

République Algérienne Démocratiques et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Microbiologie

N° d'ordre :

Série :

Mémoire

Présenté par: M^{elle} GUERGOURI Ibtissem

En vue de l'obtention de diplôme de

Magistère en Microbiologie

Option : Ecologie Microbienne

**Thème: Caractérisation des bactéries isolées de sols
contaminés par les hydrocarbures (zone de Skikda) et
productrices des biosurfactants**

Soutenu le : 29 /06/2010

Membres de jury:

Président : Mr A. BENGUEDOUAR

Rapporteur : Mr Y. BENHIZIA

Examineur : Mr M. KITOUNI

Examineur : Mr M. A. HAMIDECHI

Professeur à l'université Mentouri

Maitre de conférences à l'université Mentouri

Maitre de conférences à l'université Mentouri

Maitre de conférences à l'université Mentouri

Table des matières

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Chapitre I: Revue Bibliographique

| | |
|---|----|
| I-Notions d'écologie microbienne | 2 |
| I-1- Définitions..... | 2 |
| I-1-1- Les interactions entre les composants de l'écosystème..... | 2 |
| I-1-2- L'habitat naturel..... | 3 |
| I-2- Les méthodes classiques d'écologie microbienne | 4 |
| I-2-1- Les cultures d'enrichissement | 4 |
| I-2-2- L'isolement..... | 4 |
| I-3- Approche taxonomique dans l'étude de la biodiversité d'un écosystème donné | 4 |
| I-3-1- La taxonomie traditionnelle | 4 |
| I-3-2- L'analyse phénotypique classique | 5 |
| I-3-3- La chimiotaxonomie | 5 |
| I-3-4- La taxonomie numérique..... | 6 |
| I-3-5- La révolution phylogénétique..... | 6 |
| I-3-6- La taxonomie polyphasique..... | 6 |
| I-4- Intérêt des biosurfactants dans la caractérisation | 7 |
| II-Microbiologie des sols pollués aux hydrocarbures..... | 7 |
| II-1- La composition chimique des polluants..... | 7 |
| II-2- La communauté microbienne indigène | 8 |
| II-3- Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures..... | 8 |
| II-3-1- Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne..... | 9 |
| II-3-2- Métabolisme des hydrocarbures..... | 9 |
| II-4- Les biosurfactants | 10 |
| II-4-1- Définitions..... | 10 |
| II-4-2- Structure et classification des biosurfactants..... | 10 |
| II-4-3- Biosynthèse et rôle physiologique | 11 |
| II-4-4- Rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures | 12 |
| II-4-5- Potentiels des biosurfactants..... | 14 |

| | |
|--|----|
| II-4-6- Les différentes applications des biosurfactants..... | 14 |
|--|----|

Chapitre II: Etude Expérimentale

| | |
|--|----|
| I-Réalisation de l'échantillonnage..... | 16 |
| I-1- Description du site..... | 16 |
| I-2- Stratégie de l'échantillonnage | 16 |
| I-3- Caractéristiques du sol..... | 17 |
| II-Isolement et purification des souches bactériennes..... | 17 |
| II-1- Matériel..... | 17 |
| II-2- La dilution | 18 |
| II-3- L'isolement | 18 |
| II-4- La purification..... | 19 |
| III-Sélection des souches productrices de biosurfactants | 19 |
| III-1- Matériel..... | 19 |
| III-2- Test d'émulsification | 19 |
| III-3- Index d'émulsion | 20 |
| III-4- Conservation des souches sélectionnées..... | 20 |
| IV-Caractérisation phénotypique | 22 |
| IV-1- Caractères morphologiques..... | 23 |
| IV-1-1- Observation macroscopique..... | 23 |
| IV-1-2- Observation microscopique | 23 |
| IV-2- Caractères biochimiques et physiologiques | 23 |
| IV-2-1- Conditions physico-chimiques de croissance..... | 23 |
| IV-2-2- L'étude du métabolisme respiratoire..... | 23 |
| IV-2-3- Le métabolisme glucidique..... | 24 |
| IV-2-4- Le métabolisme d'acides organique..... | 24 |
| IV-2-5- Le métabolisme protéique..... | 24 |
| IV-2-6- Le métabolisme des lipides..... | 25 |
| IV-2-7- Les milieux sélectifs..... | 25 |
| V-Caractères chimiotaxonomiques..... | 26 |
| V-1- Préparation des extraits protéiques..... | 26 |
| V-2- Préparation du gel..... | 27 |
| V-3- Le dépôt | 28 |
| V-4- La migration..... | 28 |

| | |
|--|----|
| V-5- La révélation..... | 29 |
| <u>Chapitre III: Résultats et Interprétation</u> | |
| I-Caractéristiques du sol prélevé | 30 |
| II-Sélection des souches productrices de biosurfactant | 30 |
| III-Caractérisation phénotypique..... | 33 |
| III-1- Observations coloniales et cellulaires | 33 |
| III-2- Conditions de croissance | 33 |
| III-3- Les différents métabolismes bactériens | 35 |
| III-3-1- Le métabolisme respiratoire | 35 |
| III-3-2- Le métabolisme glucidique..... | 35 |
| III-3-3- Le métabolisme d'acides organiques | 40 |
| III-3-4- Le métabolisme protéique..... | 40 |
| III-3-5- Le métabolisme lipidique | 40 |
| III-3-6- Les milieux sélectifs..... | 40 |
| IV-Classification hiérarchique des isolats selon leurs caractères phénotypiques | 45 |
| V-Identification des isolats susceptibles de dégrader les hydrocarbures | 47 |
| VI-Caractérisation chimiotaxonomique | 59 |
| VI-1- Analyse du profil protéique..... | 59 |
| VI-2- Problèmes de résolution de certaines bandes | 59 |
| VI-3- Traitement statistique des données..... | 61 |
| <u>Discussion et Conclusion</u> | 67 |
| Références Bibliographiques | 70 |
| Annexes | |

Liste des tableaux

| Numéro | Intitulé | page |
|---------------|---|----------------|
| 1 | Source microbienne et principaux types de biosurfactants (Desai et coll., 1997) | 11 |
| 2 | Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne (C. N. Mulligan, 2009). | 15 |
| 3 | Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol. | 30 |
| 4 | Qualité et index d'émulsion obtenus pour les 16 isolats et les souches de référence. | 31 |
| 5 | Résultats d'identification phénotypique des 16 souches productrices de biosurfactants. | 58 |
| 6 | Matrice de proximité (dissimilarité générale) pour la première collection des isolats. | 62 |
| 7 | Matrice de proximité (dissimilarité générale) pour la première collection des isolats. | 64 |
| 8 | Récapitulation de tous les caractères phénotypiques des 16 isolats et des souches de référence. | Annexes |
| 9 | Diagramme type du gel No.1 | Annexes |
| 10 | Diagramme type du gel No.2 | Annexes |

Liste des figures

| Numéro | Intitulé | Page |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche <i>Pseudomonas sp.</i> SSC2 cultivé sur 2% de n-hexadecane (S. S. Cameotra et coll., 2009) | 13 |
| 2 | Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadecane englouties par la souche <i>Pseudomonas sp.</i> SSC2, Morgagni TEM (S. S. Cameotra et coll., 2009). | 13 |
| 3 | Stratégie du prélèvement des échantillons de sol contaminés. | 16 |
| 4 | La réalisation du test d'émulsification | 19 |
| 5 | Schéma générale d'isolement et de purification des souches bactériennes contenues dans les prélèvements de sol. | 21 |
| 6 | Démarche suivie pour identifier les 16 souches bactériennes. | 22 |
| 7 | Diagramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs des E24 de chaque souche | 32 |
| 8 | Schéma général des rangs hiérarchiques de classification de nos isolats. | 46 |
| 9 | Clés dichotomiques pour la différenciation des bacilles à Gram négatif. | 50 |
| 10 | Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre <i>Pseudomonas</i> . | 51, 52 |
| 11 | Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre <i>Enterobacter</i> . | 53 |
| 12 | Clés dichotomiques de différenciation des bacilles à Gram positif. | 56 |
| 13 | Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre <i>Bacillus</i> . | 57 |
| 14 | Dendrogramme simplifié de la classification, réalisé à partir de l'étude d'électrophorégramme protéique de la première collection de bactéries. | 63 |
| 15 | Dendrogramme simplifié de la classification, réalisé à partir de l'étude d'électrophorégramme protéique de la deuxième collection de bactéries. | 65 |

Liste des photographies et planches

| Numéro | Intitulé | Page |
|---------------|---|-------------|
| 1 | La préparation de suspension de jaune d'œuf. | 25 |
| 2 | (a) Addition de tampon de lyse aux culots, (b) Agitation automatique. | 27 |
| 3 | (a) Montage des plaques sur le support (b) versement du gel entre les plaques. | 27 |
| 4 | Le dépôt des protéines bactériennes dans les puits du gel de concentration. | 28 |
| 5 | (a) Remplissage du bac supérieur par le tampon de migration, (b) Lancement de la migration. | 29 |
| 6 | L'étape de la décoloration du gel. | 29 |
| 7 | Mise en évidence de la production du Biosurfactant. Formation d'émulsion dans le bouillon de l'isolat F (à droite) et un témoin (T) négatif (à gauche). | 32 |
| P1.A | Variation du taux d'émulsification d'un isolat à un autre. | 34 |
| P1.B | Les différents aspects coloniaux obtenus (a : aspect muqueux, b : aspect rugueux, c : aspect lisse) | 34 |
| P1.C | Les deux aspects majeurs obtenus pour les isolats après coloration de Gram (grossissement x1000). | 34 |
| P2.A | L'effervescence obtenue de la réaction d'H ₂ O ₂ avec la catalase bactérienne. | 36 |
| P2.B | Photographie qui montre la réduction de nitrates au stade nitrites par la nitrate-réductase. | 36 |
| P2.C | L'utilisation du glucose comme source de carbone par les différents isolats. | 36 |
| P3.A | Photographie du test Kligler-Hajna pour les différents isolats et les souches de référence. | 38 |
| P3.B | Photographie du résultat positif (couleur jaune) et du résultat négatif du test ONPG. | 38 |
| P3.C | L'utilisation du mannitol par les différents isolats sur milieu mannitol-mobilité. | 38 |
| P4.A | le test d' α -amylase (a) avant et (b) après ajout d'iode, résultat positif à gauche négatif à droite (b). | 39 |
| P4.B | le test VP pour les différents isolats, la couleur rose indique la fermentation acide mixte. | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| P4.C | le test RM, la couleur rouge indique la fermentation acide butanoïque. | 39 |
| P5.A | Virage du bleu de bromothymol de la couleur verte à la couleur bleu pour un résultat positif. | 41 |
| P5.B | La croissance de tous les isolats sur acide acétique et synthèse de pigment jaune par la souche M sur ce milieu. | 41 |
| P5.C | Mise en évidence de l'hydrolyse de la gélatine par les souches de référence Hca1 et Hs1. | 41 |
| P6.A | Les différentes couleurs obtenues sur le milieu de Falkow. | 42 |
| P6.B | Photographie des différents résultats obtenus sur le milieu de Falkow pour la recherche d'enzymes ADH, LDC, ODC. | 42 |
| P6.C | Photographie du test uréase sur milieu Urée-indole (rose : uréase positif et jaune : uréase négatif). | 42 |
| P7.A | Photographie du résultat négatif d'indole après ajout du réactif de Kovacs. | 43 |
| P7.B | Photographie du test positif sur la gélose au jaune d'œuf, formation du précipité autour des colonies | 43 |
| P7.C | La croissance des bactéries Gram – sur la gélose S-S sans production d'H ₂ S. | 43 |
| P8.A | Photographie du milieu King B ensemencé et exposé aux rayons UV après 24h d'incubation. | 43 |
| P8.B | Synthèse de pigment fluorescent sur le milieu King B par les isolats L et M. | 43 |
| P9.A | Photographies de l'aspect colonial des isolats ayant un Gram négatif. | 48 |
| P10.A | Photographies de l'aspect microscopique des isolats à un Gram négatif (Gx1000). | 49 |
| P11.A | Photographies de l'aspect colonial des isolats ayant un Gram positif. | 54 |
| P12.A | Photographies de l'aspect microscopique des isolats à un Gram positif (Gx1000). | 55 |
| 8 | Photographie du gel électrophorétique No. 1 | 60 |
| 9 | Photographie du gel électrophorétique No. 2 | 61 |

Introduction

L'objectif de toute science naturelle est d'appréhender la complexité de la nature par des catégories qui puissent fonder un langage et un raisonnement les plus cohérents possibles et servir de socle à d'autres études (Lecointre et *coll.*, 2001).

Le travail entrepris dans ce mémoire décrit l'un des écosystèmes les plus complexes, à travers la communauté bactérienne qui l'habite. Il s'agit du sol qui entoure les bacs de stockage du pétrole brut dans la zone industrielle Sonatrach à Skikda.

Les conditions physicochimiques et l'altération de ce biotope par les déversements d'hydrocarbures ne font qu'augmenter l'adaptation de certains genres bactériens via l'expression de gènes d'intérêt, tandis que d'autres deviennent incapables de survivre. Ces bactéries à pouvoir inductible synthétisent des biomolécules appelées biosurfactants, leurs permettant d'utiliser ces hydrocarbures comme sources de carbone et d'énergie.

Ces biosurfactants constituent des outils très intéressants dans beaucoup d'applications industrielles et environnementales, et peuvent être envisagés comme remplaçants aux surfactants chimiques vu leur biodégradabilité, biocompatibilité et manque de toxicité.

Beaucoup de travaux ont porté sur l'optimisation de conditions de culture de ces bactéries *in vitro*, l'évaluation de leur capacité d'émulsification, la production des biosurfactants et leurs différentes applications. Cependant, aucune recherche n'a porté sur l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes indigènes des zones littorales ou désertiques de l'Algérie.

Dans le contexte actuel d'étude de la biodiversité écologique, nous nous sommes fixés comme objectifs d'une part d'isoler toutes les souches bactériennes productrices de biosurfactants à partir du terrain choisi, et d'autre part de les caractériser et essayer de les identifier selon une approche phénotypique. La sélection des souches était faite sur la base du test d'émulsification décrit par Zajic et ses collaborateurs *en 1977*. Tandis que le travail de caractérisation était conduit en combinant plusieurs méthodes phénotypiques entre autres l'analyse du métabolisme des substrats carbonés, le métabolisme respiratoire...etc., avec une méthode chimiotaxonomique qui est l'SDS-PAGE monodimensionnelle.

I- Notions d'écologie microbienne

L'écologie microbienne est une discipline située au carrefour de deux grands champs de recherche: l'écologie et la microbiologie. Elle a pour objectif d'étendre la compréhension des relations entre la biodiversité des microorganismes, l'activité microbienne, et les facteurs écologiques du milieu, de l'échelle individuelle à celle des communautés microbiennes. Il s'agit donc d'une modélisation des écosystèmes (eau, air, sol) où les microorganismes sont des acteurs majeurs du fonctionnement.

Face aux demandes sociétales vis-à-vis des changements globaux, du développement durable, de l'extension industrielle, de la préservation de la santé humaine et animale, et de la biodiversité et ressources naturelles, cette discipline est actuellement en plein essor, se devant d'apporter des réponses aux perturbations anthropiques de l'environnement.

Ces dernières années, les études relevant, à des degrés divers, du concept de biodiversité se sont multipliées. Les analyses de diversité microbienne, *sensu* inventaire des espèces et sous-espèces d'un environnement, se sont notamment considérablement développées. En effet, l'étude des microorganismes habitant les environnements naturels avait longtemps consisté en une approche culturale puis une caractérisation des isolats purs selon des critères définis par la taxonomie (Alain, 2003). Toutefois, les techniques d'analyse restent en évolution permanente pour établir une classification stable et pallier les déficiences des voies classiques.

I-1- Définitions

Un écosystème est un ensemble dynamique au sein duquel interagissent à divers degrés des facteurs biotiques (individu, population, communauté...) et abiotique (facteurs physico-chimiques) (Begon et *coll.*, 1996).

I-1-1- Les interactions entre les composants de l'écosystème

La nature d'une communauté microbienne est soumise à des fluctuations temporelles et spatiales qui correspondent à des phases de colonisation de nouveaux milieux ou de remplacement d'une communauté par une autre plus adaptée. Nous savons

qu'un grand nombre de facteurs peut modifier la composition de la communauté microbienne : la disponibilité en sources de carbone, d'énergie et en accepteurs d'électrons, la température, le pH, la teneur en eau ou encore la lumière.

Pour survivre et se propager, les microorganismes ont développé des adaptations structurales et nutritionnelles correspondant à différentes stratégies qui restent fonction des conditions physico-chimiques aux quelles ils sont exposés.

Aux facteurs extérieurs s'ajoutent les fortes interactions qui peuvent se produire au sein d'une population (coopération ou compétition) ou entre populations (synergie, symbiose et antagonisme).

I-1-2- L'habitat naturel

L'étude de l'habitat microbien est à mettre en rapport avec la taille du microorganisme (une distance de 3mm pour une cellule de 3 μ m, correspond à l'équivalent d'une distance de 2Km pour l'homme) (Begon et *coll.*, 1996). Même si les cellules seules n'existent pas ou très peu dans la nature (on parle de micro-colonies) des micro-environnements de l'ordre du millimètre peuvent être le siège de très fortes variations physico-chimiques (c'est le cas notamment dans les particules de sol). De plus les cellules colonisent souvent les surfaces sous forme d'un biofilm. Cette structure complexe permet aux microorganismes d'accéder plus facilement aux nutriments nécessaires à leur croissance et de les stocker (Amann et *coll.*, 1998).

L'étude des populations microbiennes dans leur environnement devra donc répondre aux questions de la composition, de la structure et de la fonction de cette population. Dans ce but, les premiers microbiologistes disposaient de méthodes fondées sur leur capacité à recréer le plus fidèlement possible les conditions de croissance *in situ*. Par la suite, le développement des techniques moléculaires a permis de s'affranchir partiellement des étapes de mise en culture.

I-2- Les méthodes classiques d'écologie microbienne

I-2-1- Les cultures d'enrichissement

La plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement. Cet isolement est précédé par une phase d'enrichissement qui va favoriser la croissance d'un type donné de microorganismes, sélectionné en fonction des conditions physiques et nutritionnelles du milieu.

I-2-2- L'isolement

A partir de l'enrichissement il est possible d'isoler des espèces pures. Pour ce faire on dispose de techniques classiques qui sont : l'isolement sur boîte, la dilution successive en milieu liquide ou dans l'agar. Pour chacune des méthodes plusieurs repiquages successifs des souches isolées sont nécessaires pour s'assurer de la pureté de l'isolat.

Une fois la souche isolée il convient de la caractériser, c'est-à-dire de définir les caractères phénotypiques et génotypiques qui permettront de la comparer avec d'autres microorganismes préalablement isolés. On réalise alors une taxonomie.

I-3- Approche taxonomique dans l'étude de la biodiversité d'un écosystème donné

La taxonomie microbienne a longtemps été considérée comme une discipline ingrate. A l'instar de la taxonomie des organismes supérieurs, elle était essentiellement fondée sur l'utilisation de clés dichotomiques successives. Or ces clés n'étaient pas d'un emploi simple et étaient de plus sources d'erreurs. Le développement de la taxonomie numérique et des approches polyphasiques dans les années 70 et aussi l'apparition de la taxonomie moléculaire (en particulier l'analyse de l'ARN ribosomique ou des gènes codant pour l'ARN_r (ADN_r) ont permis de redonner un véritable élan à cette discipline.

I-3-1- La taxonomie traditionnelle

Il est important de dire qu'il n'existe pas de consensus dans la classification des organismes vivants (Vandecasteele, 2008). Les biologistes sont dogmatiques en croyant

qu'il n'y qu'une seule manière correcte de classer les individus d'une population (Priest et *coll.*, 1993).

La microbiologie traditionnelle a établie une classification basée essentiellement sur une série de traits phénotypiques.

I-3-2- L'analyse phénotypique classique

Elle concerne la caractérisation a différents niveaux ; morphologique (cellulaire, coloniale), physiologique (pH, température de croissance, accepteurs finale d'électrons..) et biochimique (activités enzymatiques) (Vandecasteele, 2008).

Ces tests constituent la base d'une description formelle des taxons, des espèces et sous-espèces en remontant vers le genre et la famille. Pendant que l'information génotypique est utilisée pour répartir les taxons sur l'arbre phylogénétique, et pour dessiner les bordures d'un système de classification, la consistance phénotypique est requise pour générer un système de classification utile, et peuvent influencer la profondeur de la ligne hiérarchique (Vandamme et *coll.*, 1996).

I-3-3- La chimiotaxonomie

C'est l'analyse des constituants chimiques caractéristiques des cellules, comme les lipides et protéines cellulaires.

La comparaison des profils électrophorétiques des protéines cellulaires totales, obtenus par une SDS-PAGE hautement standardisée, a prouvé son extrême fiabilité pour comparer et grouper plusieurs souches étroitement liées.

De nombreuses études ont révélé une corrélation entre la haute similitude dans les profils protéiques des souches et hybridation ADN-ADN. L'utilisation de SDS-PAGE pour des buts d'identification généraux est gênée par le fait qu'elle rapporte seulement des informations distinctives au niveau ou au-dessous de l'espèce (Vandamme et *coll.*, 1996).

L'analyse de ces différents traits mène vers une classification phénétique comme celle décrite dans la 1^{ère} édition du «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» 1984-

1989 (Vandecasteele, 2008). Les données obtenues peuvent être organisées dans un système de clés dichotomiques.

I-3-4- La taxonomie numérique

Historiquement, la classification bactérienne commença par être subjective, certains caractères étant considérés comme importants par certaines écoles et pas par d'autres. La première approche objective fut la taxonomie numérique, bénéficiant des ordinateurs pour calculer la similitude entre les souches en donnant, *a priori*, un poids égal à chaque caractère phénotypique (Grimont, 2002). Les données sont codifiées par un système binaire, et les bases de données obtenues sont analysées par des logiciels informatiques spécifiques pour dessiner des clusters déterminant la distance entre les différents taxons.

I-3-5- La révolution phylogénétique

Grâce au développement des méthodes de biologie moléculaire et en particulier des techniques basées sur les molécules d'ARN ribosomiaux, les cultures ne constituent plus un préalable incontournable aux études de diversité (Alain, 2003).

Nous devons admettre que cette approche basée sur le principe évolutif est vitale et fascinante. En effet, pour comprendre les caractéristiques d'un organisme, on doit considérer sa position actuelle dans l'environnement ainsi que le processus évolutif par lequel il est passé (Vandecasteele, 2008). Cette étude permet d'ordonner les espèces bactériennes dans l'arbre phylogénétique du monde vivant (Grimont, 2002).

I-3-6- La taxonomie polyphasique

Parce que les résultats varient selon les données phylogéniques utilisées pour l'analyse, beaucoup de taxonomistes pensent qu'il faut employer toutes les données valables possibles pour établir la phylogénie (Prescott et *coll.*, 2003).

En conclusion, les microbiologistes disposent à ce jour d'un très large éventail de techniques classiques et modernes leur permettant d'appréhender les caractères phénotypiques et génotypiques d'un isolat. En couplant ces différentes approches, il leur

est possible d'établir les systèmes taxonomiques et de différencier les taxons (Alain, 2003).

I-4- Intérêt des biosurfactants dans la caractérisation

L'étude des biomolécules bactériennes, qu'elles soient intracellulaires ou extracellulaires est considérée comme méthode phénotypique mais qui rapportent des informations relatives aux gènes bactériens. De cette manière, elles peuvent être proposées comme un lien entre l'approche phénotypique et l'approche génotypique dans la taxonomie bactérienne, participant au criblage des souches sauvages, et leur attribution aux taxons. C'est le cas notamment des biosurfactants qui présentent l'intérêt d'être synthétisés par un nombre restreints de microorganismes, à différents taux, avec différentes natures chimiques, et appartenant à des classes variées. Un aperçu général sur ces biomolécules est présenté dans la partie II.

II- Microbiologie des sols pollués aux hydrocarbures

II-1- La composition chimique des polluants

Du fait de l'utilisation massive des produits pétroliers, les hydrocarbures constituent les polluants organiques les plus fréquents des sols (Vandecasteele, 2002).

La composition chimique des pétroles bruts varie énormément selon leur origine géographique et géologique. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables: 30 à 70 % d'hydrocarbures saturés (alcanes cycliques, chaînes de n-alcanes) 20 à 40 % d'hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (**BTEX** pour : Benzène, le Toluène, l'Ethylbenzène et le Xylène, et **HAP** pour: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, qui sont le Naphtalène, le Phénanthrène, le Pyrène ainsi que le Benzopyrène), 5 à 25 % de composés polaires et 0 à 10 % d'asphaltènes (Soltani, 2004, Shao, 2009).

II-2- La communauté microbienne indigène

Dans l'environnement, la dégradation de la matière organique n'est jamais assurée par un seul microorganisme, mais le plus souvent par une communauté microbienne. Cette dernière est constituée d'une collection de différentes populations occupant le même habitat et interagissant positivement ou négativement (Vandecasteele, 2008).

Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs microorganismes (bactéries, levures et moisissures) ont le pouvoir de dégrader les hydrocarbures au sein d'un consortium où chaque membre contribuait selon ces capacités enzymatiques.

Des recherches portant sur les bactéries isolées à partir de sites contaminés par les hydrocarbures (Kasai, 2002; Okoh, 2003; Okerentugba, 2003 ; Ojo, 2006; Emtiazi, Shakarami, 2004) ont montré la capacité des populations bactériennes natives à minéraliser le pétrole brut et ces produits raffinés (Sepahi et *coll.*, 2008) en CO₂, H₂O et biomasse, sous les conditions idéales (Celik et *coll.*, 2008).

II-3- Le mécanisme de biodégradation des hydrocarbures

Les hydrocarbures peuvent servir de sources de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne (Head et *coll.*, 2006, Shao, 2009) et vue leur large distribution dans l'espace et dans le temps, il n'est pas surprenant de trouver que les bactéries capables de les dégrader sont ubiquitaires (Shao, 2009).

