bacillaceae, l'ordre des *bacillales,* classe des *bacilli*, phylum des *firmicutes.* Depuis qu'il a été établi par **cohnen 1872**, le nombre d'espèces n'a pas cesser de fluctué. La première étude taxonomique complète sur le genre *Bacillus* a été publiée par (**smith *et al,* 1952),** elle est basée sur une comparaison entre 1134 isolats. Néanmoins, le genre *Bacillus* est toujours considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces **(zhang *et al,* 2009).**

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler **(Bron *et al,* 1999)**. Beaucoup d'espèces, initialement incluses dans ce genre dont de nombreuses espèces initialement décrites comme B*acillus*, ont été placées dans d'autres familles et genres vue qu' aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative de base des données de séquence de l'ARN_r 16s.

Par exemple *Alicyclobacillus* contient des bâtonnets Gram positives ou Gram variable, acidophiles, sporulant, qui possèdent dans leurs membrane, des acides gras ω-alicycliques avec des cycles à 6 ou 7 carbones. Les membranes de ce genre sont aérobies ou facultatifs et ont une teneur en GC d'environ 51 à 60 %. Un autre genre, *Paenibacillus* [du latin *paene,* presque, et de bacille], rassemble des bâtonnets Gram positives, aérobies facultatifs, mobiles grace à des flagelles péritriches, qui forment des endospores ellipsoidales et des sporanges gonflés, produisent de l'acide et parfois du gaz, à partir de glucose et de divers sucre, et ont une teneur en GC de 40 et 54%. *Paenibacillus alvei. P.macerans* et *P.polymyxa* sont des exemples d'organismes qui appartenaient précédemment au genre *Bacillus.*(**benabdallah ahmed mehdi,2014)**

1.1 L'ordre des bacillales :

L'ordre des bacillales comprend une dizaine de familles, on s'intéresse par le genre *Bacillus*. Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène. L'hétérogénéité extrême du genre est refflétée par la grande variété des places écologiques que les nombreuses espèces occupent, et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques comme *; Bacillus anthracis, Bacillus cereus…etc*.

1.2 Classification des Bacillus :

Historiquement, les espèces ont été regroupées en six grands groupes basés sur de nombreux caractères physiologiques, biochimiques et morphologiques **(Priest *et al,* 1993)**, ainsi que sur la capacité à former des spores **(Jonson, 1989)**.

Dont *B. polymyxa* été classés dans le group I selon les critères phénotypiques suivant : Anaérobies facultatives qui fermente une variété de sucres et sécrètent amylases, glucanase puctinase et pullulanase.et selon leur besoin de croissance des vitamines et acide aminés.

1.2.1 Classification morphologique :

Selon **Drobniewski** citant **(Smith *et al),*** le genre *Bacillus* est divisé en trois grands groupes, selon la morphologie des spores et sporange.

Tableau 03 : Classification morphologique du groupe *bacillus* **(Bacillus cereus Par DROMIGNY Eric)**

Groupe		**Espèces représentantes**	**Caractéristiques**
Groupe I	**Sous groupe A**	***Bacillus cereus;*** ***Bacillus megaterium;*** ***Bacillus thuringiensis;*** ***Bacillus anthracis ;*** ***Bacillus mycoide***.	• grande cellules. • des cellules végétatives en forme de Bacilles. • largeur des cellules supérieur ou égale à 1um. • bacilles à coloration de Gram +. • production des spores ellipsoïdes ou cylindriques. • Spores terminales ou centrales. • spores qui ne dilatent pas les sporanges. • des inclusions protoplasmiques de poly- béta-hydroxybutyrate.
	Sous groupe B	***Bacillus subtilis ;*** ***Bacillus pumilus ;*** ***Bacillus licheniformis ;*** ***Bacillus coagulants ;*** ***Bacillus firmus.***	• petite cellules. • dépourvues d'inclusions. protoplasmiques polybéta-hydroxybutyrate.
Groupe II		***Bacillus alvei ;*** ***Bacillus brevis ;*** ***Bacillus circulans ;*** ***Bacillus larvae ;*** ***Bacillus lentimorbus***.	• les bacilles à coloration Gram variable. • des sporanges gonflés avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales.
La suite de tableau 03			

Groupe III	***Bacillus sphaericus ;*** ***Bacillus globisporus ;*** ***Bacillus insolitus.***	• des espèces hétérogènes • de Gram variable • Les sporanges sont gonflés. • des spores sphériques terminales ou subterminales.

1.2.2 Classification physiologique :

Les éléments physiologiques permettant de classer les bactéries du groupe *Bacillus sereus lato sensu* seront présentées avec l'identification différentielle des souches dans le (tableau n°4). La température minimale de croissance est un caractère physiologique très important dans la classification des genres *Bacillus.* Il existe des températures intermédiaires entre ces deux espèces.

Tableau 04 : Classification physiologique du groupe *bacillus* **(Bacillus anthracis Par DROMIGNY Éric)**

Noms de Bacille	**La température de croissance**
Bacillus weihenstephanensis	25C °à 35C° (température optimal) Capable de croitre à 7C°
psychrotrophyques	6C°

1.2.3 Classification sérotypique (B. *cereus*) :

- **Antigènes utilisés :**
  - **Antigènes O :**

La spécificité des antigènes somatiques O des cellules végétatives de *B. cereus* a été la première fois étudiée en détail par **Sievers et Zetterberg**, cités par **Kramer et Gilbert**, qui ont observé des réactions croisées entre les souches de plusieurs espèces de *Bacillus,* incluant *B.subtilis,* et les antisérums des antigènes somatiques de *B. cereus.*

- **Antigènes H :**

Les antigènes flagellaires H ont été employés intensivement dans les études sérologiques des espèces de *Bacillus,* en particulier chez *Bacillus thuringiensis.* C'est probablement dû à la spécificité des souches plus élevée conférée par les antigènes flagellaires, par opposition aux antigènes somatiques. C'est aussi dû au fait que les antigènes H sont moins difficiles à manipuler que antigènes de spores.

- **Antigènes des spores :**

En 1960, **Lamanna** a tenté de classer les bactéries du premier sous-groupe de bactéries à grandes cellules, sur la base de leurs agglutinines de spores.

- **Schéma de sérotype :**

Cette classification a été basée sur des critères morphologiques et biochimiques, d'après **Lemille *et al*** on compte dix-sept sérotypes H parmi un groupe de trente trois souches de *B. cereus* isolées principalement chez les insectes.

2. Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus :*

Le genre Bacillus représente un groupe hétérogène de bactéries en forme de bâtonnets droit ou légèrement incurvées, à gram positif avec des extrémités arrondies, a l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0 µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation…etc. Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chainettes. Elles sont catalase positive, capable de croitre sur des milieux ordinaires. La morphologie de leurs colonies est très variables entre et au sein des espèces. La composition du milieu de culture et les conditions d'incubations influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier**. (De Vos *et al,* 2009).**

Les espèces du genre de Bacillus possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnâtes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles,

halotolérants ou halophiles Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lilthotrophes, certaines espèces sont prototrophes et d'autre auxotrophes exigent des facteurs de croissance.**(benabdallah ahmed mehdi, 2014).**

3. Ecologie du genre *Bacillus :*

Le genre *Bacillus* est largement distribué dans la nature**.** on peut l'isoler aisément du sol surtout pour les espèces saprophytes ou elles jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote, sa principale sources de nutriments est le matériel végétal et les exsudats racinaires et peut être également isolé à partir des aliments, de l'eau, des organismes eucaryotiques et même à partir des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins, dont la caractéristique la plus importante de ce genre et qui lui permet d'héberger plusieurs niches écologiques est la capacité de former des endospores. **(benabdallah ahmed mehdi, 2014).**

4. Types *Bacillus* les plus répondue :

4.1. Le groupe *Bacillus* cereus :

L'expression « groupe bacillus cereus »est en fait une nomenclature considérées comme empirique et non taxonomique, elle a toute fois l'intérêt de souligner la grande proximité des micro-organismes qui composent ce groupe six éspèces corespondants à B*acillus cereus, Bacillus anthracis, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringiensis, Bacillus weihenstephanensis, Bacillus mycoide.* Ainsi a l'intérieur du groupe *Bacillus cereus, Bacillus anthracis, Bacillus Bacillus thuringiensis, ont* une telle proximité sur le plan génétique qu'on les regroupe dans une seul espèces *:* B*acillus cereus,* ces trois *Bacillus* ont par ailleurs la particularité d'être pathogène pour l'homme et l'animale. *B.cereus* est responsable de certaines formes d'empoisonnement alimentaires et peut infecter l'homme.

4.2 *Bacillus cereus :*

Est une bactérie Gram positives mobile, aéro-anaérobie facultatives dont la cellule végétative mesure 3 à 5 µm de long pour un diamètre de 1 à 2 µm. elle peut se développer à des ph variant 4,3 à 9,3 ; elle fait partie des pathogène a cause de la production de deux toxines pouvant être à l'origine de toxi-infections alimentaire. Les spores collectives ont une résistance moyenne **(Guillard, 2003)**, cette bactérie est Gram +, VP +, citrate +, nitrate +, gélatine +.**(Archambaud, 2007).**

4.3 Bacillus anthracis :

Bacillus anthracis est l'agent infectieuse causant la maladie de charbon appartenant au groupe *Bacillus cereus*, bactérie Gram positive qui apparait macroscopiquement sous la forme d'un bâtonnet épais avec des bouts carrés, il apparaît seul, en courtes chaînettes ou en longues associations ressemblant à une tige de bambou, immobile, capsulé et capable de former une spore.

Il existe dans la nature sous deux formes : la forme végétative, dans l'organisme de l'hôte, et la forme sporulée (endospore à position centrale) dont la bactérie sporulante *Bacillus anthracis* est considérée comme l'une des armes biologiques possibles les plus dangereuses.

Bacillus anthracis est aéro-anaérobie et croît en 24 heures sur milieu ordinaire, incubé à 37°C sous atmosphère normale, en donnant de grosses colonies à aspect rugueux et à bords festonnés, "en tête de méduse".(ref)

4.4 *Bacillus subtilis :*

Bacillus subtilis est une bactérie résistante qui est présente dans les sols historiquement a été nommé « vibrio Bacillus ». On retrouve *Bacillus subtilis* sur des aliments qu'il contamine. *Bacillus subtilis* peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire. L'espèce type du genre, et la bactérie Gram positive la mieux étudiée. C'est un organisme modèle utile pour l'étude de la régulation génétique, de la division cellulaire. Son génome de 4.2 Mb a été l'un des premiers à être complètement séquencé. Ce séquençage a révélé de nombreux éléments intéressants. Par exemple plusieurs familles des gènes y ont été agrandies par duplication génétique, la plus grande de ces familles est celle qui code pour le transporteur ABC.

5. Intérêts biotechnologiques des *Bacillus :*

Beaucoup d'espèces de *Bacillus* ont une importance considérable. Certaines produisent des antibiotiques comme la bacitracine, la gramacidine et la polymyxine, il est devenu très exploité dans plusieurs applications biotechnologiques **(Priest., 1993)** telles que la lutte biologique contre les ravageurs dans l'agriculture, la production d'insecticides, d'antibiotiques et des enzymes **(Souza *et al.*, 2005 ; Guo *et al.*, 2006).** Dont certaines de leurs substances ont une valeur dans le secteur pharmaceutique et d'autres sont testés in vitro pour contrôler les populations microbiennes des aliments (**Stein, 2005).**

Il ya des travaux publié par des chercheurs qui sont concentrées sur l'intérêt biotechnologique de genre *Bacillus* qui peut toucher plusieurs domaine de fabrication

industrielle, thérapeutique et agronomique donc on va citer a titre exemple le protocole et les résultats de quelques travaux :

- Arifa TAHIR *et al* a été preuve la possibilité de produire et avec rendement importante pénicilline amidase par les bactéries de genre *Bacillus* spp isolé a partir de riz et exposé a une choc thermophiles à 80 °C pendant 15 min et le mettre ensuite et rapidement à 0 °C dans une bain de glace **(Prescott *et al*., 2008).**

- L'application industrielle de genre *Bacillus* est apparais dans l'article publié sous le titre de « Purification and caractérisation of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by Bacillus subtilis strain LFS3 », dont le cellulase est une enzyme de grande importante industrielle a cause de leur grande résistance thermophile et ascidique.

5.1 Les enzymes :

Les bactéries de genre *Bacillus* constituent la source majeure d'enzymes hydrolytiques utilisées surtout dans le domaine alimentaire et dans celui des détergents. Des protéases, des lipases, des cellulases et d'autres hydrolases sont produits par des bactéries de genre *Bacillus*, ce genre constitue la source de plus des deux tiers des enzymes produites industriellement par les bactéries.

a. Les protéases (EC 3.4.21 proteins $\xrightarrow{\text{protease}}$ amino acids)

L'un des plus grandes groupe d'enzymes demandé dans le monde entier. Leur large utilisation et application, contrairement à la spécificité de leur action, attire l'attention des scientifiques dans une tentative d'exploiter leurs capacités biotechnologiques **(Rao *et al* , 1998).** Elles sont généralement utilisées comme additifs dans les détergents de blanchisserie, dans la transformation des produits alimentaires, pharmaceutiques et dans les industries de tannage de cuir aussi bien que dans la gestion des déchets **(Amoozegar *et al*., 2007; Karbalaei-Heidari *et al*., 2009).**

b. Les lipases (EC.3.1.1.3 lipide $\xrightarrow{\text{Lipase}}$ graisseux acids + glycerol)

Des souches de genre Bacillus ont été identifiées comme *Oceanobacillus, Thalassobacillus, Halobacillus, Virgibacillus,* produisent des lipases actives en présence de fortes concentrations salines **(Rohban *et al*., 2009).** Elles ont un rôle physiologique majeur dans le métabolisme des lipides en produisant des acides gras. Du fait de leur capacité de

« digestion des lipides », les lipases sont utilisées dans de nombreuses applications industrielles : en agroalimentaire, dans l'industrie chimique (incorporées dans des détergents), dans la fabrication de produits cosmétiques, et également dans le traitement de certaines pathologies telles que l'insuffisance pancréatique.

c. Les cellulases et exo-cellulases (EC 3.2.1.4 dégradation de cellulose) :

Les cellulases sont généralement produites par les champignons, les bactéries et les bactéries halophiles **(Beguin et Aubert, 1994),** aujpurd'hui**,** des cellulases halophiles dérivées de *Bacillus sp* ont des caractères essentielles comme la thermostabilité et la stabilité face à la salinité, idéales pour différentes application industrielles **(Aygan *et al*, 2008).**

En biotechnologie, la cellulase peut être utilisée, combinée à la pectinase, ou la Pectolyase Y-23, pour obtenir des cellules végétales dépourvues de leur paroi, appelés protoplastes. Ceux-ci peuvent être dé-différenciés, modifiés génétiquement, cultivés, fusionnés...

Les cellulases ont des applications en industrie, notamment pour la fabrication de diverses substances et matériaux à partir de matières végétales: pour dégrader les parois végétales afin de modifier la texture.

d. L'amylase (EC.3.2.1.x $(C_6H_{10}O_5)_n + n\,H_2O \longrightarrow n\,C_{12}H_{22}O_{11}$) :

Dans l'industrie agroalimentaire, on utilise *Bacillus subtilis* pour produire des enzymes du type amylase qui servent à fabriquer du pain. La bactérie entre également dans la composition de produits détergents. En pharmacie, *Bacillus subtilis* est utile dans les traitements antibiotiques.

Avant antibiotiques sont devenus largement disponibles, *les Bacillus subtilis* probiotiques (ou B. subtilis) a été couramment utilisé pour traiter de nombreux symptômes et troubles tractus gastro-intestinal, y compris certaines maladies qui causent la diarrhée chez les nourrissons et les jeunes enfants. Il a été montré être une bactérie intestinale importante qui travaille de concert avec d'autres bactéries intestinales en bonne santé pour faire de la flore intestinale saine observées chez les sujets sains et vitaux.

6. Production des composés antimicrobiens :

Le genre *Bacillus* a le potentiel de produire plus de quarante cinq molécules antimicrobiennes ; certains de ces composés ont une importante clinique, d'autres sont testés in vitro pour contrôler les maladies des plantes et dans la conservation des denrées alimentaires. En fonction de leur voie de biosynthèse.

7. Production des antibiotiques :

Certains bacillus sont utilisés pour la fabrication des **antibiotiques** (bacillus subtilis), telles que *Bacillus subtilis, Bacillus polymixa, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus stearothermophilus, B. brevis, B. thuringiensis, B. megaterium, B. circulans* et *B. licheniformis* **(Whipps , 2001 ; Stein, 2005)**

L'étude de **Kamat *et al*. (2011)** a mis en évidence la production de composés antibactériens par *B. marismortui*, bactérie halotolérante isolée à partir de lac salé en Inde. Cette espèce n'était pas connue par sa capacité à produire des composés antibactériens.

Très importants :

Toute étape et opération durant la partie expérimentale est réalisées suivant les règle d'hygiènes et stérilisation afin d'éviter les risques de contaminations, on doit suivre rigoureusement certaines règles de sécurité comme :

- **Nettoyer les surfaces de travail avec un désinfectant adéquat avant et après toutes manipulations.**
- **Se laver les mains avant et après toutes manipulations.**
- **Ne placer sur l'aire de travail que le matériel nécessaire**
- **Disposer le matériel sur l'aire de travail de manière à être le plus à l'aise possible pour manipuler.**
- **Bien connaître l'ensemble des étapes avant de commencer les manipulations et Apprendre bien le protocole de travaille pour ne pas déplacer trop.**
- **Porter une blouse boutonnée afin d'éviter de contaminer les vêtements.**
- **Et sans oublie le travaille devant le bec bunsen et avec instruments stérilisés préalablement.**
- **Tous les instruments de travail doivent être stérilisés**
- **Avant et après les manipulations, le matériel a été stérilisé et la surface de travaille désinfecter.**

I. Matériels :

1. Milieu et solution :

Dans notre travail on a utilisé plusieurs milieux, les milieux pour l'isolement sont LB et GN, pour les tests enzymatiques des milieux spécifique (jaune d'œuf, amidon, de lait) et pour les tests antimicrobiennes (MH, PDA), et pour la galerie classique TSI, citrate simoun, urée indole, mannitol mobile et les ampoules de ADH, LDH, ODC, pour les solutions on a utilisé l'éthanol, fushine, bleu de méthylène, lugol.

2. Petits matériel et verreries :

Matériels et verreries a utilisé ces une matériels microbiologie en principe les lamelles, les lames, anse platine les pipete pasteurs, bec ben sen, boites Pétris, papier aluminium , coton et des tube.

3. grand matériel :

Le grand matériel a utilisé ces une matériels de laboratoire de bactériologie en premier lieu autoclave pour la stérilisation, bain mare, balance et microscope photonique.

4. Echantillonne biologique :

4.1.Les sites d'échantillonnages :

Nos échantillons proviennent de six sites côtiers tableau 05.

Tableau 05: station d'échantillonnages

Sites	wilaya	Caractéristiques	Echantillons
Bouharoune	Tipaza	Aires marine protégées Hors d'activité humains Non impactée	Algue vert Eau de mer 1 Algue rouge
Lkarma	Alger	Zone d'expansion touristique et de loisir une vaste plage de sable fin	Algue vert Eau de mer
Coursso	Alger	Zone d'expansion touristique et de loisir une vaste plage de sable fin	Sable Eau de mer 4 Algue vert
Fucka	Alger	Zone d'expansion touristique et de loisir une vaste plage de sable fin	Algue brun (A 7) Algue brun (A 6) Algue rouge (A 5) Escargot (coquillage)
Tipaza (douawda)	Tipaza	Zone d'expansion touristique et de loisir une vaste plage de sable fin	Ourssin
Boumerdass		Zone d'expansion touristique et de loisir une vaste plage de sable fin	Eau de mer Sable Algue vert

4.2. Récolte et conservation des échantillons:

Les échantillons prélevés sont de type végétal et animal en plus de l'eau de mer et du sable des plages associées. Les échantillons sont prélevés aseptiquement et mis dans des boites en plastique stériles. Ils sont ensuite transportés à l'intérieur d'une glacière pour être conservés au réfrigérateur du laboratoire à 4 c°.

4.3. L'échantillonne biologiques :

Les échantillonnes sont deux types des végétaux et des animaux, ces échantillonnes récolté a déférent site, les tableaux 02 et 03 représenté les échantillonnes.

a. Les échantillons végétaux :

Tableau 06 : échantillonne végétaux.

