

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Aïn-Témouchent



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

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques
Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Melle. Bouchra TAOURIRT

Melle. Imane KEMMAD

La Recherche des Microorganismes dans la Côte de Béni-Saf

Encadrant :

Mr. Nadjib CHERIF

Soutenu en 2019

Devant le jury composé de :

Président: Mr. ZIANE (MCA)

C.U.B.B.A.T.

Examineurs: Mr. MOUEDDEN (MAA)

C.U.B.B.A.T.

Encadrant: Mr. CHERIF (MCB)

C.U.B.B.A.T.

Table des matières

Remerciement
Dédicace
Liste des abréviations
Unités et dimension
Liste des tableaux
Liste des figures

Liste d'abréviations

GC(%): coefficient de Chargaff
ATB : antibiotique
EMB : Milieu Eosine de Bleu de Méthylène.
MH : Muller Hinton
GN : gélose nutritive
BN : Bouillon nutritif

Unités et dimension

°C: degré Celsius
Min: minute
Sec: second
H: heur
g: gramme
mg: milligrammes
L: litre
m: mètre
M: mole.L-1
rpm: rotation par minute
x g : force centrifuge relative (équivalent à rcf)
µm : micromètre

Liste de tableaux

Tableau 01: Répartition des actinomycètes dans la nature.....	06
Tableau 02: Les applications majeures des organismes marines.....	10
Tableau 03: Résultats de l'observation macroscopique.....	25
Tableau 04 : Résultats de la coloration de Gram.....	27
Tableau 05 : Activité antimicrobienne de quelques souches isolée.....	28

Liste de figures

Figure 01: Les cinq couleurs des biotechnologies.....	03
Figure 02 : la localisation de région de Béni Saf.....	12
Figure 03 : site de prélèvements des mollusques.....	13
Figure 04 : site de prélèvements des algues.....	13
Figure 05 : site de prélèvement de l'eau de mer.....	14
Figure 06 : préparation des dilutions	14
Figure 07 : l'ensemencement en surface.....	15
Figure 08 : Fermentation des souches marines isolées.....	17
Figure 09 : Etude de l'effet antibiotique par la méthode des puits.....	18
Figure 10: la galerie API 20 E.....	20
Figure 11: Nombre des souches isolées à partir des échantillons prélevés.....	21
Figure 12 : L'observation macroscopique de la souche EM4.....	22
Figure 13 : L'observation macroscopique de la souche AV6.....	22
Figure 14: L'observation macroscopique de la souche AV1.....	23
Figure 15: L'observation macroscopique de la souche ES3.....	23
Figure 16: L'observation macroscopique de la souche AV3.....	23
Figure 17: L'observation macroscopique de la souche AV2.....	24
Figure 18: L'observation microscopique de quelques souches Gross 100x10.....	26
Figure 19: Activité antimicrobienne de quelques souches isolée.....	28
Figure 20: L'effet antimicrobien des souches par la méthode des puits.....	29
Figure 21: Résultats de test de catalase.....	29
Figure 22: Résultats de test d'amylase.....	30
Figure 23: Résultats de test de cellulase.....	31
Figure 24: Résultats de test de lipase après 2 jours.....	32
Figure 25: Résultats de test de lipase après 4 jours.....	32

Figure 26: Résultats de test de protéase.....	33
Figure 27: Résultats générale de l'activité enzymatiques des souches isolées.....	33

Sommaires

Sommaires

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. La Méditerranée.....	2
I.1. L'Eau de mer.....	2
I.2. La côte de BENI-SAF.....	3
II. La biotechnologie bleue.....	3
III. Les bactéries marines.....	4
III.1. Les bactéries des Microcouche.....	4
III.2. Les bactéries des abysses.....	5
III.3. Roseobacter.....	5
III.4. Pseudoalteromonas	5
III.5. Sphingopyxis alaskensis RB2256.....	6
III. 6. Les actinomycètes.....	6
III.7. Les microalgues	7
III.8. Les cyanobactéries	7
III.9. Picocyanobactéries.....	8
III.10. <i>Le thermocoque</i>	8
III.11. <i>Aliivibrio fischeri</i>	9
III.12. <i>Shewanella</i>	9
III.13. Bactéries magnéto-tactiques.....	10
III.14. Les microorganismes de contamination fécale.....	10
IV. Les applications.....	10

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I. Zones de prélèvement	12
II. Isolement et purification	14
II.1. Préparation des dilutions.....	14
II.2. L'ensemencement et incubation.....	15
II.3. purification	15

III. Identification des souches obtenues	16
III.1. Aspect macroscopique des colonies	16
III.2. Aspect microscopique des colonies.....	16
IV. L'effet antibiotique des souches isolées.....	16
IV.1. la recherche de l'activité antibactérienne par la méthode de spot.....	17
IV.2. la recherche de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.....	17
V. Etude de l'activité enzymatique des souches marines isolées	18
V.1. la recherche de la catalase	18
V.2. la recherche de l'activité amylolytique	19
V.3. la recherche de l'activité cellulolytique	19
V.4. la recherche de l'activité lipolytique.....	19
V.5. la recherche de l'activité protéolytique	20
VI. La galerie API® 20 E.....	20
Schéma générale	21

Chapitre III : résultats et discussions

Partie I : Résultats

I. Echantillonnage	22
II. Identification des souches obtenues	23
II.1. Aspect macroscopique des colonies	23
II.2. Aspect microscopique des colonies	26
III. La recherche de l'activité antimicrobienne des souches isolées:.....	28
IV. Mise en évidence des activités enzymatiques.....	30
IV.1. Résultats de test de catalase :.....	30
IV.2. Dégradation de l'amidon.....	31
IV.3. Dégradation de cellulose.....	31
IV.4. Dégradation des lipides.....	32
IV.5. Dégradation des protéines.....	33
V. La galerie API 20 E	35

Partie II : La discussion.....

Conclusion.....	38
Références.....	39
Les annexes.....	44
Résumé	

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier « Allah » qui nous a données la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Nous aimerons exprimer toute notre reconnaissance et notre respect à **Mr Cherif Nadjib**, non seulement pour nous avoir encadrées tout le long de ce travail avec enthousiasme et dynamisme mais aussi pour ses précieux conseils scientifiques, ses encouragements et son parfait sens de la responsabilité. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

*Nous sommes sensibles à l'honneur que nous faites **Mr Ziane**. Pour présider le jury de ce travail. Qu'elle veuille accepter notre profond respect et notre immense estime.*

*Nous sommes particulièrement heureuses que **Mr Mouedden**, nous fasses l'honneur de faire partie du jury et d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail. Qu'elle trouve ici l'expression de nos sentiments les plus distingués.*

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de microbiologie de centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain temouchent c'est pourquoi un vif remerciement est adressé à l'ingénieur du laboratoire : **Mr Khaled et Mme Choukria**.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à **l'ensemble de nos enseignants** qui ont contribué à notre formation tout au long de notre parcours pédagogique, que ce soit en Licence ou en Master.*

Enfin merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A ma famille, elle qui m'a toujours soutenu et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs, son amour a fait moi ce que je suis aujourd'hui

A la mémoire de mon cher père

*Ce travail est dédié à mon cher père **GAMAL TAOURIRT**, qui m'a toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études*

Celui qu'il a consacré toute sa vie pour l'éducation, Puisse ALLAH, le miséricordieux, vous accueillir dans son éternel paradis.

A ma chère maman

*A la femme qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui me rend toujours heureuse, mon adorable mère **NADJAT** que Dieu la protège et lui offre la santé et le bonheur*

A mon frère et ma sœur

*Pour leurs soutiens et conseils précieux tout au long de mes études, à mon cher frère **ZAKARIA**, et mon adorable sœur **ASMAA***

A mes tantes Sofia, Jamila, et Horia

A mes oncles abd el-Nacer, Abd el-Madjid, Mohammed, Djamel, Nabil, et exceptionnellement à Mustafa qui nous a quitté depuis 10 ans

A mes cousins(e) et mes amies précisément à ma chère Ilhem

*À mon binôme **IMANE KEMMADE** et à sa famille*

À ceux et à celles qui m'ont soutenu dans ma vie

Et tout au long de mon parcours d'études de près ou de loin

Bouchra

Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, pour toutes les personnes que j'aime,

C'est tout simplement que je dédie ce travail à :

Mon très cher père Abd el kader,

Aucune dédicace ne saurait exprimer, l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour toi.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

Ma tendre mère Naima,

Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

A la mémoire de mon oncle Benyoucef, sa femme

Fatima et son fils Salah Eddine :

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Puisse ALLAH, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

Mes très chères sœurs : Sarah et Rima

Mes chers frères : Nouredine et Djilali

Ma famille Kemmad spécialement: Mani, Mohemmed, tante Akila, tante Cherifa, Ahmed et benali.

La famille Zerrouki

Mon cher oncle: Zerrouki Aissa

Ma très chère collègue et amie : Bouchra et sa famille.

Mon encadreur Sherif Najib: Cette humble dédicace ne saurait exprimer mon grand respect et ma profonde estime, qu'Allah te procure bonne santé et longue vie.

Tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

Imane

Introduction

Introduction

Les microorganismes peuplant les milieux aquatiques présentent une très grande diversité qui reste aujourd'hui encore mal connue. Parmi les organismes eucaryotes, on compte un grand nombre de groupes de microalgues, de champignons, ciliés et autres organismes hétérotrophes. Les procaryotes rassemblent quant à eux de nombreuses lignées de bactéries photosynthétiques, photo-hétérotrophes et d'archées. Enfin, les virus marins dont l'importance n'a été mise en évidence que depuis les années 1990, constituent aussi un compartiment extrêmement diversifié.

Parmi les microorganismes présentant un intérêt industriel, les bactéries occupent une place à part dans la mesure où elles ont besoin d'une source de lumière, en plus des conditions générales de culture.

Dans le milieu marin, ces organismes constituent le phytoplancton qui est à la base de toute la chaîne alimentaire et supporte une production de ressources renouvelables exploitée de l'ordre de 100 millions de tonnes par an. Par leur taille de l'ordre de quelques μm , leur durée de génération de l'ordre de la journée, leur diversité taxonomique (40 000 espèces, dont 100 étudiées et 10 exploitées) et donc biochimique, ils peuvent donner lieu à de nouvelles applications scientifiques et économiques (**Arnaud M., 1997**) que ce soit dans le domaine de l'agroalimentaire, de la cosmétique que celui de la santé. (**Jean Guézennec**).

Il conviendrait peut-être également de considérer le milieu marin comme une ressource plus qu'un secteur spécifique des biotechnologies, tant il peut contribuer à tous les autres secteurs des biotechnologies.

L'Objectif de ce travail est de faire :

- Un isolement des microorganismes dans la côte de Beni-saf.
- Identifier quelques souches marines.
- Mise en évidence de l'effet antimicrobien de chaque souche.
- Mise en évidence de production des enzymes.

Etude

Bibliographique Sur

Les Microorganismes

De milieux Marins

I. La Méditerranée :

La Méditerranée couvre une surface de 2 510 000 km² (5 fois la superficie de la France), sa profondeur maximale est de 5124 mètres et leur profondeur moyenne est de 1370 mètres, elle est entourée d'environ 46 000 km de côtes et son volume est de 3,5 millions de m³, sa salinité moyenne est de 37,5 g/l.

En surface, la température de l'eau varie entre 10 et 30°C, Au delà de 50 m de profondeur, sa température est constante et d'environ 13 °C, elles ont une amplitude qui ne dépasse pas 40 cm. La mer Méditerranée représente en superficie 0,82 % des océans du Monde et abrite 8 à 9 % de sa biodiversité. 10 000 à 12 000 espèces de végétaux et d'animaux ont été recensées en Méditerranée, 650 espèces de poissons dont les 3/4 vivent dans les 50 premiers mètres de profondeur et 25 à 30 % des espèces méditerranéennes sont endémiques (n'existent pas dans les autres mers). **(Côte Bleue, Christian COUDE, septembre 1999).**

I.1. L'Eau de mer :

L'eau de mer est une solution complexe qui contient tous les éléments indispensables à la vie (calcium, silicium, carbone, azote, phosphore, oligo-éléments), des matières organiques (teneur comprise entre 0.5 et 2mg) et, naturellement à l'état dissous, les gaz présents dans l'atmosphère. L'eau de mer est faiblement alcaline. Son pH étant compris entre 7.5 et 8.4. **(RAPINAT M. 1982).**

La caractéristique la plus importante des eaux de mer est leur salinité, c'est-à-dire leur teneur globale en sels (chlorures de sodium et de magnésium, sulfates, carbonates). La salinité moyenne des eaux des mers et océans est de 35 g/L. Cette salinité peut être différente dans le cas de mers fermées. **(HUOT A. 2010).**

Les milieux marins et plus spécialement les milieux côtiers sont soumis à de perpétuels changements d'origine physique, chimique et bactériologique **(Alain A et Roger K, 2004).**

La mer et les océans évoquent les loisirs, les courses autour du monde, la pêche et de nombreuses autres activités. Une partie de la bioressource marine nourrit quotidiennement des millions de personnes. Mais si la mer nourrit, elle peut aussi soigner, guérir et participer à notre bien-être : nouveaux anti-douleurs, anti-cancéreux et antibiotiques, nouveaux actifs en cosmétologie, préservation de notre environnement **(Jean Guézennec, septembre 2014).**

I.2. La côte de BENI-SAF :

Les zones côtières sont très importantes pour la vie des océans, c'est elles qui filtrent et transforment les nombreux déchets et polluants que nous rejetons. Ce sont aussi des lieux de reproduction, des nurseries et des zones d'alimentation pour l'homme et pour de nombreuses espèces marines, et elles méritent donc à ce titre d'être protégées (**Boutiba et al., 2003**). En Algérie, l'organisation d'une surveillance du milieu marin est devenue une nécessité. En effet, la côte algérienne s'étend sur 1550 km. La zone littorale représente 1,9% de la superficie globale du pays, qui compte à elle seule près de 40% de la population totale (**Grimes et al., 2004**).

BENI-SAF est une ville, un port, des plages, un splendide aquarium, et une douceur de vivre, à quelques 100 Km de la frontière Algéro-Marocaine, dans l'Ouest Algérien. Elle se situe à environ 30 km à l'ouest d'Ain Témouchent et 120 km au sud-ouest d'Oran.

II. La biotechnologie bleue :

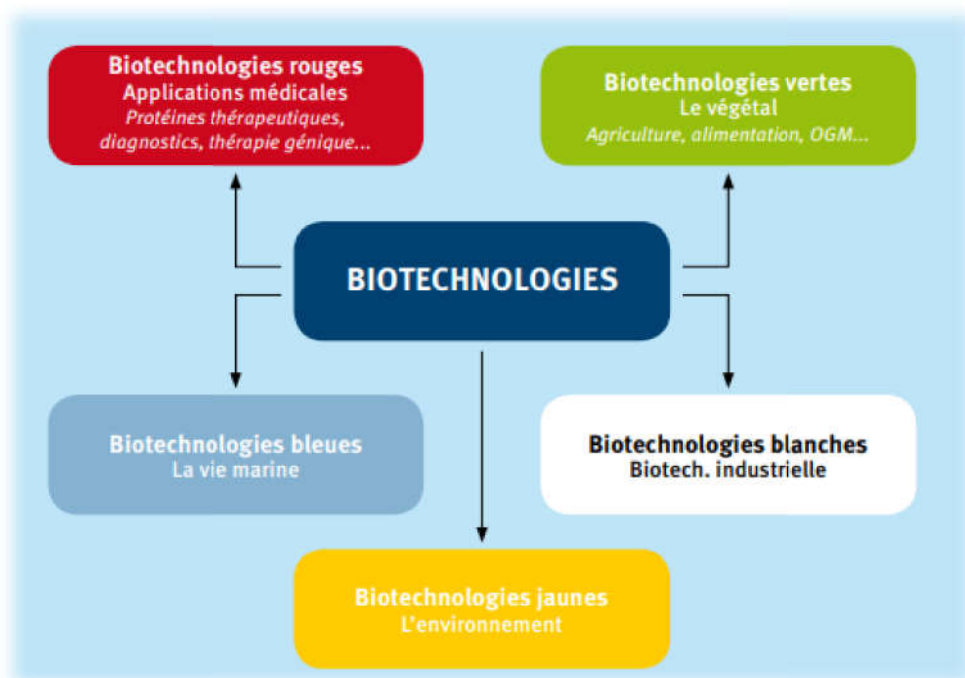


Figure 01: Les cinq couleurs des biotechnologies.