Il y'a deux étapes dans le processus de biodégradation : la première est l'assimilation du substrat par la cellule et la seconde est le métabolisme du substrat. Quand la présence d'une voie métabolique appropriée est assumée, la dégradation peut se faire rapidement à condition que le substrat soit disponible sous une forme soluble dans l'eau. Or, les hydrocarbures sont insolubles donc ils vont former un système diphasique avec l'eau du sol (Maier et *coll.*, 2009).

II-3-1- Modes d'assimilation des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Il y'a quatre modes d'assimilation bactérienne de l'hydrocarbure liquide, soit :

- par l'utilisation de composés organiques préalablement solubilisés.
- par contact direct de la cellule avec le composé organique. Cela peut être facilité par des modifications cellulaires telles que la formation de fimbriae (Rosenberg et *coll.*, 1982, Maier et *coll.*, 2009) ou l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Zhang et *coll.*, 1994, Maier et *coll.*, 2009) qui favorise l'attachement de la cellule au composé organique.
- Par contact direct avec les microgouttelettes dispersées dans la phase aqueuse.
- une assimilation améliorée via la synthèse des biosurfactants, qui augmentent la solubilité des hydrocarbures dans l'eau, ou peuvent encore faciliter l'attachement des cellules aux hydrocarbures (Maier et *coll.*, 2009), et c'est ce mode de dégradation qui nous intéresse dans cette étude.

II-3-2- Métabolisme des hydrocarbures

Pour initier la biodégradation et permettre le déroulement des autres étapes, la molécule d'hydrocarbure doit être activée. La première étape dans la dégradation aérobie de ces composés est l'introduction dans le substrat d'un atome d'oxygène dérivé de l'oxygène moléculaire. Cette étape critique est effectuée par les oxygénases (Hayaishi et *coll.*, 1955, Ollivier et *coll.*, 2005).

Typiquement, les hydrocarbures sont hydroxylés à l'alcool primaire correspondant et seront plus loin oxydés par un alcool ou aldéhyde déshydrogénase. Les acides gras qui en résultent entrent en β -oxydation ou sont incorporés dans les lipides cellulaires. Des fois, la dégradation est complète, générant du CO₂, c'est le cas pour certaines bactéries et levures (Broadway et *coll.*, 1993, Sheller et *coll.*, 1998, Ollivier et *coll.*, 2005). Dans la dégradation anaérobie, l'accepteur final d'électrons est autre que l'O₂, du CO₂ par exemple. Le mécanisme d'activation initiale des molécules d'hydrocarbure implique soit une carboxylation, une méthylation, une hydroxylation, une déshydrogénation soit une réaction d'addition (fumarate surtout) (Singh et *coll.*, 2004).

II-4- Les biosurfactants

II-4-1- Définitions

Les surfactants (**SUR**Face **ACT**ive **Age**NTS) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al-Arajil et *coll.*, 2007).

Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système (Mulligan, 2009) et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures (Prommachan, 2002).

La tension superficielle de l'eau peut être réduite de 72 mN/m jusqu'à 27 mN/m en présence d'un surfactant, synthétique ou naturel (Christofi et *coll.*, 2002) mais cette capacité reste relative et varie d'un surfactant à un autre.

II-4-2- Structure et classification des biosurfactants

Il s'agit de molécules amphiphiles (Prommachan, 2002), constituées de deux pôles: un pôle hydrophile, qui peut être un ester, un hydroxyle, un phosphate, un carboxyle, ou encore un groupe d'hydrates de carbone et peut avoir une charge neutre ou négative, et un pôle hydrophobe qui est un acide gras (Maier, 2003, Marqués et *coll.*, 2009) hydroxylé, saturé ou insaturé, et peut être aussi un peptide (Banat, 1995).

Selon plusieurs auteurs (Kosaric et *coll.*, 1983, Rosenberg et *coll.*, 1993, Desai et *coll.*, 1997, Prommachan, 2002, Al-Arajil et *coll.*, 2007, Mulligan, 2009) les classes majeures de biosurfactants sont différenciées essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne (Tableau 1).

Tableau 1: Source microbienne et principaux types de biosurfactants (Desai et coll., 1997)

| Biosurfactant | Organisme | Référence(s) |
|---|--|---|
| Glycolipides : Rhamnolipides Trehalolipides Sophorolipides | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i> <i>Ustilago zaeae, U.maydis</i> | Guerra-Santos L. et coll., 1984, Robert M. et coll., 1989 Hisatsuka K. et coll., 1972, Lang S. et coll. 1987, Parra J. et coll. 1989 Rapp P. et coll., 1979 Margaritis A. et coll., 1979,1980, Cooper D.G. et coll., 1989 Cooper D.G. et coll., 1989, Gobbert U. et coll.1984 Hommel R. et coll., 1987, Tulloch P. et coll., 1967 Cooper D. G. et coll., 1983 Boothroyd, B. et coll. 1956, Sylmack, C. 1985 |
| Lipopeptides et lipoprotéines Peptides-lipides Serrawettine Viscosine Surfactine Subtilisine Gramicidines Polymyxines | <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>P. fluorescens</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. brevis</i> <i>B. polymyxa</i> | Javaheri, M. et coll., 1985, Yakimov, M. et coll., 1996 Matsuyama, T. et coll.1991 Neu, T. et coll., 1990 Arima, K. et coll., 1968, Bernheimer, A. W. et coll., 1970 Bernheimer, A. W. et coll., 1970 Marahiel, M. et coll., 1977 Suzuki, T. et coll., 1965 |
| Acide gras, lipides neutres et phospholipides Acide gras lipides neutre phospholipides | <i>Candida lepus</i> <i>N. erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> | Cooper D.G. et coll., 1989, Cooper D.G. et coll., 1978 MacDonald, C. R. et coll., 1981 Beeba, J. L. et coll., 1971 |
| Surfactants polymériques Emulsane Biodispersane Mannane-lipide-proteine Liposane Hydrates de carbone-proteine-lipide Proteine PA | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>C. lipolytica</i> <i>P. fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphis</i> <i>P. aeruginosa</i> | Rosenberg, E. et coll., 1979, Zosim, Z., 1982 Rosenberg, E. et coll., 1988 Kappeli, O. et coll., 1984 Cirigliano, M. C. et coll., 1984, 1985 Desai, A. J. et coll., 1988, Persson, A. et coll., 1988 Singh, M. et coll., 1989 Hisatsuka, K. et coll., 1972, 1977 |
| Biosurfactants particuliers Vesicles et fimbriae La cellule entière | <i>A. calcoaceticus</i> variété de bactéries | Gutnick, D. L. et coll., 1987, Kappeli, O. et coll., 1979 Fattom, A. et coll., 1985, Roggiani, M. et coll., 1993 |

II-4-3- Biosynthèse et rôle physiologique

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficace (Pruthi et coll., 1995). Selon Adamson (1990), la présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles (Krepesky et coll., 2007).

Cameotra (2009) explique ce phénomène comme étant l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats hydrophobes, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau.

En effet, ces bactéries synthétisent les biosurfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et *coll.*, 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Al-Arajil et *coll.*, 2007).

Il est intéressant de savoir aussi que les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas dans le sol comme polluants, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par les mêmes microorganismes prédominants, comme l'a révélé l'étude de Dashti et ses collaborateurs en 2008.

Cependant, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T. bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

II-4-4- Rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures

Il existe une relation claire entre l'activité d'émulsification, l'adhérence des cellules à l'hydrocarbure, et le taux de croissance des isolats sur le pétrole brut (Mehdi et *coll.*, 2008).

Une étude très récente sur des bactéries (*Pseudomonas sp.*) capables de dégrader le n-héxadecane en produisant des biosurfactants était faite par Cameotra et ses collaborateurs (2009) pour élucider ce mécanisme.

En présence de n-héxadecane dans le milieu de culture, les bactéries secrètent des substances qui forment un réseau de projections extracellulaires reliant les cellules les unes aux autres. Ce réseau est supposé être un complexe de biosurfactants et d'alcane qui forme un site d'ancrage des cellules et un moyen de transport

d'hydrocarbures à leur surface cellulaire. Le biosurfactant disperse l'héxadécane en petites gouttelettes, et forme une couche autour de chacune, augmentant ainsi sa disponibilité aux organismes dégradants (Figure 1).

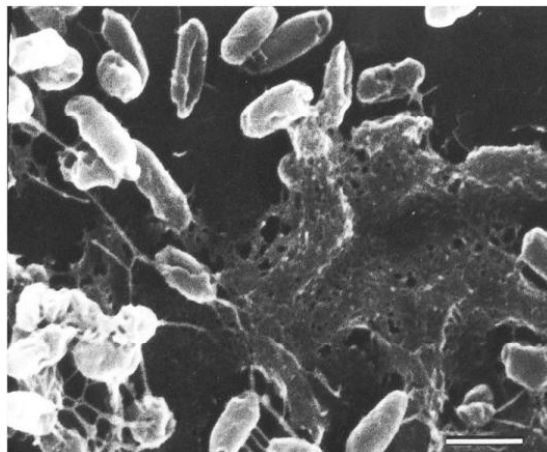


Figure 1- Observation sous microscope électronique du réseau formé par la souche *Pseudomonas sp.* SSC2 cultivé sur 2% de n-hexadécane (S. S. Cameotra et coll., 2009)

L'étude ultra-structurale a montré qu'un processus semblable à la pinocytose active prend place pour la pénétration des gouttelettes d'hydrocarbure à l'intérieur de la cellule bactérienne (Figure 2).

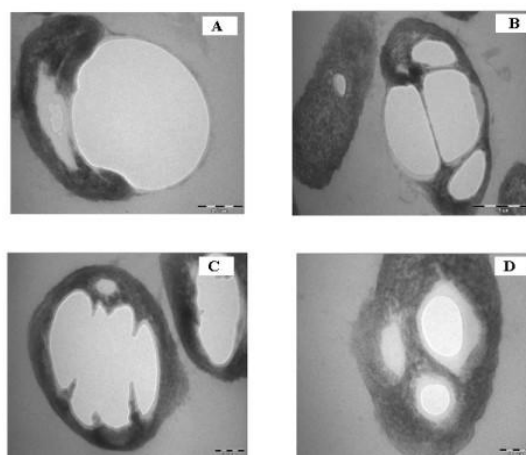


Figure 2- Observation sous microscope électronique à transmission de gouttelettes d'héxadécane englouties par la souche *Pseudomonas sp.* SSC2, Morgagni TEM (S. S. Cameotra et coll., 2009).

II-4-5- Potentiels des biosurfactants

Les biosurfactants peuvent être aussi efficaces et plus avantageux que les surfactants synthétiques. Ils sont hautement spécifiques, biodégradables, biocompatibles avec l'environnement (Mulligan, 2009), moins sensibles aux biotopes de températures, pH et salinité extrêmes (Suwansukho et *coll.*, 2008), moins toxiques et peuvent être synthétisés en grandes quantités, sur des sources d'énergie coûteuses, comme les produits pétroliers (Sarubbo et *coll.*, 2006), mais aussi sur des ressources renouvelables.

Un autre avantage des biosurfactants, est la possibilité de leur modification par biotransformation à fin de générer de nouveaux produits pour des besoins spécifiques (Samadi et *coll.*, 2007). Avec l'introduction de certains groupements fonctionnels, les biosurfactants fournissent de nouvelles propriétés, surpassant ainsi les surfactants chimiques dans beaucoup d'applications (Huang et *coll.*, 2010).

Ces biomolécules présentent une large gamme de propriétés fonctionnelles qui permettent leur exploitation dans divers domaines (Prommachan, 2002). Cependant, il n'est pas facile de rationaliser la différence entre leurs rôles naturels et nos applications (Cameotra et *coll.*, 2004; Hamme et *coll.*, 2006, Marqués et *coll.*, 2009).

Leur capacité à modifier les propriétés interfaciales et leur auto-assemblage en micelles ou autres nanostructures est cruciale pour plusieurs processus industriels tels que la formation de couches, la diffusion, la formation de mousse, la détergence, la catalyse micellaire, etc. (Xiaoyang et *coll.*, 2009).

Ces biomolécules peuvent aussi induire la formation d'émulsion, la séparation de phases, la solubilisation, le mouillage, la réduction de viscosité (Ochsner et *coll.*, 1995), la floculation, l'agrégation, la désorption (Karanth et *coll.*, 1999) ainsi que la stabilisation et la déstabilisation d'émulsions (Huang et *coll.*, 2010).

II-4-6- Les différentes applications des biosurfactants

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les biosurfactants sont aujourd'hui utilisés dans différents domaines d'application tels que :

- la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds (Tableau 2), (Raza et *coll.*, 2007) et dans le traitement des eaux usées (Samadi et *coll.*, 2007).

Tableau 2 : Composés chimiques éliminés par biodégradation bactérienne (Mulligan, 2009).

| Composés éliminés par voie bactérienne | Références bibliographiques |
|--|--|
| Composés organiques Phénanthrène Styrène Polychlorobiphényle Pétrole Brut (Heavy, Light) Gaz-Oil Diesel 4-Chlorophenol (4-CP) Perchloroethylene (PCE) | H. Yin et <i>coll.</i> , 2008 Y. Guo et <i>coll.</i> , 2006 Occulti et <i>coll.</i> , 2008 Vasefy et <i>coll.</i> , 2008, Mehdi et <i>coll.</i> , 2008 Li et <i>coll.</i> , 2006 L.-M. Whang et <i>coll.</i> , 2008 A. Uysal et <i>coll.</i> , 2007 J.S. Clifford et <i>coll.</i> , 2007 |
| Métaux lourds Cadmium Plomb Zinc Copper, et Nickel Chromium hexavalent Arsenic Phenanthrene mélangé au Cadmium | Juwarkar et <i>coll.</i> , 2007, Asci et <i>coll.</i> , 2007 Juwarkar et <i>coll.</i> , 2007, J. Kim et <i>coll.</i> , 2006 B. Dahrazma et <i>coll.</i> , 2007, Asci et <i>coll.</i> , 2007 B. Dahrazma et <i>coll.</i> , 2007, W.-J. Chen et <i>coll.</i> , 2008 H. Massara et <i>coll.</i> , 2007 Wang and et <i>coll.</i> , 2009 S. Song et <i>coll.</i> , 2008 |

- l'industrie pétrolière, et particulièrement dans l'amélioration de récupération transport dans les pipelines et dans les opérations de nettoyage des bacs de stockage du pétrole (Banat, 1995, Meylheuc et *coll.*, 2001).
- l'agriculture, jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation de ces zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) (Hultberg et *coll.*, 2008).
- l'industrie alimentaire, comme additifs alimentaires, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie (Prommachan, 2002).
- l'industrie du cosmétique (Suwansukho et *coll.*, 2008) et dans les procédés de teinture du textile (Savarino et *coll.*, 2009).
- l'industrie pharmaceutique, comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour combattre les différentes maladies infectieuses (Rodrigues et *coll.*, 2006).
- le secteur de haute technologie comme l'impression électronique, l'enregistrement magnétique, la micro-électronique (Marqués et *coll.*, 2009) ainsi que dans les nanotechnologies, tel que la fabrication des nanoparticules d'argent ou les tiges de NiO, etc. (Mulligan, 2009).

I- Réalisation de l'échantillonnage

I-1- Description du site

L' échantillon est du type solide, c'est un sol contaminé par des hydrocarbures, particulièrement du pétrole brut, prélevé à différents endroits autour de trois bacs de stockage (le 108, le 102 et le R) au niveau du service d'exploitation dans la raffinerie de SONATRACH à SKIKDA. Ces bacs ont été construits en 1971(par la CMP France). Leur diamètre est de 66,75 m, la hauteur est égale à 14,64 m avec une capacité de stockage de 51200 m³ de pétrole brut.

I-2- Stratégie de l'échantillonnage

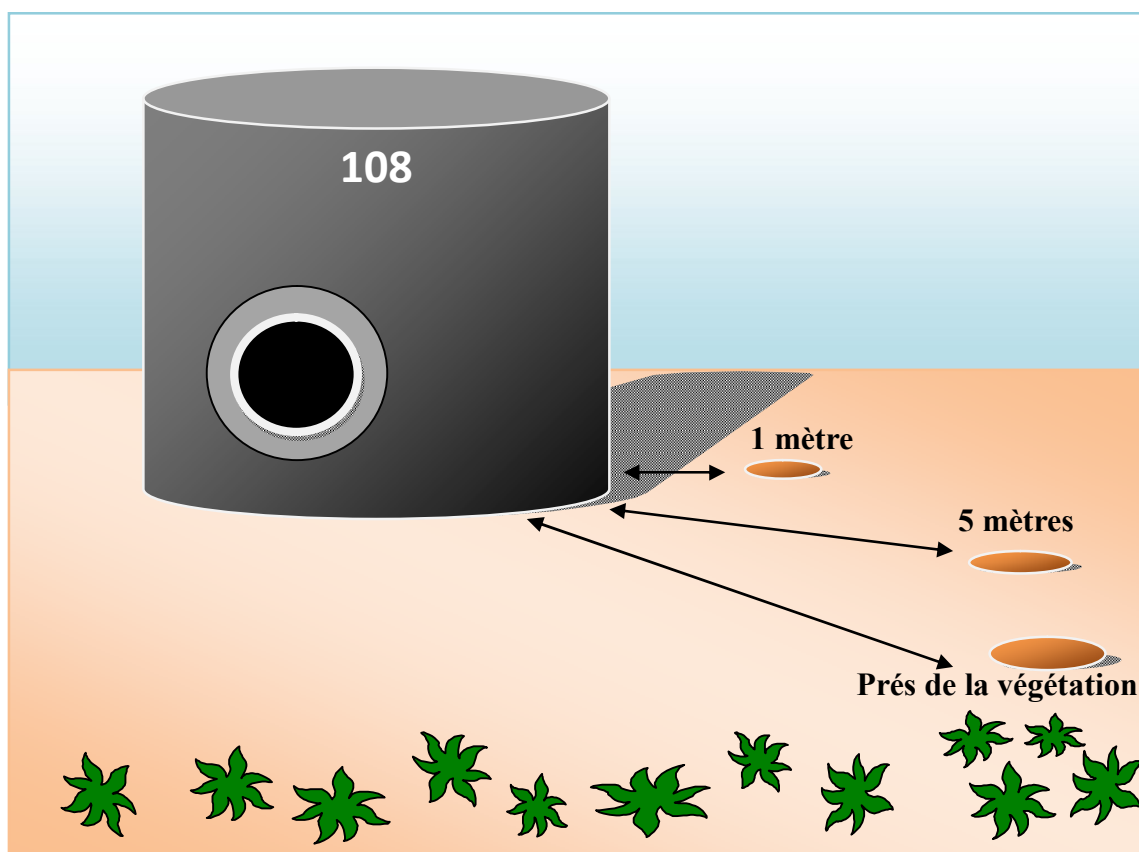


Figure 3- Stratégie du prélèvement des échantillons de sol contaminés.

Sur la (figure 3), on peut voir que le prélèvement est fait à trois distances du bac et à différentes profondeurs:

- à distance de 1m et profondeur de 5cm.
- à distance de 5m et profondeur de 10cm.
- près de la végétation qui pousse autour des bacs et à 5cm de profondeur.

La stratégie est conçue de cette manière dans l'esprit de faire varier les échantillons prélevés. Nous avons prélevé le sol à différentes distances du bac de stockage à fin d'étudier l'influence de la concentration des hydrocarbures sur la population microbienne et à des profondeurs déterminées pour pouvoir mettre en culture les bactéries aérobies ou aérobies anaérobies facultatives et éviter les anaérobies qui sont trop exigeantes en terme de conditions de culture.

L'échantillon est prélevé de manière à conserver au maximum la flore autochtone d'une contamination quelconque. La terre est creusée à l'endroit précis en utilisant une pioche propre, et avec une spatule stérile, nous remplissons un flacon stérile de sol. La spatule est lavée à l'eau de javel et séchée à l'aide d'une compresse stérile avant de prélever le deuxième échantillon.

I-3- Caractéristiques du sol

La couleur, la texture et la structure ainsi que le pH du sol sont appréciés au niveau du laboratoire. Nous observons les échantillons pour décrire les caractéristiques physiques du sol. Nous mesurons le pH des différents échantillons à partir des solutions préparées selon la méthode décrite par Mathieu et ces collaborateurs (2003) :

- Sécher la terre à 40°C et peser 20g dans un bécher.
- Ajouter 50mL d'eau déminéralisée et agiter une minute.
- Laisser reposer 2h.
- Effectuer la mesure en plongeant l'électrode du pH mètre dans le liquide surnageant.
- laisser la lecture se stabiliser durant plusieurs secondes et noter les valeurs.

II- Isolement et purification des souches bactériennes

II-1- Matériel

Pour la dilution des échantillons, nous avons besoin d'eau physiologique stérile, de tubes stériles, d'un vortex et d'une micropipette.

Pour l'ensemencement nous utilisons des boîtes de Pétri contenant les deux milieux spécifiques M1 (Zajic 1977) et M2 (Margaritis et *coll.*, 1979) solides, dont la composition est la suivante :

Le milieu M₁ contient: 5g K₂HPO₄, 2g KH₂PO₄, 2g MgSO₄, 0.1g NaCl, 3g extrait de levure, 5g NaNO₃, 15g de Glucose, 15g agar, 1000mL d'eau distillée et 20mL de kérosène. Son pH est ajusté à 6.5.

Le milieu M₂ est composé de: 2g NH₄Cl, 0.1g KCl, 1g K₂HPO₄, 0.01g CaCl₂, 0.5g KH₂PO₄, 0.01g FeSO₄7H₂O, 0.5g MgSO₄7H₂O, 1g extrait de levure, 15g agar, 1000mL eau distillée et 20mL de kérosène. Le pH est ajusté à 6.5.

Pour la purification nous utilisons aussi les milieux M1et M2 sous forme de liquide contenus dans des tubes stériles, et sous forme solide dans des boîtes de Pétri.

II-2- La dilution

Seulement deux des neufs échantillons prélevés ont fait l'objet d'une investigation et ont donné lieu à un travail laborieux qui a duré environ neuf mois. Pour isoler les souches bactériennes, il faut procéder par des dilutions décimales à partir des deux solutions mères du sol préparées, comme c'est expliqué sur la Figure 5.

II-3- L'isolement

Une öse de chaque dilution préparée estensemencée par étalement sur les deux milieux de culture solides synthétiques M₁ et M₂. Le milieu M₁ est un milieu qui sert à isoler les bactéries productrices de biosurfactants. Il contient comme source de carbone le glucose et le kérosène. Le glucose étant le substrat préférentiel d'une large gamme de bactéries, donc sera la première source à utiliser permettant ainsi l'obtention d'une biomasse bactérienne, mais une fois consommé, il ne reste que le kérosène comme source de carbone pour les bactéries capables de le dégrader.

Le milieu M₂ est un milieu d'appoint utilisé en parallèle avec le M₁ pour permettre de mieux observer les souches puisqu'il est d'un aspect et de couleur claire comparé à M₁ et pour confirmer la capacité des bactéries à utiliser le kérosène comme unique source de carbone.

L'ensemencement se fait par stries en surface et les boîtes sont incubées pendant 18 - 24h à 30°C.

II-4- La purification

C'est une étape très importante et très délicate, qui demande beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre le reste de travail taxonomique.

Après le premier ensemencement sur boîte de Pétri, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée à part dans un milieu liquide. Les tubes ensemencés seront incubés 18 à 24h à 30°C. La purification des souches se fait par des passages successifs et alternés en milieu liquide, puis en milieu solide jusqu'à l'obtention au sein d'une boîte de Pétri de colonies identiques par l'aspect et la couleur. Après plusieurs passages sur milieu gélosé, la souche est en général purifiée et nous procédons au test d'émulsification.

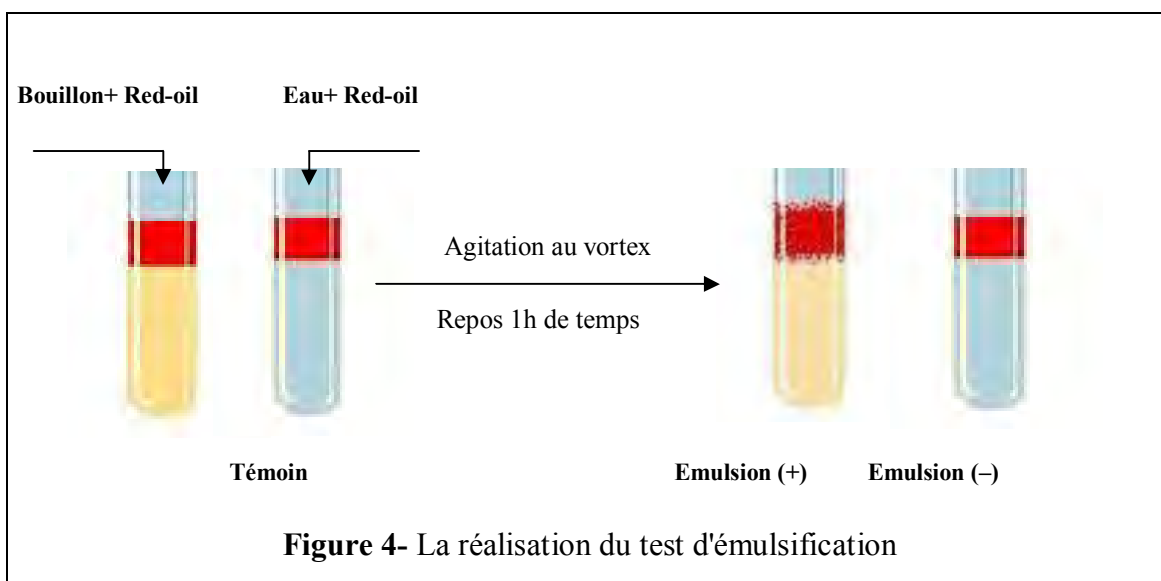
III-Sélection des souches productrices de biosurfactants

III-1- Matériel

Nous avons besoin de tubes à essai stériles, de micropipette, de vortex, des bouillons de 24h des souches à tester et de la solution de révélation (Annexe 1).

