

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة أمحمد بوقرة – بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

Faculté Des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de master Académique

Domaine : *Sciences de la nature et de la vie*

Filière : *Biotechnologie*

Spécialité : *Biotechnologie Microbienne*

THEME :

Criblage d'une collection de souches *Pseudomonas* spp et
Bacillus sp d'intérêt biotechnologique.

Présenter par :

Mlle BENKEMACHE Nour el houda Manel,

Mlle HAMMANI Imane.

Le jury composé de :

Mme SAHIR-HALOUANE. F

Pr. (UMBB)

Présidente.

Mme AIT KAKI. S

MCA (UMBB)

Examinatrice.

Mme BENZINA. F

MCA (UMBB)

Promotrice.

Année Universitaire 2020/2021.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

*En second lieu, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus vifs à notre promotrice Madame **Benzina Farida** qui a su nous guider et nous aider dans ce travail avec beaucoup de tact et de gentillesse et qui nous a permis de découvrir un domaine très intéressant. Qu'elle trouve ici notre estime et notre profond respect.*

*Nos remerciements les plus chaleureux et respectueux vont à Madame **Reghis Leila**, pour l'accueil chaleureux au niveau de laboratoire de corrosion au niveau du centre de recherche et développement CRD Boumerdès. Pour leur soutien, leur compréhensions et leur Encouragements leur aide précieuse sa gentillesse Nous sommes très heureuses de pouvoir vous exprimer notre gratitude.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Madame **SAHIR-HALOUEANE Fatma** D'avoir acceptée la présidence du jury de notre travail, qu'elle trouve ici toutes nous expressions respectueuses.*

*Nous adressons un grand merci à Mme : **AIT KAKI. S** de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire.*

*Parmi ces remerciements, une mention spéciale à Madame **Siham** la technicienne et responsable du laboratoire 15 de biotechnologie microbienne au niveau de la faculté de science avec qui nous avons pris un immense plaisir à travailler. Merci pour sa disponibilité, l'enthousiasme qu'elle a manifesté au cours de ce travail.*

*Nous tenons à remercier aussi Monsieur **Nacer** le responsable du magasin et la distribution des produits au niveau de la faculté. Merci pour son aide et ses conseils donnés tout au long du travail et merci pour sa disponibilité à tout moment qu'on a eu besoin de quelques choses.*

Un ENORME merci à tous ceux qui nous ont aidé, nous ont conseillé, nous ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms.

Nous tenons aussi à remercier tous les enseignants du département de la Biologie ainsi que tous les amis et les étudiants de master 2 promo de BTM 2021.

Manel & Imane

Dédicace :

Avant toute je remercie ALLAH, le tout puissant qui m'a donné, la foi, la patience et la santé durant toutes mes études et surtout en accomplissant cette modeste thèse.

A ma très chère mère « Zehira »

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher Père « Mohamed »

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon cher frère : « Zakaria » et mes sœurs : « Sara, Meriem, Amina, Asma, Khadija »

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon Affection.

A ma chère amie : « Yasmine »

Je tiens très fortement à te remercier également ma chère amie que Dieu a choisis de nous réunir, on a passé des moments inoubliables ensemble qui restera graver dans ma mémoire toute ma vie, je te

remercie pour ton soutien pour ton amour que tu m'as donné .Qui m'a pas cessé de me conseiller, encourager et me soutenir tout au long de cette année.

A la personne la plus cher pour moi

Sa fait déjà plusieurs années qu'on se connaît, on s'est éloigner certes, mais cela n'a rien changé entre nous. Tu es et tu resteras ma meilleure confidente. Tu es vraiment quelqu'un de cher à mes yeux, Je remercie le destin de m'avoir mis sur terre afin d'apporter la joie et le bonheur tu es pour moi mon cœur, la personne qui a su m'apprivoiser. Merci d'être pour moi une sœur, une meilleure amie la personne la plus proche pour moi

A ma chère binôme « Manel »

Je tiens à te remercie énormément mon amie et mon binôme avec qui j'ai pu préparer ce modeste mémoire .Je te remercie pour toute tes efforts pour ton aide et pour ton encouragements. On a pu ensemble dépasser toutes les difficultés et atteindre vers la fin notre principal objectif et rendre nos parents fiers de nous.

A mes très chers amis

Un grand merci à tous mes amis de loin ou de près pour votre encouragement et vos conseils qui m'ont beaucoup aidé durant toute l'année.

Imane

Grace Allah Je dédie ce travail :

A Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ta confiance totale... A toi mon cher papa « ABD EL HALIM », J'espère que je suis la bonne fille que tu es rêvé de l'avoir.

A toi ma chère maman « FATMA ZOËRA », J'ai une pensée toute particulière pour toi maman, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la personne la plus cher à mes yeux « LAWZ », je tiens fortement à te remercier pour ton soutien et ton encouragement. T'était la personne fidèle à moi qui n'a jamais pensé à me laisser seule dans les moments les plus difficiles de ma vie. Je remercie Dieu de t'avoir choisi et de nous réunir ensemble.

*A mes frères : **Khalef**, **Djihed**, et **Ahmed Yacine**, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous,*

*À mes chères tantes surtout **Amína** et mes oncles,*

*A ma chère grande mère « **FATMA** », que dieu bénéfice dans son vaste paradis.*

*A mes très chères amies **Asmaa** et **Romaïssa** avec qui je partage ma petite vie de tous les jours et qui m'ont soutenue moralement pendant toute cette période de préparation.*

*A ma chère binôme « **IMANE** », je tiens à te remercier de m'avoir soutenu dans ce travail qu'on a pu le préparé malgré toutes les difficultés qu'on a dépassé durant cette année.*

A tous mes amies, A tous mes collègues de promotion.

BENKEMACHE Nour el houda Manel

Liste des figures :

Figure 1 : Technique d'examen à l'état frais.

Figure 2 : La coloration de la spore.

Figure 3 : Présentation des types respiratoires.

Figure 4 : Remplissage des tubes.

Figure 5 : Production d'acide cyanhydrique (HCN).

Figure 6 : Test de la dispersion du pétrole.

Figure 7 : Test de l'indice de l'émulsification.

Figure 8 : Aspect macroscopique des souches bactériennes étudiées (Photos originales 2021).

Figure 9 : Aspect microscopique des souches bactériennes après coloration de Gram observée sous microscope optique (G 40×100) (Photos originales 2021).

Figure 10: aspect des spores chez les souches de *Bacillus* sous microscope photonique (G40X100) (Photos originales 2021).

Figure 11: Type respiratoire des souches (Photo originale 2021).

Figure 12: Résultats de test mannitol-mobilité. (Photo originale 2021).

Figure 13: Résultats de test de catalase observée à l'œil nu (photos originales 2021).

Figure 14: Résultats de test oxydase observé à l'œil nu. (Photo originale 2021).

Figure 15: Détection du pigment Pyoverdine sur milieu « King B » sous lumière UV (photo originale 2021).

Figure 16: Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches Bc2 et Bc7 après l'incubation (photos originales 2021).

Figure 17: Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches Bc2 et Bc7 après l'incubation (photos originales 2021).

Figure 18: Capture d'écran du programme d'identification en ligne (photo originale 2021)

Figure 19: Capture d'écran de l'affichage de l'onglet d'identification de la souche Ps2 Par le programme d'identification en ligne l'UPBM (photo originale 2021).

Figure 20: Représentation des résultats du test de la résistance des souches bactériennes vis-à-vis de dix antibiotiques

Figure 21 : Résultats de test antibiogramme sur les souches bactériennes Sp2, Sp7, Bc2 et Bc7 vis-à-vis de dix antibiotiques (photos originales 2021).

Figure 22 : activité caséinase des souches *Pseudomonas* spp fluorescents (photo originale 2021).

Figure 23 : Production de l'acide cyanhydrique HCN chez les souches *Bacillus* sp (Photo originale 2021).

Figure 24 : Présentation du test de dispersion du pétrole (Photos originales 2021).

Figure 25 : L'index d'émulsification chez les trois souches sélectionnées productrices des biosurfactants (Photos originales 2021).

Figure 26 : Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion E24% chez les différentes souches productrices de biosurfactants.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : les antibiotiques produits par certaines souches de *Pseudomonas*.

Tableau 2 : Substances antifongiques produites par quelques espèces des genres *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Tableau 3 : Familles et abréviations des antibiotiques.

Tableau 4 : Les caractères morphologiques des isolats.

Tableau 5 : les caractères physiologiques et biochimique des souches bactériennes étudiées.

Tableau 6 : résultats des galeries Api 20E des souches de Ps2, Ps7, Bc2 et Bc7.

Tableau 7 : Identification probable des souches isolées.

Tableau 8 : zone d'inhibition par la méthode de disques de diffusion.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques observées chez les souches de *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Tableau10 : Résultats du test de déplacement de l'huile pour différentes souches.

Liste des Abréviations :

- : négative.

% : Pourcentage.

+: Positive.

°C : Degré Celsius.

µm : Micromètre.

AAF : aéro-anaérobie facultatif.

AnS : anaérobie stricte.

API 20E : appareil et procédés d'identification 20 N entérobactéries.

AS : aérobie stricte.

ATB : antibiotique.

Bc : *Bacillus*.

Bc2 : souche *Bacillus*.

Bc7 : souche *Bacillus*.

BPB : Bromo-Phenol-Bleu.

CA SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Cm : Centimètre.

Cry : Protéine Crystal.

Cyt : protéine cytotoxique.

E24: Index d'émulsification.

ES : bactérie extrêmement sensible.

g : gramme.

G: Grossissement.

GN : gélose nutritive.

Gram+ : gram positif.

Gram- : gram négatif.

h : heure.

H₂O: l'Eau.

H₂O₂: l'Eau oxygénée.

HCN : Acide cyanhydrique.

He : Hauteur de l'émulsion formée.

Ht : Hauteur totale du mélange.

KB : milieu King B.

L : litre.

MA: micro-aérophile.

MF : McFarland.

min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

NaCl : Chlorure de Sodium.

nm : nanomètre.

O₂ : l'Oxygène.

PH : potentiel d'hydrogène.

PO₄ : phosphatase.

Ps : *Pseudomonas*.

Ps2 : souche *Pseudomonas*.

Ps7 : souche *Pseudomonas*.

PVK : Pikovskaya.

R : Résistante.

S: Sensible.

T : témoin.

T° : Température.

TGEA: Tryptophane Glucose Extract Agar.

tr : tour.

TS : bactérie très sensible.

TSA : Tryptone Soya Agar.

UV : Ultra-Violet.

V : Volume.

VF : milieu viande foie.

VIP : protéines végétatives insecticides.

Tableau des matières :

Introduction

Introduction générale	01
-----------------------	----

Chapitre I : Partie Bibliographique

I. Les <i>Pseudomonas</i>	03
I.1. Caractères généraux des <i>Pseudomonas</i>	03
I.2. Distribution écologique du genre <i>Pseudomonas</i>	03
I.3. Définition	03
I.4. Caractères génétiques	04
I.5. Taxonomie	04
I.6. Caractères cytologiques et biochimiques	04
I.7. Métabolites Secondaires possédant des propriétés de biocontrôle	05
I.7.1. Antibiotiques peptidique	05
I.7.2. Enzymes dégradant les parois fongiques	06
I.7.3. La chitinase, la β -1,3-glucanase et la cellulase	06
I.7.4. Cyanure d'hydrogène (HCN)	07
I.7.5. La production de biosurfactants	07
I.7.5.1. Définition	08
I.8. <i>Pseudomonas</i> et ses métabolites antifongiques	08
II. <i>Bacillus</i>	08
II.1. Définition de groupe <i>Bacillus cereus</i>	08
II.2. Les métabolites secondaires produits par les <i>Bacillus</i>	09
II.2.1. Les exotoxines	09
II.2.2. Les protéines Cyt	09
II.2.3. Les protéines Cry	09
II.2.4. Les exoenzymes	10
II.2.4.1. La chitinase	10
II.2.4.2. La protéase	10
II.2.4.3. D'autres enzymes produits par les <i>Bacillus</i>	10

➤ La cellulase	10
➤ Les estérases et les lipases	11
II.2.5. Les antibiotiques et les antifongiques produits par <i>B. thuringiensis</i>	11
II.2.5.1. Les antibiotiques	11
II.3. Intérêt de <i>Bacillus</i> dans la lutte Biologique	12
II.3.1. <i>Bacillus</i> et ses métabolites antifongiques	12
II.4. Facteur influençant la production d'antibiotique par les PGPR	12
II.5. Intérêt de <i>Bacillus</i> dans la lutte biologique	14

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I. Matériels	15
I.1. Matériel biologique	15
I.1.1. Souches bactériennes	15
I.2. Matériel non biologique	15
I.2.1. Equipements	15
I.2.2. Milieux de culture	15
II. Méthodes	15
II.1. Caractérisation phénotypique	15
II.1.1. La revivification des souches <i>Pseudomonas</i> spp et <i>Bacillus</i> sp	16
II.1.2. Etude morphologique	16
II.1.2.1. Etude macroscopique	16
II.1.2.2. Etude microscopique	16
✚ Examen à l'état frais	16
✚ Coloration de Gram	17
✚ La coloration de la spore	18
II.1.3. Etude biochimique	19
✚ Type respiratoire	19
✚ Test mannitol –mobilité	20
✚ Recherche de la catalase	21
✚ Test oxydase	22
✚ Test de fluorescence	22

✚	Identification par galerie API 20E	23
✚	Interprétations probabilistique des profils biochimiques par un programme d'identification en ligne l'UPBM	25
II.1.4. Etude microbiologique		25
✚	L'antibiogramme	25
II.2. Production d'enzymes		27
II.2.1. Cellulase		27
II.2.2. Solubilisation de PO ₄		27
II.2.3. Hydrolyse de la caséine		28
II.2.4. Hydrolyse de la Chitine		28
II.2.5. Production de l'acide cyanhydrique HCN		29
II.3. Le dépistage et l'isolement des micro-organismes producteur de biosurfactants		31
II.3.1. Test de dispersion du pétrole		31
II.3.2. Activité d'émulsification E24		32

Chapitre III: Résultats et Discussions

I. Résultats		34
I.1. Caractérisation phénotypique		34
I.1.1. La revivification des souches de <i>Pseudomonas</i> Et <i>Bacillus</i>		34
I.1.2. Etude morphologique		35
I.1.2.1. Etude macroscopique		35
I.1.2.2. Etude microscopique		35
✚	Examen à l'état frais	35
✚	Coloration de Gram	36
✚	La coloration de la spore	37
I.1.3. Etude biochimique		37
✚	Type respiratoire	37
✚	Test mannitol –mobilité	38
✚	Recherche de la catalase	39
✚	Test oxydase	40

✚ Test de fluorescence	40
✚ Identification par galerie API 20E	42
✚ Interprétations probabilistique des profils biochimiques par un programme d'identification en ligne l'UPBM	44
I.1.4. Etude microbiologique	46
✚ L'antibiogramme	46
I.2. Production d'enzymes	48
I.2.1. Cellulase	48
I.2.2. Solubilisation de PO ₄	48
I.2.3. Hydrolyse de la caséine	49
I.2.4. Hydrolyse de la Chitine	50
I.2.5. Production de l'acide cyanhydrique HCN	50
I.3. Le dépistage et l'isolement des micro-organismes producteur de biosurfactants	51
I.3.1. Test de dispersion du pétrole	51
I.3.2. Activité d'émulsification E24	53
II. Discussion	55
Conclusion	
Conclusion générale	60
Références Bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Introduction

Les *Pseudomonas* est un genre d'un group bactérien important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries. Il comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (**Bossis et al., 2000 ; Palleroni et Moore, 2004**).

Le groupe des *Pseudomonas* représente la plus grande fraction de la communauté microbienne. Ils partageant leur environnement avec les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. On les retrouve dans différentes milieu sous les horizons, particulièrement sur les systèmes racinaires des plantes (**Bossis et al ., 2000**).

Le groupe *Bacillus* est le genre bactérien le lus répondu dans l'environnement. Leurs espèces sont caractérisées par la diversité et l'aptitude à survivre dans des conditions défavorables telle que la haute salinité et de produire aussi de grandes quantités des enzymes extracellulaires ainsi que des molécules ayant un grand intérêt industriel et médical. (**Schallmey et al .,2004**).

Ces bactéries ont la capacité de stimuler la croissance de nombreuses plantes, ainsi que la colonisation des racines, ils synthétisent les hormones végétales, comme ils produisent aussi les enzymes et de métabolites de contrôle biologique. Les *Pseudomonas* ont fait l'objet de recherches et de tests approfondis de divers phytopathogènes (**Ouserir et al., 2018**).

Les tensioactifs sont utilisés largement à diverses fins dans beaucoup d'industries et, pendant de nombreuses années, ils ont été synthétisés exclusivement par les voies chimiques. Cependant au cours des dernières années, des composés tensioactifs biologiques (biosurfactants) ont été décrits et étudiés. (**Varjani et Upasani, 2017 ; Rocha et al, 2014**).

Les biosurfactants sont produits par une variété de micro-organismes, sécrétée soit à l'extérieur de la cellule, soit attachée à des parties de cellules notamment lors la croissance sur des substrats non miscibles à l'eau et classés en plusieurs classes (**L.Al-Araji et al, 2007**). Les lipopeptides, produits par *Bacillus* sp sont l'un des les biosurfactants les plus efficaces, les mieux connus pour leurs propriétés thérapeutiques, telles que l'activité anti tumorale (**C.Sivapathasekaran et al, 2010**).

Bacillus est un micro-organisme adapté à la production de biosurfactants car il n'a aucun effet pathogène, permettant ainsi la l'emploi de ses produits dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (**Sivapathasekaran et al, 2010 ; Giro et al, 2009**).

Cette présente mémoire s'intègre dans un contexte de criblage d'une collection de souches microbiennes d'intérêt biotechnologique et basé sur la recherche des métabolites secondaires produits par ces souches.

L'objectif principal de ce travail est la caractérisation et l'identification phénotypique d'une collection de souches isolées préalablement d'un sol rhizosphérique, la recherche de quelques enzymes à effets hydrolytique tels que la chitinase, la Cellulase, la Phosphatase et la Caséinases en plus de la recherche de la production de l'acide cyanhydrique. Ces souches aussi ont été criblés pour leur aptitude à produire des biosurfactants estimé par le test d'émulsification E24 et le test d'épandage de l'huile.

Ce mémoire s'articule sur trois volets :

Le premier volet de ce mémoire est consacré à une synthèse bibliographique sur les *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Le second volet de ce mémoire est consacré sur le matériel et la méthodologie utilisés au cours de ce travail.

Le dernier volet présent les résultats obtenus ainsi que leur discussion, enfin on conclut tout le document par une conclusion générale

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Les *Pseudomonas*

I.1.1. Caractères généraux des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* constitue l'un des 8 genres bactériens incluant des espèces phytopathogènes. Créé en 1894 par Migula, ce genre bactérien compte aujourd'hui de nombreuses espèces qui colonisent le sol, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer. Quelques espèces sont pathogènes des animaux ou de l'homme (**Prévot, 1961**), en particulier *P. aeruginosa*.

I.2. Distribution écologique du genre *Pseudomonas*

Les espèces de *Pseudomonas* décrites prouvent que c'est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde. Plusieurs espèces ont été isolées de différentes niches écologiques.

- *P. plecoglossicida* est un pathogène de poissons (**Nishimori et al, 2000**) *P. salomonii* et *P. palleroniana* sont des espèces phytopathogènes (**Gardan et al, 2002**) ; *P. simiae* a été isolé d'un échantillon clinique de singe (**Vela et al, 2006**) et *P. costantinii* est un pathogène de champignons comestibles (**Munsch et al, 2002**).
- D'autres bactéries associées aux racines. Elles ont été isolés de différentes plantes *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* isolés de plants d'ail et de riz (**Achouak et al, 2000**). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* isolé de la rhizosphère de l'herbe (**Peix et al, 2003, 2004, 2005**).
- Certaines ont été isolés de la phyllosphère des plantes, comme : *P. lurida* de la phyllosphère de l'herbe (**Behrendt et al, 2007**).
- Quelques espèces ont été isolées d'écosystèmes marins comme : *P. marincola* (**Romanenko et al, 2008**).
- Ou d'écosystèmes désertiques *P. duriflava* (**Liu et al, 2008**), *P. guineae*, une bactérie psychro-tolérante du sol de l'antarctique (**Bozal et al, 2007**), *P. thermotolerans*, qui peut croître à 55°C isolée d'échantillons animaux (**Manaia et Moore, 2002**).

I.3. Définition

Par définition, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, généralement mobiles grâce à une ou plusieurs flagelles polaires, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes. Mais cette définition ne permet

pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatifs, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques (**Palleroni, 2008**).

Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (**Palleroni, 1984**).

I.4. Caractères génétiques

- La valeur du GC% (coefficient de Chargaff, pourcentage de guanine et de cytosine dans les acides nucléiques) de l'espèce *P. syringae* varie de 58 à 61 % (**Palleroni, 1984**).
- Comme de nombreuses bactéries, il a été démontré que *Pseudomonas syringae* possède des plasmides de poids moléculaires différents. Ces plasmides sont conjugatifs (**Gonzales et al., 1984**) et peuvent être porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds, mais également transmissibles à d'autres bactéries.
- *Pseudomonas* est le genre présentant le plus grand nombre de caractéristiques de résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds détectés par **Manceau (1984)**.
- Ceux-ci semblent être portés par les chromosomes, mais les auteurs s'interrogent sur le risque de transfert de ces gènes de résistance vers des plasmides. **Sundin et ses collaborateurs (1989)** n'ont pas réussi à transférer le plasmide résistant au cuivre de *Ps pv syringae* à *Ps pv morsprunorum* et ont conclu que les deux pathogènes sont génétiquement incompatibles à ce niveau.
- Ils croient qu'il ne devrait y avoir aucun problème avec la différenciation de ces deux agents pathogènes au niveau génétique.

I.5. Taxonomie

Les *Pseudomonas* appartiennent au groupe des Eubactéries non photosynthétiques, chimiotrophes, à l'ordre des Eubacteriales **Buchanan (1917)**, à la famille des Pseudomonadaceae (**Winslow et al., 1917**), à la tribu des Pseudomonadeae Kluyver et **Van Niel (1936)**.

I.6. Caractères cytologiques et biochimiques

La cellule de *Pseudomonas* est un bâtonnet droit ou bacille de taille moyenne de 0,7-3 µm de longueur sur 0,7-1 µm d'épaisseur, isolé, en paires ou en chaînes, mobile par 1 à 3 flagelles polaires ; sa paroi ne retient pas la coloration de Gram (Gram négatif). Sur gélose nutritive, les colonies sont rondes, blanches et généralement lisses, convexes avec reflets bleus (**Prévot, 1961**).

I.7. Métabolites Secondaires possédant des propriétés de biocontrôle

Les *Pseudomonas fluorescents* produisent un grand nombre de métabolites secondaires (Leisinger et Margraff, 1979) qui peuvent jouer un rôle dans l'effet antagoniste de ces micro-organismes dans le sol. Ces agents inhibiteurs peuvent être divisés en 4 groupes : Les antibiotiques, les sidérophores, les enzymes et l'acide cyanhydrique (HCN).