Avec les biotechnologies vertes, les biotechnologies rouges et les biotechnologies blanches, les biotechnologies bleues (aussi appelées biotechnologies marines) constituent une catégorie particulière de biotechnologies. Elles font des ressources marines (algues et micro-

algues essentiellement) leurs matériaux de base. Plus largement, ce terme se rapporte aux biotechnologies mettant en œuvre des organismes marins.

III. Les bactéries marines :

Les microorganismes marins (bactéries et micro-algues) représentent la plus grande part de vie dans les océans mais on estime que 99% d'entre eux sont encore à découvrir. Or, les avancées dans le domaine de la biologie moléculaire et de la microbiologie rendent désormais possibles l'étude et l'utilisation de ces microorganismes marins. Négligés jusqu'à présent, ces organismes pourraient donc bien être le principal gisement de nouvelles molécules des prochaines décennies.

Les bactéries ont colonisé tous les environnements marins (côtiers et au large). Leur abondance moyenne est de 10^5 cellules par millilitre.

III.1. Les bactéries des Microcouche :

La microcouche de surface est généralement définie comme étant le premier millimètre de la surface des océans (**Macintyre 1974, Hardy 1982, Liss et Duce 1997**). Cependant, la réelle épaisseur de cette microcouche a toujours été source à débats. Elle varie, selon les auteurs de 30 à 300 m (**Harvey 1973, Hardy 1982, Li et al. 1998, Falkowska 1999a, Zuev et al. 2001**). Cette épaisseur dépend, entre autre, de la quantité de matière organique présente au niveau de la microcouche (**Cincinelli et al. 2001**) et de la vitesse du vent (**Liu et Dickhut 1998**).

On trouve des bactéries hétérotrophes qui utilisée une grande partie de matière organique dissoute et particulaire hétérotrophes (**Williams 2000**). Cette matière organique provient notamment de l'excrétion des polymères de nature polysaccharidique par les cellules phytoplanctoniques, des pelotes fécales, de la prédation exercée à tous les niveaux trophiques et de la lyse virale et naturelle des cellules bactériennes et phytoplanctoniques (**Azam et al. 1983**). Tel que genres *Pseudomonas*, *Micrococcus* et *Bacillus*.

III.2. Les bactéries des abysses :

Certaines bactéries issues des abysses supportent une très forte pression. En effet, la pression dans le milieu marin, augmente environ d'une atmosphère normale (atm) tous les dix mètres atteignant des valeurs proches de 1000 atm (ou 100 Mpa) aux plus grandes profondeurs. Ces bactéries ou archéobactéries sont appelées barophiles et ne peuvent croître à des pressions inférieures à 40 bar.

des microorganismes vivant au niveau du fond des mers, des bactéries hyperthermophiles (70 à 110°C) et anaérobies ont été mises en évidence autour des sources hydrothermales dans les grands fonds marins, à des profondeurs où règnent des pressions de l'ordre de 250 bars (PRIEUR et al., 1995). Tel que *Pyrococcus abyssi*.

III.3. Roseobacter :

Une goutte de l'eau de mer contient par exemple, du genre *Roseobacter*, qui représente près de 15 à 20 % des espèces présentes dans chaque goutte. Ces bactéries sont retrouvées dans tous les océans du globe, et fréquemment associées à des algues marines et des efflorescences.

Il a été démontré que les roses-caractères jouent un rôle important dans les cycles biogéochimiques marins et dans le changement climatique et sont bien connus pour le traitement d'une grande quantité de carbone marin. Elles constituent environ 25% des bactéries marines côtières et sont présentes dans de nombreux habitats, notamment les océans côtiers et les océans, la banquise et les fonds marins. (Raphaël L, 2013).

III.4. Pseudoalteromonas :

Les pseudoalteromonas sont répandus dans divers environnements marins et la plupart des souches peuvent affecter la colonisation et la métamorphose des larves d'invertébrés en formant des biofilms.

Le genre *Pseudoalteromonas* est un groupe de bactéries marines appartenant à la classe des *γ-proteobacteria*, et dont les recherches sur les produits naturels et le domaine des sciences de l'écologie microbienne ont fortement augmenté depuis la dernière décennie. Il semble que ce soit l'un des seuls genres bactériens marins montrant clairement des propriétés pharmacologiques et écologiques intéressantes et innovantes. (Zeng et al., 2015).

III.5. *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 :

Sphingopyxis alaskensis RB2256 est une bactérie oligotrophe facultative, gram négative, appartenant au phylum des Proteobacteries, a la classe des α Proteobacteries et a l'ordre des Rhodospirillales.

S. alaskensis présente une forte résistance a différents stress, comme des températures élevées (jusqu'a 56° C), le peroxyde d'hydrogène (25 mM), l'éthanol (20 %), ou le rayonnement ultraviolet B (Eguchi *et al.*, 1996 ; Joux *et al.*, 1999). De plus, *S. alaskensis* présente une résistance similaire à ces différents stress en phase exponentielle et en phase stationnaire.

III.6. Les actinomycètes

Les actinomycètes, des bactéries à Gram positif, à haut coefficient de Chargaff (GC%), montrant une diversité morphologique marquée (Goodfellow et O'Donnell, 1989), ont été et demeurent la source la plus féconde pour tous les types de métabolites bioactifs (Ravikumar *et al.*, 2011).

En plus des antibiotiques, elles sont connues pour leur aptitude à dégrader des métabolites et de produire plusieurs enzymes tels que : la chitinase (Gomez *et al.*, 2000 ; Kim *et al.*, 2003) , la xylanase (Mansour *et al.*, 2003 ; Alberton *et al.*, 2009) , l' α -amylase (Syed *et al.*, 2009) , la cellulase (Aboul-Enein , 2010 ; Rathan et Ambili , 2011), la protéase (Patke et Dey, 1998 ; Vonothini *et al.*, 2008), la lipase (Zhou *et al.*, 2000 ; Vujaklija *et al.*, 2002) , la pectinase (Kuhad *et al.*, 2004 ; Arijit *et al.*, 2013) etc.

Habitat	Genre
Eau	<i>Actinoplanes</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i>

Tableau 01:Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow, 1983).

III.7. Les microalgues :

Que dire des microalgues qui, selon les estimations, varient de 200 000 à plus d'un million d'espèces ! Les microalgues sont également connues de très longue date. Les scientifiques ont découvert que les Aztèques au Mexique consommaient le phytoplancton. Certains peuples d'Afrique en faisaient tout autant avec la spiruline pour sa valeur nutritionnelle et ses nombreuses vitamines antioxydants et β (Beta)-carotène.

Cette grande diversité permet d'imaginer un vaste panel d'applications pour de nombreux secteurs industriels. L'industrie pharmaceutique, l'industrie cosmétique, l'alimentation animale mais également humaine, les fertilisants, l'environnement, et plus récemment le domaine de l'énergie et des biocarburants, sont autant de pistes de valorisation prometteuses pour ces microorganismes marins. **(Jean Guézennec, septembre 2014).**

Les microalgues possèdent des activités biologiques telles que l'activité antibiotique et l'activité antivirale.

Les lipides de microalgues marines sont riches en acide eicosapentaénoïque (EPA) qui a un effet anti inflammatoire et en acide docosahexaénoïque (DHA) qui diminue le taux de cholestérol. **(Gaëlle Pencreac'h. et al), (Renaud, S. et al., 2011).** Ces métabolites sont des acides gras de la famille oméga-3.

Tels que *Cryptocodinium cohnii* (Dinoflagellées) qui produisent DHA et *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophytes) qui produisent EPA.

III.8. Les cyanobactéries :

Les cyanobactéries sont des micro-organismes aquatiques qui présentent à la fois des caractéristiques provenant des bactéries et des algues. Elles contiennent, comme les algues, de la chlorophylle qui est le pigment responsable de la photosynthèse. La photosynthèse est un processus qui permet aux plantes et à d'autres organismes d'utiliser l'énergie solaire pour fabriquer leur nourriture.

Ces dernières, aussi appelées cyanobactéries, sont classées parmi le groupe des bactéries mais possèdent une caractéristique commune aux algues. En effet, leurs cellules renferment des pigments leur permettant de faire la photosynthèse et ainsi produire de l'oxygène. Colonisant plusieurs écosystèmes, les cyanobactéries ne représentent pas une nuisance pour les humains et l'environnement lorsqu'elles sont présentes en faible concentration. Elles appartiennent au premier maillon de la chaîne alimentaire des

écosystèmes aquatiques. Les cyanobactéries sont microscopiques. C'est pourquoi en faible quantité, il est impossible de les voir. Par contre, lorsque les conditions favorisant leur apparition sont réunies, elles se multiplient jusqu'à être visibles facilement à l'œil nu. On parle alors de fleur d'eau d'algues bleu-vert (en anglais : bloom). Il est à souligner que les fleurs d'eau d'algues bleu-vert peuvent être présentes même si elles ne sont pas visibles. En effet, certaines fleurs d'eau peuvent se retrouver en suspension à différentes profondeurs dans l'eau, passant inaperçues aux regards. **(Coalition québécoise, 2010).**

III.9. Picocyanobactéries :

Les picocyanobactéries marines sont aujourd'hui considérées comme les phototrophes oxygéniques numériquement les plus abondants dans bien des régions océaniques, elles ne sont toutefois représentées que par les deux genres que sont *Prochlorococcus* et *Synechococcus*, découverts il y a une quarantaine d'années seulement. La mise en évidence de ces organismes de taille microscopique et de leur importance a été possible grâce à l'apparition de nouvelles technologies telles que la microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux. C'est en 1979 que John Waterbury observa la présence en abondance d'une cyanobactérie coccoïde fluoresçant en orange sous lumière bleue (caractéristique de la fluorescence de la phycoérythrine), et assigna cet organisme au genre *Synechococcus* **(Waterbury et al. 1979)**. Cette étude insiste notamment sur l'ubiquité de cet organisme et sa taille très réduite comprise entre 0.8 et 2 μm .

III.10. Le thermocoque :

Le thermocoque est un genre d'archéa hyperthermophile omniprésent dans les environnements hydrothermaux marins qui poussent dans des habitats anaérobies de subsurface mais sont capables de survivre dans une eau de mer oxygénée froide.

Il s'agit d'un hyperthermophile organotrophique anaérobie dont le diamètre est compris entre 0,5 et 3,0 μm . Ils ont trouvé une enzyme issue d'une bactérie nommée *Thermococcus litoralis* et en ont créé une enzyme polymérase qui a permis de répliquer d'une façon exponentielle les fragments d'ADN. Cela a donné naissance au séquençage, à la génétique, aux empreintes génétiques... C'était en réalité une révolution gigantesque dans le domaine scientifique et biotechnologique qui a permis de booster ce secteur économique qui

était encore mal connu. C'est un exemple majeur de bactérie marine utilisée désormais dans le monde entier, dans tous les laboratoires de biologie. (Mark et al 2015).

III.11. *Aliivibrio fischeri* :

Aliivibrio fischeri est une bactérie marine Gram-négative. C'est une bactérie bioluminescente hétérotrophe.

La bactérie marine *V. fischeri* existe naturellement soit dans un état planctonique libre, soit en tant que symbiote de certains poissons ou calmars luminescents (Ruby & Nealson, 1976, Ruby et McFall-Ngai, 1999). Les bactéries colonisent les organes de lumière spécialisés chez les poissons ou les calmars, ce qui les rend bioluminescentes. On pense que la luminescence du poisson ou du calmar participe à l'attraction des proies ou même au camouflage. Au cours de l'alimentation nocturne du calmar *Euprymna scolopes*, la luminescence de l'organe de lumière est dirigée vers le fond de la mer et est modulée par le calmar pour correspondre à l'intensité du clair de lune, empêchant ainsi une ombre du calmar sur le fond de la mer (Visick & McFall- Ngai, 2000). La bactérie est la source de la luminescence. En milieu marin, les bactéries ne luminescent que lors de la colonisation des organes de lumière et n'émettent pas de lumière à l'état libre. Il est judicieux que les bactéries régulent étroitement la bioluminescence car le mécanisme par lequel la lumière est produite consomme beaucoup d'énergie. Les recherches menées pour répondre à la question de savoir comment *V. fischeri* régule la bioluminescence ont conduit à la découverte de la détection du quorum bactérien via les N-acyl-L-homosérine lactones (AHL).

III.12. *Shewanella* :

Shewanella est une bactérie bacille motrice à Gram négatif qui se rencontre généralement dans les environnements marins du monde entier, généralement dans des eaux plus chaudes. L'algue *Shewanella* est l'espèce supposée causer le plus d'infections chez l'homme, bien que l'infection humaine soit très rare et soit le plus souvent associée aux personnes immunodéprimées. Les infections à *Shewanella* ne sont pas à signaler au ministère de la Santé et des tests spécifiques peuvent ne pas être demandés. Par conséquent, le nombre d'infections humaines, bien que rare, est inconnu. (Holt et al., 2005).

III.13. Bactéries magnéto-tactiques :

Ces bactéries sont magnéto-sensibles, ceci est dû aux magnétosomes présents dans leur membrane qui impliquent une orientation de leur nage suivant les lignes du champ magnétique. (Ronan Ket *al*, 2015).

La recherche sur ces bactéries est rendue difficile par le faible nombre de souches que l'on a découvertes et les difficultés que l'on a à les isoler en culture.

II.14. Les microorganismes de contamination fécale :

Les coliformes totaux (CT), les coliformes fécaux (FC) et *Escherichia coli* sont utilisés comme indicateurs de la qualité de l'eau de loisir en mer. Parmi ceux-ci, *E. coli* est généralement considéré comme le plus fiable étant donné que sa présence est directement liée à la contamination fécale avec sa menace implicite de présence d'une maladie entérique (Rice *et al.* 1991).

IV. Les applications :

Les applications des biotechnologies bleues sont nombreuses. Les ressources maritimes peuvent en effet avoir des usages dans la cosmétologie (crèmes, thalassothérapies, etc.) et dans l'industrie agro-alimentaire (compléments alimentaires, engrais, etc.) mais aussi dans le secteur de l'énergie (biocarburants notamment) ou de la pharmacologie.

Aperçu très général des applications majeures des organismes marins		
Domaines d'application	Organismes considérés	Exemples de molécules et produits
Cosmétologie Dermo-cosmétologie	Macro- et microalgues, cyanobactéries, bactéries, champignons, crustacés...	Peptides, exopolymères, enzymes, composés antimicrobiens, pigments...
Environnement	Macroalgues, microalgues cyanobactéries, bactéries, crustacés	Molécules <i>antifouling</i> et antibiofilm bioremédiation : biopolymères (PS, EPS, PHA, polyphosphates)...
Industrie pétrolière	Bactéries	Exopolymères, glycolipides, biosurfactants...
Agroalimentaire	Tous organismes	Enzymes, biopolymères, pigments...
Pharmacologie/Santé	Tous organismes	Principes actifs...

