

---

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



Institut des Sciences

Département de science de la nature et de la vie

## Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Melle : HADJ KADDOUR Imane

Mme : BENAZIZA Asma

---

### **Effet de Sources de Carbone et d'Azote Sur la Croissance et le Spectre Antimicrobien de *Bacillus spp.***

---

Encadrant :

Mr. CHERIF Nadjib

Maitre de Conférences « B » au C.U.B.B.A.T

Soutenu le 20/09/2020

Devant le jury composé de :

---

Président : Mr. BOUAMRA Mohamed (MCA)	CUBBAT
Examineur : Mr. MOUEDDEN Riad Nesr eddin (MAA)	CUBBAT
Encadrant : Mr. CHERIF Nadjib (MCB)	CUBBAT

---

# *Remerciement*

Avant tout, Nous tenons d'abord à remercier ALLAH le tout puissant qui nous a donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail dans ces conditions difficiles de confinement.

Notre plus grande gratitude va à notre encadrant Mr. CHERIF NADJIB (MCB) pour l'orientation, nous le remercions pour sa gentillesse, son soutien et pour le fait de nous avoir fait partager son expérience. Sa disponibilité, et leur suivi lors de la mise en œuvre du pratique en laboratoire de microbiologie. On le remercie pour ses conseils dans l'orientation de ce travail, ainsi que pour son soutien moral.

Nous tenons à remercier messieurs les membres de jury Mr. BENNABI FARID (MCB) et Mr. BOUAMRA MOHAMED (MCB) pour l'honneur qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail, également pour leur conseils et remarques qu'ils nous adresseront afin d'améliorer notre recherche.

Merci à toutes les personnes du laboratoire de microbiologie du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Centre Universitaire Belhadj Bouchaib - Ain Témouchent pour leur accueil, leur soutient et leur aide.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

Avant tous Je rends grâce à Dieu tout puissant pour sa miséricorde, sans lui rien n'aurait été possible.

Je dédie affectueusement ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leurs sacrifices, encouragements et leurs patiences durant toutes mes années d'étude pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui.

Ma mère, mon père, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les efforts et soutiens que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, bien que je ne vous en acquitte jamais assez que dieu vous procure bonne santé et bonheur.

Mon cher frère, MOHAMED : Je ne pourrai pas oublier, même si pour un instant, tous les sacrifices et l'aide que vous m'avez apportés tout au long de mes études, sans lesquels je n'aurais pas surmonté toutes les difficultés que j'ai traversées, que dieu vous garde et vous protège, et que votre chemin soit plein de succès.

Ma chère grande sœur, MOKHTARIA : Tous les mots de remerciements et de gratitude pour votre soutien particulier, qui m'a permis de mener à bien ce travail dans des conditions confortables et favorables à la recherche scientifique.

A mes sœurs : HADJER et SOUMIA, Ma petite belle adorable et douce ROUAA.

À ma collègue ASSMA pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons passé ensemble.

Je remercie chaleureusement mes très chères amies : HAFIDA, WAFAA, SOUMIA, IMANE, KAWTAR, pour leur aide et leur soutien, avec qui j'ai partagé des moments forts, je leur souhaite, à toutes, bonne continuation et beaucoup de réussite.

A tous ceux que j'aime.

***IMANE***

## *Dédicace*

Avant tout, nos sincères remerciements reviennent à ALLAH le tout puissant pour tous ses dons.

A ma Mère BELMAHI Houaria, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir, tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte

En témoignage, je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et l'affection dont tu m'as toujours entourée.

A mon Père Yazid, l'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

A mon cher Mari, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts, les sacrifices et l'encouragement que je n'ai jamais cessé de consentir pour mon bien-être.

A mes chères adorables Sœurs : Kaouter, Fatima Zohra, Zineb, Maroua et Safaa

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A ma belle-mère et mon beau-père, puisse Dieu le très haut vous accorder la santé, bonheur et longue vie.

A mon grand-père et mes grand-mères ainsi qu'à tout membre de ma famille petit et grand.

A ma belle-sœur et mon beau-frère, je vous souhaite une belle vie plein de réussite.

A ma camarade Imane, merci pour votre aide dans les moments critiques et l'amitié qui nous a rassemblées durant un temps précieux.

A tous mes amies et les personnes que j'aime.

*Asma*

# ***TABLE DES MATIERES***

## **Liste des tableaux**

## **Liste des figures**

## **Liste des abréviations**

Introduction.....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
I. Définition du sol .....	3
II. Les bactéries du sol.....	3
III. Le genre <i>Bacillus</i> .....	4
III.1. Morphologie .....	4
III.2. Phénotype .....	4
III.3. Environnement .....	5
III.4. Génétique .....	5
III.5. Taxonomie.....	5
IV. Utilisation des <i>Bacillus</i> .....	7
V. Intérêt biologique du genre <i>Bacillus</i> .....	9
VI. Exigences et croissance du genre <i>Bacillus</i> .....	9
VII. La résistance du genre <i>Bacillus</i> .....	10
VIII. Le spectre antimicrobien de <i>Bacillus</i> .....	10
IX. Production des antibiotiques par <i>Bacillus</i> .....	10
X. Effet antibiotique du genre <i>Bacillus</i> sur les microorganismes .....	11
XI. Effets des conditions physico-chimiques sur la production des antibiotiques par <i>Bacillus</i> .....	12
XI.1. Le pH.....	12
XI.2. La température .....	12
XI.3. Agitation et aération.....	12

XII. La matière organique du sol .....	12
XIII. Fonction de la matière organique dans le sol .....	13
XIV. La biodégradation de la matière organique en tant que source de nutriments .....	13
XV. Le carbone dans le sol .....	13
XV.1. Sources de carbone .....	14
XVI. L'azote dans le sol.....	14
XVII. Effet de source de carbone et d'azote sur la croissance .....	15
XVII.1. Effet de source de carbone sur la croissance .....	15
XVII.2. Effet de source d'azote sur la croissance .....	16
<b>Matériels et méthodes</b>	
I. Zones de prélèvement et échantillonnage .....	17
I.1. Zones de prélèvement .....	17
II. Echantillonnage .....	19
III. Isolement et purification.....	20
III.1. Préparation des dilutions .....	20
III.2. Ensemencement et purification .....	20
III.3. Isolement des souches de <i>Bacillus</i> .....	21
IV. Identification morphologique et vérification de la pureté des isolats .....	21
IV.1. Observation macroscopique .....	21
IV.2. Observation microscopique.....	22
IV.3. Repiquage et purification des isolats .....	22
V. Effet antibiotique des souches isolées .....	22
V.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	22
V.1.1. Préparation de l'inoculum.....	23
V.1.2. Préparation des surnageants .....	23
V.1.2.1. La fermentation .....	23
V.1.3. Préparation de suspensions bactériennes cibles .....	24

V.1.4. Ensemencement par la méthode des puits .....	25
VI. Conservation des souches .....	26
VII. Effet de sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques chez <i>Bacillus spp</i> .....	27
VII.1. Préparation de l'inoculum .....	27
VII.2. Préparation des précultures .....	27
VII.3. Préparation des germes-cibles .....	28
VII.4. Mesure de l'activité antimicrobienne .....	28
<b>Résultats et discussions</b>	
I. Echantillonnage.....	30
II. Traitement thermique .....	32
III. Isolement des souches .....	32
IV. Identification des souches de <i>Bacillus</i> isolées .....	33
IV.1. Aspect macroscopique des colonies :.....	33
IV.2. Etude microscopique des colonies : .....	34
V. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne .....	35
V.1. Production des substances antimicrobiennes .....	36
V.2. Antibiogramme.....	36
VI. Effet de sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques chez <i>Bacillus spp</i> .....	38
Conclusion.....	46

## **Références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumés**

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> La classification taxonomique du genre <i>Bacillus</i> à la base de la morphologie et la spore. ....	6
<b>Tableau 2:</b> Certaines utilisations pour quelques espèces de <i>Bacillus</i> . ....	8
<b>Tableau 3:</b> Symboles des échantillons. ....	32
<b>Tableau 4:</b> Codes des isolats et leurs nombres. ....	33
<b>Tableau 5:</b> Présentation de différents aspects macroscopique des souches isolées. ....	33
<b>Tableau 6:</b> Présentation des résultats de l'antibiogramme des souches de <i>Bacillus</i> spp. ....	37
<b>Tableau 7:</b> Illustration du nombre des souches selon les caractères culturels et morphologiques des isolats du sol. ....	42
<b>Tableau 8:</b> Caractères culturels et morphologiques des isolats du sol.	
<b>Tableau 9:</b> Quelques aspects des colonies isolée à partir des échantillons du sol sur GN.	



# *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Localisation de la commune de BENI SAF (Googale Maps, 2020).....	17
<b>Figure 2:</b> Localisation de la commune de REMCHI (Googale Maps, 2020).....	19
<b>Figure 3:</b> Prélèvements effectués à partir du sol. ....	20
<b>Figure 4:</b> Schéma de la préparation des dilutions décimales à partir du sol. ....	20
<b>Figure 5:</b> Description des étapes de traitement thermique des souches de <i>Bacillus</i> spp.....	21
<b>Figure 6:</b> Présentation des étapes d'ensemencement et purification des souches. ....	21
<b>Figure 7:</b> Présentation de la préparation de l'inoculum. ....	23
<b>Figure 8:</b> Schématisation des étapes de préparation des surnageants par la fermentation.....	24
<b>Figure 9:</b> Présentation des étapes de préparation des suspensions bactériennes pathogènes..	25
<b>Figure 10:</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.....	26
<b>Figure 11:</b> Schématisation des étapes de la conservation des souches. ....	26
<b>Figure 12:</b> Schéma de protocole des production des antibiotiques des souches de <i>Bacillus</i> en milieu liquide.....	29
<b>Figure 13:</b> Aspect macroscopique des prélèvements effectuées de couleurs différentes.....	30
<b>Figure 14:</b> Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués. ....	31
<b>Figure 15:</b> Nombre des souches obtenus de chaque type de sol après le traitement thermique. ....	32
<b>Figure 16:</b> Présentation des différents aspects macroscopique des colonies après 48h d'incubation à 37°C sur GN.....	34
<b>Figure 17:</b> Observation microscopique des souches P3, L2, O2, J3, F1, C1, S1, E2, B1, G1, après une coloration de Gram (Gross 100*10).....	35
<b>Figure 18:</b> Effet de l'activité antimicrobien des six souches de <i>Bacillus</i> ensemercer par la méthode des puits vis à vis <i>Escherichia coli</i> : M1, K1, K2, L2, N2, N1.....	36
<b>Figure 19:</b> Diamètre des zones d'inhibition après la mise en évidence de l'activité antimicrobien du <i>Bacillus</i> spp. ....	37
<b>Figure 20:</b> Schéma représentative d'une boîte de Pétri contient le milieu MH ensemencé par la méthode des puits. ....	39

# *Liste des abréviations*

**C°** : température

**h** : heure

**spp**: espèce non précisée

**gross** : grossissement

**ZI** : zone d'inhibition

**mm** : millimètre

**g** : gramme

**l** : litre

**pH** : potentiel hydrogène

**mn** : minute

**LB** : Lysogeny Broth

**GN** : Gélose nutritive

**MH** : Mueller Hinton

**AND**: Acide désoxyribonucléique

**CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de Carbone

**B** : Bacillus

**E**: Escherichia

**C**: Carbone

**Da** : Dalton

**UV**: Ultraviolet

**G+C**: coefficient de Chargaff

**nm**: nanomètre

**rpm**: rotation par minute

**tr** : tour

**DO** : densité optique

**ARN** : Acide ribonucléique

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** : Ammonium

# *Introduction*

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et à ce titre, c'est un réservoir majeur de la diversité microbienne, ils abritent des communautés vivantes qui dépassent nos capacités de perception, par leur taille microscopique, mais aussi par leur incroyable foisonnement. Il existe plusieurs milliards de bactéries qui coexistent dans un gramme de sol sous nos pieds (**Faugier, 2010**).