	Nom	**Site de récolte**
Algue rouge	*Laurencia cf complanata* *Gelidium sesquipedale*	Bou haroun fucka
Algue vert	*Ulva lactuca*	Bou haroun fucka
Algue brune (ce n'est pas une vrais algue)	*L.digitata* *Laminariadigitata*	Fucka Fucka

b. Les échantillons animaux:

Tableau 07 : Les échantillons animaux**.**

	Nom	**Site de récolte**
oursin	*échinodermes*	Tipaza fucka
Escargot	limaçon	fucka

II. Méthode :

II.1. échantillonnage

1. Les Sites d'échantillonnages :

Pour enrichie notre échantillonnes, on a assuré la multiplication des sites d'échantillonnages, on a prélevé des algues et des espèces marins a partir des plages algérien comme Boumerdasse, Bou haroune, Lkarma, Tipaza.





2. Récolte et conservassions :

L'échantillonne récolté par la méthode de raclage, on a raclé les surfaces de rochés et la surface des bâtonnes pour les algues, les échantillonnes sont retenue avec l'eau de mer, pour le sable on a prendre le sable qui on émergé dans l'eau de mer, les boites de prélèvement

sont stériles et au temps de prélèvement les boites ferme sous d'eau de mer, l'échantillonne déplace dans classier a température bas 4C°.



II.2 Isolement et purification des espèces microbiennes

Les isolements sont réalisés dans un délai qui ne dépasse pas les 24h après les prélèvements, plus de 07 expériences ont été lancées. Chaque type d'échantillon est manipulé selon un protocole qui lui est spécifique.

Le sable est ensemencé dans une gélose ordinaire après la réalisation des dilutions :

2.1.1 Préparation de solution mères et de leurs dilutions

a. Le sable

Une série de dilutions décimales est réalisée à partir d'une solution mère préparée au préalable par l'introduction d'un gramme de sable dans 9 ml de bouillon nutritif. 1 ml de chaque dilution est ensemencé en duplicata dans deux boites Pétri contenant une gélose ordinaire.

b. Les espèces (algue, oursin, escargot)

1 g d'algue, 1 g coquillage d'escargot et 1g des piquants d'oursin sont bien broyées dans des mortiers stériles le broyat de chaque espèce marine est mis dans un tube de 09 ml de bouillon nutritif, Une série de dilutions décimales est effectuée à partir de chaque tube en diluant à chaque fois 1ml de l'échantillon dans 9ml de bouillon nutritif stérile, le tout est agité puis incubés à 30C°pendant 24h.

Tableau 08: tableau résume les conditions de préparation des dilutions pour l'ensemencement.

L'échantillonnes	BOUHAROUNNE							COURSSOU
	Eau de mer 1	Eau de mer 4	A 1	A2	A 3		A4	Sable
					Avec rinçage	Sans rinçage		
Température	12.7	19.9	20.9	23.7	16	18.8	19.9	19
PH	7.57	6.96	6.96	6.64	7.6	7.5	7.62	7.86
La masse	1 ml	1ml	1.489	1.164	2.24	2.30	1.39	1 g
Le volume	9 ml	9ml	18 ml	18ml	9ml	9ml	18ml	9 ml

Tableau 08: tableau résume les conditions de préparation des dilutions pour l'ensemencement. (Suite)

BOUMERDASSE		**AINE KARMA**		**FUCKA**	
sable	A 5 Avec rinçage	A6	A7	**oursin**	**L'escargot**
		Avec rinçage		Avec rinçage	Avec rinçage
19	20	24	23.9	19	20
7.88	7.63	6.1	7.12	7.5	6.85
1 g	1 g	1g	1g	1g	1 g
9 ml	18 ml	9 ml	9 ml	9 ml	9 ml

2.1.2 L'ensemencement et la purification

Apres 24 h d'incubation, les tubes sont agités encore une fois par le vortex. Puis en utilisant une anse de platine stérile, une goutte de chaque solution mère ainsi que ses dilutions est ensemencée sur 03 boites de milieu gélosé ordinaire. Les souches obtenues sont purifiées à la suite de plusieurs repiquages successifs.

2.1.3 Sélection des souches

Seules les souches qui sont de forme bacillaire, de Gram+ et capables de sporuler sont retenues pour les tests ultérieurs.

3. Identification phénotypique des souches

3.1 Caractères microscopique et macroscopique

3.1.1 Caractérisation macroscopique des cultures

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir des isolements après leurs incubation pendent 24h à température 30c°.L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies.

a. Aspect de colonies en surface sur milieu solide

- **La taille**

Elle est mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant le micromètre oculaire.

- **La forme**

- Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers
- Relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- Centre : parfois surélève, parfois ombiliquée (en creux)

- **L'aspect de la surface**

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, renvoyé la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé….

- **L'opacité**

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière)
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne peut pas voir les

Forme son travers, comme le verre dépoli)

- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre)

- **La consistance**

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

- **La couleur et/ou pigment**

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge …), tendis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.

3.1.2 Caractérisation microscopique

- **L'observation par microscope photonique**

L'étude microscopique permet de décrire la morphologie microbienne (la forme des bactéries, leur mode de regroupement aussi bien que leur taille, mobilité et leur affinité pour différents colorants (Gram)), l'observation microscopie permet la détection des spores et des inclusions cellulaires, ces derniers critères sont les plus importants dans la sélection de nos souches (éventuellement faisant partie du groupe *Bacillus*).

Ces renseignements peuvent être fournis par une simple préparation à l'état frais entre lame et lamelle, les bactéries étant alors observées vivantes, ou par l'observation d'un frottis coloré au bleu de méthylène ou par une coloration différentielle de GRAM.

a. Observation de l'état frais

Une petite quantité d'une colonie isolée est déposée sur une larme propre contenant une goutte d'eau distillée stérile dans laquelle elle est émulsionnée puis la préparation est recouverte par une lamelle et observée à l'objet X10, X 40.

b. Observation à l'état fixé

- **La coloration simple au bleu méthylène**

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes. La coloration est d'abord lancer par la préparation de frottis en suite

ce dernier est recouvert par quelques gouttes de bleu de méthylène phéniqué et laissé 1 à 5 minutes. Après rinçage, le frottis est séché puis observé. La mise en évidence des spores et faite par l'observation de cellules provenant de colonies âgées de 48heures au grossissement X 100.

- **La coloration des Gram**

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet. La coloration de Gram est basée sur une coloration des bactéries par le violet de Gentiane phénique pondant 1 minute ensuite un rinçage et la fixation de la couleur par le lugol pendant 45s. Après, une décoloration par l'alcool 95° pendant10 s et en fin l'émersion par la Fuchsine phéniquée de ziehl 1 minute rinçage et l'observation au grossissement X100 avec une goutte de l'huile à immersion.

4 .Caractérisation biochimique

4.1 Mise en évidence des enzymes respiratoires

- **Cytochrome oxydase**

Le cytochrome oxydase est une enzyme qui intervient à la fin de la chaine respiratoire pour catalyser la fixation de l'hydrogène et des électrons sur l'oxygène. Sa production est mise en évidence par des disques « Oxydase » imprégnés d'oxalate N-N-diméthylparaphénylène. Une quantité suffisante de culture est déposée sur le disque imbibé d'eau distillée. Une couleur bleu violacée se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive **(Joffin etLeyral, 2006).**

- **Catalase**

La catalase permet la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par la souche. Sa recherche consiste à mettre en contact une colonie de l'isolat en présence d'eau oxygénée à 10 volumes. Une effervescence due à un dégagement gazeux traduit la présence de cette enzyme **(guiraud *et al*,2003).**

- **Nitrate réductase**

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Il a été réalisé selon le protocole mentionné dans le Bergey's Manuel of Systematics**(De Vos *et al,* 2009).** Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 48 heures, trois gouttes de chacun des réactif NIT I (acide par a sulfanilique 0,8 g en 5 N acide acétique) et NIT II (dimethyl-α-naphthylamine 0.6 ml ; acide acétique100 ml),

En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a :

-Apparition de la coloration rouge : les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la Nitrate réductase.

-Absence de coloration rouge : les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la Nitrate réductase.
L'apparition de gaz dans la cloche de durham indique la réduction des nitrates en azote gazeux.

4.2 Test Mannitol-Mobilité :

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu semi-solide Mannitol-Mobilité. C'est une gélose molle conditionnée en tubes qui permet d'étudier la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries. La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation, L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur, et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture **(Harley et Prescott, 2002).** Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, créant un trouble dans le milieu alors que les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la strie d'ensemencement **(Gerhardt *et al* ., 1994).**

4.3 Type respiratoire :

Ce test a été effectué selon les recommandations de **Guiraud (1998)**. La gélose viande foie (VF) répartie en tube et régénérée par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon. L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur. Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures.

5. Galerie classique :

a. Utilisation du citrate

L'habilité des souches à utiliser le citrate comme seule source de carbone et d'énergie est testée sur le milieu au citrate de Simmons. Le virage au bleu du milieu indique une réaction positive **(Harley et Prescott, 2002).**

b. Utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H_2S et de CO_2 sont appréciées sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI) **(Harley et Prescott, 2002).**

c. Recherche de la β-galactosidase

A une suspension dense des bactéries testées en eau distillée stérile, un disque imprégné d'Ortho-Nitro-phényl-β-Galactoside (ONPG) est ajouté puis incubée à 37°C pendant 30 à 60minutes. L'apparition d'une couleur jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et donc la présence d'une β-galactosidase **(Joffin et Leyral, 2006).** Le test a été effectué pour 15 isolats d'activité enzymatique.

d. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur une gélose à l'urée de Christensen. La production de l'uréase libère le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu d'où virage de l'indicateur coloré de l'orange en rose ou en rouge-violacé **(Harley et Prescott, 2002).**

6. Dégradation des acides aminés

o Utilisation du tryptophane

La recherche de la tryptophanase, complexe enzymatique permettant la production d'indole à partir du tryptophane, est réalisée par inoculation d'un tube d'eau peptoné exempte d'indole. La production d'indole est mise en évidence par ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs (para-diméthyl-aminobenzaldéhyde/N-amyl ou iso amyl alcool/HCl pur)et une réaction positive est interprétée par l'apparition d'un anneau rouge à la surface **(Joffinet Leyral, 2006).**

o recherche du tryptophane désaminase

La **TDA** dégrade le tryptophane selon la réaction suivante :

Tryptophane $+H_2O \rightarrow$ **acide indole pyruvique** $+ NH_3$

L'acide indole pyruvique Forme un précipité marron foncé en présence d'un réactif : le chlorure de fer en solution acide.

o Production de décarboxylases et de l'arginine dihydrolase

Les activités enzymatiques de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine Décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) sont examinées en anaérobiose, sur le bouillon de Moeller à partir d'une suspension dense de culture. Une activité positive est interprétée par une couleur violette (alcalinisation du milieu) et l'absence d'enzyme est exprimée par un virage au jaune (acidification du milieu**) (Joffin et Leyral, 2006).**

7. Système API 20^{E}

La galerie api 20E est un système simplifié et standardisé, elle comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés permettant d'effectuer 20 tests biochimiques.

Dans les micro-tubes, une suspension bactérienne des dix souches sélectionnées effectuée en API medium à partir d'une culture de 18 heures sur milieu gélose nutritive (GN) à 10% de NaCl (p/v) (équivalent à 0,5 McFarland) est ensemencée. Après incubation 24 heures à 30°C, les réactions se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. L'interprétation des résultats se réfère au catalogue joint avec la plaque.

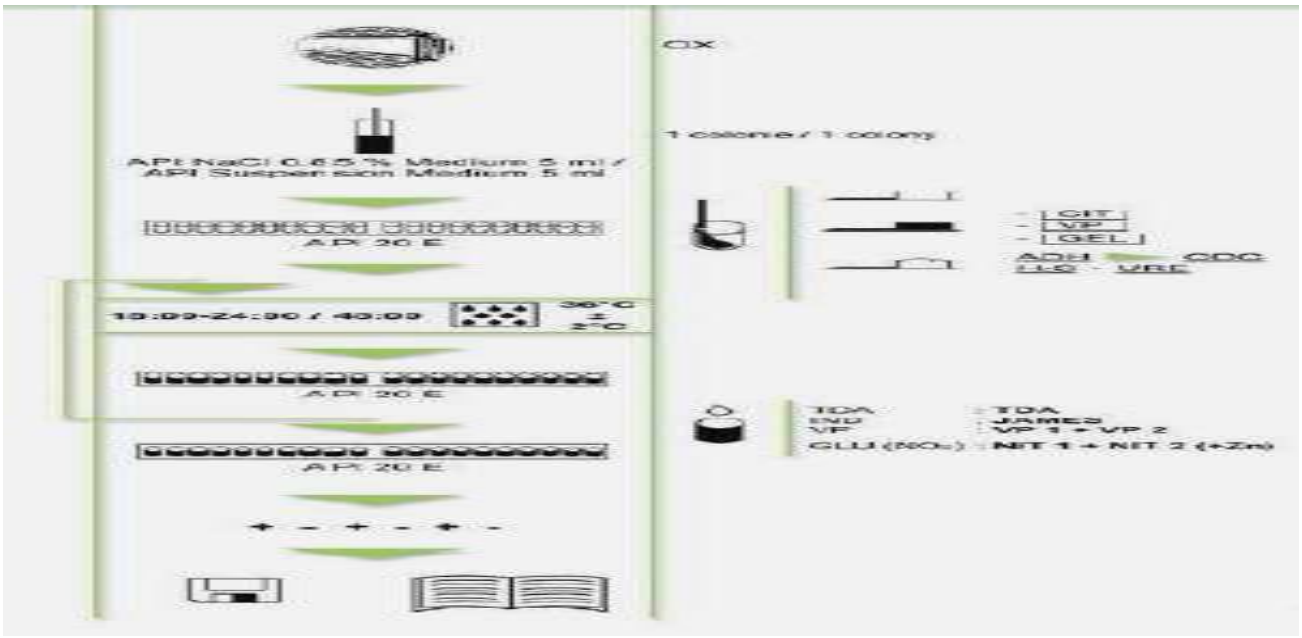


Figure 01 : chemin de réalisation de test API 20 E**.**

8. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires

Les isolats sont soumis à une recherche qualitative d'hydrolases extracellulaires à 30°C. Le milieu 1 solide est modifié par réduction de la source organique (milieu de base) et l'addition du polymère-test **(Demirjian*et al.*, 1999 ; Tholey et Heinzle, 2002).** La composition des milieux modifiés utilisés est rapportée dans l'annexe

8.1.1. Détermination de l'activité amylolytique

- **L'amylase**

L'activité amylolytique est examinée en ajoutant 1% (p/v) d'amidon soluble au milieu de base. L'incubation est effectuée pendant 1 à 3 jours et la lecture se fait par inondation desboites avec une solution de lugol. La présence de zones claires autour de l'ensemencement témoigne de la production d'amylases **(Gordon *et al,* 1973).**

8.1.2. Détermination de l'activité protéolytique

- **Hydrolyse de la caséine**

L'hydrolyse de la caséine est étudiée sur gélose au lait double agar-agar (annexe). Après Ensemencement par des spots, les souches testées sont incubées pendant 1 à 2 jours. La présence d'une activité caséinolytique se manifeste par la présence d'un halo clair autour des colonies **(Priest*et al.*,1988).**

8.1.3. Détermination de l'activité lipolytique

- **la lécithinase**

Ce test a été réalisé par l'ensemencement de la souche en spot sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (voir annexe). Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition de halo opaque blanc-jaunâtre autour de la culture prouve que la souche possède une lécithinase **(De VOS *et al*, 2009).**

- **La lipase**

Le test de lipase est réalisé sur milieu à base de jaune d'œuf, l'ensemencement des souches est réalisé par spot, l'apparition d'une zone floue autour de colonie prouve que la bactérie possède une lipase.

- **La lipoprotéinase**

Dans le même milieu et avec la même méthode d'ensemencement, la présence de l'enzyme est confirmée par un halo d'éclaircissement autour de colonie.

- **la gélatine**

Le milieu de base est additionné de 15% (p/v) de gélatine. L'ensemencement des colonies à tester est fait par piqure centrale dans des tubes remplis par le milieu gélatiné, après une incubation de 24 h une $1^{ére}$ lecteur est réalisée, la $2^{émé}$ lecteur est faite après un refroidissement de 24h dans un réfrigérateur, la liquéfaction de milieu après l'incubation et le refroidissement mise que la bactérie capable de dégradé le gélatine. (**Frazier, 1926).**

9. Mise en évidence des activités antimicrobiennes

La caractérisation d'activité antimicrobiennes de nos bactéries est réalisée contre des souche pathogènes isolées de l'hôpital 6 souches bactériennes et une levure sont utilisées pour les tests, par la méthode de diffusion (NCCLS) « National comité for clini callaboratory standard », des suspensions de souches microbiennes pathogènes de 0.5Mcfarland sont préparées à partir de colonies jeunes de 18h, A partir de ses suspensions, des boites Pétri contenant le milieu MH sont ensemencées totalement par un écouvillon stérile. Nos souches sont ensuite ensemencées par spot, les boites sont incubées à 30c° pendant 24h. Les résultats positifs sont identifiés par l'apparition d'une zone d'inhibition auteurs des colonies présentant une activité antimicrobienne.

Tableau 09 : les souches utilisé dans le test l'activité antibactérienne.

La souche	**ATCC**
Staphylocuccus aureus résistanteà la méthyciline(SARM)	**« ATCC34300 »**
Staphylocuccus aureus sensible à la méthyciline(SASM)	**« ATCC25923 »**
Pseudomonas aeruginosa	***« ATCC25853 »***
Echerichia coli	**« ATCC25922 »**
Micrococcussp	
Levure (Candida albicans)	Isolé dans l'hopitale

10. Etude de l'activité antifongique

Dans notre étude deux types de pathogènes fongiques sont utilisés pour la détermination de l'activité antifongiqueLa mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des disques, passe par 4 étapes :

1er étape :

Un disque portant la souche fongique est coupée puis déposé au centre d'une boite pétrie contenant le milieu de PDA.

2^{em}étape :

Par la même méthode des disques portant nos souches sont déposés aux quatre coins de la boite avec la même distance par rapport au centre.

3^{em}étape :

Les boites sont incubées à 20 à 37 c° pendant 5 à 7 jours.

4^{em}étape :

La présence d'une zone d'inhibition entre le champignon test et la souche suppose que cette dernière possède une activité antifongique. Le rapport ci-dessous montre l'importance d'une telle activité :

Le rayon interne correspond au rayon du champignon qui fait face à la souche bactérienne testée.

R=rayon interne de champignon /rayon externe de champignon

Le potentiel de l'activité antifongique eut être évalué comme suit :

- R entre 0-0.6 forte activité ;
- R entre 0.61- 0.85 moyenne activité ;
- R est supérieur à 0,85 : activité antifongique négligeable.

11. Conservation des souches

On veut garder les souches isolées et étudiées pour d'autres études la conservation peut être réalisées pour des jours (courte durées) ou des mois (longue durées)donc le chois de la méthode de conservation dépend de la durées pendant laquelle on veut garder les organismes ainsi que de l'équipement et des locaux de laboratoire dont on dispose.

a. Conservation de courte durée

Certaines souches sont facilement et rapidement perdues il s'agit donc de les conserver pour éviter le risque de les perdre.

- **Conservation par repiquages successifs**

L'idée est la suivante : repiquer régulièrement (avant la perte de viabilité) sur un nouveau milieu nutritif. En fait, même si on fait abstraction des problèmes éventuels des risques de contaminations liées aux repiquages, cette technique est limitée par les dérives, les instabilités génétiques des souches pures.

Ainsi, à partir d'un clone de départ de cellules identiques entre elles et identiques à la cellule mère du clone, on va aller vers l'apparition de variant génétiques qui seront rapidement présents en grandes proportions. C'est le milieu de culture et les conditions de culture qui vont faire la sélection des variant.

- **Conservation sur des tubes de GN incliné**

Leur conservation se fera sur des géloses inclinées avec un repiquage annuel ou pluriannuel

b. Conservation de longue durée

Les cultures bactériennes peuvent être conservées congelées ou lyophilisées dans diverses suspensions préparées à cet effet. Il existe de nombreuses formulations de suspension mais en général on utilise le lait écrémé, un milieu à base de sérum ou le milieu de polyvinylpyrrolidone (PVP) pour la lyophilisation. Pour la congélation, on utilise un bouillon de lait écrémé ou de sang ou encore un bouillon trypticase-soja avec 15 à 20 % de glycérol.