III-2- Test d'émulsification

Pour mettre en évidence la production bactérienne de biosurfactants, nous effectuons un test qualitatif nommé test d'émulsification, à partir des pré-cultures sur le milieu (M1) contenant 2% de kérosène, voir les différentes étapes sur la figure 4.



Ce test consiste à colorer le kérosène avec un colorant rouge lysochrome (soluble dans l'huile, Oil red O) à fin de distinguer les deux phases: kérosène et bouillon ensemencé. Dans un tube à essai, on met 1.5ml de kérosène coloré et 3.5ml de moût de fermentation. La solution obtenue est agitée au vortex pendant 3 minutes à la vitesse maximale, puis nous la laissons reposer pendant une heure de temps. La qualité d'émulsion est estimée à l'œil nu par comparaison à un témoin ou le moût de fermentation est remplacé par de l'eau distillée (J. E. Zajic et *coll.*, 1977).

III-3- Index d'émulsion

À fin d'estimer l'activité d'émulsification, nous pouvons calculer une valeur appelée index d'émulsion ou E24. Nous ajoutons 3mL de kérosène coloré à 3mL de mout de fermentation. Le tout est vortexé à la vitesse maximale pendant 2 minutes. Les mesures sont prises 24h après (D. G. Cooper et *coll.*, 1987). L'index d'émulsion représente la hauteur de l'émulsion formé (H_e) divisée par la hauteur totale du liquide dans le tube (H_t) multipliée par 100 :

$$E24 = (H_e / H_t) .100$$

III-4- Conservation des souches sélectionnées

Après avoir sélectionné les souches bactériennes capables d'utiliser le kérosène comme source de carbone, en produisant les biosurfactants, nous passons à leur conservation en tubes sur gélose incliné contenant un milieu possédant la même composition en sels que le milieu M₁ et additionné de (1%) de fructose. La conservation des tubes se fait dans un frigo à 4°C.

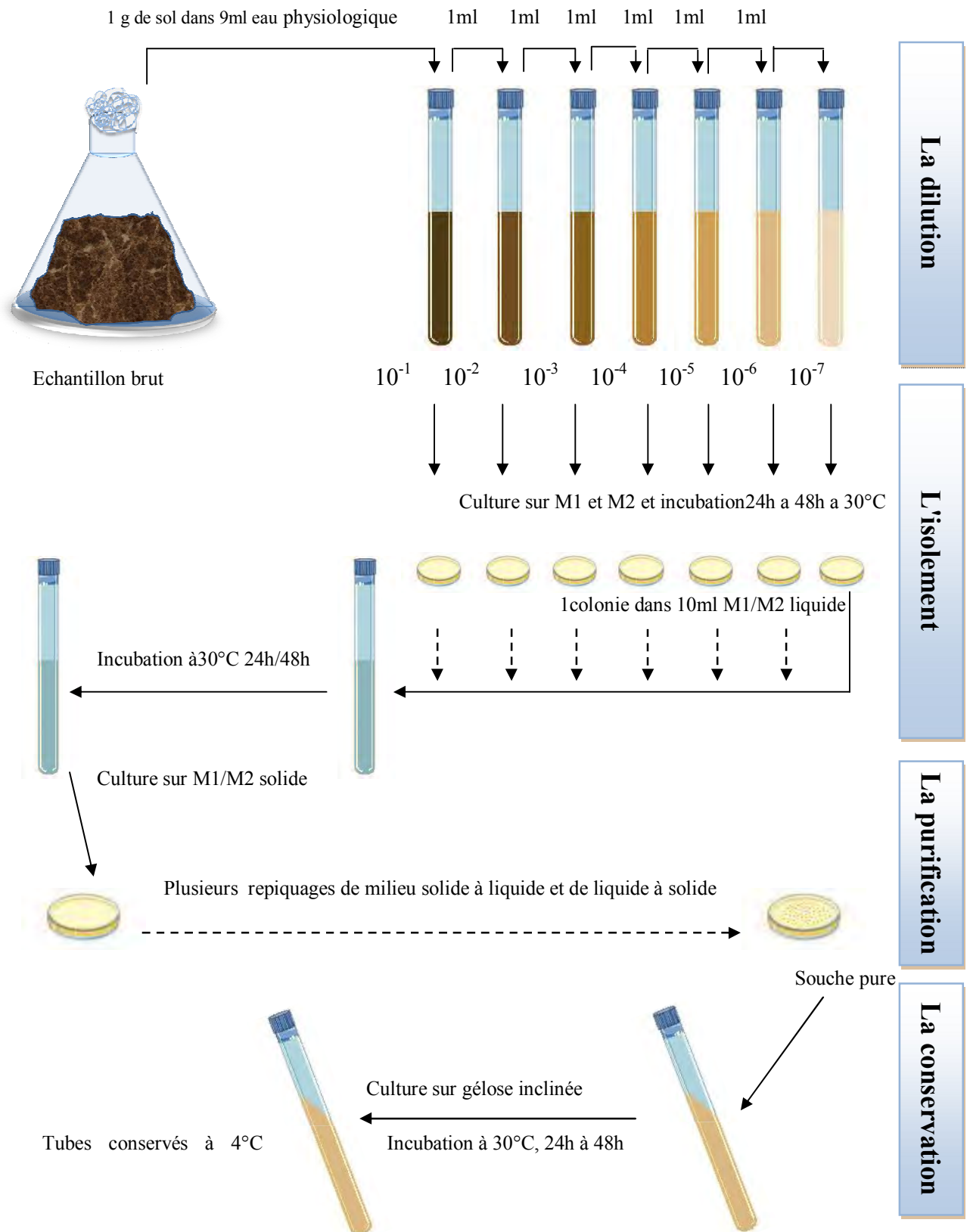


Figure 5- Schéma générale d'isolement et de purification des souches bactériennes contenues dans les prélèvements de sol.

IV- Caractérisation phénotypique des souches sélectionnées

Pour s'orienter pendant l'identification des 16 isolats, il faut exploiter les caractères de différenciation des genres bactériens. Le choix de tests biochimiques à effectuer est fait en se basant sur les observations des bactéries à l'état frais et le Gram, ainsi que sur la catalase. D'autres caractères propres à certaines espèces bactériennes sont recherchés sur des milieux spécifiques. L'établissement de profils électrophorétiques des protéines cellulaires totales par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes était d'un grand intérêt puisque ça reste caractéristique de chaque souche, donc comparer ces profils donnera une idée sur la phylogénie de l'ensemble des espèces étudiées. Le parcours de la caractérisation est démontré sur la figure 6. Deux souches de références issues de la collection de notre laboratoire sont utilisées: Hs1 et Hca1 identifiées et répertoriées en tant que *Pseudomonas aeruginosa*.

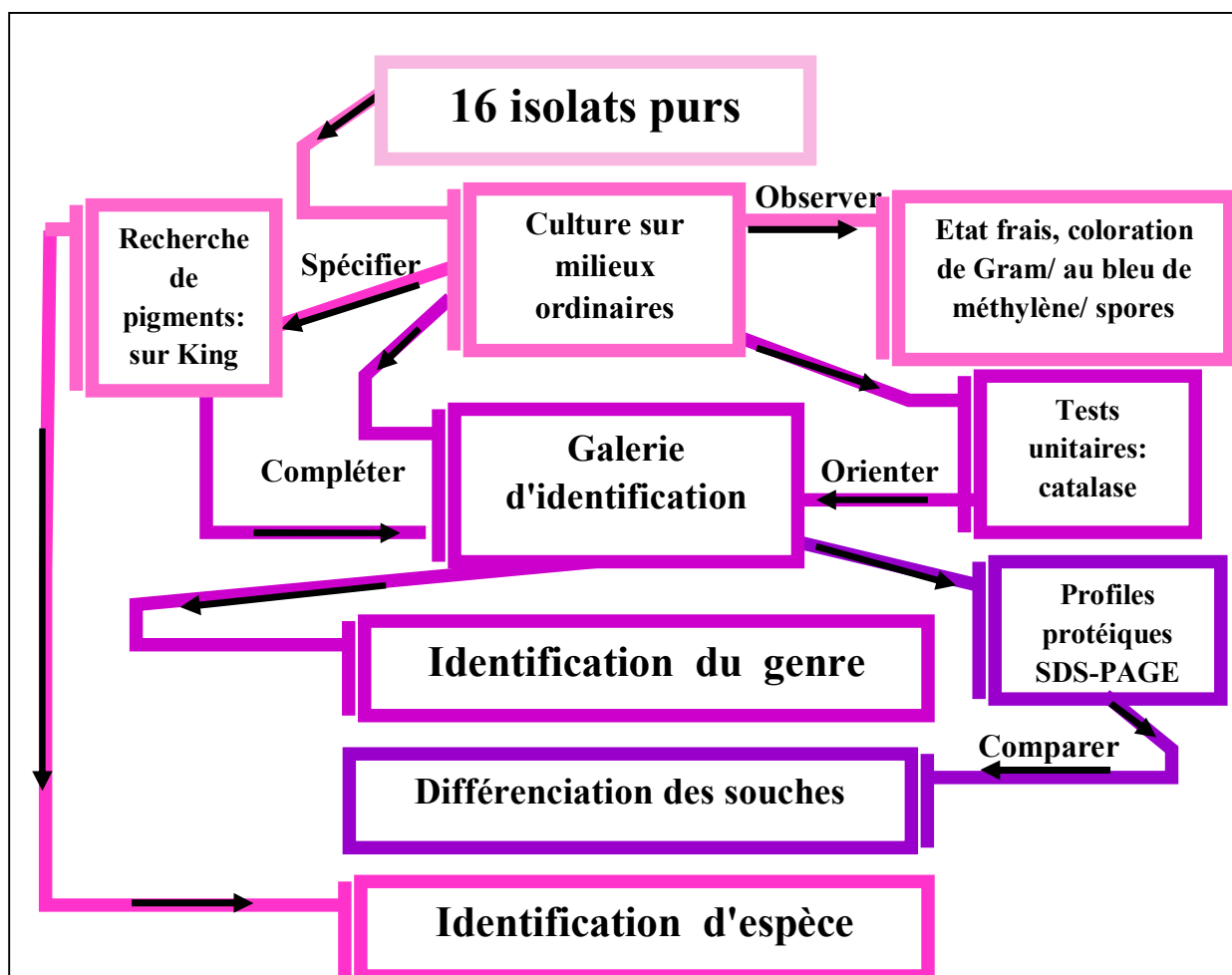


Figure 6- Démarche suivie pour identifier les 16 souches bactériennes.

IV-1- Caractères morphologiques

IV-1-1- Observation macroscopique

L'observation des colonies peut être d'un grand intérêt taxonomique lorsque la culture est faite sur des milieux spécifiques faisant apparaître certains caractères propres aux espèces ex: la production de pigment. Or, ici, c'est une description directe faite sur boîtes d'isolement, permettant au moins une distinction des souches les unes des autres à fin de les purifier.

IV-1-2- Observation microscopique

Nous faisons une observation microscopique des bactéries à l'état frais, pour voir leur mobilité. La taille, la forme et le type de regroupement des cellules bactériennes sont appréciés après coloration au bleu de méthylène.

Pour vérifier la pureté des isolats et s'orienter dans le diagnostique, nous utilisons la coloration de Gram. Pour voir si les bactéries possèdent des spores nous faisons une coloration au vert de Malachite.

IV-2- Caractères biochimiques et physiologiques

IV-2-1- Conditions physico-chimiques de croissance

Un test de croissance à différentes températures : 4°C, 30°C, 45°C et 52°C est réalisé sur le milieu M₁, dans le but de déterminer les températures optimales pour chaque isolat et voir à quel groupe appartiennent ces bactéries ; psychrophiles, mésophiles ou thermophiles. Cela permet de choisir la température convenable à l'incubation des différents milieux par la suite.

Le choix de pH du milieu de culture est relatif à celui mesuré à partir des solutions du sol à fin de créer les mêmes conditions que celles *in vivo*.

IV-2-2- L'étude du métabolisme respiratoire

À fin d'étudier le métabolisme respiratoire, nous effectuons les tests suivants : recherche du type respiratoire sur milieu VF (viande-foie), test de catalase, et test de nitrate réductase sur bouillon nitrate, et normalement le test d'oxydase qui est indisponible.

IV-2-3- Le métabolisme glucidique

Le métabolisme des glucides est dévoilé par l'utilisation de milieux de culture contenant un ou plusieurs glucides comme source de carbone et d'énergie. Les milieux utilisés sont respectivement : M1 pour auxanogramme de carbone, milieu Hajna-Kligler ou milieu TSI (tri sugar iron), disques d'ONPG-hydrolase, milieu mannitol-mobilité-nitrate, gélose à l'amidon, bouillon Clark et Lubs pour l'étude des dérivés d'acide pyruvique.

L'auxanogramme du carbone détermine la gamme des glucides utilisés par nos bactéries. En pratique, nous utilisons le milieu M1 fournissant tous les micronutriments nécessaires à son développement (ions minéraux, facteurs de croissance), à l'exception de source de carbone, qui sera rajoutée sous forme d'un seul glucide (ou dérivé) à 1% (Joffin et *coll.*, 2006).

Les glucides utilisés sont soit des diholosides: saccharose, lactose et maltose, soit des hexoses: glucose (= dextrose), fructose (= lévulose), galactose et mannose, soit des pentoses : xylose et arabinose ou bien des polyalcools parfois dérivés d'oses comme le glycérol (=glycérine, dérivé du dihydroxyacetone phosphate DHAP), le mannitol (dérivé du fructose), le sorbitol (dérivé du glucose), l'inositol (polyalcool dérivé du cyclohexane).

IV-2-4- Le métabolisme d'acides organique

Les acides organiques (ou anions correspondants) sont des sources de carbone possibles pour de nombreux microorganismes. Nous testons l'utilisation de citrate sur milieu citrate de Simmons et d'acide acétique sur le milieu M₁ additionné de ce dernier comme seule source de carbone.

IV-2-5- Le métabolisme protéique

Les enzymes qui permettent la dégradation de composés protéiques, de polypeptides ou d'acides aminés sont recherchées sur des milieux spécifiques. En pratique nous recherchons la gélatinase sur la gélose à la gélatine nutritive, l'ADH (Argénine dihydrogénase), l'LDC (Lysine décarboxylase), l'ODC (Ornithine décarboxylase) sur milieu de Falkow, uréase et tryptophanase sur milieu urée-indole, les acides aminés soufrés sur le milieu Kligler.

IV-2-6- Le métabolisme des lipides

Le jaune d'œuf, substrat complexe est composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine. Il permet donc de chercher les trois enzymes: la lécithinase, la lipase et les lipoprotéases. (C. Delarras, 2007). On s'intéresse à chercher uniquement la lécithinase.

Avant de lancer ce test, une émulsion de jaune d'œuf est préparée en mettant stérilement à quantités égales, le jaune d'œuf et l'eau physiologique. Par la suite, nous ensemençons sur une gélose ordinaire une goutte de cette émulsion pour tester la stérilité du jaune d'œuf (Joffin et *coll.*, 2006).



Photographie 1- La préparation de suspension de jaune d'œuf.

Pour confectionner la gélose à l'œuf, 1.5ml de la suspension est déposé au fond de la boîte de pétri, et la gélose en surfusion (refroidie à 45°C) est coulée sur le jaune d'œuf. Avec un mouvement rotatoire de la boîte, nous homogénéisons le mélange et nous le laissons sécher puis nous ensemençons par touche une goutte de la souche en bouillon. La lecture peut se faire à partir de 24h d'incubation.

IV-2-7- Les milieux sélectifs

Des milieux sélectifs sont employés pour mettre en évidence certains caractères propres aux espèces. Le King A et King B sont deux milieux sélectifs, destinés à

l'isolement et la différenciation des *Pseudomonas* fluorescents (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) grâce à la production de pigments spécifiques.

La gélose S-S est un milieu sélectif qui ne permet que la croissance des bactéries à Gram négatif. Il est utilisé pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella*, mais il peut laisser pousser *Pseudomonas* et *Yersinia enterocolitica*. Les coliformes et les germes à Gram positif, sont inhibés par un mélange de sels biliaries. Toute fois, on peut rencontrer des *Entérocoques*, tout particulièrement pour certaines compositions.

NB : L'incubation des différents tests se fait à 30°C, la durée est cependant fonction du test variant de 24h à 7 jours.

V- Caractérisation chimiotaxonomiques

La composition protéique d'une cellule bactérienne est tellement variée qu'elle fait l'objet d'étude biochimique lors de la caractérisation de souches bactériennes inconnues.

Comme toutes molécules chargées, les protéines peuvent se mouvoir dans un champ électrique. Cette charge provient des groupements ionisables des chaînes latérales de certains acides aminés composant la protéine. On peut donc se servir de l'électrophorèse pour les séparer (D. Gauthier, 2004).

La technique employée est une électrophorèse des protéines cellulaires totales sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), décrite par Ulrich Laemmli en 1970.

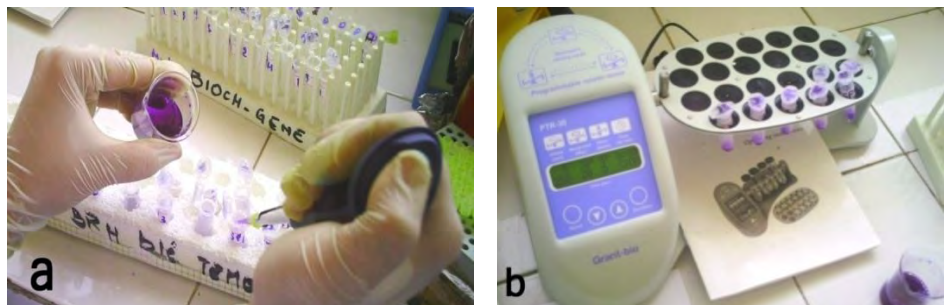
L'SDS-PAGE est très sensible et donne surtout des informations sur l'analogie des souches qui se trouvent dans les mêmes genres, espèces ou sous-espèces (Ndiaye et coll., 2002). En effet, deux profils électrophorétiques similaires ou identiques reflètent la ressemblance des génomes bactériens et donc le degré de parenté entre les souches comparées qui sont alors proches ou analogues.

Le protocole expérimental suivi est décrit brièvement en quatre étapes :

V-1- Préparation des extraits protéiques

Un volume de 100 µl de chaque suspension (bouillon ensemencé M1 de 24h) est transféré dans des tubes Eppendorfs et centrifugé à une vitesse de 7000 tours/min pendant 15min à 4°C.

Les culots récupérés sont traités avec 50 μ l de tampon de lyse (Annexe 2) contenant un détergent anionique, le SDS et un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol (β ME). Le mélange est agité pendant 30min puis traité à la chaleur (90-100°C) pour accélérer les réactions de dénaturation des protéines par l' SDS et le β ME.

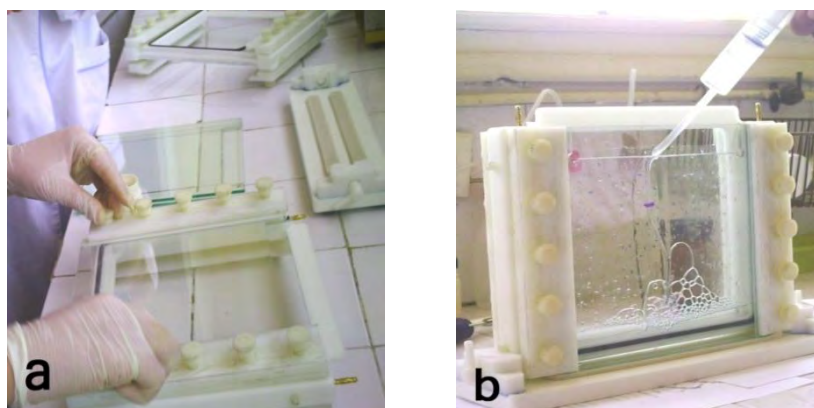


Photographie 2- (a) Addition de tampon de lyse aux culots, (b) Agitation automatique.

V-2- Préparation du gel

Les deux gels sont préparés en utilisant des mélanges de solutions mères d'acrylamide, de tampon de gel de séparation (TGS) et de tampon de gel de tassement (TGT) (Annexe 2). On verse immédiatement le gel de séparation dans le moule formé par deux plaques de verre. Le deuxième gel est coulé et un peigne de 15 puits est enchâssé sur ce dernier.

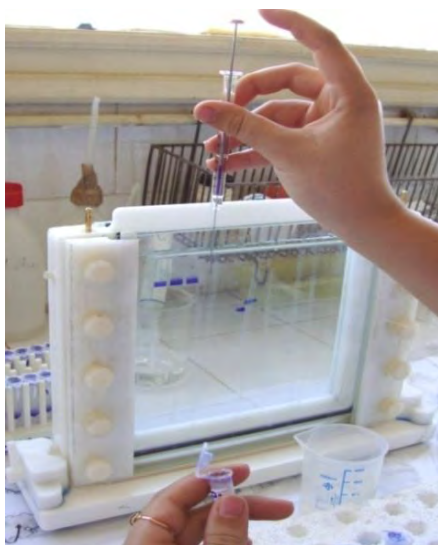
Le gel réticulé est obtenu après polymérisation, initiée par la formation de radicaux libres grâce au persulfate d'ammonium et catalysée par le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane – qui est toxique). Le peigne est retiré pour former des puits et le tampon de migration est versé sur les puits à fin de stabiliser les échantillons déposés par la suite. (D. Gauthier, 2004).



Photographie 3- (a) Montage des plaques sur le support (b) versement du gel entre les plaques.

V-3- Le dépôt

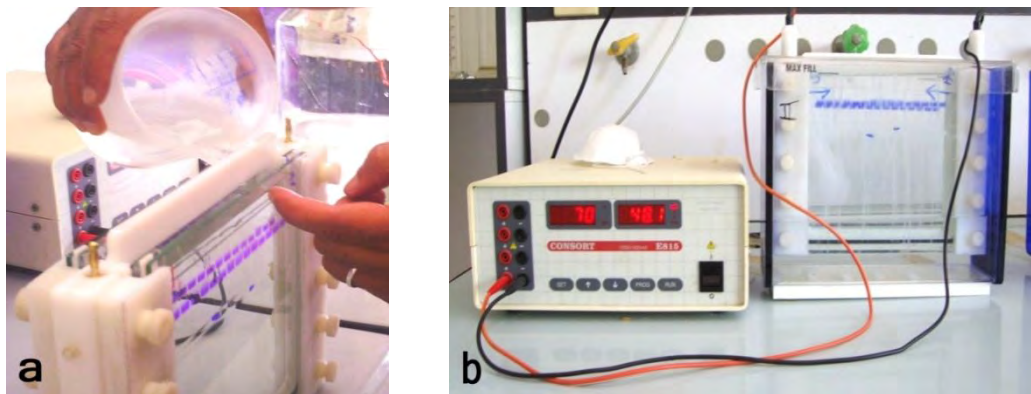
Des volumes de 20 μ l des échantillons sont déposés séparément dans les puits du gel de concentration et les quatre plaques sont renversées pour remplir de tampon de migration le bac supérieur, qui sert de support à ces plaques, à fin de laisser passer le courant électrique.



Photographie 4- Le dépôt des protéines bactériennes dans les puits du gel de concentration.

V-4- La migration

Le bac supérieur est déposé dans un bac inférieur contenant le même tampon de migration. Il est relié à un générateur du courant permettant la migration des protéines. On règle le courant à un ampérage de (80mA) et un voltage de (500V) et on fait migrer nos protéines pendant toute une nuit (24h) dans ces conditions en présence d'un cryothermostat qui refroidi le circuit s'il est chauffé à fin d'éviter la modification du gel électrophorétique.



Photographie 5- (a) Remplissage du bac supérieur par le tampon de migration, (b) Lancement de la migration.

V-5- La révélation

Le gel est démoulé, et le gel de concentration est éliminé. La façon la plus simple pour visualiser le patron de migration des protéines est de les colorer après leur fixation dans les mailles du gel pour qu'elles ne diffusent plus. Le gel est transféré dans la solution de coloration (Annexe 2) dans un bac en agitation pendant 24h. Cela permet de fixer les protéines grâce à l'acide trichloroacétique en même temps qu'on les colore au bleu de Coomassie R-250, en présence de méthanol. À la fin, le gel est décoloré par lavage à l'eau de robinet 2 à 3 fois, pour obtenir un gel transparent avec les bandes de protéines colorées en bleu.



Photographie 6- L'étape de la décoloration du gel

I- Caractéristiques du sol prélevé

L'observation des prélèvements de sol, montre que la couleur et la texture diffèrent d'un échantillon à un autre, rapportées dans le tableau 3. Le premier échantillon prélevé à une distance de 1m du bac est de couleur noire et d'une texture agrégée, compacte et humide, tandis que le deuxième, prélevé à 5m du bac est de couleur cuivre et de texture sableuse.

Les échantillons contiennent probablement des concentrations différentes de pétrole. Logiquement, plus nous nous approchons du bac de stockage, plus la terre est saturée par le pétrole, chose qui explique la couleur et la texture du premier échantillon.