PS : polysaccharide ; EPS : exopolysaccharide ; PHA : polyhydroxyalcanoate

Tableau 02: Les applications majeures des organismes marins (Jean Guézennec, septembre 2014)

Il existe une réelle demande au niveau industriel pour des enzymes d'origine microbienne afin d'améliorer certains procédés de fabrication. Les domaines d'application enzymatiques sont très divers: industrie textile (décoloration de jeans), papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier), dépollution (attaque des substances phénoliques), industrie alimentaire (boulangerie, ...).

Les Actinomycètes en général, et plus particulièrement les Streptomyces sont également d'importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de Streptomyces, y compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines. **(Davail S, et al).**

La fonction écologique des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques. Ils se joignent aux autres bactéries et aux champignons comme décomposeurs et formateurs d'humus. Ils prolifèrent surtout quand l'action des bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action.

Les actinomycètes jouent un rôle important dans le milieu marin, mis à part la production d'antibiotiques **(Das et al. 2006)**. La dégradation et le renouvellement de divers matériaux constituent un processus continu sous l'action de divers micro-organismes **(Jensen et al., 2005a, Lam, 2006)**.

Les premiers antibiotiques d'origine marine ont été découverts suite à l'identification de pyrroles bromés à partir de pigments pourpres d'*Alteromonadales*, dont le pyrrole 2,3,4-tribromo-5(1'-hydroxy-2',4' dibromophenyl) de *Thalassia* sp. **(Lowell, 1966)**. Par la suite, de nombreuses autres substances antibactériennes de faibles masses ont été identifiées à partir de *P. luteoviolacea* (anciennement nommée *Chromobacterium marinum* **(Gauthier, 1982)**), telles que le 2,3,4,5-tetrabromopyrrole **(Gribble, 1999)** ou encore le pentabromopseudilin **(Hanefeld et al., 1994)**.

Matériel

Et

Méthode

I. Zones de prélèvement :

Les échantillons ont été prélevés à partir de différents sites de la côte de Béni saf (plage de Rachgoun le 10 mars 2019, Ain temouchent). Ces endroits ont été choisis pour la recherche des divers microorganismes présents dans le milieu aquatique marin.

La côte Béni saf est très riches par différents espèces animales et végétales, et aussi par des différents microorganismes.

Les échantillons de l'eau de mer ont été prélevés à une distance de 6 m et une profondeur de 50 cm, tandis que des prélèvements à partir des mollusques collés à des roches, et des algues sous-marines ont été effectués pour le deuxième échantillonnage.

Les échantillons ont été mis à des flacons stériles dans une glacière et transporté au laboratoire de microbiologie de centre universitaire Belhadj bouchaib d'Ain témouchent.



Figure 02 : La localisation de région de Béni Saf (Google Maps)



Figure 03 : Site de prélèvements des mollusques



Figure 04: Site de prélèvements des algues



Figure 05 : Site de prélèvement de l'eau de mer (Rachgoun, Ain temouchent)

II. Isolement et purification :

II.1. Préparation des dilutions :

Dans un tube stérile, des pesées des échantillons (1g algues / 1g mollusque / 1ml d'eau de mer) ont été mises dans un volume de 9 ml de bouillon SEA WATER chacune, puis, des dilutions successives de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) ont été préparées par la suite.

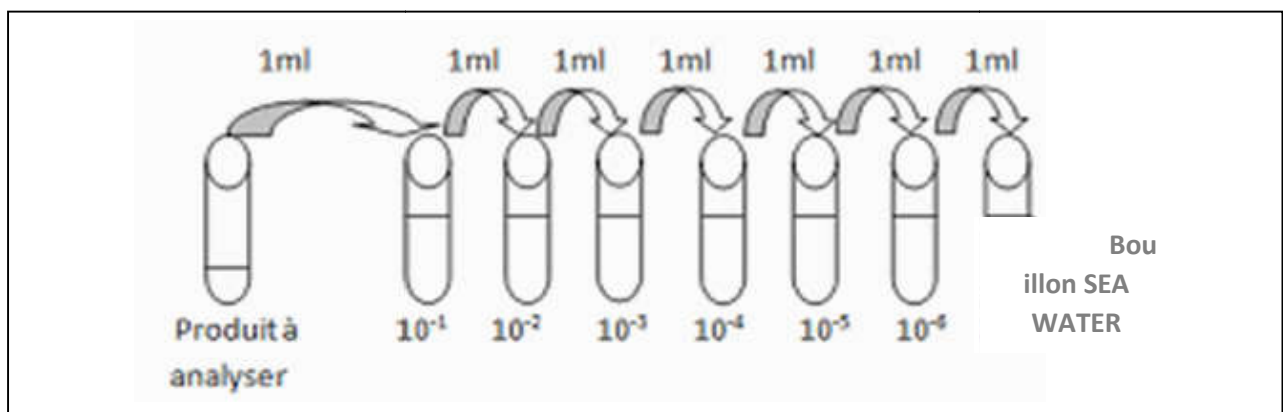


Figure 06 : Préparation des dilutions.

II.2. Ensemencement et Incubation :

Dans des conditions d'asepsie, un volume de 0,1 ml de chaque dilution a été ensemencé sur la surface de la gélose par l'étalement avec un râteau stérile en verre. Trois types de milieux de culture ont été préparés pour l'isolement des différents microorganismes marins :

SWA :Sea Water Agar pour l'isolement des souches marines totales dont l'incubation dure 48h à 30 °C

GPYS : pour isolement des champignons marins, l'incubation dure 5 jours à 25 °C.

Grein and Mayers Agar : pour l'isolement des actinomycètes marins, l'incubation dure 15 jours à 25 °C.

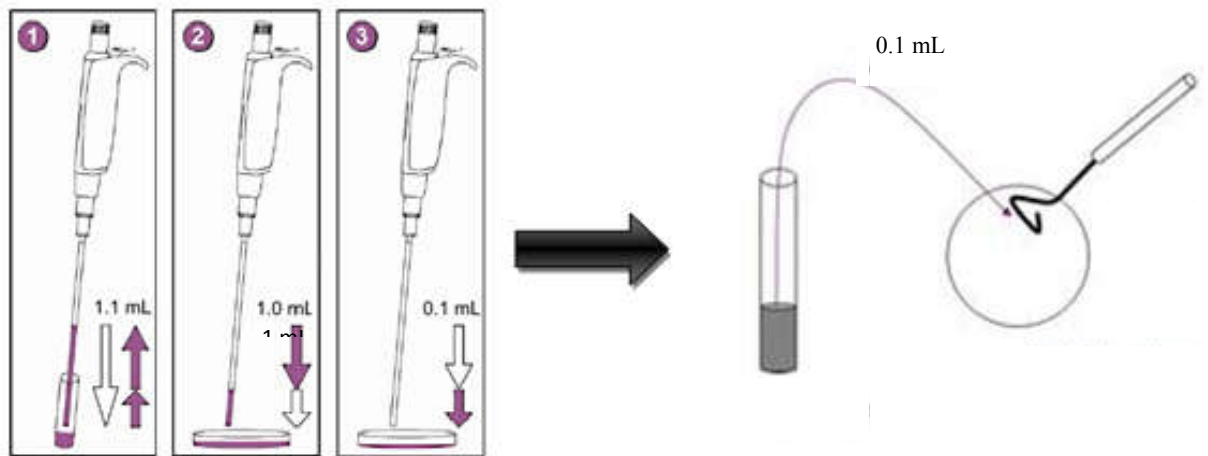


Figure 07 : L'ensemencement en surface

II.3. Purification :

Après l'incubation, une étude macroscopique des différentes colonies isolées a été réalisée en observant la forme, la couleur, la taille, et d'autres caractéristiques, cette observation conduit à purifier les colonies ayant le même aspect par une série successive de repiquage.

III. Identification des souches obtenues :

III.1. Aspect macroscopique des colonies :

Comme il est indiqué précédemment, une étude macroscopique des différentes colonies isolées a été réalisée en observant la forme, la couleur, la taille, et d'autres caractéristiques.

III.2. Aspect microscopique des souches isolées :

La coloration de Gram est la base de l'identification des souches bactériennes. La paroi joue un rôle important dans la différenciation de cette technique, et permet de distinguer les bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs, cette observation permis aussi la détermination de la forme, la taille, et le mode de regroupement.

Un frottis bactérien a été préparé sur une lame puis fixé par flambage sur le bec Bunsen.

Une coloration avec le violet de Gentiane durant une minute a été réalisée suivie d'un rinçage avec de l'eau de robinet, après, la lame a été recouvert par le Lugol pendant une minute puis rincée.

Une décoloration par l'éthanol a été effectuée puis une recoloration par la Fuchsine pendant une minute suivis d'un rinçage et séchage entre deux feuilles de papier absorbant.

Les bactéries à Gram - sont alcool-sensibles et sont donc décolorées, et La paroi des bactéries à Gram+ ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcool-résistantes et restent colorées en violet.

IV. L'effet antibiotique des souches isolées :

Cette étude détermine la sensibilité des bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *Serratia*, *klebsella*, *Acinitobacter*, *Bacillus cereus*) vis-à-vis les souches isolées.

IV.1. la recherche de l'activité antibactérienne par la méthode de spot :

Des suspensions bactériennes des différentes souches cibles ont été préparées dans de l'eau physiologique stérile, puis ajustées à une valeur de la densité optique DO de 0.08 – 0.09 pour une longueur d'onde de 600 nm.

A l'aide d'un écouvillon stérile, chaque suspension bactérienne a été encensée par des stries très serrés sur des boites de pétri contenant le milieu Muller Hinton.

Après séchage, les souches isolées dans ce travail ont étéensemencées par spots sur chaque boite précédemment préparées. L'incubation dure 24 heures à une température de 30°C.

IV.2. la recherche de l'activité antibactérienne par la méthode des puits :

Dans des erlenmeyers stériles, les souches marines isolées ont étéensemencées dans un volume de 50 ml de bouillon nutritif, les verreries sont fermées par le coton stérile et incubées à une température de 30°C pendant 48 heures.

Après la fermentation, chaque milieu a subis une centrifugation à une vitesse de 12000 g pendant 10 minutes, le surnageant a été récupéré dans des micro-tubes stériles.

Les boîtes de chaque souche cible ont été préparées comme il est indiqué précédemment, après séchage de milieu, des puits ont été creusés à l'aide du bout des pipetes pasteur, puis remplis par un volume du surnageant obtenu après la fermentation des souches marines isolées.

L'incubation dure 24 heures à une température de 30°C.

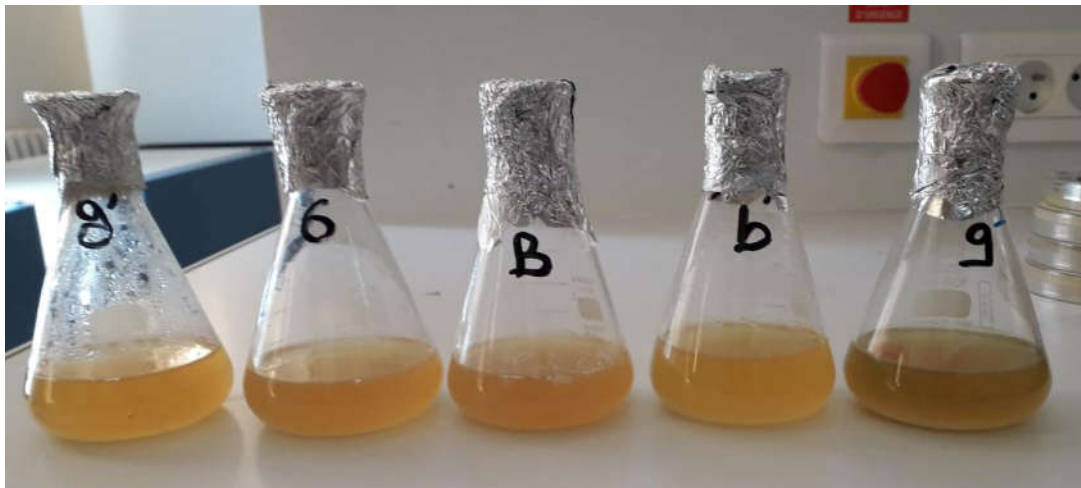


Figure 08 : Fermentation des souches marines isolées.

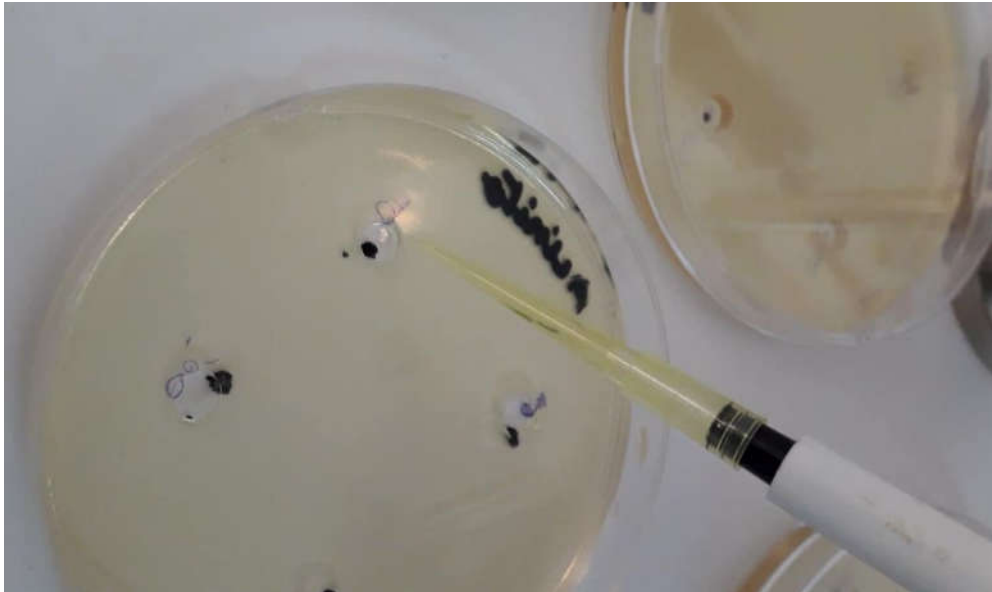


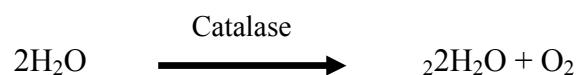
Figure 09: Etude de l'effet antibiotique par la méthode des puits

V. Etude de l'activité enzymatique des souches marines isolées :

Les souches marines sont connues par leur grand pouvoir de dégradation, ce qui indique la richesse de ces cellules par différentes enzymes telle que les amylases, cellulases, lipases et protéases. Une étude de la production de ces molécules catalytiques a été effectuée.

V.1. La recherche de la catalase :

Les catalases sont des enzymes dont la fonction principale est la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Ces enzymes, présentes dans pratiquement tous les organismes aérobies, (**Chance et al., 1979**).



Sur une lame sèche, une goutte d'eau oxygénée a été déposée, puis homogénéisée avec une boucle d'anse de platine de la souche bactérienne marine. Le résultat s'apparait immédiatement sous forme de bulles d'air effervescente, ce qui indique la présence de cette enzyme.

V.2. la recherche de l'activité amylolytique :

Les amylases, dont la production est induite par l'amidon, sont probablement réprimées par des métabolites de l'amylolyse tels que le glucose (Cotta, 1988).