I. Résultats :

1. L'isolement et la purification :

Plus de 40 souches Gram positif, ayant la forme de bâtonnets, capables de former des spores ont été isolées et purifiées par repiquages successifs des colonies. C'est souches faisant probablement partie du groupe *Bacillus* ont fait l'objet de notre étude. Les isolats ont des tailles, des couleurs et des formes différentes. Ils sont nommés selon un code composé de lettres et de chiffres désignant le site d'échantillonnage et la souche en question.

Le rendement d'isolement de bacilles diffère en fonction de site d'échantillonnage aussi bien que l'espèce à partir de laquelle ils sont isolés.

Tableau 10 : tableau présenté la diffusivité des souches à partir l'espèce d'isolement.

L'espace	Les algues	L'eau de mer	sable	oursin	Algue brunes	Escargots
Nombre des souches	16	8	3	1	9	2

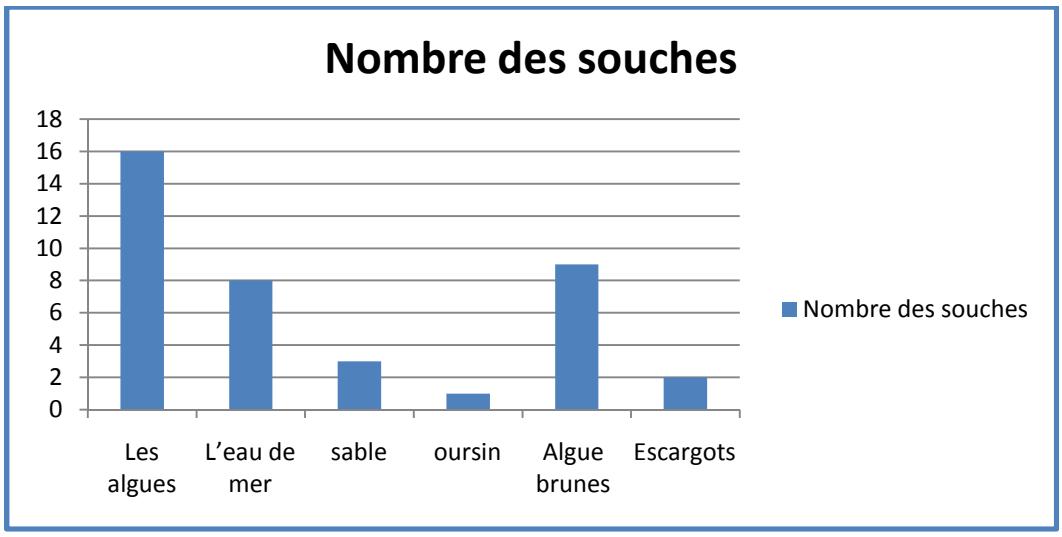


Figure 02 : Répartition des souches bactériennes isolées selon l'espèce marine.

- **Interprétation de figure 02 :**

Les résultats présentés sur la figure ci-dessus montrent que les souches bactériennes ciblées sont très répondues dans les échantillons d'algues marines Elles sont plus abondement présentes en association avec les algues qu'en suspension dans l'eau de mer environnante. Elles sont isolées du sable et des autres espèces marines animales également mais d'une façon beaucoup moins

importante. Les microorganismes sont des ubiquitaires et ils se sont montrés capables de coloniser tous les lieux du globe même les plus hostiles d'entre eux. Le fait qu'on puisse isoler des bacilles en étroite association avec les algues, et probablement absents dans leur environnement immédiat (l'eau de mer) qui est très dynamique, suggère qu'il y a probablement une association bénéfique entre l'algue et les souches isolées.

- **Bacilles associés à chaque type d'espèce marine.**

Tableau 11 : tableau présentant Les taux de bacilles associés à chaque espèce marine prélevée.

Echantillonne	**A1**	**A2**	**A3**		**A4**	**A5**	**A6**	**A7**	**Aeu1**	**Aeu4**	**oursin**	**escargot**	**Eau sans bouillon**
Nbr souches	1	5	5	2	3	4	1	6	3	1	1	2	4

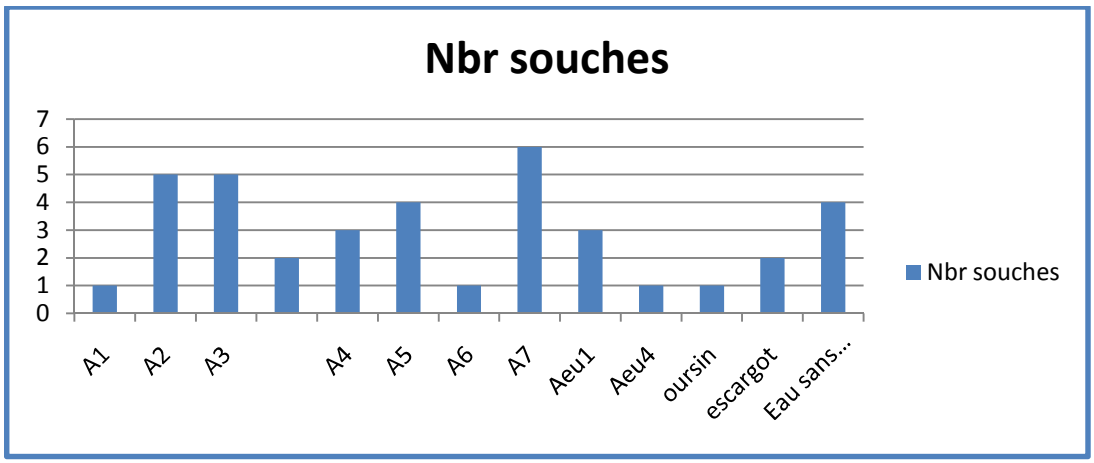


Figure 03: graphe représenté la retenue de chaque échantillon

- **Interprétation de figure 03 :**

D'après le tableau l'algue numéro 7 fournis 6 souches 3 à partir des feuilles et 3 à partir de tige d'algue elle-même, suivi par les échantillons A2 et A3et eau sans Enrichissement dans du bouillon.

2. **Résultats de l'étude phénotypique des souches :**

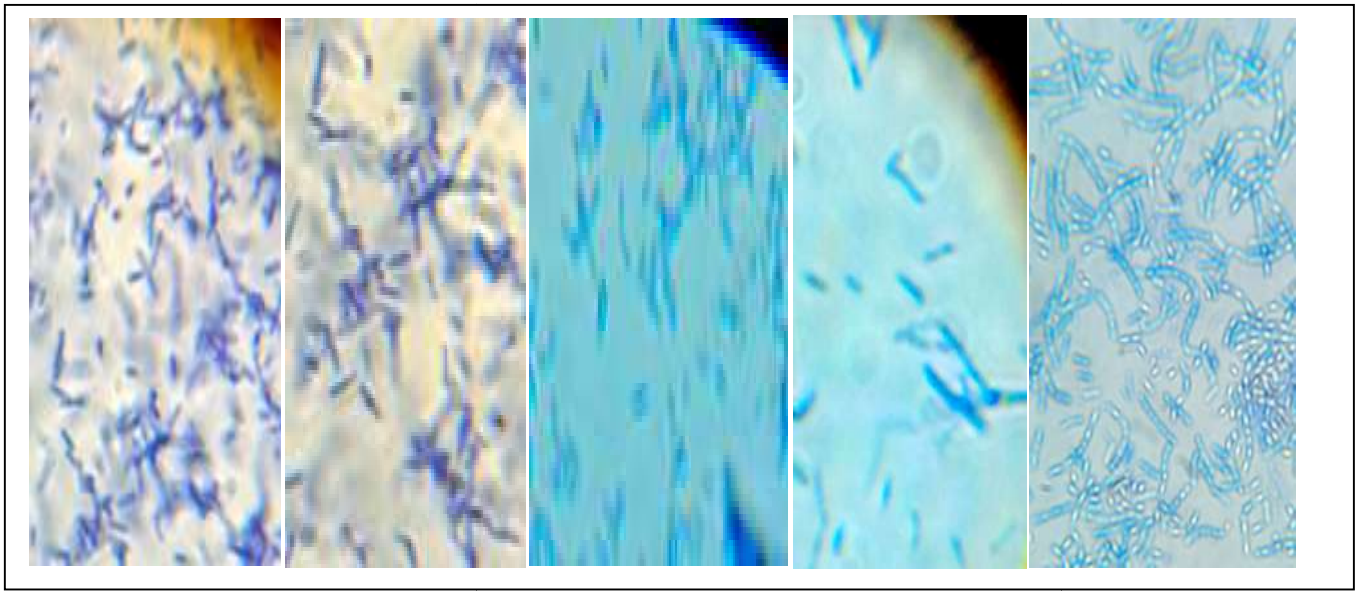
L'identification phénotypique des isolats est réalisée en suivant les recommandations de **Logan *al*, 2009** a pour la description de nouveaux taxons dans l'ordre des *Bacillales.*

2.1 Caractérisation macroscopique et microscopique de souche :

2.1.1 Etude microscopique :

2.1.1.1 L'observation de l'état frais :

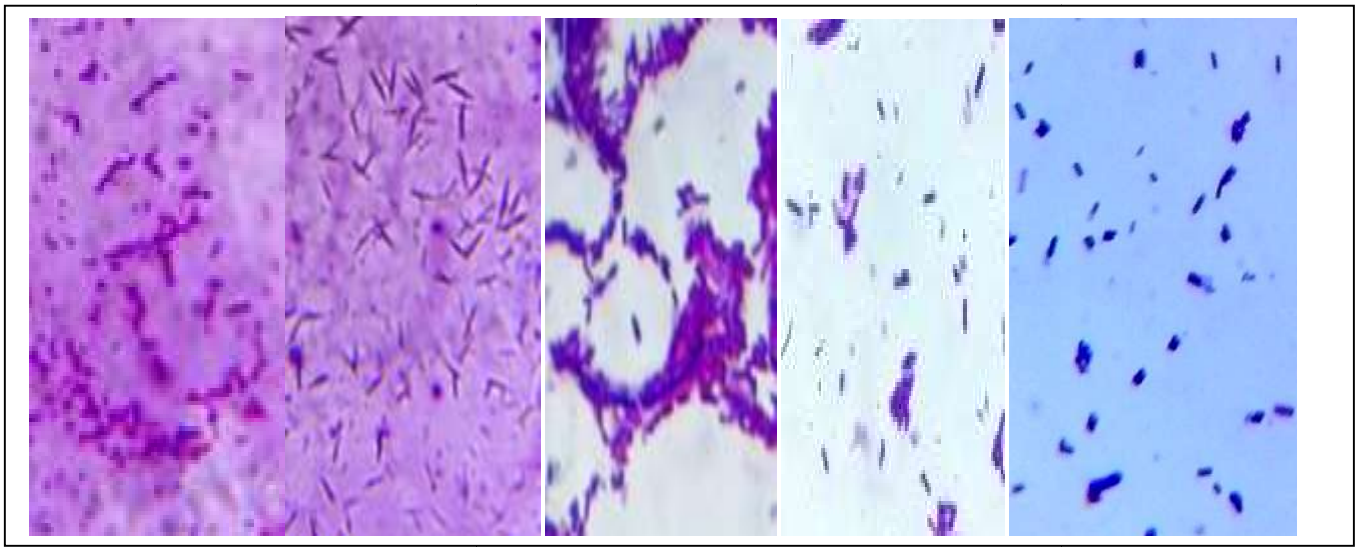
L'examen de l'état frais montre que les souches sélectionnées présentent sous forme de bâtonnets de différente taille et de regroupements différents.



Photos 01 : photos de souche par la coloration de bleu méthylène

2.1.1.2 L'observation à l'état fixe :

Le but de cette étude était porté sur le screening des bactéries de genre *Bacillus* qui présente la forme bâtonnet à Gram positif sporulé, de ce fait seules ces derniers ont été retenus.



Photos 02: coloration de Gram des souches.

- **Les résultats d'étude microscopique sont apparus dans le tableau N° 12:**

Tableau 12: résultats d'étude microscopique.

La souche	La forme	la mobilité	regroupement	Les spores	Type de spores	Gram
BH 1	BC	+	DIP/ UNI	PR	**ND /C**	+
BH2	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH3	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH4	BC	-	CH/DIP	PR	**TR /ND**	+
BH5	BC	+	UN	PR	**C /ND**	+
BH6	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH7	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH8	BC	-	CH /DIP	PR	**ND /TR**	+
BH9	BC	-	UN	PR	**ND /C**	+
BH10	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH11	BC	-	DIP	PR	**TR /ND**	+
BH12	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH13	BC	Nf	UNI	PR	**C /ND**	+
BH14	BC	Nf	DIP	PR	**C /ND**	+
BH15	BC	-	DIP/CH	PR	**TR /ND**	+
BH16	BC	Nf		PR		+
BH17	BC	-	DIP	PR	**C /ND**	+
BH18	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH19	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
BH20	BC	-	UN	PR	**ND /C**	+
BH21	BC	-	DIP/CH	PR	**ND /C**	+
BH22	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
KR23	BC	+	DIP/CH	PR	**C /ND**	+
KR24	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
KR25	BC	Nf	UNI /DIP	PR	**C /ND**	+
KR26	BC	-	DIP	PR	**C /ND**	+
KR27	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
KR28	BC	-	UN	PR	**TR /ND**	+
KR29	BC	Nf	UNI	PR	**C /ND**	+
KR30	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
FK31	BC	+	DIP/UN	PR	**C /ND**	+
FK32	BC	Nf	UNI	PR	**C /ND**	+
FK33	BC	Nf	UNI	PR	**TR /ND**	+
FK34	BC	-	DIP	PR	**C /ND**	+
FK35	BC	Nf	UNI	PR	**TR /D**	+
FK36	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
FK37	BC	Nf	Nf	PR	**Nf**	+
FK38	BC	Nf	UNI /DIP	PR	**ND/C**	+
TP39	BC	nF	UNI	PR	**TR /ND**	+
TP 40	BC	Nf	UNI /DIP	PR	**ND /C**	+

BC : groupe bacille **PR :** présente

ND : non déformant **C :** central

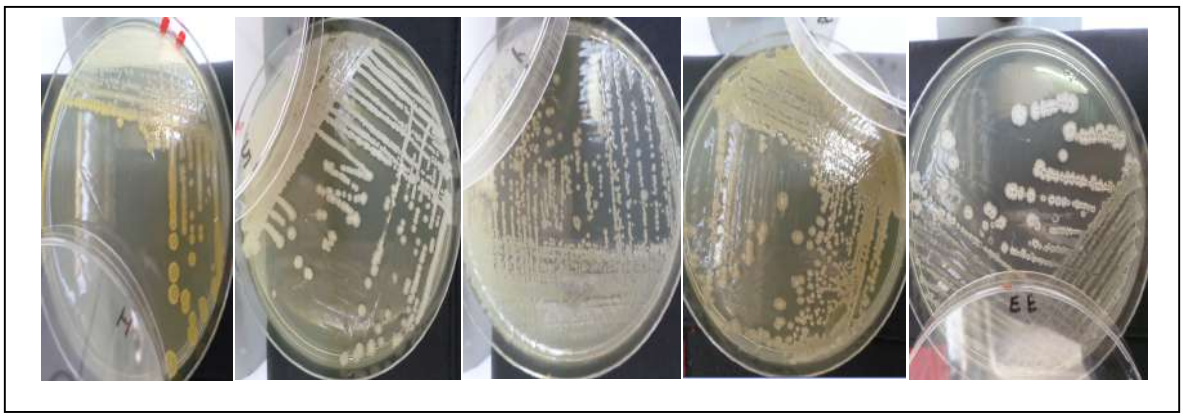
TR : terminal

UN : unicellulaire bacille **D :** déformant

CH : chaine bacillaire **DIP :** diplobacilles

2.1.2 Etude macroscopique :

L'étude macroscopique a été réalisée sur un milieu solide qui nous permets d'observées l'aspect de chaque isolats du la plus petite colonie (1à2 mm) jusqu' au plus grande, les résultats obtenues sont présentés dans le tableau 07mais avant de le présenter voici les photos de quelques souches isolées :



Photos 03:photos de quelque souche isolée

Tableau 13: résultats d'étude macroscopique des souches.

souche	Aspects des colonies								
	Taille	**Forme**	**relief**	**contour**	**surface**	**opacité**	**couleur**	**Consist-ance**	**odeur**
BH 5	Moyenne	ronde	Œuf sur plat	dentelée		translucide	orange	sèche	Pas d'odeur
FK 31	Moyenne	ronde	Œuf sur plat	régulier	Lisse brillante	opaque	Bège	crémeuse	Pas d'odeur
TP 40	Moyenne	Irrégulier	Œuf sur plat	dentelée		translucide		sèche	Pas d'odeur
KR 24	petite	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	bège		Pas d'odeur
BH 10	Moyenne	Irrégulier Etoile	Œuf sur plat	dentelée		opaque		crémeuse	Pas d'odeur
KR 25	Gros	Plage	Platte			translucide	Bège fancé	sèche	Pas d'odeur
FK 36	Moyenne	ronde	Platte	dentelée		translucide	bège	crémeuse	Pas d'odeur
FK 35	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Bège-blanche	crémeuse	Pas d'odeur
KR 29	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Beige citron soie	crémeuse	Pas d'odeur
BH 7	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Bège-blan	crémeuse	Pas d'odeur
KR 26	Moyenne	ovoïde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Bège fancé	crémeuse	Pas d'odeur

La suit de tableau 13									
KR 27	Moyenne	ronde	Platte	dentelée	Lisse brillante	translucide	Bège bran	crémeuse	Pas d'odeur
BH 1	Grosse	ronde	Platte	dentelée	Lisse brillante	translucide	Bège blan	crémeuse	Pas d'odeur
BH20	Grosse	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Grise blar	crémeuse	Pas d'odeur
FK 34	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Blan	crémeuse	Pas d'odeur
BH 12	Moyenne	ronde	élevé	régulier	Lisse brillante	opaque	Beige citron soie	crémeuse	Pas d'odeur
BH 13	Moyenne	Irrégulier	Platte	dentelée	Lisse brillante	opaque	Bège fancé	crémeuse	Pas d'odeur
BH 15	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Bège	crémeuse	Pas d'odeur
BH 4	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	opaque	Blan	crémeuse	Pas d'odeur
BH 16	petite	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	opaque	orange	crémeuse	Pas d'odeur
BH 11	Petite	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Orange	crémeuse	Pas d'odeur
BH 8	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	crémeuse	Pas d'odeur
BH 19	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	opaque	Blan-grise	crémeuse	Pas d'odeur
BH 22	Moyenne	Irrégulier	élevé	dentelée		translucide		crémeuse	Pas d'odeur
KR 30	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	opaque	Blan-grise	crémeuse	Pas d'odeur
FK 33	Moyenne	ronde	élevé	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	sèche	Pas d'odeur
KR 23	Grosse	Irrégulier	Platte	dentelée		translucide	Brun bois	crémeuse	Pas d'odeur
FK 38	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Crem grise	crémeuse	Pas d'odeur
BH 2	petite	ronde	élevé	régulier	Lisse brillante	translucide	Crème bège	++sèche	Pas d'odeur
BH 18	petite	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	crémeuse	Pas d'odeur
BH 21	Moyenne	Irrégulier	élevé	dentelée		Transparente	Blan grise	- crémeuse	Pas d'odeur
BH 9	petite	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	Transparente	Crème orange	- crémeuse	Pas d'odeur
FK33	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	opaque	Blanc-grise	- crémeuse	Pas d'odeur
FK 37	Grosse	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	opaque	Blan-grise	- crémeuse	Pas d'odeur
BH 17	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	opaque	Blan-grise	crémeuse	Pas d'odeur
FK32	petite	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Blanche	crémeuse	Pas d'odeur
KR 30	Grosse	Irrégulier	Platte	régulier	Lisse brillante	opaque	Blanche	- crémeuse	Pas d'odeur

La suit de tableau 13									
FK 38	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Blan-orang	- crémeuse	Pas d'odeur
BH 6	Moyenne	ronde	Bombé	régulier	Lisse brillante	translucide	Blanche	crémeuse	Pas d'odeur
KR 28	Moyenne	ronde	Platte	régulier	Lisse brillante	translucide	Brun bois	crémeuse	Pas d'odeur

3. caractérisation biochimique :

3.1 les enzymes respiratoires :

Tableau 14: tableau des résultats de type respiratoire des isolats

Les souches	Oxydase	catalase	Type respiratoire
BH 1	++	++	ANF
BH 2	++	+++	ANF
BH 3	++	+++	ANF
BH 4	+	+++	A
BH 5	++	+++	ANF
BH 6	++	+++	ANF
BH 7	++	+++	A
BH8	++	+++	ANF
BH9	++	+++	ANF
BH10	++	++	A
BH11	+++	+++	ANF
BH12	++	++	ANF
BH13	+++	+++	ANF
BH14	+++	-	AN
BH15	+	+++	ANF
BH16	++	+++	A
BH17	++	++	ANF
BH18	++	+++	AN
BH19	+++	+++	ANF
BH20	++	+++	ANF
BH21	++	+++	ANF
BH22	+	+	ANF
KR23	++	++	ANF
KR24	+	++	A
KR25	++	+++	ANF
KR26	+++	++	ANF
KR27	++	++	ANF
KR28	++	+	ANF
KR29	++	+++	ANF
KR30	++	+++	ANF
FK31	+	+	A
FK32	+++	+++	ANF
FK33	++	+++	ANF
FK34	++	+++	ANF
FK35	++	+++	ANF

La suite de tableau 14			
FK36	++	+++	ANF
FK37	++	+++	ANF
FK38	-	+	ANF
TP39	+	+	ANF
TP40	+++	++	ANF

A : aérobie strict, AN : anaérobie strict, ANF : aéro-anaérobie facultatif.