Parmi Les genres bactériennes les plus abondantes et les plus communément isolés sont les *Bacillus spp* (**Noumeur, 2008**), qui sont largement distribués dans la nature et présentes dans diverses conditions environnementales, Ils constituent l'un des principaux groupes de population des bactéries du sol qui sont très largement répandus dans les couches aérobies (**Foysal et Lisa, 2018**).

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont des bactéries Gram-positives, sporulées, en forme de bâtonnets et mobiles. Ces organismes se trouvent généralement dans la matière organique en décomposition, elles survie à long terme dans différentes conditions difficiles est attribuée à la production d'endospores par le développement simple et rapide de différentes formulations fiables (**Foysal et Lisa, 2018**).

Les espèces de *Bacillus* sont connues pour la synthèse de nombreuses métabolites secondaires telle que les antibiotiques, avec une diversité remarquable tant en structure qu'en fonction et sont fortement actifs contre une variété de micro-organismes (**Amin et al., 2012**), ils sont utilisés dans de nombreux processus médicaux, pharmaceutiques, agricoles et industriels qui tirent parti de leur large éventail de caractéristiques physiologiques (**Baron, 1996**).

La synthèse de ces métabolites peut être influencée par le type et de la concentration des nutriments formulant les milieux de culture (**Sánchez et al., 2010**). Les conditions nutritionnelles actuelles qui régulent la production de substances antimicrobiennes devraient nous permettre de choisir des conceptions de processus de fermentation qui minimisent, modèrent ou maximisent la productivité. Par conséquent, les variations de l'environnement de fermentation entraînent souvent une modification sur la production des antibiotiques (**El-Banna, 2005**).

- L'objectif de ce travail se base sur l'isolement des espèces du genre *Bacillus spp* à partir du sol et leur identification.
- La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolées et sélectionnés par la méthode de puis vis-à-vis des souches cibles

- La recherche des sources de carbone et d'azote qui permettant une bonne production des composés antimicrobiens par ces *Bacillus spp*

# *Synthèse bibliographique*

## I. Définition du sol

Le sol est un mélange hétérogène de différents organismes et substances organiques et minérales présents en trois phases : solide, liquide et gazeuse (**Musy et Soutter, 1991 ; Souza et al., 2015**). Ils se composent de roches, de sable et d'argile, de matière organique (comme les résidus végétaux), d'animaux et d'organismes vivants (bactéries et champignons), d'air et d'eau (dans les pores). Les caractéristiques du sol (texture, couleur et teneur en carbone) peuvent varier d'une région à l'autre. Le sol joue un rôle clé dans le cycle de la nature, en particulier dans le cycle de l'eau et le cycle des nutriments (carbone, azote et phosphore) (**Bruyninckx, 2019**).

Le sol est le milieu naturel qui héberge la plus grande densité et la plus grande diversité microbienne connues, et une faune d'une grande richesse. Ils renferment ainsi une quantité gigantesque de microorganismes, de l'ordre d'un milliard par gramme de sol (**Balandreau, 2000 ; Deveau et al., 2014 ; Briat et Job, 2017**).

C'est aussi un important réservoir de carbone et d'azote et joue donc un rôle important dans la compensation des pertes causées par les émissions de gaz à effet de serre. Le carbone et l'azote du sol sont liés à la matière organique du sol, qui possède des propriétés physico-chimiques et peut favoriser le fonctionnement durable des écosystèmes (**Ndiaye et al., 2014**).

## II. Les bactéries du sol

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires les plus abondantes du sol, il peut y avoir des millions de bactéries par gramme de sol (**Deguine et al., 2016 ; Walser et al., 2018 ; Khan et Rao, 2019**). En 2011, Hoorman indique qu'une cuillère à café de sol productif contient généralement entre 100 millions et 1 milliard de bactéries.

Ces bactéries ont une grande variété de formes, de tailles et de fonctions, elles sont divisées en trois groupes morphologiques, à savoir les cocci, les bacilles et les spirilles. Elles sont aussi divisées en quatre groupes fonctionnels, y compris les pathogènes, les décomposeurs, les lithotrophes, et les mutualistes (**Hoorman, 2011**), ainsi que trois modes respiratoires ; aérobies, anaérobies et aéro-anaérobies facultatifs (**Pebret, 2003 ; Loynachan, 2008**).

Il existe plusieurs types de bactéries, parmi eux certaines qui sont très résistantes à des conditions extrêmes, comme la température élevée. Il y en a aussi d'autres qui sont très fragiles et peuvent être neutralisées par de petits changements dans le milieu du sol (**Khan et Rao, 2019**).

Les bactéries du sol tirent leur source de carbone et d'énergie de matières organiques, de racines en décomposition et de résidus végétaux, et leur source d'azote des nitrates et des composés d'ammoniac (protéines) présents dans le sol et d'autres nutriments. Certaines bactéries nécessitent également des acides aminés, des vitamines et d'autres substances favorisant la croissance (**Khan et Rao, 2019**).

### III. Le genre *Bacillus*

*Bacillus* a été signalé pour la première fois par Christian Gottfried Ehrenberg en 1835, elle a été trouvée dans une grande variété d'organismes et environnements, tels que le sol. Ce genre a été élargi avec de nombreuses nouvelles souches (**Ping et al., 2019**), qui se différencient par une variété d'observations de laboratoire impliquant la morphologie, l'écologie, la génétique, la taxonomie et leurs croissances sur des milieux sélectifs (**Long et al., 2017**).

#### III.1. Morphologie

Les bactéries du genre *Bacillus* sont des Bacilles à Gram positives (**Ping et al., 2019**) avec quelques exemples identifiés comme Gram négatifs (**Cote et al., 2015**), mobiles ou immobiles, aérobies ou aéro-anaérobies facultative (**Cote et al., 2015 ; Ping et al., 2019**) avec quelques-unes anaérobies strictes, et présentent une variété morphologique de colonies (**Cote et al., 2015**).

*Bacillus* est une bactérie en forme de bâtonnet de grande taille varie généralement de l'ordre du micron ou plus (**Calvet, 2003 ; Loynachan, 2008 ; Ping et al., 2019**). Sur la gélose nutritive, elles se développent généralement en grandes colonies circulaires ou irrégulières (**Prod et Bille, 2017 ; Ping et al., 2019**), aux bords rugueux, opaques, blancs flous ou légèrement jaunes faciles à reconnaître (**Ping et al., 2019**). Elle peut apparaître comme un seul organisme ou dans des chaînes de longueur considérable, avec une spore qui peut être ovale ou cylindrique et peut être localisée au centre, au sous-terminal ou au terminal (**Weber et Rutala, 1988**).

#### III.2. Phénotype

Les *Bacillus* sont des espèces hétérotrophes, phénotypiquement hétérogènes, nitrifiants ou dénitrifiants, fixatrices d'azote, précipitrices de fer, oxydants de sélénium, oxydants et réductrices de manganèse, chimioorganotrophe ou chimiolithotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles ou thermophiles, présentent différentes propriétés physiologiques telles que la capacité à dégrader de nombreux substrats dérivés de sources végétales et animales,



y compris l'amidon, la cellulose, les protéines, les hydrocarbures et des biocarburants et autres (Slepecky et Hemphill, 2006 ; Abriouel *et al.*, 2011).

Les espèces de *Bacillus* produisent plusieurs toxines (y compris l'entérotoxine, la toxine émétique, les phospholipases, les protéases et les hémolysines) (Long *et al.*, 2017), ainsi que des antibiotiques en tant que des métabolites secondaires, elles sont aussi capables de sécréter une grande variété d'enzymes dans le milieu de culture, chaque espèce produit au moins une enzyme extracellulaire (Slepecky et Hemphill, 2006).

### III.3. Environnement

Les espèces du genre *Bacillus* sont omniprésentes dans la nature ; ubiquitaires, mais se trouvent en concentrations plus élevée dans le sol, l'eau et les produits alimentaires d'origine végétale (Schultz *et al.*, 2017). La plupart sont des saprophytes largement distribués dans l'environnement (Prod et Bille, 2017), fréquemment isolés dans les laboratoires sous forme de contaminants de milieux ou d'échantillons (Greenwood *et al.*, 2012). Cette capacité à survivre dans des différents écosystèmes est grâce à leurs endospores (Slepecky et Hemphill, 2006 ; Abriouel *et al.*, 2011).

### III.4. Génétique

Le genre *Bacillus* est un genre bactérien particulièrement hétérogène. L'ARNr 16S, l'hybridation d'ADN-ADN et le séquençage des gènes centraux sont nécessaires pour acquérir la compréhension actuelle la plus complète de toutes les espèces du genre *Bacillus* (Cote *et al.*, 2015). La teneur en G + C de l'ADN des espèces connues de *Bacillus* varient de 32 à 69% en moles (Slepecky et Hemphill., 2006 ; Eric, 2008 ; Cote *et al.*, 2015). Cette variabilité, ainsi que les expériences d'hybridation d'ADN, ont révélées l'hétérogénéité génétique du genre et même d'une espèce à l'autre, ce qui est beaucoup plus large que ce que l'on considère comme raisonnable pour la définition d'un genre (Slepecky et Hemphill., 2006 ; Eric, 2008). Cette hétérogénéité en génétique rend difficile la catégorisation du genre ou de faire des généralisations (Slepecky et Hemphill., 2006).

### III.5. Taxonomie

Le genre *Bacillus* appartient du domaine des Bactéries ou *Eubactéries* (ou *Eubacteria*) et du phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, l'ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae*. (Eric, 2008 ; Rooney, 2009).