A ces métabolites secondaires, il convient d'ajouter une molécule dérivant du métabolisme primaire, l'ammoniaque, qui peut avoir un effet inhibiteur en alcalinisant le milieu, sur la croissance d'espèces fongiques phytopathogènes.

I.7.1. Antibiotiques peptidique

Les antibiotiques peptidiques sont aussi produits par les bactéries à Gram positif (Katz et Demain, 1977) que celles à Gram-négatif (Dowling et O'Gara, 1994), par une synthèse multienzymatique non-ribosomique (Kleinkauf et Dohren, 1996).

Pseudomonas produisent Plusieurs antibiotiques et jouent un rôle important dans l'inhibition d'agents phytopathogènes, le 2,4-diacetyl-phloroglucinol (DPG) produit par *P. fluorescens* CHA0 (Keel et al., 1992) a montré un effet suppressif sur plusieurs phytopathogènes (*G. graminis* et *Thielaviopsis basicola*), d'autres antibiotiques sont produits par les *Pseudomonas* dont le pyoluteorine (Maurhofer et al., 1994), Pyrrolnitrin (Ligon et al., 2000), L'oomycine A (James et Gutterson, 1986 ; Howie et Suslow, 1991). (Voir tableau 1)

Tableau 1 : les antibiotiques produits par certaines souches de *Pseudomonas* (Adapté de Raaijmakers et coll., 2002)

Antibiotiques	Souches	Références
2,4-diacétylphloroglucinol	<i>Pseudomonas spp.</i> Q2-87 CHA0 Pf-5 Q8rl-96	Vincent et coll. (1991) Keel et coll. (1992) Howell et Stipanovic (1979) Raaijmakers et Welle(2001)
Phénazines	<i>Pseudomonas spp.</i> 2-79RN10 30-84 PCL1391	Weller(1983) Pierson et Thomashow (1992) Chin-A-Woeng et coll.(1998)
OomycineA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Hv37a	Gutterson et coll. (1986)

Pyolutéorine	<i>P.fluorescens</i> <i>Pf-5</i> <i>CHAO</i>	Howell et Stipanovic (1979) Keel et coll. (1992)
Pyrrolnitrine	<i>P.fluorescens</i> BL915 <i>Burkholderia cepacia</i> B37w	Ligon et coll. (2000) Burkhead et coll. (1994)
Viscosinamide	<i>P.fluorescens</i> DR54	Nielsen et coll. (1999)
Butyrolactones	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 63-28	Gamard et coll. (1997)

I.7.2. Enzymes dégradant les parois fongiques

La production d'enzymes mycolitiques est également évoquée pour expliquer l'action antagoniste des *Pseudomonas fluorescens* (Lam et al., 1992). Pour une souche de *Pseudomonas stutzeri* (non fluorescent), Lim et al., (1991) ont montré que la chitinase et la laminarinase produites par cette souche sont responsables de l'antagonisme in vitro observé vis-à-vis de *Fusarium solani*.

- L'excrétion d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongique est souvent impliquée dans l'attaque de champignons phytopathogènes (Martin et Loper 1999 ; Nielsen et Sorensen, 1998 ; Picard et al., 2000).
- La dégradation des enzymes sécrétées par les micro-organismes pour lyser les parois cellulaires est une fonction bien connue du parasitisme fongique.
- La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont des enzymes importantes, en particulier dans la lutte contre les champignons, par leur activité de dégradation des composés de la paroi cellulaire tels que : la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981 ; Chet, 1987 ; Lorito et al., 1996).
- Il a été rapporté que les microbes qui sécrètent la chitinase sont des agents de contrôle biologique efficaces (Ordentlich et al., 1988 ; Inbar et Chet, 1991).

I.7.3. La chitinase, la β -1,3-glucanase et la cellulase

- La chitinase et la β -1,3-glucanase hydrolysent respectivement la chitine et le β -1,3- glucane, qui sont des composants majeurs de la paroi cellulaire des champignons pathogènes.
- Des souches de PGPR, telles que *Pseudomonas*, ont été développées commercialement sous forme de préparations de talc et testées contre plusieurs maladies des cultures (Vivekananthan et al., 2004).

- La chitinase purifiés à partir de *Pseudomonas fluorescens* a une activité insecticide contre le moustique du thé *Helopeltis theivora*.
- C'est un ravageur insidieux qui constitue une menace économique majeure pour les jardins de thé. La chitinase est toxique en hydrolysant par voie enzymatique la chitine, les composants communs de l'exosquelette et de la muqueuse de la membrane nutritive entourant les insectes (**Suganthi et al., 2017**).
- **Abdul-kadhim et Jarallahont (2013)** ont isolé 18 bactéries cellulolytiques des sols d'agriculture. Après identification, les résultats ont montré que tous les isolats bactériens faisaient partie de *P. fluorescens*.

I.7.4. Cyanure d'hydrogène (HCN)

- Le cyanure d'hydrogène (HCN) est un métabolite secondaire volatil produit par diverses rhizosphères *Pseudomonas fluorescens*. Il a une activité de contrôle biologique contre les champignons pathogènes (tels que l'agent pathogène de la pourriture noire du tabac *Thielaviopsis basicola*,) (**Mousa et Raizada 2015**).
- D'un point de vue mécanique, le HCN agit en inhibant d'importantes métalloenzymes (telles que le cytochrome c oxydase et /ou les métaux complexes dans le sol (**Mousa et Raizada 2015**).
- Le HCN est biosynthétisé à partir de la glycine dans une réaction d'oxydation catalysée par la HCN synthase (une flavoenzyme liée à la membrane), et des accepteurs d'électrons tels que le méthosulfate de phénazine sont présents (**Mousa et Raizada 2015**).
- La production de HCN par les *Pseudomonas* est impliquée dans la suppression d'agents pathogènes comme *Thielaviopsis basicola*, *Septoria tritici* et *Puccinia recondita* (**Ramette et al., 2003**).

I.7.5. La production de biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par une grande variété de microorganismes (bactéries, levures et champignons), (**DESAI et BANAT, 1997**) soit sécrétés à l'extérieur de la cellule, soit liés à des parties de la cellule. Parmi les différents biosurfactants recensés, on trouve des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides, des lipides neutres, des acides gras ou des lipopolysaccharides. Les biosurfactants ont été utilisés comme agents de dissolution. Leurs applications ont été étendues à d'autres domaines, comme une meilleure alternative aux produits chimiques tensioactifs, en particulier dans les produits alimentaires, pharmaceutiques et dans l'industrie pétrolière. Aussi, ils possèdent de nombreux avantages par

rapport aux surfactants synthétiques. Ils offrent des applications dans des domaines variées comme la médecine, l'environnement, l'alimentaire, le cosmétique... (GAKPE et al ,2007).

I.7.5.1. Définition

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (DESAI et BANAT, 1997).

Les surfactants (SURFace ACTive AgeNTS) sont des agents à activité de surface synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants) (Al-ARAJI et al. 2007)

I.8. *Pseudomonas* et ses métabolites antifongiques

Pseudomonas est également appliquée dans le biocontrôle des maladies des plantes, grâce à la production élevée en métabolites antimicrobiens (bactériocines, antibiotiques, antifongiques, sidérophores et le cyanide d'hydrogène) (Marschner et Timonen, 2006 ; Jamali et al., 2009). Ce genre bactérien inclue aussi des bactéries rhizosphériques facilement cultivables au laboratoire et sur le sol comme inoculât des céréales (Kiely et al., 2006).

- ✓ Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopoly- saccharide entourant leurs cellules, et les protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) permet à ces cellules de former des bio films, qui leur permet de rester collées aux surfaces, d'une façon qu'il est difficile de les déloger (Visca et al., 2007). Ce genre produit plusieurs poly hydroxy alcanooates et d'alginate et aussi d'autres substances métaboliques. Ce qui rend ce genre d'un grand intérêt biotechnologique (Holloway, 1992).

II. *Bacillus*

II.1. Définition de groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus* est un groupe qui regroupe des espèces de bactéries formants endospores et comprend six espèces : *Bacillus cereus sensus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus pseudomycoides*.

Il a été montré que ces espèces sont taxonomiquement très proches mais phénotypiquement variable notamment en matière de pathogénicité (Pandiani, 2010).

Ce sont des bacilles Gram positifs, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs, capables de produire une endospore quand les conditions deviennent défavorables. Elles ont des capacités physiologiques très diversifiées. En effet, elles peuvent être impliquées dans la minéralisation du phosphate, la dénitrification, la protéolyse ou la production d'antibiotiques (**Soufiane, 2013**).

II.2. Les métabolites secondaires produits par les *Bacillus*

II.2.1. Les exotoxines

B. thuringiensis est une bactérie qui produit un grand nombre de toxines au cours de son cycle de vie et métabolites de tous types.

Elle produit une toxine thermostable appelée Bêta-exotoxine, pendant sa phase végétative. Il existe deux types de Bêta – exotoxines : la Bêta-exotoxine de type 1 et la Bêta-exotoxine de type 2 (**Levinson, Kasyan et al., 1990**).

Les gènes qui codent les exotoxines sont de nature plasmidique. Ils peuvent aussi coder pour les delta-endotoxines (**Levinson, Kasyan et al., 1990**).

Les Bêta-exotoxines ont une structure similaire à l'adénosine triphosphate (ATP) (**Bond, Boyce et al., 1969**).

Elles sont toxiques pour plusieurs insectes tels que les nématodes, les diptères et les lépidoptères (World Health Organization, « EnvironmentHealthCriteria 217 », 1999).

II.2.2. Les protéines Cyt

Tout comme les protéines Cry, les protéines Cyt se retrouvent dans la famille des δ -endotoxines et sont produites toutes deux dans le même cristal lors de la sporulation.

Ces protéines peuvent notamment agir en synergie avec certaines protéines Cry afin d'augmenter leur toxicité sur les insectes (**Soberon, Lopez-Diaz et al., 2013**).

Ces caractéristiques tendent à accroître l'intérêt des chercheurs envers ce type de protéines afin de développer des insecticides plus efficaces.

II.2.3. Les protéines Cry

Au cours de la sporulation, la plupart des souches de produisent un cristal protéique composé de δ -endotoxines. (**Ibrahim, Griko et al., 2010**).

Grâce à leur toxicité sélective envers différents insectes nuisibles, les protéines Cry sont utilisées depuis les années 1930 en tant qu'insecticide biologique. À ce jour, plus de 500 protéines Cry ont été découvertes et classées dans 72 familles (Crickmore et al., 2014).

II.2.4. Les exoenzymes

Les exoenzymes de *Bacillus* jouent un rôle dans la pathogénicité chez l'insecte et la dégradation des parois fongiques et non sur les vertébrés contrairement aux entérotoxines.

Les plus importantes exoenzymes sont les chitinases et les protéases.

II.2.4.1 . La chitinase

La chitinase est une enzyme qui décompose la chitine, qui est un composant de l'exosquelette des insectes et un composant des champignons.

Chez les insectes, les chitinases peuvent coexister avec les toxines de *Bacillus thuringiensis* pour faciliter leur passage à travers la membrane externe de l'intestin de l'insecte (Huber, Cabib et al., 1991; Sampson et Gooday, 1998).

La chitinase de *Bacillus* peut également lyser les parois cellulaires des champignons phytopathogènes, protégeant ainsi les plantes des maladies (de la Vega, Barboza-Corona, et al, 2006).

II.2.4.2 . La protéase

Bacillus est également un producteur majeur de diverses protéases, qui peuvent être intracellulaires et extracellulaires. L'activité de la protéase augmente en phase post-exponentielle, lors de la lyse des bactéries dans le milieu de culture (Andrews, Bibilos, et al., 1985).

Les protéases de *Bacillus* jouent un rôle tout aussi important dans la croissance bactérienne et la sporulation chez les insectes (Brar, Verma et al., 2007).

II.2.4.3. D'autres enzymes produits par les *Bacillus*

➤ La cellulase

La majorité des cellulases microbiennes étudiées sont des glycoprotéines, avec un taux élevé en acides aminés acides (Beldman et al, 1985). Les cellulases se distinguent des autres glycosides hydrolases par leur capacité à hydrolyser les liaisons β -osidiques entre les résidus glycosyliques (Lynd et al, 2002).

Des cellulases halophiles et halotolérantes dérivées de *Bacillus sp* (Aygan et al, 2008) ont été caractérisées. Elles sont thermostables, halostables et alcalostables ce qui fait d'elles des candidates idéales pour différentes applications industrielles (Setati, 2010).

➤ Les estérases et les lipases

Les triacylglycerol acyl-hydrolases ou lipases sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'actions et leur spécificité de substrats. Elles sont responsables de catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol. Il existe deux groupes d'enzymes très connus dans la famille des hydrolases d'esters carboxyliques : les lipases et les estérases (Ghanem, 2007).

Plusieurs études ont révélé diverses activités lipolytiques chez les *Bacillaceae*. Les souches ont été identifiées des genres *Oceanobacillus*, *Thalassobacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Piscibacillus* (Rohban et al, 2009) et *Bacillus* (Ghasemi et al, 2010).

Ces microorganismes produisent des lipases actives de fortes concentrations salines (Rohban et al, 2009).

II.2.5. Les antibiotiques et les antifongiques produits par *B. thuringiensis*

En plus de synthétiser un bon nombre de protéines insecticides, *Bacillus* produit aussi d'autres métabolites tels que des antibiotiques et des antifongiques. Ces métabolites peuvent notamment servir aux plantes pour les aider à lutter contre certains champignons ou bactéries néfastes.

II.2.5 .1. Les antibiotiques

Les espèces du groupe *Bacillus* produisent plusieurs nombre de peptide d'antibiotiques qui ont de différentes structures chimiques (Jung et al ,2008).

Parmi ces métabolites on a : la zwitternicine A, les thuricines, la --tochicine, la bacthuricine F4 et les entomocines. La zittennicine A et les thuricines représentent les métabolites les plus importants dans la protection des plantes par les espèces bénéfiques du genre *Bacillus*.

La zwitternicine A est un antibiotique qui a été isolé pour la première fois à partir de *Bacillus cereus* UW85 pour son effet protecteur de la plante alfalfa (luzerne) et contre l'oomycète *Phytophthora medicaginis*.

Bactéries à Gram négatif et un grand nombre de fungi pathogènes (Silo-Suh, Stabbet al., 1998). Les thuricines sont des bactériocines, des peptides aux propriétés bactéricides ou antibactériennes. En revanche, ils sont actifs contre plusieurs espèces de *Bacillus*, telles que

Bacillus thuringiensis, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa* et *Bacillus sphaericus* (Favret et Yousten, 1989).

Ils sont également efficaces contre des bactéries plus nocives telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* (Chehimi, Delalande et al., 2007).

En raison de leurs effets toxiques sur ces bactéries nocives, les thuricines peuvent offrir une protection particulière aux plantes. La découverte de souches de *Bacillus thuringiensis* qui produisent des antibiotiques et des métabolites antifongiques peut conduire à la création de biopesticides respectueux de l'environnement.

II.3. *Bacillus* et ses métabolites antifongiques

Les bactéries du genre *Bacillus* sont l'un des principaux groupes des rhizobactéries connues pour leur application dans le biocontrôle de plusieurs phytopathogènes. Elles produisent plusieurs composés biologiques actifs contre les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus (Bottone and Peluso, 2003). Ce genre est capable de produire des antibiotiques, ainsi qu'une variété d'enzymes antifongiques qui dégradent les parois cellulaires, comme les chitinases, les cellulases, les amylases, glucanases, etc. Plusieurs peptides antifongiques synthétisés par des espèces de *Bacillus* sont actifs contre les champignons filamenteux et les levures. De nombreuses souches du genre *Bacillus* produisent des petits peptides circulaires (Comme l'iturine, fengycine, Bacillopeptidase, et surfactine) (Maheshwari, 2010). L'iturine et la fengycine possèdent une forte activité inhibitrice de la croissance d'une large gamme de phytopathogènes (Vanittanakoma et Loeffler, 1986 ; Hsieh et al., 2008).

II.4. Facteur influençant la production d'antibiotique

Plusieurs facteurs abiotiques (oxygène, température, sources spécifiques de carbone et d'azote et micro-éléments), biotiques (plante hôte, pathogène, microflore indigène et densité de cellules de la souche productrice) et physiologiques tels que le quorum sensing influencent la production d'antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle (Adam, 2008).

Tableau 2 : Substances antifongiques produites par quelques espèces des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* (Quan et al, 2010).

Antifongiques	Source	Pathogène	Référence
Bacillomycine D, F, L, Lc	<i>B.subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>F.graminearum</i> , <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i>	Eshita et oberto (1995) ; Zhao et al. (2010)
Iturine (A–E)	<i>B.subtilis</i> , <i>B.circularan</i> <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. notatum</i> , <i>R.solani</i> , <i>B. cinerea</i>	Hsieh et al. (2008)
Fengycine	<i>B.thuringiensis</i> <i>B.subtilis</i> <i>B.amyloliquefaciens</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>R.solani</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P.capsici</i>	Kim et al. (2004) Wang et al. (2007) Vanittanakoma et Loeffler (1986)
Bacisubine	<i>B. subtilis</i>	<i>R. solani</i> , <i>A.oleracea</i> <i>B.cinerea</i>	Liu et al. (2007)
Pyrrolnitrine	<i>Pseudomonas fluoresces</i>	<i>Fusarium sp</i> , <i>R.solani</i> <i>Botrytis cinerea</i>	Loper et Gross. (2007) Ligon et al. (2000)
Pyoverdine	<i>P. fluoresces</i> <i>P. putida</i>	<i>f. graminerearum</i>	Lamont et Martin (2003)
HCN Chitinase viscosine	<i>P.fluorescens</i> <i>P. pseudomonuds</i>	<i>p. ultimum</i> <i>f.oxysporum</i> <i>f. culmorum</i>	Ramette et al. (2003) Ajit et al. (2006) Braun et al. (2001)
Syringopeptine	<i>P. syringae pv. syringae</i>	Avec une activité antifongique à large spectre	Feil et al. (2005) Scholz-schroeder et al. (2003)
Syringomycine	<i>P. syringae pv. syringae</i>	Avec une activité antifongique à large spectre	Kang et gross (2005) Vaillancourt et al. (2005)

II.5. Intérêt de *Bacillus* dans la lutte Biologique

Bacillus est l'un des micro-organismes les plus connus et les plus utilisés dans le domaine de la lutte biologique contre plusieurs ravageurs des cultures et agents pathogènes des plantes (**Bravo et al., 2011**).

Elles jouent également un rôle important dans le cycle biogéochimique du carbone et de l'azote, les spores produites par ces bactéries peuvent être particulièrement importantes dans la production d'antagonistes préparés commercialement, car ces derniers sont également plus faciles à stocker et à conserver que les bactéries non sporulantes (**Alexandre, 1977**). La plupart des espèces de *Bacillus* ont été utilisées avec succès dans l'agriculture et l'industrie fine, ainsi que dans les domaines médicaux et pharmaceutique.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne (laboratoire 15) du département de biologie à l'Université M'HAMED BOUGARA Boumerdès (UMBB).

L'objectif principal de ce travail est de réaliser des extractions des métabolites secondaires (biosurfactant et antibiotique) produit par deux souches de genre *Bacillus* (Bc2, Bc7), deux souches de genre *Pseudomonas* (Ps2, Ps7) isolées à partir de la rhizosphère de l'olivier, ainsi que la recherche de quelques métabolites secondaires produites par ces dernières tels que les enzymes, et l'acide cyanhydrique (HCN).

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Souches bactériennes

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé quatre souches bactériennes des genres différents : Deux *Bacillus* (Bc2, Bc7), deux *Pseudomonas* (Ps2, Ps7) fournis aimablement par Mme BENZINA.F, conservées dans des tubes à essais contenant le milieu GN inclinées.

I.2. Matériel non biologique

I.2.1. Equipements

Les équipements ainsi que le matériel utilisé au cours de la réalisation de notre travail sont regroupés dans l'annexe 1.

I.2.2. Milieux de culture

La liste des milieux de culture, leurs compositions, les réactifs et les produits chimiques utilisés sont présentés au niveau de l'annexe 2.

I. Méthodes

II.1. Caractérisation phénotypique

L'identification des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp. est effectuée par différentes méthodes. Dans notre cas il s'agit de techniques classiques faisant appel à une caractérisation phénotypique basé sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

II.1.1. La revivification des souches de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp

La revivification des souches bactériennes utilisées est réalisée sur le milieu solide TGEA afin de s'assurer de sa pureté. L'ensemencement en strie des souches est fait sur des boîtes de Pétri. Ces dernières ont été scellées avec du parafilm, puis incubé à l'étuve à 30°C pendant 24 heures.

II.1.2. Etude morphologique

II.1.2.1. Etude macroscopique

Les colonies obtenues sur milieu solide sont observées à l'œil nu. L'étude macroscopique est basée sur les éléments d'identification donnés par (**Joffin et Leyral., 2014**) :

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières...etc.
- **La taille des colonies : par mesure du diamètre** : punctiformes ou non punctiformes.
- **L'opacité** : opaque, translucide.
- **L'aspect de la surface.**
- **L'aspect de contour.**
- **La consistance.**
- **L'odeur** : présence ou absence.
- **L'élévation** : convexe, concave, plate.
- **La chromogènes** : couleur de la colonie.

II.1.2.2. Etude microscopique

Examen à l'état frais

La taille des cellules (**Narayanasamy, 2013**), le mode de regroupement et la mobilité (**Delarras, 2014**) des bactéries a été étudiée par observation microscopique à l'état frais sur cultures en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle. Il est conseillé d'examiner des cultures jeunes.

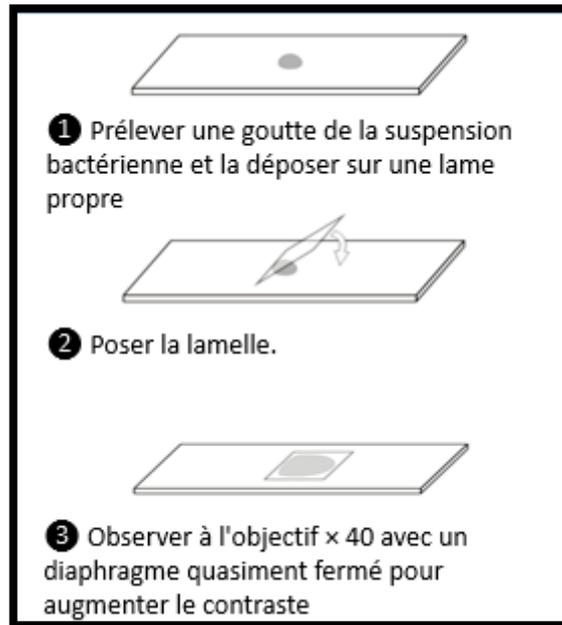


Figure 1: Technique d'examen à l'état frais.