Un ensemencement en spots des souches marines isolées, sur la surface de la gélose nutritive additionnée de l'amidon a été réalisé afin de déterminer l'activité amylolytique, Les boîtes de pétri sont incubées à une température de 30°C pendant 24h.

La révélation des résultats a été effectuée par l'inondation boîtes après l'incubation par une solution de Lugol pendant 5 minutes, puis rinçage avec de l'eau de robinet

Une réaction positive de l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie sur un fond bleu foncé (De VOS et al., 2009).

V.3. la recherche de l'activité cellulosique :

Les cellulases se rapportent à un groupe d'enzymes agissant ensemble et hydrolysent la cellulose en sucre simple (kader et al. , 1999 ; korish ,2003).

Un ensemencement en spots de nos souches isolées, sur la surface de la gélose à la cellulose a été effectué afin de déterminer l'activité cellulosique, ensuite Les boîtes de pétri sont incubées à une température de 30°C pendant 24h

L'observation d'une zone claire autour des colonies après inondation des boîtes par une solution de Lugol indique que la réaction de l'hydrolyse de cellulose est positive.

V.4. la recherche de l'activité lipolytiques :

Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites par les bactéries à Gram positif que par des bactéries à Gram négatif (Fickers et al., 2008).

Les enzymes lipolytiques forment une classe d'enzymes parfaitement solubles dans l'eau. Elles sont responsables de l'hydrolyse des lipides. Verger R. (1985).

Un ensemencement en spots de nos souches isolées, sur la surface de la gélose minérale additionnée de Tween 80 a été réalisé afin de déterminer l'activité lipolytique, Les boîtes de Pétri sont incubées à une température de 30°C pendant 2-4 jours.

La réaction positive de l'activité lipolytique se manifeste par l'apparition des précipitations blanchâtres autour des colonies.

V.5. la recherche de l'activité protéolytique :

La protéase est une enzyme qui hydrolyse les protéines en scindant les liens peptidiques reliant les acides aminés entre eux.

Un ensemencement en strie unique de nos souches isolées a été réalisé sur la surface de la gélose nutritive additionnée de 5 ml de lait écrémé stérile, afin de déterminer l'activité protéolytique, ensuite Les boîtes de pétri sont incubées à une température de 30°C pendant 24h.

L'apparition d'une zone claire autour des stries indique l'hydrolyse de la caséine (protéine du lait).

VI. La galerie API® 20 E :

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif. Comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, Et permet la mise en évidence de quelques tests biochimiques

Pour préparer la galerie API 20E, 5 ml d'eau a été dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide

A l'aide d'une micropipette les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, et GEL ont été remplis avec la suspension bactérienne, tandis que les cupules des tests ADH, LDC, ODC, URE, H2S sont complétées avec de d'huile de paraffine stérile pour créer un environnement anaérobie. Et enfin, refermer la boîte et incuber à 37°C pendant 18 h.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification ou grâce à un logiciel d'identification.

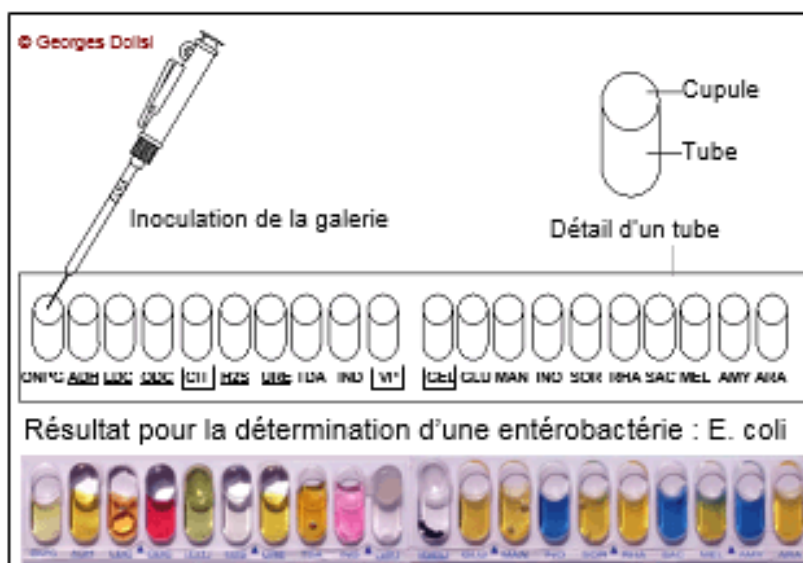
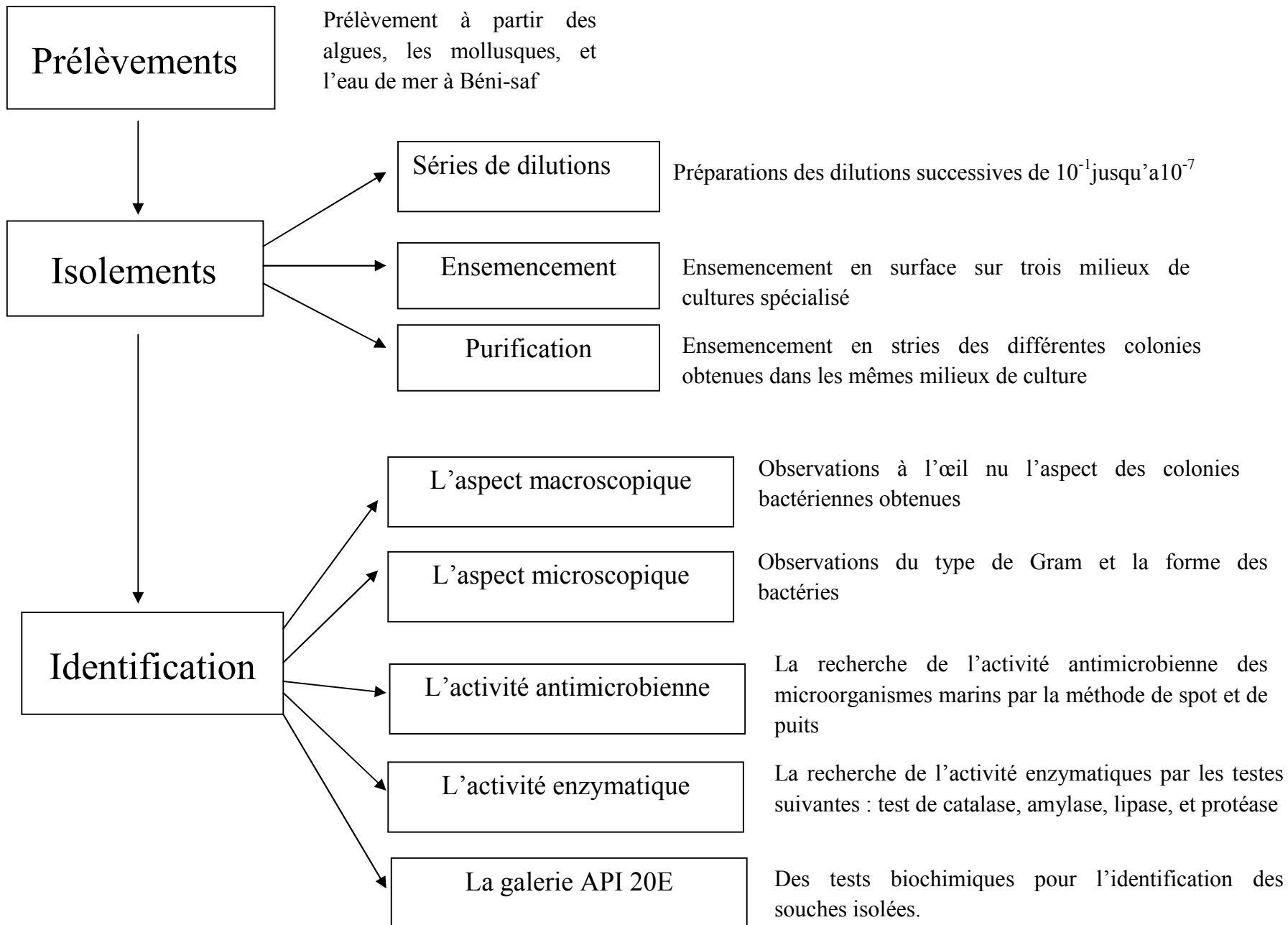


Figure 10: la galerie API20E



Résultats

Et

Discussion

Partie I : Résultats

I. Echantillonnage :

Les prélèvements sont effectués dans la région de Bénisaf (plage Rachgoun, wilaya de Ain temouchent) et de différents sites, afin de rechercher les divers microorganismes présentant dans ce bord de la mer, les échantillons sont collectés à partir de l'eau marine, des algues, et des escargots de collés sur les roches.

Le matériel utilisé dans ce prélèvement a été stérile pour préserver les échantillons de toutes contaminations possibles, ces échantillons ont été transportés au laboratoire de microbiologie du centre universitaire Belhadj Bouchaïb d'Ain témouchent dans une glacière à une température de 4°C pour effectuer les analyses microbiologiques.

Des dilutions décimales ont été préparé (10^{-1} - 10^{-7}) à partir des solutions mer qui sont constituée d'une pesée de chaque échantillon (1g algues / 1g escargot / 1ml d'eau de mer) et de 9 ml de bouillon nutritif dans des tubes à vis stériles.

Trois milieux de culture sont préparés : GPYS pour isolement des fungi marin, Grein and mayers agar pour les actinomycètes, et Sea water agar pour l'isolement des souches totales.

D'après l'histogramme, 13 souches ont été trouvées dans les algues, 4 souches dans l'eau de mer, et 6 dans les mollusques. La comparaison de la charge microbienne totale présente dans les trois sites indique que les algues contiennent la plus forte concentration de microorganismes.

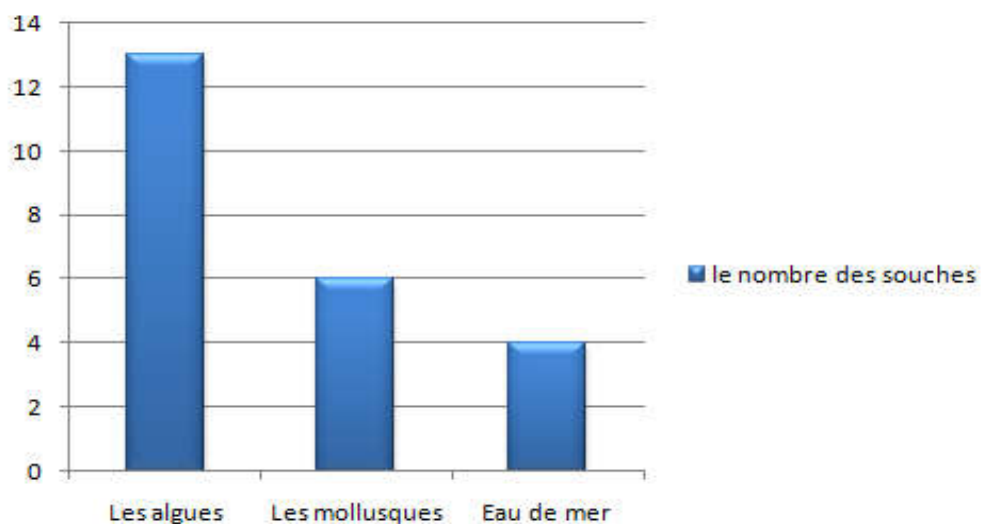


Figure 11: Nombre des souches isolées à partir des échantillons prélevés

II. Identification des souches obtenues :

II. 1. Aspect macroscopique des colonies :

L'observation macroscopique qui est effectuée par l'œil nu montre plusieurs types de colonies de différentes caractéristiques tels que la forme, la taille, la couleur, la consistance, le diamètre. Différents aspects macroscopiques inhabituels ont été observés sur les souches marines isolées, le tableau ci-dessous résume les formes, les couleurs et les consistances des colonies.