La mesure du pH au niveau du laboratoire montre des valeurs faiblement alcalines, proches de la neutralité.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de sol

| Echantillon | pH | Couleur | Texture |
|--------------------|-----------|----------------|----------------|
| Sol 1 | 8.05 | Noire | Agrégats |
| Sol 2 | 7.96 | Jaunâtre | Sableuse |

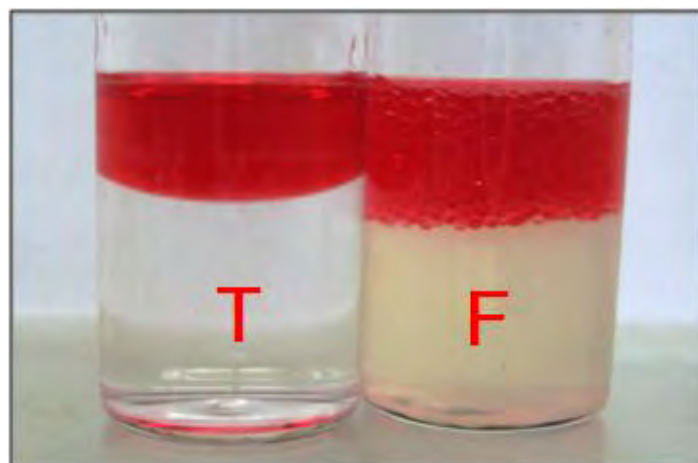
II- Sélection des souches productrices de biosurfactants

La mise en culture des bactéries contenues dans ce type de sol, sur un milieu minéral additionné de glucose et de 2% de kérosène comme source de carbone, nous a permis d'isoler 112 souches.

Lorsque ces souches sont soumises à l'estimation qualitative de production de biosurfactants par le test d'émulsification (voir la photographie 7), 16 d'entre elles montrent une production, avec des différences dans le taux et dans le type d'émulsion obtenus. Les résultats sont rapportés sur le Tableau 4.

Tableau 4 : Qualité et index d'émulsion obtenus pour les 16 isolats et les souches de référence Hca1 et Hs1.

| E₂₄ | Diamètre | Code final | Numéro de souche |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | < 0.5mm | A | 51 |
| 2 | 1mm | B | 23 |
| 3 | < 0.5mm | C | 63 |
| 4 | < 0.5mm | D | 57 |
| 5 | 1mm | E | 15 |
| 6 | 1mm | F | 44 |
| 7 | 1mm | G | 16 |
| 8 | 1mm | H | 13 |
| 9 | < 0.5mm | I | 26 |
| 10 | < 0.5mm | J | 20 |
| 11 | < 0.5mm | K | 50 |
| 12 | < 0.5mm | L | 46 |
| 13 | < 0.5mm | M | 53 |
| 14 | 1mm | 2A | 29 |
| 15 | 1mm | 2B | 12 |
| 16 | 1mm | 2C | 12 |
| 17 | < 0.5mm | Ref: Hca1 | 47 |
| 18 | < 0.5mm | Ref: Hs1 | 62 |



Photographie 7- Mise en évidence de la production du Biosurfactant. Formation d'émulsion dans le bouillon de l'isolat F (à droite) et un témoin (T) négatif (à gauche).

L'index E24 permet une estimation quantitative du taux d'émulsification par les différents isolats. Certaines bactéries émulsifient totalement la quantité du kérosène ajoutée (A, C, D, K, L, M ainsi que Hca1 et Hs1) tandis que d'autres forment des émulsions partielles (B, E, F, G, H, I, J, 2A, 2B, 2C) (Planche 1.A). Les résultats de calculs des E24 sont exploités pour établir un diagramme qui permet de mieux visualiser la différence entre les souches sélectionnées et les souches de référence, en terme de productivité et rendement en biosurfactants (Figure 7).

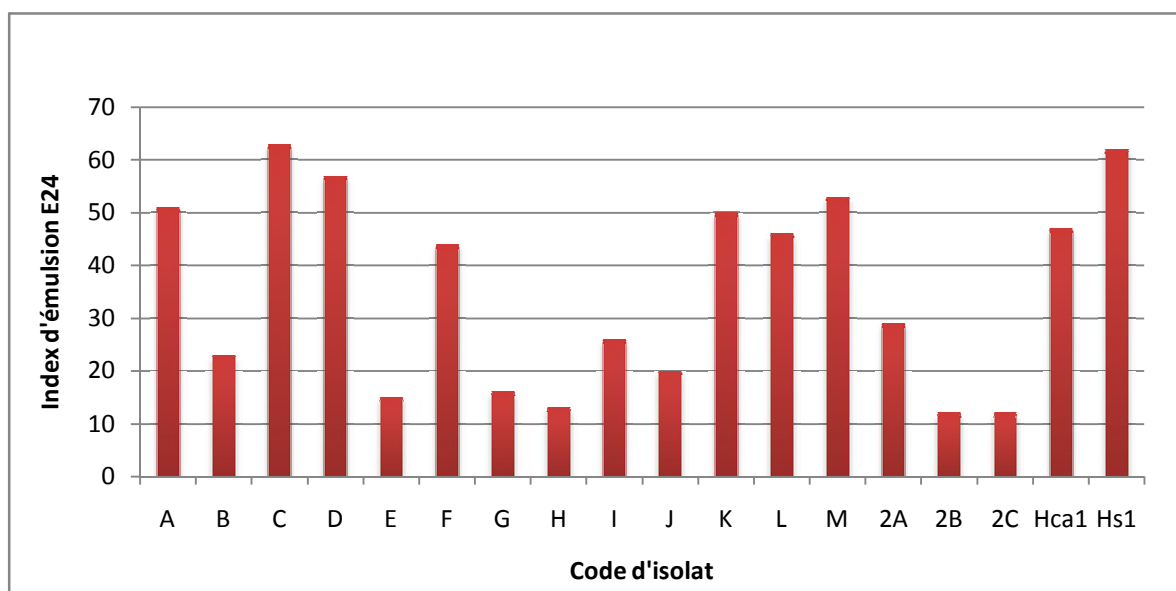


Figure 7- Diagramme représentant l'estimation de la qualité d'émulsion par les valeurs des E24 de chaque souche.

III- Caractérisation phénotypique

III-1- Observations coloniales et cellulaires

L'observation de la morphologie coloniale décrit trois types majeurs de colonies: des colonies de forme ovale, ayant un contour régulier et d'aspect très visqueux (A, C, D, I, J, Hca1, Hs1), des colonies ondulées à contour irrégulier et d'aspect rugueux et sec (B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C) et des colonies circulaires ayant un contour régulier et un aspect lisse (K, L,M). L'aspect lisse ou visqueux des colonies renseigne sur la synthèse d'exopolysaccharides capsulaires (Planche 1.B).

L'observation des bactéries à l'état frais montre que certains isolats sont très mobiles (A, C, D, I, J, K, L, M, Hca1, Hs1), tandis que d'autres sont lents et présentent un mouvement Brawnien (B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C).

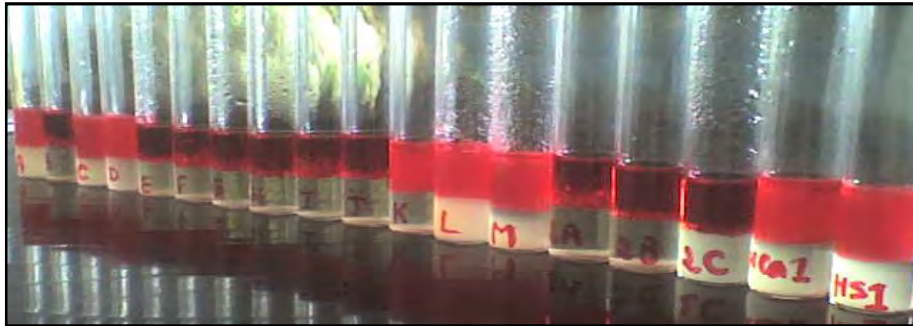
L'observation des frottis colorés sous microscope optique nous permet de distinguer les formes cellulaires bactériennes de nos isolats. La coloration de Gram révèle deux groupes de bactérie : des Gram - (A, C, D, I, J, K, L, M) avec les souches de référence (Hca1 et Hs1) qui sont des *Pseudomonas sp.* ainsi que des Gram + (B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C). Concernant la taille et le type de regroupement, les bactéries à Gram négatif sont surtout des diplo-coccobacilles très fins et les bactéries à Gram positif, sont sous forme de gros bâtonnets à bouts arrondies (Planche 1.C).

La coloration au vert de Malachite de bactéries soumises à un stress nutritionnel pendant 21 jours, révèle la disparition des bâtonnets et l'apparition de spores chez les isolats suivants : B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C. Un stress à la chaleur sèche (70°C) pendant une semaine provoque la formation de spores excentriques non déformantes chez ces mêmes isolats sans pour autant détruire la cellule végétative.

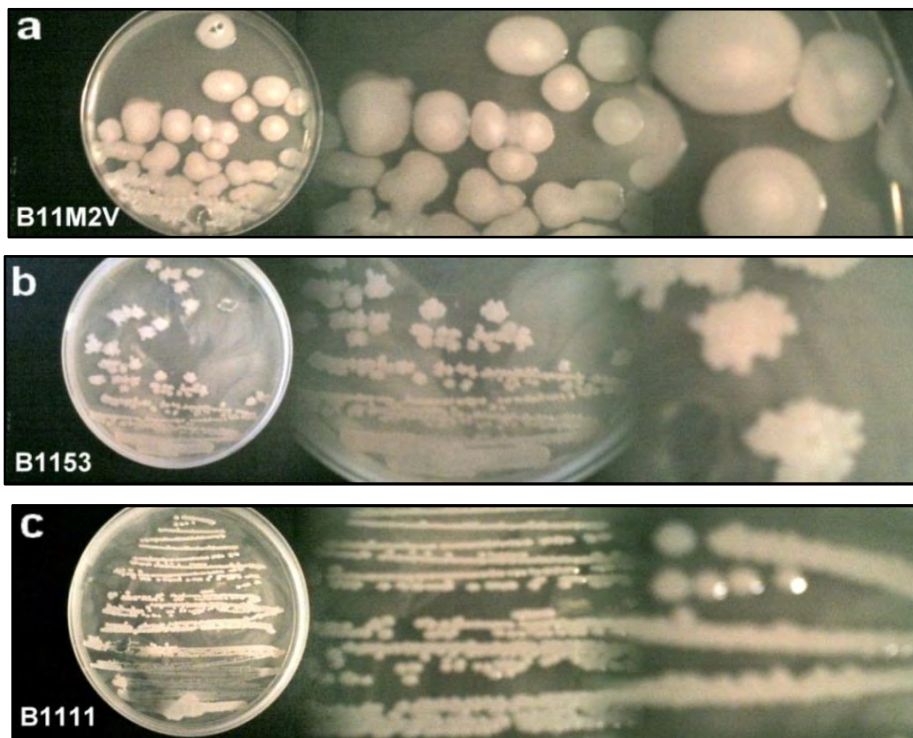
III-2- Conditions de croissance

Des tests de croissance à différentes températures et des mesures de pH, sont réalisés afin d'optimiser la croissance des bactéries *in vitro*. Certaines bactéries à Gram négatif (A, C, D, Hca1 et Hs1) se développent à différentes températures allant de 10°C jusqu'à 50°C avec un optimum de 30°C (bonne pousse à cette température comparée au reste). Cependant, les bactéries (I, J, K, L, M) à Gram négatif ainsi que les bactéries à Gram positif se développent dans une gamme de température plus étroite allant de 25°C

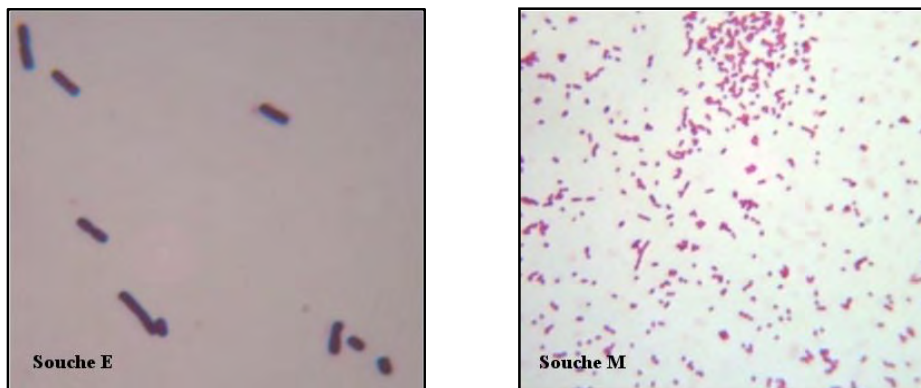
jusqu'à 45°C avec un optimum de 30°C. Les valeurs de pH mesurées montrent un caractère quasi neutre des échantillons de sols.



A- Variation du taux d'émulsification d'un isolat à un autre.



B- Les différents aspects coloniaux obtenus (a) aspect muqueux, (b) rugueux, (c) lisse.



C - Les deux aspects majeurs obtenus pour les isolats après coloration de Gram (G x1000).

Planche No. 1

III-3- Les différents métabolismes bactériens

III-3-1- Le métabolisme respiratoire

Le type respiratoire des bactéries est déterminé par la culture sur milieu Viande-foie. Les isolats (A, C, D, E, F, G, H, L, M, Hca1 et Hs1) se développent uniquement dans la partie supérieure du milieu contenu dans les tubes, ce sont des bactéries aérobies strictes. Les autres isolats (B, I, J, K, 2A, 2B, 2C) peuvent croître tout au long du milieu, il s'agit de bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

Nous avons détecté une catalase chez tous les isolats (Planche 2.A), capable de décomposer l'eau oxygénée en eau et oxygène, ainsi qu'une nitrate-réductase (Planche 2.B) qui réduit les nitrates au stade nitrite. Cependant, cette dernière fait défaut chez l'isolat M.

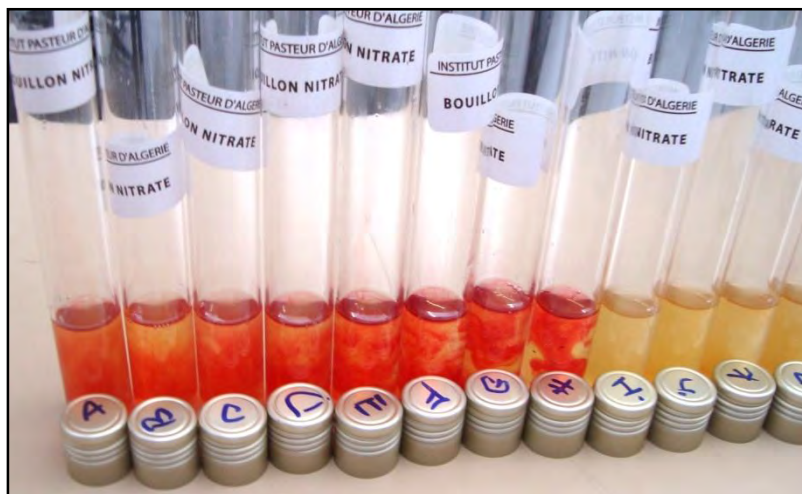
III-3-2- Le métabolisme glucidique

En observant l'auxanogramme du carbone, nous remarquons que la majorité des glucides sont utilisés par nos isolats comme source de carbone et d'énergie. Nous remarquons aussi que le glucose constitue le substrat préférentiel qui donne une bonne croissance par comparaison au reste des glucides (Planche 2.C). Cependant, les pentoses qui sont le xylose et l'arabinose ne sont pas utilisés par les isolats (B, E, F, G, H, I, J, K, 2A, 2B, 2C) et (F, I, J, 2A) respectivement. Cela peut être dû à l'absence des enzymes de la voie des pentoses.

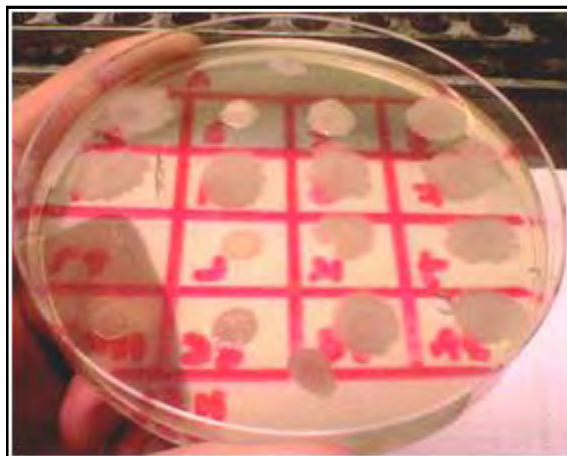
L'aspect des colonies bactériennes sur les différents glucides est le même sauf pour l'isolat K. Celles qui sont visqueuses ou lisses ont pu synthétiser les EPS en présence de n'importe quel glucide. Cela s'explique par le fait que la source de carbone n'influence pas la capacité des bactéries à synthétiser des EPS, si elles possèdent les enzymes nécessaires pour sa dégradation.



A- L'effervescence obtenue de la réaction d' H_2O_2 avec la catalase bactérienne.



B- Mise en évidence de la réduction de nitrates au stade nitrites par la nitrate-réductase.



C- L'utilisation du glucose comme source de carbone par les différents isolats.

Planche No. 2

Sur le milieu Kligler Hajna, les isolats A, B, C, D, E, F et Hs1 montrent leur capacité à utiliser le glucose et le lactose et acidifier le milieu. Les isolats H et Hca1 dégradent le glucose mais pas le lactose (culot jaune, pente rouge). Les autres isolats (G, I, J, K, L, M, 2A, 2B) sont incapables d'utiliser les deux sucres (Planche 3.A). Cela laisse supposer qu'il s'agit de bactéries aérobies strictes incapables de fermenter le glucose (vu l'anaérobiose en culot), et pour le lactose il faut compléter par le test ONPG (Planche 3.B).

Les isolats présentent plusieurs réponses vis-à-vis le test ONPG. Certains sont ONPG+, possédant une ONPG hydrolase (B-galactosidase). Pour être lactose +, ces dernières doivent posséder une autre enzyme qui est la B-galactoside perméase, c'est le cas des isolats (A, B, C, D, E, F et Hs1) sinon, elles sont lactose- (I, J, K). Les isolats à ONPG- sont forcément lactose- c'est le cas pour les isolats (G, L, M, 2A, 2B, 2C).

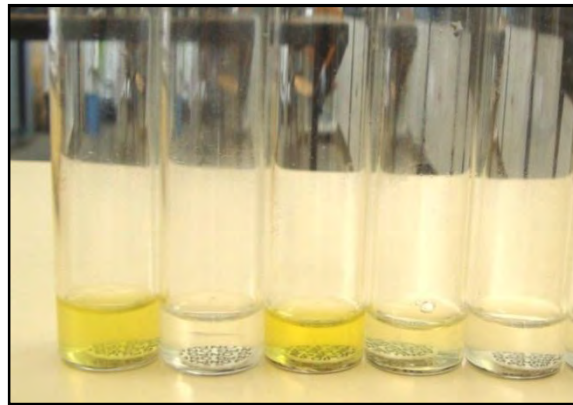
Le mannitol n'est acidifié que par certains isolats (A, C, D, K, 2C, Hca1 et Hs1) (Planche 3.C).

L'amidon est un glucide complexe et sa dégradation nécessite une amylase présente chez tous nos isolats (B, E, F, G, H, K, M, 2A, 2B, 2C, Hca1 et Hs1). (A, C, D, I, J, L) (Planche 4.A).

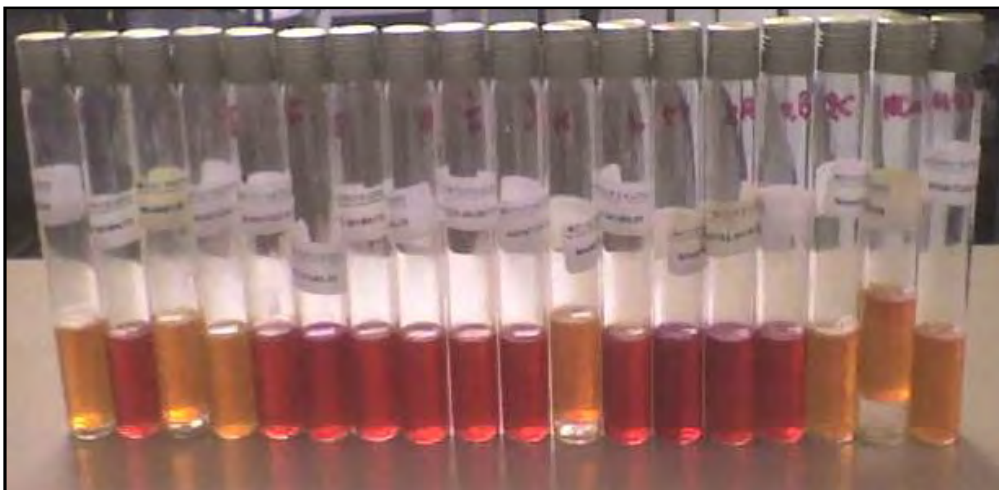
Le test VP-RM permet de mettre en évidence la fermentation acide mixte et la fermentation acide-butandioïque qui génère l'AMC (acétyl-méthyl-carbinole) comme composé final. Les bactéries (A, B, C, D, I, J, K, L, M, Hca1 et Hs1) sont VP +/- RM- tandis que (E, G, 2A, 2B) sont VP-/RM+. Les bactéries (F, H, 2C) sont VP-/RM- (Planche 4.B/ 4.C).



A- Le test TSI pour les différents isolats et les souches de référence.

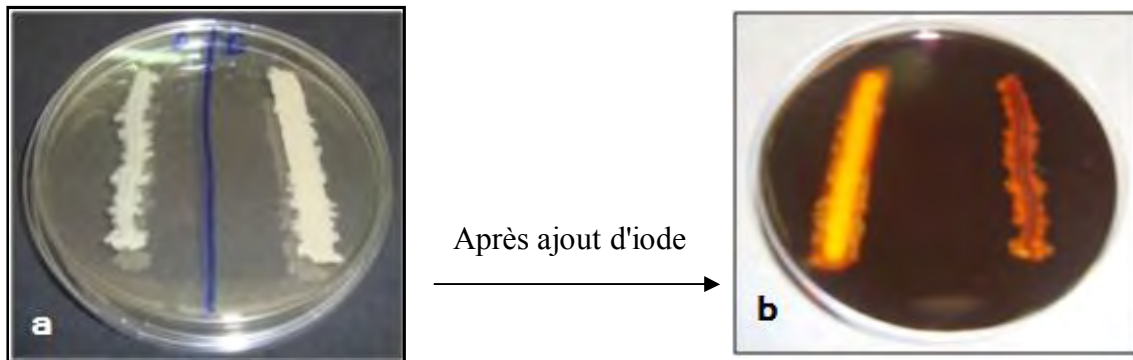


B- Mise en évidence résultat positif (couleur jaune) et du résultat négatif du test ONPG.



C- L'utilisation du mannitol par les différents isolats sur milieu mannitol-mobilité.

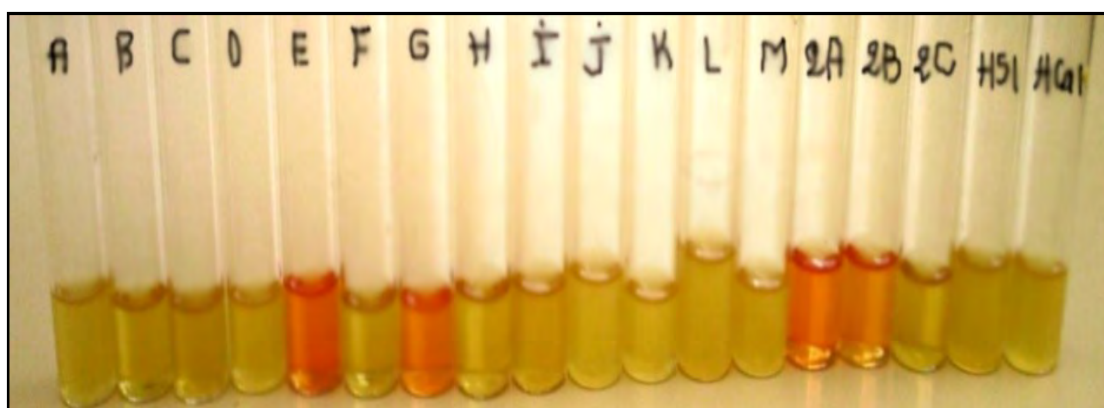
Planche No. 3



A- Le test d' α -amylase (a) avant et (b) après ajout d'iode, résultat positif à gauche négatif à droite (b).



B- Le test VP pour les différents isolats, la couleur rose indique la fermentation acide butanoïque.



C- Le test RM, la couleur rouge indique la fermentation acide mixte.

Planche No. 4

III-3-3- Le métabolisme d'acides organiques

Certaines de nos bactéries peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, ce sont celles à Gram négatif (Planche 5.A).

Les isolats montrent aussi leur capacité à utiliser l'acide acétique comme source de carbone, mais seulement après 48h d'incubation, cela peut s'expliquer par une phase de latence prolongée, pour la préparation de l'équipement enzymatique nécessaire. Pour la souche M, nous avons remarqué sa capacité à synthétiser un pigment diffusé dans la culture, de couleur jaune (Planche 5.B).

III-3-4- Le métabolisme protéique

La présence de protéases telle que la gélatinase est un caractère très important dans l'identification de certains genres bactériens. Seules les souches de référence sont capables d'hydrolyser la gélatine contrairement aux isolats qui sont tous incapables de la dégrader (Planche 5.C).

La présence d'ADH, LDC, ODC (Planche 6.A/ 6.B), d'uréase (Planche 6.C) et de tryptophanase est caractéristique (Planche 7.A). Les résultats obtenus sont différents d'un isolat à une autre.

III-3-5- Le métabolisme lipidique

Il est toujours utile de chercher la lécithinase pour l'identification de certaines bactéries. Les résultats de croissance sur gélose au jaune d'œuf montrent la formation d'un précipité autour des colonies de bactéries à Gram positif, ce qui indique la présence de cette enzyme (Planche 7.B).