La classification taxonomique des espèces du genre *Bacillus* a été auparavant basée sur leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques ainsi que leur capacité à sporuler, alors qu'aujourd'hui la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S par séquençage d'oligonucléotides (**Bron et al ; Slepecky et Hemphill, 2006**), l'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques (**Eric, 2008**).

*Bacillus* ne représente qu'une petite partie d'une plus grande classification taxonomique de bactéries productrices d'endospores appelé *Bacillus sensu lato*. En tout état de cause, malgré l'importance du genre, il a été difficile de placer avec précision *Bacillus spp* dans des positions taxonomiques bien définies, et de fournir une description approfondie de chaque espèce de *Bacillus* (**Weber et Rutala, 1988 ; Zeigler et Perkins, 2008 ; Eric, 2008**).

Ce groupe de bactéries comprend plusieurs espèces réparties en trois grands groupes sur la base de la morphologie et la spore comme le montre le tableau.

**Tableau 1:** La classification taxonomique du genre *Bacillus* à la base de la morphologie et la spore (**Eric, 2008**).

Groupes		Espèces	Caractéristiques
Groupe I	Sous-groupe A	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus cereus var. Bacillus mycoides</i> ), <i>Bacillus megaterium</i> et <i>Bacillus thuringiensis</i>	Bactéries à grandes cellules, en forme de bacilles, supérieure ou égale à 1 µm, à coloration de Gram positive, avec des spores ellipsoïdes ou cylindriques, centrales ou terminales, et des d'inclusions protoplasmiques de poly-béta-hydroxybutyrate.
		<i>Bacillus pseudomycoïdes</i> et <i>Bacillus weihenstephanensis</i> .	

	Sous-groupe B	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , et <i>Bacillus firmus</i> .	Bactéries à petites cellules, inférieur à 1 µm, dépourvues d'inclusions protoplasmiques de poly-béta-hydroxybutyrate.
	Groupe II	<i>Bacillus alvei</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus larvae</i> , <i>Bacillus lentimorbus</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus popillae</i> et <i>Bacillus stearothermophilus</i> .	Bacilles à coloration de Gram variable, avec des spores ellipsoïdes centrales ou terminales.
	Groupe III	<i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Bacillus globisporus</i> , et <i>Bacillus insolitus</i> .	Espèces hétérogènes, à coloration de Gram variable, avec des spores sphériques terminales ou subterminales.

le séquençage de l'ARNr 16S, était une nouvelle révolution, qui permis à Ash et ses collègues 1991 d'examiner les espèces connues de *Bacillus* et de conclu qu'elles appartenaient à cinq groupes de similarité de séquence d'ARNr 16S distincts ; *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et de nombreuses autres espèces ont été placées dans ce groupe qui peut être appelé *Bacillus sensu stricto*, grâce à leurs caractéristiques classiques de ces membres, connues pour les bacilles aérobies Gram-positifs formatrices de spores. Et depuis les années 1990, les cinq groupes de *Bacillus* développés par Ash et al. (1991) et plus tard affinés par Priest (1993) beaucoup d'espèces ont été subdivisés en plusieurs genres supplémentaires ou reçu de nouveaux noms de genre. Cette catégorie élargie de formateurs d'endospores est maintenant appelée *Bacillus sensu lato*. (Zeigler et Perkins, 2008).

#### IV. Utilisation des *Bacillus*

Les espèces de *Bacillus* ont jouées un rôle crucial dans l'établissement de nombreux processus médicaux, pharmaceutiques, agricoles et industriels qui profitent de leurs caractéristiques physiologiques et de leurs capacités à produire une multitude d'enzymes, d'antibiotiques et d'autres métabolites (Baron, 1996 ; Schultz et al., 2017).

Les produits les plus prédominantes sont les antibiotiques, les protéines humaines et les vaccins. (Zeigler et Perkins, 2008 ; Elshaghabee et al., 2017). L'espèce a montré aussi des avantages probiotiques depuis les années 1950, (Schultz et al., 2017). *Bacillus* est également très utile dans le secteur agricole, comme une importante source de biopesticides naturels efficaces contre un large éventail d'insectes ravageurs. (Zeigler et Perkins, 2008 ; Pérez et al., 2011). Métaboliquement, ces espèces sont très actives et capables d'être utilisés dans de nombreux processus de fermentation industrielle, dans lequel plusieurs espèces jouent un rôle important pour la production de vitamines et de produits chimiques fins, elles sont capables aussi de produire un certain nombre d'enzymes utiles, Les applications (tableau) incluent les détergents ménagers, l'hydrolyse de l'amidon, le textile, la pâtisserie et les boissons (Zeigler et Perkins, 2008 ; Elshaghabee et al., 2017).

**Tableau 2:** Certaines utilisations pour quelques espèces de *Bacillus* (Cote et al., 2015).

Espèces	Application
<i>B. cereus</i>	Probiotique pour animaux
	Dosage antibiotique
	Validation des désinfectants
<i>B. clausii</i>	Enzymes pour détergents
<i>B. circulans</i>	Probiotique pour animaux
	Dosage antibiotique
	Production d'aminosides
<i>B. coagulans</i>	Probiotique pour animaux
<i>B. fastidiosus</i>	Dosage d'acide urique
<i>B. globigii</i>	Surveillance de la fumigation
<i>B. licheniformis</i>	Production de bacitracine
<i>B. megaterium</i>	Production de vitamine B2 et B12
	Dosage antibiotique
<i>B. polymyxa</i>	Production de polymyxine
<i>B. pumilus</i>	Dosage antibiotique
	Suivi des processus de racliation
<i>B. stearothermophilus</i>	Dosage antibiotique
	Surveillance de la stérilisation thermique
<i>B. subtilis</i>	Production de bacitracine

	Dosage antibiotique
	Production de biotine et de riboflavine
	Dosage dépendant de la subtilisine pour Chlamydia
	Test de dépistage de la phénylcétonurie
<i>B. thuringiensis</i>	Insecticide

### V. Intérêt biologique du genre *Bacillus*

Les *Bacillus* sont impliquées dans la production de métabolites primaires tels que les vitamines et les ribonucléosides ainsi que des métabolites secondaires comme les bactériocines et les biosurfactants. Ces biosurfactants peuvent être des glycolipides, des lipopeptides, des lipopolysaccharides et des glycoprotéines (Makkar et al., 2011).

Le genre *Bacillus* est également attrayante pour plusieurs activités biologiques, elle constitue un moyen de lutte contre les maladies cardiovasculaires comme les thromboses, elle a aussi des activités antivirale, anti-inflammatoire et antitumorale (Rodrigues et al., 2006).

Ces espèces sont aussi les plus dominantes dans les fermentations microbiennes, et les plus importants producteurs d'enzymes industriels (Schallmey et al., 2004). Les *Bacillus* sont aussi utilisées comme modèles dans la recherche pour mieux comprendre les processus cellulaires tels que la réplication, la réparation et la ségrégation de l'ADN mais aussi dans l'étude de la transcription, la traduction, le cycle cellulaire, la division, la sporulation et la morphogénèse (Graumann, 2007).

### VI. Exigences et croissance du genre *Bacillus*

La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont des chimiohétérotrophes, et utilisent une variété de composés organiques simples (sucres, acides aminés, acides organiques). Dans certains cas, elles fermentent également les hydrates de carbone par réaction mixte qui produit typiquement le glycérol et le butanediol (Todaro, 2003).

Quelques espèces n'exigent aucun facteur organique de croissance, d'autres exigent des acides aminés, des vitamines ou les deux. La majorité sont des mésophiles avec une température optimale entre 30 et 45 C°, mais le genre contient également un certain nombre d'espèces thermophiles avec température optimale plus de 65 C° (Todaro, 2003).

Les exigences de croissance vont du simple au complexe. La plupart des *Bacillus spp* poussent facilement sur de la gélose nutritive ou des milieux de peptone. La plupart des espèces croissent de manière optimale à pH 7, mais certaines espèces croissent à pH 9 et d'autres tolèrent pH 2 (Weber et Rutala, 1988).

### VII. La résistance du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* a une capacité de produire des endospores dormantes en aérobiose qui lui permet de confronter à des conditions de croissance défavorables. (Weber et Rutala, 1988 ; Zeigler et Perkins, 2008). La formation des spores permet à la bactérie de résister à différents stress environnementaux tels que la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques ; tel que les désinfectants (Baron, 1996 ; Nicholson, 2002), et de croître à des températures hautes ou basses, à des valeurs différentes de pH et de concentrations en sel (Baron, 1996 ; Bron, S et al.,).

### VIII. Le spectre antimicrobien de *Bacillus*

Les antibiotiques sont des protéines ou des peptides ribosomiaux ayant une activité bactéricide envers des espèces qui sont souvent étroitement liées aux bactéries productrices, (Sansinenea et Ortiz, 2011).

Ces antibiotiques sont produits par plusieurs microorganismes fongiques et bactériens, qui peuvent inhiber ou tuer à faibles concentrations d'autres microorganismes. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structuralement modifiés en laboratoire pour augmenter leurs efficacités, c'est la classe des antibiotiques semi-synthétiques (Marinelli, 2009).

Le genre *Bacillus* produit différentes classes d'antibiotiques, c'est une source antimicrobienne relativement abondante, car ils sont bien connus en tant que producteurs des peptides antimicrobiens a activité antagoniste contre les champignons et certains bactéries pathogènes. Ces bactéries représentent une riche source de métabolites secondaires qui présentent une forte activité antifongique et antibactérienne et permettent à la bactérie de survivre dans son environnement naturel (Sansinenea et Ortiz, 2011).

### IX. Production des antibiotiques par *Bacillus*

Les antibiotiques sont les métabolites secondaires produits par les micro-organismes par catalyse enzymatique, impliquant une série de voies de biosynthèse des polypeptides de faible poids moléculaire produits par des mécanismes ribosomiaux. La majorité de ces antibiotiques

sont de nature toxique et responsable de la régulation et du contrôle de la population microbienne dans le sol. Seuls quelques-uns trouvent une utilisation en médecine pour le traitement de multiples affections (**Amin et al., 2012**).

Le genre *Bacillus* produit environ 167 antibiotiques qui sont principalement des peptides (**Serari, 1984**), *B. subtilis* et *B. coagulans* sont parmi les espèces les plus étudiées (**Cherif et al., 2003**). Ces espèces sont connues pour la synthèse des antibiotiques avec une diversité remarquable à la fois dans la structure et la fonction (**Amin et al., 2012**). Les antibiotiques peptidiques ont généralement un poids moléculaire compris entre 270 (bacilysine) et 4 500 Da (lichenniformine), elle se compose entièrement d'acides aminés. Ces antibiotiques sont souvent cycliques (**Serari, 1984**).