Figure 12 : L'observation macroscopique de la souche EM4

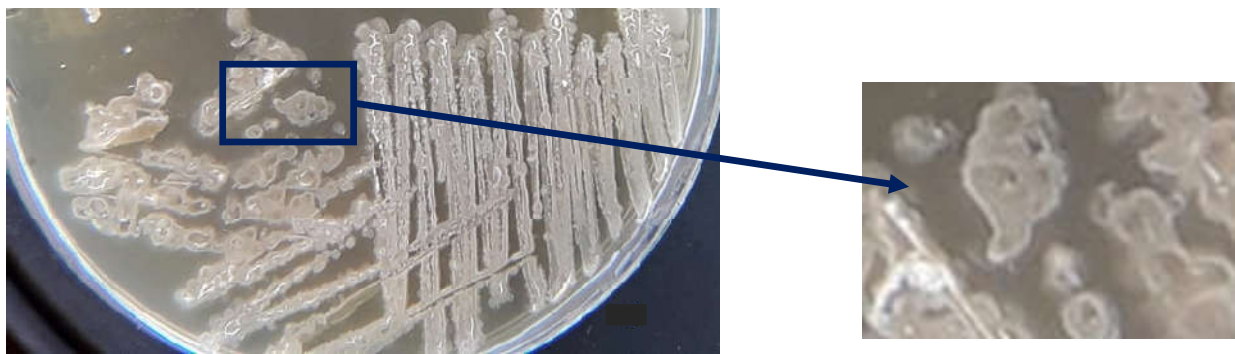


Figure 13 : L'observation macroscopique de la souche AV6

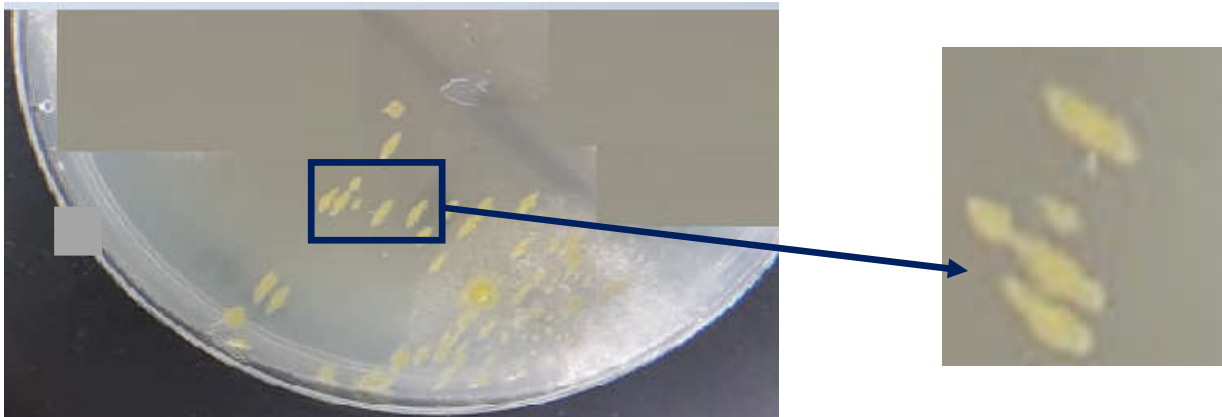


Figure 14: L'observation macroscopique de la souche AV1

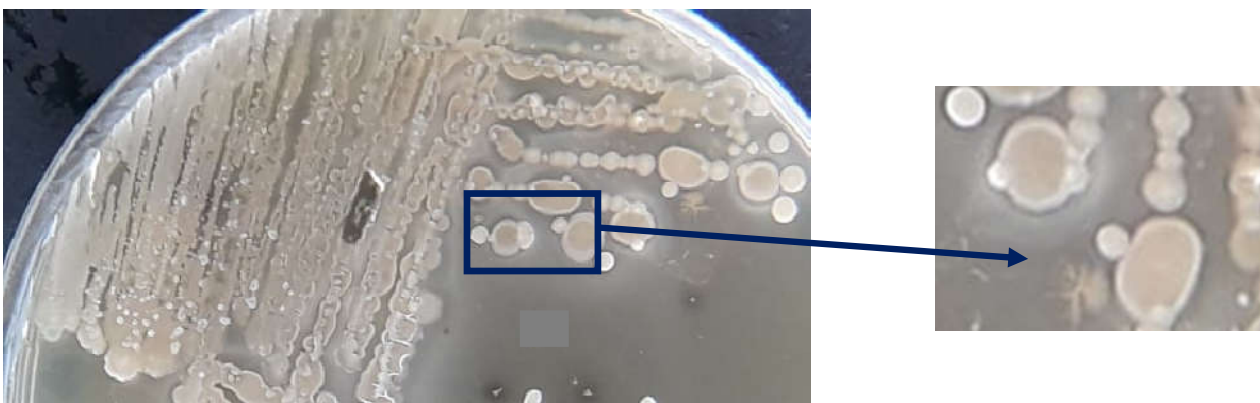


Figure 15: L'observation macroscopique de la souche ES3

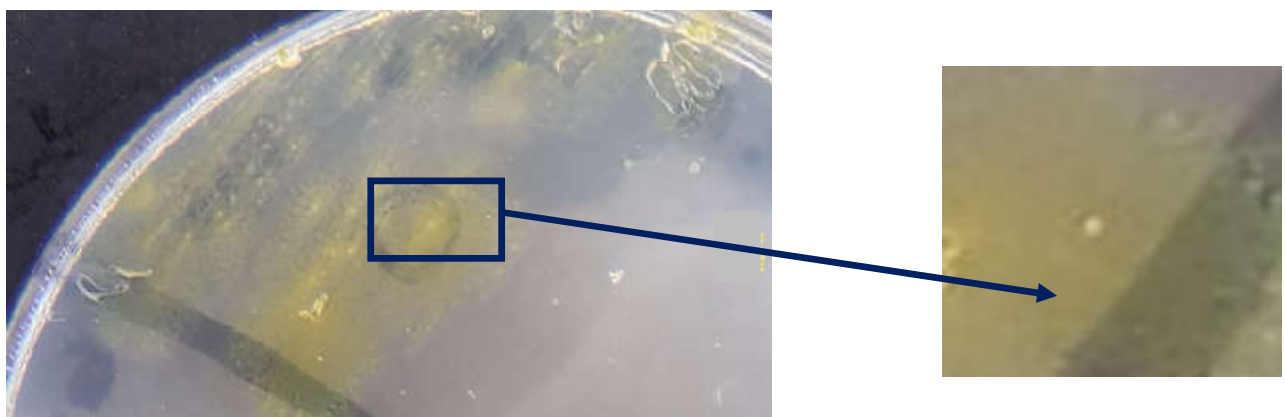


Figure 16: L'observation macroscopique de la souche AV3

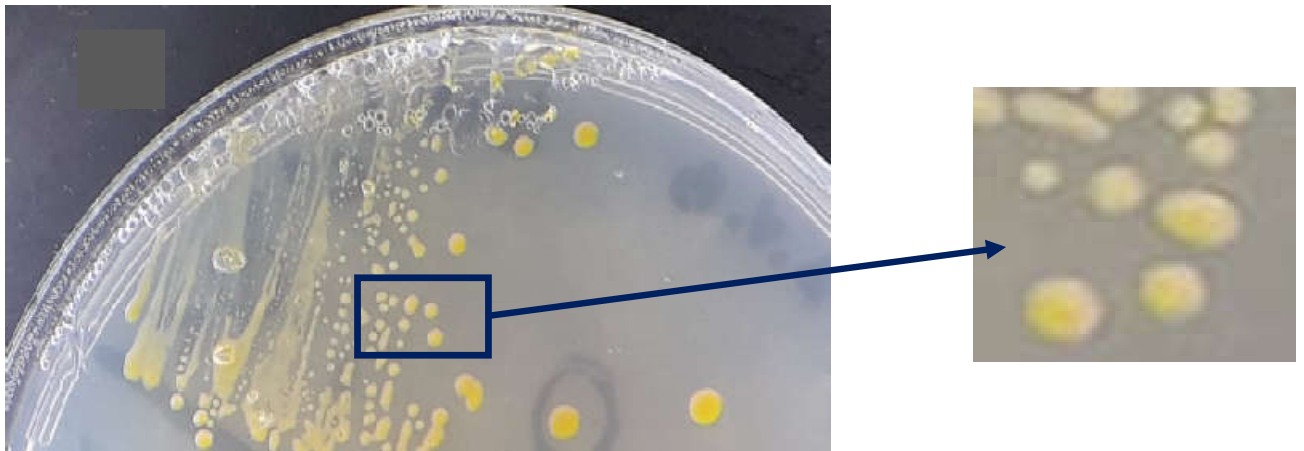


Figure 17: L'observation macroscopique de la souche AV2

Tableau 03: Résultats de l'observation macroscopiques

Les souches	Couleur	Forme	Consistance	Taille
AV1	Jaune	Fusifforme	Visqueuse	Petite
AV2	Jaune	Ronde	Visqueuse	Moyenne
AV3	Vert avec un noyau jaune dans le centre	Irrégulière	Dure	Grande
AV6	Transparente avec un anneau blanc	Irrégulière	Dure	Moyenne
AV7	Transparente avec un anneau blanc	Irrégulière	Visqueuse	Petite
AV10	Blanche	Ronde	Visqueuse	Très petites
ES1	Blanche	Punctiforme	Visqueuse	Très petite
ES3	Beige	Irrégulière	Visqueuse	Grande
EM1	Beige avec un anneau blanc	Irrégulière	Visqueuse	Grande
EM4	Beige	Irrégulière filamenteuse	Dure	Grande

II. 2. Aspect microscopique des colonies :

L'examen microscopique nous aide à observer la forme, la taille, le groupe de et le mode de regroupement est représenter soit en amas, en chainettes, ou même isolées.

La plupart des bactéries isolées observées ont présenté une paroi à Gram positive, elles ont des formes des cocci, des cocobacilles, des fine bacilles, et des gros bacilles.

Des spores sont observées dans les bactéries de formes bacillaires. Le tableau 02 présent l'observation microscopique de quelques bactéries.

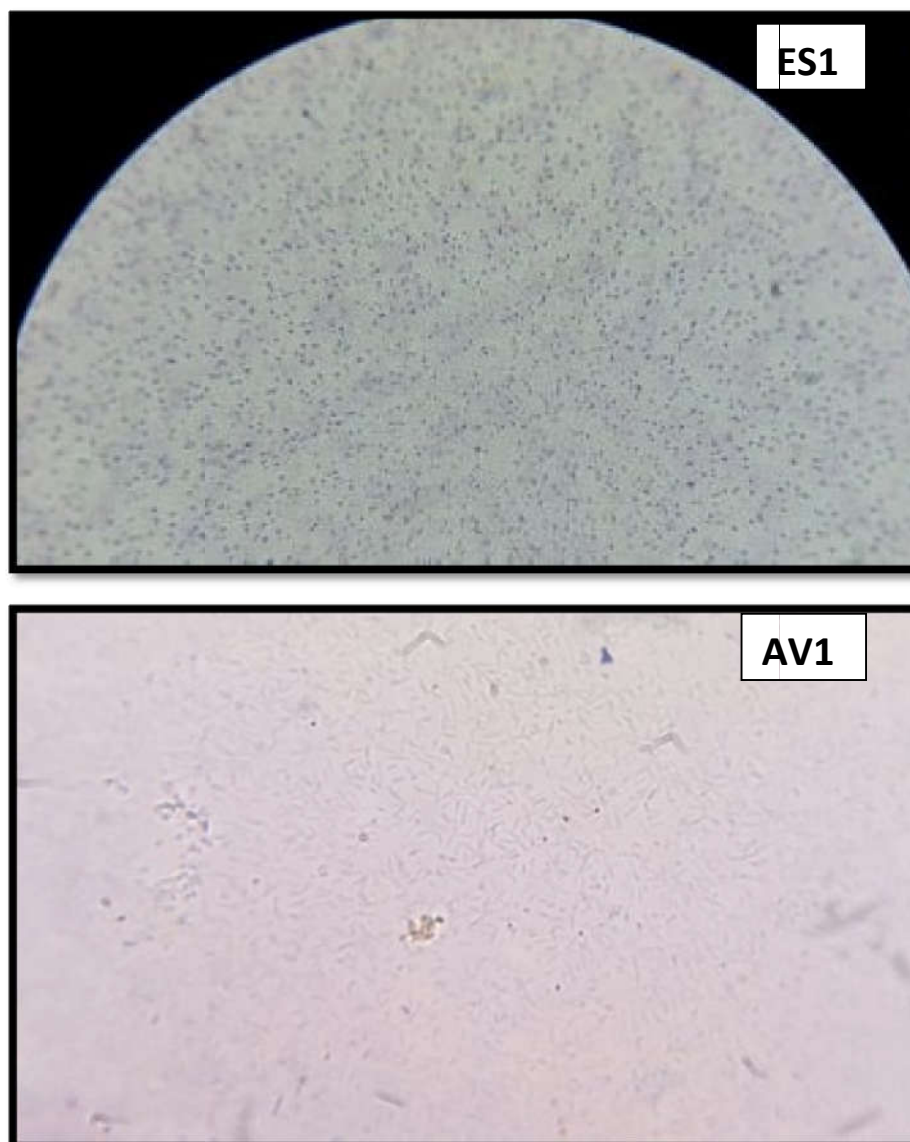




Figure 18: L'observation microscopique de quelques souches Gross 100x10

Tableau 04 : Résultats de la coloration de Gram

Les souches	Gram	Forme
AV1	-	Bacille très fine
AV2	+	Cocci
AV3	+	Cocobacille
AV6	+	Bacille
AV7	+	Cocci
AV8	+	Bacille
AV10	+	Cocobacille
AV11	-	Cocobacille
AV12	+	Cocobacille
AV13	+	Cocci
ES1	+	Cocobacille
EM1	+	Bacille
EM2	+	Bacille
EM4	+	Bacille

III. La recherche de l'activité antimicrobienne des souches isolées :

Deux méthodes sont utilisées pour la recherche de l'activité antimicrobienne des souches isolées contre les souches suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Serratia*, *klebsiella*, *Acinitobacter* et *Bacillus cereus*.

Différents résultats sont remarqués après l'incubation, La souche (ES1) a montré un grand pouvoir antimicrobien contre les souches *S. aureus*, *Serratia*, *klebsiella* et *B. cereus* avec des zones de sensibilité bien visible, alors que la souche *Acinitobacter* a présenté une résistance au pouvoir antimicrobien de la bactérie testée.

Les souches *Serratia* et *Acinitobacter* ont montrées leur sensibilité par mes agents antimicrobiens de la bactérie isolée (ES2), tandis que *S. aureus*, *klebsiella*, *B. cereus* sont considérées comme des souches résistantes à ES2.

Les souches isolées (AV1, AV2, AV9, AV11, AV13, EM3 et EM4) ne possèdent aucune activité antimicrobienne contre les souches de tests.

Les figures et le tableau ci-dessous montrent les différents résultats de la sensibilité aux substances antimicrobiennes des souches isolées.

Tableau 05 : Activité antimicrobienne de quelques souches isolée

Souches testées Souches isolées	<i>B. cereus</i>	<i>Acinitobacter</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Serratia</i>
ES1	++	-	+++	+	+
ES2	-	+++	-	-	+
ES5	+	++	-	-	-
ES6	+	++	-	-	-
AV8	-	-	+	-	-

- : Aucune activité antimicrobienne

+ : Faible activité

++ : Moyenne activité

+++ : Forte activité

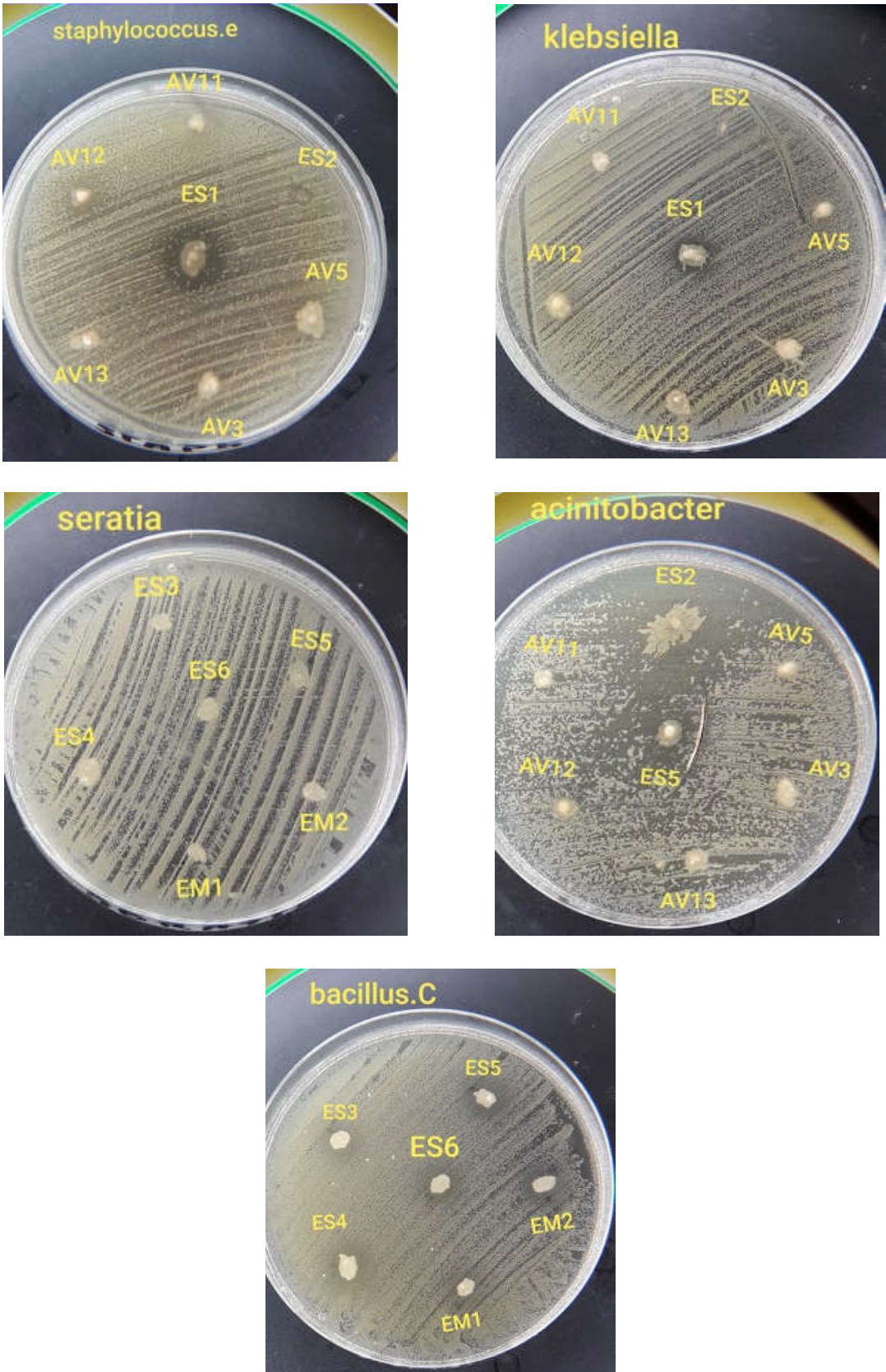


Figure 19: Activité antimicrobienne de quelques souches isolée

La deuxième méthode de la recherche de l'activité antimicrobienne des souches isolées a été effectuée par la méthode des puits.