Coloration de Gram

Son objectif est de classer les micro-organismes en deux groupes (Gram+ et Gram-) en fonction de la composition chimique de leur paroi et son affinité aux différents colorants (**Perry et al, 2004 ; Camille, 2007**).

a. La technique

La coloration de Gram, est réalisée selon la technique classique (**Hildebrand et al, 1988**) :

- La première étape consiste à réaliser un frottis à partir d'une culture jeune. Un aliquote de suspension est prélevé avec l'anse de platine stérile puis étalé sur une lame contenant une goutte d'eau distillée en appliquant un mouvement circulaire en partant du centre vers la périphérie de la lame.
- La seconde étape est la fixation par la chaleur pour tuer, fixer la structure cytotogique, et faire adhérer les bactéries sur la lame.
- La troisième étape nécessite l'ajout de quelques gouttes du violet de Gentiane sur le frotti déjà fixé pendant une minute et après rinçage à l'eau distillé, on ajoute le Lugol, pendant 45 secondes, et rincer à l'eau distillé.
- La quatrième étape consiste à laver le frottis avec l'alcool à 90° goutte à goutte pour décolorer leur cytoplasme pendant 10 à 20 secondes, puis un rinçage avec de l'eau distillée est fait.

- En fin, quelques gouttes de fuchsine sont versées sur la lame qu'on laisse agir une minute puis la lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation sous microscope photonique à l'immersion (Gx100).

b. La lecture

La paroi des bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet.

La paroi des bactéries à Gram négatif apparaissent colorées en rose (**Prevot, 1977**).

La coloration de la spore

Les spores ou endospores bactériennes sont des formes de résistances que prennent certaines espèces quand les conditions deviennent défavorables (**Singleton, 2005**).

Dans la méthode de Coloration au Vert de Malachite «méthode de Schaeffer-Fulton», une teinture primaire verte de malachite est forcée dans la spore par vaporisation de l'émulsion bactérienne. Le vert de malachite est soluble dans l'eau et a une faible affinité pour le matériel cellulaire, de sorte que les cellules végétatives peuvent être décolorées avec de l'eau. La Fuchsine est ensuite appliquée pour contre-colorer les cellules qui ont été décolorées. À la fin du processus de coloration (**Ejiofor et Johnson 2002**).

a. La technique

- Prenez une lame propre sans graisse et faites un frottis.
- Sécher à l'air et fixer l'organisme sur une lame de verre et couvrir d'un carré de papier buvard ou d'essuie-tout coupé pour s'adapter à la lame.
- Saturer le papier buvard avec une solution de teinture vert malachite et le vaporiser à la vapeur pendant 5 minutes, en gardant le papier humide et en ajoutant plus de colorant au besoin. En variante, la lame peut être vaporisée sur un récipient d'eau bouillante.
- Lavez la lame à l'eau du robinet après retrait du papier filtre.
- Contre-colorer avec 0,5% de Fuchsine pendant 30 secondes. Laver à l'eau du robinet, séchez.
- Examinez la lame au microscope à l'immersion (G×100) pour la présence d'endospores (**Delarras 2014**).

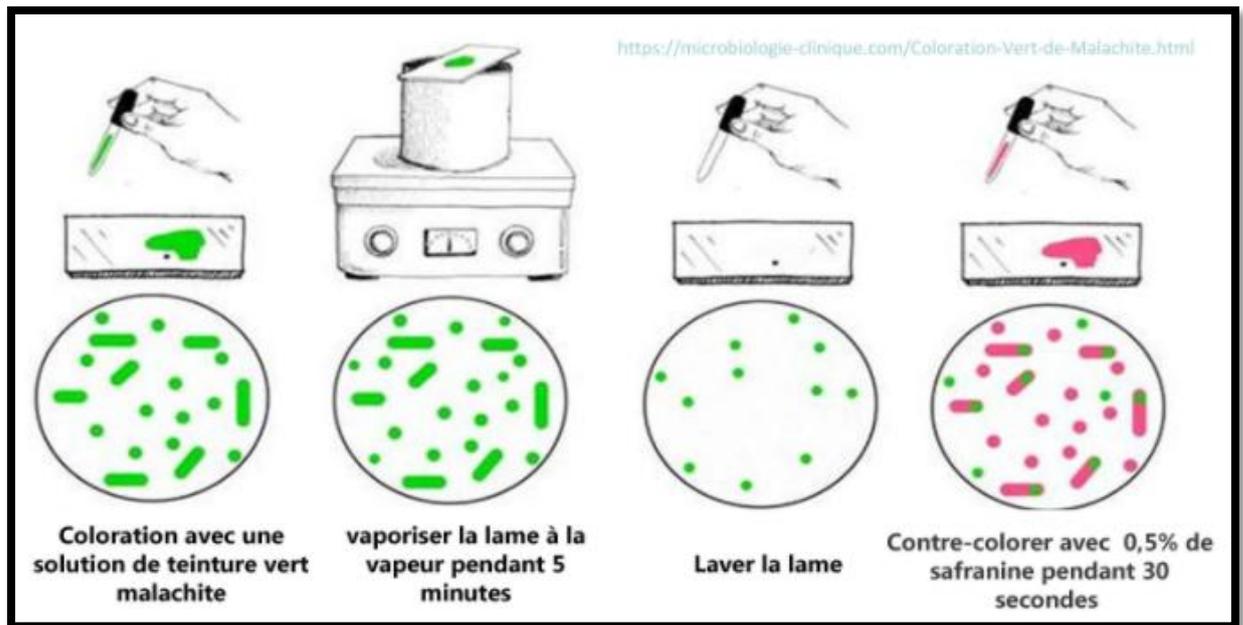


Figure 2 : La coloration de la spore.

b. La lecture

Les cellules végétatives seront roses et les endospores seront vert foncé.

II.1.3. Etude biochimique

✚ Type respiratoire

Le comportement des souches vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans gélose viande de foie (VF) et ensemencé par piqûre central. D'après **Guiraud (1997)**, Le type respiratoire des bactéries est en relation avec la zone qui présente le développement des colonies.

a. Technique

- Le test du type respiratoire a consisté préalablement en une régénération du milieu viande foie (VF) (Annexe 2) par un chauffage durant 30 minutes au bain-marie bouillon.
- Le milieu gélosé Viande Foie est coulé dans un tube vissé.
- L'ensemencement a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur plongée au fond du tube, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu sur toute la hauteur.

- Après refroidissement, le milieu est mis en incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures. (Abe A. M. K. *et al.*, 2018).

b. Lecture

Le comportement de la souche vis-à-vis de son substrat et de l'oxygène est observé, donnant ainsi son type respiratoire. La hauteur de la culture permet de déterminer le type respiratoire :

- culture sur toute la hauteur : aéro-anaérobie facultatif (AAF) ;
- culture seulement en haut : aérobie stricte (AS) ;
- culture limitée entre 0,5 et 1,5 cm du haut : micro-aérophile (MA) ;
- culture seulement 1 cm au-dessous du haut : anaérobie stricte (AnS). (Amziane touazi M., 2014).

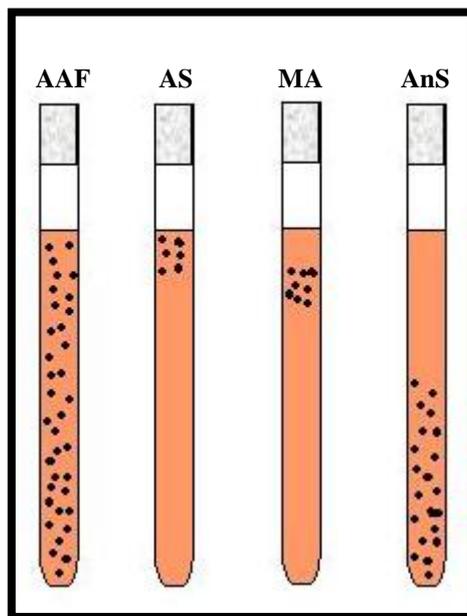


Figure 3: Présentation des types respiratoires.

✚ Test mannitol –mobilité

La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) Rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol

acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) (Joffin et Leyral, 2014).

a. Technique

- Par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur fermée ;
- Incuber 24 heures à 37°C.

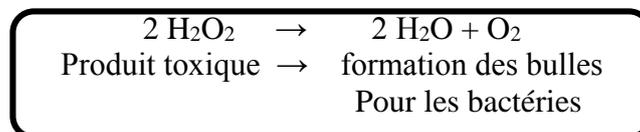
b. Lecture

La mobilité de l'isolat est interprétée par un envahissement du milieu à partir de la piqure d'inoculation et la fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (Harley et Prescott, 2002).

 **Recherche de la catalase**

La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire présente dans toutes les bactéries aérobies, qui leur permet de survivre dans des conditions aérobies (Marchal *et al.*, 1991). En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en fait une courte chaîne auxiliaire chez les organismes aérobies qui peut fixer l'hydrogène pour produire du peroxyde d'hydrogène (l'hydroperoxyde catalase est une sorte de peroxyde d'hydrogène qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau). Les enzymes et l'oxygène constituent un bon élément distinctif de la systématique bactérienne (Harley et Prescott, 2002).

Selon Joffin et Leyral (2014) ; la catalase permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



a. Technique

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes.
- à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- observer immédiatement. (Guiraud, 1997).

b. Lecture

Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al*, 1992).

Test oxydase

Les bactéries avec une chaîne respiratoire complète sont dotées de cytochrome oxydase. Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylènediamine oxydase des bactéries en milieu gélosé, ce qui est très important pour le diagnostic des bacilles à Gram négatif. L'enzyme peut oxyder le réactif : la N-diméthyl-p-phénylènediamine. Ce réactif est incolore, en présence d'enzymes, il va libérer un composé rose qui deviendra noir au contact de l'air (Singleton, 2005).

a. La technique

- Dans des conditions aseptiques, placer le plat d'oxydase sur une lame de verre trempée dans de l'eau physiologique stérile.
- Utiliser une pipette Pasteur pour prélever une colonie jeune et âgée de 24 heures et la déposer sur le disque - instrument n'oxydant pas le réactif - (Guiraud, 1997).

b. La lecture

Le réactif est incolore mais une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes; la réaction est tardive entre 10 et 60 secondes, et elle est négative après 60 secondes Kovacs (1956).

Test de fluorescence

Selon (Bultreys et Gheysens, 2000, Olmar *et al.*, 2001), le test de fluorescence est le premier test a réalisé pour une sélection préliminaire des isolats. La production de la pyoverdine (marqueurs taxonomiques potentiels des *Pseudomonas* fluorescents) a été recherchée sur milieu solide King B (Annexe 2) favorisant la production et la détection de ce sidérophore grâce au sulfate de magnésium et au phosphate bipotassique (King *et al.*, 1954).

a. La technique

- La production du pigment fluorescent est mise en évidence par l'ensemencement des souches *Pseudomonas* sur milieu KB.
- L'incubation a été faite à 30°C pendant 24 h.

b. Lecture

Les souches isolées sont soumises à des observations à l'œil nu, dans une chambre noire à une lampe UV à une longueur d'onde 366 nm afin d'explorer la présence et l'absence d'une fluorescence.

✚ Identification par galerie API 20E

Afin d'obtenir une orientation vers le genre et l'espèce de l'isolat performant P11, une identification biochimique par galerie API 20E a été effectuée. La galerie API 20E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries croissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. Le test d'oxydase constitue le 21ème test d'identification à effectuer hors galerie (**Delarras, 2014**).

a. Technique

L'API 20E est un système d'identification des bactéries, ce teste est réalisé selon les recommandations Biomerieux S.A (France) qui consiste à :

✚ Préparation de la galerie :

- Combiner le fond et le couvercle de la boîte d'incubation et verser environ 5 ml d'eau distillée stérile dans les cellules pour créer une atmosphère humide.
- Écrivez la référence de la souche sur l'étiquette latérale de la boîte
- Sortez la galerie d'un emballage séparé.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

✚ Préparation de l'inoculum :

- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever quelques colonies de jeunes cultures qui ont été cultivées pendant 24 heures.

- Faire une suspension bactérienne corespand à un standard de 0,5 de Mc Farland dans une solution de NaCl à une concentration de 0.9%, et cette dernière doit être utilisée dans 15 minutes suivant sa préparation.

✚ Inoculation de la galerie :

- Remplir en posant la pipette contre la paroi de la cupule, pour éviter la formation de bulles d'air qui pourraient fausser le résultat.
- Les tubes et cupules sont remplis pour la réalisation des tests **CIT**, **VP** et **GEL**, pour les autres tests seuls les tubes sont remplis.
- Les tests anaérobies **ADH**, **LDC**, **ODC**, **H₂S** et **URE** nécessitent l'ajout de l'huile de Paraffine stérile dans leurs cupules afin de créer une aérobiose.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 48 heures.

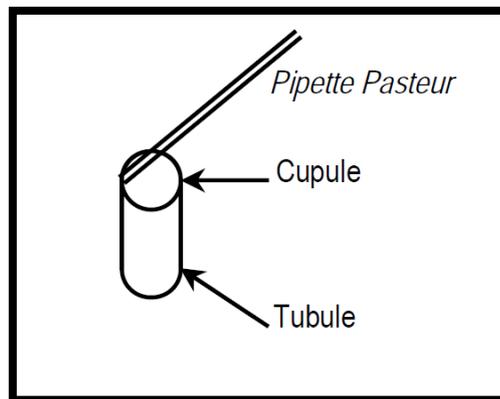


Figure 4: Remplissage des tubes.

b. Lecture

La lecture des résultats s'effectue directement par des changements de la coloration initiale des différents milieux, et indirectement par l'utilisation des réactifs de révélation (VP1, VP2, TDA, RM, Poudre de Zinc, Kovacs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture (Annexe 3), et les résultats de toutes les réactions sont notés sur la fiche de résultats sous formes de signes (+,-) des tests positifs négatifs (**Emanuel et al., 2009**).

✚ Interprétations probabilistique des profils biochimiques par un programme d'identification en ligne l'UPBM

Le programme d'identification en ligne l'UPBM est destiné pour l'identification des isolats bactériens. L'emplacement de la matrice correspondante au type la galerie utilisée doit être impliqué, le programme l'utilise directement.

II.1.4. Etude microbiologique

✚ L'antibiogramme

L'antibiogramme par diffusion permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé (milieu de Mueller-Hinton) préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester. L'arrêt de la croissance à distance du disque se produit en présence de la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique. (Balouiri *et al.*, 2016).

L'antibiogramme utilisé dans notre expérimentation est celui recommandé par la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2010 (CA SFM). Les antibiotiques utilisés dans cette étude sont :

Sigle	Antibiotique	famille
AMP	Ampicilline	Aminopénicilline
AMX	Amoxicilline	Aminopénicilline
C	Chloramphénicol	Phénicolés
CIP	Ciprofloxacine	Fluoroquinolone
CZ	Céfazoline	Céphalosporine
E	Erythromycine	Macrolides
NA	Acide nalidixique	Quinolones
S	Streptomycine	Aminosides
SXT	Triméthoprim/sulfaméthoxazole	Sulfamides- Triméthoprim
TEC	Teicoplanine	Glycopeptides

Tableau 3: Familles et abréviations des antibiotiques.

a. Technique

- Incuber sur un milieu gélosé non sélectif pendant 24 heures et préparer une suspension dans une solution saline (0,9 NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5.
- Retirer 0,5 ml de la suspension bactérienne préparée et ensemercer en stries serrées la surface d'une boîte de Pétri contenant du milieu solide Muller Hinton (Annexe 2).
- Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de pétri à 60° C, à chaque fois et faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur toute la périphérie de la gélose.
- Incuber la boîte de Pétri à 30°C pendant 15 minutes.
- Déposez ensuite le disque imprégné de l'antibiotique commun à la surface de la gélose Muller Hinton préalablement inoculée, et enduisez-le soigneusement avec une pince à épiler stérile.
- Mettez le plat pétri au réfrigérateur pendant 15 minutes pour faciliter la propagation de l'ATB.
- Incuber à 30°C pendant 18 à 24 heures (**Li et al., 2003**).

b. Lecture

Après l'incubation ; l'absence de la croissance se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré à l'aide d'une règle (exprimé en mm).

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est classée selon les diamètres des halos d'inhibitions (\emptyset) (**Ponce et al., 2003**).

- $\emptyset < 8\text{mm}$: bactérie non sensible.
- $9 < \emptyset < 14\text{ mm}$: bactérie sensible.
- $15 < \emptyset < 19\text{ mm}$: bactérie très sensible.
- $\emptyset > 20\text{ mm}$: bactérie extrêmement sensible.

II.2. Production d'enzymes

II.2.1. Cellulase

La production de cellulase a été déterminée selon la méthode décrite par **Cattelan et al. (1999)**. Cette méthode est utilisée pour tester la capacité d'hydrolyse en produisant de la cellulase.

a. Technique

- La gélose M9 (**Miller, 1974**) (annexe 2) additionnée de 10 g de cellulose et de 1,2 g d'extrait de levure.
- Etaler l'isolat et incuber à 28°C pendant 8 jours.

b. Lecture

Un halo clair autour de la colonie indique une réaction positive (**Verma et al., 2007**).

II.2.2. Solubilisation de PO₄

Ce test permet d'évaluer la capacité de nos isolats à solubiliser les phosphates sur milieu de Pikovskaya (PVK) (**Pikovskaya, 1948**), ce milieu contient du Ca₃(PO₄)₂ comme seule source de phosphate (annexe 2).

Cette méthode est basée sur la décoloration du Bromo-Phenol-Bleu (BPB) suite à un abaissement du pH du milieu par production de phosphatases.

a. Technique

La solubilisation des phosphates a été évaluée qualitativement sur milieu de Pikovskaya (**Ahmad et al., 2008**) (annexe 1), selon la méthode décrite par **Mehta et Nautiyal (2001)**.

- Des aliquotes de 100µl (10⁷ cellule/ml) de cultures fraîches sont déposées sur gélose de Pikovskaya, à raison de trois répétitions.
- Incubés pendant 96h à 28°C.

b. Lecture

La décoloration autour des spots est un indicateur d'une solubilisation des phosphates. L'intensité de la couleur bleue est directement proportionnelle à la concentration des phosphates dans l'échantillon.

II.2.3. Hydrolyse de la caséine

La caséine, protéine de lait, peut être hydrolysée par certaines espèces bactériennes, la recherche de l'activité caséolytique est notamment utile dans l'identification des *Pseudomonas* (Delarras, 2014).

a. Technique

Pour réaliser ce test :

- Une culture bactérienne âgée de 24h a été ensemencée en centre d'une gélose au lait écrémé (annexe 2) en amas.
- Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h à 72h.

b. Lecture

Après incubation, les zones d'éclaircissement du milieu autour des colonies traduisent un résultat positif indiquant l'hydrolyse de la caséine, l'absence de telles zones exprime une caséinolyse négative (Delarras, 2014).

II.2.4. Hydrolyse de la Chitine

L'activité chitinolytique ou la capacité de nos isolats à décomposer la chitine colloïdale a été testée sur milieu à la chitine additionnée ou non de glucose est estimée selon la méthode décrite par de la Vega, Barboza-Corona et al., (2006).

a. Technique

Avant de tester la production de la chitine, il est nécessaire de préparer la chitine colloïdale

1. Préparation de la chitine colloïdale :

Elle est préparée à partir de chitine commerciale (chitine de carapaces de crevettes, Sigma). La préparation a été réalisée selon le schéma de modification de Berger et Reynolds, (1958) ;

- 40 g de chitine (sigma) ont été dissous dans 400 ml de HCL concentré et agités sous une hotte chimique à 30°C pendant 1 heure.
- Traiter ensuite avec 2L d'eau distillée des glaciers pour précipiter la chitine colloïdale
- incubé une nuit à 4°C.
- Le précipité a été filtré à travers 3 couches de papier filtre placé dans un entonnoir,

- la chitine colloïdale a été rincée avec environ 3 litres d'eau distillée jusqu'à ce que le pH du filtrat augmente à 6,0.
- La chitine colloïdale résultante a été pressée entre deux papiers filtres pour éliminer l'excès d'eau, puis placée dans un bécher en verre de 100 ml,
- recouvert de deux couches de papier d'aluminium et autoclavé à 121°C pendant 20 minutes.
- La chitine autoclavée a été stocké à 4°C jusqu'à utilisation ultérieure sous forme humide selon le protocole de **Gomez Ramirez et al., (2004)**.

2. Production de la chitinase :

- L'inoculation sur milieu à la chitine (annexe 2) est effectuée en déposant des amas de bactéries à la surface,
- Incubation de 72h à 30°C.

b. Lecture

L'apparition d'un halo clair autour des colonies indique un résultat positif (**Roberts and Selitrennikoff, 1988**).

II.2.5. Production de l'acide cyanhydrique HCN

La production de l'acide cyanhydrique ou cyanogénèse est effectuée sur le milieu TSA (Tryptone Soya Agar) indicateur de la synthèse d'HCN, selon la technique décrite par **Freyklette et al. (2005)**.

a. Technique

La technique consiste à :

- dans un milieu TSA (annexe 2) additionnée de 4.4g/l de glycine stérilisé séparément par filtration à froid.
- Les boîtes de Pétri contenant le milieu ainsi préparé sont inoculées par une culture bactérienne âgée de 24h par strie.

- Un disque de papier filtre stérile de 9 cm de diamètre imprégné d'une solution de picrate de sodium (5% d'acide picrique et de 2% de carbonate de sodium anhydre) est déposé au fond du couvercle de chaque boîte.
- Cet essai a été mené avec trois répétitions pour chaque traitement avec des témoins sans culture.
- L'ensemble a été scellés avec du parafilm afin de contenir le métabolite gazeux produit et permettre une réaction chimique avec de l'acide picrique sur le dessus.
- Celle-ci est incubée à 30°C/96 h.

b. Lecture

Le potentiel de production de l'HCN a été évaluée en fonction de changements de couleur du papier filtre du jaune vers une couleur comme suit :

- couleur jaune : pas d'HCN ;
- Couleur brune : production faible d'HCN ;
- Brune à orange : production modéré ;
- Orange foncée : production forte. (Trivedi *et al.*, 2008).

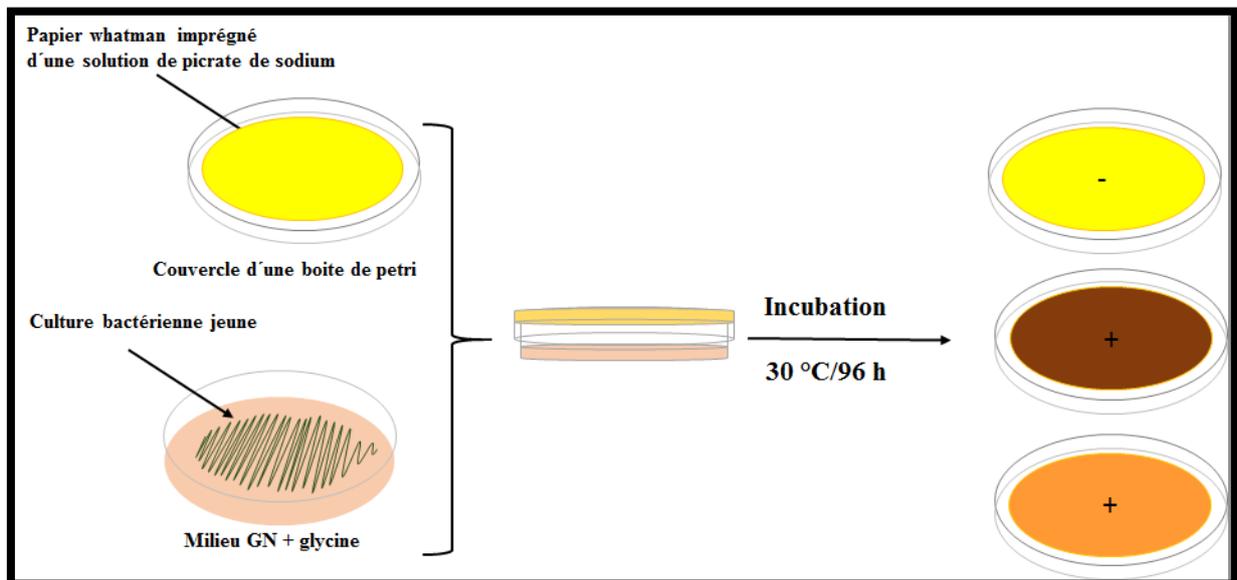


Figure 5: Production d'acide cyanhydrique (HCN)
 + : Présence d'HCN - : Absence d'HCN

II.3. Le dépistage et l'isolement des micro-organismes producteur de biosurfactants

Dans le but d'explorer la production de biosurfactants, un criblage secondaire est effectué chez les souches sélectionnées. A cet effet, différents tests basés essentiellement sur les caractères de la dispersion du pétrole et le pouvoir émulsifiant ont été réalisés.