### **X. Effet antibiotique du genre *Bacillus* sur les microorganismes**

Le genre *Bacillus* est l'un des espèces les plus utilisés dans la lutte contre plusieurs maladies racinaires et foliaires, car ce genre comprend un groupe hétérogène de bactéries Gram positif, formant des endospores, a des structures thermo-tolérantes, résistantes à la sécheresse, au rayonnement ultraviolet et aux solvants organiques. Ces propriétés, associées à la capacité de production d'antibiotiques peptidiques, contribuent à la lutte biologique contre les phytopathogènes (**Monteiro et al., 2005**).

*Bacillus* spp, participent à la lutte contre les microorganismes pathogènes responsables des maladies des plantes grâce à divers mécanismes d'action, l'antibiose c'est l'un des mécanismes les plus importants (**Monteiro et al., 2005**). La plupart des antibiotiques peptidiques produits par les bacilles sont actifs contre les bactéries gram-positives, comme la bacitracine ; certains de ces antibiotiques ont une utilisation thérapeutique : polymyxine, colistine et la circuline présentent une activité presque exclusivement sur les bactéries gram-négatives, tandis que la mycobacilline et la fungistatine sont actives essentiellement sur les champignons et les levures (**Kartz et Demain, 1977 ; Serari, 1984**). Les antibiotiques agissent généralement sur un des éléments de la structure bactérienne ; la paroi bactérienne, la membrane cellulaire, l'ADN et la synthèse protéique.

### **XI. Effets des conditions physico-chimiques sur la production des antibiotiques par *Bacillus***

L'influence des conditions de culture (pH, température, aération et agitation) sur la biosynthèse des métabolites secondaires, diffèrent en fonction des souches, par conséquent ils affecteraient la production et le rendement en molécules bioactives (Wang et al., 2008).

#### **XI.1. Le pH**

Le PH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires. En effet il est bien connu que chaque espèce microbienne possède un pH optimal, minimal et maximal à partir duquel elle pousse. L'étude de Vijayakumar et al. (2012) a révélé que le pH optimal pour la production de composés antimicrobiens est compris entre 7 et 8.

#### **XI.2. La température**

La température a un effet sur la production des métabolites secondaires par les microorganismes. De plus, il a été montré que les *Bacillus* possèdent une gamme assez déffirent de température de croissance mais la température optimale de production des antibiotiques est de l'ordre de 30°C (Bundale et al., 2015).

#### **XI.3. Agitation et aération**

L'agitation affecte l'aération ainsi le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Pfefferle et al., (2000) ont étudié l'influence de la vitesse et du mode d'agitation et de l'aération sur la production de métabolites secondaires et les meilleurs résultats ont été obtenus avec une agitation de type « turbine-hélice ».

Toutes les productions des antibiotiques se déroulent dans les conditions aérobies. Comme pour les facteurs environnementaux, l'optimum de concentration en oxygène n'est pas nécessairement le même pour la croissance et pour la synthèse des métabolites secondaires.

### **XII. La matière organique du sol**

La matière organique du sol est considérée comme un compartiment du sol qui peut représenter jusqu'à 98% du carbone organique total retrouvé dans le sol (Shibu et al., 2006). La quantité de la matière organique du sol est exprimée de deux manières : soit par une teneur en carbone, soit par une teneur en matière organique. Il est plus rigoureux d'utiliser les teneurs



en carbone organique parce que l'analyse chimique conduit à cette grandeur. Il est clair qu'il existe une relation entre ces deux teneurs mais elle n'est qu'approximative en raison de la composition très variable et très variée de la matière organique du sol. La même remarque peut aussi être faite à propos de la teneur en azote organique (Calvet, 2003).

### **XIII. Fonction de la matière organique dans le sol**

Les matières organiques assurent de nombreuses fonctions dans les sols : source d'éléments et d'énergie pour les organismes vivants du sol, elles sont un facteur essentiel de la présence de végétaux et de microorganismes nombreux et divers. Elles contribuent à la biodiversité des sols ainsi qu'à leur fertilité physique, chimique et biologique (organismes auxiliaires) (Briat et Job, 2017).

### **XIV. La biodégradation de la matière organique en tant que source de nutriments**

La biodégradation et la transformation des matières organiques par les organismes vivant du sol, est essentiellement (micro) biologique car ces matières organiques sont les ressources trophiques des organismes hétérotrophes des sols. L'activité de ces derniers sur les éléments nutritifs ; carbone et azote, dépend directement de la richesse relative de ces éléments dans les matières organiques entrant dans les sols (Briat et Job, 2017).

L'ensemble de ces organismes hétérotrophes des sols dégradent les substrats en produisant des enzymes extracellulaires. Ces enzymes sont utilisées comme des indicateurs fonctionnels des besoins en nutriments de la biomasse microbienne hétérotrophe (Briat et Job, 2017).

Malgré que le carbone microbien représente une faible partie du C total des sols, la biomasse microbienne hétérotrophe reste le compartiment biologique clé de toutes les formations du carbone et des nutriments et de la formation des matières organiques des sols et même l'azote minéral n'est pas disponible en quantité suffisante, la croissance microbienne et donc la dégradation pourront être ralenties (Briat et Job, 2017).

### **XV. Le carbone dans le sol**

Les sols sont la plus grande réserve de carbone. La quantité totale de carbone de la matière organique des sols n'est pas connue avec précision en raison des incertitudes due à l'hétérogénéité des sols (Calvet, 2003).

### XV.1. Sources de carbone

Les sucres simples tels que le glucose, le fructose et le saccharose provoquent généralement une meilleure croissance et une meilleure production de métabolites que les sources de carbone complexes telles que l'amidon, le galactose et les mannitols (**Arora, 2019**).

Dans les cellules microbiennes, le glucose, généralement est une excellente source de carbone pour la croissance, interfère avec la formation de nombreux métabolites secondaires (**Ruiz et al., 2010**).

Les profils d'assimilation des substrats de carbone ont une grande valeur dans la caractérisation et l'identification des espèces de *Bacillus*, plusieurs espèces utilisent du glucose et / ou d'autres glucides fermentescibles comme seules sources de carbone et d'énergie, mais certaines espèces ne semblent pas d'utiliser du tout de glucides (**Vos et al., 2009**).

Vos et ces collègues (2009) montrent que, *Bacillus azotoformans* utilise une gamme d'acides organiques comme sources de carbone et n'attaque pas les glucides ; *Bacillus badius* et *Bacillus benzoovorans* assimilent certains acides aminés et acides organiques et ne produisent pas d'acides à partir du glucose et d'autres glucides.

Ils indiquent aussi que, *Bacillus fastidiosus* utilise généralement l'acide allantoinique, ou l'acide urique comme seule source de carbone et d'énergie, ainsi que *Bacillus fusiformis* ne produit ni acide ni gras à partir de D-glucose ou d'autres glucides, elle utilise de l'acétate, du citrate, du formiate, du lactate et du succinate comme source de carbone. *Bacillus schlegelii* et *Bacillus tusciae* se développent de façon chimolithotrophe utilisant H<sub>2</sub> comme donneur d'électrons et CO<sub>2</sub> comme source de carbone (**Vos et al., 2009**).

### XVI. L'azote dans le sol

La plupart des transformations de l'azote dans les sols sont sous le contrôle de microflore plus ou moins spécifiques (fixation, minéralisation, organisation, dénitrification), les formes minérales pouvant être considérées comme la plaque tournante d'une grande partie de ces processus (**Lemaire et Nicolardot, 1997**).

L'azote du sol est présent sous différentes formes : azote organique qui constitue la majeure partie de l'azote contenu dans un sol agricole, azote sous forme minérale (ammonium, nitrite et nitrate) ; azote gazeux (azote moléculaire, ammoniac, oxydes d'azote) (**Lemaire et Nicolardot, 1997**).

Les micro-organismes peuvent utiliser une grande variété de sources d'azote pour la croissance. En général, de bonnes sources d'azote sont l'ammoniac, la glutamine et l'asparagine, tandis que la proline et l'urée sont considérées comme de mauvaises sources d'azote. Afin de sélectionner le meilleur parmi une grande diversité de sources d'azote disponibles, les micro-organismes ont développés des mécanismes de détection et de régulation qui permettent d'utiliser la meilleure source d'azote présente dans le milieu. (Sanchez et Demain, 2002).

### **XVII. Effet de source de carbone et d'azote sur la croissance**

Parmi la grande variété de métabolites produits par les espèces de *Bacillus* ; les antibiotiques. Dans le milieu de fermentation, plusieurs formes d'antibiotique sont généralement produites simultanément (Aharonowitz, 1980). La biosynthèse est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate utilisé dans le milieu de fermentation (Martin et Demain, 1980 ; Lounès et al., 1996).

Aharonowitz, (1980) a suggéré que les conditions favorisant le catabolisme de certaines molécules nutritives influencent la biosynthèse des antibiotiques en améliorant les processus cataboliques qui augmentent le niveau de précurseurs d'antibiotiques.

#### **XVII.1. Effet de source de carbone sur la croissance**

Dans les milieux contenant un mélange d'une source de carbone à utilisation rapide et de sources de carbone à utilisation lente, la première est utilisée en premier pour produire des cellules mais peu ou pas de métabolites secondaires sont formées. Une fois le composé rapidement assimilé est épuisé, la « deuxième meilleure » source de carbone est utilisée pour l'idiophase, afin de produire de métabolite secondaire pour la croissance (Sanchez et Demain, 2002).

Le glucose, généralement est une excellente source de carbone pour la croissance, interfère avec la biosynthèse de nombreux antibiotiques. Au cours des études sur le développement du milieu de fermentation par Martin et Demain en 1980, les polysaccharides ou oligosaccharides sont souvent révélés meilleurs que le glucose comme sources de carbone pour la production d'antibiotiques.

Dans un milieu contenant du glucose plus une source de carbone utilisée plus lentement, le glucose est généralement utilisé en premier en l'absence de production d'antibiotiques. Une fois le glucose épuisé, la deuxième source de carbone est ensuite utilisée pour la biosynthèse

des antibiotiques. Selon le micro-organisme, l'effet régulateur du carbone peut être exercé par des sources de carbone rapidement utilisées autres que le glucose (**Martin et Demain, 1980**).

### **XVII.2. Effet de source d'azote sur la croissance**

Peu d'études ont traités spécifiquement de la régulation des métabolites de l'azote de la biosynthèse des antibiotiques, mais plusieurs rapports dans la littérature indiquent que la biosynthèse des antibiotiques peut être suggérée par l'ammoniac et d'autres sources d'azote utilisées rapidement (**Martin et Demain, 1980**). Aharonowitz en 1980, montre que De nombreux résultats affirment que la production d'antibiotiques est influencée par l'état de l'azote dans le milieu de culture.

Ainsi que des concentrations élevées en azote de différentes sources d'azote du milieu de fermentation affectent la synthèse des enzymes sensibles impliquées dans le métabolisme primaire et secondaire (**Sanchez et Demain, 2002**).