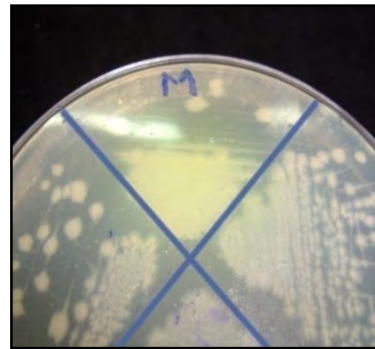
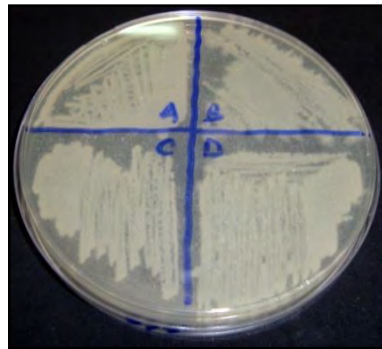
III-3-6- Les milieux sélectifs

L'utilisation du milieu King B permet de dévoiler un caractère distinctif d'espèce chez les isolats L et M, qui est la formation du pigment jaune fluorescent sous UV (Planche 8.A/ 8.B), caractéristique de l'un des *Pseudomonas* fluorescents. Ce pigment est probablement la fluorescéine (=pyoverdine).

L'utilisation de la gélose S-S n'a pas montré de caractères spécifiques des *Salmonella* et *Shigella*. Les bactéries qui ont poussé sur ce milieu sont des Gram- sans caractères particuliers (Planche 7.C).



A- Virage du bleu de bromothymol de la couleur verte à la couleur bleu pour un résultat positif.

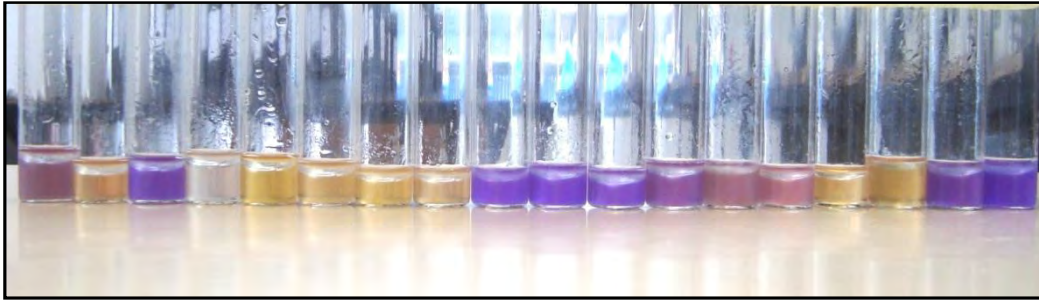


B- La croissance de tous les isolats sur acide acétique et synthèse de pigment jaune par la souche M sur ce milieu.

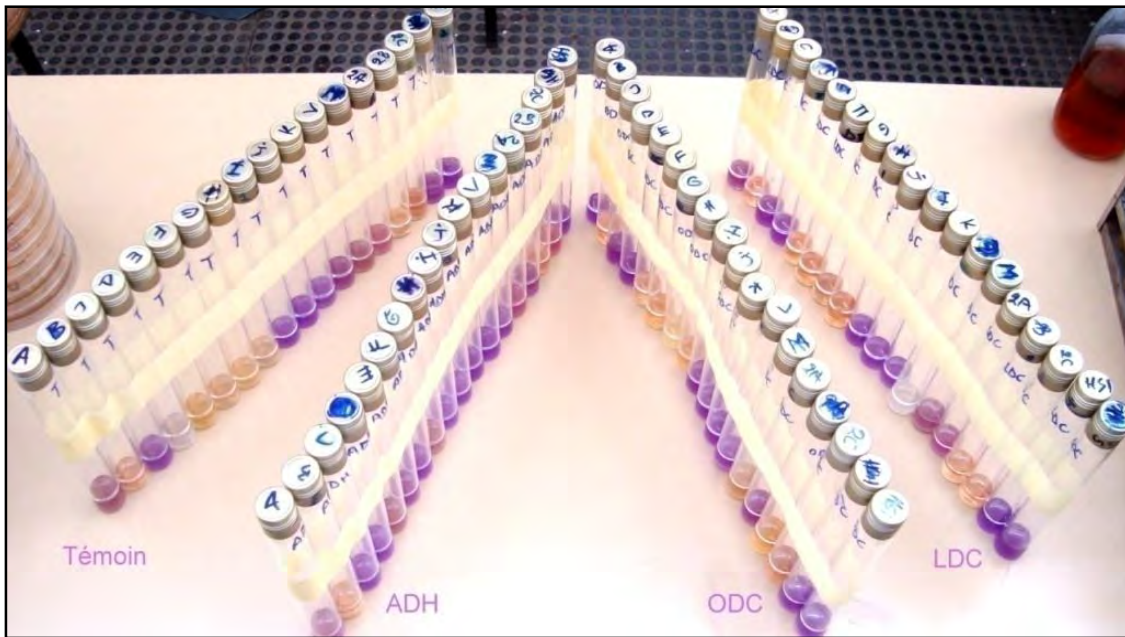


C- La mise en évidence de l'hydrolyse de la gélatine par les souches de référence Hca1 et Hs1.

Planche No. 5



A- Les différentes couleurs obtenues sur le milieu de Falkow.

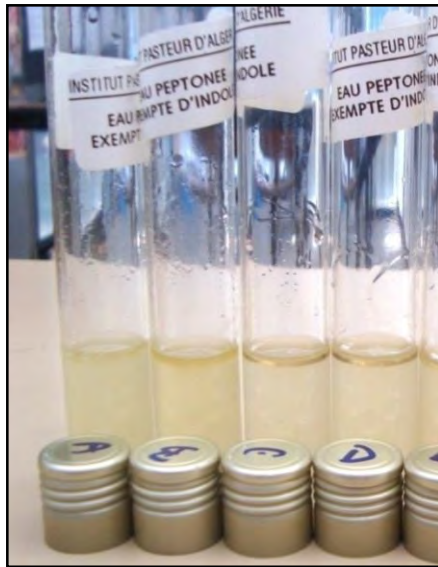


B- Les différents résultats obtenus sur le milieu de Falkow pour la recherche d'enzymes ADH, LDC, ODC.

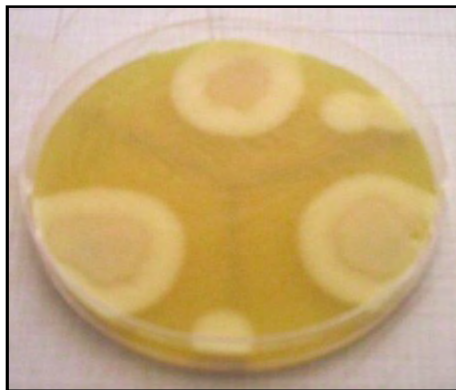


C- Le test uréase sur milieu Urée-indole (rose : uréase positif et jaune : uréase négatif).

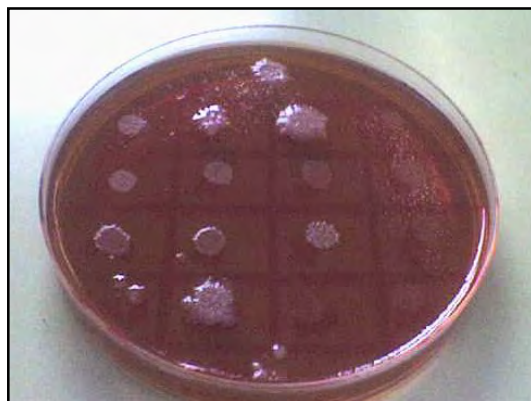
Planche No. 6



A- Le résultat négatif d'indole après ajout du réactif de kovacs.

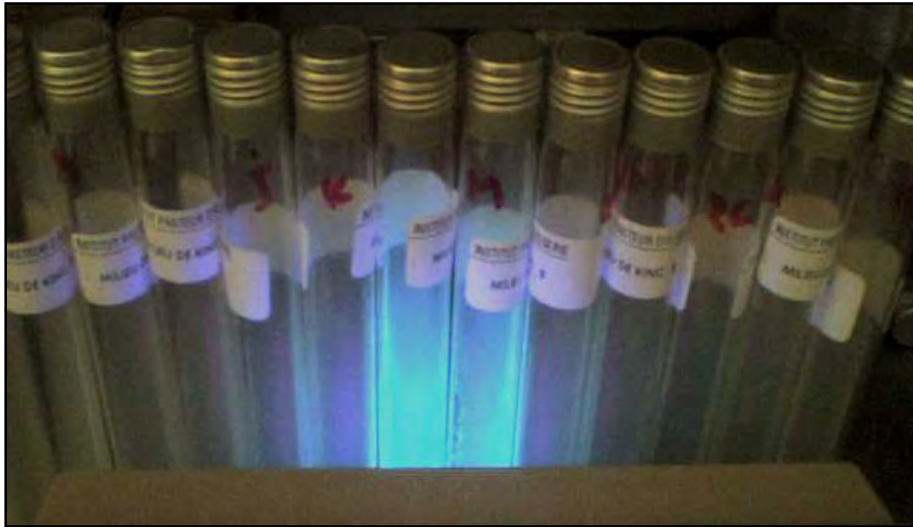


B- Résultat positif du test lécithinase sur la gélose au jaune d'œuf, formation du précipité autour des colonies.



C- La croissance des bactéries Gram – sur la gélose S-S sans production d'H₂S.

Planche No. 7



A- Fluorescence sue le milieu King B ensemencé et exposé aux rayons UV après 24h d'incubation.



B- Synthèse de pigment fluorescent sur le milieu King B par les isolats L et M.

Planche No. 8

IV- Classification hiérarchique des isolats selon leurs caractères phénotypiques

Selon Woese et ces collaborateurs (1990), les microorganismes se répartissent sur trois domaines : Eucarya, Archaea et Bacteria. Nous avons attribué nos isolats au domaine Bacteria en se basant sur le métabolisme cellulaire, les conditions de croissance qui ne sont pas extrêmes, la forme des cellules, leur organisation structurale, leur taille, ainsi que leur réponse à la coloration de Gram qui renseigne sur la structure pariétale bactérienne nettement différente de celle des Archaea et des Eucarya.

Au sein du domaine Bacteria, les individus présentent différentes formes cellulaires, bacillaires ou sphériques, et peuvent avoir un Gram positif ou négatif, selon la nature de leur paroi. Nos bactéries sont partagées en deux groupes : huit isolats Gram positifs (B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C) ayant tous la forme bacillaire et huit isolats Gram négatifs avec sept sous forme de coccobacilles (A, C, D, I, J, L, M) et un isolat (K) sous la forme de bacilles très fins. Ces deux caractères nous permettent de dire à quel embranchement parmi les 24 de ce domaine appartiennent ces bactéries.

Le premier groupe de bactéries fait partie des Firmicutes tandis que le deuxième groupe fait partie des Proteobacteria.

L'embranchement des Firmicutes comporte 3 classes, que nous pouvons différencier par le type respiratoire et la température de croissance. Nous avons rangé nos isolats à Gram négatif dans la classe des Bacilli, qui regroupe les bactéries aérobies strictes et aérobies anaérobies facultatives, dont certaines sont thermotolérantes.

Dans cette classe nous distinguons 2 ordres et 17 familles. Probablement, nos bactéries appartiennent à l'ordre des Bacillales et la famille des Bacillaceae. Les caractères distinctifs de cette famille sont la formation de spores de résistance dans les conditions défavorables, la forme des bacilles, et surtout leur taille. Nous supposons que nos isolats font partie de l'un des 17 genres qui composent cette famille.

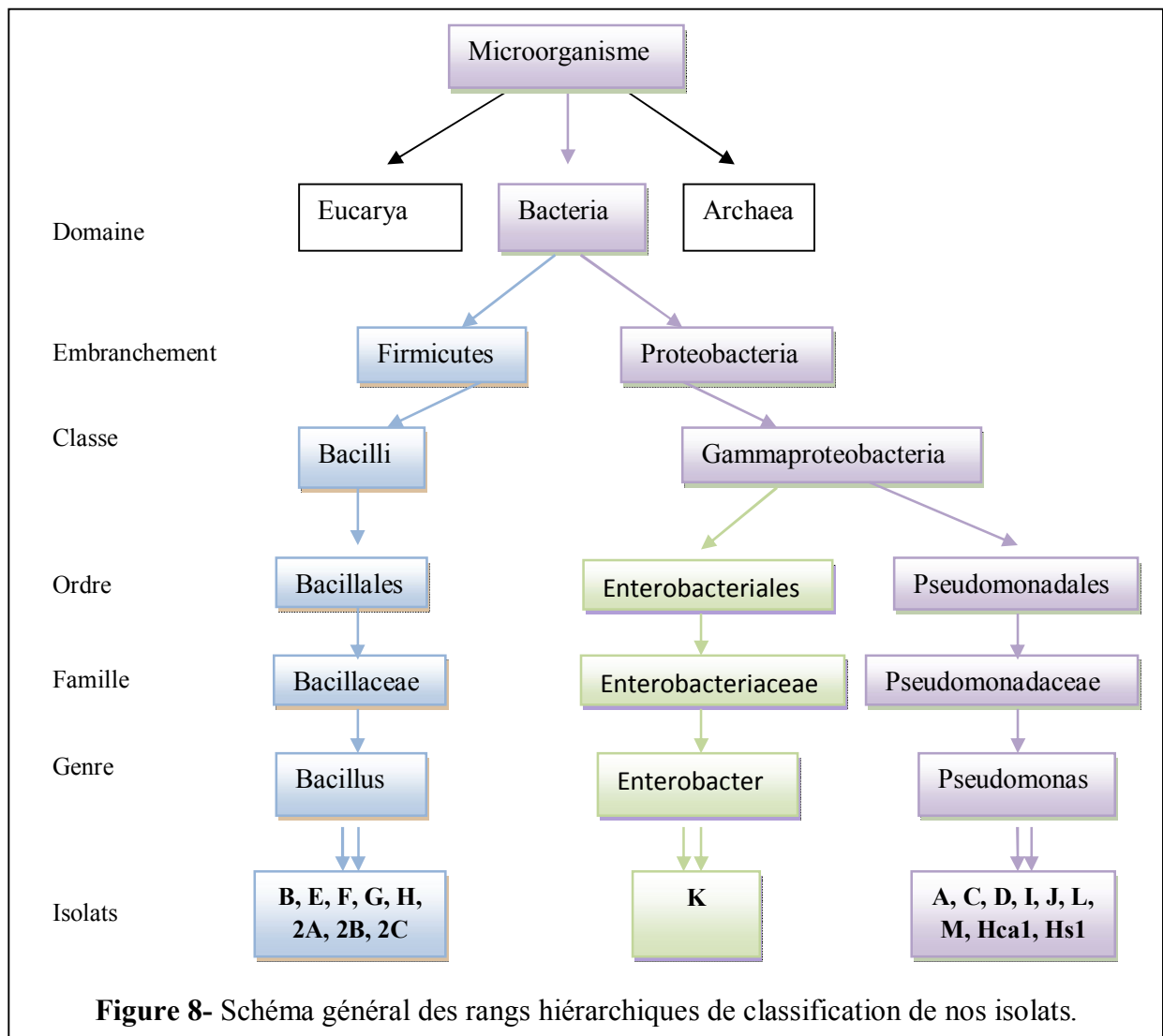
Puisqu'il s'agit de bacilles à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, ayant une catalase et capables de former des spores, nous sommes probablement dans le genre *Bacillus sp.*

L'embranchement des Proteobacteria comporte 5 classes, et c'est la classe des Gammaproteobacteria qui réunit les bactéries chimioorganotrophes aérobies anaérobies facultatives ou aérobies strictes aux quelles appartiennent nos isolats à Gram négatif.

Grâce à certains caractères tels que la mobilité, la culture facile, le métabolisme respiratoire, nous sommes orientés dans la classification des isolats (A, C, D, I, J, L et M) vers l'ordre des Pseudomonadales, et la famille des Pseudomonadaceae parmi 15 ordres et 48 familles de cette classe.

Des caractères plus spécifiques tels que la formation de pigments pour certains, la mobilité par flagelles polaires, l'oxydation de glucose, la présence d'une nitrate réductase ainsi que la dégradation d'hydrocarbures nous permettent de supposer que nos bactéries à Gram négatif font partie du genre *Pseudomonas sp.*

L'isolat K présente un aspect cellulaire et colonial ainsi que des caractères différents des autres isolats ayant un Gram négatif. Nous suspectons l'appartenance de cette bactérie à l'ordre des Enterobacterales, et la famille des Enterobacteriaceae. Des caractères tels que la mobilité, la présence d'une ONPG hydrolase, l'absence d'une gélatinase, le VP positif, nous orientent vers les Entérobactéries et plus spécifiquement le genre *Enterobacter sp.*



V- Identification des isolats susceptibles de dégrader les hydrocarbures







Les nombreux caractères réunis sur l'isolat en question, nous permettent de l'identifier en faisant appel à la dichotomie. L'identification reste, cependant présomptive et non confirmative.

Les clés dichotomiques sont tracées suivant des couplets de descriptions de la présence ou de l'absence du caractère chez la bactérie. Ces clés sont établies en se basant sur les informations que donne la 9^{ème} édition du « bergey's manual of determinative bacteriology » 1994, sur les caractères phénotypiques des groupes bactériens.

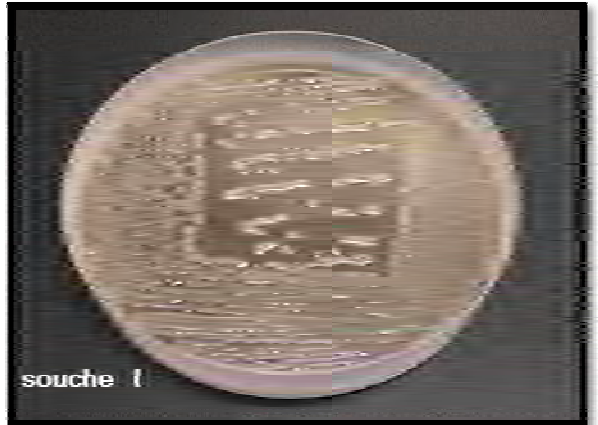
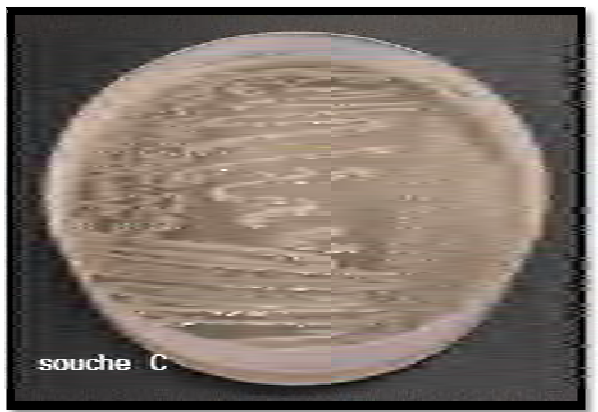
Nous commençons par présenter les clés de différenciation des genres, l'aspect macroscopique ainsi que le Gram des isolats puis a présenter les clés d'identification des espèces.

NB :

- Chaque chemin suivi pour identifier l'une des espèces microbiennes est indiqué sur les schémas des clés dichotomiques par l'une des couleurs suivantes :

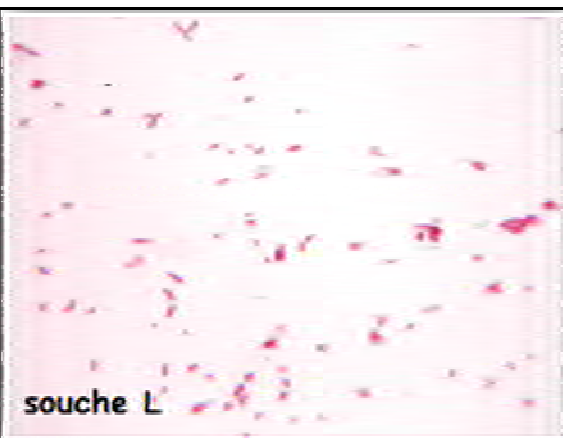
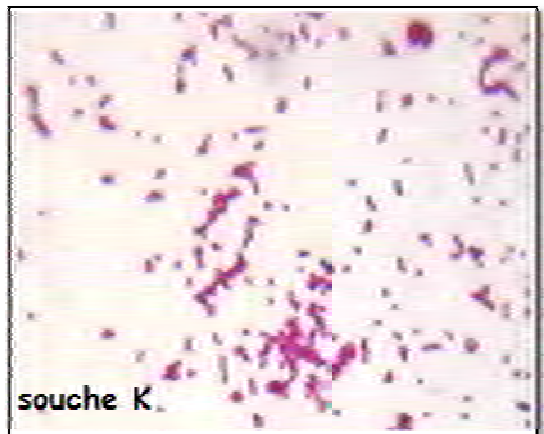
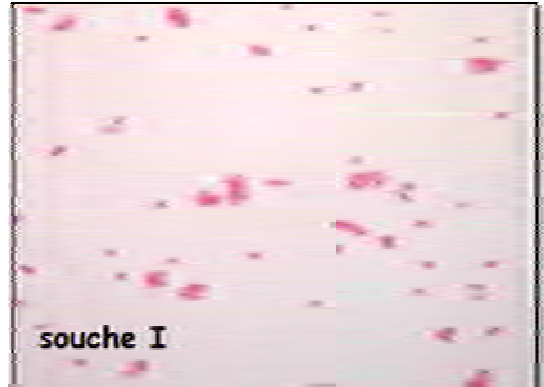
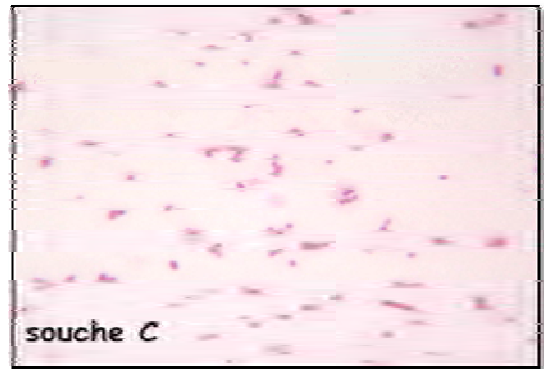
| | |
|---|--------------------------------------|
|  | Les souches de référence Hs1 et Hca1 |
|  | Les Pseudomonas fluorescents |
|  | Les Pseudomonas non fluorescents |
|  | |
|  | Les Enterobacter |
|  | Les Bacillus |

- Toutes les informations collectées pour tracer les clés dichotomiques proviennent de la 9^{ème} édition du Bergey's manual of determinative bacteriology, (1994) sauf celles des Bacillus qui sont citées dans la 7^{ème} édition (1957) du même livre.



A- Photographies de l'aspect colonial des isolats ayant un Gram négatif.

Planche No. 9



A- Photographies de l'aspect microscopique des isolats ayant un Gram négatif (Gx1000).