II.3.1. Test de dispersion du pétrole

Ce test permet de vérifier la corrélation entre le diamètre de la zone claire formée sur la surface de l'huile et l'activité tensio-actif, appelée également l'activité de dispersion de pétrole est observée. La présence d'une concentration très élevée de biosurfactants, augmente considérablement le diamètre formé de la dispersion de l'huile. Par ailleurs, cette méthode est même applicable en présence d'une faible quantité de biosurfactants avec une faible activité tensio-actif (**Youssef et al., 2004 ; Plaza et al., 2006**).

a. Technique

Morikawa et ses collaborateurs (2000) ont développé le test de la dispersion du pétrole, qui consiste à :

- Introduire dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, 20 ml d'eau distillée.
- Puis une quantité de 10 μ l de pétrole est rajoutée à l'aide d'une micropipette, sur la surface de l'eau, afin de former une mince couche d'huile.
- Ensuite, un volume de 10 μ l d'une suspension bactérienne est déposé doucement sur le centre de la couche du pétrole.

b. Lecture

La présence des biosurfactants dans le surnageant est traduite par le déplacement de l'huile et la formation d'une zone claire.

La forme de la goutte sur la surface de l'huile est inspectée après 1min .Si la goutte d'huile sur le surnageant est devenue plate 1min après l'ajout de l'huile, le résultat est considéré comme positif. Si les gouttes restaient perlées, le résultat est noté comme négatif. (**THAVASI et al. 2010**).

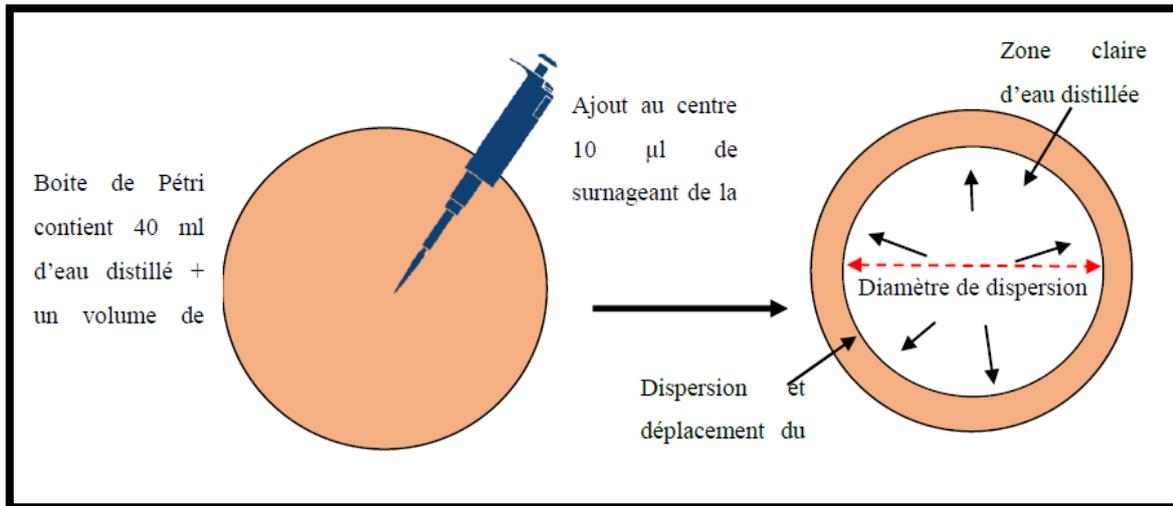


Figure 6: Test de la dispersion du pétrole.

II.3.2. Activité d'émulsification E24

Ce test permet de vérifier la capacité des souches microbiennes à émulsionner la phase hydrophobe (pétrole brut, gasoil, benzène) dans la phase hydrophile (milieu de culture), et la détection des émulsifiants (biosurfactants).

Le « E24 » est fortement lié à la concentration de tensioactifs. Le test d'émulsification permet le dépistage de la production des biosurfactants chez les microorganismes (Chen *et al.*, 2007 ; Bento *et al.*, 2005).

a. Technique

Ce test a été mis en point par FRANCY *et al.* (1991), et modifié par Bodour *et al.*, (2004). Le Protocol du test consiste à :

- Ensemencer chaque souche microbienne est dans un ErlenMeyer de 100 ml contenant 10 ml de milieu M1 liquide (annexe 2).
- le milieu est additionné à 2% de gasoil (phase hydrophobe).
- chaque Erlen Meyer est bouché par le coton pour assurer le passage de l'oxygène tout en évitant la contamination.
- Incuber à 30° C pendant 24h sous agitation à 70 tr/min.
- Après 24h d'incubation, 3 ml de mout de fermentation sont mélangé avec un volume égal (3ml) de gasoil dans des tubes stériles.

- Les tubes sont agités au vortex pendant 2 min ;
- en estime à l'œil nu après 24h de repos à température ambiante la qualité de l'émulsion et ceci par comparaison au témoin ou le mout de fermentation et remplacer par le milieu de culture aseptique.

b. Lecture

Pour les souches émulsifiant le gasoil, on obtient dans le tube 3 phases :

- La 1 ère phase : le mout de fermentation en bas
- La 2èmephase : le gasoil émulsifié aux milieux
- La 3ème phase : la fraction du gasoil qui n'est pas été émulsifiée à la surface.

c. Calcul de l'index d'émulsion E24

Nous avons calculé l'index de l'émulsion (E24) qui représente le rapport de la hauteur de l'émulsion formée sur la hauteur totale du mélange multiplié par 100 par la formule suivante :

$$E24\% = \frac{H_e}{H_t} \times 100.$$

E24 : Activité d'émulsification après 24h.

H_e : Hauteur de l'émulsion formée.

H_t : Hauteur totale du mélange. (Cooper et Goldenberg., 1987).

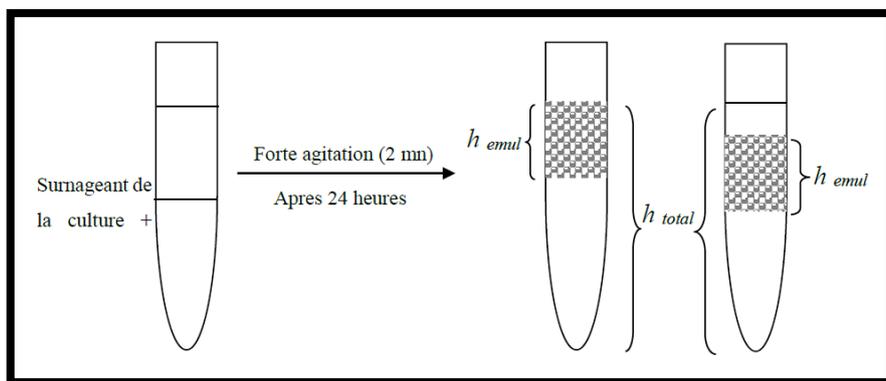


Figure 7: Test de l'indice de l'émulsification.

I. Résultats

I.1. Caractérisation phénotypique

I.1.1. La revivification des souches de *Pseudomonas* Et *Bacillus*

Après purification de quatre souches bactériennes par plusieurs repiquages sur milieu TGEA à 37°C pendant 24 heures, nous avons observé l'apparition de différentes colonies visibles à l'œil nu, montrant des standards morphologiques spécifiques pour le genre *Pseudomonas* et le genre *Bacillus* (figure 8). Les quatre souches bactériennes utilisées sont caractérisés par une croissance rapide sur le milieu TGEA après 24h d'incubation.

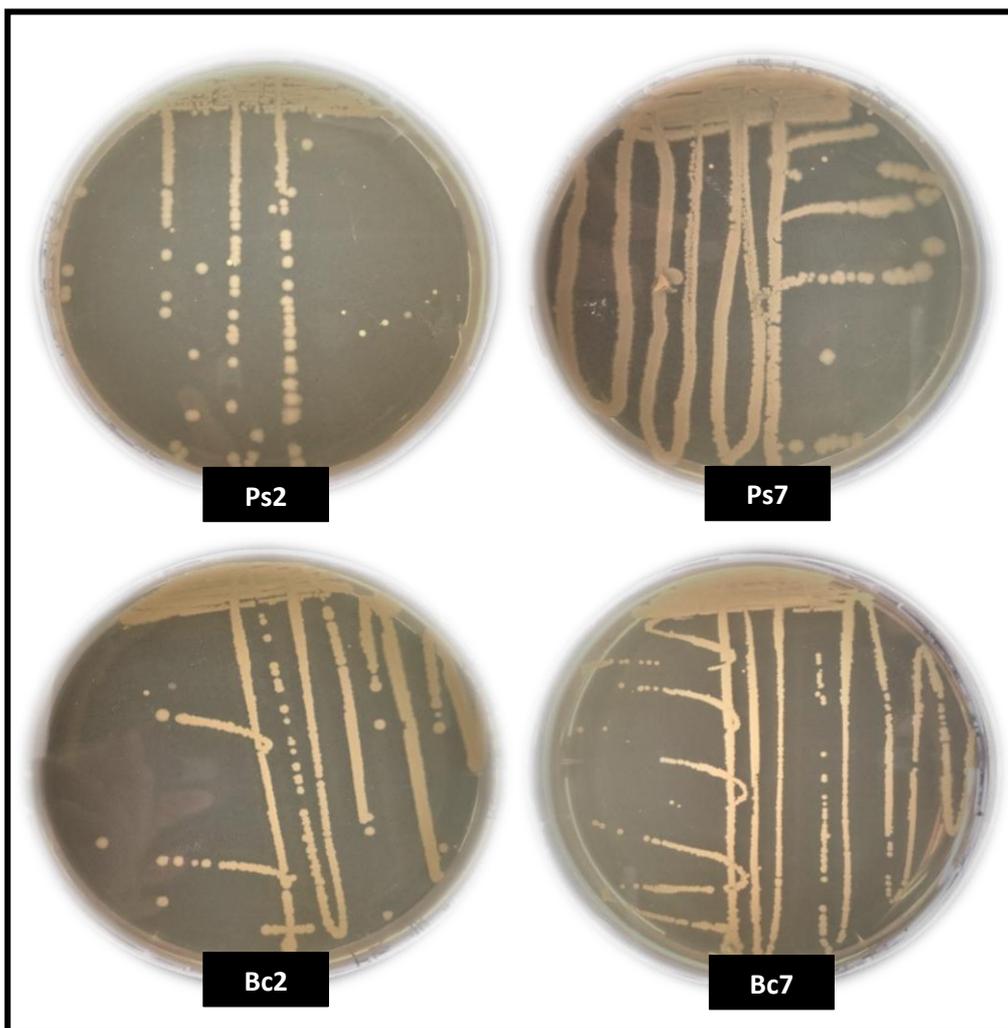


Figure 8: Aspect macroscopique des souches bactériennes étudiées (Photos originales 2021). Bc7 et Bc2 appartiennent au genre *Bacillus* et Ps7, Ps2 appartiennent au genre *Pseudomonas*

I.1.2. Etude morphologique

I.1.2.1. Etude macroscopique

Les caractéristiques morphologiques des souches bactériennes étudiées sont résumées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 4 : Les caractères macromorphologiques des isolats bactériens étudiés.

Caractère macroscopique	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Taille de colonie	0,2 à 0,4 cm	0,3 à 0,5 cm
Forme de colonie	circulaire	circulaire
Opacité	opaque	opaque
Aspect de surface	lisse	lisse
Aspect du contour	Dentelé / irrégulier	régulier
Elévation	plate	connexe
Chromogènes	blanchâtre	Beige à crème
Consistance	visqueuse	visqueuse
Odeur	Présence d'odeur typique	Présence d'odeur typique

I.1.2.2. Etude microscopique

Examen à l'état frais

L'observation microscopique des *pseudomonas* révèle des bacilles droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. Les *Pseudomonas* spp ont une largeur de 0,5-1 µm sur une longueur de 1,5-5 µm (Falkow *et al.*, 2006). Elles sont des bacilles, en forme de bâtonnets, ne formant pas de spores, elles sont mobiles par un seul flagelle comme des *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* et *P. oryzihabitans* ou par plusieurs flagelles polaires comme chez *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. luteola* (Wisplinghoff, 2017).

L'observation microscopique des *Bacillus* révèle des bacilles strictement droite, dont les cellules se présentent isolées ou groupées, qui sont dans la plupart des cas sporulantes et mobiles.

✚ Coloration de Gram

Après réalisation de la coloration Gram, les souches bactériennes appartenant au genre *Pseudomonas* apparaissent sous microscope optique au grossissement (40x100) avec une couleur rose et de forme bacille, donc ce sont des bacilles à Gram négatifs (Figure 9). Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont de petits bâtonnets avec une ciliature polaire, présentant un Gram négatif (Prevot, 1977).

La paroi bactérienne des souches *Bacillus* apparaît de couleur bleue violacée sous forme de bacilles droits, donc ce sont des bacilles à Gram positif (Figure 9). Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont de grands bâtonnets avec une ciliature péritriche, présentant un Gram positif (Prevot, 1977).

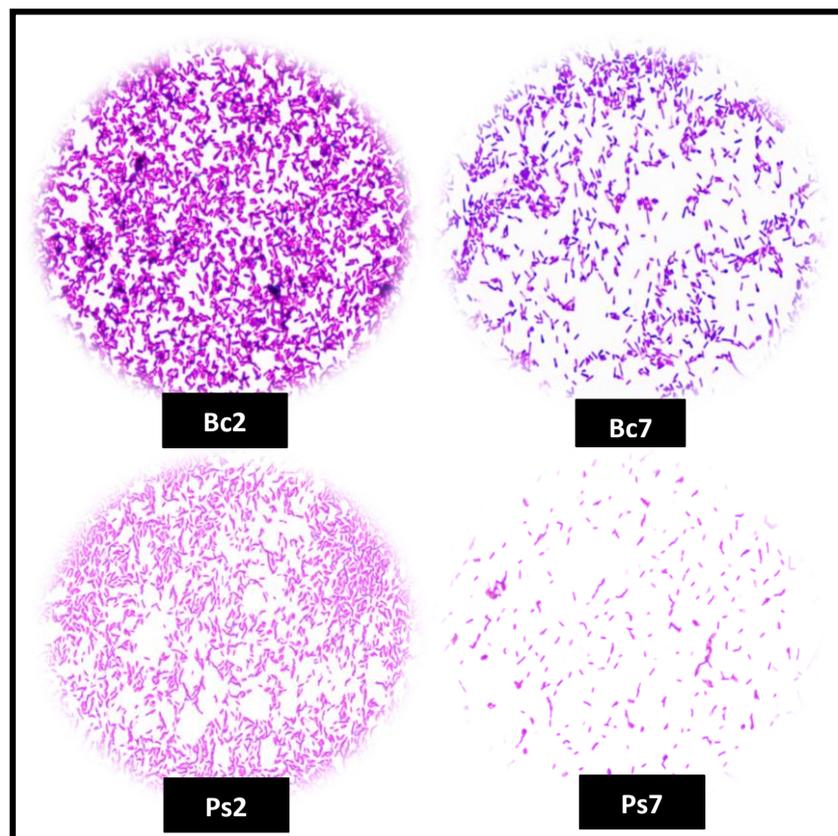


Figure 9: Aspect microscopique des souches bactériennes après coloration de Gram observée sous microscope optique (G 40×100) (Photos originales 2021). Bc2 et Bc7 appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

✚ Coloration de la spore

La coloration de la spore bactérienne au vert de Malachite a révélé la présence de spores chez les souches de *Bacillus* (Figure 10), pour certaines nous avons même observé la spore après coloration de Gram.

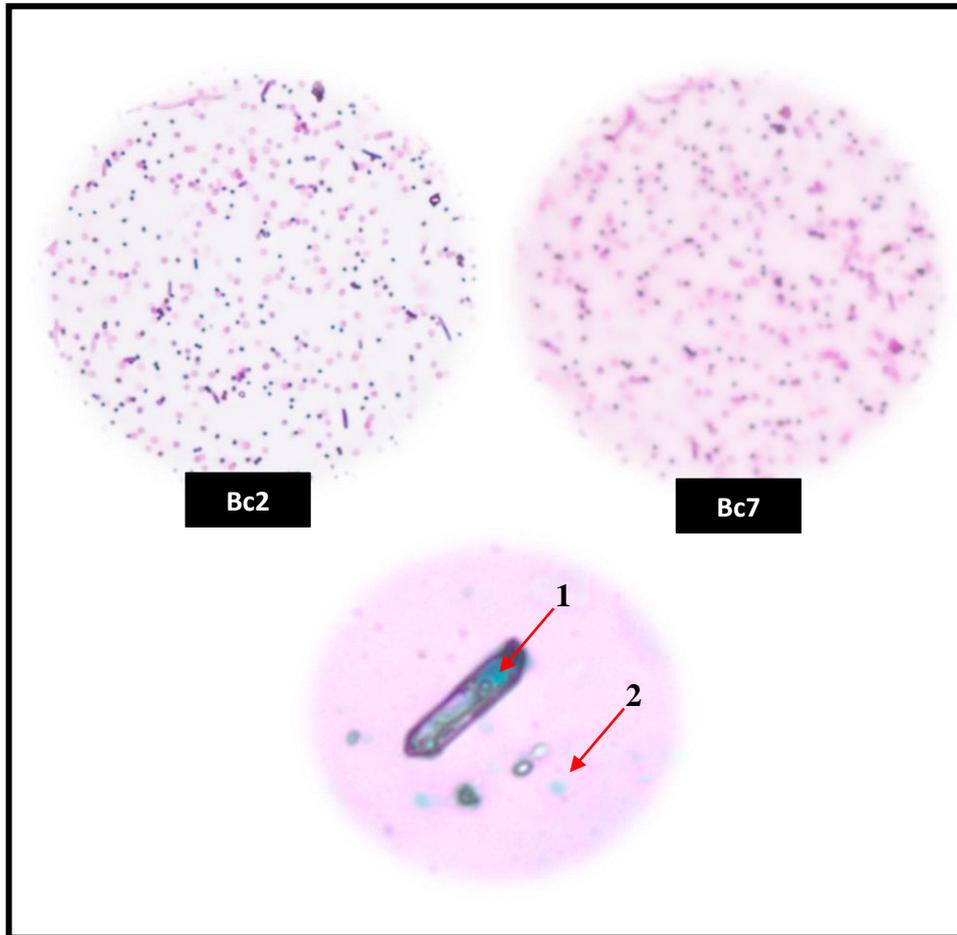


Figure 10: aspect des spores chez les souches de *Bacillus* sous microscope photonique (G40X100) (Photos originales 2021).

Bc2 et Bc7 : appartenant au genre *Bacillus*, 1 : spore intercellulaire, 2 : spore libre.

I.1.3. Etude biochimique

✚ Type respiratoire

Après 24h d'incubation, les quatre colonies ne se développent qu'à la surface du milieu. Ce qui montre que les souches Ps2, Ps7, Bc2 et Bc7 étudiés sont aérobies stricts. D'après ce test, la souche ne peut se développer en absence d'oxygène (O₂). Les résultats observés sont illustrés dans la figure 11:

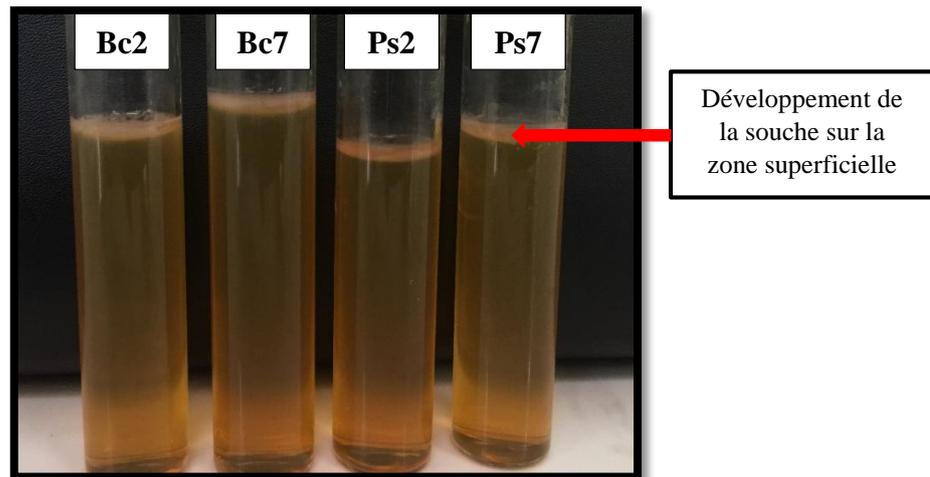


Figure 11: Type respiratoire des souches (Photo originale 2021).

Bc2 et Bc7 : appartenant au genre *Bacillus*, Ps2 et Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

✚ Test mannitol –mobilité

Les résultats du test mannitol mobilité des *Pseudomonas*, a montré la présence des troubles au tour de la pique central, et une diffusion dans le milieu avec une coloration jaune orangée, c'est une dégradation du mannitol produit par réduction du mannose. Donc on constate que ces souches se sont des bactéries mobiles, fermentant le mannitol (Figure 12).

L'absence d'acidification du milieu chez les *Bacillus* révèle que les isolats ne fermentent pas le mannitol elles sont dites mannitol -. Les bactéries aérobies strictes qui ne poussent pas en profondeur, leur mobilité ne pourra être lue. (Joffin et Leyral, 2014).



Figure 12: Résultats de test mannitol-mobilité. (Photo originale 2021).

Bc2 et Bc7 appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

✚ Test de catalase

Le test catalase a pour but de mettre en évidence la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène.

Tous les isolats sont catalase positive, les souches de *Pseudomonas* et *Bacillus* testées, ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (Figure 13).