Sanchez et Demain, (2002) indiqueront que de nombreuses voies métaboliques secondaires sont affectées négativement par des sources d'azote favorables à la croissance. Seules quelques informations sont disponibles concernant l'effets négatifs de  $\text{NH}_4^+$  et de certains acides aminés. La production de certains antibiotiques aminoglycosides est défavorablement affectée par l'ammonium, par ex. la néomycine et la kanamycine alors que le nitrate et certains acides aminés sont stimulants.

Ils montrent aussi que l'ajout d'ammonium au milieu de culture peut améliorer la production de streptomycine. L'effet stimulant de l'ammonium a également été observé dans d'autres processus aminoglycosides tels que la néomycine et la gentamicine.

Une autre étude de Sanchez et Demaine, (2002) présente ce qui concerne l'effet stimulant de l'ammonium sur la production de gentamicine, est dû à sa conversion en glutamine, qui est utilisée dans la formation des précurseurs de la gentamicine, la désoxystreptamine, l'aminodésoxyinosose et la d-glucosamine.

# *Matériels et méthodes*

Ce travail a été réalisé afin d'isoler et identifier des espèces du genre *Bacillus* à partir du sol, détecter l'activité antimicrobienne des souches isolées vis-à-vis des souches cibles et la recherche des sources de carbone et d'azote qui permettant une bonne production des composés antimicrobiens par ces *Bacillus spp.*

## I. Zones de prélèvement et échantillonnage

### I.1. Zones de prélèvement

Dix échantillons ont été prélevés à partir du sol de divers types de champs fertiles, qui ont été choisis selon leurs richesses en matière organique.

Cinq échantillons ont été prélevés à partir de différentes zones de la commune de BENI SAF, wilaya d'Ain TEMOUCHENT (**figure 1**) dont les prélèvements sont :

- Echantillon 1 : sol de pins à pignons.
- Echantillon 2 : sol de lavande.
- Echantillon 3 : sol d'olivier.
- Echantillon 4 : sol d'un jardin.
- Echantillon 5 : sol d'une forêt.



**Figure 1:** Localisation de la commune de BENI SAF (Googale Maps, 2020).



**Figure 2:** Localisation de la commune de REMCHI (Googale Maps, 2020).

Le deuxième site de prélèvement est situé dans la commune de REMCHI, wilaya de TLEMEN (figure 2) dont les Cinq autres échantillons sont :

- Echantillon 6 : sol de pois chiches.
- Echantillon 7 : sol de pois.
- Echantillon 8 : sol d'eucalyptus.
- Echantillon 9 : sol de blé.
- Echantillon 10 : sol de grenade.



## II. Echantillonnage

A l'aide d'une spatule stérile, environ 100g du sol est prélevé à partir d'une profondeur de 5-10 cm en éliminant les débris de la surface, les échantillons ont été conservés dans des sacs d'aluminium stériles étiquetés puis transportés au laboratoire de microbiologie du centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent (**figure 3**).



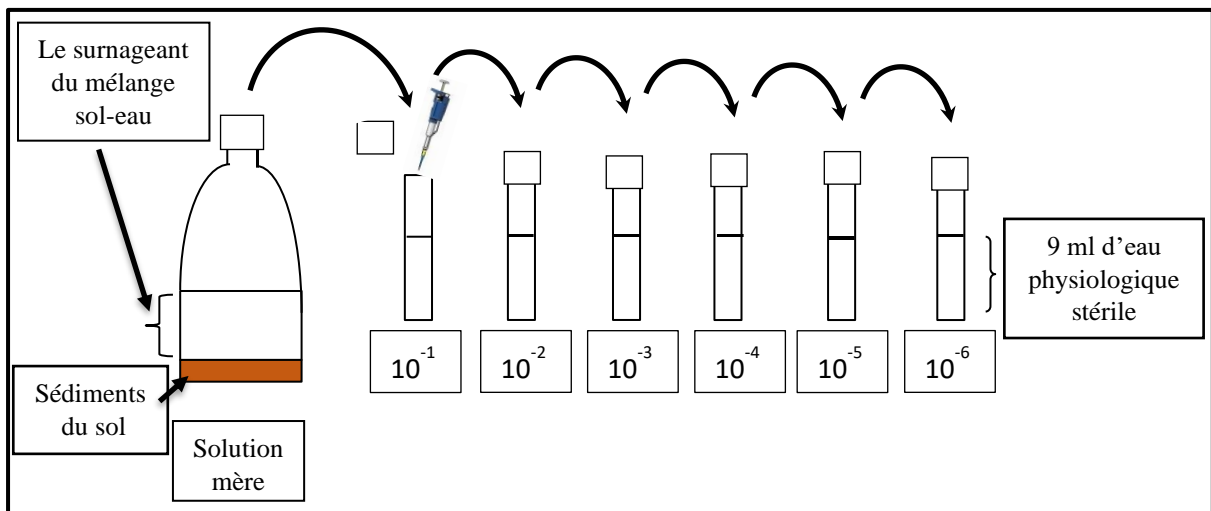
**Figure 3:** Prélèvements effectués à partir du sol.



### III. Isolement et purification

#### III.1. Préparation des dilutions

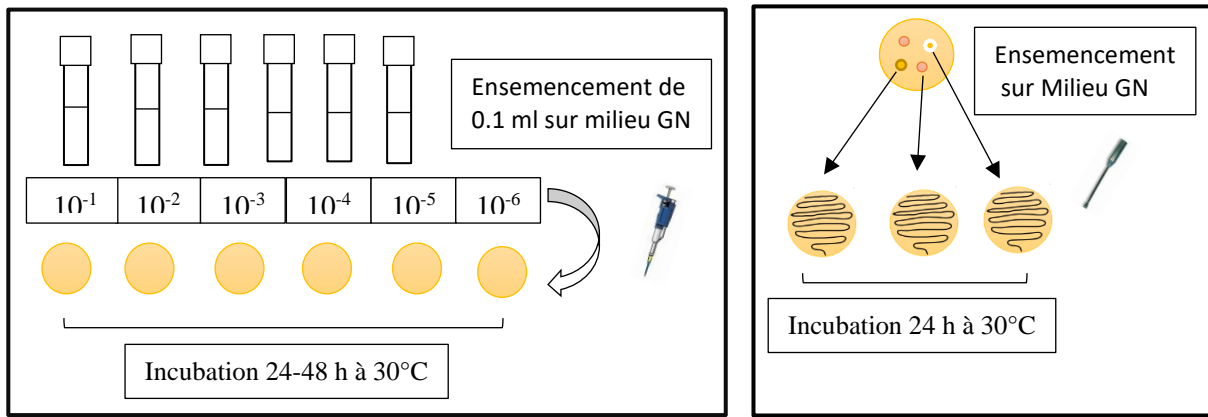
Dans un flacon stérile de 200 ml, une pesée de 10 g de sol est diluée dans un volume de 90 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 5 minutes. Ensuite, un volume de 1 ml de surnageant récupéré après précipitation pendant 5 minutes est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une dilution décimale de  $10^{-1}$ . Des dilutions successives ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) ont été préparées par la suite (**Figure 4**).



**Figure 4:** Schéma de la préparation des dilutions décimales à partir du sol.

#### III.2. Ensemencement et purification

L'ensemencement est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive à l'aide d'un râtelier stérile en verre. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures (**Figure 5-A**). Les boîtes montrant les colonies isolées ont été sélectionnées. Les observations macroscopiques des colonies obtenues ont été effectuées afin de déterminer leurs formes, couleur et d'autres caractéristiques. Des colonies représentatives de différents aspects ont été repérées et récupérées. Ensuite, les colonies sont purifiées par des repiquages successifs à l'aide d'une anse de platine stérile sur la gélose nutritive en striés, incubées à une température 30°C pendant 24 heures (**Figure 5-B**).

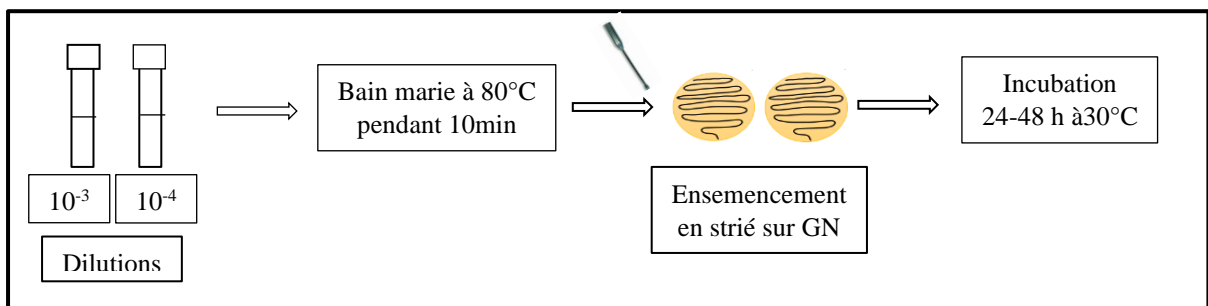


**Figure 5:** Présentation des étapes d'ensemencement et purification des souches.

(A) Ensemencement des dilutions, (B) Purification et isolement des souches.

### III.3. Isolement des souches de *Bacillus*

Pour la sélection du genre *Bacillus* uniquement, les dilutions de  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  préparés de chaque échantillon ont été soumises à un traitement thermique dans un bain marie à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10min, afin d'isoler les formes sporulées et d'éliminer toutes les formes végétatives (Figure 5).



**Figure 6:** Description des étapes de traitement thermique des souches de *Bacillus spp.*

## IV. Identification morphologique et vérification de la pureté des isolats

Pour cette étude, 34 isolats ont été retenus et ont fait l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

### IV.1. Observation macroscopique

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 après incubation (Abe et al., 2018).

Après isolement et purification des différents isolats sur Gélose Nutritive, une observation macroscopique permet la détermination des principaux caractères tels que la forme, la taille, la couleur, la consistance et la surface des colonies ainsi que la pureté des isolats.

#### **IV.2. Observation microscopique**

Toutes les souches bactériennes qui se rapprochent par leurs aspects macroscopiques aux *Bacillus* par leurs grandes tailles des colonies, sa couleur jaunâtre au blanchâtre et avec une consistance visqueuse ou crouteuse, sont observées au microscope optique après la coloration de Gram. Les frottis sont observés au microscope optique avec l'objectif à immersion (objectif x100).

L'observation microscopique permet de déterminer le Gram, la morphologie, le mode d'association, la position des spores et la pureté des isolats.

L'ensemble des isolats obtenus des différents échantillons de sols qui correspondent aux souches de *Bacillus* sont repiqués sur le même milieu qui a servi à l'isolement.