Des zones d'inhibitions autour des puits contenant le surnageant de fermentation des souches isolées ont apparu après l'incubation, ce qui indique qu'il y a synthèse des substances bioactives contre les souches de tests.

Les souches ES1, ES2 et ES6 ont une activité antimicrobienne.



Figure 20: L'effet antimicrobien des souches par la méthode des puits.

IV. Mise en évidence de l'activité enzymatique des souches isolées :

IV.1. Test de catalase :

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram +. Après avoir immergé la colonie sur une goutte d'eau oxygénée, l'observation de résultat est instantanée par l'apparition de bulles et dégagement de gaz de dioxygène, les souches sont classées catalase positive.

Les souches EM1, AV7, AV10, et ES1 contiennent cette enzyme.

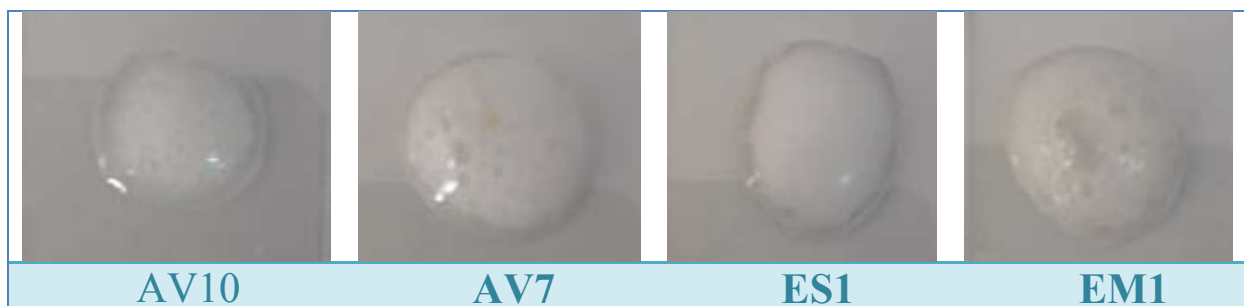


Figure 21: Résultats de test de catalase

IV.2. Recherche de l'amylase :

Sur la surface de la gélose nutritive additionnée d'une quantité de 1g d'amidon, un ensemencement en spots des souches isolées a été réalisé, Les boîtes de Pétri sont incubées à une température de 30°C pendant 24h

Après l'incubation les boîtes ont été recouvertes d'une solution de Lugol dilué.

Une réaction positive de l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**De VOS et al., 2009**).

Sept souches ont montré une activité amylolytique ce qui traduit par l'activité de l'enzyme amylase, en hydrolysant les molécules d'amidon en sucres simples (glucose)

La réaction de la dégradation de l'amidon :

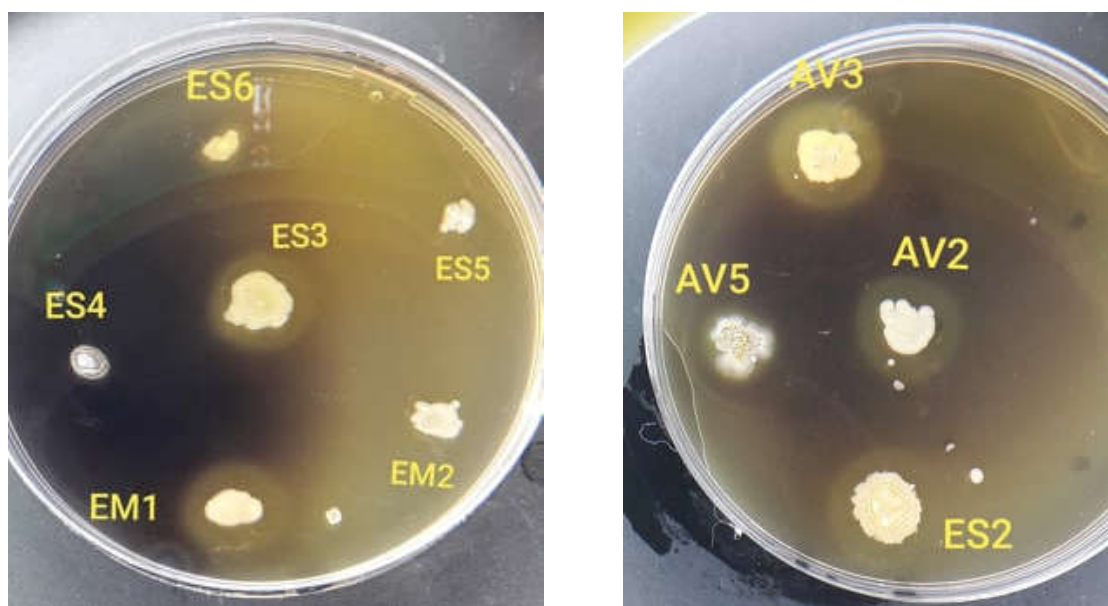


Figure 22: Résultats de test d'amylase

IV.3. Recherche de cellulase :

Cette activité a été testée sur une gélose additionnée de cellulose comme substrat, Le milieu a été coulé dans des boîtes de Pétri puis ensemencé en spots par la souche à tester, puis incubé à 30°C.

Après 24h, une solution de Lugol a été ajoutée, suivie d'un rinçage sur toutes les boîtes de Pétriensemencées. Cette activité cellulolytique se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour les colonies.

18 souches ont été apparaitre cellulase positives.

Réaction de la dégradation de la cellulose :

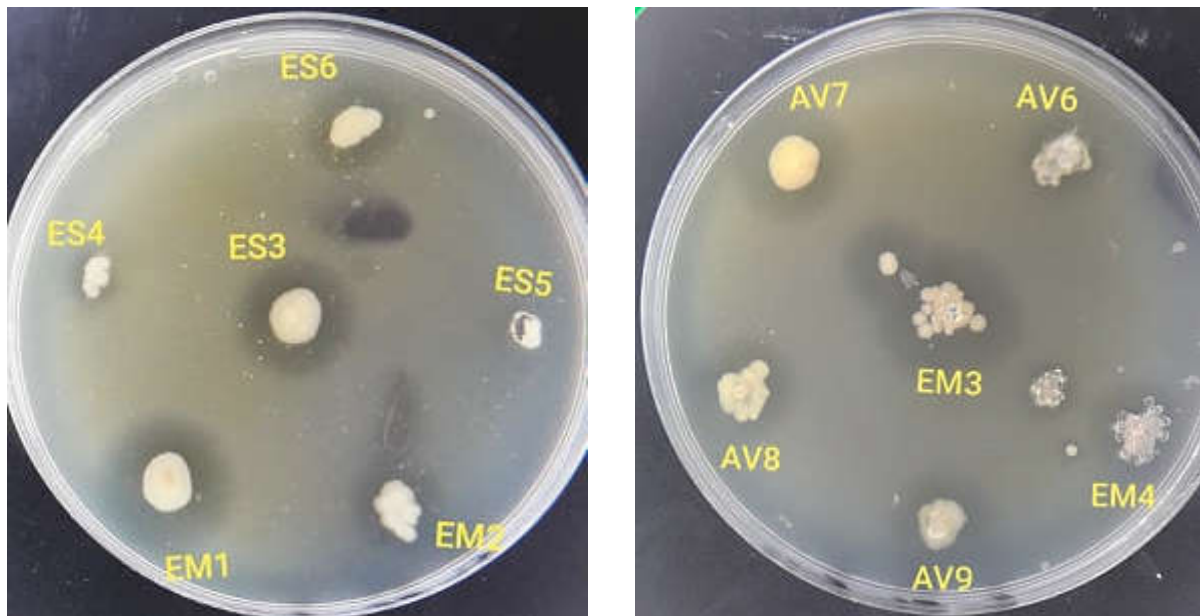
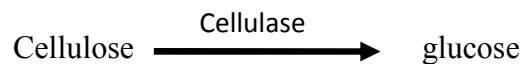


Figure 23: Résultats de test de cellulase

IV.4. Recherche de lipase :

Ce test a été réalisé sur une gélose additionnée de tween 80.

Un ensemencement en spots de nos souches isolées a été réalisé, et les boîtes de pétri ont été incubées à une température de 30°C. Le résultat positif indiqué par l'apparition d'un halo blanc perlé huileux et brillant. Se manifeste par l'apparition des petits points blancs autour des colonies.

Le premier résultat est lu après 2 jours, et le deuxième après 4 jours.

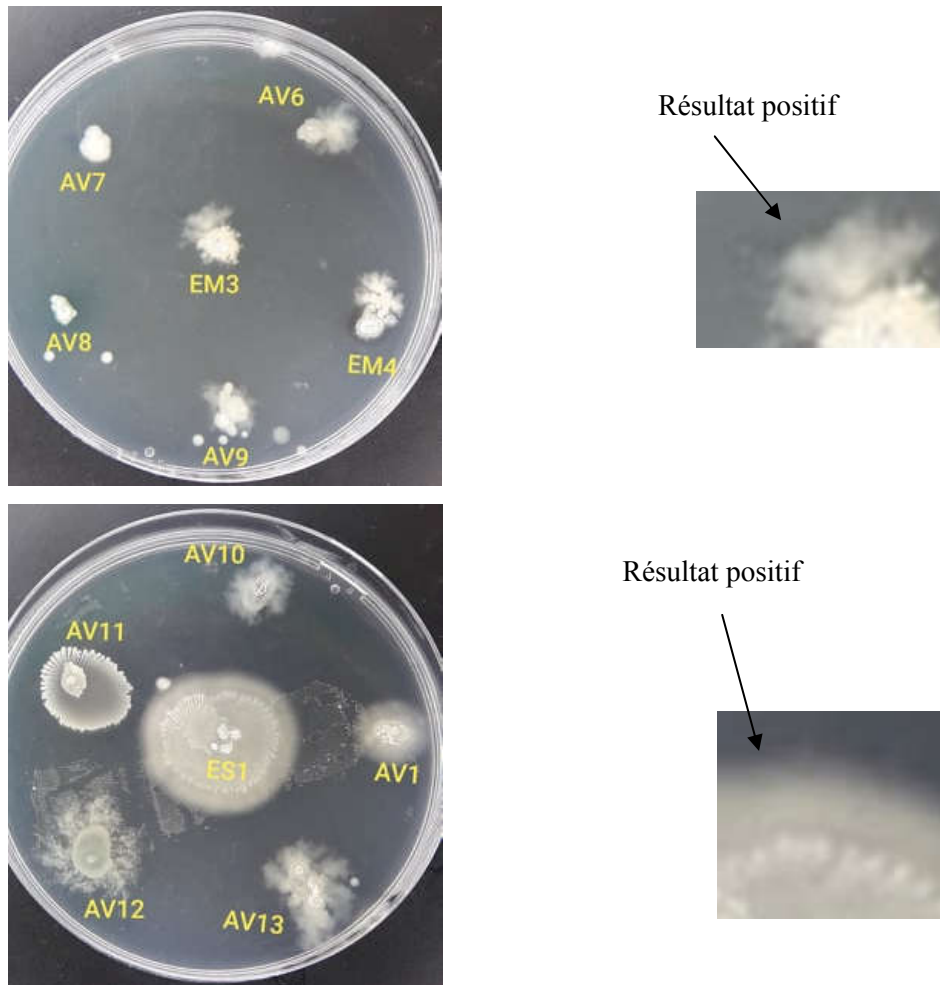


Figure 24: Résultats de test de lipase après 2 jours

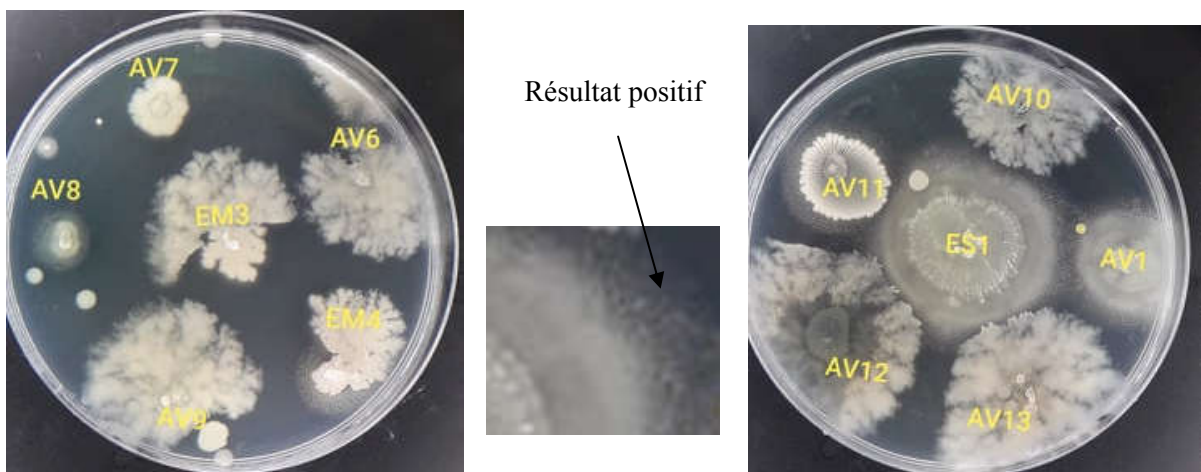


Figure 25: Résultats de test de lipase après 4 jours

IV.5. Recherche de Protéase :

Un ensemencement en strie de nos souches à tester a été réalisé sur la surface de la gélose nutritive additionné de 5 ml de lait écrémé stérile, ensuite Les boîtes de pétri ont été incubées à une température de 30°C. Cette activité se traduit par la présence d'un halo clair autour de la colonie, visible sans l'ajout d'aucun réactif.

13 souche ont été trouvées capables de produire des enzymes qui dégradent la protéine.