- **Interprétation des résultats :**

Toutes les souches étudiées sont catalase positive. Elles sont donc aérobies ou anaérobies facultatives et plus que la moitié des souches sont cytochrome oxydase positives et pour le type réspératoire la majorité sont (33 souches) de type respiratoire ANF, 6 sont A et une seul souche est AN.

4. galerie classique :

Dans notre projet on a effectué la galerie classique pour 20 souches, les résultats sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 15:tableau résume les résultats de galerie classique d'isolats.

Les souches \les tests	Gaz (H_2S)	ODC	ADH	LDH	mannitol	mobilité	citrate	ONPG	URE	TDA	IND	Sucre TSI
(TP 40)	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(BH20)	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(FK 35)	-	+	+	+	+	-	API	API	-	-	+	L
(BH21)	-	+	+	+	NR	+	api	api	-	-	-	L
(BH5)	+	+	-	+	+	+	-	api	-	-	+	G –S-L
(BH4)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	G –S-L
(BH3)	-	+	-	-	+	-	API	API	+	-	-	NR
(FK 32)	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-v	-	L
(BH1)	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(KR23)	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(TP39)	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	L
(KR27)	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	G –S-L
(BH15)	-	-	-	-	NR	NR	-	+	-	-	-	G –S-L
(BH17)	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	G –S-L
(BH19)	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	G –S-L
(Kr26)	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(FK34)	+	++	+-	+-	+	+	-	+	-	-	-	G –S-L
(BH10)	+	-	-+	-	-	-	+	+	-	-	-	L-S
(FK37)	+	+	+-	+	+	+	+	+	-	-	-	G –S-L
BH(11)	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	G-S

G : fermentation de glucose, L : dégradation de lactose, S : dégradation de saccharose, NR: non réalisant.

Interprétation de tableau :

D'après les résultats de tableau il y'a **11/20** souche sont libéré le gaz , et 7/20 sont dégradé le ODC,12/20 dégradé le ADH, et 7/20 sont dégradé le LDH, pour les autres test il y'a 15/20 sont capable a dégradé le Mannitol, 12/20 sont mobile et 7/20 prendre le citrate comme source de Carbonne et pour le test ONPG tout les souche capable de libéré le β-galactosidase, les autres test pas vraiment intérêt ou qu'une souches possède TDA +,il y'a quelque souches URE et IND +, d'après le tableau 13/20 sont fermenté le glucose et dégradé lactose et le saccharose, et 4/20 sont dégradé lactose et une seul fermenté le glucose et dégradé le saccharose.

5. Galerie API 20 E :

Galerie API 20 ^{E} utilisé pour l'identification d entérobactéries et des bacilles Gram- dans notre travail on a fait galerie API 20 pour l'identification de 8 souches qui possédant une activité enzymatique, antibactérienne, antifongique majore les résultats présenté dans le tableau suivant tableau 06.

Tableau 16: résultats de système API 20^{E}**.**

Les souches \les tests	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
(TP 40)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(BH20)	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(FK 35)	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(BH21)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	--	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(BH5)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	--	--	--	--	--	--	--
(BH4)	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(BH3)	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- **Interprétation de tableau :**

On 'a appliqués le système API 20^{E} sur 07 isolats qui possèdent une activité extracellulaire et antibactérienne majeures, Les tests ont été réalisés sur les Api20E juste pour apprécier les 20 tests présents sur cette plaque puisque normalement l'identification biochimique des bactéries du faisant partie du genre *Bacillus* se fait sur les galeries API 50CHB. Le tableau présenté que toutes les souche testé sont dégradé le gélatine et prenez le citrate comme source de Carbonne 7/7.

6. activité hydrolytique exo cellulaire :

Dans notre travail on a trouvé plusieurs souches possédant une activité enzymatique important comme le montre le tableau 17 expliqué. (Avec l'enzyme gélatinase).

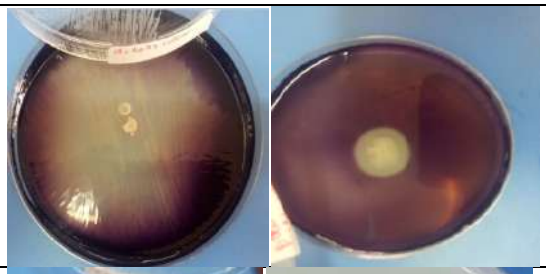
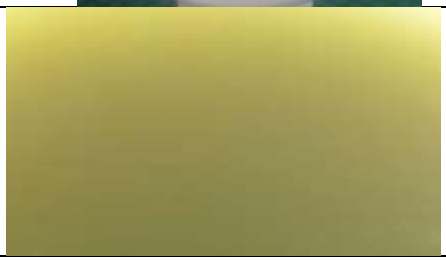
Tableau 17: les résultats d'activité enzymatique ex cellulaire.

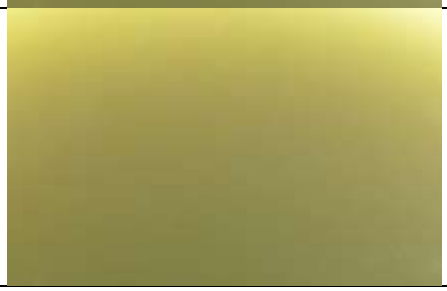
Les souches	amylase	Casiénse	lécithinase		lipoprotiénase		lipase		gélatinase			
	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48h	24 h	48 h	72 h	96 h
BH 1	+ 14mm	+ 2mm	+	+ 35mm	-	-	+	+ 30mm	+++	+++	+++	+++
BH 2	+ 15mm	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
BH 3	+	+ 2 mm	+	+5mm	+1mm	1mm	+4mm	+4mm	-	-	-	-
BH 4	-	+3mm	+3mm	+3mm	+1mm	+1mm	+4mm	+4mm	+++	+++	+++	+++
BH 5	+16mm	+6mm	+10 mm	+25mm	-	+1mm	+10mm	+30mm	-	-	++	+++
BH 6	-	- → +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BH 7	+	-	+6 mm	+6mm	-	+2mm	-	-	-	-	+++	+++
BH8	-	+2mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BH9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BH10	+15mm	-	-	+3mm	-	+1mm	-	-	-	-	-	-
BH11	+16mm	-	+	+8mm	-	-	+4mm	+4mm	-	-	-	-
BH12	-	-	-	-	+	+2mm	-	-	-	-	-	-
BH13	+2mm	-	-	-	+	+2mm	-	-	-	-	-	-
BH14	+2mm	-	-	-	-	-	-	-	-	--	-	-
BH15	+15mm	+	-	+2mm	-	+2mm	-	-	-	-	-	-
BH16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BH17	-	-	+3mm	+5mm	-	-	+4mm	+6mm	-	-	-	-
BH18	-	-	+2mm	+3mm	-	-	+4mm	+8mm	-	-	-	-
BH19	+3mm	+30mm	-	+5mm	-	-	+4mm	+4mm	-	-	-	-
BH20	+5mm	+10mm	+10 mm	+15mm	-	-	+10mm	+20mm	+++	+++	+++	+++
BH21	+8mm	+30mm	-	+5mm	-	+1mm	+3mm	+6mm	++	++	+++	+++
BH22	-	+1mm	-	+2mm	-	-	+2mm	+2mm	-	-	-	-
KR23	-	+	-	-	-	+	+30mm	++	+++	+++	+++	+++
KR24	-	+2mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR25	-	-	-	+2mm	-	-	+	+3mm	-	-	-	-
KR26	+10mm	+4mm	+	+25mm	-	-	+	+21mm	+++	+++	+++	+++
KR27	-	+1mm	+	+4mm	+1mm	+2mm	+4mm	+7mm	++	++	+++	+++
KR28	-	-	-	-	+	+3mm	+	+10mm	-	-	-	-

La suite de tableau 17												
KR29	-	+10mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR30	+10mm	+8mm	+10 mm	+15mm	-	-	-	-	+++	+++	++ +	++ +
FK31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK33	+20mmm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK34	+8mm	+3mm	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++ +	++ +
FK35	+8mm	+5mm	-	+2mm	-	+1mm	+	+5mm	+++	+++	++ +	++ +
FK36	+1mm	+1mm	-	-	-	-	+2mm	+4mm	-	-	-	-
FK37	+8mm	-	+3m	+4mm	-	-	+2mm	+2mm	-	-	-	-
FK38	+3mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TP39	+16mm	-	-	+3mm	-	+2mm	+1mm	+3mm	-	-	-	-
TP40	+	+3mm	+	+8mm	+4m m	+6mm	+	+	+++	+++	++ +	++ +

Les figures qui suivi tableau présenté les résultats des tests enzymatiques.

Photos 04: tableau explicatif de lecteur d'activité enzymatique.

Test enzymatique	Résultat positif	Résultat négatif
Amylase		
Caséinase		
Lipase		

Lipoprotéinase		
lécithinase		

- **Interprétation de tableau :**

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine et la gélatine aussi bien que les lipoprotienes et l'amylase.

L'amylase, la caséinase et lécitinase sont les enzymes les plus présentes chez nos b*acilles* selon les résultats d'étude par un rendement de 22, 21 et 20 souches par ordre, contrairement à la lipoprotéinase et la gélatinase par 13 souches.

Parmi les 40 isolats, il ya des souches qui possèdent une activité majeures chez toute les enzymes étudié (BH5, BH21, Fk35, TP40), et d'autre ont une activité majeures chez certains enzymes comme ; FK33 présente la grande activité d'amylase de diamètre 20mm, BH19 et BH21 chez la caséinase de 30mm, KR26 pour la lécitinase,KR23 et BH1 par un diamètre de 30mm chez lipoprotéinase, et 13 souches pour la gélatinase qui donne un résultat immédiat après 24 h.

7. activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne de nos souches est testée vis-à-vis de 6 souches pathogènes, les résultats de l'activité antibactérienne sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 18: Résultats de l'activité antibactérienne de nos souches (le diamètre annulaires).

Les souches	Micrococcus	Ps	SASM	E.coli	E. fecalis	SARM
BH1	-	+1mm	-	-	-	-
BH2	-	-	-	-	-	-
BH3	+3mm	-	-	-	-	-
BH4	+4mm	-	+1mm	-	-	-

La suite de tableau 18						
BH5	-	-	+4mm	-	-	-
BH6	-	-	-	-	-	-
BH7	-	-	-	-	-	-
BH8	-	-	-	-	-	-
BH10	-	-	-	-	-	-
BH11	-	-	+0.5mm	-	-	-
BH12	+1mm	-	--	-	-	-
BH13	+1mm	-	-	-	-	-
BH14	-	-	-	-	-	-
BH15	-	-	-	-	-	+1mm
BH16	-	-	-	-	-	-
BH17	+2mm	-	+2mm	-	-	-
BH18	+3mm					
BH19	-	-	-	-	-	-
BH20						
BH21	+5mm	-	-	-	-	-
BH22						
KR23	-	-	-	-	+1mm	-
KR24	-	-	-	-	-	-
KR25	-	-	-	-	-	-
KR26	-	+1mm	-	-	-	-
KR27	+2mm	-	+1mm	-	-	-
KR28	+					
KR29	-	-	-	-	-	-
KR30	-	-	-	-	-	-
FK31	-	-	-	-	+1mm	-
FK32	-	-	-	-	-	-
FK33	-	-	-	-	-	-
FK34	-	-	-	-	-	-
FK35	+1mm	-	-	-	-	-
FK36	-	-	-	-	-	-
FK37	-	-	-	-	-	-
FK38	-	-	-	-	-	-
TP39	-	-	-	-	-	-
TP40	+5mm	-	+3mm	+3mm	+0.5mm	+4mm

Ec : *Echerichia coli.*

SARM : *Staphylocuccus aureus* resistance à la méthiciline

SASM : *Staphylocuccus aureus* sensible à la méthiciline

Ps : *Pseudomonas aeruginosa*

Interprétation de tableau 18 (l'activité antibactérienne) :

Les résultats de l'antagonisme antibactérien vis-à-vis des 6 germes pathogènes montrent des activités antimicrobiennes différentes. En fait, l'intensité de l'activité est proportionnelle à la valeur

du rayon d'inhibition mesuré. Un maximum de **24 / 40** souches présentent un antagonisme positif vis-à-vis d'une souche pathogène au moins. La souche TP40 présente des résultats d'antagonisme très prometteurs. En effet, elle montre un antagonisme positif vis-à-vis de 5/6 pathogènes de Gram différent avec des rayons d'inhibitions arrivant jusqu'à 5mm vis-à-vis de *Micrococcussp.* Ce ci laisse suggérer que cette souche est éventuellement capable de synthétiser des molécules antibactériennes à large spectre.

***Micrococcussp* :**

11/40 souches ont une activité positive contre *Micrococcussp*, soit **27, 5** ◦/° des souches isolées. Isolé à partir des algues vertes brun et rouge.

Pseudomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline :* 2/40**souches uniquement présentent un antagonisme positif vis-à-vis de *P. aeruginosa ou de* ***Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline*, soit* **5**◦/° des souches isolées

***Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline : 7/* 40 souches présentent un antagonisme vis-à-vis des SASM soit 17,5 ◦/° des souches isolées**

***E coli :* 1 souche criblée sur 40 souches testées possède une activité positive contre E coli, soit 2,5 ◦/° de l'ensemble de nos souches.**

E. fecalis : *3/*40 souches présentent un antagonisme positif vis-à-vis de ***E. fecalis*** soit 7,5◦/° des souches testées

Ces résultats nous permettent de conclure que ***E coli*** est la souche la plus résistante et que *Micrococcussp* est le germe le plus sensible.

8. Activité antifongique :

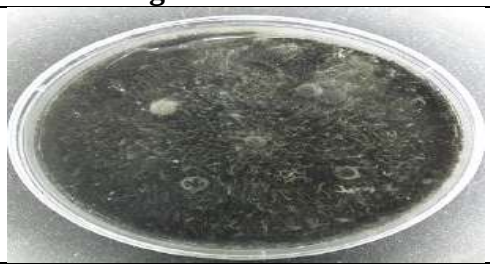
L'antagonisme de nos bacilles contre deux mycètes pathogènes est résumé dans le tableau ci-après.

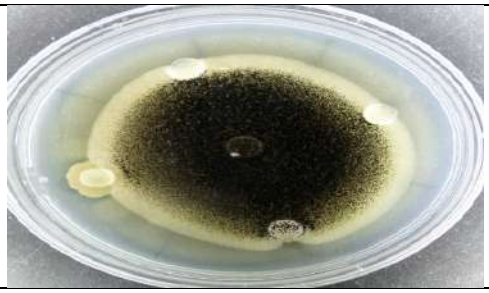
Tableau 19: résultats de l'activité antifongique.

Les souches	Moisissure MCH	EMB23
BH1	-	-
BH2	-	-
BH3	-	-
BH4	+	-
BH5	+	-
BH6	-	-
BH7	-	-

La suite de tableau 19		
BH8	-	-
BH9	-	-
BH10	-	-
BH11	-	-
BH12	-	-
BH13	-	-
BH14	-	-
BH15	-	-
BH16	-	-
BH17	+	-
BH18	-	-
BH19	-	-
BH20	+	-
BH21	+	+
BH22	+	-
KR23	-	-
KR24	-	-
KR25	-	-
KR26	-	-
KR27	-	-
KR28	-	-
KR29	-	-
KR30	-	-
FK31	-	-
FK32	-	-
FK33	-	-
FK34	-	-
FK35	-	-
FK36	-	-
FK37	-	-
FK38	-	-
TP39	-	-
TP40	+	+

Photos 05: **A**ctivité antifongique.

Souche fongique	**Lecteur positif**	**Lecteur négatif**
MCH 07		

EMB23		

- **Interprétation des résultats :**

Pour le premier champignon étudié MCH 07, souche possédant une forte résistance, deux bacilles uniquement présente une activité positive soit un pourcentage de 5 pourcent et seulement. Les résultats avec le deuxième pathogène EMB23 sont environ 17,5 pour cent**.** Les souches possédant une activité antifongique positive contre MCH présente un virage couleur vers l'orangé, la coloration peut avoir comme cause la libération de produits biologiques antifongiques.

9. sensibilité a les antibiotiques

Le test de sensibilité réalisé sur 7 souches a une activité enzymatique, antibactérienne et antifongique majeure, les résultats obtenus et les souches testées sont présentées dans le tableau 16, et les antibiotiques utilisés sont exprimé dans l'annexe.

Tableau 20: les résultats de la sensibilité aux antibiotiques :

Les souches	DIAMETRE CRITIQUE					
	BH 4	BH 5	BH 17	BH 20	BH 21	TP 40
DA	13	0 R	14	21	20	24
ATM	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
CAZ	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R	0 R
FF	24	12	22	30	36	0
TIC	28 S	23 S	27 S	0 R	24 S	32 S
TOB	23 S	30 S	23 S	18 S	21 S	33 S
CIP	30 S	34 S	28 S	24 S	36 S	34 S
S	25	32	24	22	20	26
GEN	27	38	27	24	28	50
F	23	0	21	20	24	20
TMP	38 S	14 R	NF	0 R	34 S	0 R
AK	27 S	32 S	35 S	24 S	26 S	36 S
CT	11	20	8	0 R	8	10
FOX	25 S	14 I	16 I	NF	NF	NF
C	18 S	30 S	16 S	21 S	30 S	30 S
CTX	0 R	31 R	22 I	10 R	26 S	28 S
CZ	0 R	0 R	34 S	0 R	40 S	36 S
AML	30	24	30	0	26	37
OX	18	36	20	0	21	25
AM	NF	16 I	22 S	NF	20 S	20 S

III. Discussion :

Le criblage est la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes. Il est pratiqué jusqu'à ce jour par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus exotiques et en mettant au point des méthodes de sélection qui favorisent des espèces rares.

Les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des composés antimicrobiens (**Chen *et al*, 2010).**

La stratégie abordée par ce travail repose sur le screening de bactéries appartenant probablement au groupe *Bacillus* à partir des échantillons végétatives, animal et autres de sable et d'eau de mer.
Les échantillons ont été prélevés durant le mois de février 2015 à partir de 6 bords différents plages Algériennes les mesures de température et de pH sont réalisés avant la manipulation au laboratoire.