Planche No. 10

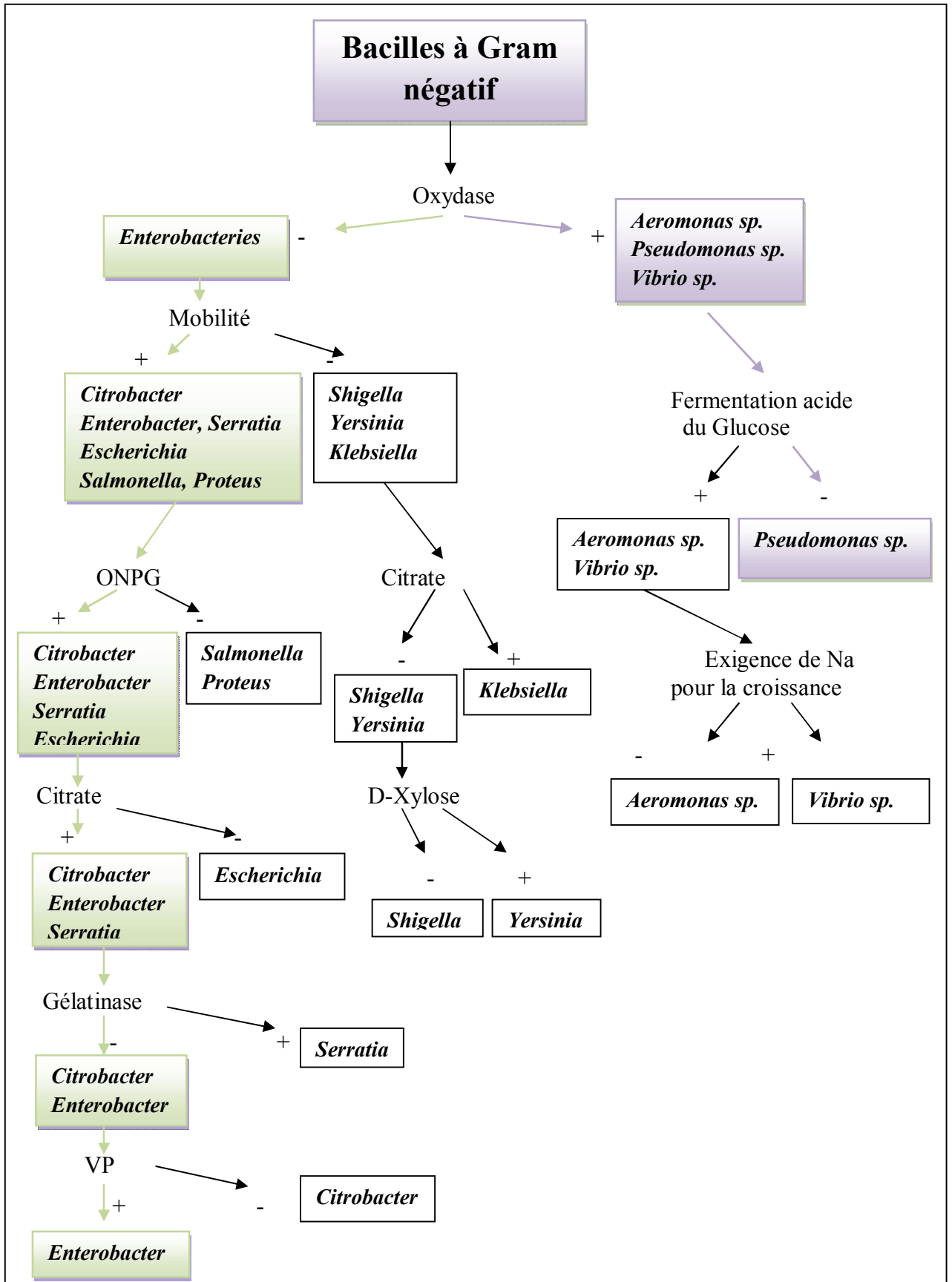
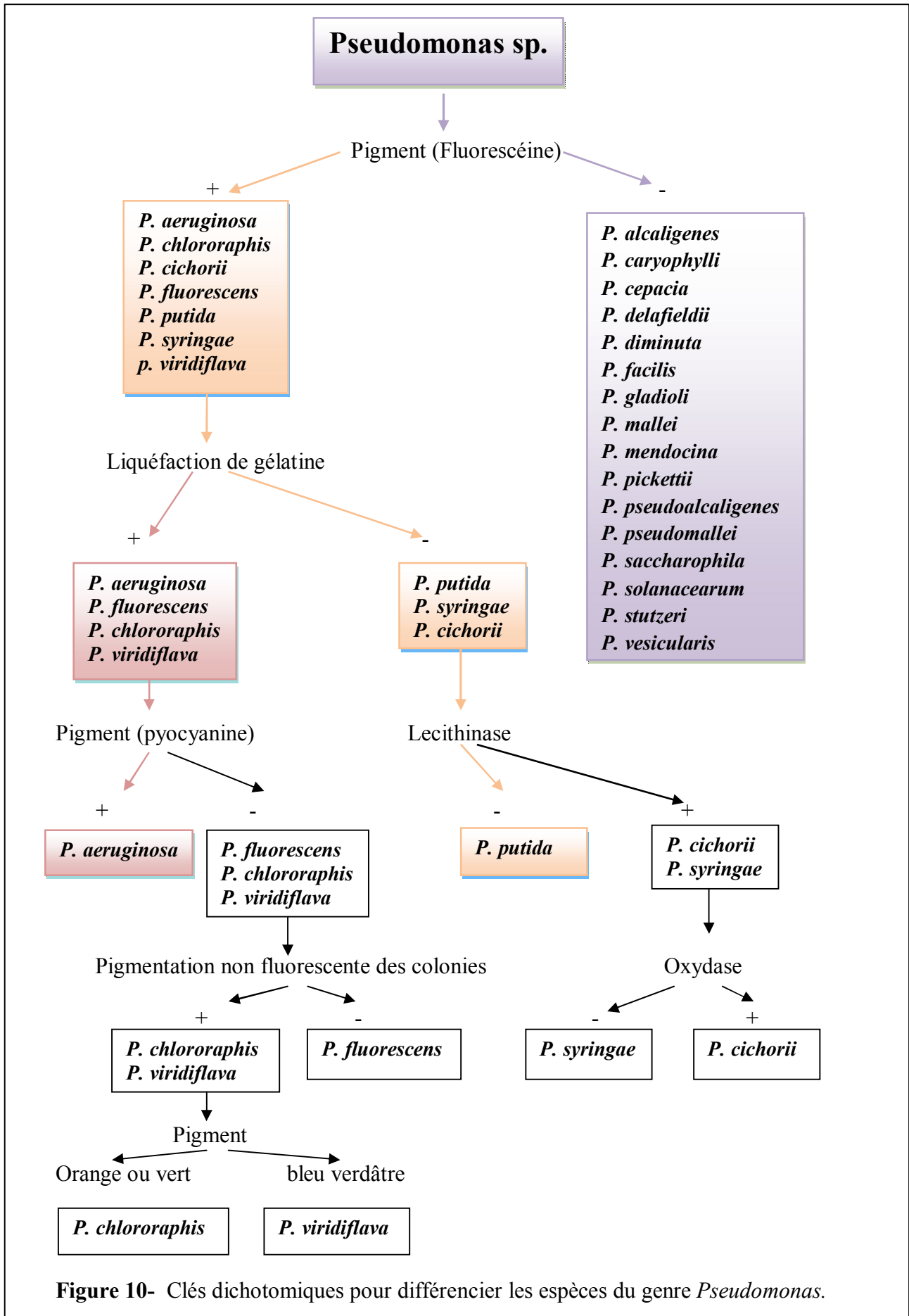


Figure 9- Clés dichotomiques pour la différenciation des bacilles à Gram négatif.



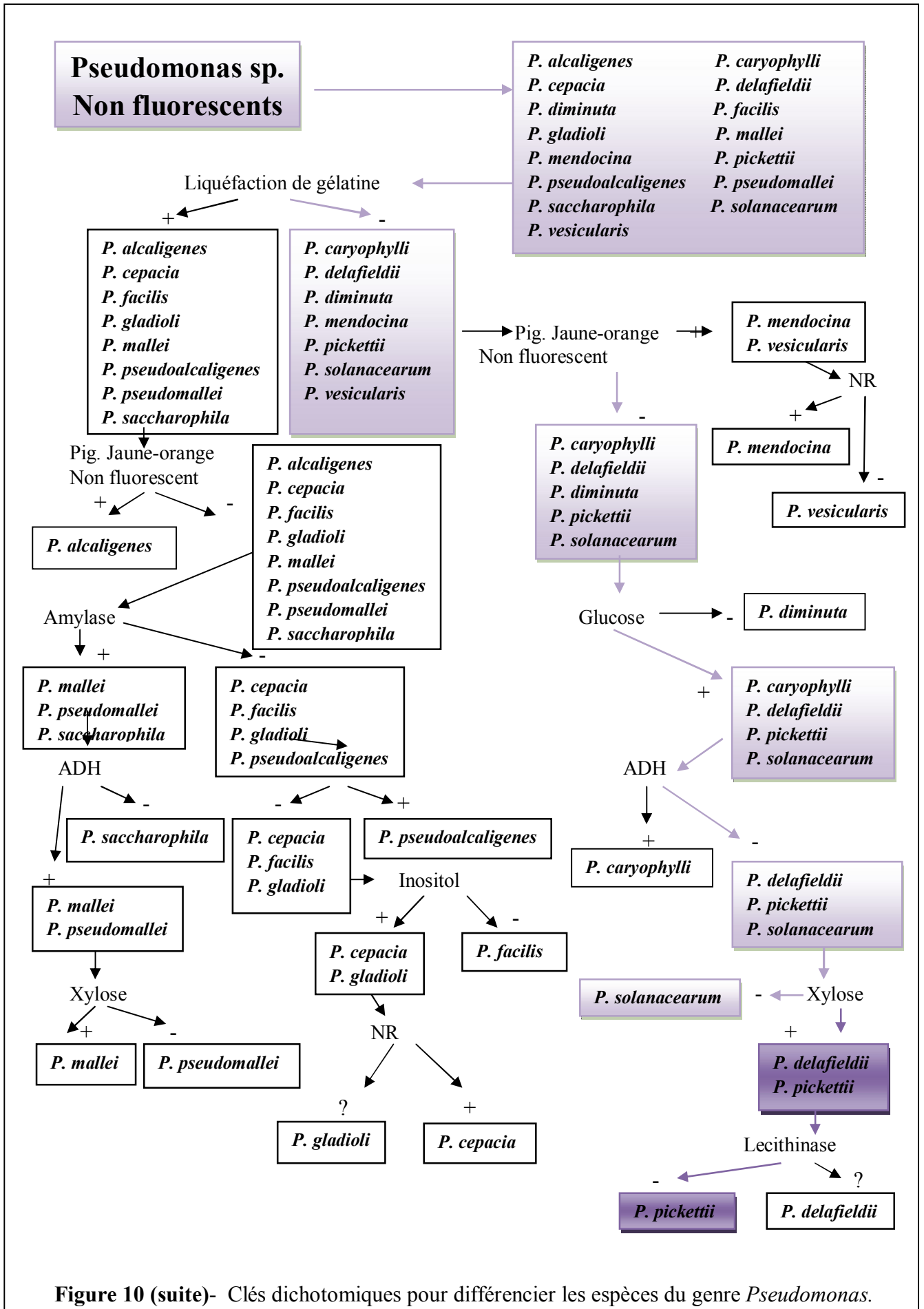


Figure 10 (suite)- Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre *Pseudomonas*.

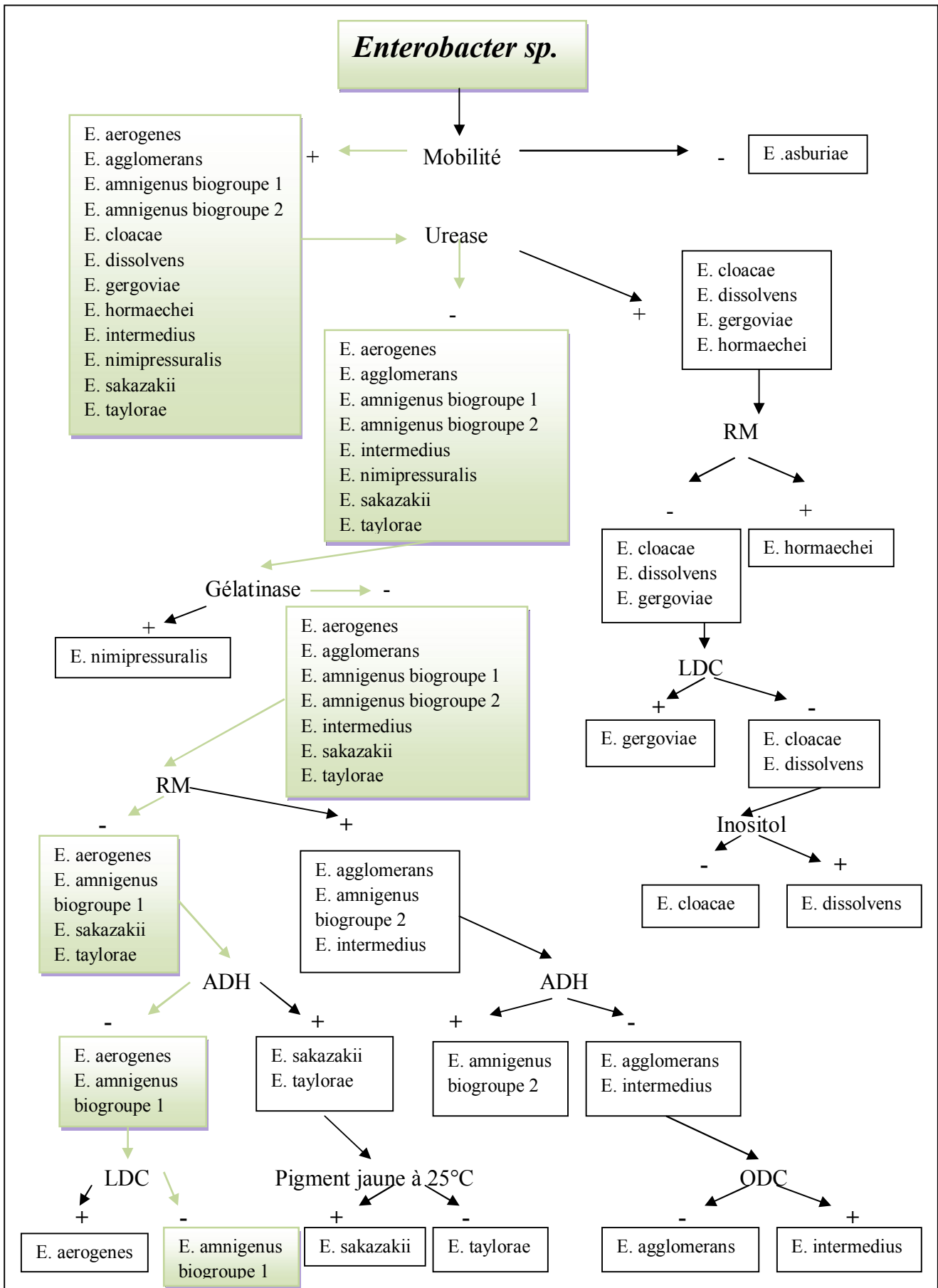
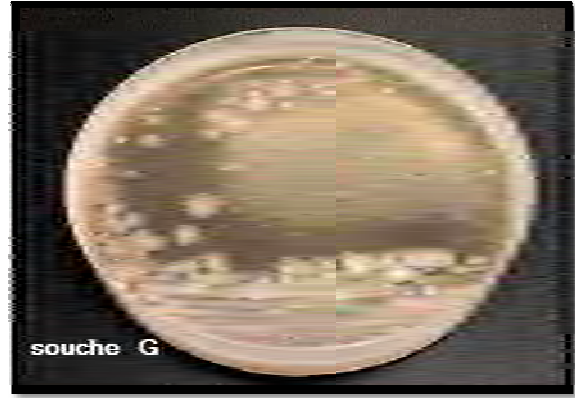
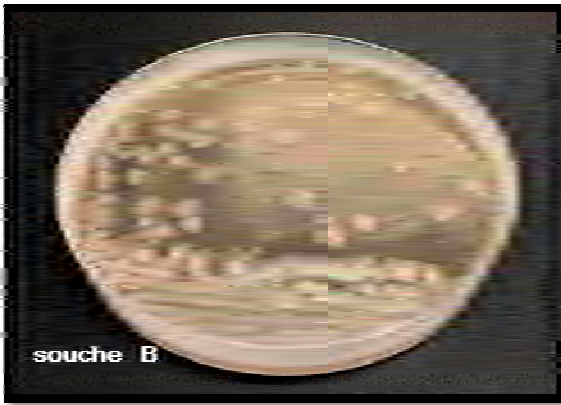
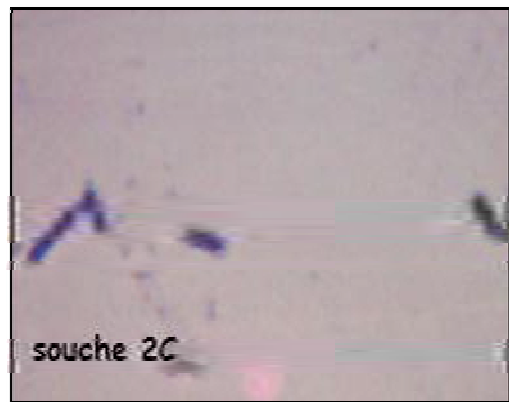
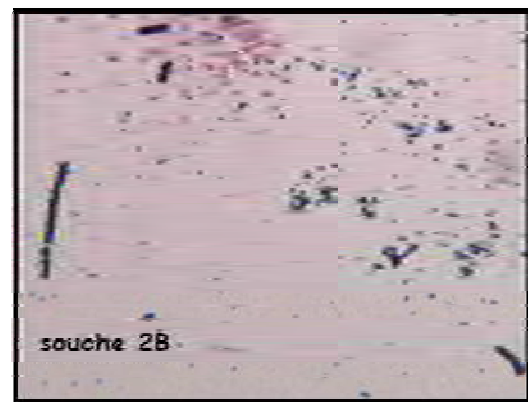
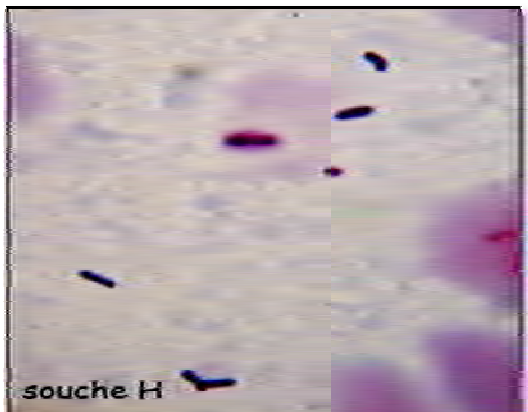
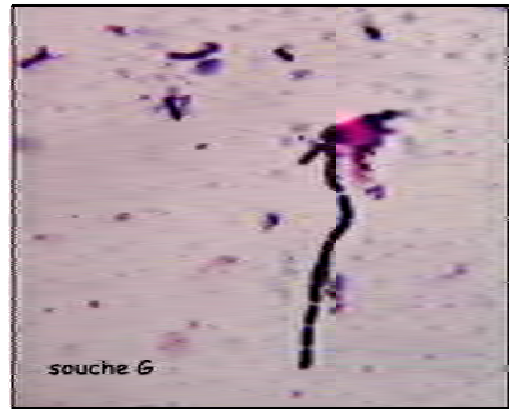
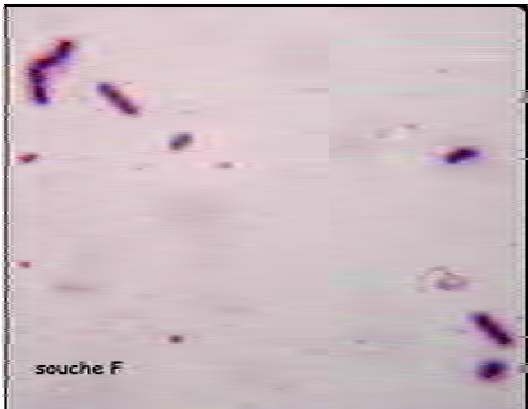


Figure 11- Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre *Enterobacter*.



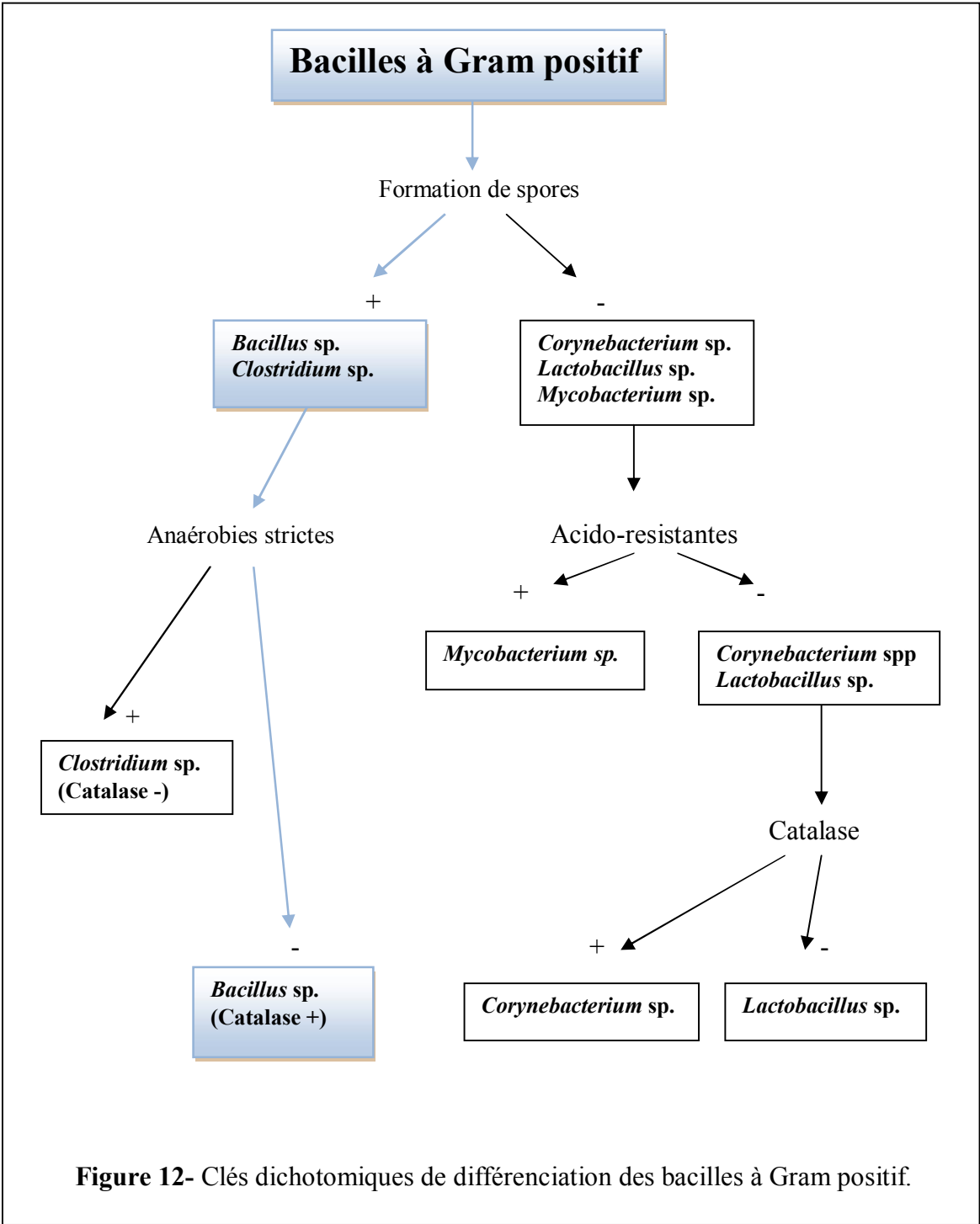
A- Photographies de l'aspect colonial des isolats ayant un Gram positif.

Planche No. 11



A- Photographies de l'aspect microscopiques des isolats à un Gram positif (Gx1000).

Planche No. 12



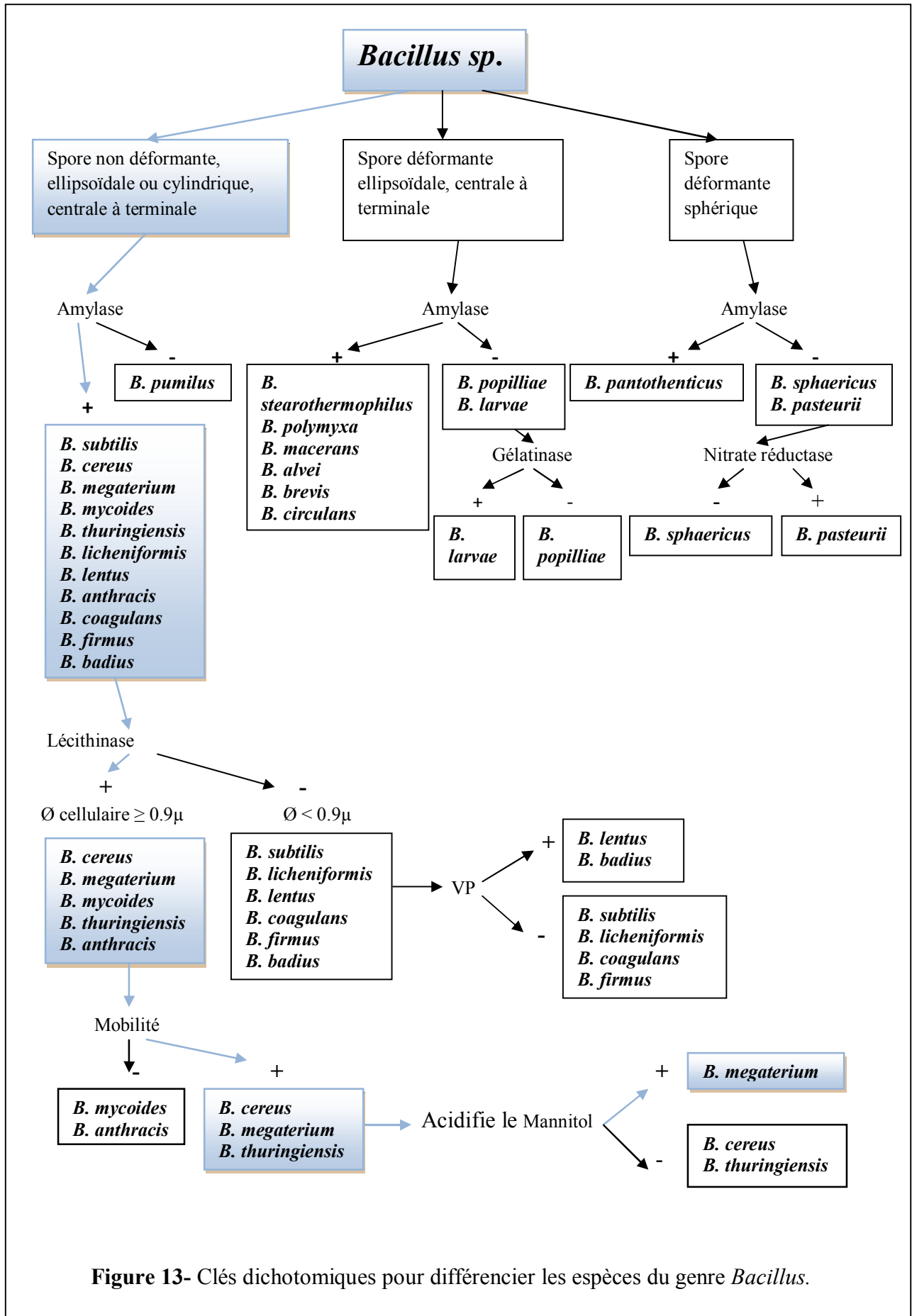


Figure 13- Clés dichotomiques pour différencier les espèces du genre *Bacillus*.

Tableau 5 : Résultats d'identification phénotypique des 16 souches productrices de biosurfactants.

| Isolat | Espèce présumée |
|-----------------------------------|--|
| A | <i>Pseudomonas pickettii</i> |
| B | <i>Bacillus megaterium</i> |
| C | <i>P. pickettii</i> |
| D | <i>P. pickettii</i> |
| E | <i>B. megaterium</i> |
| F | <i>B.megaterium</i> |
| G | <i>B.megaterium</i> |
| H | <i>B.megaterium</i> |
| I | <i>P. solanacearum</i> |
| J | <i>P. solanacearum</i> |
| K | <i>Enerobacter amnigenus biogroupe 1</i> |
| L | <i>P. putida</i> |
| M | <i>P. putida</i> |
| 2A | <i>B. megaterium</i> |
| 2B | <i>B. megaterium</i> |
| 2C | <i>B. megaterium</i> |
| Hca1 (souche de référence) | <i>P. aeruginosa</i> |
| Hs1 (souche de référence) | <i>P. aeruginosa</i> |

VI- Caractérisation chimiotaxonomique

VI-1- Analyse du profil protéique

Les bactéries sont extrêmement variées quant à leurs profils protéiques. Les souches de certaines espèces ont un contenu protéique très homogène avec des petites variations dans le profil des bandes. Ainsi, les profils sont spécifiques d'espèces et peuvent jouer le rôle de marqueurs d'identification (J. Howard et *coll.*, 1995).