#### **IV.3. Repiquage et purification des isolats**

Seules les souches qui présentent des caractères de bâtonnet à Gram positif avec la présence des spores ont été retenues et repiqués sur milieu GN en utilisant la technique de trois cadrans, afin d'obtenir des colonies bien isolées. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

### **V. Effet antibiotique des souches isolées**

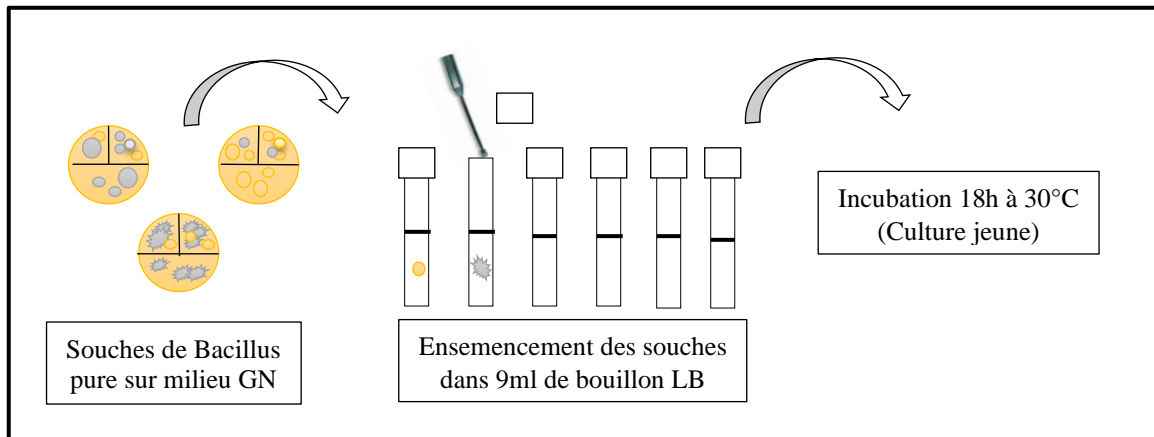
Cette étude détermine l'effet antibiotique des souches isolées de *Bacillus* vis-à-vis des souches de références pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*).

#### **V.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches de *Bacillus* étudiées a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (Malik et al., 2018).

### V.1.1. Préparation de l'inoculum

Des inoculums sont préparés à partir des colonies pures de *Bacillus* stockées sur GN qui sont repiqués à l'aide d'une anse de platine stérile dans des tubes à essai contenant 9 ml de bouillon LB et incubés pendant 18 h à 30°C (**figure 7**) (culture jeune en phase de croissance).



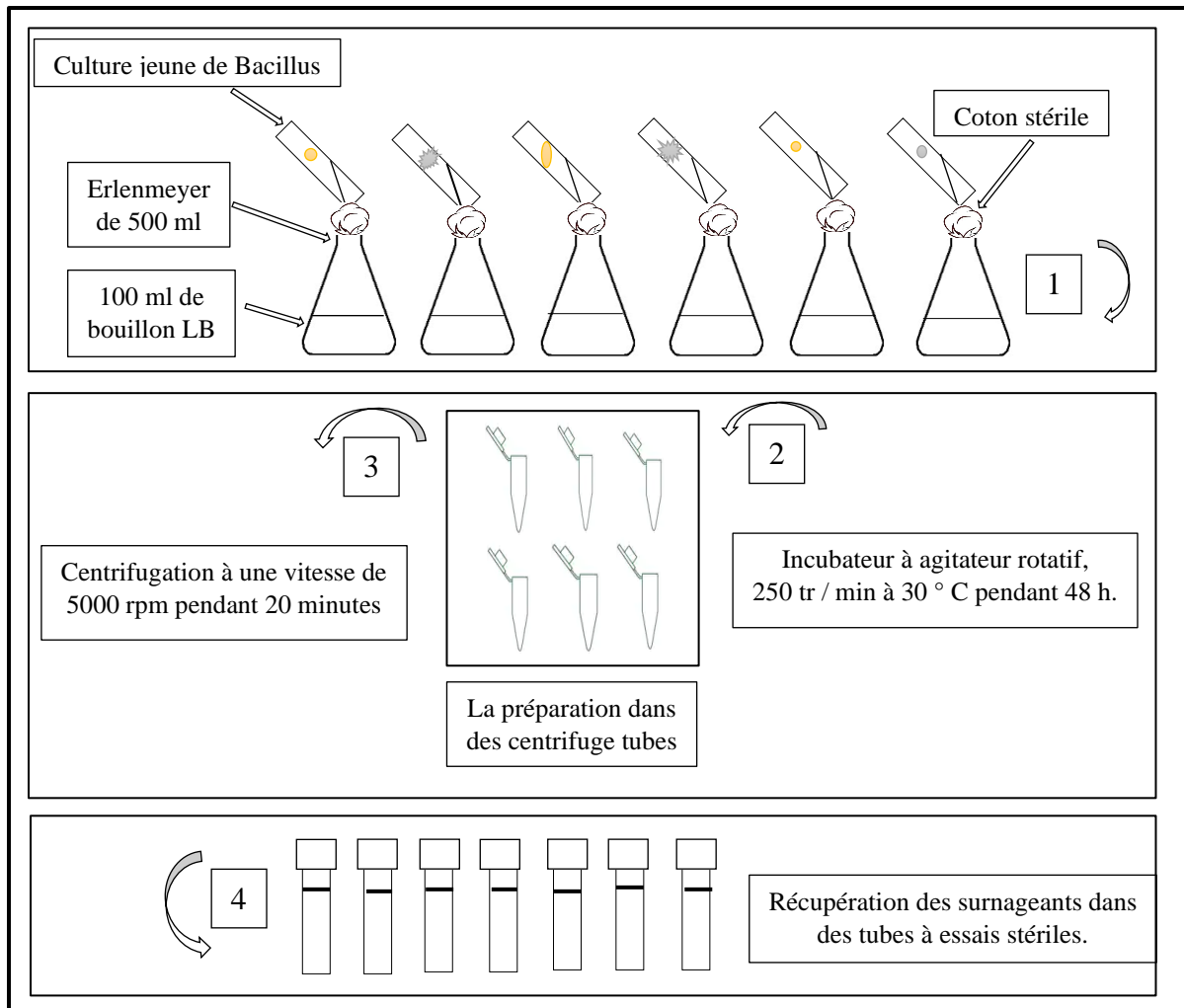
**Figure 7:** Présentation de la préparation de l'inoculum.

### V.1.2. Préparation des surnageants

#### V.1.2.1. La fermentation

Les inoculums préparés de chaque souche de *Bacillus* isolées ont été mis en culture dans des Erlenmeyer stériles de 500 ml contenant 100 ml de bouillon LB, puis fermées par le coton stérile et incubés à 30 ° C sous une agitation de 250 rpm pendant 48 h.

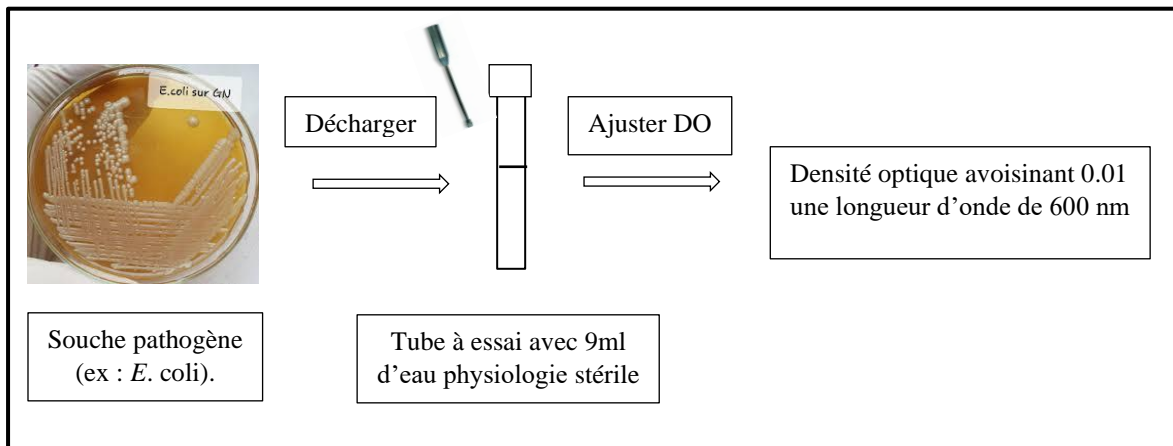
Après la fermentation, chaque préparation a subi une centrifugation à une vitesse de 5000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant a été récupéré dans des tubes à essai stériles (**figure 8**).



**Figure 8:** Schématisation des étapes de préparation des surnageants par la fermentation.

### V.1.3. Préparation de suspensions bactériennes cibles

Dans des tubes à essai stériles et à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées des souches de référence pathogènes de 18h sur le milieu gélosé : *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, ont été prélevées puis déchargées dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, puis ajustées optiquement jusqu'à l'obtention d'une densité avoisinant 0.1 à une longueur d'onde de 600 nm (**figure 9**).



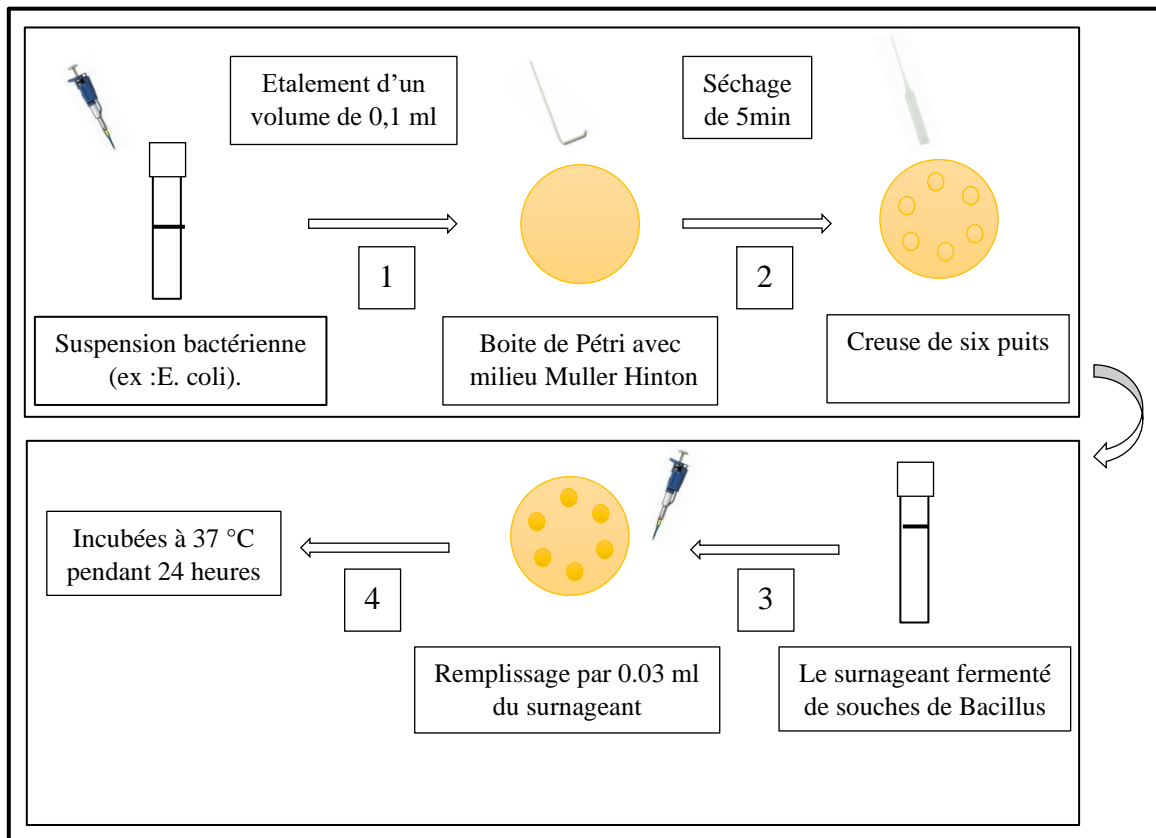
**Figure 9:** Présentation des étapes de préparation des suspensions bactériennes pathogènes.