Le screening a été réalisé sur milieu ordinaire de gélose nutritive sur la base de critères morphologiques et microscopique c'est-à-dire bâtonnets Gram positif capable de former des spores(**Beric et al,2012**) suivant ces critères , 40 souches sont retenues et ont fait objet :

- D'une étude des caractéristiques morphologiques
- Une étude de caractéristiques biochimiques

La caractérisation macroscopique a permis de distinguer des colonies rondes ; plates ou bombées, à bords réguliers ou non, opaques ou transparente et de couleurs blanches, beige ou citron ou autre. L'étude microscopique réalisée aussi bien à l'état frais qu'après double coloration de Gram, a permis de constater que toutes les souches se présentent sous formes de bâtonnets de taille variable (fins, moyens et gros) droits à extrémités arrondies et arrangés en cellules isolées, regroupés en paires ou en chaînettes, à Gram positif, sporulées et mobiles ou immobiles. Les résultats des tests biochimiques sont regroupés en 3 catégories: caractères positifs, négatifs et variables chez les isolats.
40 souches ont été isolées tout en se basant sur les critères cités auparavant, sur gélose nutritive de 24 à 48 heurs, il s'agit de bâtonnets aéro-anaérobie facultatif mobiles, et non-mobiles, à Gram positif, capables de former des spores .C'est le cas de la plupart des isolats bactériens aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs isolés à partir de différents habitats salins tels que les lacs salés, les aliments salés et les estuaires d'eau **(Ventosa et al, 1989 ; Arahal et al, 1999;Yoon et *al*., 2004)** et qui ont été affiliés au genre *Bacillus,* Comme exemples l'espèce *Bacillus bagoriensis*isolée à partir d'un lac de soude au Kenya **[Vargas et *al*., 2005],** l'espèce *Bacillus okhensis*isolée à partir d'un lac salé en Inde **[Nowlan et *al*., 2006],** et l'espèce *Bacillus solisalis*isolée à partir d'un sol salé autour du lac salé de Yuncheng en Chine **[Liu et *al*, 2009].**

Les 40 souches isolées possèdent presque toutesune catalase et une oxydase, c'est le cas de la majorité des microorganismes aérobiesde membres des familles *Bacillaceae***(Oren, 2002a ; Arahal et al., 2007 ; De la Haba et al., 2011).**

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser la caséine, l'amidon, la lécithine, l'amylase les lipoprotéineset la gélatine, elles possèdent aussi la catalase et l'oxydase.

Parmi les isolats, 22 sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité amylolytique. Elle est souvent rencontrée chez les isolats.

Ce bagage enzymatique est directement influencé par la disponibilité des nutriments dans l'environnement direct, et fait partie de l'adaptation de ces microorganismes à leur milieu naturel. Il semble qu'une plus grande adaptabilité de certaines souches aux conditions de température, de pH et de salinité a une relation avec la capacité de ces mêmes souches à produire des enzymes extracellulaires : une plus grande capacité d'adaptation implique des mécanismes métaboliques plus développés, comparativement aux microorganismes qui en sont dépourvus **(Cohen, 2011).**

Pour les autres tests biochimiques, ils ont été réalisés en utilisant la galerie classique sur 20 isolats. En se basant sur leur réponses aux différents tests physiologiques et biochimiques, ce système est largement utilisé dans les méthodes d'identification pour les membres du genre *Bacillus* des études réalisées ont montré que les meilleurs reproductions des tests pourrait être réalisée avec des plaques **API** qu'avec les tests classiques surtout pour la taxonomie du genre *Bacillus* **(De vos et al, 2009).**

Les bacilles isolés au cours de notre travail présentent une activité antimicrobienne contre certains pathogènes tests étudiés comme le *Micrococussp.*

L'activité antifongique a été réalisées contre deux souches pathogènes contre les, il montre qu'il ya certaines activités chez 07 isolats parmi les 40 souches.

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

Perspective :

Les micro-organismes marins ont longtemps été considérés comme une potentielle ressource biotechnologique encore inexploitée, leur exploitation a été longtemps freinée par la difficulté et le coût liés à l'isolement de leurs nouveaux produits chimiques et précieuses molécules. Une grande majorité de micro-organismes marins n'a donc jusqu'à présent pas été correctement cultivée. Ces micro-organismes non encore cultivés seront d'une importance capitale pour la biotechnologie, la médecine et notre économie future.

Les méthodes modernes d'étude de la diversité microbienne attirent notre attention sur le fait que la grande diversité du vivant est microbienne. Nous n'avons, en effet, que très peu d'informations sur la plus grande majorité des micro-organismes qui colonisent notre planète. Tant que des efforts soutenus ne seront pas déployés pour le développement d'outils et de stratégies permettant leur culture, seuls ou en association avec d'autres micro-organismes, nous serons condamnés à spéculer sur l'importance et le rôle fonctionnel des microorganismes non encore cultivés et sur leur potentiel, aussi bien physiologique que biochimique.

Le perspective de notre travaille est clairement apparies dans la venir de monde qui va largement jouer sur les océans avec leurs ressources incommensurables, surtout le domaine de l'isolation des microorganismes qui est le principale clé de nombreux problématiques de santés et d'économie et environnemental.

Dans notre recherche on a réussi a isolées plus de 40 souches mais on 'a pas admis a leur identification mais elles sont conservées; donc il ya une grande possibilité que parmi elles il existe de nouvelles souche qui n'on jamais isolées surtout les souches isolé a partir des algues marine (très très peut des recherches sont concentrées sur ce type), la continuité de cette travaille par une étude moléculaires et génétique permets de confirmer cette hypothèse.

En perspective l'approche génomique s'avère d'une importance cruciale dans l'étude des espèces microbiennes et leurs capacités métaboliques «Le séquençage des acides nucléiques est la méthode actuellement la plus rapide et au taux le plus élevé pour acquérir des informations sur les microbes ». Dont Les progrès de la génomique et la prise en compte de la génétique des populations pour les bactéries non identifiants.

De surcroit, Le métagénomique ou encore *génomique environnementale* ou *génomique des communautés*, indique l'étude des *métagénomes*, qui lui-même réfère à l'ensemble des séquences d'ADN extraites de communautés multi-espèces prélevées dans l'environnement.

Ces communautés sont généralement composées d'organismes non cultivables, le défi du méta génomique consiste à relier les informations génomiques issues des clones à l'organisme ou à l'écosystème duquel l'ADN a été extrait. Des stratégies métaboliques ont pu être proposées pour plusieurs espèces de bactéries non-cultivables, laissant envisager une compréhension plus précise des espèces microbiennes, de la variabilité de leur génome, et de la distribution intra- et inter-espèce des gènes et des chemins biochimiques.

On souhaiterait pouvoir répondre à des questions telles que :

- Identifier les souches qu'on a isolées et preuve l'existence de nouvelles espèces qui n'ont été jamais identifié.
- différencier des espèces proches ou de relier des espèces éloignées
- déterminer leur application dans le domaine industrielle, thérapeutique et agronomique
- exploitées les résultats qu'on a obtenue pour améliorer les connaissances humains sur le mode microbien

Cette étude n'est qu'un tout premier essai de caractérisation des bactéries halotolérantes productrices de composés antimicrobiens provenant des milieux hypersalins.

Cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique concernant la production des activités antimicrobiennes élaborées par cette souche peut être complétée par des études supplémentaires et nécessaires afin d'identifier ces composants. Par conséquent, ce travail ouvre des perspectives diverses :

Microscopie électronique des isolats qui valorisera notre caractérisation phénotypique et complète la génotypique ;

La purification des activités antimicrobiennes qui doit être faite par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques très sensibles et reproductibles, tels que : la bioautographie, la chromatographie sur colonne, la HPLC , la spectroscopie de masse, RMN ainsi que l'utilisation des méthodes d'analyses des substances bioactives qui doivent répondre à de nombreuses exigences notamment la stabilité, la sélectivité et la non toxicité afin de les utiliser dans le domaine thérapeutiques ou dans d'autres domaine, si toutefois, elle présentent un avantage réel par rapport aux composés déjà commercialisés.

Autre intérêt biotechnologique, concernant les enzymes hydrolytiques extracellulaires produites par ces bactéries , l'étude de leurs propriétés doit être menée à bout afin de pouvoir déterminer la rentabilité de leur exploitation. Ainsi, déterminer les conditions optimales de production, les limites physiologiques d'excrétion de ces enzymes, mais aussi les paramètres de culture pouvant affecter l'activité enzymatique. L'isolement, la purification, et la caractérisation biochimique et biophysique de ces enzymes feront suite.

Conclusion générale:

Ce travaille de mémoire avait plusieurs objectifs. Le premier été l'isolement des souches bactériennes de genre *Bacillus* associés a des espèces marine végétales et autre animales récolté de différents sites. Le deuxième est la mise en point des études taxonomique, morphologique et biologique de ces échantillons.

Les résultats montrent que les échantillons choisit sont très diversifiées par des microorganismes réduite dans le genre *Bacillus* (plus de quarante souches isolé) dans notre travaille.

Sur le plan de la production d'enzymes Il est intéressant de signaler que parmi les souches sélectionnées, plus que la moitié des souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, d'où leur importance biotechnologique.

Cette contribution à l'étude phénotypique et la mise en évidence d'activités enzymatiques extracellulaires et biologique de souches microbiennes isolées de algérien-t-elle que des plages Algériennes a donné des résultats très encourageants qui devront être complétés par une analyse polyphasique plus approfondie en introduisant de la chimio taxonomie couplée à l'approche moléculaire.

Au vu des résultats obtenus, les microorganismes marins sont loin d'avoir livrées touts leurs secrets, A défaut d'en connaître l'utilité, elles constituent cependant une source d'inspiration pour le pharmaco chimiste qui doit sans cesse rechercher des solutions plus efficaces à des problèmes thérapeutiques majeurs.

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

ANNEXE

Annexe 01 : Les Milieux gélosés utilisé pour l'isolement et purification.

Gélose nutritive GN

- Peptone 15g
- Extrait de viande 10g
- Extrait de levure 02g
- Chlorure de sodium 05g
- Agar 20g
- Eau distillée 1000ml

pH =6,8-7,4

Le milieu LB :

- Chlorure de sodium ……....10g
- L'extrait de levure …….5 g
- Peptone ……10 g
- Agar-agar ……20g

Pour 1 l PH =7

Les milieux utilisant pour l'activité enzymatiques :

Milieu pour Caséinase milieu de lait :

- Agar-agar ……..8 g
- Lait écrémé 100% (0% lipide)…… … 200 ml
  Pour préparation de 400ml de milieu

Pour lipase , lipoprotiénase et lécitinase jaune d'œuf :

- Milieu GN ……....200 ml
- Jaune d'œuf ……....20ml

Pour l'activité antibactérienne utilisation de milieu Mueller Hinton (fournis par l'institut pasteur d'Alger)

Pour l'activité antifongique les deux milieux utilise sont milieu PDA de base pomme de terre

Milieu PDA : (pour 1 l de milieu)

- Agar-agar …….....20g
- Pomme de terre …….250g
- Glucose …….20 g
- Amidon ……10g

PH=7

Gélose Mueller-Hinton

- Infusion de viande de bœuf 300g
- Hydrolysat de caséine 17.5g
- Amidon ..... .01.

- Agar 17g
- Eau distillée 1000ml

pH =7,4

Annexe 02 : les sites d'échantillonnage.

Figure 1 : Sites d'échantillonnage Bou haroun



Figure 2: Sites d'échantillonnage Lkarema



Figure 3: Sites d'échantillonnage fouka

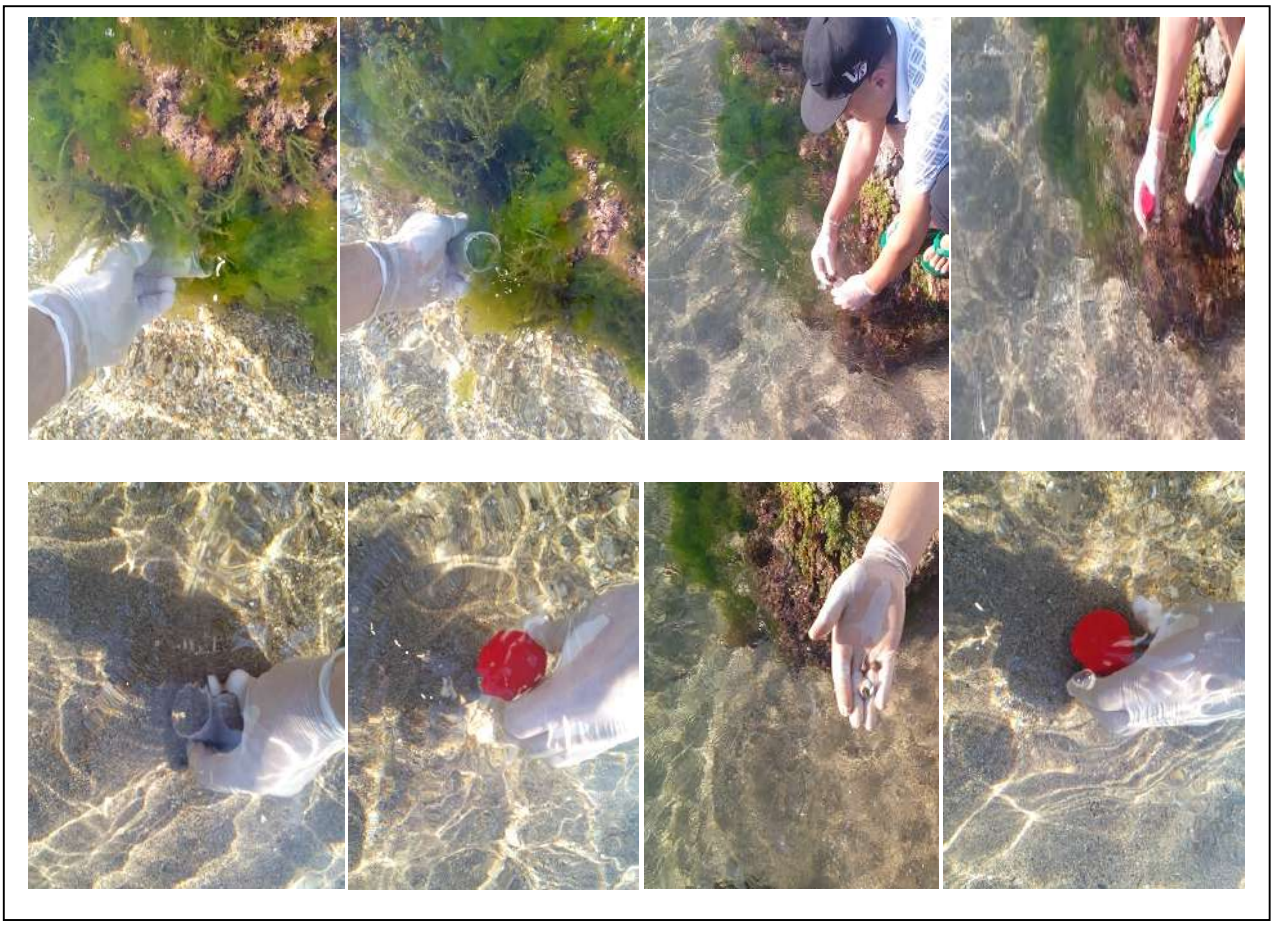


Annexe

Les places exactes de prélèvement :
Photos de site exact de prélèvement.



La méthode de prélèvement des échantillonnes :
Les photos de méthode de prélèvement.



Annexe

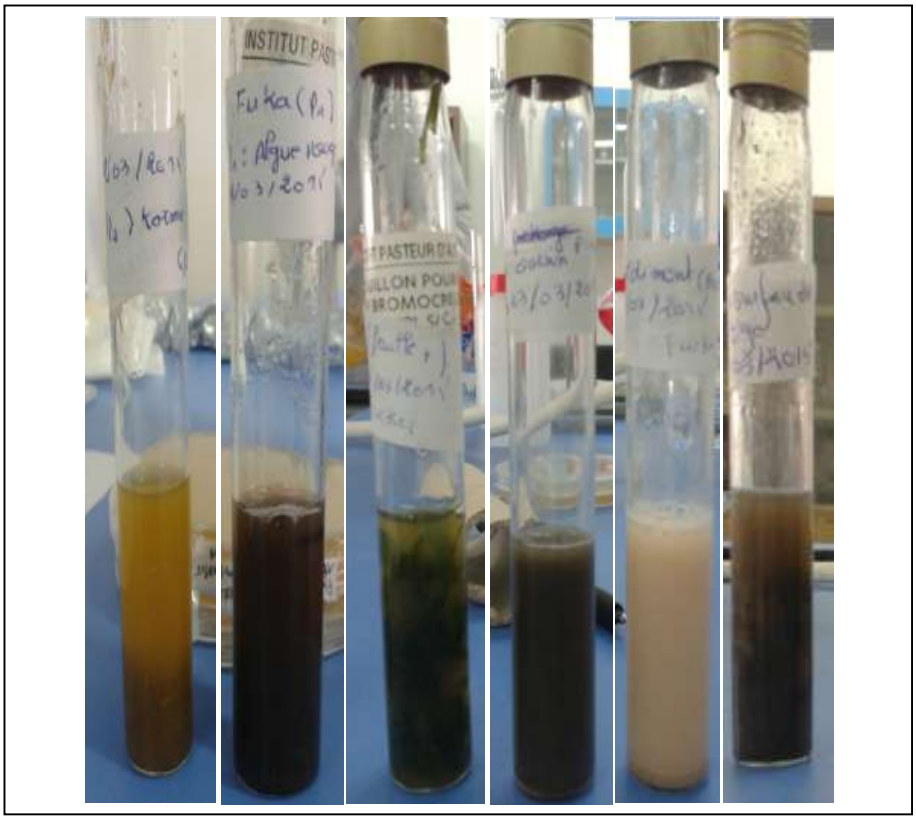
Annexe03 : l'isolement et la purification.

Les photos des 'échantillons de recherche.



Annexe

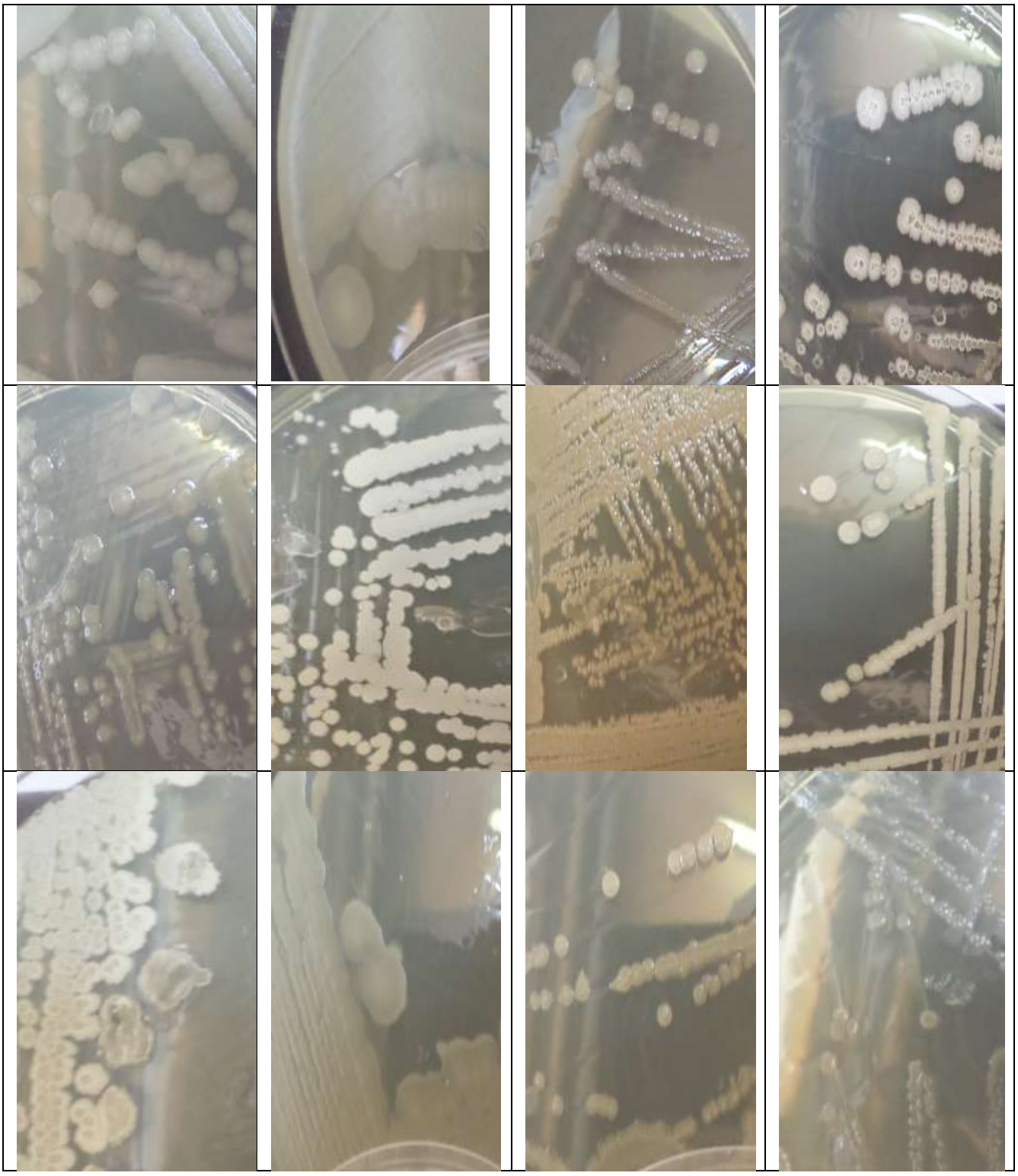
Les photos des dilutions ont préparé.