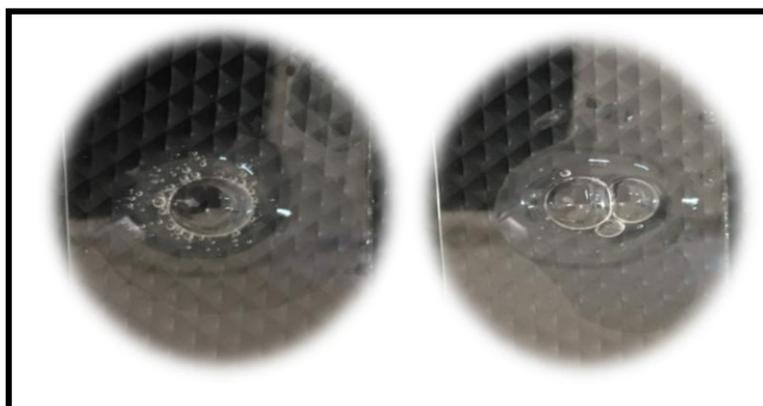


Figure 13: Résultats de test de catalase observée à l'œil nu (photos originales 2021).

✚ Test oxydase

Le test oxydase est basé sur la production d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome c. L'apparition de la couleur violette foncé sur le disque d'oxydase chez les deux souches *Pseudomonas* (Ps2 et Ps7) montre une réponse positive, indique qu'il y a eu une oxydation du réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet.

Par contre, l'absence de la coloration en violet chez les souches Bc2 et Bc7, indique qu'il n'y a pas eu oxydation du réactif (Figure 14).

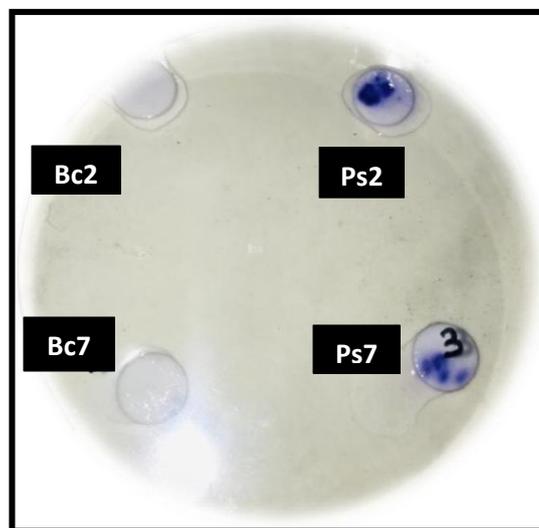


Figure 14: Résultats de test oxydase observé à l'œil nu. (Photo originale 2021).

Bc2 et Bc7 appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

✚ Test de Fluorescence

Nous avons observé un faible pigment bleu diffusible (Figure 15) pour les deux isolats bactériens du genre *Pseudomonas* spp, ces bactéries sont bacilles mobiles, à Gram négatif produisant un pigment fluorescent, de l'oxydase et de la catalase répondant aux critères discriminatifs du groupe fluorescents des *Pseudomonas*.

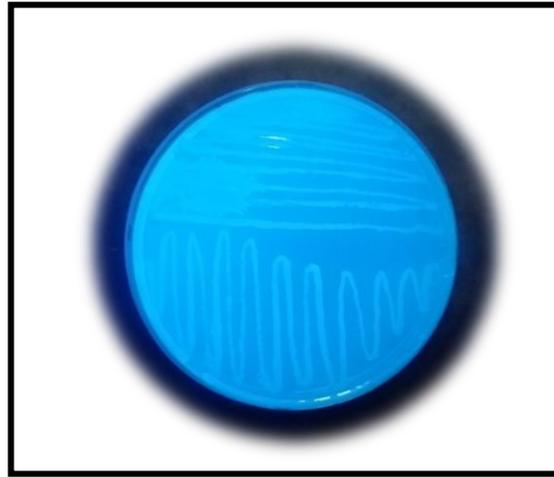


Figure 15: Détection du pigment pyoverdine sur milieu « King B » sous lumière UV (photo originale 2021).

- Le Tableau 5 suivant résume les différents tests physiologiques et biochimiques effectués;

Tableau 5 : les caractères physiologiques et biochimique des souches bactériennes étudiées Bc2 et Bc7 appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

Souche Test	Ps2	Ps7	Bc2	Bc7
Gram	-	-	+	+
Mannitol	+	+	-	-
Mobilité	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Oxydase	+	+	-	-
endospore	/	/	+	+
Fluorescence	+	+	/	/

✚ Résultats de la galerie API 20E

Une galerie d'identification a été utilisée pour nous orienter vers le genre et l'espèce de ces isolats de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp. Après incubation, la lecture de la galerie (Figure 16, 17) a été faite en se référant au tableau de lecture (Tableau 6). Les résultats de toutes les réactions sont notés sur les fiches de résultats. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6: résultats des galeries Api 20E des souches de Ps2, Ps7, Bc2 et Bc7.

	Ps2	Ps7	Bc2	Bc7
ONPG	+	-	+	+
ADH	+	+	-	-
LDC	-	-	-	-
ODC	+	-	-	-
CIT	+	+	+	+
H₂S	-	-	-	-
URE	-	-	+	+
TDA	-	-	-	-
IND	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+
MAN	-	-	-	-
INO	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-

AMY	-	-	-	-
ARA	-	+	-	-
OX	+	+	-	-

(+) : réponse positive, (-) : réponse négative.

L'aspect des galeries Api 20^E est représenté dans la figure suivante :

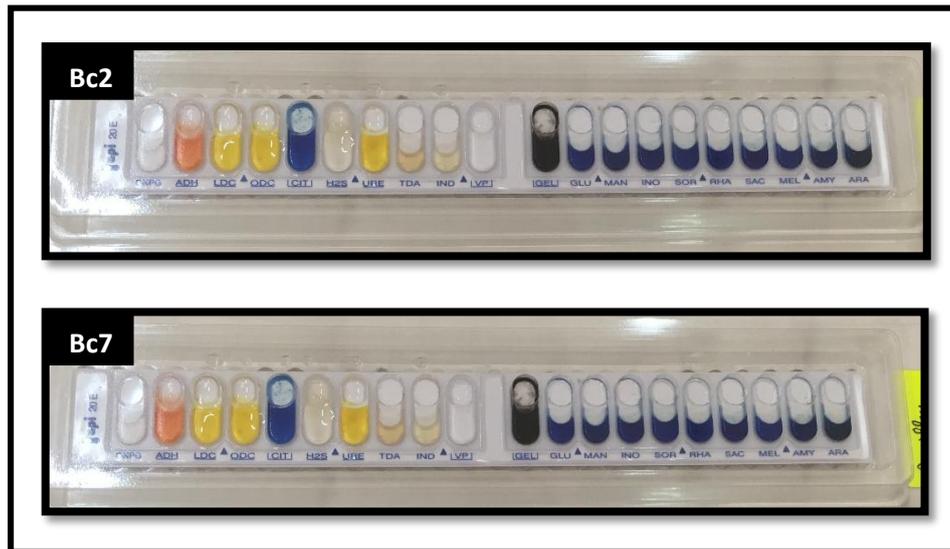


Figure 16: Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches Bc2 et Bc7 après incubation de 48h (photos originales 2021).



Figure 17: Aspect de la galerie API 20E, inoculée par les souches Bc2 et Bc7 après incubation de 48h (photos originales 2021).

Interprétations probabilistique des profils biochimiques par un programme d'identification en ligne l'UPBM

Les résultats des tests biochimiques obtenus suite à l'inoculation de galerie API 20E avec les quatre souches ont été remplis dans la grille des résultats (Figure 18).

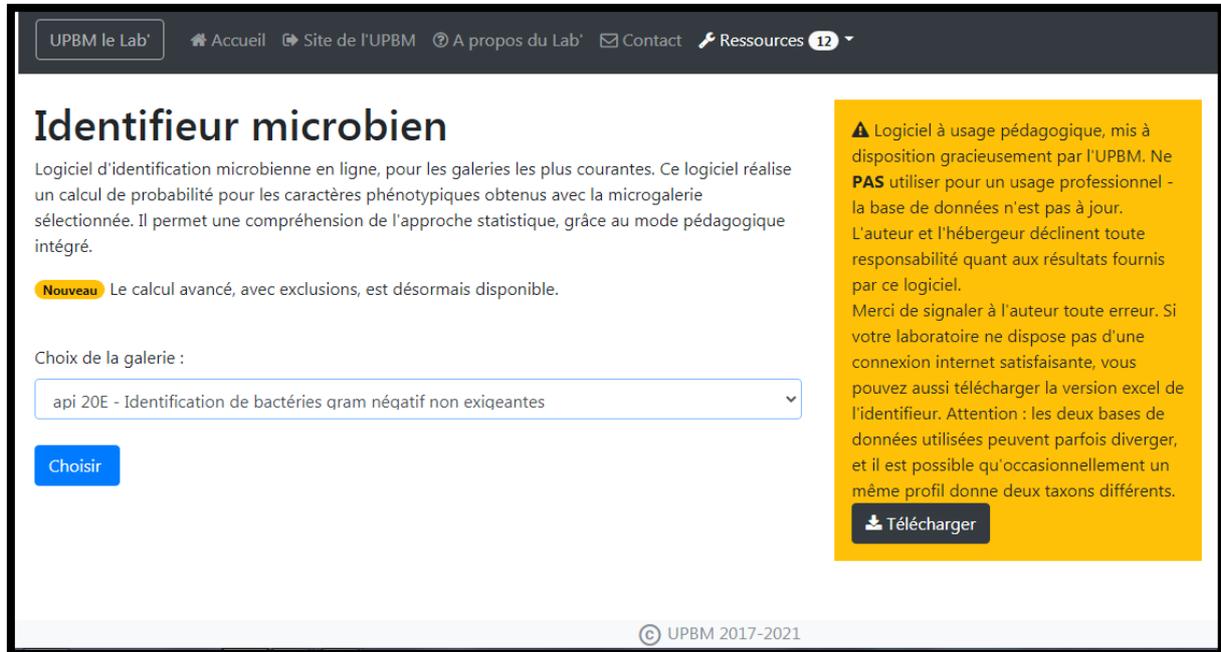


Figure 18: Capture d'écran du programme d'identification en ligne (photo originale 2021)

Une fois que le gille d'identification est rempli, le programme engendre une comparaison entre les résultats de la souche obtenus avec la matrice des autres souches similaires dont le même genre. Par la suite un affichage des résultats obtenus du profile biochimique de l'isolat. Le programme suggère dans le cas de Ps2 que la souche est une *Pseudomonas luteola* avec un score d'identification de 99.8% (Figure 19).

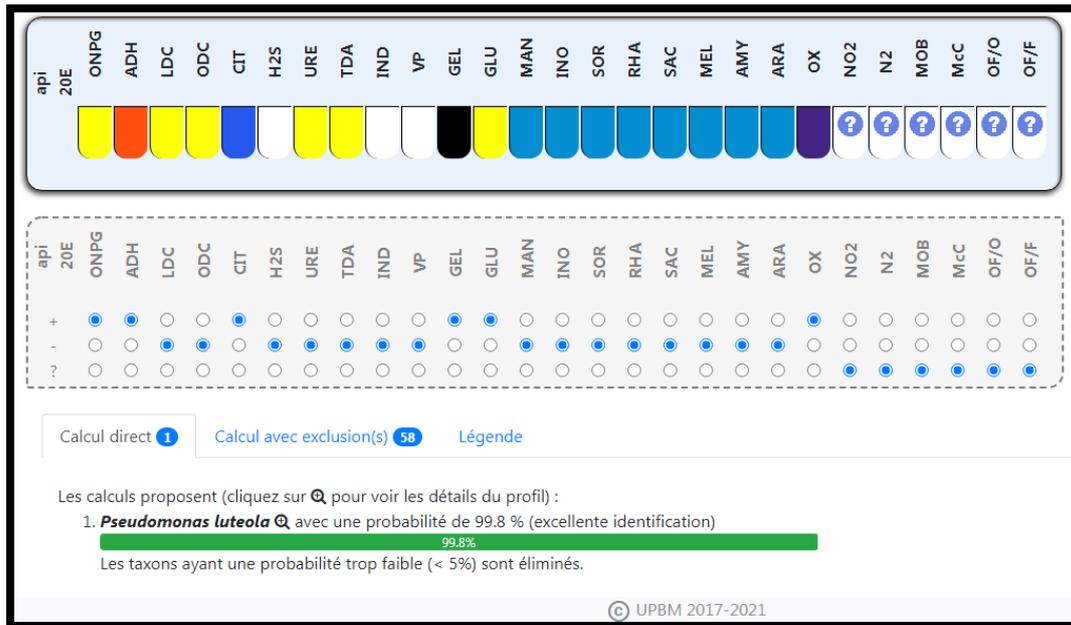


Figure 19: Capture d’écran de l’affichage de l’onglet d’identification de la souche Ps2 Par le programme d’identification en ligne l’UPBM (photo originale 2021).

Les résultats probables obtenus après l’identification sont résumé dans le tableau suivant :

Tableau 7: Identification probable des souches bactériennes testées.

Souche	Identification probable du genre et/ou espèce	Probabilité
Ps2	<i>Pseudomonas luteola</i>	99.8%
Ps7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90.7%
	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	9.3%
Bc2	<i>Bacillus licheniformis</i>	96%
Bc7	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.2%

I.1.3. Etude microbiologique

✚ L'antibiogramme

Les profils de résistance déterminés montrent que les souches présentent différents comportements vis-à-vis les ATB testés. Les résultats d'antibiogramme des souches bactériennes réalisés sur le milieu King B sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 8: zone d'inhibition par la méthode de disques de diffusion.

Sigle	Ps2	Ps7	Bc2	Bc7
AMP	R	R	R	R
AMX	R	R	R	S
C	TS	R	TS	ES
CIP	ES	ES	ES	ES
CZ	ES	ES	ES	ES
E	TS	R	ES	ES
NA	ES	S	TS	TS
S	ES	ES	ES	ES
SXT	ES	ES	R	R
TEC	TS	TS	TS	TS

(R) : bactérie résistante, (S) : bactérie sensible, (TS) : bactérie très sensible, (ES) : bactérie extrêmement sensible.

Les souches *Pseudomonas* ont montrées une résistance totale aux Aminopénicilline (Amoxicilline, l'Ampicilline) et aux Phénicoles (Chloramphénicol) et les Macrolides (Erythromycine) c'est uniquement la souche Ps2 qui s'est montrée sensible et représente des zones d'inhibition 16 mm de diamètre.

Les deux souches *Pseudomonas* testées présentent des sensibilités élevées aux fluoroquinolones (Ciprofloxacine), aux Sulfamides-Triméthoprimine (Triméthoprimine), aux Céphalosporines (Céfazoline), et aux aminosides (Streptomycine).

Les souches *Bacillus* ont montrées une résistance totale aux Sulfamides-Triméthoprimine (Triméthoprimine), et une très faible sensibilité aux Aminopénicilline (Amoxicilline, l’Ampicilline). Elles ont montrées une sensibilité aux aminosides (Streptomycine), aux fluoroquinolones (Ciprofloxacine), aux Céphalosporines (Céfazoline) et aux Macrolides (Erythromycine).

Les souches *Bacillus* montrent des sensibilités intermédiaires vis-à-vis des Phénicolés (Chloramphénicol), des Glycopeptides (Teicoplanine), et des Quinolones (Acide nalidixique).

Pour les Aminopénicilline, nos résultats montrent une résistance importante des souches à l’Amoxicilline et l’Ampicilline. Les figures ci-dessous montre les différentes réactions des quatre souches bactériennes étudiées vis à vis des ATB testés.

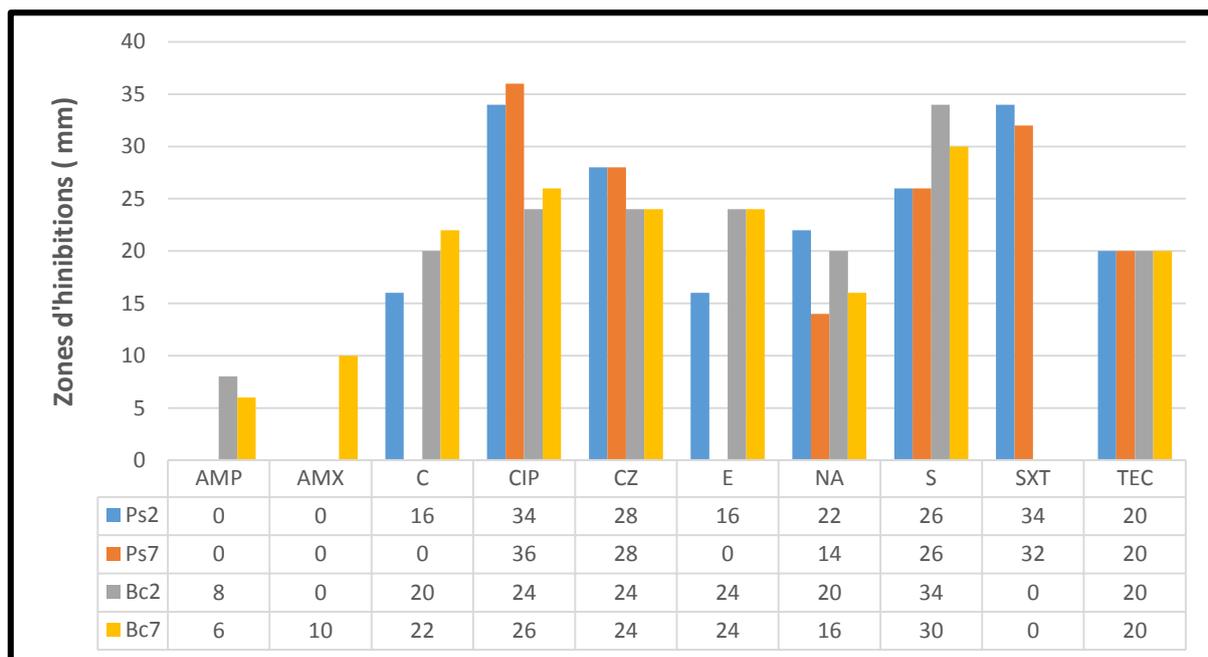


Figure 20: Représentation des résultats du test de la résistance des souches bactériennes vis-à-vis de dix antibiotiques testés.

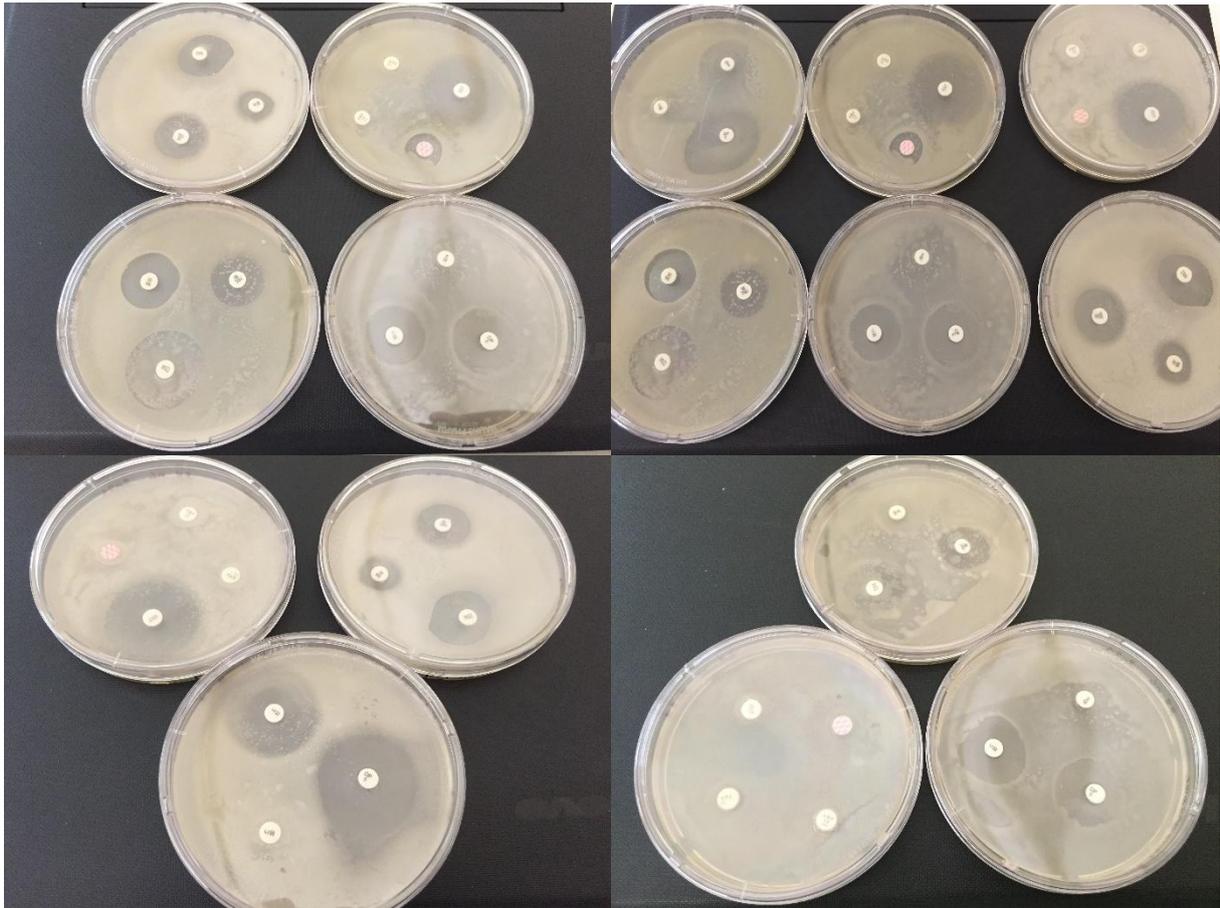


Figure 21: Résultats de test antibiogramme sur les souches bactériennes Sp2, Sp7, Bc2 et Bc7 vis-à-vis de dix antibiotiques (photos originales 2021).

I.2. Production d'enzymes

I.2.1. Cellulase

Le pouvoir hydrolytique des souches est révélé également par la production de cellulases.

Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma et al., 2007) pour les souche de *Pseudomonas* spp fluorescents et *Bacillus* sp.

I.2.2. Solubilisation des phosphates

Les quatre souches ont été testées pour leur capacité de solubiliser le phosphate inorganique sur un milieu Pikovskaya solide contenant le phosphate tricalcique $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphore. Après 10 jours d'incubation à 30°C, les résultats confirment clairement la capacité des souches *Bacillus* à utiliser $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ disponibles en milieu PKV, qui ont produit une zone claire autour de la colonie, et sa traduit une solubilisation de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, cela

reflète la même fonction réalisée par ces espèces dans leur habitat naturel. Le halo est absent chez les *Pseudomonas*

Le développement de halos clairs autour des colonies phosphatases positives n'est devenu net qu'après 96h d'incubation.

I.2.3. Hydrolyse de la caséine

La dégradation de la caséine par les souches étudiées est révélée par l'apparition d'un halo claire autour des colonies. Des zones claires ont été observées pour les deux isolats *Pseudomonas*, indiquant qu'ils sont des caséinase positive, à l'exception de la souche Bc2 et Bc7, qui ont montrés une réponse négative envers la dégradation de la caséine (Figure 22).