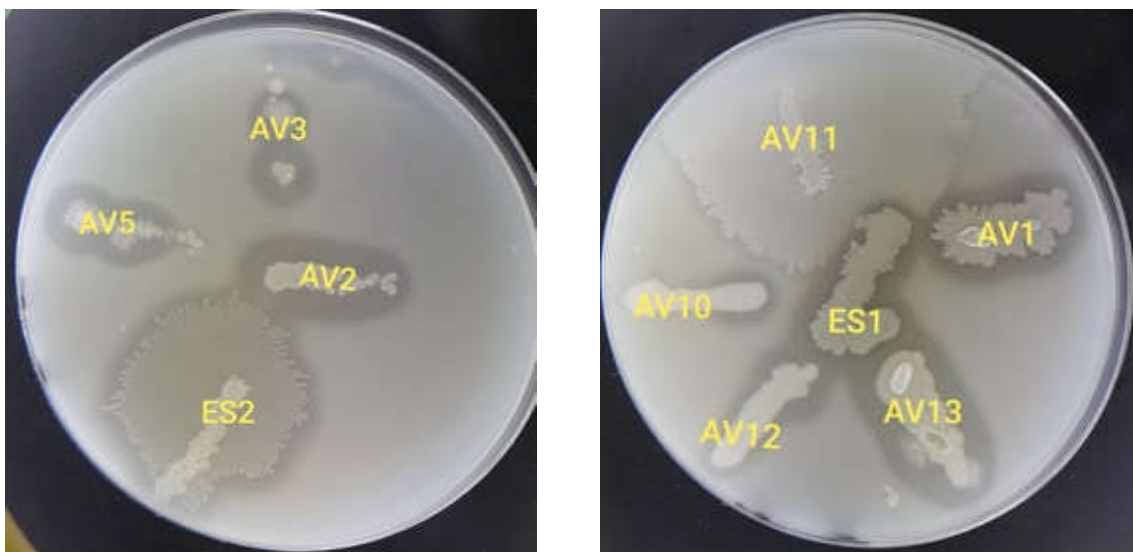


Figure 26: Résultats de test de protéase

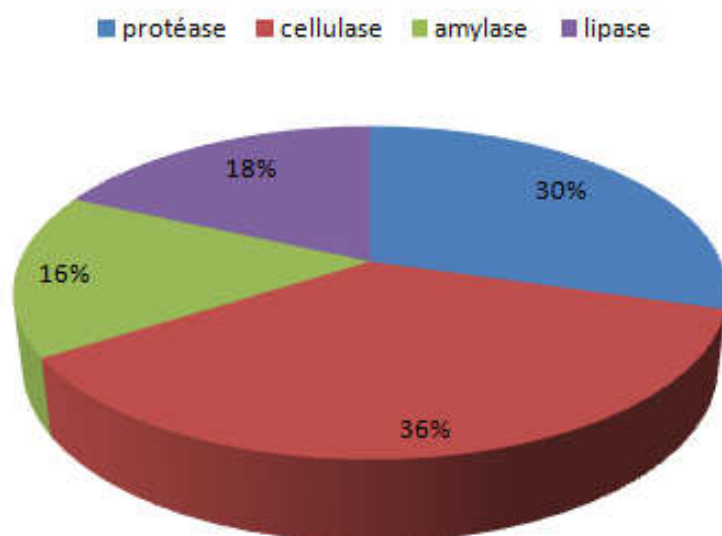


Figure 27: Résultats générale de l'activité enzymatique des souches isolées

V. La galerie API 20 E :

Le système API 20E est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques qui nous aide à l'identification des Enterobacteriaceae

Après incubation d'une durée de 24 H, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

La compilation des résultats de l'utilisation des substrats par la bactérie à identifier permet de déterminer un code de 7 chiffres (**Lyse V et Michel L., 2005**).

Partie II : Discussion

Notre étude consiste à faire une analyse microbiologique de l'eau de mer dans la côte de Béni-Saf. Elle est basée essentiellement sur la recherche des microorganismes dans l'eau de mer, les algues, et les mollusques.

Des résultats ont été obtenus après une longue série de méthode d'analyses que nous avons préalablement montrées (Chapitre II)

Après avoir analysé nos échantillons, des colonies bactériennes de différentes formes, tailles, et couleurs ont été obtenu,

Des petites colonies blanches (AV10), et d'autre de couleur jaune (AV1, AV2), des colonies orange de taille moyenne (AV13), des colonies transparentes avec un anneau blanc (AV7), et autre beige filamenteuse (AV11) ont été obtenu de l'analyse des algues.

Des grosses colonies irrégulières filamenteuses (EM4) ont été obtenues de l'analyse de l'eau de mer, par contre les prélèvements à partir des mollusques ont montrés des colonies très petites transparentes avec un anneau (ES5), et d'autre avec un centre blanc (ES4).

L'observation microscopique des souches isolées après avoir fait la coloration de Gram a montré que la majorité des bactéries sont des bacilles à Gram positif (ES3, AV9...).

Une étude montre que les cellules bactériennes à Gram négatif introduites dans l'eau de mer perdent leur capacité à former des colonies en peu de temps (**Xu et al, 1982**).

Par contre Yoshiro Okami et Takao Okazaki (1972) rapportent que parmi les isolats, des bactéries, en particulier des bactéries à Gram négatif, ont été observées plus abondantes que d'autres micro-organismes tels que les champignons et les levures. Aucun actinomycète n'a été isolé de la mer du Japon dans cette expérience.

La recherche de l'activité antimicrobienne par la méthode de spot a été montré que la souche (ES1) a un pouvoir antimicrobien sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Serratia*, *Klebsiella*, et *Bacillus cereus*, par contre *Acinetobacter* se manifeste résistante a cette activité, et on constate que (ES1) est la seul souche qui a un effet antimicrobien sur *Klebsiella*, et que cette dernière est résistante a toutes les autres souches.

Les résultats obtenus sont comparés et sont similaire avec les résultats de ROSENFELD et ZOBELL 1947 qui mettent en évidence la production d'agents antimicrobiens par des bactéries marine.

Dans les années 70, BURKHOLDER et ses collaborateurs purifient le premier antibiotique à partir d'une bactérie marine.

Yoshiro Okami et Takao Okazaki (1972) trouvent que plus de 20% des microorganismes marins parmi 123 souches ont montré une activité antimicrobienne.

Toutes les souches marines testées possèdent une ou plusieurs activités enzymatiques sauf la souche (ES5) qui n'a présentée aucune réaction, les zones obtenues et le pouvoir de production des enzymes se diffèrent d'une souche à l'autre.

La souche (ES1) qui a un grand pouvoir antimicrobien possède les enzymes cellulase, protéase, lipase, alors que la souche (EM1) possède la cellulase, la protéase et l'amylase.

Les souches (ES1, ES2, ES6, EM4) sont les seules choisies parmi toutes les autres, à raison de leur grand pouvoir enzymatique et antimicrobien.

Les analyses microbiologiques ont montré une absence totale des actinomycètes. Ce résultat est en accord avec Yoshiro Okami et Takao Okazaki car au cours de leur expérience, aucun actinomycète n'a été isolé de la mer du Japon, tandis que de nombreux actinomycètes ont été isolés par d'autres chercheurs de l'océan Atlantique nord et de l'océan Pacifique. **(Yoshiro O. Takao O, 1972)**

Par ailleurs, des espèces appartenant aux genres *Scenedesmus*, *Chlorella* ont un effet inhibiteur de *Bacillus cereus* et *Pseudomonas* tandis que d'autres espèces présentent des effets biocides vis-à-vis des coliformes et des *Salmonelles*. La cyanophytine des algues bleues est inhibitrice de certaines espèces des champignons et des levures pathogènes.

Conclusion

Conclusion

Les microorganismes peuplant les océans présentent une très grande diversité qui reste aujourd'hui encore mal connue. Parmi les organismes eucaryotes, on compte un grand nombre de groupes de microalgues, de champignons, ciliés et autres organismes hétérotrophes. Les procaryotes rassemblent quant à eux de nombreuses lignées de bactéries photosynthétiques, (photo)hétérotrophes et d'archées.

Notre travail s'est intéressé à l'étude des microorganismes présents dans l'eau de mer, et a porté sur une caractérisation (macroscopique, microscopique et biochimique) des différentes souches, ainsi qu'une mise en évidence de leurs effets antibactériens sur des souches référenciées (*Acinitobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Klebseilla*, *Bacillus cereus* et *Serratia*) et de leur aptitude à produire quelques enzymes tel que l'amylase, la cellulase, la protéase et la lipase.

Nos résultats ont démontré que :

- ✓ Les vingt trois (23) souches étudiées appartiennent aux différents genres.
- ✓ 65% de nos souches ont une activité antimicrobienne et la souche ES1 a présenté une grande activité antimicrobienne sur les souches cibles.
- ✓ La majorité des souches isolées ont montré des activités enzymatiques importantes et variées, ce qui démontre leur importance industrielle.
- ✓ La cellulase est l'enzyme, la plus produite par nos souches (36%) ; suivie par la protéase (30%) ; puis la lipase (18%). et dernièrement l'amylase (16%).
- ✓ 34% de nos souches ont dévoilé une production de trois (3) enzymes dans la même cellule.

Perspectives :

En perspectives pour cette étude, il est recommandé :

- D'identifier avec exactitude les souches, jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires plus approfondies.
- L'identification génétique des souches.
- D'étudier la production d'une enzyme potentiellement produite par nos souches telle l'amylase, lipase, protéase et cellulase pour cela il faut :
 - Optimiser les conditions de culture de la souche sélectionnée pour une bonne production enzymatique.
 - Et pourquoi ne pas extraire et purifier l'enzyme concernée.

Références

A

Aboul-Enein (2010). Purification and characterization of a novel thermoactive cellulase from thermophilic actinomycetes isolated from soil sample of Egypt. *Int. J. Academic Res.*, 2: 81 -86.

Alain A. et Roger K, 2004. **Hydrologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses** Quae, 336p.

Alberton LR, de Souza Vandenberghe LP, Assmann R, Fendrich RC, León JR and Soccol CR (2009). Xylanase production by *Streptomyces viridosporus* T7A in submerged and solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52: 171-180.

Arnaud Muller-Feuga: les microalgues marines; les enjeux de la recherches 1997

Arijit D, Sourav B, Naimisha RV and Rajan SS (2013). Improved Production and Purification of Pectinase from *Streptomyces sp.* GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India, *Inter. Res. J. Biol. Sci.* 2, pp 16-22.

C

Chance B., Sies H., Boveris A. 1979.Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews.*59: 527-605.

colonie (De VOS et al., 2009).

Cotta MA (1988) *Appl Environ Microbiol* 54, 772-776

D

Das et al., 2006 , S. Das , PS Lyla , SA Khan **Diversité microbienne marine et écologie: importance et perspectives d'avenir**, *Curr Sci* , 90 (2006) , pages 1325 – 1335

De Vos A., De Stobbeleir K et Meganck A. (2009). The relationship between career-related antecedents and graduates' anticipatory psychological contracts. *Journal of Business and Psychology*, 24(3), 289-298.

F

Fickers, P., Destain, J. et Thonart, P. 2008. Les lipases sont des hydrolases atypiques: principales caractéristiques et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 119-130.

G

Gauthier, M.J. (1982) Validation of the name *Alteromonas luteoviolacea*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **32**, 82-86.

Goodfellow M and O'Donnell AG (1989). Search and discovery of industrially significant actinomycetes. Proceeding of the 44th Symposium on Society for General Microbiology, (SCGM'89).Cambridge University Press, Cambridge.pp 343-383.

Goodfellow M and Williams ST (1983). Ecology of actinomycetes. -Ann. Rev. Microbial. 37.p 189-216.

Gomez RC, Semedo LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF and Coelho RR (2000). Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 30, 146-150.

Grein, A. &S. P. Meyers : Growth characteristic and antibiotic

Gribble, G.W. (1999) The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chemical Society Reviews* **28**, 335 - 346.

H

Hanefeld, U., Floss, H.G. and Laatsch, H. (1994) Biosynthesis of the marine antibiotic Pentabromopseudilin. 1. The benzene ring. *Journal of Organic Chemistry* **59**, 3604-3608.

HUOT A. 2010. Eau et santé. La revue Bio contact, n°200.

J

, **PR Jensen , TJ Hachoir , PG Williams , W. Fenical, 2005. Diversité marine actinomycètes et découverte de produits naturels,** Antonie Van, Leeuwenhoek , 87 (2005) , p. 43 – 48

K

KADER. A. J., OMAR. O., FENG. L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungi from the barrio highlands, Sarawak. University of Kebangsaan, Malaysia. Review of Biodiversity and Environmental Conservation.

Kim KJ, Yang YJ and Kim JG (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J. Biochem. Mol. Biol. 36(2), 185–189.

KORISH. M (2003). Production, Purification, Properties and Application of the Cellulase forma Wild Type Strain of a Yeast isolate. Faculty of Biology, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany.

Kuhad RC, Kapoor M and Rustagi R (2004). Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation, World J. Microbiol. Biotechnol. 20, pp 257–263.

L

Lam, 2006, KS Lam, Découverte de nouveaux métabolites à partir d'actinomycètes marins, Curr Opin Microbiol , 9 (2006) , p. 245 – 251

Legrand, P. Bourre, J.M. Descomps, B. Durand, G. Renaud, S. (2011). Lipides. In Martin, A. (éd.), AFSSA. (éd.). *Apports nutritionnels conseillés pour la population française (ANC)*. 3^{ème} éd. Paris : Lavoisier/Tec et doc, p. 63-82.

Lowell, F.M. (1966) The structure of a bromine rich antibiotic. *Journal of the American Chemical Society* **88**.

M

Mansour FA, Sherief AA, el-Dein MMN, Dora MIA and Ball AS (2003). Purification and characterisation of xylanase from a thermophilic *Streptomyces* sp. K37. Acta Microbiologica Polonica., 52: 159-172.

P

Patke D and Dey S (1998). Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SDP4. Lett Appl Microbiol 26, 171-174.

R

RAPINAT M, « L'eau », 1982, Presse universitaire de France. 1re édition.

Rathan RK and Ambili M (2011). Cellulase enzyme production by *Streptomyces sp.*

Ravikumar S, Inbaneson SJ, Uthiraselvam M, Priya SR, Ramu A and Banerjee MB (2011). Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. J Pharm Res ; 4 (1): 294-296.

Rice, EW, Allen, MJ, Brenner, DJ, Edberg, SC 1991 Dosage de la β -glucuronidase chez des espèces du genre *Escherichia coli* et application à l'analyse de l'eau de boisson. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 57, 592-593.

S

Syed DG, Agasar D and Pandey A (2009). Production and partial purification of α -amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 36, no.2, pp.189–194.

V

Verger R. (1985). Les enzymes lipolytiques. In Mouranche A. & Costes C. Hydrolases et dépolymérase. Enzymes d'intérêt industriel. Paris, Edition : Gauthier Villars. 313-329.

Vonothini G, Murigan M, Sivakumar K and Sudha S (2008). Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. Afr J Biotechnol 7, 3225-3230.

Vujaklija D, Schroder W and Abramic M (2002). A novel *Streptomyces* lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS (L)-lipase gene. Arch. Microbiol. 178(2), 124–30.

W

Les Références

2) **Weyland, H.** : Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. Nature 223 : 858, 1969

3) **Weyland, H.** : Studies on Actinomycetes of the sea benthos. Presented at the Ocean World- Joint Oceanographic Assembly, Tokyo, 1970

X

Xu, H. S., N. Robert, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, and R. R. Colwell. 1982. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. **8**:313–323.

Y

Yoshiro Okami and Takao Okazaki STUDIES ON MARINE MICROORGANISMS. ISOLATION FROM THE JAPAN SEA .Institute of Microbial Chemistry, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan. 1972.

Z

Zhou X, Huang J, Ou Z, Wang H and Wang R (2000). Conditions of enzyme production and properties of alkaline lipase by *Streptomyces* Z94-2. Wei Sheng Wu Xue Bao. 40, 75–79.

Les Annexes

Les annexes :

Annexe 1: Composition des milieux de culture:

Milieux d'identification

Sea water agar :

- ❖ Extrait de bœuf 10g
- ❖ Peptone 10g
- ❖ Agar 20g
- ❖ L'eau du robinet 250 ml
- ❖ Eau de mer 750ml

Dissoudre l'extrait de bœuf et la peptone en les chauffant dans de l'eau du robinet, ajuster le pH à 7,8 et faire bouillir pendant 10 min. réajusté le pH à 7,3. Ajouter la gélose et autoclave à 121 pendant 20 min. immédiatement après l'autoclavage, ajouter de l'eau de mer stérile tiède (55 ° C). Le milieu liquide sans agar doit être combiné une fois refroidi à la température ambiante.

L'eau de mer naturelle est conservée dans l'obscurité pendant au moins trois semaines pour "vieillir". Si de l'eau de mer naturelle n'est pas disponible, utilisez de l'eau de mer artificielle.