Les photos de souches isolées



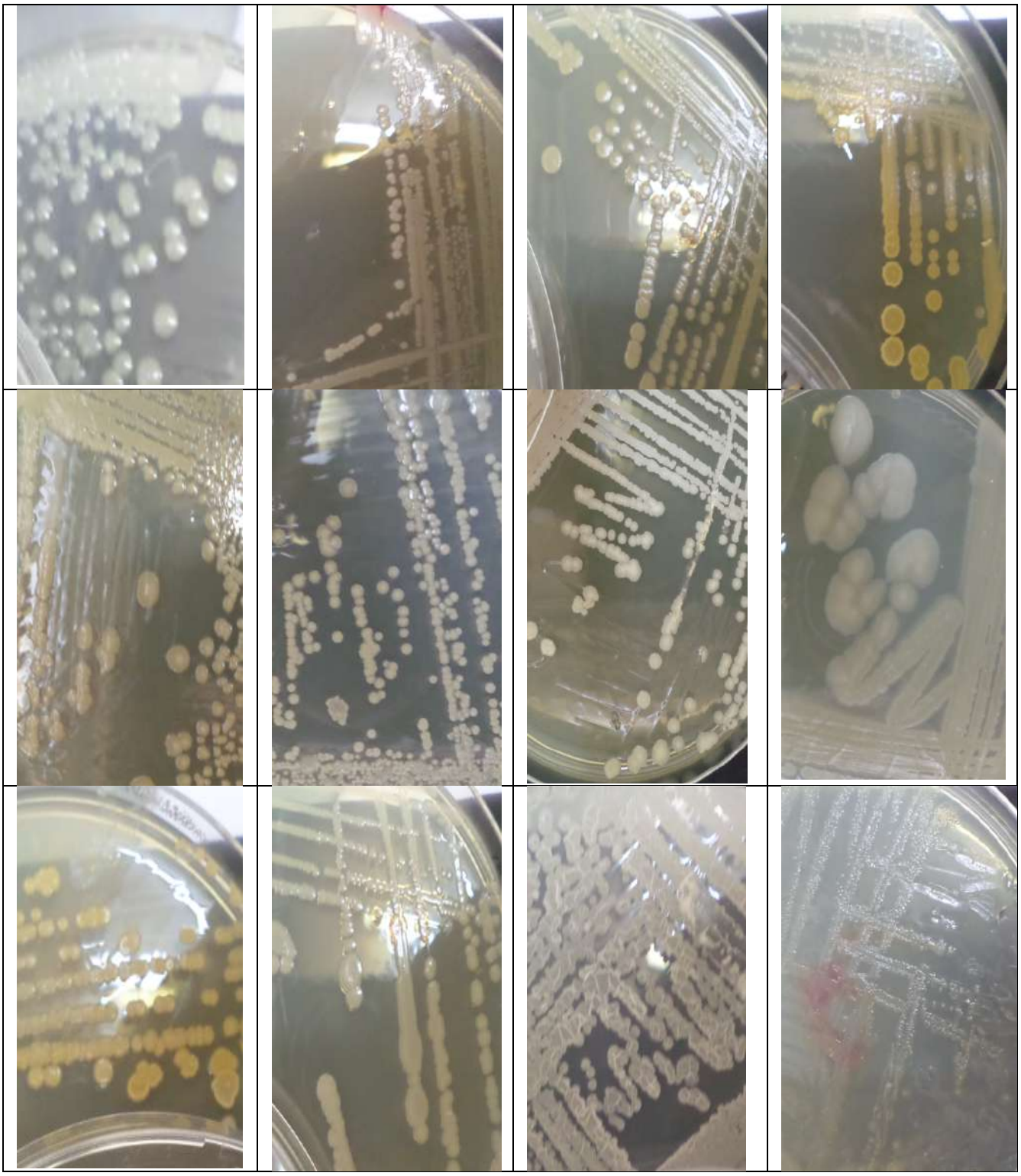
Annexe



Annexe



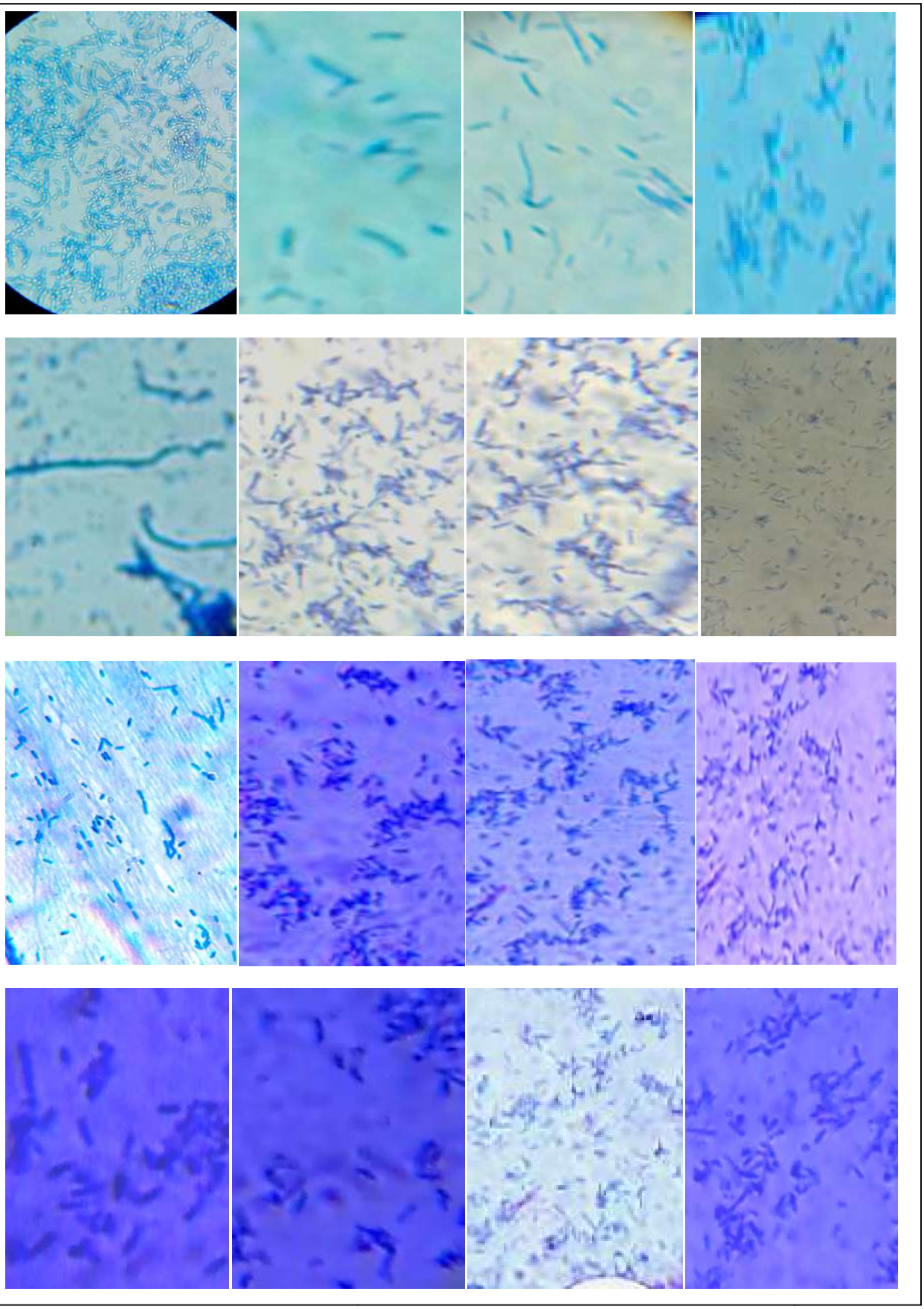
Annexe



Annexe

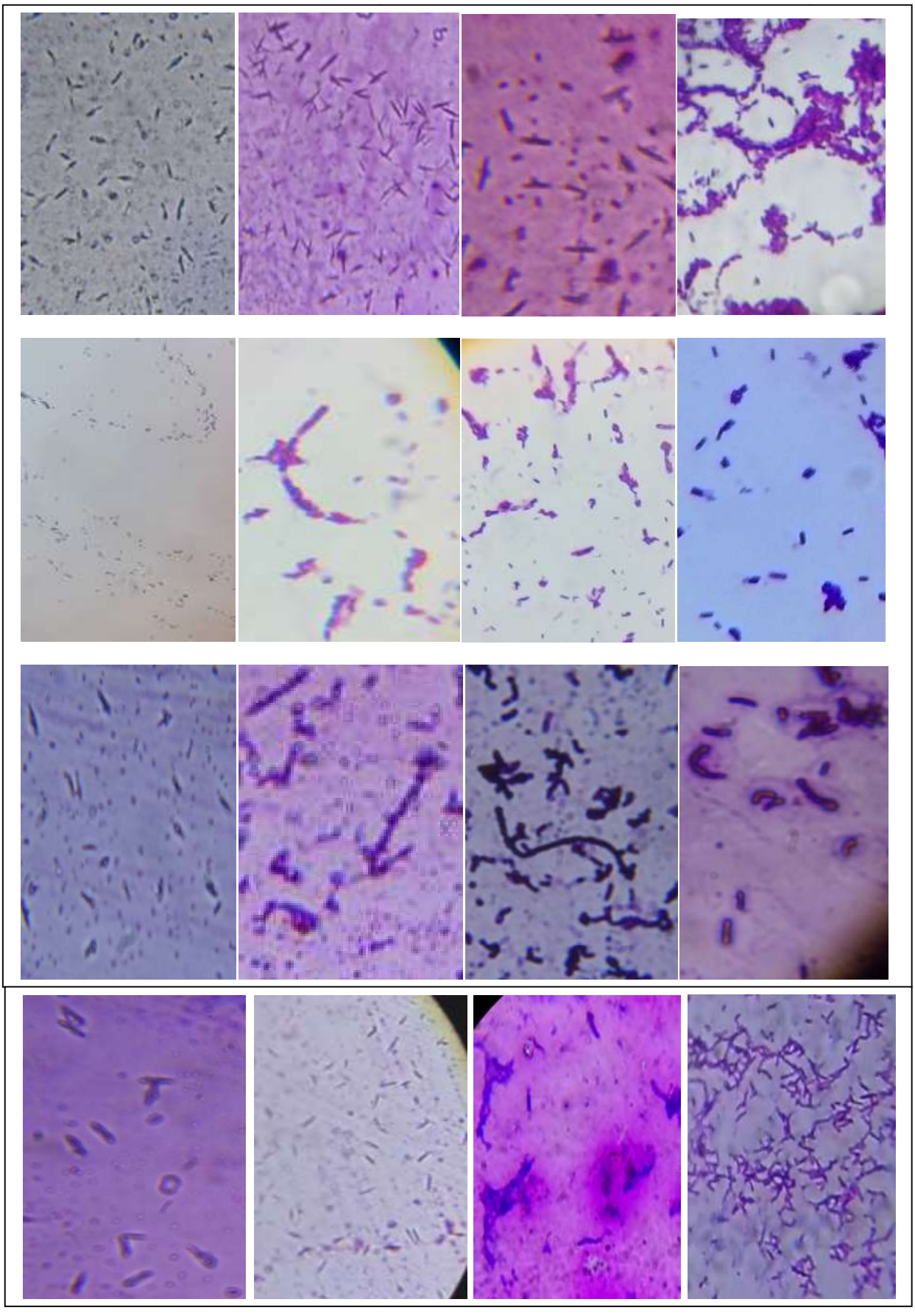
Photos l’étude microscopie la mobilité et la forme et regroupement Gram

Coloration bleu de méthylène



Annexe

Photos de Coloration de Gram :



Annexe

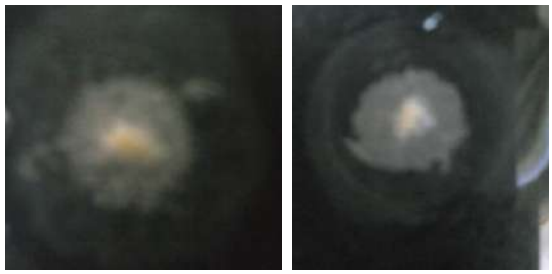
Tableau 21 : Tableau d'abréviation des souches et leur espèce de récoltes :

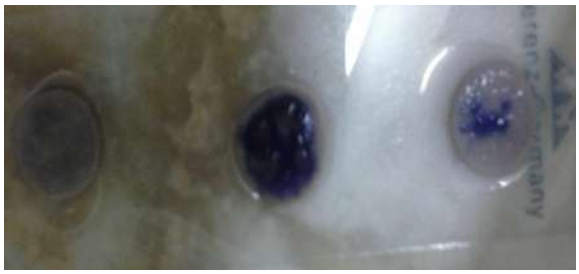
La souche	Place de récolte	La source
BH 1	BOUHAROUNE	A 3 (algue rouge)
BH 2		Eau sans bouillon
BH 3		A3 (algue rouge)
BH 4		Eau 1
BH 5		A3 (algue rouge)
BH 6		A 1 (algue vert)
BH 7		A3 (algue rouge)
BH 8		A2 (algue vert)
BH 9		A2 (algue vert)
BH 10		Eau 1
BH 11		Eau sans bouillon
BH 12		A 2 (algue vert)
BH 13		Eau sans bouillon
BH 14		Eau 4
BH 15		A 4 (algue vert)
BH 16		A 2 (algue vert)
BH 17		A 3 (algue rouge)
BH 18		A 3 (algue rouge)
BH 19		Eau 4
BH 20		A 3 (algue rouge)
BH 21		Eau 1
BH 22		Eau sans bouillon
KR 23	KOURSSOU	A 5 (algue brune)
KR 24		A 6 (algue brune)
KR 25		A 5 (algue brune)
KR 26		A3 (algue rouge)
KR 27		Eau 4
KR 28		A 5 (algue brune)
KR 29		A 5 (algue brune)
KR 30		Eau 4
FK 31	FOUCKA	A 7 (algue brune)
FK 32		Piquant d'Oursin
FK 33		Escargot
FK 34		A 7 feuilles (algue brune)
FK 35		A 7 feuilles (algue brune)
FK 36		A 7 feuilles (algue brune)
FK 37		A 7 tiges (algue brune)
FK 38		Piquant d'Oursin
TP 39	**TIPAZA**	A 7 (algue brune)
TP 40		A 7 tiges (algue brune)

Annexe

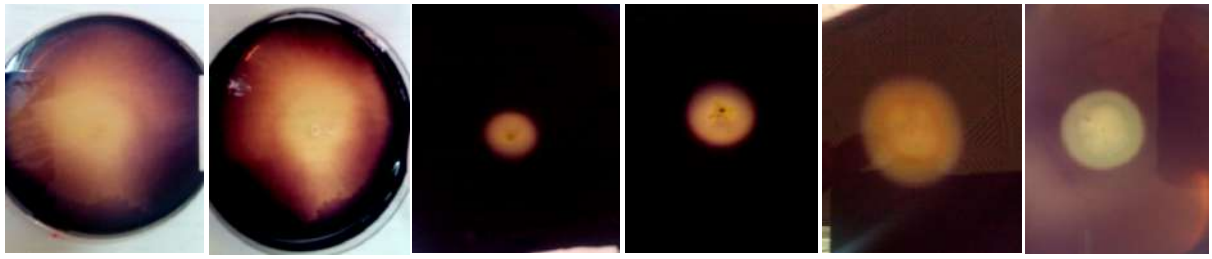
Les photos des tests enzymatiques

Catalase **oxydase**





Amylase



Caséinase :



Lipase, lipoprotienase, Lécithinase :





Annexe 04: galerie classique.

KR 26



FK 37



BH 12



BH 7



BH 19



FK 34



BH11



KR 23



Annexe

FK 32



BH 1



TP 39



BH 15



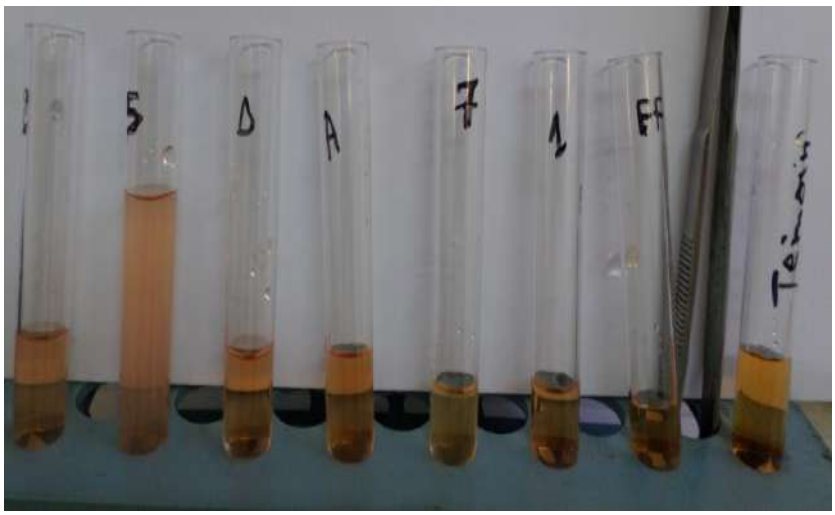
KR 27





Annexe

Les photos de test d'urée-indole et TDA



Test d'urée



Le test positif.



Test TDA tryptophane désaminase



Test indole

Annexe

Les réactifs utilisant dans le test urée, indole et TDA.

Sans réactif Le lecteur après incubation Virage de couleur		
Recherche **d'urée** Incubation	Recherche **d'indole**	recherche TDA **tryptophane désaminase**

Les photos des souches de galerie classique et API 20 e




BH 20




BH 4




TP40




BH 5

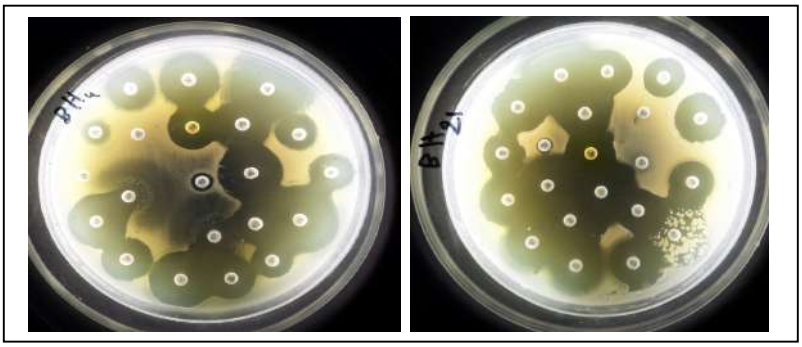
Annexe 05: l'activité antimicrobienne et sensibilité d'antibiotique.

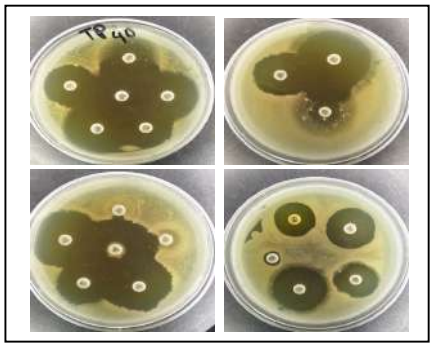
Les antibiotique a utiliser pour l'étude de sensibilité des 'antibiotique sont présenté sur le tableau.

Tableau 22 : les antibiotiques utilisé pour les tests antibiogramme.

l'antibiotique	le nom	la concentration de disque (µg)
DA	**Clindamycine**	2
ATM	**Aztreonam**	30
CAZ	**Ceftazidime**	30
FF	**Fosfomycin**	50
TIC	**Ticarcilline**	75
TOB	**Tobramycine**	10
CIP	**Ciprofloxacine**	5
S	**Streptomycine**	10
GEN	**Gentaicin**	10
F	**Nitrofurantoin**	300
TMP	**Trimethoprim**	5
AK	**Amikacine**	30
CT	**Colistine**	10
FOX	**Cifoxitin**	30
C	**Chloramphenicol**	30
CTX	**Cefotaxime**	30
CZ	**Cefazoline**	30
AML	**Amoxycillin**	25
OX	**Oxacillin**	5
AM	**Ampiciline**	10

Les photos de sensibilité d'antibiotique





Annexe

Le lecteur de concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour enterobacteriaceae.