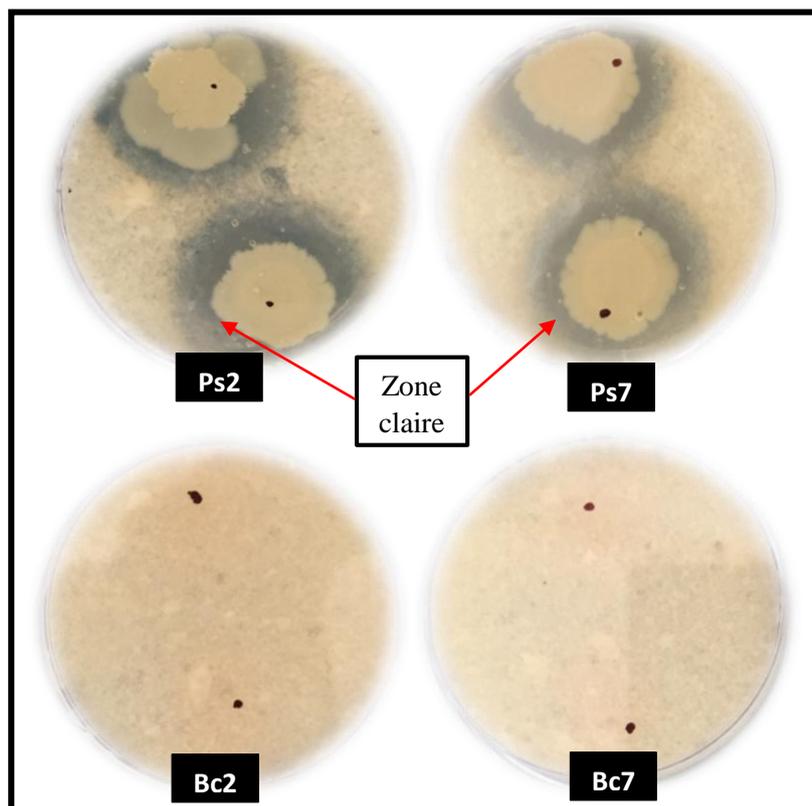


Figure 22: activité caséinase des souches *Pseudomonas* spp fluorescents (photo originale 2021).

I.2.4. Hydrolyse de la Chitine

L'étude de la production de la chitinase chez les souches isolées, est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'hydrolyse autour des colonies suite à l'inoculation de milieu de culture gélosé, additionnée ou non de glucose par les souches bactériennes testés après une l'incubation à une température de 30°C pendant 5 jours.

Les résultats obtenus ont montré que les souches isolées, n'ont manifesté aucune activité chitinolytique.

I.2.5. Production de l'acide cyanhydrique HCN

Après 5 jours d'incubation à 30°C, la couleur du papier filtre commence à virer du jaune à brun foncé indiquant ainsi la production d'acide cyanhydrique et cela pour les deux souches *Bacillus* testées (Figure 23).

Nous avons remarqué que les deux souches *Pseudomonas* n'ont pas la capacité à produire de l'acide cyanhydrique.

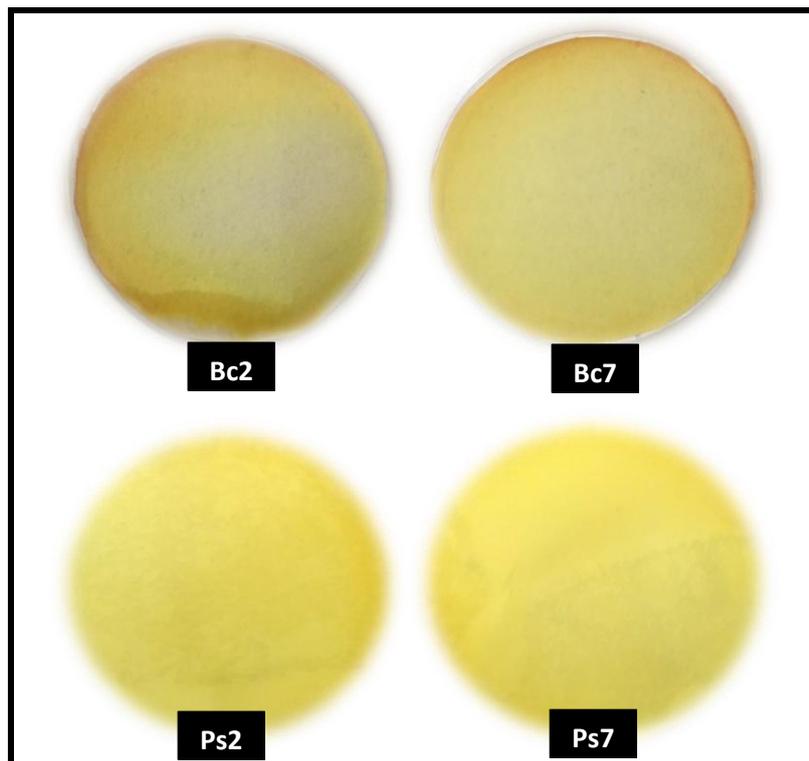


Figure 23: Production de l'acide cyanhydrique HCN chez les souches *Bacillus* sp (Photo originale 2021).

- Le Tableau ci-dessous récapitule les différentes activités enzymatiques enregistrées chez les souches de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp étudiées :

Tableau 9: Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques observées chez les souches de *Pseudomonas* et *Bacillus*.

Souche \ Test	Ps2	Ps7	Bc2	Bc7
Cellulase	+	+	+	+
Phosphatase	-	-	+	+
Caséinases	+	+	-	-
Chitinase	-	-	-	-
HCN	-	-	+	+

I.3. Le dépistage et l'isolement des micro-organismes producteur de biosurfactants

I.3.1. Test de dispersion du pétrole

Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant qui induit une variation de l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression superficielle du bio-tensioactif fait déplacer la phase huileuse (MORIKAWA *et al.* 1993).

Les résultats du test de déplacement d'huile sont positifs pour les quatre souches : le surnageant des souches a provoqué une zone de déplacement d'huile visible ; ce qui indique que les quatre souches ont une activité de surface et de mouillage, ce déplacement moyen est de l'ordre de 14.8mm, 21mm, 8mm et de 11.2mm respectivement pour les souches Ps2, Ps7, Bc2 et Bc7 (Figure 24). Ce résultat c'est un indicateur de présence de biosurfactants ; donc les quatre souches étudiées sont productrices de molécules douées d'activité de surface et/ou d'émulsification.

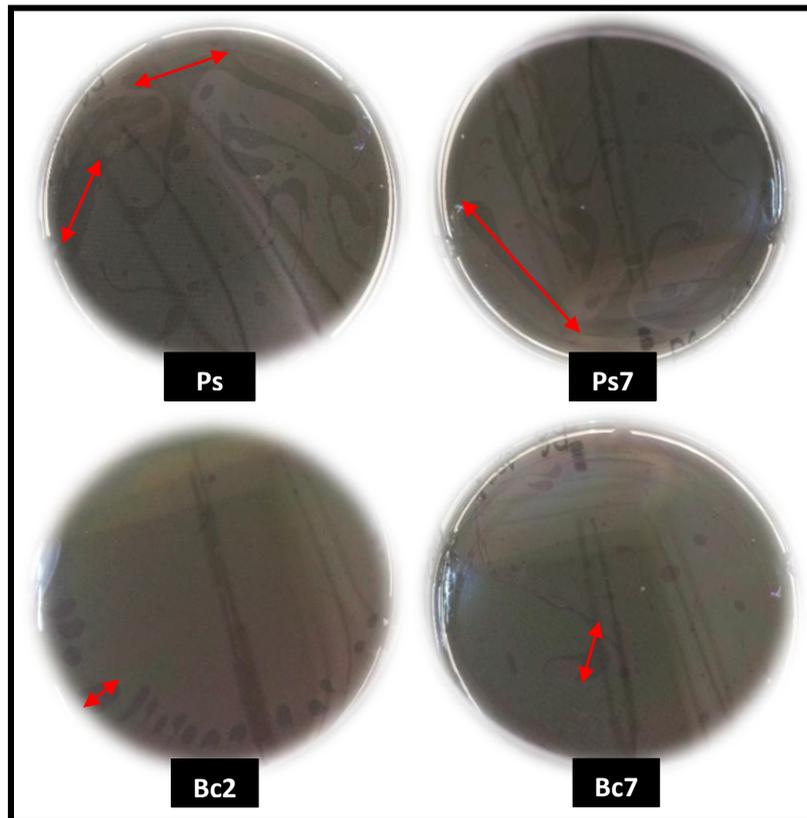


Figure 24: Présentation du test de dispersion du pétrole (Photos originales 2021). Bc2 et Bc7 appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 appartenant au genre *Pseudomonas*.

➤ Le tableau suivant compare nos valeurs avec ceux trouvés par d'autres études :

Tableau 10: Résultats du test de déplacement de l'huile pour différentes souches.

Souche	Origine	Diamètre	Référence
<i>Brevibacteriumlutescens</i> (JS05)	Usine de stockage de la pêche contenant une teneur élevée en sel, Inde	4.2cm	JAYSREE et al. 2013
<i>Bacillus sp.</i> (JS06)	Usine de stockage de la pêche contenant une teneur élevée en sel, Inde	3.0cm	JAYSREE et al. 2013

<i>Halobacillus Dabanensis</i>	Ecosystème de Mangrove contaminée par du pétrole, Egypte	4.00 ± 0.25cm	KHEIRALLA et al. 2013
<i>Pontibacillus Chungwhensi</i>	Ecosystème de Mangrove contaminée par du pétrole, Egypte	3.60 ± 0.10cm	KHEIRALLA et al. 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (C450R)	Eaux de production des champs de pétrole, Tunisie	8 ± 1cm	MNIF et al. 2011
<i>Ps2</i>	rhizosphère de l'olivier, Algérie	1.15 cm	Cette étude
<i>Ps7</i>	rhizosphère de l'olivier, Algérie	0.8 cm	Cette étude
<i>Bc2</i>	rhizosphère de l'olivier, Algérie	2.1 cm	Cette étude
<i>Bc7</i>	rhizosphère de l'olivier, Algérie	1.48 cm	Cette étude

I.3.2. Activité d'émulsification E24

Dans le but d'estimer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test d'émulsification (E24) est mis en évidence.

Les résultats obtenus ont montré que tous les souches se manifestent productrices de biosurfactants, ceci est confirmé par l'apparition d'une couche d'émulsion dans tous les tubes. La figure 25 représente les indices d'émulsion (E24) obtenus par les quatre souches sélectionnées en présences du gasoil.

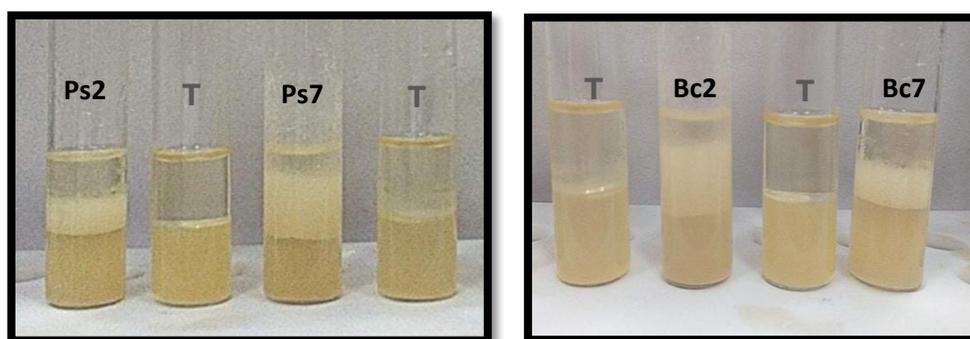


Figure 25: L'index d'émulsification chez les trois souches sélectionnées productrices des biosurfactants (Photos originales 2021). Bc2 et Bc7 : appartenant au genre *Bacillus*, Ps2, Ps7 : appartenant au genre *Pseudomonas*, T : témoin.

Au vu des résultats obtenus ; nous pouvons en déduire que la souche Ps7 est plus efficace à dégrader les hydrocarbures que les reste des autres souches étudiées, avec un pourcentage dépassant les 50%. Les restes des souches Ps2, Bc2 et Bc7 ont présenté un E24 moins important, avec des pourcentages de (41, 48.48 et 42.42%) respectivement.

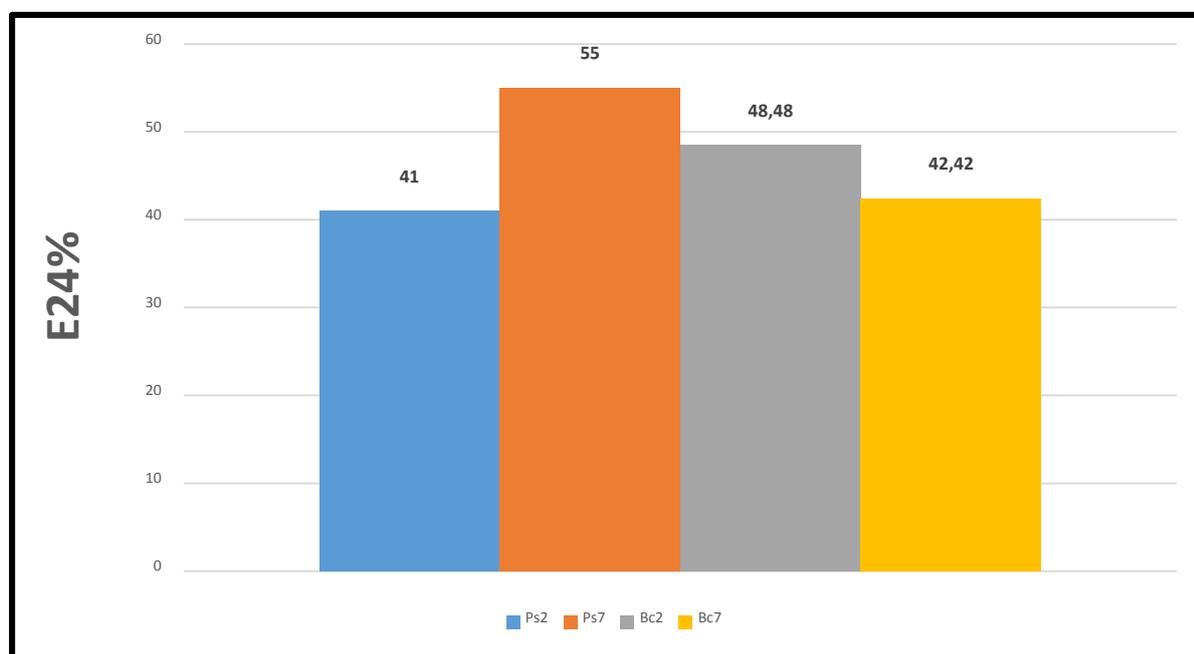


Figure 26: Présentation du pourcentage de l'indice d'émulsion E24% chez les différentes souches productrices de biosurfactants.

II. Discussion

Les bactéries du genre *Pseudomonas* spp occupent la majorité des écosystèmes naturels et même extrême. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et aussi elles sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments, et de dégrader plusieurs composés organiques, tels que des composés halogénés des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (**Ramos, 2004**).

Les bactéries du genre *Bacillus* sp sont retrouvées pratiquement dans toutes les niches écologiques. Allant du sol jusqu'aux environnements aquatiques. Cette diversité est confirmée par les travaux de plusieurs auteurs qui ont isolé des souches de *Bacillus* à partir des eaux de mer, des sédiments, des lacs salés, des poussières, des sources chaudes et des sols pollués (**Mutzel et al, 1996 ; Danne et al ,2002 ; Yumoto et al ,2003**).

L'identification morphologique a d'abord consisté en un examen macroscopique par l'observation directe à l'œil nu de l'aspect des colonies obtenues sur le milieu TGEA. Ensuite un examen microscopique des colonies à l'état frais et une coloration de Gram ont été réalisés.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Prevot : Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* spp sont de petits bâtonnets avec une ciliature polaire, présentant un Gram négatif (**Prevot, 1977**). Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sp sont de grands bâtonnets avec une ciliature péritriche, présentant un Gram positif (**Prevot, 1977**).

Les bactéries appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents sont parmi les bactéries à Gram négatif les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (**Kaioua et Grairi, 2015**). La pyoverdine est un sidérophore de type « catécholate-hydroxamate », ayant une très forte affinité pour l'ion Fe³⁺. Ce sont des pigments très tôt considérés comme des marqueurs taxonomiques potentiels des *Pseudomonas* fluorescents comme : *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (**Tourkya et al., 2009**). Les *pseudomonas* fluorescents produisent ces sidérophores pour assimiler le fer et sont donc impliqués dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes (**Lemanceau et al., 1992**).

Les deux souches de *Bacillus* étudiées produisent des endospores. En effet la capacité de former des endospores dans des conditions aérobies a été le caractère clé dans la définition du groupe *Bacillus* depuis les années 1920 appliqué dans toutes les éditions du Bergey's Manual of Systematic.

La catalase est une enzyme commune dans presque tous les organismes vivants exposé à l'oxygène ; elle catalyse la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. La présence de catalase chez les micro-organismes est utile dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ainsi, des souches présentant une activité catalase doivent être hautement résistantes au stress mécanique et chimique de l'environnement (**Kumar et al, 2012**).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches sont catalase positif pour les quatre. Ces résultats sont en accord avec les études de plusieurs chercheurs, qui ont montré que les *Pseudomonas* spp sont des producteurs de catalase et de cytochrome oxydase (**Uğur et al, 2012 ; Burns, 2018**),

La recherche de l'enzyme cytochrome c oxydase est considérée comme étant un caractère taxonomique indispensable pour l'identification de groupe fluorescents des *Pseudomonas* (**Singleton, 2005**). Les *Pseudomonas* spp *Fluorescent* sont définis comme étant des microorganismes aérobies utilisant l'oxygène comme récepteur final d'électron et incapable de fermenter le glucose et selon **Stanier et al, (1966)**, les *Pseudomonas* spp sont à catalase positive et oxydase positive à l'exception de quelque espèces comme *P. luteola*, *P. syringae* et *P. oryzihabitans* qui sont oxydase négative (**Wisplinghoff, 2017**).

Les deux souches de *Bacillus* utilisés ont montré un résultat positif pour production de la phosphatase. Effectivement, d'après (**Kloepper et al, 1989**) les *Bacillus* peuvent solubiliser le phosphore organique du sol par l'action de phosphatase ou phosphore inorganique par la libération d'acides organiques avec un faible poids moléculaire, tels que l'acide citrique (**Reys et al, 2001**) et de l'acide gluconique (**Fenice et al, 2000**).

Malgré l'absence d'un halo autour des colonies *Pseudomonas*, mais ces souches pourraient solubiliser le phosphore en milieu liquide. D'après **Arif et al., 2015**, qui montre que *Pseudomonas* spp solubilise le phosphore a des quantités significatives en milieu liquide (187.9µg / ml), malgré l'absence d'halo de la solubilisation sur milieu solide,

Le test de cellulase effectué sur les quatre souches utilisées de *Bacillus* et *Pseudomonas* ont montré que tous les isolats sont positifs. Des résultats similaires ont été trouvés avec **Sweta Kachhap et al., 2015** qui montrent que la production maximale a été affichée chez *Pseudomonas* spp avec (85%) suivie par *Acetobacter* spp. (75%), *Azotobacter* spp. (61,5%) et *Enterobacter* spp. (41,2%). Le résultat positif des souches de *Pseudomonas* se confirme avec le travail de (**Reetha et al, 2014**) qui a montré que *Pseudomonas fluorescens* a la capacité de produire un

mécanisme important d'inhibition, la cellulase qui dégrade la paroi cellulaire fongique, cette enzyme a un rôle dans la prévention de l'infection des plantes provoquée par des agents pathogènes. Le pouvoir hydrolytique des souches est révélé également par la production de cellulases (**Verma et al, 2007**).

Les *Pseudomonas* spp sont reconnues par leur production des enzymes thermostables, telles que les protéases (exemple : la métalloprotéase), elles peuvent provoquer de graves problèmes dans l'industrie laitière, tels que l'hydrolyse des protéines du lait (**Martins et al, 2015**).

L'acide cyanhydrique est l'un des produits impliqués dans l'élimination de divers agents pathogènes, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition (**Zeller et al., 2007**). Une différence existe entre les souches en termes d'efficacité de production de HCN, celle-ci revient à la variabilité d'expression des gènes (hcnB et hcnC) présentés chez les souches producteurs (**Ramette et al, 2003**). La HCN synthase est une flavoprotéine de la membrane qui catalyse la formation de HCN et de CO₂ de la glycine (**Ramette et al., 2003**).

Une corrélation positive est observée entre la production de HCN et la protection du concombre et de la tomate contre *Phytophthora ultimum* et *Fusarium oxysporum* respectivement (**Ramette et al, 2003**). Dans cette étude, nous avons signalé la production de l'HCN chez deux isolats de *Bacillus* uniquement. Ce qui confirme nos résultats positifs pour nos deux souches de *Bacillus* utilisés dans le test de HCN. Les autres souches de *Pseudomonas* se sont avérées incapables de produire ce composé volatile. Ceci serait la conséquence de l'inexistence de gènes (hcn) responsables de la synthèse de ce métabolite (**Laville et al, 1998**) ou bien de l'absence d'un précurseur adéquat (**Castric, 1977 ; Curl et Truelove, 1986**).

La variabilité de l'expression des gènes (hcnA, hcnB et hcnC) peut expliquer la différence de production de HCN entre les souches de *Pseudomonas* spp (**Ramette et al., 2003**). *Bacillus* sp produit du HCN et participe à l'inhibition de divers agents pathogènes, notamment les champignons (**Verma et al., 2007**). Ce composé volatil agit directement sur les cellules en bloquant le cytochrome C oxydase dans la chaîne respiratoire. Il permet également de capter certains ions métalliques en formant des complexes avec eux (**Blumer et Haas, 2000**), et peut agir comme un inducteur de résistance des plantes (**Kumar et al., 2012**).

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi-synthétique (**Lavigne, 2007**), qui peut inhiber sélectivement certaines

voies métaboliques des bactéries, et ne produit généralement pas d'effets toxiques sur les organismes supérieurs (**Perronne, 1999**).

Les résultats obtenus montrent que les souches *Pseudomonas* sont résistantes vis-à-vis des antibiotiques qui agissent sur la synthèse du peptidoglycane pariétal (Ampicilline, Amoxicilline) et sur la synthèse des protéines (Chloramphénicol et l'Érythromycine). Selon des études de **Zerrouki A et Kaci-Moussa F (2014)** l'ensemble des souches *Pseudomonas* spp présente une forte sensibilité à la Streptomycine qu'à l'Ampicilline. Ces résultats s'accordent avec ceux obtenue par **Donna et al, (1972)** et **Saravanan et al, (2013)**. Pour les Aminopénicilline, nos résultats montrent une résistance importante des souches *Bacillus* à l'Amoxicilline et l'Ampicilline, ce qui nous laisse supposer que les souches sont productrices de bêta-lactamase (**Amziane touazi, 2014**).

La plupart des *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp dont l'efficacité a été prouvée dans le biocontrôle des maladies de plantes, produisent un ou plusieurs antibiotiques autres que les sidérophores (**Haas et Défago, 2005**).