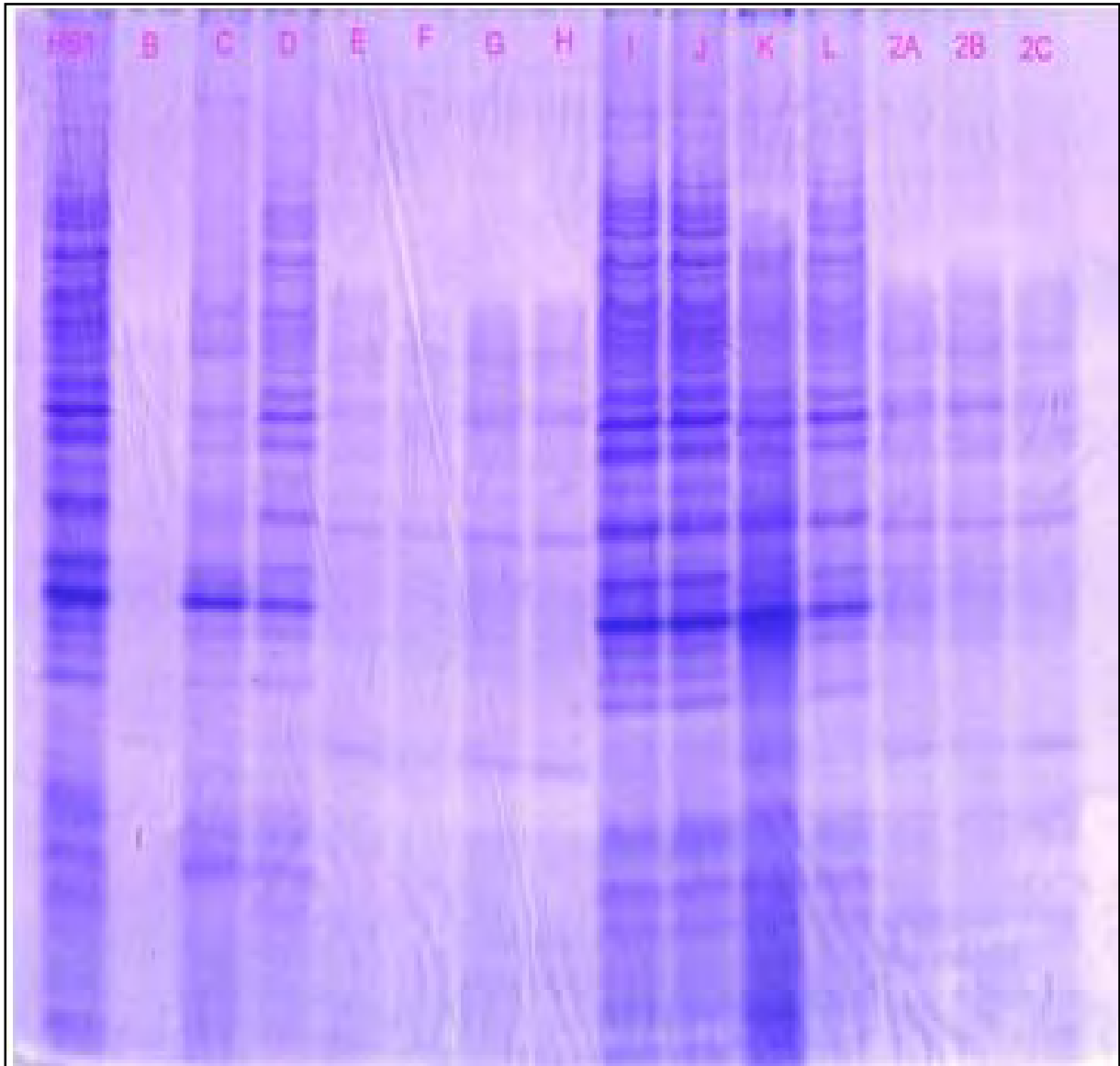
Un profil unidimensionnel typique de toutes les protéines d'une cellule bactérienne peut contenir plus de 50 ou 60 bandes discrètes de différentes intensités. Par conséquent, il est extrêmement difficile d'estimer objectivement la similarité entre les profils (J. Howard et *coll.*, 1995). L'estimation peut être faite par densitométrie, mais dans notre cas nous l'effectuons par un simple examen visuel.

L'observation des deux gels obtenus conduit à la détermination de 45 bandes protéiques sur le premier gel et 55 bandes sur le deuxième.

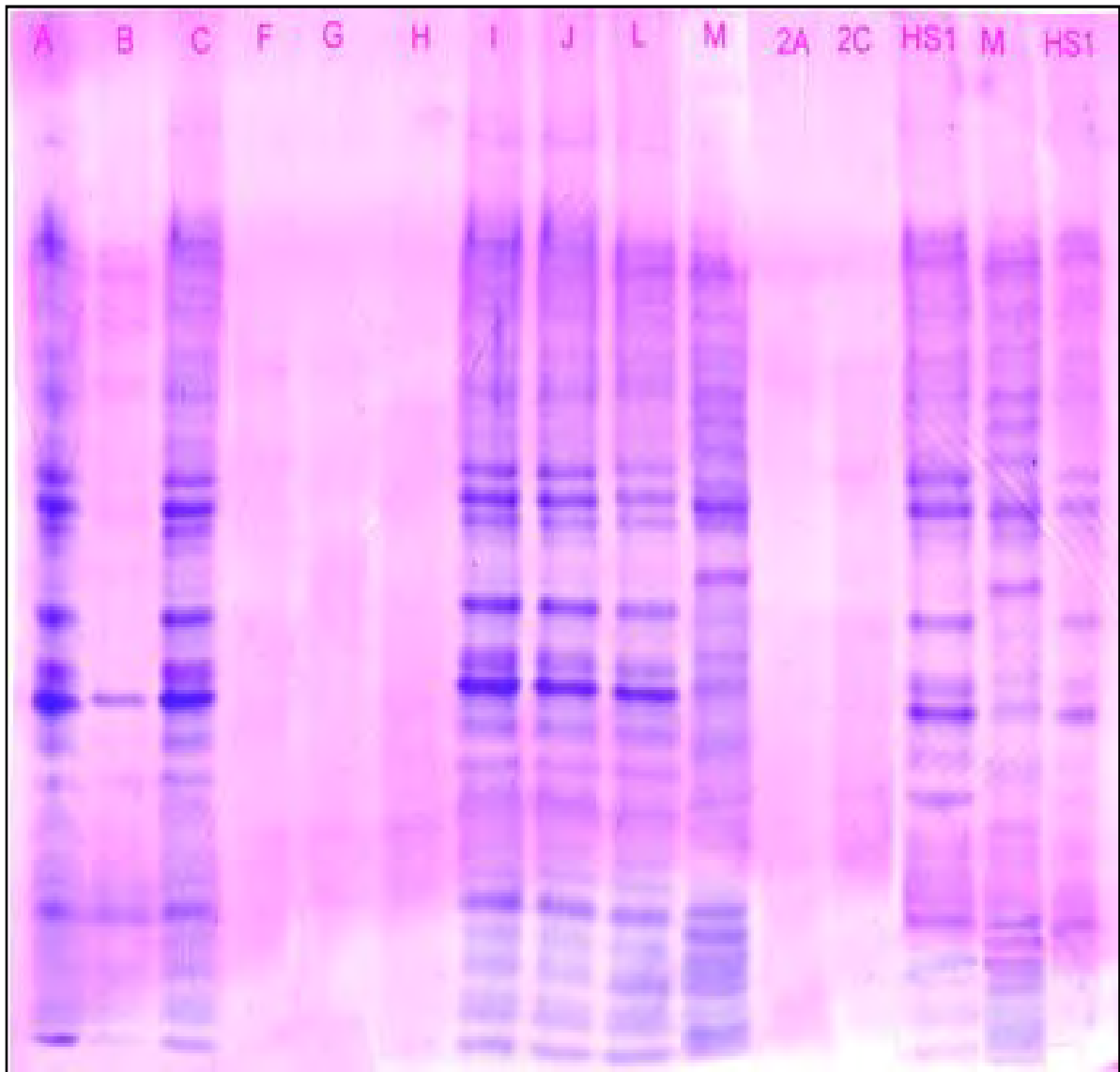
VI-2- Problèmes de résolution de certaines bandes

Sur le gel électrophorétique nous avons remarqué que certains profils (essentiellement des bactéries Gram +) sont de mauvaise résolution et cela peut être expliqué par :

1. La présence d'exo-polysaccharides ou de matériel capsulaire dans l'échantillon du dépôt qui peut engendrer un profil protéique de résolution médiocre ou barbouillé.
2. La méthode de préparation des échantillons qui dépend essentiellement de l'hypersensibilité des bactéries étudiées vis-à-vis les différentes méthodes de rupture cellulaire. Généralement, il y'a deux méthodes de rupture cellulaire : une méthode chimique et une méthode physique (mécanique). La majorité des bactéries Gram négatif sont sensible à rupture directe par SDS et d'autres sont si fragiles au point où la rupture des membranes et de la paroi peuvent avoir lieu par une simple modification de conditions osmotiques. Cependant, les bactéries Gram positif posent plus de problèmes et sont relativement plus robustes et moins souple envers la rupture chimique. Des digestions enzymatiques sont prévues dans ce cas en utilisant des lysozymes (J. Howard et *coll.*, 1995).



Photographie 8- Photographie du gel électrophorétique No. 1



Photographie 9- Photographie du gel électrophorétique No. 2

VI-3- Traitement statistique des données

La lecture biochimique des profils électrophorétiques repose sur l'établissement d'un diagramme type qui rapporte sous forme binaire (0,1), respectivement l'absence ou la présence de chacune des bandes protéiques sur le profile des bactéries.

Les profils protéiques des 16 isolats étudiés ainsi qu'une souche de référence sont traités en deux collections par une CAH (Classification Ascendante Hiérarchique). Nous avons réalisé des tableaux binaires (Annexe 4) sur la base de présence ou d'absence d'une bande protéique chez les différents isolats. Le reste des calculs est effectué par ordinateur à l'aide du logiciel XLstat (Addinsoft).

La première étape consiste à calculer les coefficients de similitude entre les souches prises deux à deux. Il existe plusieurs formules proposées, mais nous avons utilisé une formule de similarité générale, symétrique, qui tient compte des résultats positifs et des résultats négatifs.

$$Cs = \frac{N(1,1) + N(0,0)}{N(1,1) + N(1,0) + N(0,1) + N(0,0)}$$

Où :

Cs : coefficient de similitude

N(1,1) est le nombre des bandes présentes chez les deux isolats

N(0,0) est le nombre des bandes absentes chez les deux isolats

N(1,0) et N(0,1) est le nombre des bandes présentes chez l'un des isolats absentes chez l'autre.

À partir de ces pourcentages de similitude entre les différents isolats, une matrice de distance ($D = 1 - Cs$) est établie, les isolats sont alors comparés en fonction de ces distances.

Tableau 5 : Matrice de proximité (dissimilarité générale) pour la première collection des isolats.

| | A | B | C | F | G | H | I | J | L | M | 2A | 2C | Hs1 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| A | 0 | | | | | | | | | | | | |
| B | 0,511 | 0 | | | | | | | | | | | |
| C | 0,044 | 0,511 | 0 | | | | | | | | | | |
| F | 0,622 | 0,289 | 0,622 | 0 | | | | | | | | | |
| G | 0,622 | 0,289 | 0,622 | 0,000 | 0 | | | | | | | | |
| H | 0,622 | 0,289 | 0,622 | 0,000 | 0,000 | 0 | | | | | | | |
| I | 0,133 | 0,556 | 0,089 | 0,622 | 0,622 | 0,622 | 0 | | | | | | |
| J | 0,133 | 0,556 | 0,089 | 0,622 | 0,622 | 0,622 | 0,000 | 0 | | | | | |
| L | 0,200 | 0,578 | 0,156 | 0,600 | 0,600 | 0,600 | 0,111 | 0,111 | 0 | | | | |
| M | 0,311 | 0,556 | 0,356 | 0,711 | 0,711 | 0,711 | 0,400 | 0,400 | 0,422 | 0 | | | |
| 2A | 0,644 | 0,356 | 0,644 | 0,200 | 0,200 | 0,200 | 0,644 | 0,644 | 0,622 | 0,644 | 0 | | |
| 2C | 0,644 | 0,311 | 0,644 | 0,156 | 0,156 | 0,156 | 0,644 | 0,644 | 0,622 | 0,689 | 0,044 | 0 | |
| Hs1 | 0,178 | 0,511 | 0,133 | 0,578 | 0,578 | 0,578 | 0,222 | 0,222 | 0,244 | 0,400 | 0,600 | 0,556 | 0 |

Des phénogrammes qui illustrent la relation entre les isolats d'une collection donnée et entre les groupes contenus dans cette collection sont en fin élaborés.

Sur le premier phénogramme, sont notés en ordonnée les 13 isolats de la 1ère collection, regroupés en fonction de leur similitude, et en abscisse les distances taxonomiques.

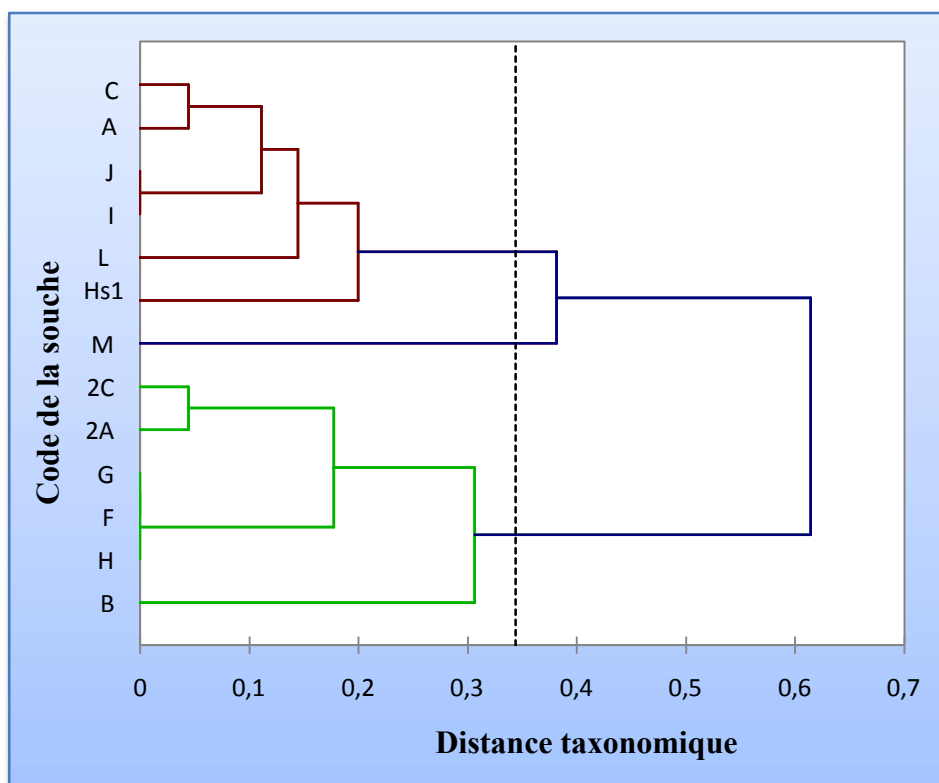


Figure 13 - Phénogramme simplifié de la classification, réalisé à partir de l'étude d'électrophorégramme protéique de la première collection de bactéries.

Le partitionnement des isolats en groupes se fait par une coupure arbitraire de l'arbre. La détermination du niveau de coupure donne la distance taxonomique 0,34 comme la plus propice pour l'obtention de groupes d'isolats homogènes : C1, C2 et C3.

Le groupe C1 est composé de 5 isolats (C, A, J, I, L) et la souche de référence Hs1 qui sont toutes des bactéries à Gram négatif. Ce groupe est assez homogène, avec 80% d'homogénéité, mais nous pouvons distinguer à l'intérieur 2 sous-groupes :

- Le sous-groupe 1 : qui contient les isolats A et C similaires à 95,6 %.

- Le sous-groupe 2 : contenant les isolats I et J qui sont similaires à 100%.

Le groupe C2 est composé d'une seule bactérie à Gram négatif (M).

Le groupe C3 contient 6 isolats (2C, 2A, G, F, H, B) qui présentent 70% d'homogénéité. Au sein de ce groupe nous distinguons 2 sous-groupes :

- Le sous-groupe 1 : contenant les isolats 2A et 2C qui sont similaires à 95,6%.
- Le sous-groupe 2 : avec 100% de similarité entre les isolats F, G et H.

Sur le deuxième phénoграмme, on note les 15 isolats de la deuxième collection en ordonnée et les distances taxonomique qui les séparent en abscisse.

Tableau 6 : Matrice de proximité (dissimilarité générale) pour la première collection des isolats.

| | Hs1 | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | 2A | 2B | 2C |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| Hs1 | 0 | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 0,509 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| C | 0,327 | 0,473 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| D | 0,473 | 0,509 | 0,364 | 0 | | | | | | | | | | | |
| E | 0,491 | 0,309 | 0,455 | 0,491 | 0 | | | | | | | | | | |
| F | 0,491 | 0,309 | 0,455 | 0,491 | 0,000 | 0 | | | | | | | | | |
| G | 0,491 | 0,309 | 0,455 | 0,491 | 0,000 | 0,000 | 0 | | | | | | | | |
| H | 0,491 | 0,309 | 0,455 | 0,491 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0 | | | | | | | |
| I | 0,364 | 0,509 | 0,509 | 0,473 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0 | | | | | | |
| J | 0,364 | 0,509 | 0,509 | 0,473 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0,000 | 0 | | | | | |
| K | 0,545 | 0,545 | 0,582 | 0,545 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0,491 | 0,291 | 0,291 | 0 | | | | |
| L | 0,418 | 0,527 | 0,491 | 0,455 | 0,545 | 0,545 | 0,545 | 0,545 | 0,200 | 0,200 | 0,236 | 0 | | | |
| 2A | 0,455 | 0,309 | 0,455 | 0,418 | 0,182 | 0,182 | 0,182 | 0,182 | 0,527 | 0,527 | 0,527 | 0,582 | 0 | | |
| 2B | 0,455 | 0,309 | 0,455 | 0,418 | 0,182 | 0,182 | 0,182 | 0,182 | 0,527 | 0,527 | 0,527 | 0,582 | 0,000 | 0 | |
| 2C | 0,436 | 0,327 | 0,436 | 0,436 | 0,200 | 0,200 | 0,200 | 0,200 | 0,545 | 0,545 | 0,545 | 0,600 | 0,018 | 0,018 | 0 |

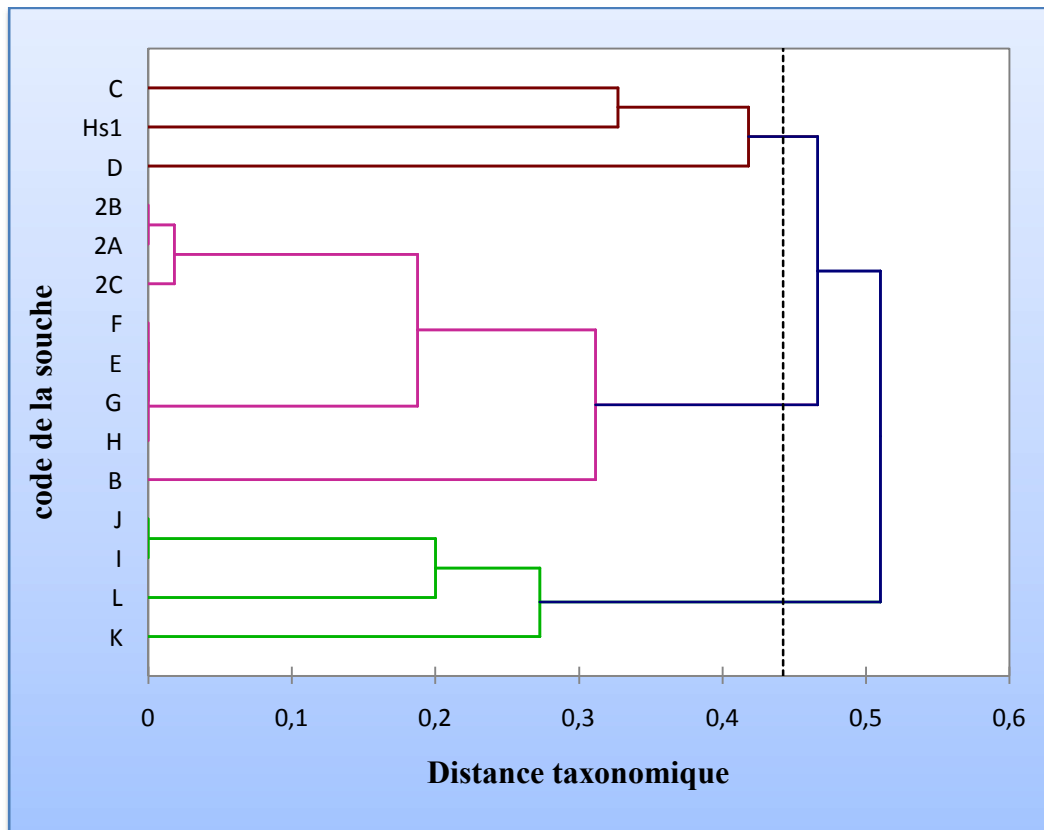


Figure 14 - Phénogramme simplifié de la classification, réalisé à partir de l'étude d'électrophorogramme protéique de la deuxième collection de bactéries.

La coupure à une distance taxonomique de 0.44 fournit également 3 groupes qui sont C1', C2' et C3'.

Le groupe C1' est composé de 2 isolats (C, D) et de la souche de référence Hs1, constituant une classe de bactéries à Gram négatif homogène à 60%. Un sous-groupe formé par l'isolat C et la souche de référence Hs1 est distingué à l'intérieur de ce groupe avec 69% de similarité.

Le groupe C2' est composé de 8 isolats (2B, 2A, 2C, F, E, G, H, B) à Gram positif. C'est un groupe qui présente une homogénéité de 70% et qui comporte 3 sous-groupes :

- Le sous-groupe 1 : qui contient les isolats 2A et 2B similaires à 100 %.
- Le sous-groupe 2 : composé des isolats 2C avec 2A et 2B qui sont similaires à 98%.
- Le sous-groupe 3 : contenant les isolats F, E, G et H similaires à 100%.

Le groupe C3' contient 4 isolats (J, I, L, K) à Gram négatif qui présentent 73% d'homogénéité. Au sein de ce groupe nous distinguons 2 sous-groupes :

- Le sous-groupe 1 : contenant les isolats I et J qui sont similaires à 100%.
- Le sous-groupe 2 : composé des isolats L avec I et J qui sont similaires à 80%.

D'après les constats sur les deux phénogrammes, nous supposons que :

- Les isolats A, C, D, I, J et L font partie du même genre que la souche de référence Hs1, qui est un *Pseudomonas sp.*
- Les isolats I, J sont identiques, c'est probablement la même souche.
- Les isolats B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C, font partie du même genre, que nous supposons être un *Bacillus sp.*
- Les isolats 2A et 2B sont identiques, il s'agit donc de la même souche.
- Les isolats E, F, G et H sont également identiques et constituent éventuellement la même souche.

Comme résumé aux résultats obtenus de l'identification phénotypique des souches bactériennes ainsi que l'étude des relations de parenté à travers les phénogrammes établies, nous avons réparti nos bactéries comme suit :

Les isolats A, C, D, I, J, L, M appartiennent au même genre que celui de la souche de référence Hs1, qui est le *Pseudomonas*, mais probablement à différentes espèces:

- Les souches A, C, D appartiennent à l'espèce *P. pickettii*
- Les isolats I et J constituent la même souche qui fait partie de l'espèce *P. solanacearum*
- Les souches L et M sont des *P. putida*.

L'isolat K appartient à l'espèce *Enterobacter amnigenus* biogroupe 1.

Les isolats B, E, F, G, H, 2A, 2B et 2C font partie de la même espèce qui est *Bacillus megaterium* tout en étant des souches différentes. Les isolats E, F, G, H constituent la même souche. De même pour les isolats 2A et 2B.

La mise en culture des bactéries contenues dans du sol mouillé au pétrole, sur un milieu minéral additionné de glucose et de 2% de kérosène comme sources de carbone, a permis la croissance de plusieurs colonies bactériennes. Ces bactéries, sont capables de dégrader le pétrole brut dans leur biotope naturel, chose qui a été confirmée par les travaux de plusieurs chercheurs (Samadi et coll., 2007, Sepahi et coll., 2008).

Le choix de source de carbone influence fortement la production de biosurfactants. L'addition de l'hydrocarbure au milieu de culture améliore la synthèse de biosurfactants par les bactéries (Parkinson, 1985). Bien que dans la majorité des cas, l'hydrocarbure peut être utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, certaines bactéries ont besoin de la présence d'un autre composé organique pour un métabolisme efficace (Shao, 2009).

L'utilisation du glucose comme deuxième source de carbone, avec l'hydrocarbure, permet d'obtenir un rendement plus élevé en biosurfactants. D'une part les bactéries acidifient le milieu en consommant le glucose, ce qui rend le pH favorable à la production (Samadi et coll., 2007, Krepsky et coll., 2007) d'autre part la biomasse bactérienne sera importante pour assumer la dégradation.

Grâce à l'établissement des profils morphologique et métabolique des isolats par les techniques standards, nous avons pu les classer parmi deux phylums : les Firmicutes (B, E, F, G, H, 2A, 2B, 2C) et les Protéobactéries (A, C, D, I, J, K, L, M). Des caractères comme : la présence de spores, la présence de pigments, rangent les bactéries dans des ordres, des familles puis des genres.