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques mg/L		Diamètres critiques mm		Remarques
		cci	ccs	D	d	
Ampicilline	10 µg	≤ 4	> 8	≥ 19	< 16	Interprétation valable pour bacampicilline, pivampicilline. Cf. règles (1) et (2)
Amoxicilline	25 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 16	Cf. règles (1) et (2)
Ampicilline/sulbactam	10/10 µg	≤ 4/8	> 8/8	≥ 19	< 16	Cf. règle (1b).
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	≤ 4/2	> 8/2	≥ 21	< 16	Cf. règle (1b).
Ticarcilline	75 µg	≤ 8	16	≥ 24	< 22	Interprétation valable pour un traitement intraveineux. Cf. règles (1), (2) et (3).
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 8/2	> 16/2	≥ 24	< 22	
Pipéracilline	75 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 16	Interprétation valable pour un traitement intraveineux. Cf. règles (1), (2) et (3).
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤ 8/4	> 16/4	≥ 21	< 17	
Mécillinam	10 µg	≤ 8	> 8	≥ 24	< 22	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17	
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15	
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26	Déterminer la CMI en cas de résistance par diffusion à l'ertapénème avec sensibilité à l'imipénème
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19	
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 27	< 21	Cf. règles (4) et (5).
Céfalotine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12	Interprétation valable pour les céphalosporines injectables de 1ère génération (céfapirine, céfazoline). Interprétation également valable pour les céphèmes orales de 1ère génération (céfadroxil, céfalexine, céfradine, céfaclor, cefatrizine, loracarbef) mais uniquement pour les souches isolées des urines.
Céfuroxime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 22	< 22	
Céfamandole	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15	
Céfoxitine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15	
Céfotétan	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17	
Latamoxef	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17	Non commercialisé en France
Céfotaxime	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23	Pour les 6 céphalosporines de ce groupe cf. règles (4) et (5)
Ceftriaxone	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23	
Ceftazidime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 26	< 19	
Céfépime	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17	
Cefpirome	30 µg	≤ 1	> 8	≥ 24	< 17	
Céfixime	10 µg	≤ 1	> 2	≥ 25	< 22	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines
Kanamycine	30 UI	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	Interprétation valable pour néomycine, framycétine, paromomycine
Tobramycine	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16	Cf. règles (6), (9) et (11).
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	Cf. règles (6) et (7).
Isépamicine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	Cf. règles (6) et (7).
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16	Cf. règles (6), (8) et (11)
Nétilmicine	30 µg	≤ 2	> 4	≥ 21	< 19	Cf. règles (6), (10) et (11)
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 23	< 23	Interprétation valable pour thiamphénicol.
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17	Interprétation valable pour les autres tétracyclines, sauf la minocycline.
Minocycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17	
Tigécycline	15 µg	≤ 1	> 2	≥ 21	< 19	En cas d'utilisation thérapeutique, il y a lieu de déterminer la CMI pour les diamètres de 19 et 20 mm.
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15	Les diamètres ont pour but de vérifier la résistance naturelle de certaines espèces, mais ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique. Interprétation valable pour polymyxine B

Annexe

(Suite) :

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques mg/L		Diamètres critiques mm		Remarques
		S(cci)	R(ccs)	S (D)	R (d)	
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines.
Triméthoprime	5 µg	≤ 2	> 4	≥ 20	< 16	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines.
Triméthoprime/sulfaméthoxa-zole	1,25 / 23,75 µg	≤ 2/38	> 4/76	≥ 16	< 13	Interprétation valable pour les autres associations triméthoprime-sulfamide.
Nitrofuranes	300 µg	≤ 64	> 64	≥ 15	< 15	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines
Acide oxolinique	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 20	< 17	Il est justifié de fournir une réponse globale pour l'ensemble du groupe des quinolones classiques (parfois appelées de première génération) en n'étudiant qu'un seul représentant de ce groupe. Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines.
Fluméquine	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 25	< 21	
Acide nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15	
Acide pipémidique	20 µg	≤ 8	> 16	≥ 19	< 14	
Acide piromidique	25 µg	≤ 16	> 32	≥ 20	< 16	
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22	La résistance aux fluoroquinolones est croisée entre les différentes molécules mais son niveau d'expression peut varier pours chaque molécule. Les souches d'entérobactéries sensibles à la norfloxacine (NOR) sont sensibles aux autres fluoroquinolones. Pour les souches I (ou R) à NOR, des différences d'activité intrinséque impliquent un test et une réponse indépendante pour les autres molécules
Enoxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19	
Lévofloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 20	< 17	
Loméfloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19	
Moxifloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 24	< 21	
Norfloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22	
Ofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22	
Péfloxacine	5 µg	≤ 1	> 4	≥ 22	< 16	
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14	La résistance acquise à la fosfomycine est homogène. La présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise en compte. Interprétation valable pour la fosfomycine-trométamol
Azithromycine		≤ 16				Valable pour *Salmonella* sérotype Typhimurium et *Shigella* spp.

Règles de lecture interprétative pour le tableau de lecteur de concentration critique :

(1) Interpréter I les résultats S (faible expression de la résistance naturelle) dans les cas suivants :

a- Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Citrobacter diversus et Escherichia hermannii, S aux amino- et/ou aux carboxy- et/ou aux uréido-pénicillines.

b- *Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Morganella morganii, Providencia rettgeri, Providencia stuartii et Hafnia alvei*, S aux amino-pénicillines et/ou aux céphalosporines de première génération et/ou à l'association amoxicilline + acide clavulanique et ampicilline + sulbactam.

c- Ŕ *Proteus vulgaris et Proteus penneri*, S aux amino-pénicillines et/ou aux céphalosporines de première génération.

(2) Interpréter I un résultat S aux carboxy- et/ou aux uréido-pénicillines chez *Proteus mirabilis* R aux amino-pénicillines.

(3) Interpréter I un résultat S aux uréido-pénicillines chez toute entérobactérie I ou R aux carboxy-pénicillines.

(4) Interpréter I un résultat S à toutes les céphalosporines sauf céfépime et cefpirome si la souche est catégorisée I ou R à céfotaxime et/ou ceftriaxone et/ou ceftazidime et/ou aztréonam en l'absence de synergie entre ces molécules et l'acide clavulanique (en pratique : disque d'amoxicilline + acide clavulanique = AMC). Ce phénotype est évocateur d'une céphalosporinase chromosomique hyperproduite (entérobactérie du groupe III et *E. coli*) ou d'une céphalosporinase plasmidique (toutes espèces d'entérobactéries).
La réalisation d'un antibiogramme standard sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250 mg/L de cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinases) permet de vérifier que la résistance observée est bien liée à ce type de mécanisme (restauration de la sensibilité aux molécules précitées en l'absence de tout autre mécanisme de résistance aux b-lactamines) et de détecter une éventuelle b-lactamase à spectre élargi associée qui aurait été masquée par une hyperproduction de céphalosporinase .

(5) interpréter i un résultat s à toutes les céphalosporines sauf les céphamycines (céfoxitine et céfotétan) et à l'aztréonam en présence d'une synergie significative entre au moins l'une des céphalosporines de 3ème génération (c3g) ou l'aztréonam et amc. ce phénotype est évocateur d'une b-lactamase à spectre élargi (blse).
a) cette synergie significative (typiquement "en bouchon de champagne") est habituellement visible sur l'antibiogramme standard où les disques sont distants de 30 mm (centre à centre).
toutefois, chez les souches résistantes à haut niveau aux b-lactamines (souches cumulant plusieurs mécanismes de résistance, dont l'hyperproduction de céphalosporinase), la détection d'une blse est facilitée par la recherche d'une synergie entre des disques de céfépime ou cefpirome et d'amc, que l'on peut rapprocher, et/ou la réalisation d'un antibiogramme standard (comprenant éventuellement des disques de c3g + amc, voir remarque 5d) sur gélose mueller- hinton additionnée de 250 mg/l de cloxacilline.
chez certaines espèces intrinsèquement très sensibles aux b-lactamines (*p. mirabilis, p. vulgaris, p. penneri, p. stuartii et p. rettgeri*), les blse s'expriment à bas niveau. leur détection est facilitée par la recherche d'une synergie entre les c3g ou l'aztréonam et amc avec des disques placés à une distance de 40-45 mm, ou comme indiqué dans la remarque 5b.
b) la présence d'une blse peut être confirmée en quantifiant la synergie soit par un antibiogramme comportant des disques de céfotaxime, ceftazidime et céfépime simples et combinés à l'acide clavulanique, soit par la mesure de la cmi de ces molécules testées seules ou associées à l'acide clavulanique. une synergie significative est définie comme l'augmentation de 5 mm du diamètre de la zone d'inhibition ou la diminution d'au moins 3 dilutions de la cmi en présence d'acide clavulanique. cette synergie significative témoigne de la présence de blse et permet de distinguer ces enzymes de certaines pénicillinases plasmidiques (oxa-1/30, shv-1). Une synergie non significative exclut a priori la présence d'une blse et la lecture interprétative associée à ce mécanisme.
c) chez *k. oxytoca*, un test de synergie positif (image "en entonnoir") avec l'aztréonam et/ou la ceftriaxone, mais négatif avec la ceftazidime, évoque une hyperproduction de la b-lactamase naturelle chromosomique. Interpréter i le seuls résultats associé à une synergie.
d) chez *p. vulgaris et p. penneri*, un test de synergie positif évoque une hyperproduction de la b-lactamase naturelle chromosomique et beaucoup plus rarement la présence d'une blse, surtout s'il n'y a pas de résistance acquise aux autres familles d'antibiotiques
Abréviations : gentamicine (g), tobramycine (t), nétilmicine (nt), amikacine (a), isépamicine (is)

(6) se conformer aux diamètres critiques de chaque molécule pour l'interprétation si une diminution des diamètres d'inhibition (< 20 mm) est observée pour l'ensemble des aminosides ; elle évoque une perméabilité diminuée.
(7) interpréter aiisi un résultat gs et ti/r nti/r et as/i iss/i, évoquant la production d'une aac(6'), (cf. également note 5).
(8) interpréter gi un résultat gs si une diminution du diamètre d'inhibition (16 à 19 mm) de la seule gentamicine, évoquant la production d'une aac (3)-i, est observée.
(9) interpréter ti un résultat ts si une diminution du diamètre d'inhibition (16 à 19 mm) de la tobramycine est observée avec un résultat gi/r. ceci évoque la production d'une ant (2'').
(10) interpréter nti un résultat nts si une diminution du diamètre d'inhibition (19 à 22 mm) de la nétilmicine est observée avec un résultat gi/r ti/r. ceci évoque la production d'une aac(3)-ii ou d'une aac(3)-iv.
(11) chez *providencia* spp., après vérification de l'identification, interpréter gi ti nti un résultat gs ts et nts (résistance naturelle par production d'une aac (2')-i).
Important : les phénotypes G^r T^s Nt^r A^s, G^s T^r Nt^r A^s, G^s T^s Nt^r A^r et G^s T^r Nt^s A^r demeurent improbables. Vérifier l'identification et l'antibiogramme, ainsi que l'interprétation.

Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques	Charge du disque	Concentrations critiques mg/L		Diamètres critiques mm		Remarques
		S(cci)	R(ccs)	S (D)	R (d)	
Ticarcilline	75 µg	≤ 16	> 16	≥ 22	< 22	Cf. règles (1) à (4).
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 16/2	> 16/2	≥ 22	< 22	
Pipéracilline	75 µg	≤ 16	> 16	≥ 18	< 18	
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤ 16/4	> 16/4	≥ 19	< 19	
Imipénème	10 µg	≤ 4	> 8	≥ 22	< 17	Une résistance isolée aux carbapénèmes correspond à une imperméabilitésélective associée à une hydrolyse par la céphalosporinase constitutive de l'espèce. Cette résistance n'est pas croisée avec les autres bêta-lactamines.
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15	
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19	
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 16	≥ 27	< 19	Cf. règles (3) à (5).
Ceftazidime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	Cf. règles (1) à (5).
Céfépime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	
Cefpirome	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	
Tobramycine	10 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16	Cf. règles (6) et (7).
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	
Isépamicine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16	
Nétilmicine	30 µg	≤ 4	> 4	≥ 19	< 19	
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2			En raison de l'absence de corrélation CMI/diamètre, il y a lieu de déterminer la CMI de la colistine en cas d'utilisation thérapeutique (souche multirésistante). Interprétation valable pour polymyxine B.
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22	
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14	
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14	La résistance acquise à la fosfomycine est homogène. La présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise en compte
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines

Annexe

Règles de lecture interprétative du tableau de lecteur de concentration critique de pseudomonas aeruginosa

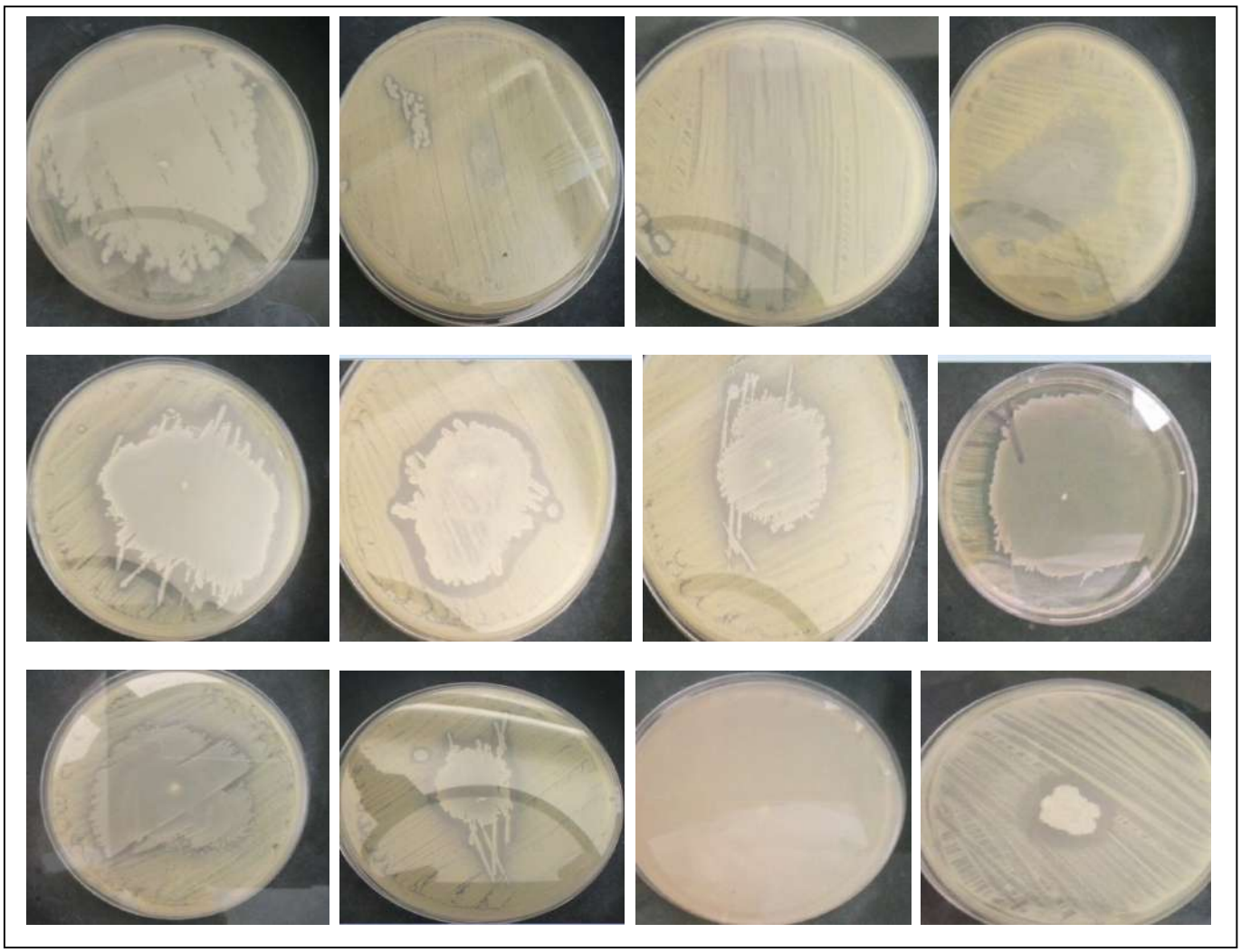
Abréviations : TIC, ticarcilline ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; PIP, pipéracilline ; PTZ, pipéracilline + tazobactam ; AZL, azlocilline ; IPM, imipénème ; ATM, aztréonam ; CFZ, céfopérazone ; CFS, cefsulodine ; CPO, cefpirome ; FEP, céfépime ; CAZ, ceftazidime.
(1) Interpréter I un résultat S à TCC, PIP, PTZ, AZL, CFZ, CFS si une résistance à haut niveau (CMI > 256 mg/l, disque contact) à TIC est mise en évidence.
(2) Un résultat TIC S TCC I/R est en relation avec une céphalosporinase inductible ; il n'y a pas lieu de changer la catégorisation de la ticarcilline.
(3) Interpréter I un résultat S à TIC, TCC, PTZ, CFZ, CFS, CPO, ATM si un phénotype PIP I/R CAZ I/R et TIC S est mis en évidence.
(4) Un résultat TIC I/R TCC I/R et/ou ATM I/R avec une sensibilité conservée aux autres b-lactamines du tableau ci-dessus évoque une résistance par efflux. Etant donné l'absence de données sur les conséquences cliniques, il n'y a pas lieu de changer les catégorisations.
(5) Une synergie entre TCC et ATM et/ou CAZ et/ou FEP et/ou CPO permet la détection de certaines b-lactamases à spectre étendu (BLSE).
Abréviations : G, gentamicine ; T, tobramycine ; Nt, nétilmicine ; A, amikacine ; Is, isépamicine.
(6)- Se conformer aux diamètres critiques de chaque molécule pour l'interprétation, si une diminution des diamètres d'inhibition (< 20 mm), évoquant une résistance non enzymatique, est observée pour l'ensemble des aminoglycosides.
(7) - Interpréter A I Is I un résultat A S Is S et G S et T I/R Nt I/R évoquant la production d'une AAC (6')-I.

Annexe

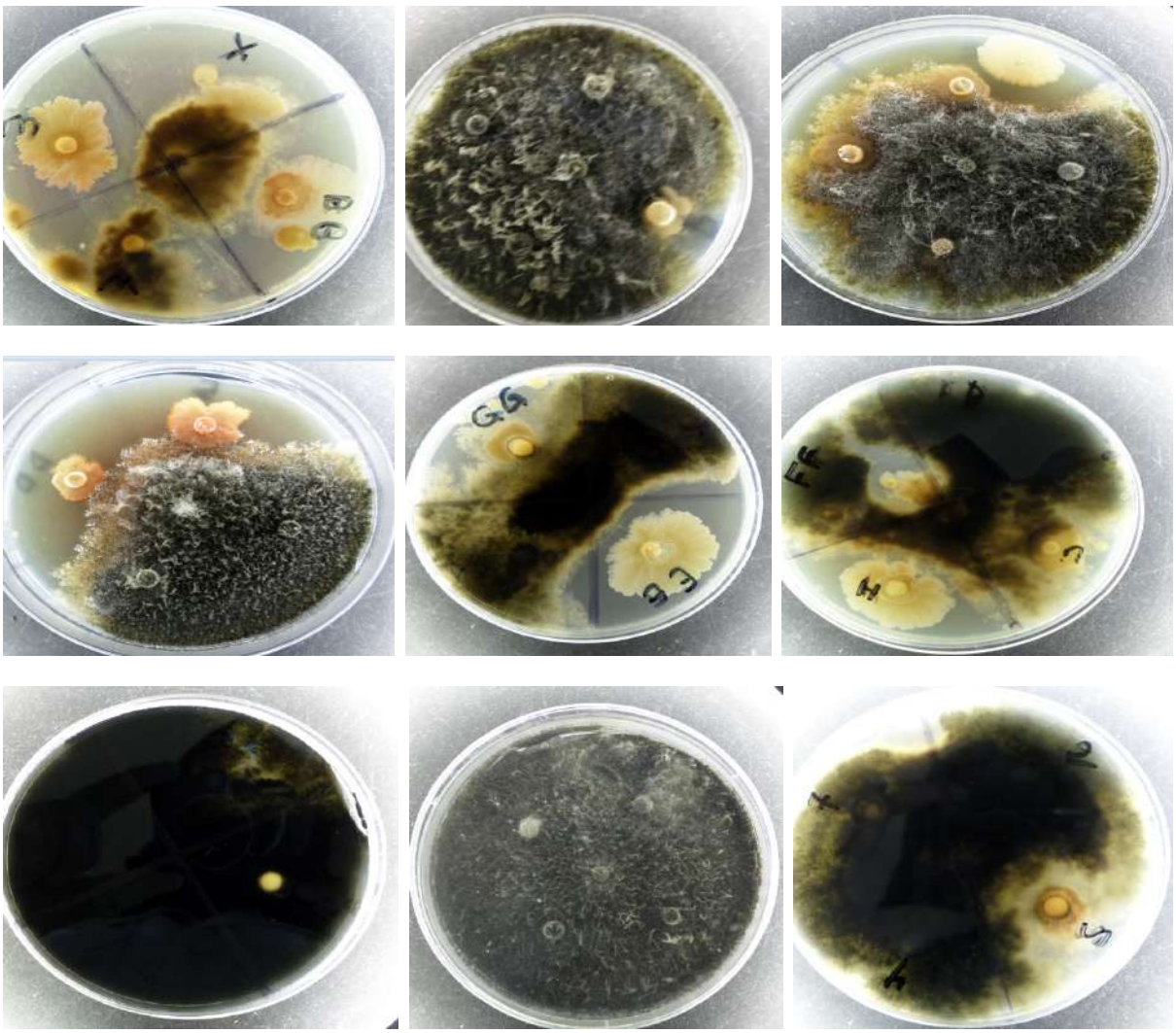
Les tableaux de lecteur prennent par documentation technique d'étude de la sensibilité aux antimicrobiens, Documentation technique extraite des notices techniques commerciales et de différentes publications, 2010-2011, ministère de la sante et de la population direction de la prévention sous direction sante maternelle et infantile.