GPYS Medium :

- | | |
|------------------------|---------|
| ❖ Glucose | 1g |
| ❖ Peptone | 0.5g |
| ❖ Extrait de levures | 1g |
| ❖ Agar | 16g |
| ❖ Eau de mer naturelle | 1000 ml |
| ❖ Ph | 6 |

Grain and Meyers agar :

- | | |
|-------------------------------|---------|
| ❖ Amidon soluble | 10g |
| ❖ Caséine (dissous dans NaOH) | 1g |
| ❖ Agar | 15 g |
| ❖ Eau de mer filtrée | 1000ml |
| ❖ Ph | 7.0-7.5 |



Figure 30: le filtre utilisée dans la filtration de l'eau de mer

Bouillon nutritif :

- ❖ Peptone 10g
- ❖ Extrait de viande 4g
- ❖ NaCl 5g
- ❖ Eau distillée 1000ml
- ❖ pH 7,2
- ❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C

Gélose nutritive :

- ❖ Peptone 10g
- ❖ Extrait de viande 4g
- ❖ Na Cl 5g
- ❖ Agar 13g
- ❖ Eau distillée 1000ml
- ❖ pH 7,2
- ❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C

EMB (gélose éosine bleu de méthylène ou milieu de Lévine :

- ❖ peptone 10,0 g
- ❖ lactose 10,0 g
- ❖ éosine 0,4 g
- ❖ bleu de méthylène 0,0625 g
- ❖ hydrogénophosphate de potassium 2,0 g

❖ Eau distillée	1000ml
❖ agar	15,0 g
❖ pH	6,8

Milieu de base non sélectif pour la culture des bactéries (antibiogramme)

Muller Hinton :

❖ Infusion de viande de bœuf	300 mL
❖ Peptone de caséine	17,5g
❖ Amidon de maïs	1,5g
❖ Agar	17g
❖ Eau distillée	1000ml
❖ pH	7,4
❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C	

Milieux pour tests enzymatiques

La gélose au lait écrémé :

❖ Peptone	10 g
❖ NaCl	05 g
❖ Extrait de levure	03 g
❖ Agar	20 g
❖ Eau distillée	100 mL
❖ Lait écrémé stérile	5ml
❖ pH	7
❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C	

La gélose à la cellulose :

❖ KH ₂ PO ₄	0.5 g
❖ MgSO ₄	0.25 g
❖ Cellulose	2 g
❖ Gélatine	2g
❖ Agar	18g
❖ Eau distillée	1000ml

- ❖ PH 7
- ❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C

La gélose a amidon :

- ❖ Peptone 10 g
- ❖ NaCl 05 g
- ❖ Extrait de levure 03 g
- ❖ Agar 20 g
- ❖ Eau distillée 100 mL
- ❖ Amidon 1g
- ❖ pH 7
- ❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C

La Gélose au Tween 80 :

- ❖ Peptone 10g
- ❖ NaCl 5g
- ❖ CaCl 0.1g
- ❖ Agar 18g
- ❖ Tween 80 10ml
- ❖ Eau distillée 1000ml
- ❖ Ph 7.4
- ❖ Stérilisation 20 minutes à 120°C

N.B. l'ajustement du pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH ou d'une solution d'HCL.

NaOH : 10g de NaOH dans 250 ml d'eau distillée.

HCL : 200 ml d'HCL dans 16.40 ml d'eau distillée.

Annexe 2 : Les Colorants

Violet de Gentiane :

- ❖ Violet de Gentiane 1g
- ❖ Ethanol 10ml
- ❖ Phenol 2g

❖ Eau distillée 100 ml

La solution de lugol :

❖ iodure de potassium 2g
 ❖ Iode métalloïde I₂ 1g
 ❖ Eau distillée 100ml

La solution de fuchsine :

❖ Fuchsine basique 10g
 ❖ Phénol 50g
 ❖ Ethanol 100 ml
 ❖ Eau distillé 1 L

Annexe 3 : les tableaux

Tableau 06: l'activité antimicrobienne des souches marines sur les souches de références testé

Les souches	Bacillus.c	acinitobacter	Staphylococcus.e	klebsiella	seratia
AV1	-	-	-	-	-
ES1	++	-	+++	+	+
AV2	-	-	-	-	-
AV3	+	-	-	-	-
AV5	+	-	-	-	-
ES2	-	+++	-	-	+
ES3	+	-	-	-	-
ES4	+	-	-	-	-
EM1	+	-	-	-	-
EM2	+	-	-	-	-
ES5	+	++	-	-	-
ES6	+	++	-	-	-
AV6	+	-	-	-	-
AV7	+	-	-	-	-
AV8	-	-	+	-	-
AV9	-	-	-	-	-
EM3	-	-	-	-	-
EM4	-	-	-	-	-
AV10	-	++	-	-	-
AV11	-	-	-	-	-
AV12	-	-	+	-	-
AV13	-	-	-	-	-

Tableau 07 : l'activité enzymatique des souches marines

Les souches	protéase	cellulase	amylase	lipase
AV1	++	-	-	++
ES1	++	++	-	++
AV2	+++	-	+	+++
AV3	++	+	+	-
AV5	++	-	-	+
ES2	-	+	+	-
ES3	+	++	+	-
ES4	-	-	-	++
EM1	++	+++	+	-
EM2	-	+	-	-
ES5	-	-	-	-
ES6	-	+	-	-
AV6	-	+	-	-
AV7	+	++	+	-
AV8	+	++	-	+
AV9	-	+	-	-
EM3	+++	+++	-	-
EM4	-	+	+	+
AV10	+	-	-	+
AV11	-	++	-	-
AV12	+	+	-	-
AV13	++	+++	-	-

Tableau 08 : Résultat de la coloration de Gram

Les souches	Gram	Forme
AV1	-	Bacille
ES1	+	Cocobacille
AV2	+	Cocci
AV3	+	Cocobacille
AV5	-	Bacille très fine
ES2	+	Cocci
ES3	+	Bacille
ES4	+	Bacille
EM1	+	Bacille
EM2	+	Bacille
ES5	+	Bacille
ES6	+	Cocobacille
AV6	+	Bacille
AV7	+	Cocci
AV8	+	Bacille
AV9	+	Bacille
EM3	+	Bacille
EM4	+	Bacille
AV10	+	Cocobacille
AV11	-	Cocobacille
AV12	+	Cocobacille
AV13	+	Cocci

Annexe 04 : les figures

Figure 31: L'effet antimicrobien par la méthode des spots

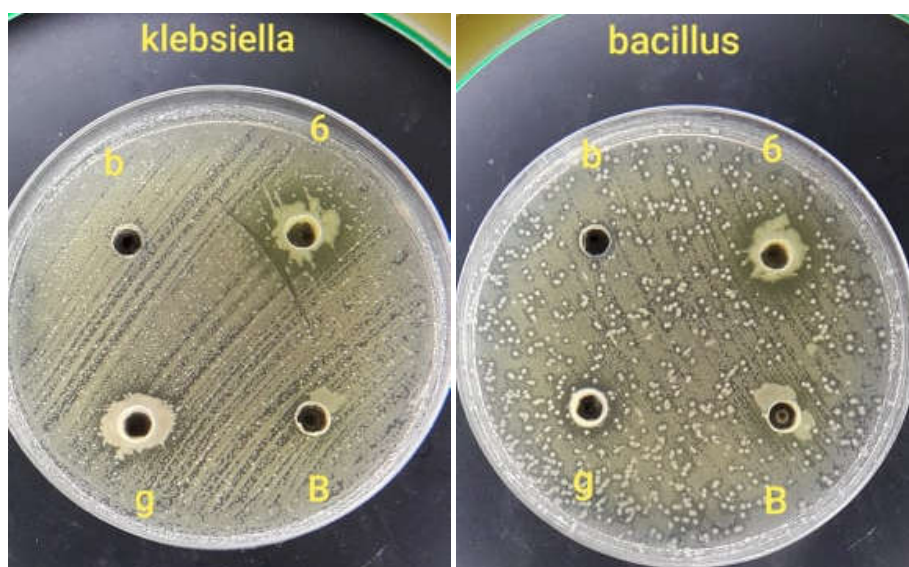
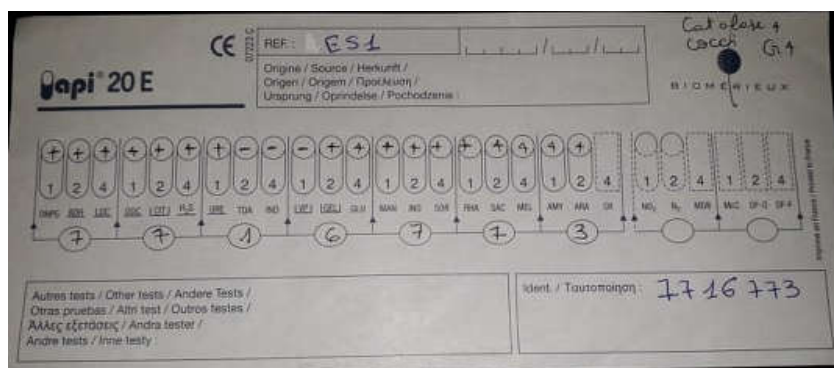
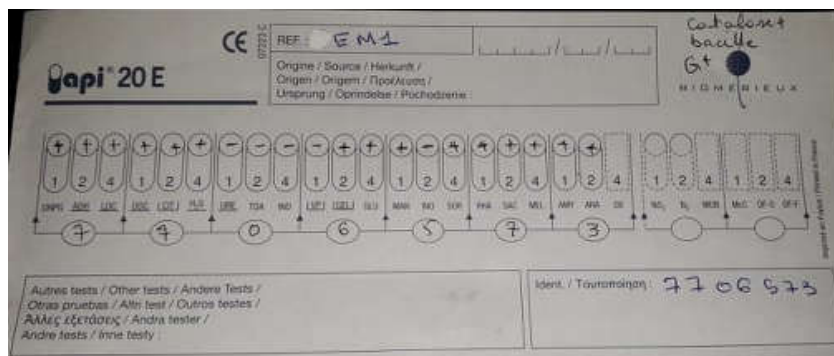
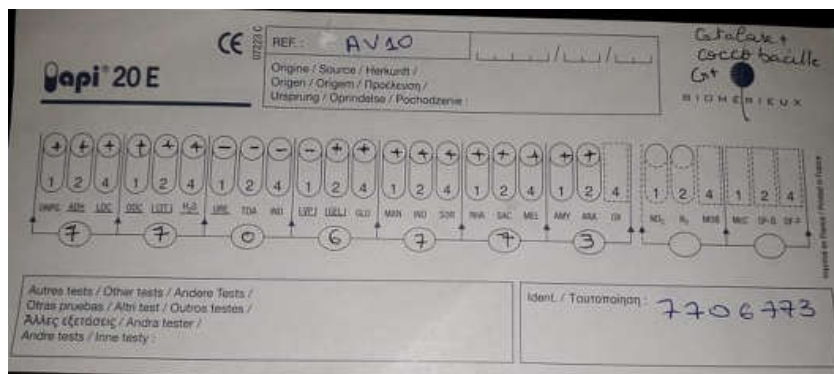
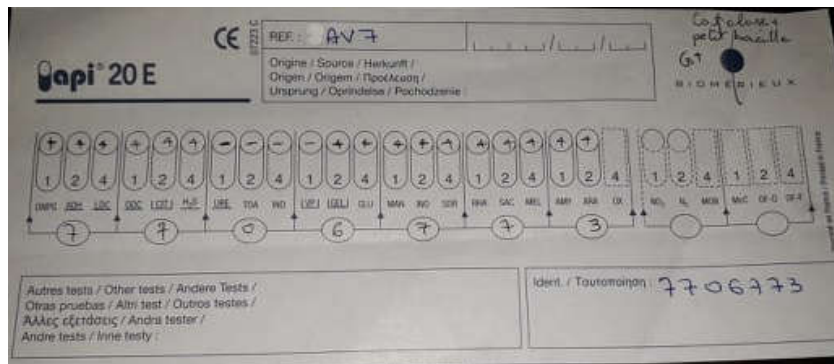


Figure 32: résultats de la galerie API 20 E :



Résumé

Les microorganismes marins représentent la plus grande partie des êtres vivants dans les espaces aquatiques. Les applications des microorganismes marins sont nombreuses, dans les domaines pharmaceutique et parapharmaceutique, l'agro-alimentaire, et de l'énergie (biocarburants).

Notre travail est basé sur l'isolement et l'étude des souches marines à partir de différents sites de la côte de Beni Saf. Une identification des souches isolées ainsi qu'une mise en évidence de leurs pouvoirs antibactérien et enzymatique (amylolytique, cellulolytique, lipolytique et protéolytique) ont été effectués. Les résultats ont démontré que 65% des souches isolées ont une activité antimicrobienne remarquable vis-à-vis des souches pathogènes cibles, et la majorité ont des activités enzymatiques importantes et variées, ce qui les classe comme des microorganismes à intérêt industriel. La cellulase est l'enzyme, la plus abondante avec un moyen de (36%) des souches isolées ; suivie par la protéase (30%) ; puis la lipase (18%). et dernièrement l'amylase (16%), 34% de nos souches possèdent trois (3) enzymes dans la même cellule.

Mots clés : Eau de mer, Microorganismes marines, Activité antibactérien, Activité enzymatique.

Abstract

Marine microorganisms represent the largest part of living things in aquatic spaces. The applications of marine microorganisms are numerous, in the fields of pharmaceutical and parapharmaceutical, agro-food, and energy (biofuels).

Our works based on the isolation and study of strains from different sites on the Beni Saf coast. An identification of isolated strains and their antibacterial and enzymatic activities (amylolytic, cellulolytic, lipolytic and proteolytic) were purchased. The results reached that 65% of the isolated strains have a remarkable antimicrobial activity against the target pathogenic strains, and the majority have important and varied enzymatic activities, which corresponds to the class of microorganisms of industrial interest. Cellulase is the most abundant enzyme, with a rate of (36%) of the isolated strains; followed by protease (30%); then lipase (18%). and recently amylase (16%), 34% of our strains have three (3) enzymes in the same cell.

Key words: Seawater, Marine microorganisms, Antibacterial activity, Enzymatic activity.

الملخص:

الكائنات الحية الدقيقة البحرية (البكتيريا والطحالب الدقيقة) تمثل الجزء الأكبر من الحياة في المحيطات، تطبيقات الكائنات الحية البحرية متعددة. يمكن للموارد البحرية بالفعل استخدامها في مستحضرات التجميل (الكريمات، العلاج بمياه البحر، وما إلى ذلك) وفي صناعة الأغذية (المكملات الغذائية، والأسمدة، وما إلى ذلك) ولكن أيضا في قطاع الطاقة (وخاصة الوقود الحيوي). أو الصيدلة.

ركز عملنا على دراسة السلالات البحرية وركز على تحديد المورفولوجية الظاهرية والمجهريّة بالإضافة إلى دراسة آثارها المضادة للبكتيريا وقدرتها على إنتاج بعض الإنزيمات: الأميلاز، السليلاز، الليباز و البروتياز. أظهرت نتائجنا أن 65% من سلالاتنا لها نشاط مضاد للميكروبات، وأظهرت غالبية السلالات المنعزلة نشاطاً إنزيمياً كبيراً ومتنوعاً، مما يدل على أهميتها الصناعية، ويعتبر السليلاز أكثر الأنزيمات التي تنتجها سلالاتنا (36%)؛ تليها البروتياز (30%)؛ ثم الليباز (18%). ومؤخراً الأميلاز (16%)، كشفت 34% من سلالاتنا عن إنتاج ثلاثة (3) إنزيمات في نفس الخلية.

الكلمات المفتاحية: ماء البحر، الكائنات الحية الدقيقة البحرية، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط الأنزيمي.