L'interprétation des profils électrophorétiques, montre un polymorphisme entre les différents isolats appartenant au deux phylum précités, et une homogénéité au sein de chaque groupe. Certains isolats ont montré une identité dans leurs profils protéiques ; laissant supposer qu'il s'agit d'une même souche. C'est le cas de l'isolat I avec J, 2A avec 2B, ainsi que les isolats E, F, G, H.

L'identification de ces isolats mène vers trois genres bactériens qui sont *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* et *Enterobacter sp.* Des résultats similaires ont été obtenus par Bento et ces collaborateurs en 2005.

L'étude phylogénétique par Bodour et ces collaborateurs (2003) confirme l'appartenance des souches productrices de biosurfactants à 3 divisions du phylum Eubacteria : la division des Protéobactéries, celle des CFB (Cytophaga, Flexibacter, Bacteroides) et celle des Firmicutes.

D'après les résultats obtenus, peu de genres bactériens sont capables de survivre dans des sols contaminés au pétrole et de synthétiser les biosurfactants.

Les échantillons de sol prélevés à différentes distances du bac de stockage du pétrole brut, contiennent probablement des concentrations différentes de pétrole. Logiquement, plus on s'approche du bac, plus l'échantillon sera saturé par le pétrole, chose qui explique la couleur noire de l'échantillon et la diminution de populations microbienne.

Les quantités de pétrole absorbées par le sol depuis 39 ans, exercent une sélection par enrichissement *in situ*. Dans ces environnements, la diversité microbienne diminue et seule des souches capables d'utiliser les hydrocarbures survient et prédominent (Huang et coll., 2010). Ces données peuvent expliquer la prédominance des deux genres bactériens identifiés (*Bacillus* et *Pseudomonas*) sur le reste des populations, mais sans pour autant négliger l'importance de chaque membre de la communauté microbienne qui fonctionne en consortium. D'ailleurs, 18% seulement de nos isolats initiaux étaient capables de synthétiser les biosurfactants, ceci dit que les 82% qui restent ont leur importance dans le maintien d'équilibre au sein de cette population.

La réalisation du test d'émulsification selon le protocole de Zajic nous a permis de tirer des informations sur la capacité synthétique de nos souches. L'émulsion obtenue restait stable pendant plus d'une semaine. Krepsky et ses collaborateurs ont pu avoir cette stabilité pendant une semaine. Elle constitue un indice de la présence des biosurfactants dans le milieu

Après comparaison du taux d'émulsion entre trois bactéries, Mehdi et ses collaborateurs (2008) se sont rendu compte que *Pseudomonas* est plus efficace en dégradation du pétrole brut que *Bacillus* et *Rhodococcus*. Nous avons obtenu ces mêmes résultats en comparant les taux d'émulsification de nos groupes bactériens par calcul de leur index d'émulsification (E24).

Il est maintenant bien établi que bon nombre de bactéries indigènes des biotopes littoraux et sahariens de l'Algérie, provenant particulièrement des sols pollués aux hydrocarbures, sont capables de synthétiser des molécules tensioactives ou biosurfactants, dont la principale propriété est de réduire fortement la tension de surface de l'eau, leur permettant ainsi une adaptation à la nouvelle source de carbone et d'énergie.

Cependant, cette capacité reste fonction de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques interagissant pour favoriser ou défavoriser la production bactérienne des biosurfactants.

L'application de techniques classiques standardisées dans l'identification bactérienne a permis de répartir les 16 isolats sur deux phylum: Firmicutes et Proteobacteria, et a révélé certains caractères distinctifs des genres laissant supposer qu'il s'agit principalement des genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*.

L'approche phénotypique reste cependant limitée à un diagnostic présomptif, qui devrait être consolidé par des techniques plus performantes en allant vers la moléculaire. D'autant plus que la mise en culture ne prend en compte que la minorité de bactéries non exigeantes et cultivables, et cela soulève une question importante : est-ce que cette catégorie reflète vraiment la biodiversité tellurique ?

Dans le futur, il faudra envisager de considérer de manière plus approfondie les conditions environnantes, et leur influence sur la diversité de cette population bactérienne et de combiner techniques phénotypiques et moléculaires afin d'apporter des réponses concernant la systématique bactérienne. Il faudra, d'autre part, évaluer les potentialités de biosurfactants bactériens pour élargir le champ d'exploitation de ces biomolécules.

Références Bibliographiques

- **Alain K., 2003.** Approches Culturelles Et Moléculaires Des Assemblages Microbiens Associés Aux Polychètes Hydrothermaux De La Famille Alvinellidae, Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, 197p.
- **Al-Araji L., Abd Rahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B., 2007.** Minireview : Microbial Surfactant. (*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, **Vol. 15** No.3, p. 99-105.
- **Amann R., Kuhl M., 1998.** *In-situ* methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* **Vol. 1** p. 352-358.
- **Banat I. M., 1995.** Biosurfactants Production And Possible Uses In Microbial Enhanced Oil Recovery And Oil Pollution Remediation: A Review. *Bioresource Technol.* **Vol. 51**, p. 1–12.
- **Begon M., Harper J.L., Townsend C.R., 1996.** Ecology: individuals, populations and communities. 3rd Edition. Blackwell Science Eds. Oxford. 1068 p.
- **Bodour A., Drees K. P., Maier R. M., 2003.** Distribution Of Biosurfactant-Producing Bacteria In Undisturbed And Contaminated Arid Southwestern Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **Vol. 69**, No. 6, p. 3280–3287.
- **Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R., 1957.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th edition, USA, 1094 p.
- **Cameotra S. S. , Singh P., 2009.** Synthesis Of Rhamnolipid Biosurfactant And Mode Of Hexadecane Uptake By *Pseudomonas* Species, *Microb Cell Fact.* **Vol. 8**, No. 16.
- **Celik G. Y., Aslim B. , Beyatli Y., 2008.** Enhanced Crude Oil Biodegradation And Rhamnolipid Production By *Pseudomonas stutzeri* strain G11 In The Presence Of Tween-80 And Triton X-100, *J. Environ. Biol.* **Vol.29**, No. 6, p. 867-870.
- **Cooper D.G., Goldenberg B. G. , 1987.** Surface-Active Agents From Two *Bacillus* Species, *appl. environ. microbiol.* **Vol. 53**. No. 2. p. 224-229.
- **Christofi N., Ivshina I.B, 2002.** Microbial Surfactants And Their Use In Field Studies Of Soil Remediation. *J. Appl. Microbiol.* **Vol.93**, p. 915–929.
- **Dashti N., Al-Awadhi H., Khanafer M., Abdelghany S., Radwan S., 2008.** Potential Of Hexadecane-Utilizing Soil-Microorganisms For Growth On Hexadecanol, Hexadecanal And Hexadecanoic Acid As Sole Sources Of Carbon And Energy, *Chemosphere*, **Vol.70**, p.475–479 .

- **Delarras C., 2007.** Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou De Contrôle Sanitaire, 1^{ère} édition, Paris : Edition tec et doc, 476 p.
- **Desai J. D., Banat I. M., 1997.** Microbial Production Of Surfactants And Their Commercial Potential, *microbiol. and mol. Biol. Reviews*, **Vol. 61**, No. 1, p. 47–64.
- **Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., 2005.** Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edition, **Vol. 2**, 304p.
- **Gauthier D., 2009.** Introduction aux techniques utilisées en biochimie. Groupe AFNOR, <http://www.chimiebiochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/electro.html>, dernière mise à jour :19 juin 2009.
- **Grimont P. A. D., 2002.** Risque Bactériologique : Repérage Des Souches, *C. R. Biologies*, **Vol. 325**, p. 901–906.
- **Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T., 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, USA, 787p.
- **Howard J., Whitcombe D. M., 1995.** Diagnostic bacteriology protocols, Humana Press, New jersey, **Vol. 46**, 283p.
- **Huang X. F., Guan W., Liu J., Lu L. J., Xu J. C., Zhou Q., 2010.** Characterization And Phylogenetic Analysis Of Biodemulsifier-Producing Bacteria, *Bioresource Technology*, **Vol.101**, p.317–323.
- **Hultberg M., Bergstrand K. J., Khalil S., Alsanus B.,** Characterisation Of Biosurfactant-Producing Strains Of Fluorescent Pseudomonads In A Soilless Cultivation System, *J. Antonie Van Leewenhoek*, 2008. **Vol. 94**, p. 329-334.
- **Joffin J.N., Leyral G., 2006.** Microbiologie technique-T1- Dictionnaire des techniques, 4^{ème} édition , Bordeaux : CRDP d'Aquitaine, 368 p.
- **Karanth N. G. K., Deo P. G., Veenanadig N. K., 1999.** Microbial Production Of Biosurfactants And Their Importance, *Current science*, **Vol. 77**, No. 1, p.116-126.
- **Kosaric N., Gray N. C. C., Cairns W. L. 1983.** Microbial Emulsifiers And De-emulsifiers, p. 575–592. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, **Vol. 3**. Verlag Chemie, Deerfield Beach, Fla.
- **Krepesky, N., Da Silva, F.S., Fontana, LF.,Crapez, M.A.C, 2007.** Alternative Methodology For Isolation Of Biosurfactant-Producing Bacteria, *Braz. J. Biol.*, **Vol. 67**, No.1, p. 117-124.
- **Laemmli U. K., 1970.** Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nat.* **Vol. 227**, p.680-685.

- **Lecointre G., Guyader H., Visset D., 2001.** Classification Phylogénétique Du Vivant, 3^{ème} édition revue et augmentée, Paris: Edition Belin, 98p.
- **Maier R. M., 2003.** Biosurfactants: Evolution And Diversity In Bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **Vol. 52**, p. 101–121.
- **Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P., 2009.** Environmental Microbiology, 2^{ème} édition, 598 p.
- **Margaritis A., Zajic J. E., Gerson D. F., 1979.** Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotech. and Bioeng.*, **Vol. 21**, p1151-1162.
- **Marqués A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M.J., 2009.** The Physicochemical Properties And Chemical Composition Of Trehalose Lipids Produced By *Rhodococcus erythropolis* 51T7, *Chem. Phys. Lip.* **Vol.158**, p.110–117.
- **Mathieu C., Pielain F., 2003.** Analyse Chimique Des Sols - méthodes choisies, 1^{ère} édition, France: Edition Tec et Doc, 388p.
- **Mehdi H., Giti E., 2008.** Investigation Of Alkane Biodegradation Using The Microtiter Plate Method And Correlation Between Biofilm Formation, Biosurfactant Production And Crude Oil Biodegradation, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **Vol. 62**, No. 2 , p.170-178
- **Meylheuc T. , Herry J. M. , Bellon-Fontaine M. N., 2001.** Les Biosurfactants, Des Biomolécules A Forte Potentialité D'application, *J. Sciences des aliments* **Vol. 21**, No. 6, p. 591-649.
- **Mulligan C. N., 2009.** Recent Advances In The Environmental Applications Of Biosurfactants, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **Vol. 14**, No. 5, p. 372-378.
- **Ndiaye A., Sylla S.N., Gueye M., Delajudie P., Ndoye I., 2002.** Utilisation De La Technique D'électrophorèse Des Protéines Totales Sur Gel De Polyacrylamide-Sds (Sds-Page) Pour L'étude De La Diversité Des Rhizobiums D'*acacia tortilis* (forsk.) hayne subsp. *raddiana* (savi) brenan. (*AJST*) *Sci. and Engin.* **Vol. 3**, No. 1, p. 33-43.
- **Ochsner A., Reiser J., Fiechter A., Witholt B., 1995.** Production Of *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipid Biosurfactants In Heterologous Hosts, *Appl. Envir. Microbiol.*, **Vol. 61**, No. 9, p. 3503-3506.
- **Ollivier B., Magot M. , 2005.** Petroleum Microbiology, Édition illustrée , Éditeur ASM Press, 365 p.
- **Parkinson M., 1985.** Bio-surfactants, *Biotechnology Advances*, **Vol. 3**, Issue 1, p.65-83.

- **Prabhu Y., Phale P., 2003.** SB PP2 Novel Metabolic Pathway, Role Of Biosurfactant And Cell Surface Hydrophobicity In Hydrocarbon Assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **Vol. 61**, p. 342–351.
- **Prescott L. M. , Harley J. P. , Klein D. A. , Bacq-Calberg C. M. , Dusart J. ,** Microbiologie, 2^{ème} Édition, Traduit par : Claire-Michèle Bacq-Calberg, Jean Dusart, Éditeur De Boeck Université, 2003. 1164 p.
- **Priest F. G. , Austin B. , 1993.** Modern Bacterial Taxonomy, 2^{ème} Édition illustrée, Éditeur Springer, 228 p.
- **Prommachan O., 2002.** Production And Application Of Biosurfactant From *Bacillus* MUV4, Master of science thesis of biotechnology, Prince of songkla university, Thaïland, 70 p. PDF/Nature of biosurfactants.
- **Pruthi V., Cameotra S. S., 1995.** Rapid Method For Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained By Acetone Precipitation, *Biotechnol. Techniq.* **Vol. 9**, p. 271–276.
- **Raza Z. A., Khan M. S., Khalid Z. M., 2007.** Evaluation Of Distant Carbon Sources In Biosurfactant Production By A Gamma Ray-Induced *Pseudomonas putida* Mutant, *Process Biochemistry*, **Vol. 42**, p.686-692.
- **Rodrigues L., Banat I. M. , Teixeira J., Oliveira R. , 2006.** Biosurfactants : Potential Applications In Medicine, *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **Vol. 57**, n°4, pp. 609-618
- **Rodriguez-Nava V., Laurent F., Couble A., Boiron P., 2007.** Identification Phénotypique Et Moléculaire Des Bactéries Appartenant Au Genre *Nocardia*, *Revue Francophone des Laboratoires*, **Vol 2007**. No. 391, p.49-56.
- **Rosenberg E., 1993.** Exploiting Microbial Growth On Hydrocarbon: New Markets. *Trends Biotechnol.* **Vol.11**, p.419–424.
- **Samadi N., Abadian N., Akhavan A., Fazeli M. R., Tahzibi A., Jamalifar H., 2007.** Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil, *J. Biol. Sci.* **Vol. 7**, No. 7, p. 1266-1269.
- **Sarubbo L. A., De Luna J. M., De Campos-Takaki G. M.,** Production And Stability Studies Of The Bioemulsifier Obtained From A New Strain Of *Candida glabrata* UCP 1002, *Elect. J. Biotech.* July 2006. **Vol.9** No.4 ISSN: 0717-3458.
- **Savarino P., Montoneri E., Bottigliengo S., Boffa V., Guizzetti T., Perrone D., Mendichi R., 2009.** Biosurfactants From Urban Wastes As Auxiliaries For Textile Dyeing, *Ind. & engin. Chem. Research* **Vol. 48**, No.8, p. 3738-3748 .

- **Sepahi A. A., Golpasha I. D., Emami M., Nakhoda A. M., 2008.** Isolation And Characterization Of Crude Oil Degrading *Bacillus Spp.* *Iranian Journal of Environ. Health Sci. Engin.*, **Vol. 5**, No. 3, p. 149-154.
- **Shao Z., 2009.** Enrichment And Isolation Of Hydrocarbons Degraders, *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* , Edition Springer Berlin Heidelberg part 3, **Vol.4**, p. 3777-3785.
- **Singh A. , Ward O. P. , 2004.** Biodegradation And Bioremediation, **Vol. 2** de Soil biology, Édition illustrée, Éditeur Springer, 309 p.
- **Soltani M., 2004.** Distribution Lipidique Et Voies Métaboliques Chez Quatre Bactéries Gram-Négatives Hydrocarbonoclastes. Variation En Fonction De La Source De Carbone, These de doctorat en chimie analytique, Université paris 6, 284p.
- **Suwansukho P., Rukachisirikul V., Kawai F., Kittikun A. H., 2008.** Production And Applications Of Biosurfactant From *Bacillus subtilis* MUV4, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **Vol. 30**, No.1, p. 87-93.
- **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J., 1996.** Polyphasic Taxonomy, A Consensus Approach To Bacterial Systematics, *Microbiological Reviews*, **Vol. 60**, No. 2, p. 407–438.
- **Vandecasteele J. P., Monot F. , Ballerini D. , 2002.** La Microbiologie Des Produits Pétroliers Et Ses Applications, *L'actualité chimique*, No. 256, p. 58-62.
- **Vandecasteele J. P., 2008.** Petroleum Microbiology, Editions TECHNIP, Paris, 816 p.
- **Woese C. R., Kandler O., Wheelis M.L., 1990.** Towards A Natural System Of Organisms: Proposal For The Domains Archaea, Bacteria, And Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **Vol. 87**, No.12, p. 4576–4579.
- **Xiaoyang L., Abbott N. L., 2009.** Spatial And Temporal Control Of Surfactant Systems, *J. Colloid and Interface Science*, **Vol. 339**, p. 1–18.
- **Zajic J. E., Guignard H., Gerson D. F., 1977.** Properties And Biodegradation Of A Bioemulsifier From *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnol. and Bioeng.* **Vol. 19** No. 9, p.1303 – 1320.

Annexe 1: Composition des milieux de culture et tests biochimiques préparés

Solution de révélation

- Oil red O (colorant d'huile) 0.008g
- Kérosène 200 mL

Milieu de conservation

- K₂HPO₄ 5g
- KH₂PO₄ 2g
- MgSO₄ 2g
- NaCl 0.1g
- Extrait de levures 3g
- NaNO₃ 5g
- Fructose 10g
- Agar 15g
- H₂O QSP 1L
- pH= 6.5

Clark et lubs

- Peptone tryptique ou polypeptone 7g
- glucose 5g
- K₂HPO₄ 5g
- H₂O QSP 1L
- pH= 7.5

Gélose à l'amidon

- Peptone 5g
- Amidon 10g
- Agar 20g
- H₂O QSP 1L
- pH= 6.8

Gélose à la gélatine

- Agar 15g
- Gélatine 15g
- Péptone 4g
- Extrait de levure 1g
- H₂O QSP 1L
- pH= 7.2

Annexe 2: Composition des solutions d'électrophorèse

Tampon de lyse:

| | |
|----------------------------|-----------|
| - Tris | 25mM |
| - Glycérol | 192 mM |
| - SDS | 2.5% |
| - β -mercaptoéthanol | 2.5% |
| - bleu de bromophénol | 5mg |
| - H ₂ O | QSP 200ml |

Solution d'acrylamide:

| | |
|-----------------------|-----------|
| - Acylamide 30% | 60g |
| - Bis acrylamide 0.8% | 1.6 g |
| - H ₂ O | QSP 200ml |

Tampon de gel de séparation (TGS): Tris-HCL 3M pH 8.8

| | |
|-------------------------|-----------|
| - Tris 3M | 72.7g |
| - SDS 0.8% | 1.6g |
| - Mercaptoéthanol (MCE) | 0.8ml |
| - H ₂ O | QSP 200ml |
| - pH = 8.8 | |

Tampon de gel de tassement (TGT) : Tris-Hcl 0.5M pH 6.8

| | |
|--------------------|-------------|
| - Tris 0.5M | 12.1g |
| - SDS 0.4% | 0.8% |
| - (MCE) 0.2% | 400 μ l |
| - H ₂ O | QSP 200ml |
| - pH = 6.8 | |

Gel de separation (resolving gel) à 12%

| | |
|---------------------------------|--------------|
| - Solution d'acrylamide | 10.4ml |
| - Tampon resolving | 3.14ml |
| - Tetraméthylènediamine (TEMED) | 12.5 μ l |
| - H ₂ O | QSP 25ml |

Gel de concentration (Stacking gel) à 7.5 %

| | |
|-------------------------|------------|
| - Solution d'acrylamide | 5ml |
| - Tampon stacking | 5ml |
| - TEMED | 20 μ l |
| - H ₂ O | QSP 20ml |

Juste avant de couler chaque gel ajouter du persulfate d'ammonium (ammonium-peroxodisulfate) 15%

Préparer 0.15 g de persulfate dans 1ml d'eau distillée et ajouter au:

- Resolving gel 140 μ l
- Stacking gel 200 μ l

Tampon de migration Ph 8.3

- Tris 0.025M 1.06g
- Glycine 0.192M 5.04g
- SDS 0.1% 0.35g
- (MCE) 0.05% 175 μ l
- H₂O QSP 350ml

Solution de coloration:

- Solution mère (bleu de Comassie et de méthanol) 25ml
- Acide tricholacétique (TCA) à 60% 40ml
- Eau distillée QSP 200ml

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|--------|---|---|---|---|-----|
| Kligler-Hajna (Glucose) | + | - | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Lactose | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| H2S | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gaz | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| ONPG | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - | + | + |
| Amidon | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + |
| VP | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + |
| RM | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - |
| Citrate de Simmons | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + | + |
| Acide acétique | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Gélatinase | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| ADH | - | + | - | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| LDC | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | + | + | - |
| ODC | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - |
| Urease | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | + |
| Tryptophanase | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lécithinase | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | +/- |
| King B | - | / | - | - | / | / | / | / | - | - | - | + fluo | + fluo | / | / | / | - | - |
| Gélose S-S | + | / | + | + | / | / | / | / | - | - | + | + | + | / | / | / | + | + |

Pig : pigmentation, Fluo : fluorescence de la culture sous UV.

Annexe 4 : Diagrammes types des gels électrophorétiques

Tableau 9 : Diagramme type du gel No.1

| Numéro de bande | Mobilité Réelle (cm) | A | B | C | F | G | H | I | J | L | M | 2A | 2C | Hs1 |
|-----------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|-----|
| 1 | 1.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 2.6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 4.2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 4.5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | 4.8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 5.0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 7 | 5.1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 5.2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | 5.8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 10 | 6.0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 6.6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 12 | 6.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 13 | 7.1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 14 | 7.5 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 15 | 7.8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 16 | 8.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 8.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 9.1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 19 | 9.6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 20 | 9.8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 10.0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 22 | 10.3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 23 | 11.0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | 11.2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 25 | 11.7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 26 | 12.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | 12.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 28 | 12.7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 29 | 12.9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 30 | 13.2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 31 | 14.0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 32 | 14.5 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 14.9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 34 | 15.5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | 16.0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | 16.3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 37 | 16.7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 38 | 17.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 39 | 17.8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 40 | 18.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 41 | 18.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | 18.7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 43 | 19.1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 44 | 19.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 45 | 19.9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |

Annexe 5 : Les grandes lignes de classification des Bacteries selon la deuxième édition du « *Bergey's manual of systematic bacteriology* », vol 2, 2005.

Domain *Bacteria* VP

Phylum BI. *Aquificae* VP

Class I. *Aquificae* VP

Order I. *Aquificales* VP (T)

Family I. *Aquificaceae* VP

- Genus I. *Aquifex* VP (T)
- Genus II. *Calderobacterium* VP
- Genus III. *Hydrogenobaculum* VP
- Genus IV. *Hydrogenobacter* VP
- Genus V. *Hydrogenothermus*VP
- Genus VI. *Persephonella* VP
- Genus VII. *Sulfurihydrogenibium* VP
- Genus VIII. *Thermocrinis* VP
- Genera incertae sedis
- Genus I. *Desulfurobacterium* VP
- Genus II. *Thermovibrio* VP

Phylum BII. *Thermotogae* VP

Class I. *Thermotogae* VP

Order I. *Thermotogales* VP (T)

Family I. *Thermotogaceae* VP

- Genus I. *Thermotoga* VP (T)
- Genus II. *Fervidobacterium* VP
- Genus III. *Geotoga* VP
- Genus IV. *Marinitoga* VP
- Genus V. *Petrotoga* VP
- Genus VI. *Thermosiphon* VP

Phylum BIII. *Thermodesulfobacteria*

VP

Class I. *Thermodesulfobacteria* VP

Order I. *Thermodesulfobacteriales* VP (T)

Family I. *Thermodesulfobacteriaceae*

- VP
- Genus I. *Thermodesulfobacterium* VP (T)

Phylum BIV. *Deinococcus- Thermus*VP

Class I. *Deinococci* VP

Order I. *Deinococcales* VP (T)

Family I. *Deinococcaceae* VP

- Genus I. *Deinococcus* VP (T)

Order II. *Thermales* VP

Family I. *Thermaceae* VP

- Genus I. *Thermus*AL (T)
- Genus II. *Marinithermus*VP
- Genus III. *Meiothermus*VP
- Genus IV. *Oceanithermus*VP
- Genus V. *Vulcanithermus*VP

Phylum BV. *Chrysiogenetes* VP

Class I. *Chrysiogenetes* VP

Order I. *Chrysiogenales* VP (T)

Family I. *Chrysiogenaceae* VP

- Genus I. *Chrysiogenes* VP (T)

Phylum BVI. “*Chloroflexi*”

Class I. “*Chloroflexi*”

Order I. “*Chloroflexales*”

Family I. “*Chloroflexaceae*”

- Genus I. *Chloroflexus* AL
- Genus II. *Chloronema* AL
- Genus III. *Heliothrix* VP
- Genus IV. *Roseiflexus* VP

Family II. *Oscillochloridaceae* VP

- Genus I. *Oscillochloris* VP (T)

Order II. “*Herpetosiphonales*”

Family I. “*Herpetosiphonaceae*”

- Genus I. *Herpetosiphon* AL

Phylum BVII. *Thermomicrobia* VP

Class I. *Thermomicrobia* VP

Order I. *Thermomicrobiales* VP (T)

Family I. *Thermomicrobiaceae* VP

- Genus I. *Thermomicrobium* AL (T)

Phylum BVIII. “*Nitrospira*”

Class I. “*Nitrospira*”

Order I. “*Nitrospirales*”

Family I. “*Nitrospiraceae*”

- Genus I. *Nitrospira* VP
- Genus II. *Leptospirillum* VP
- Genus III. *Magnetobacterium* VP
- Genus IV. *Thermodesulfobivrio* VP

Phylum BIX. *Deferribacteres* VP

Class I. *Deferribacteres* VP