L'activité antibactérienne et antifongique

Les photos d'activité antibactérienne



Annexe



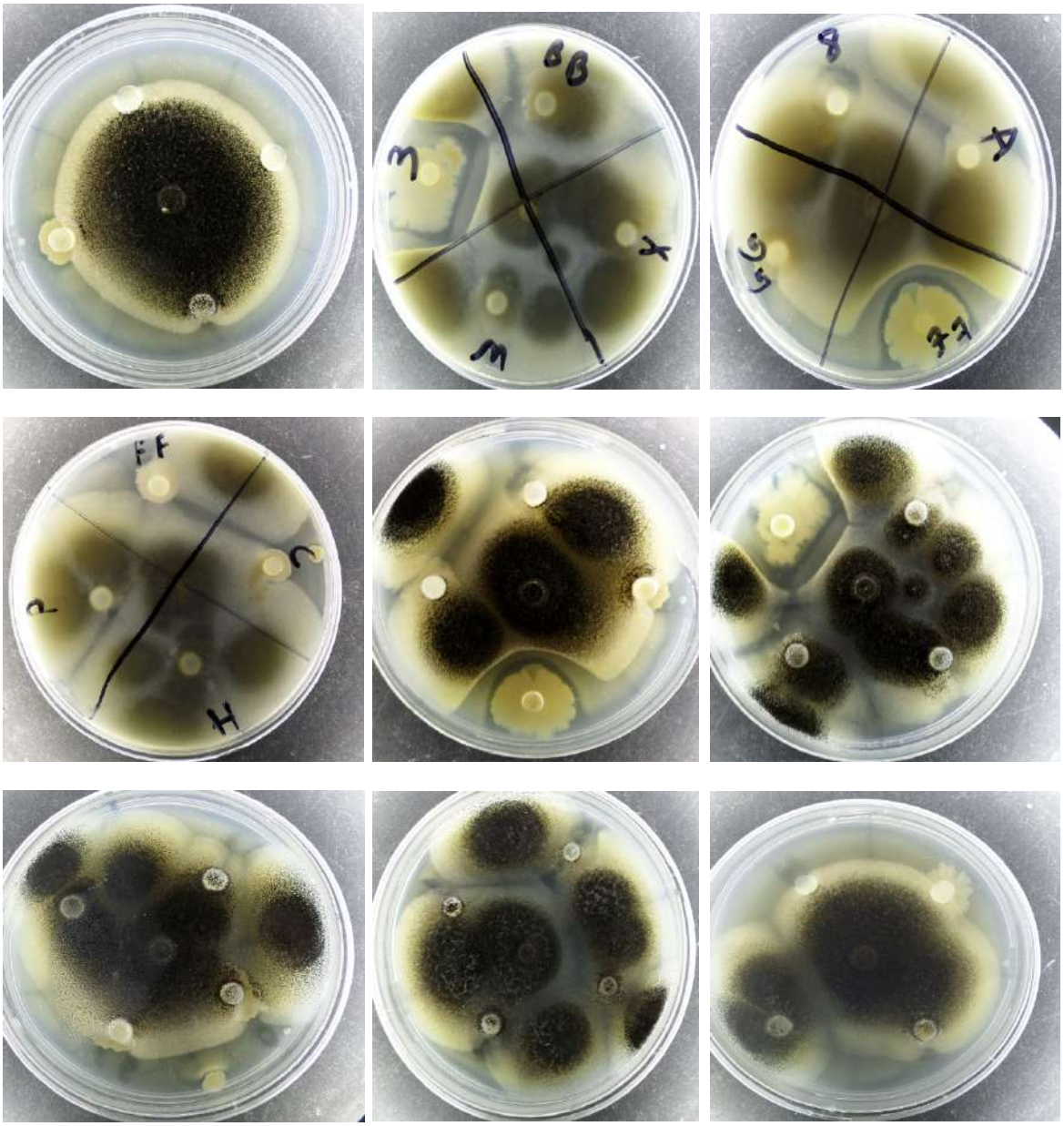
Le premier champignon



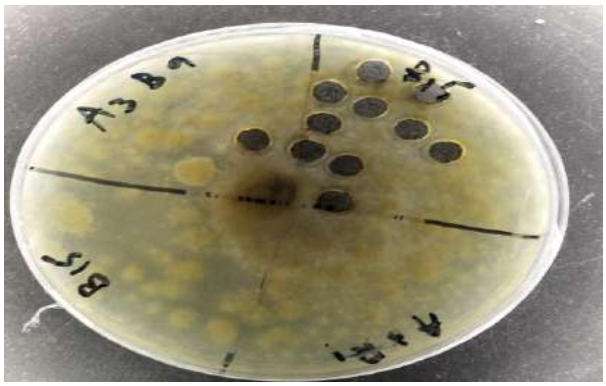
Le champignon a testé

Les photos d'activité antifongique de 1er champignon MCH 07

Annexe



Les résultats d'activité antifongique de la 2éme



Le champignon a testé EMB 23

Annexe

La validation de lecteur basé sur la méthode de lecteur qui annoncer par **La lecture de l'antibiogramme Prise en compte des recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) pour la réalisation d'une lecture Interprétative.**

Annexe 06: identification de système API 20^{e}.

Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION

Coffret de 25 tests (réf. 20 100)

- 25 galeries API 20 E
- 25 boîtes d'incubation
- 25 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

Coffret de 100 tests (réf. 20 160)

- 100 galeries API 20 E (4x25 galeries)
- 100 boîtes d'incubation
- 100 fiches de résultats
- 1 barrette de fermeture
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie API 20 E est reportée dans le Tableau de Lecture.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs

- API Nl 0,85 % Medium, 5 ml (Réf. 20 230) ou
API Suspension Medium, 5 ml (Réf. 20 150)
- API 20 E coffret de réactifs (Réf. 20 120) ou réactifs individuels : TDA (Réf. 70 402) JAMES (Réf. 70 542)
VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422) NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
- Réactif Zn (Réf. 70 380)
- Oxydase (Réf. 55 635*)

Annexe

* référence non commercialisée dans certains pays :
Utiliser un réactif équivalent.
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Catalogue Analytique API 20 E (Réf. 20 190) ou logiciel d'identification **api*web* TM** (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)

Matériel
- Pipettes ou PSIpettes
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

REACTIFS COMPLEMENTAIRES
- API OF Medium (Réf. 50 110):
Test pour la détermination du métabolisme fermentatif ou oxydatif du glucose.
- API M Medium (Réf. 50 120) : Test pour la détermination de la mobilité des bactéries aéro-anaérobies.

PRECAUTIONS D'UTILISATION
• **Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.**
• **Pour usage professionnel uniquement.**
• Ce coffret contient des composants d'origine animale.
La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
• Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections*; *Approved Guideline* - Révision en vigueur". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories CDC/NIH
- Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
• Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
• Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
• Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, …
• Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
• L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine, du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

Annexe

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 E ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.
Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté à la culture des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Test oxydase

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21ème test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Préparation de la galerie

• Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl2, CO2 ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
• Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
• Sortir la galerie de son emballage.
• Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

NOTE : API 20 E doit être utilisé avec des *Enterobacteriaceae* et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux. Les microorganismes fastidieux, exigeants et nécessitant des précautions de manipulation particulières (ex. *Brucella* et *Francisella*) ne font pas partie de la base de données API 20 E. Il convient d'utiliser d'autres techniques pour exclure ou confirmer leur présence.

Préparation de l'inoculum

• Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
• A l'aide d'une pipette ou d'une PSIpette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
• Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : la plupart des espèces de *Vibrio* sont halophiles. En cas de suspicion d'un *Vibrio*, réaliser la suspension bactérienne dans API NaCl 0,85 % Medium.

Inoculation de la galerie

• Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIpette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
- pour les tests CIT , VP et GEL , remplir tube etcupule,
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H2S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
• Refermer la boîte d'incubation.
• Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures

Annexe

- **La référence du lecteur API 20 ^{E} :**

Test négatif



Test positif



La souche api 20^{e} :

TP 40



BH 20



FK35



BH 4



Annexe

BH 5



BH 3



LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

• Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

• Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur **rose** diffusant dans toute la cupule indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur **rose** ou **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration **rose** apparaissant après 10 minutes doit être considérée **négative**.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

• Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :

- Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).

- Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

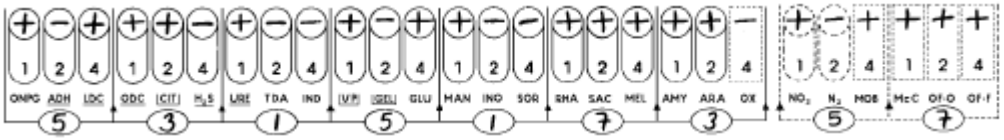
• Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

• Identification : Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)

* à l'aide du Catalogue Analytique :

Annexe

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.
* à l'aide du logiciel d'identification **api*web* TM** :
- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres Par ailleurs dans certains cas, le profil à 7 chiffres étant insuffisamment discriminant, les tests complémentaires suivants sont nécessaires :
- Réduction des nitrates en nitrites (NO2) et en azote (N2) : ajouter 1 goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2 à 5 minutes. Une coloration **rouge** indique une réaction **positive** (NO2). Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) : ajouter 2 à 3 mg de réactif Zn dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté **jaune** indique une réaction **positive** (N2) à noter sur la fiche de résultats. Si la cupule est **orange-rouge**, la réaction est
Négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc. Cette réaction est intéressante pour les bacilles à Gram négatif oxydase positive.
NOTE : Pour les mêmes raisons que le test indole (se référer à la note du paragraphe "Lecture de la galerie"), le test de réduction des nitrates doit être réalisé en dernier.
Mobilité (MOB) : Inoculer une ampoule d'API M Medium (cf notice).
- Culture sur gélose de MacConkey (McC) : Ensemencer un milieu de Mac Conkey (cf notice).
- Oxydation du glucose (OF-O) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice).
- Fermentation du glucose (OF-F) : Inoculer une ampoule d'API OF Medium (cf notice). Ces tests complémentaires, mentionnés dans l'introduction (Codage des profils) du Catalogue Analytique, peuvent être utilisés pour constituer un profil à 9 chiffres, identifiable avec le logiciel d'identification.



5 315 173 (57) *Enterobacter gergoviae*
D’autres tests supplémentaires peuvent être proposés en cas de faible discrimination. Se référer au logiciel ou Catalogue Analytique.
Tableau de lecture API 20 ^{E}.

Annexe

Tests	Composants actifs	Réactions /Enzymes	Résutats	
			Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl- βD-galactopyranoside	β-galactosidase (OrthoNitroPhényl- βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
ADH	L -arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange /rouge
LDC	L -lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
ODC	L-ornithine	Ornithine Décarboxylase	Jaune	Orange /rouge
CIT	Trisodium citate	Utilisation du CITrate	Vert pale-jaune	Bleu-vert-bleu
H_2S	Sodium thoisulfate	Production d' H_2S	Incolore-grisâtre	Dépôt noir-fin liseré
URE	Urée	UREase	Jaune	Orange /rouge
TDA	L-tryptophane	TriptophaneDésAminase	TDA immédiat Jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	Production d'INDole	JAMES immédiat Incolore-vert pale – jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate	Production d'acétoine	VP1+VP2/10min Incolore – rose pale	Rose -rouge
GEL	Gélatine (origine bovine)	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment
GLU	D-glucose	Fermentation -oxydation (GLUcose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MAN	D-mannitol	Fermentation -oxydation (MANnitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
INO	Inositol	Fermentation -oxydation (INOsitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SOR	D-sorbitol	Fermentation -oxydation (SORbitol)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
RHA	L-rhamnose	Fermentation -oxydation (RHAmnose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
SAC	D-saccharose	Fermentation -oxydation (SACcharose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
MEL	D-melibiose	Fermentation -oxydation (MELibiose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
AMY	Amygdaline	Fermentation -oxydation (AMYgdaline)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
ARA	L-arabinose	Fermentation -oxydation (ARAbinose)	Bleu-bleu vert	Jaune-jaune gris
OX	Voir notice du test oxydase	Cytochrome oxydase	Voir notice du test oxydase	

Liste des références :

A

Aminetou Bent Mohamed, Aicha mint Sidi Baba 2007 – 2008 ,université de Nouakchott faculté des sciences et techniques département de biologie ;manuel de travaux pratiques de microbiologie .

Api ® 20 E ™ Système d'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, ref **20 100 / 20 160,** 07584**J** - fr - 2010/05.

.**(Archambaud, 2007).**

Anne POSTEC,2005, université de Provence (aix-marseille i), Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles.

Melle : AISSAOUI Nadia, 2012/2013, Université de Tlemcen,
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie.

(Amoozegar *et al*., 2007; Karbalaei-Heidari *et al*., 2009).

(Aygan *et al*, 2008).

(Aygan *et al*, 2008).

B

Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C. and Turck M., 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method.*American Journal of Clinical Pathology*; 45:493–496.

bacillus anthracis.(boseret g., linden a., mainil j.) service de bactériologie et de pathologie des maladies bactériennes faculté de médecine vétérinaire
Université de liège.

bacillus genetic stock center catalog of strains, seventh edition, volume 1: bacillus subtilis 168(daniel r. zeigler, ph.d. the bacillus genetic stock center department of microbiology the ohio state university 484 west twelfth avenue

(Beguin et Aubert, 1994),

BENABDALLAH AHMED MEHDI,2014, Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkha D'Oran (caractérisation phénotypique) ;université de tlencen.

(Bron *et al,* 1999).

C

Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre, Ministère de l'Environnement Espagne, Gouvernement de la Catalogne Ministère de l'Environnement .

Centre d'Activités Régionales pour la Production Propre (CAR/PP) ,Plan d'Action pour la Méditerranée**.2003**

columbus, ohio 43210

cohnen 1872,

D

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B., 2009. *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition., Volume Three, The Firmicutes.* Springer, New York, USA.

J

Joffin J.N. and Leyral G., 2006. *Microbiologie Technique. Tome 1, dictionnaire des techniques.* Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine**,** France.

Jean GUEZENNEC, Cécile DEBITUS; éditions 2005, Substances naturelles en Polynésie française ressources marines de la Polynésie française : applications en matière de biotechnologie.

Journale officiel ; 2/07/1992cf loi n° 92-597 ;1/07/1992.

(Jonson, 1989).

H

Harley J.P. and Prescott L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed.* McGraw-Hill, USA.

G

Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W.A. and Krieg N.R., **1994.** *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington DC, ASM, USA.

gomri mohamed amine, 2011/2012, universite mentouri-constantine.

guezzen abdedjeilil, 2014, université abou bekr belkhaid-tlemcen, étude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne des extraits bruts de l'algue brunes cystoseria stricta de la côte ouest la algérienne évaluation de la capacité anti oxydantes totale.

K

Kramer et Gilbert

Kamat *et al*. (2011).

L

Logan N.A., Berge O., Bishop A.H., Busse H.J., De Vos P., Fritze D., Heyndrickx M., Kaampfer P., Salkinoja-Salonen M.S., Seldin L., Rabinovitch L. and Ventosa A., 2009a. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology;* 59:2114-2121.

pdf 925ksignaler ce document

Lemille *et al*

M

Microbiologie generale; Leclerc, Gaillard, Simonet; Brock; Pelmont

P

(Priest *et al,* 1993),

(Prescott *et al*., 2008).

R

Recommandations therapeutiques pour la prise en charge des patients exposes a bacillus anthracis dans des circonstances naturelles 9 décembre 2010 pdf.

(Rao *et al* , 1998).

(Rohban *et al.,* 2009).

S

stéphanie salaun,2009,unive de bretagne.intéractions entre la macro algue brune et ses épointes bactériens, études moléculaire et spectroscopieque,et capacité d'adhésion et de formation de bio film.

(**smith *et al,* 1952),**

Sievers et Zetterberg

(Souza *et al.,* 2005 ; Guo *et al.,* 2006).

(**Stein, 2005).**

Z

(zhang *et al,* 2009).

Zellal aicha, 2012, la croissance et le développement d'une rhodophyte agaropyte ; gelidium ses qui pédale de la côte de Mostaganem (ouest algérien) : étudie préliminaire, université d'Oran.

W

(Whipps , 2001 ; Stein, 2005

Les sites utilisés :

http://wwz.ifremer.fr/L-institut/Organisation/Departements/Ressources-Biologiques-et-Environnement/Biotechnologies-et-Ressources-marines

https://vertigo.revues.org/3356
https://books.google.dz/books?id=FCoDCAAAQBAJ&pg=PA306&dq=classification+des+bacillus&hl=fr&sa=X&ei=V8lfVbwSo5_uBrT2gbAB&ved=0CDkQ6AEwBA#v=onepage&q=classification%20des%20bacillus&f=false

https://books.google.dz/books?id=JDbSBQAAQBAJ&pg=PA125&dq=bacillus+marine&hl=fr&sa=X&ei=WspfVb-zHcjk7Abdk4PABw&ved=0CEwQ6AEwBw#v=onepage&q=bacillus%20marine&f=false

https://etudes.univ-rennes1.fr/digitalAssets/39/39586_S_Griess_VLcorrige.pdf

http://cdn.staticwebdom.com/js/blank7.html#%7B%22namespace%22%3A%22LITE%22%2C%22revMode%22%3A18%2C%22marketingCampaignID%22%3A999999%2C%22campaignID%22%3A%22001868%22%2C%22browser%22%3A%22ch%22%2C%22url%22%3A%22https%3A%2F%2Fetudes.univ-rennes1.fr%2FdigitalAssets%2F39%2F39586_S_Griess_VLcorrige.pdf%22%2C%22install%22%3A1408277683%2C%22appID%22%3A61792%2C%22subID%22%3A%2220018680612000000%22%2C%22windowName%22%3A%22icm_inline_p%22%2C%22ad_width%22%3A1%2C%22ad_height%22%3A100%2C%22ad_type%22%3A%22siteunder%22%2C%22asw%22%3A%228_-2147483643_16777216%22%2C%22pstn%22%3A%22268435464%22%2C%22icmVersion%22%3A%221228%22%2C%22operatingSystem%22%3A%22win%22%2C%22domain%22%3A%222.csdevgrp.com%2FzTSRSW%22%2C%22ibic%22%3A%22A61C106E4CF74FC29D16108F8973E4A1IE%22%2C%22refferer%22%3A%22https%3A%2F%2Fwww.google.dz%2F%22%7D

http://fr.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9riologie_m%C3%A9dicale

http://fr.wikipedia.org/wiki/Bact%C3%A9riologie_m%C3%A9dicale

http://www.nature.com/nature/anthrax/

http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/32797-bacillus-subtilis-definition

http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/B_subtilis.html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1428398/

http://www.techmicrobio.net/systematique/GramPositif/Bacillus/Bacillus_doc/BacillusCharbon.html.