Depuis quelques années, grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes tels que les tensioactifs biologiques appelés encore biosurfactants. Les biosurfactants sont des composés amphiphiles qui ont la capacité de mobiliser les contaminants et les rendre disponibles pour la biodégradation. Ils ont également été utilisés dans les industries comme agent floculant, adhésifs, désémulsion- agents mouillants, mouillants et moussants. Le biosurfactant largement étudié appartient au groupe des rhamnolipides qui est un biosurfactant anionique et isolé à plusieurs reprises de *Pseudomonas* spp. Divers bioremédiations des études ont montré que les souches productrices de biosurfactants améliorent le taux de biodégradation des contaminants (**Gupta et al., 2020a, 2020b**).

Noha et al, (2004) ont rapporté que la technique de déplacement du pétrole est une méthode fiable pour mise en évidence de la production des biosurfactants. **Čipinytė, et al, (2011)** ont rapporté la présence d'une relation proportionnelle entre la concentration des biosurfactants et la surface de la zone claire de déplacement.

Dans le but d'explorer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test de dispersion de l'huile est mis en œuvre. Une lecture positive de la présence du biosurfactants dans le surnageant est traduite par l'apparition d'une zone claire. Les résultats obtenus ont montré que les souches sont productrices de biosurfactants avec des diamètres des zones claires

formées entre 8mm, 21mm. Cette constatation laisse suggérer que les quatre souches présentent un intérêt industriel majeur, dans la mesure où elles sont capables de produire des molécules avec une activité émulsifiante (**Morikawa et al, 2000**). Une souche de *Pseudomonas* spp a montré un résultat positif pour criblage initial de la production de biosurfactants par la méthode de déplacement d'huile (**Swati et al, 2020**).

Dans le but d'estimer la production des biosurfactants chez les souches isolées, le test d'émulsification (E24) est mis en évidence, La souche Bc2 est sélectionnée émulsifiante des hydrocarbures avec un pourcentage de 48.48% pour le gasoil. Cependant, la souche Ps7 a engendré un indice d'émulsification de gasoil de 55%. Parmi les souches sélectionnées, dans les travaux de **Swati et al (2020)**, *Bacillus* spp RSL2 présentait une meilleure tensioactive propriété telle que le plus élevé E24 de 57%. **Pereira et al, (2013)** ont isolé une souche appartenant au genre de *Bacillus subtilis* à partir d'un champ pétrolier au Brésil, avec un pouvoir émulsifiant de n-hexadecane de 52.7 %. Des résultats proches ont été enregistrés chez la même espèce par **Benincasa et Accorsini, (2008)** et **Lovaglio et al, (2011)** avec un index d'émulsion de 50% et 58% respectivement. **Patel et Desai, (1997)**, et **Wei et al, (2005)** ont rapporté que différentes souches de *Pseudomonas* spp sont dotées de pouvoir émulsifiant et stabilisateur de plusieurs types d'hydrocarbures et des huiles.

La souche *Bacillus* sp est un micro-organisme adapté à la production de biosurfactants en raison de ne présenter aucun effet pathogène, permettant ainsi la l'emploi de ses produits dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (**Sivapathasekaran et al, 2010 ; Giro et al, 2009**). *Bacillus* sp produit un lipopeptide nommé surfactine, un puissant biosurfactant avec une activité de surface étendue, qui peut être facilement isolé sous sa forme pure. Il se compose d'un acide gras -hydroxylé à longue chaîne avec 13, 14 ou 15 atomes de carbone avec deux groupes fonctionnels qui ont une chaîne peptidique courte de sept résidus d'acides aminés (**Barros et al, 2007 ;Khopade et al, 2012 ;Vaz et al, 2012**).

Conclusion et perspectives

Durant notre étude, nous avons mis en exergue les potentialités des souches de *Bacillus* et *Pseudomonas* à synthétiser des molécules actives pouvant apporter une source naturelle de métabolites trouvant leurs applications dans les différents domaines de la biotechnologie.

Sur la base des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, les deux souches Ps2 et Ps 7 présentent des caractéristiques identiques à celles du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescent ainsi que les souches Bc2 et Bc7 présentent des caractéristiques identiques à celle du groupe de *Bacillus* sp.

De nombreuses activités biologiques telles que la solubilisation de phosphates, la production de l'HCN, la production d'enzymes lytiques (chitinase et cellulase) ainsi que la production des biosurfactants sont mises en évidence *in vitro* chez les souches isolées.

Les résultats de cette étude montrent pour la majorité des souches une bonne production de métabolites secondaires (HCN, cellulase, phosphatases, et caséinase), donc ces souches peuvent être efficaces et jouent un rôle dans l'antagonisme et la biostimulation végétale.

L'utilisation de galerie API 20E et l'interprétation probalistique des résultats obtenus a montré l'identification des souches isolées (Ps2, Ps7, Bc2 et Bc7) comme étant : *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus licheniformis* respectivement.

L'étude de la production en biosurfactant par les souches a montré qu'elles sont capables de synthétiser des biomolécules spécifiques ayant des propriétés tension-actives puisque l'index d'émulsification varie de 41% à 55%. Les résultats de la dégradation du gasoil ont démontré qu'ils sont intrinsèquement biodégradables en raison de leur hydrophobicité.

Ces isolats pourraient trouver leurs places dans les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable. De nombreux travaux ont pu mettre en évidence des souches modèles, toutefois il faut garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces bactéries à l'échelle de pratiques biotechnologiques.

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- L'identification des souches bactériennes testées par des techniques de la biologie moléculaire telle que le séquençage de l'ARN 16s

- La recherche d'autres métabolites secondaires a l'origine de ces effets bénéfiques.
- L'isolement d'autres souches productrices des biosurfactants.
- Purification et extraction des biosurfactants.
- L'utilisation des souches productrices des biosurfactants comme agent de bioremédiation.

Références bibliographiques

A

- ❖ **Abdul-kadhim, A.R., and jarallah, E.M., 2013.** Screening of cellulase activity produced from *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Babylon University, Pure and Applied Sciences, Vol 21 (3): 849-854.
- ❖ **Abe, A.M.K., Assanvo, J.B, Sanogo, M., et Koffi, K.M., 2018.** Caractérisation phénotypique de 52 souches des *Bacillus* isolées à partir de racines fraîches de manioc cultivées en Côte d'Ivoire / Int. J. Biol. Chem. Sci. 12(5): 2284-2293.
- ❖ **Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R. and Gardan, L., 2000.** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Syst. Evolution. Microbiol. 50 : 9–18.
- ❖ **Adam, A., 2008.** Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat en Science. Université de Liège, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Belgique, 165p.
- ❖ **Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* **163**: 173-181.
- ❖ **Al-Araji, A., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M., Salleh, J., 2007.** MINIREVIEW: Microbial Surfactant. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. Mol. Microbiol. Biotechnol. 15 (3): 99–105.
- ❖ **Alexandre,H., 1977.** (Dijon,France) Le vin: un monde d'interactions multiples .Dept.of Microbiology and Immunology,Dartmouth Medical School ,208 Vail Building,Hanover,NH 03755.USA.
- ❖ **Amziane touazi M., 2014.** Screening de souches de groupe *Bacillus* à partir de microhabitats de zones arides ; Thèse de doctorat ; HOUARI BOUMEDIENE, 2014 : 100.
- ❖ **ANANDARAJ B. et THIVAKARAN P., 2010 – ISOLATION AND PRODUCTION OF BIOSURFACTANT PRODUCING ORGANISM FROM OIL SPILLED SOIL.** *jbiosci tech*, 1(3):120-126.

- ❖ **Andrews, R. E., Jr., M. M. Bibilos, et al., 1985.** "Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*." *Applied and environmental microbiology* 50(4): 737-742. *Biotechnology*, 15(3): 99-105.
DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i5.28>
- ❖ **Arif, F., Silini. A., Cherifi- Silini. H., et Ghouli. M., 2015.** Plant Growth Promoting and antagonistic traits of indigenous Fluorescent *Pseudomonas* spp. Isolated from Wheat rhizosphere and *A. Halimus* endosphere. *ESJ*. Vol 11, N: 24.
- ❖ **Aygan, A. and Arikan, B., Korkmaz,, H., Dincer, S. and Colak, O., 2008.** Highly thermostable and alkaline –amylase from a halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Braz J Microbiol.*, 39:547-553.

B

- ❖ **Balouiri M, Sadiki M and Ibsouda S, 2016.** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol: 6 (2): 71-79.
- ❖ **Barros F.F.C., Quadros C.P., Júnior M.R.M., Pastore G.M. , Química N., 2007.** 409–414.
- ❖ **Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Meyer, J-M and Spröer, C., 2007.** *Pseudomonas lurida* sp. nov., a fluorescent species associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (5): 979-985.
- ❖ **Beldman,G., Searle-Van, Leewen, M. F., Rombouts, F.M. and Voorzangen, F. G. J., 1985.** Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol.*, 61 : 135 -141.
- ❖ **Benincasa M et Accorsini F. R, 2008.** *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *BioresourceTechnology*, 99 : 3843–3849.
- ❖ **Berger, L,R., et Reynolds, D, M., 1958.** The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem Biophys Act* 29: 522-534.
- ❖ **Bergey,D.P.,2001.** *Bergey's Taxonomic Outline.Bergey's Manual of systematic bacteriology*,second edition . 81:537-547.
- ❖ **Blumer, C., and D. Haas., 2000.** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol.*, 173: 170-177.

- ❖ **Bond, R. P., C. B. Boyce, et al., 1969.** "A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner." *The Biochemical journal* 114(3): 477-488.
- ❖ **Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- ❖ **Bottone EJ, et Peluso RW., 2003.** Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary Report. *Journal of Medical Microbiology*. 52, 69–74.
- ❖ **Bozal, N., Montes, M.J. and Mercade, E., 2007.** *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2609–2612.
- ❖ **Brar, S. K., M. Verma, et al., 2007.** "*Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism." *Process Biochemistry* 42(5): 773-790.
- ❖ **Bravo, A., Likitvatanavog, S., Gill, S.S., et Soberon, M., 2011.** *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide., *Insect biochemistry and molecular biology* 41:423-431.
- ❖ **Buchanan, R.E., 1917.** Studies on the nomenclature and classification of the bacteria. 3. The families of Eubacteriales. *J Bacteriol* 2, 347-350.
- ❖ **Bultreys, A., et I. Gheysen., 2000.** Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 325-331.
- ❖ **Burns JL, 2018.** Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases *Pseudomonas* Species and Related Organisms (Fifth Edition), Elsevier.

C

- ❖ **Castric, P., 1977.** Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen cyanides biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 130: 826-831.
- ❖ **Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J., 1999.** Screening for Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670–1680.
- ❖ **Chehimi, S., F. Delalande, et al., 2007.** "Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*." *Canadian journal of microbiology* 53(2): 284-290.

- ❖ **Chen C., Belanger R.R., Benhamou N., Paullitz T.C. 2000.** De-fense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56 (1): 13–23.
- ❖ **Chen C., Baker S et Darton R., 2007.** The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. *J Microbiol Methods.* 70:503–510.
- ❖ **Chet, I., 1987.** Trichoderma - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, I. Chet (ed.), John Wiley & Sons: New York. pp. 137-160.
- ❖ **Čipinytė V., Grigiškis S., Šapokaitė D et Baškys E., 2011.** Production of biosurfactants by arthrobacter sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. *Environment. Technology. Resources.* ISBN 97 8-9984-44-070-5.
- ❖ **Cooper De et Goldenberg B., 1987.** Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 53(2):224–229.
- ❖ **Cooper D.G. et Paddock D.A., 1984.** Production of a biosurfactants from *Torulopsis bombicola*. *App. Environ. Microbiol.*, Vol.47, 173-176.
- ❖ **Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R., 2014.** "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature". DOI: <http://www.btnomenclature.infoL>
- ❖ **Curl E. A. et B. Truelove., 1986.** The rhizosphere, pp: 55-92. Springer Verlag, Berlin.

D

- ❖ **Daane, L.L., Harjono, I., Barns, S.M., Launen, L.A., Palleron, N.J. and Haggblom, M.M. 2002.** PAH Degradation by *Paenibacillus* spp. And Description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. Nov., a Naphtalene Degrading Bacterium from the Rhizosphere of Salt March Plants. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52:131-139.
- ❖ **de la Vega, L. M., J. E. Barboza-Corona, et al. 2006.** "Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai and its action against phytopathogenic fungi." *Canadian journal of microbiology* 52(7): 651-657
- ❖ **Delerras C. 2014.** *Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures.* Edition Lavoisier, France. p. 31-70-126-143-145.

- ❖ **Desai J.D et Banat I.M. 1997.** Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS. Vol. 61, No. 1, p. 47–64.
- ❖ **Doona J., Blazevic., Marilyn H., Kepcke., John, Matsen. 1972.** Incidence and identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the clinical laboratory. Printes in USA. Vol. 25, N°1: 107-110.
- ❖ **Dowling, D.N. and O’Gara, F., 1994.** Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol. 12: 133-140.

E

- ❖ **Emanuel G., Lorrence H. G., 2009.** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA. 13: 8493-9365.

F

- ❖ **Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K and Stackebrandt E, 2006.** The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass (3rd edition), Springer.
- ❖ **Favret, M. E. and ousten, A. Y., 1989.** "Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*." Journal of Invertebrate Pathology 53(2): 206-216.
- ❖ **Fenice, M., L. Selbman, F. Federici, et N. Vassilev., 2000.** Application Encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Bioresource Technol.* 73: 157-162.
- ❖ **FRANCY D.S., THOMAS J.M., RAYMOND R.L et WARD C.H., 1991.** Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:237-246.

G

- ❖ **GABET S., 2004.** Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. 1-186. Thèse de Doctorat, Université de Limoges.

- ❖ **GAKPE, E., PATTANATHU, K. S. M. R. et HATHA, M.A.A., 2007.** Microbial Biosurfactants –Review. *J.Mar. Atmos. Res*, 3(2): 1-17.
- ❖ **Ghanem, A., 2007.** Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/ enriched compounds. *Tetrahedron*. 8: 1721-1754.
- ❖ **Gardan, L., Bella, P., Meyer, J.M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W. and Samson, R., 2002.** *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2065–2074.
- ❖ **Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Ebrahiminezhad, A., Zarrini, G., Kazemi, A., Mousavi-Khorshidi, S., Ghoshoon, M.B., and Rae, M.J., 2010.** Halotolerant Amulase Production by a Novel Bacterial Strain, *Rheinheimera aquimaris*. *Res J Microbiol.*, 2: 144-149
- ❖ **Giro M.E.A., Martins J.J.L., Rocha M.V.P., Melo V.M.M., Gonçalves L.R.B., 2009.** *Biotechnol. J.* 4 : 738–747.
- ❖ **Gomez Ramirez, M., L. I. Rojas Avelizapa, N. G. Rojas Avelizapa, et R. Cruz Camarillo., 2004.** Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*.56: 213-219.
- ❖ **Gonzales, C.F, Layher, S.K, Vidaver, A.K, Olsen, R.H., 1984.** Transfer, mapping and cloning of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* plasmid pCG131 and assessment of its role in virulence. *Phytopathology* 74, 1245-1250.
- ❖ **Guiraud G.P., 1997.** *Microbiologie alimentaire*, Ed. Duno, Paris 652 p.
- ❖ **Gupta, B., Puri, S., Thakur, I.S., Kaur, J., 2020a.** Comparative evaluation of growth kinetics for pyrene degradation by *Acinetobacter pittii* NFL and *Enterobacter cloacae* BT in the presence of Biosurfactant. *Biores. Technol. Rep.* 9, 100369.
- ❖ **Gupta, B., Puri, S., Thakur, I.S., Kaur, J., 2020b.** Enhanced pyrene degradation by a biosurfactant producing *Acinetobacter baumannii* BJ5: growth kinetics, toxicity and substrate inhibition studies. *Environ. Technol. Innov.* 19, 100804.

H

- ❖ **Haas, D. et Défago, G., 2005.** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.

- ❖ **HARLEY J.P., PRESCOTT L.M., 2002.** Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Ed., 449P.
- ❖ **Hilddbrand D.C., Schorth M.N et Sand D.C., 1988.** *Pseudomonas* spp 60-77. In Shaaad, N.W.E.D Laboratory guide for identification of plant pathogen bacteria 2nd .ST. Pael .Minnostosa.
- ❖ **Holloway, B. W., 1992.** Pseudomonas in the late twentieth century. In: Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology (E Galli, S Silver, B Witholt,eds), Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1-8.
- ❖ **Howie, W.J., et Suslow, T.V., 1991.** Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *pseudomonas fluorescens*.Mol.Plant.Microb.Inter.4:393-399.
- ❖ **Hsieh, F.C, Lin, T.C, Kao, M.M.S., 2008.** Comparing Methods for Identifying Bacillus Strains Capable of Producing the Antifungal Lipopeptide Iturin A. Current Microbiology. 56, 1–5.
- ❖ <https://microbiologie-clinique.com/Familles-Abreviations-Antibiotiques.html>
- ❖ **Huber, M., E. Cabib, et al., 1991.** "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(7): 2807-2810.

I

- ❖ **Ibrahim, M. A., N. Griko, et al., 2010.** *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." Bioengineered bugs 1(1): 31-50.
- ❖ **Inbar, J. and Chet, I., 1991.** Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in the biological control of soil borne plant pathogens by this bacterium. Soil Biol. Biochem. 23: 973-978.

J

- ❖ **Jamali F, Sharifi-Tehrani A, Lutz MP et Maurhofer M., 2009.** Influence of Host Plant Génotype, Presence of a pathogen, and Coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* Strains on the rhizosphere expression of hydrogen Cyanide- and 2, 4-

Diacetylphloroglucinol biosynthesis Genes in *P. fluorescens* biocontrol Strain CHAO. *Microbial Ecology*. 57, 267-275.

- ❖ **James, D. W. and Gutterson, N. I., 1986.** Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl Environ. Microbiol.* 52: 1183-1198.
- ❖ **JAYSREE R.C., RAJAM C. et RAJENDRAN N., 2013** .BIOSURFACTANT PRODUCTION BY HALOPHILIC BACTERIA. *Environmental Biotechnology*, 4(4): (B) 904 – 912.
- ❖ **Joffin, J.N., Leyral, G., 2014.** Microbiologie technique TI-Dictionnaire des techniques. 4eme Edition. Bordeaux: CRDP d'aquitaine.
- ❖ **Jung, W.J., Mabood, F., Souleimanov, A., Zhou, X., Jaoua, S., Kamoun, F. and Smith, D. L., 2008.** Stability and antibacterial activity of bacteriocins produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*. *J microbial Biotechnol.*, 18: 1836-1840.

K

- ❖ **Kaioua, A. & Grairi, I. ; 2015.** Solubilisation du phosphate, production de sidérophores et activité antifongique de souches d'actinomycètes et du genre *Pseudomonas* isolées des sols rhizosphériques. Identification de souches représentatives. *Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*, UFM Constantine I. 52p.
- ❖ **Katz, E. and Demain, A. L., 1977.** The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 40: 449–474.
- ❖ **Keel, C.U., Schinder, M., Maurhofer, C., Voissard, J., Laville, P., Burger, P., Wirthner, Haas, D., et Défago, G., 1992.** Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 5:4-13.
- ❖ **KHEIRALLA Z.H., ASHOUR S.M., RUSHDY A.A et AHMED H.A., 2013.** Characterization of Biosurfactants Produced by *Halobacillus Dabanensis* and *Pontibacillus Chungwhensi* Isolated from Oil Contaminated Mangrove Ecosystem in Egypt. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(3): 263–269.

- ❖ **Khopade A., Ren B., Liu X.Y., Mahadik K., Zhang L., C. Kokare C., 2012.** Colloid Interface Sci. 367: 311–318.
- ❖ **Kiely PD, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP et O’Gara F., 2006.** Exploiting New Systems-Based Strategies to Elucidate Plant-Bacterial Interactions in the Rhizosphere. 51, 257–266.
- ❖ **King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney., 1954.** Two simple methods for the determination of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.
- ❖ **Kleinkauf, H. and von DGHren, H., 1996.** A non ribosomal system of peptide biosynthesis. Eur. J. Biochem. 236:335-351.
- ❖ **Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. et Schroth., M.N., 1980.** Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr. Microbiol.* 4: 317–320.
- ❖ **Kloepper J.W., Lifchitz R. et Zablutowiess R.M., 1989.** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39-44.
- ❖ **Kluyver, A.J, Van Niel, C.B., 1936.** Proposals for a natural System of Classification of Bacteria. Zentrabl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 2, 19-23, 369-403.
- ❖ **Kovacs, N., 1956.** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178-703.
- ❖ **Kumar, A., A. Kumar, S. Devi, S. Patil, C. Payal et S. Negi., 2012.** Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. *Recent Res. Sci. Technol.*, 4: 01-05.

L

- ❖ **Lavigne J-P, 2007.** Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- ❖ **Laville, J., C. Blumer, C. Von Schroetter, V. Gaia, G. Delfago, C. Keel et D. Haas., 1998.** Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J. Bacteriol.*, 180: 3187- 3196.
- ❖ **Leisinger,T., Margraff, R. 1979.** Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol .Rev.*, 43,pp 422-442.
- ❖ **Lemanceau, P., 1992.** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp* fluorescents. *Agronomie, EDP Sciences* 12(6): 413-437.

- ❖ **Levinson, B. L., K. J. Kasyan, et al., 1990.** "Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography." *Journal of Bacteriology* 172(6):3172-3179.
- ❖ **Levy. E., Eyal. Z., Chet. I. and Hochman, A., 1992.** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:163-71.
- ❖ **Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D. et Kempf, H.J., 2000.** Natural Products with antifungal activity from *Pseudomonas*. *Biocontrol bacteria. pest Manag. Sci.* 56.688-69.
- ❖ **Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, C.X., Zhang, K.Y. and Lai, R., 2008.** *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1404–1408.
- ❖ **Li Y., Xiang H., Liu J., Zhou M. and Tan H. 2003.** Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092. *Extremophiles* 7: 401 – 407.
- ❖ **Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. and Kubicek, C.P., 1996.** Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.* 178: 6382–6385.
- ❖ **Lovaglio R. B., dos-santos F. J., Junior M. J., Contiero J., 2011.** Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85 : 301–305.
- ❖ **Lynd, L. R., Weimer, P.J., Van Zyl, H. and Protorius, I. S., 2002.** Microbial Cellulose Utilization; Fundamentals and Biotechnology. *Microbial and Molecul Biol.*, 3; 506-577.

M

- ❖ **Maheshwari, D.K., 2010.** Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Edition: springer, Heidelberg Dordrecht London New York.445p.
- ❖ **Manaia, C.M. and Moore, E.R., 2002.** *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermo-tolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2203–2209.
- ❖ **Manceau, C., 1984.** Utilisation des antibiotiques en agriculture : étude des risques potentiels de sélection et de dissémination des gènes d'antibiorésistance et

caractérisation du support génétique de ces caractères. Thèse 3e cycle. Univ Clermont Ferrand.