#### V.1.4. Ensemencement par la méthode des puits

L'activité antibactérienne des isolats a été testée directement sur un milieu solide préalablement ensemencé par les bactéries indicatrices (**Zahir et al., 2018**).

L'ensemencement est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque suspension bactérienne sur une boîte de Pétri contenant le milieu Muller Hinton à l'aide d'un râteau stérile en verre.

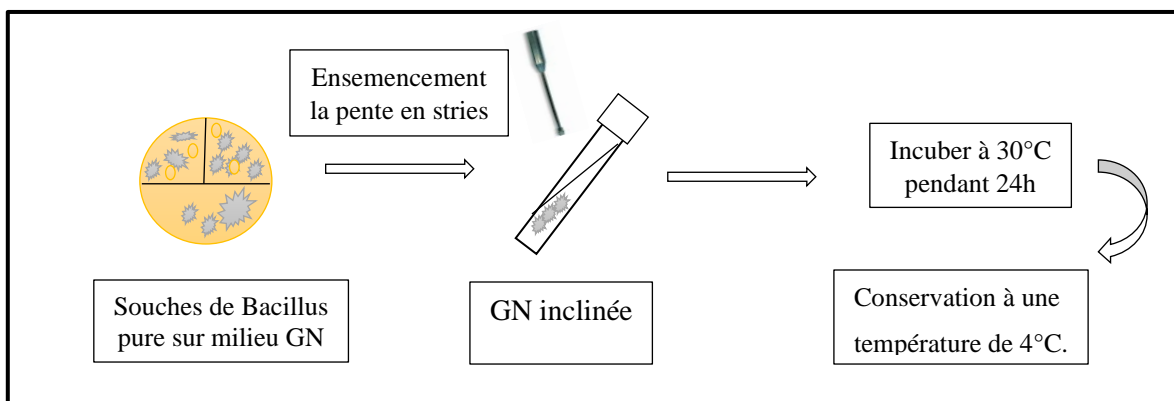
Après 5min de séchage, six puits ont été creusés à l'aide d'un bout de pipette pasteur, puis à l'aide d'une micropipette, ces derniers sont remplis par 0.03 ml de surnageant obtenu par la fermentation des souches de *Bacillus* isolées. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures (**figure 10**). Le résultat positif se traduit par l'absence de culture autour des puits (**Siboukeur, 2011**).



**Figure 10:** Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des puits.

## VI. Conservation des souches

Seules les souches à coloration de Gram positif présentant un spectre antimicrobien sont conservées dans des tubes à essai contenant de la gélose inclinée afin de les utiliser pour des tests ultérieurs (**Figure 11**). Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 30°C pendant 24h, puis conservées à 4°C.



**Figure 11:** Schématisation des étapes de la conservation des souches.

## VII. Effet de sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques chez *Bacillus spp*

La production des antibiotiques a été réalisée en vue de détermination des sources de carbones et d'azotes qui ont permettant une bonne production des antibiotiques.

### VII.1.Préparation de l'inoculum

Des inocula ont été préparées à partir des cultures solides sur GN inclinée dans des tubes à essai des souches de K1 et N1 de *Bacillus* qui ont déjà présentés un spectre antimicrobien, et repiqués à l'aide d'une anse de platine stérile dans des tubes à essai contenant 9 ml de bouillon LB (six tubes pour chaque souche), et incubé pendant 18 h à 30°C (culture jeune en phase de croissance).

### VII.2.Préparation des précultures

L'influence de différentes sources de carbone et d'azote a été étudiée pour standardiser la production d'antibiotiques.

L'inoculum préparé de chaque souche de *Bacillus* sont mises en culture dans des Erlenmeyer de 250 ml stériles contenant 50 ml de bouillon LB, puis chaque erlenmeyer est additionné d'une seule source (trois Erlenmeyer pour trois différentes sources de carbone et trois d'autres pour trois différentes sources d'azote), 35 g par litre de l'une des sources de carbone suivantes (fructose, galactose, glucose) et 2 g par litre de l'une des sources d'azote suivants (KNO<sub>2</sub>, NaNO<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>) après chaque Erlenmeyer est fermée par le coton stérile puis incubés à 30 ° C sur un agitateur rotatif, à 250 rpm pendant 2 jours.

Pour la production des antibiotiques, chaque Erlenmeyer de 500 ml stérile contenant 100 ml de milieu de bouillon LB, est ensemencé par un inoculum de 3 ml de la préculture correspondante puis incubée aux mêmes conditions de température et d'agitation que les précultures pendant une période de 7 jours.

Après 7 jours d'incubation, chaque préparation est versée dans des tubes Eppendorf et subis une centrifugation à une vitesse de 5000 rpm pendant 20 minutes, le surnageant a été récupéré dans des tubes à essai stériles.



### VII.3.Préparation des germes-cibles

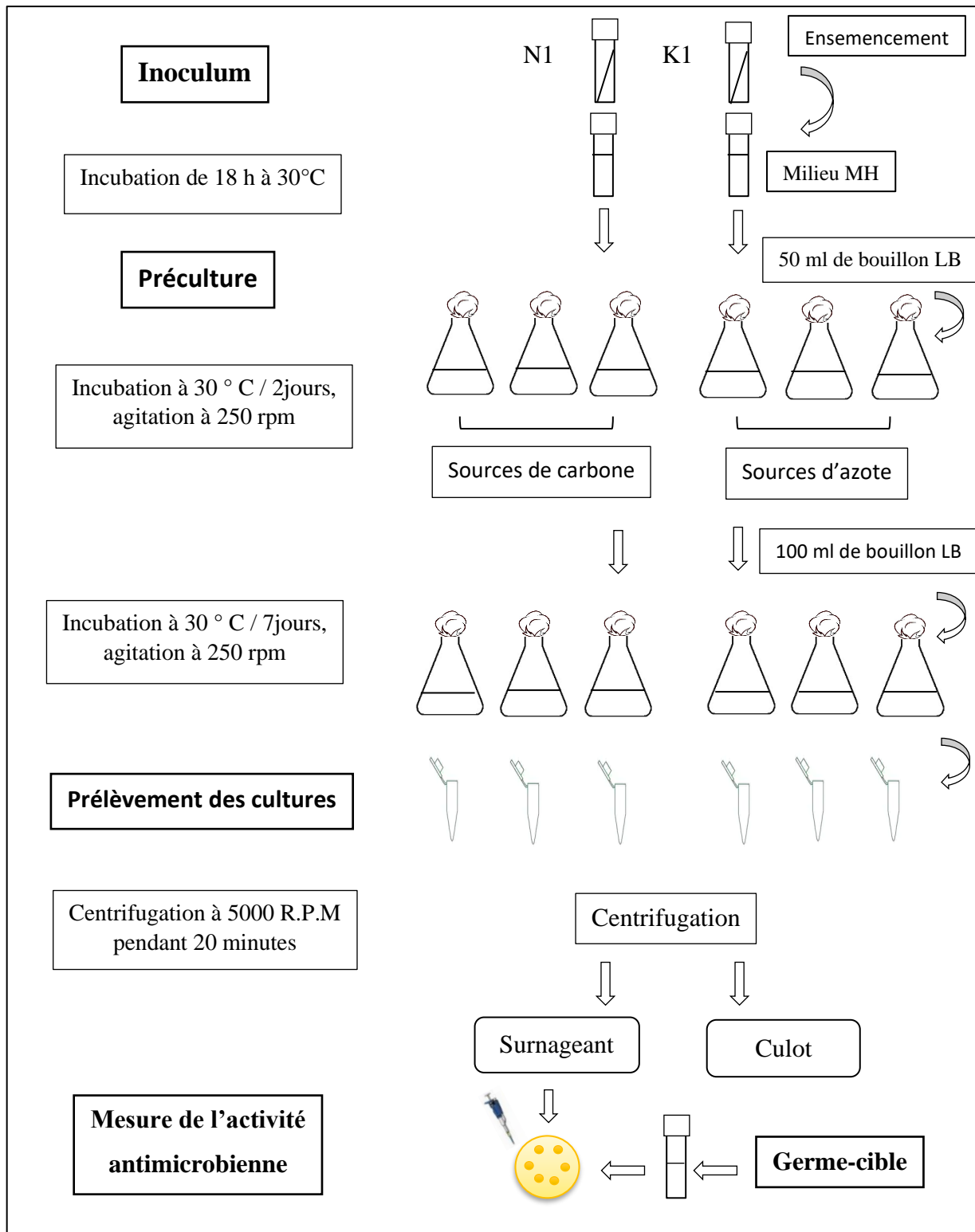
À l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées des germes-cibles ont été déchargées dans des tubes à essai stériles contenant 10 ml d'eau physiologique stérile, puis ajustées à 0.01 de densité optique à une longueur d'onde 600 nm.

### VII.4.Mesure de l'activité antimicrobienne

Le test d'activité antimicrobienne de cet extrait a été réalisé contre une gamme de bactéries Gram positives, de bactéries Gram négatives, par la méthode des puits (**Figure 12**).

L'ensemencement est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque suspension bactérienne sur une boîte de Pétri contenant le milieu Muller Hinton à l'aide d'un râteau stérile en verre.

Après séchage de 5min, six puits ont été creusés à l'aide d'un bout de pipette pasteur, puis à l'aide d'une micropipette remplis par 0.03 ml du surnageant de la culture des espèces de *Bacillus*. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures, et l'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant la zone d'inhibition de la croissance autour des puits.