- ❖ **Marchal, N., Bourdon, J. L., & Richard, C. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, 49-65.
- ❖ **Marschner, P., et Timonen, S., 2006.** Bacterial community composition and activity in rhizosphere of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. In Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J. (Eds.), *Microbial activity in the rhizosphere*, Soil Biology. 7, 139-154.
- ❖ **Martin, F. N. and Loper, J. E., 1999.** Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: Ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:111-181.
- ❖ **Martins, M.L, Pinto, UM., Riedel, K., and Vanetti, M.C., 2015.** Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Braz J Microbiol*, Vol: 46(1):207-17.
- ❖ **Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mettraux, J.P. and Défago, G., 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.* 84: 139-146.
- ❖ **Meena, B., 2001.** Radhajealakshmi, R., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., Sabitha Doraiswamy and Velazhahan,. Induction of pathogenesis related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*.
- ❖ **Mehta, S. and Nautiyal, C. S., 2001.** An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-56.
- ❖ **Migula, W., 1984.** Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* 1, 235-238 (A1).
- ❖ **MNIF S., CHAMKHA M., LABAT M et SAYADI S., 2011** – Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 525–536.
- ❖ **MORIKAWA M., DAIDO H., TAKAO T., MURATA S., SHIMONISHI Y et IMANAKA T., 1993.** A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 175 (20): 6459-6466.
- ❖ **Morikawa M., Hirata Y et Imanaka T.A., 2000.** study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta.* 1488(3):211–218.

- ❖ **Mousa, W.K., and Raizada, M.N., 2015.** Biodiversity of genes encoding antimicrobial traits within plant associated microbes. *Frontiers in plant science*, Vol: 6 (231).
- ❖ **Munsch, P., Alatossava, T., Marttinen, N., Meyer, J.M., Christen, R. and Gardan, L., 2002.** *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1973–1983.
- ❖ **Mutzel, A., Reinscheid, U.M., Antranikian, G. and Mueller, R. (1996).** Isolation and Characterization of Therophilic Bacillus Strain That Degrades Phenol and Cresols As sole Carbon Source at 70°C. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 46: 593-596.

N

- ❖ **Narayanasamy P, (2013).** Biological management of diseases of crops: volume 1: characteristics of biological control agents. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. India.
- ❖ **Nielsen, M.N., Sørensen, J., Fels, J. and Pedersen, H.C., 1998.** Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.
- ❖ **Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K. and Wakabayashi, H., 2000.** *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 83–89.
- ❖ **Noha H.Y., Kathleen E. D., David P. N., Kristen N. S., Roy M. K et Michael J. M. 2004.** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56, 339– 347.

O

- ❖ **Olmar B., Weber I., Leonardo M., Cruz J.L., Baladani J., et Dobereiner., 2001.** Herbaspirillum-like bacteria in banana plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 201.
- ❖ **Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, L., 1988.** The Role of Chitinase of *Serratia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* 78: 84- 88.

- ❖ **Ouserir, S., Chennaoui, N., and Benchabane, M., 2018.** Effets de la bactérisation par *Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium fabae* sur la stimulation de la nodulation et de la croissance de la fève (*Vicia faba* L. var. *hista*). Vol : 8(1): 775-785.

P

- ❖ **Patel R. M. et Desai A. J., 1997.** Surface active properties of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* G3S. *J. Basic Microbiol.*, 37 :281-286.
- ❖ **Palleroni N.J., 1984.** *Pseudomonas* (Migula). In *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. (1): 141-199.
- ❖ **Palleroni, N.J., 1984.** Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp. 141–171.
- ❖ **Palleroni, N.J., 2008.** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- ❖ **Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B., 2004.** Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In "*Pseudomonas*", vol. 1. Ramos, J. L. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Etats-Unis, pp. 3-44.
- ❖ **Pandiani F., 2012.** Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus* : rôle des hélicases à ARN. Thèse pour obtenir le titre de Docteur de l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse Discipline : Biotechnologie, Microbiologie. Pp 6-9.
- ❖ **Peix, A., Berge, O., Rivas, R., Abril, A. and Velazquez, E., 2005.** *Pseudomonas argentinensis* sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1107–1112.
- ❖ **Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C. and Velazquez, E., 2003.** *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 2067–2072.
- ❖ **Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Rodriguez-Barrueco, C. and Velazquez, E., 2004.** *Pseudomonas lutea* sp. nov., a

novel phosphate solubilizing bacterium isolated from rhizosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 847–850.

- ❖ **Pereira J.F.B., Gudiña E. J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J. A. , Coutinho J.A.P et Rodrigues L.R., 2013.** Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel* 111 (2013) 259–268.
- ❖ **Perronne C, 1999.** Maladies infectieuses, volume 1. pp65.
- ❖ **Perry, J.J., Staley, J.T., et Lory, S., 2004.** Cours et questions de révisions. PCEM.PCEP. 1^{er} cycle/licence 2eme cycle/master. Dunod. Ed. Paris. pp: 480-481.
- ❖ **Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A., 2000.** Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948–955.
- ❖ **Prevot, A.P., 1977.** Bactériologies, notions élémentaire. Ed. Presses universitaires de France. P 218 *Pseudomonas aureofaciens* strain Applied and Environmental Microbiology 57:2928-2934.
- ❖ **Prévot, A.R., 1961.** Traité de systématique bactérienne 2 (Dunod, Paris, éd) 42-83.
- ❖ **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle, Roura S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss L Wu. Technol. Vol. 36: 679-684.

Q

- ❖ **Quan, C.S., Wang, X., et Fan, S.D., 2010.** Antifungal Compounds of Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Its Action Mode, in *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Maheshwari DK, (Ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 117-156.

R

- ❖ **Raaijmakers, J., Vlami, M. et de Souza, J., 2002.** Antibiotic production by bacterial.
- ❖ **Ramette A., M. Frapolli G. Défago and Y. Moënne- Loccoz., 2003.** Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol Plant Microbe Interact* 16:525-535.
- ❖ **Ramos J.L., and Levesque R.C., 2004.** *Pseudomonas* molecular biology of emerging issues. ISBN-0306-48375. (1).

- ❖ **Reetha S, G. Selvakumar, G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan, et T. Ravimycin ., 2014.** Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas* fluorescence and *Bacillus subtilis*. *International Letters of Natural Sciences* P: 75-80
- ❖ **Reyes, I., R. Baziramakenga, L. Bernier et H. Antoun., 2001.** Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium rugulosum*. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 1741-1747.
- ❖ **Reynolds MT, Falkiner FR, Hardy R and Keane CT, (1979).** Differentiation of fluorescent pseudomonads by their effect on milk agar. *J. YED*, Vol: 12: 379-382.
- ❖ **Roberts, W,K., et Selitrennikoff, C,P., 1988.** Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J Gen Microbiol.*134: 169–176.
- ❖ **Rocha, M.V.P., Mendes, J. Giro, M.E., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B., 2014.** *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 20: 49–58.
- ❖ **Rohban, R., Amoozegar, M .A. and Ventosa, A., 2009.** Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Lake, Iran. *Ind Microbil Biotechnol.*, 36: 333-340.
- ❖ **Romanenko, L.A., Uchino, M., Tebo, B.M., Tanaka, N., Frolova, G.M. and Mikhailov, V.V., 2008.** *Pseudomonas maricola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 706–710.

S

- ❖ **Sampson, M. N. and G. W. Gooday., 1998.** "Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects." *Microbiology* 144 (pt 8): 2189-2194.
- ❖ **Saravanan S., Muthumanickam P., Saravanan T.S., Santhaguru K 2013.** Antagonistic potential of fluorescent *Pseudomonas* and its impact on growth of tomato challenged with Phytopathogens. *African. Science. Corp . Science. Journal*, Vol. 21, No. 1, 29-36.
- ❖ **Schroth, M.N. and Hancock, J.G., 1981.** Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- ❖ **Setati, M.E., 2010.** Diversity and industrial of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African J Biotech.*, 11: 1555-1560.

- ❖ **Silo-Suh, L. A, E. V. Stabb, et al., 1998.** "Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*." *Current microbiology* 37(1): 6-11.
- ❖ **Singleton,P., 2005.** *Bactériologie pour la médecine. La biologie et la Biotechnologie.* Ed. Dunod. Paris. 541 p.
- ❖ **Sivapathasekaran C., Das P., Mukherjee S., Saravanakumar J., Mandal M., 2010.** *Int. J. Pept. Res. Ther:* 215–222.
- ❖ **Soberon, M., 1. A. Lopez-Diaz, et al., 2013.** "Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides* 41: 87- 93. Suppressives to take-all. *Phytopathology* 73:1548-1553.
- ❖ **Soufiane B., 2013.** *Propriétés physiologiques et génétiques-communes entre Bacillus weihenstephanensis et des souches de Bacillus thuringiensis, Bacillus cereus et Bacillus mycoides.* Thèse. Université du Québec. 222p.
- ❖ **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M., 1966.** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J Gen Microbiol* 43, 159-271.
- ❖ **Suganthi, M., Senthilkumar, P., Arvinth, S., Chandrashekara, Kn., 2017.** Chitinase from *Pseudomonas fluorescens* and its insecticidal activity against *Helopeltis theivora*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol: 63.
- ❖ **Sundin GW, Jones A.L., Fulbright, D.W., 1989.** Copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv *syringae* from cherry orchards and its associated transfer in vitro and in planta with plasmid. *Phytopathology* 79, 861-865.
- ❖ **Swati A., Moni Kumari B., Pooja Ghosh C., Indu Shekhar Thakur A., 2020.** Evaluation of a biosurfactant producing bacterial strain *Pseudomonas* sp. ISTPY2 for efficient pyrene degradation and landfill soil bioremediation through soil microcosm and proteomic studies, *Bioresource Technology Reports*. 12 (2020) 100607.
- ❖ **Sweta Kachhap., Anita Chaudhary., et Singh, S, D., 2015.** Response of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in relation to elevated temperature conditions in Groundnut (*Arachis Hypogaea* L.). *The Ecoscan* 9 (3-4):771-778.

T

- ❖ **THAVASI R., JAYALAKSHMIS et BANAT I.M., 2011.** Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*,

Corynebacterium kutscheri and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 102: 772–778.

- ❖ **Tourkya, B., Boubellouta, T., Dufour, E. & Leriche, F., 2009.** Fluorescence Spectroscopy as a promising tool for a polyphasic approach to *Pseudomonad* Taxonomy. *Curr.Microbiol.* 58(8): 39-46.
- ❖ **Trivedi, P., Pandey, A. and Palni L.M.S., 2008.** In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugate*. *Microbiol. Res.* **163** : 329-336.

U

- ❖ **Uğur A, Ceylan Ö and Aslım B, 2012.** Characterization of *Pseudomonas* spp. from seawater of the southwest coast of Turkey. *J. BIOL. ENVIRON. SCI.*, Vol: 6 (16):15-23.

V

- ❖ **Vanittanakoma, N., et Loeffler, W., 1986.** Fengycin – a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics.* 39, 888–901.
- ❖ **Varjani, V.N., 2017.** Upasani, *Bioresour. Technol.* 232 : 389–397.
- ❖ **Vaz D.A., Gudiña E.J., Alameda E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R., 2012.** Colloids Surf. B Biointerfaces. 89: 167–174.
- ❖ **Vela, A.I., Gutierrez, M.C., Falsen, E., Rollan, E., Simarro, I., Garcia, P., Dominguez, L., Ventosa, A. and Fernandez-Garayzabal, J.F., 2006.** *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2671–2676.
- ❖ **Verma, M., Satinder, K. Brar, R.D., Tyagi, R.Y., Surampalli, J. and Valero R., 2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **37**: 1–20.
- ❖ **Visca, P., Imperi, F. and Lamont, I.L., 2007.** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.* 15: 22–30.
- ❖ **Vivekananthan, R., Ravi, M., Ramanathan, A. and Samiyappan, R., 2004.** Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate

defence against the anthracnose pathogen in mango. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol: 20 (3): 235-244.

W

- ❖ **Wei Y.H., Chou C.L. et Chang, J.S. 2005.** Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, 27 : 146–154.
- ❖ **Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Rogers, J.A., Smith, G.H., 1917.** The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *J Bacteriol* 2, 506-566.
- ❖ **Wisplinghoff H, 2017.** *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and *Miscellaneous Gram-Negative Bacilli*. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Elsevier, Vol : 2: 1579-1599.
- ❖ **World Health Organization, 1999.** "Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*" Geneva, Environment health criteria 217, pp. 6-69.

Y

- ❖ **Youssef N., Duncan K., Nagle D. et al. 2004.** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods*. 56(3):339-347.
- ❖ **Yumoto, I., Yamaga, S. and Sogabe, Y. 2003.** *Bacillus Krulwichiae* sp. Nov., a Halotolerant Obligate Alkaliphile That Utilizes Benzoate and Hydroxybenzoate. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 53:1531-1536.

Z

- ❖ **Zeller SL, Brandl H, Schmid B., 2007.** Host-Plant Selectivity of Rhizobacteria in a Crop/Weed Model System .*Plant-Selective Rhizobacteria*. **9**, 1-9. 30.

- ❖ **Zerouki A., et Kaci-Moussa F., 2014.** Identification préliminaire de quelques souches de *Pseudomonas* spp. Fluorescents isolées à partir de la rhizosphère de deux essences forestières de Cédre.43-44.

Annexe 1 :

Matériels, verreries et appareillages utilisés au cours de l'expérimentation:

Appareillages	Verreries et matériels
<ul style="list-style-type: none">- Agitateur magnétique.- Agitateur-plaque chauffante.<ul style="list-style-type: none">- Autoclave.-Bain-Marie.-Balance de précision.- Bec Bunsen.- Centrifugeuse.<ul style="list-style-type: none">- Etuve.-Incubateur-agitateur.- Microscope photonique.<ul style="list-style-type: none">- pH-mètre.-Plaque chauffante.- Réfrigérateur.- Rotavapeur.- Spectrophotomètre.<ul style="list-style-type: none">- Supports.-Vortex.	<ul style="list-style-type: none">-Ampoules à décantées.- Anse de platine.- Barreau-magnétique- Bécher de 100ml, 1000ml.- Boîtes de pétri en plastique.<ul style="list-style-type: none">- Cotons.- Entonnoir.- Epreuve graduée de 10ml, 20 ml, 500ml.- Erlenmeyer de 100ml, 1000ml.- Flacons de 160 - 200 ml.- Lames et lamelles.- Micropipette de 100μl- 1000μl.<ul style="list-style-type: none">- Papier filtre.- Pince en bois, en métal.- Pipettes pasteur.- Portoir.- Râteaux.- Ruban adhésif.- Seringue.- Spatule.- Tubes à essai.-Tubes à centrifuger.

Annexe 2 :

I. Les milieux de cultures :

▪ Milieu gélose Tryptone Glucose Extrait d'Agar (TGEA) :

Tryptone	5g.
Glucose	1g.
Extrait de levure	25g.
Gélose	15g.
Eau distillée	1000ml.
pH	7.

Autoclave à 120 C° pendant 30 min.

▪ Milieu viande foie (VF):

Peptone viande-foie	30g.
Amidon soluble	2g.
Glucose	2g.
Sulfite de sodium	2.5g.
Citrate ferrique ammoniacal	0.5g.
Agar	14g.
Eau distillée	1000ml.

Autoclave à 120 C° pendant 30 min.

▪ Milieu Mannitol Mobilité :

Hydrolysats trypsique de caséine	10g.
Mannitol	7,5g.
Rouge De Phénol	0,04ml.
Nitrate de potassium	1g.
Agar	3,5g.

Eau distillée 1000ml.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Milieu King B liquide :**

Peptone de caséine 20 g.

Sulfate de magnésium MgSO₄ 1,5 g.

Phosphate bi-potassique K₂HPO₄ 1,5 g.

Glycérol 10 ml.

Eau distillée 1000 ml.

pH : 7,2.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Gélose Mueller-Hinton :**

Infusion de viande de bœuf 300ml.

Peptone de caséine 17,5g.

Amidon de maïs 1,5g.

Agar 17g.

PH: 7,4.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Gélose M9**

Na₂HPO₄ (anhydrous) 6g.

KH₂PO₄ 3g.

Cellulose 10g.

Extrait de levure 1.2g.

NaCl	0.5g.
NH ₄ Cl	1g.
Eau distillée	1000ml.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Milieu Pikovskaya (PVK) :**

Glucose	10g.
Ca ₃ (PO ₄)	25g.
KCl	0,2g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g.
Nacl	0,2g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5g.
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02g.
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,002g.
Agar	20g.
Eau distillée	1000ml.

pH: 7.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Gélose nutritive au lait écrémé :**

Glucose	28g.
Agar	14g.
Lait écrémé	1000ml.

Autoclave à 120 C° pendent 30 min.

▪ **Milieu à la chitine :**

Glucose	28g.
Chitine colloïdale	10g.
Agar	14g.

Eau distillé 1000ml.

Autoclave à 120 C° pendant 30 min.

▪ **Milieu TSA (Tryptone Soya Agar) :**

Tryptone Soya Agar 40g.

Glysine 4.4g.

Eau distillé 1000ml.

Autoclave à 120 C° pendant 30 min.

▪ **Milieu d'isolement et de purification M₁ :**

K₂HPO₄ 5g.

KH₂PO₄ 5g.

MgSO₄ 2g.

NaNO₃ 5g.

Extrait de levure 3g.

Glucose 15g.

Eau distillée 1000ml.

pH : 6, 5.

Le milieu ainsi obtenu doit être chauffé à 60°C sous agitation pendant 1 heure pour un bon mélange de ces constituants, après ajustement du pH le milieu est passé à la stérilisation dans l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. L'ajout de l'hydrocarbure (Gasoil) avec une concentration de 2 %, doit se faire après la stérilisation pour éviter sa volatilisation.

Eau Physiologique :

Sodium chloride 9g.

Eau distillée 1000ml.

Autoclave à 120 C° pendant 30 min.

II. Réactifs utilisés en expérimentation

▪ Solution de Picrate Alcaline :

Acide picrique	2.5g.
Na ₂ CO ₃	12.5g.
Eau distillée	1000 ml.

▪ Verte de malachite :

Vert malachite en poudre	50g.
Eau distillée	1000 ml.

Le réactif ainsi obtenue doit être agité pendant 1 heure pour une bonne solubilisation.

Annexe 3 :

Tableau de lecture de la galerie API 20E :

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E					
Microtube	Substrat	Caractère recherche	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β-galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétone	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Résumé

La demande en enzymes et surfactants pour des applications biotechnologiques est de forte croissance. Les enzymes et les biosurfactants principalement produits par les microorganismes sont les plus recherchées dans divers secteurs industriels.

Un total de quatre souches bactériennes ; deux *Pseudomonas* fluorescents et deux *Bacillus* isolées à partir de la rhizosphère de l'olivier ont été étudiées. Des tests préliminaires macroscopiques et microscopiques, ont permis la caractérisation des souches pour chaque genre. Ces souches ont subi différentes techniques d'identification physiologique et biochimique tel que la coloration de Gram, la coloration de la spore, la recherche de l'oxydase et de la catalase en plus de l'utilisation de la galerie biochimiques Api 20E et d'autres tests complémentaires tels que le TSI, viande foie et le mannitol mobilité. Interprétations probabilistique des profils biochimiques est confirmé encore une fois l'identité des ces dernières. Ces bactéries ont montré leur aptitude à produire des métabolites secondaires tels que les enzymes (cellulases, phosphatase, caséinase, HCN). Les souches testées possèdent un large spectre d'activité enzymatique pour les enzymes recherchées, cependant une prédominance de l'activité cellulasique a été notée. Le spectre de réponse de ces souches vis-à-vis des différents antibiotiques testés été très diversifié allant de la sensibilité vers une résistance totale à l'amicilline et l'amoxicilline observé chez les souches de *Bacillus*. Ensuite, nous avons recherché la production des biosurfactant chez ces espèces par la méthode d'épandage de l'huile et le test d'émulsification. Les résultats obtenue été très satisfaisant avec un E24 de l'ordre de 50% observé chez la souche Bc2.

Mots clés : *Pseudomonas* spp.fluorescents, *Bacillus* sp, métabolites secondaires, enzyme, criblage, biosurfactants.

Abstract

The demand for enzymes and surfactants for biotechnology applications is growing rapidly. Enzymes and biosurfactants mainly produced by yeasts, fungi, bacteria are the most sought after in various industrial sectors.

A total of four bacterial strains; two fluorescent *Pseudomonas* and two *Bacillus* isolated from the rhizosphere of the olive tree were studied. Preliminary macroscopic and microscopic tests have enabled the characterization of the strains for each genus. These strains have undergone different physiological and biochemical identification techniques such as Gram staining, spore staining, oxidase and catalase research in addition to the use of the Api 20E biochemical gallery and of other additional tests such as TSI, meat liver and mannitol mobility. Probabilistic interpretations of the biochemical profiles is confirmed once again the identity of the latter. These bacteria have shown their ability to produce secondary metabolites such as enzymes (cellulases, phosphatase, caseinase, HCN). The strains tested have a broad spectrum of enzymatic activity for the enzymes sought, however a predominance of cellulase activity was noted. The response spectrum of these strains to the different antibiotics tested was very diverse, ranging from sensitivity to total resistance to ampicillin and amoxicillin observed in *Bacillus* strains. Next, we investigated the production of biosurfactants in these species by the oil

spreading method and the emulsification test. The results obtained were very satisfactory with an E24 of around 50% observed in the strain.

الملخص

ينزايد الطلب على الإنزيمات والمواد الخافضة للتوتر السطحي لتطبيقات التكنولوجيا الحيوية بقوة. الإنزيمات والمواد الحيوية التي تنتجها الخمائر والفطريات والبكتيريا هي الأكثر طلباً في مختلف القطاعات الصناعية.

ما مجموعه أربع سلالات بكتيرية ؛ تمت دراسة اثنين من بسودوموناس الفلورية واثنين من الباسيليس المعزولة من جذور شجرة الزيتون. مكنت الاختبارات الأولية المجهرية والميكروسكوبية من توصيف السلالات لكل جنس. خضعت هذه السلالات لتقنيات مختلفة فيزيولوجية وكيميائية حيوية مثل تلوخي الجرام وتلوخي البوغ وأكسيداز وأبحاث الكاتلاز بالإضافة إلى استخدام معرض الكيمياء الحيوية Api 20E واختبارات إضافية أخرى مثل TSI وكبد اللحم وتنقل المانيتول. تم تأكيد التفسيرات الاحتمالية للملفات الكيميائية الحيوية مرة أخرى على هوية الأخير. أظهرت هذه البكتيريا قدرتها على إنتاج مستقلبات ثانوية مثل الإنزيمات (السليلاز ، الفوسفاتاز ، الكازيناز ، HCN). تمتلك السلالات المختبرة نطاقاً واسعاً من النشاط الأنزيمي للإنزيمات المطلوبة ، ولكن لوحظ غلبة نشاط السليلولاز. كان طيف استجابة هذه السلالات للمضادات الحيوية المختلفة التي تم اختبارها متنوعاً للغاية ، حيث تراوح من الحساسية إلى المقاومة الكاملة للأميسيلين والأموكسيسيلين الملحوظ في سلالات العصيات. بعد ذلك ، قمنا بدراسة إنتاج المواد الحيوية في هذه الأنواع بطريقة نشر الزيت واختبار الاستحلاب. كانت النتائج التي تم الحصول عليها مرضية للغاية حيث لوحظ وجود E24 بحوالي 50% في السلالة.