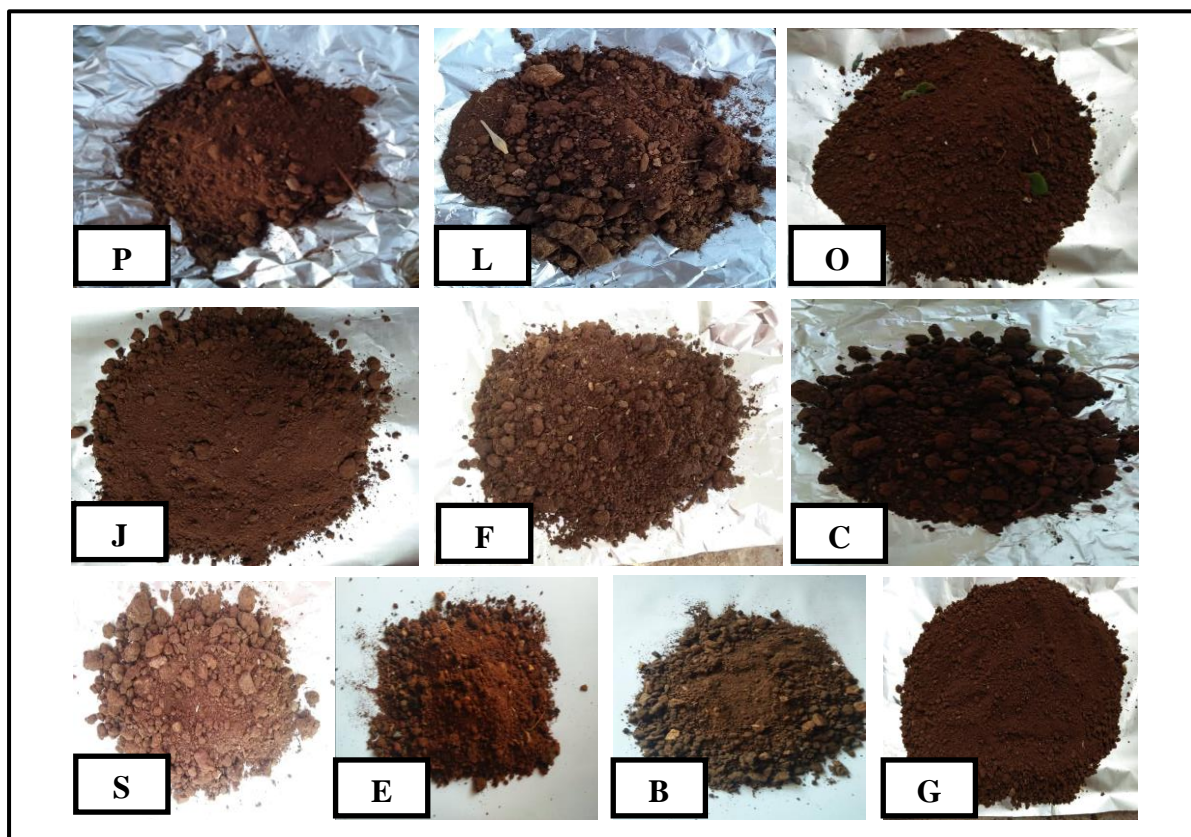
**Figure 12:** Schéma de protocole des productions des antibiotiques des souches de *Bacillus* en milieu liquide.

# *Résultats et discussion*

### I. Echantillonnage

Les prélèvements effectués dans ce travail sont choisis sur la base de la différenciation des sols, leurs endroits et le type de culture. A cet effet, les échantillons sont collectés à partir du sol de pins à pignons, de lavande, d'olivier, d'un jardin, d'eucalyptus, de blé, d'une forêt, de pois chiches, de pois et de grenade.

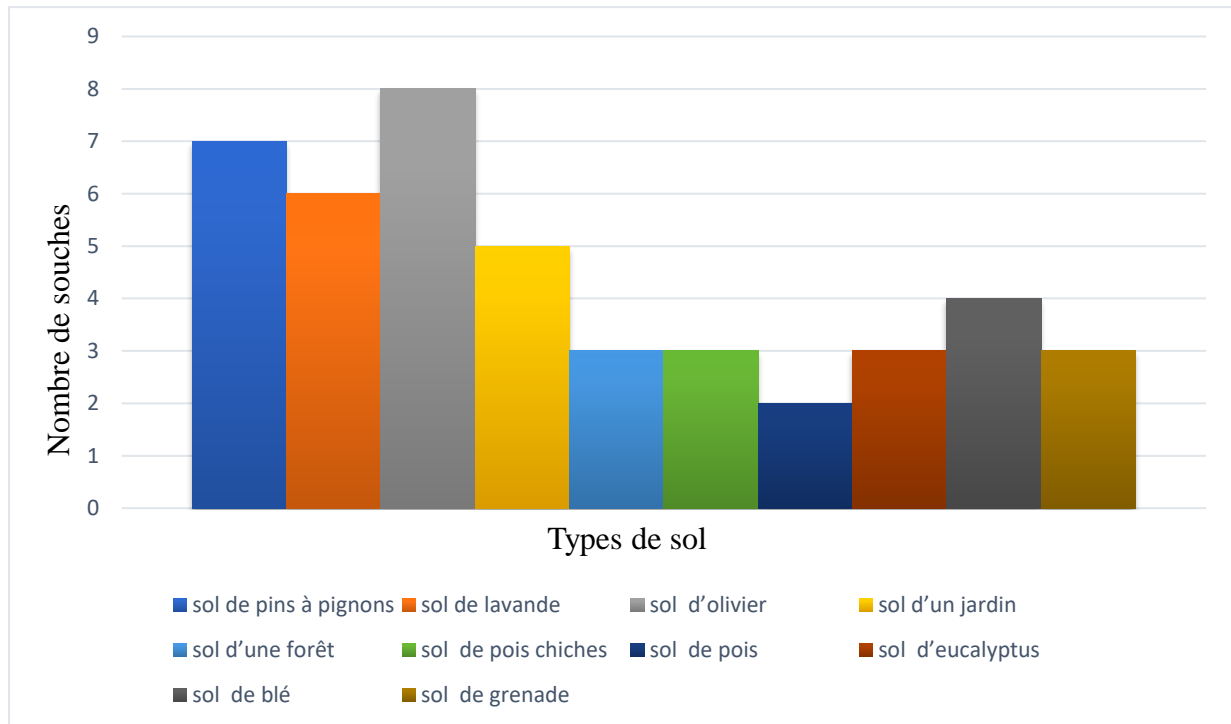
La couleur des échantillons est l'un des paramètres indicateurs de la charge microbienne. Les sols de couleur noire ou marron foncé sont riches en microorganismes (**Figure 13**). Les prélèvements effectués sont ensuite transportés au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université BELHADJ Bouchaib d'Ain Temouchent afin de procéder les analyses microbiologiques.



**Figure 13:** Aspect macroscopique des prélèvements effectués de couleurs différentes.

**P** : sol de pins à pignons ; **L** : sol de lavande ; **O** : sol d'olivier ; **J** : sol de jardin ; **F** : sol d'une forêt ; **C** : sol de pois chiches ; **S** : sol de pois ; **E** : sol d'eucalyptus ; **B** : sol de blé ; **G** : sol de grenade.

Après la préparation des différentes dilutions de la solution mère jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ . L'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque solution sur la surface de gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'isolement de 44 différentes souches (**Figure 14**), répartis sur les sites de prélèvements effectués.

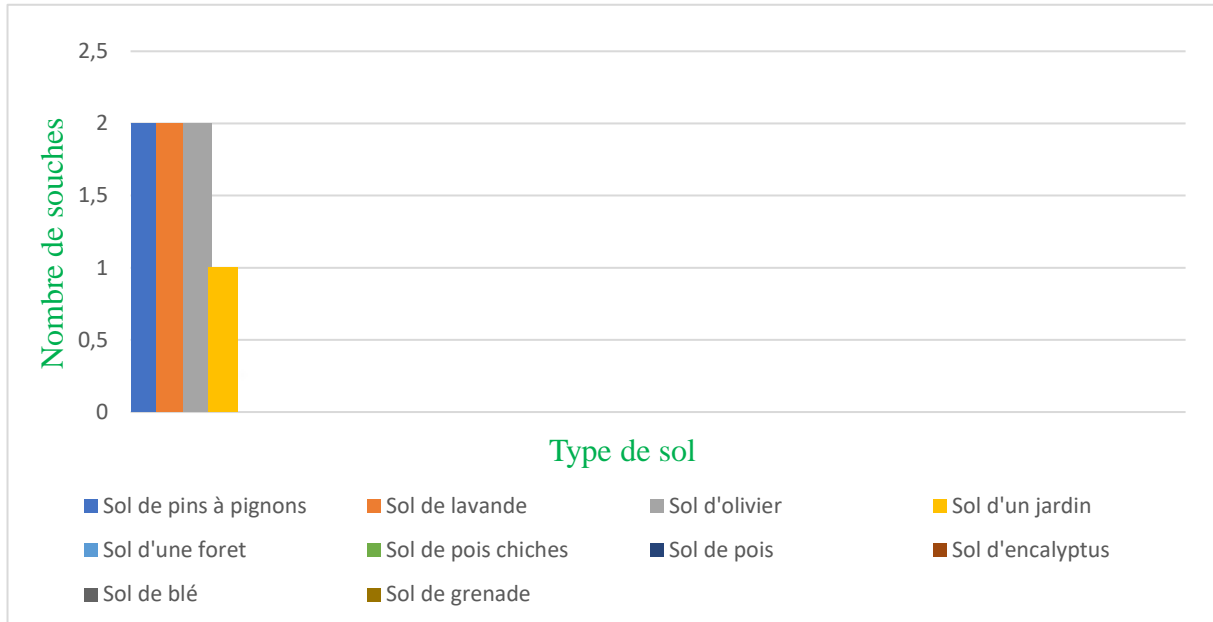


**Figure 14:** Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués.

D'après l'histogramme, il en ressort qu'il y a présence d'une microflore dans la totalité des dix sites de prélèvements effectués. La comparaison de la charge microbienne totale présente dans les dix sites a permis de déduire que le sol de d'olivier contient une microflore assez importante par rapport au sol de pins à pignons. Cependant, le sol de lavande a montré la présence d'une faible diversité microbienne que les deux premiers sols. Une faible charge microbienne dans le sol de jardin suivi par le sol de blé a été remarquée. Bien qu'il soit facile de remarquer la même quantité dans chacun des quatre échantillons du sol du forêt, de pois chiches, d'eucalyptus, et de grenade. Cependant, le sol de pois a montré la présence d'une faible diversité microbienne.

## II. Traitement thermique

Parmi les 44 souches, 7 souches (**figure 15**) sont les résultats d'une sélection thermique à 80°C pendant 10min des dilutions de  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  de chaque échantillon.



**Figure 15:** Nombre des souches obtenus de chaque type de sol après le traitement thermique.

A travers les résultats obtenus, une différence évidente de la résistance des souches de chaque sol à la chaleur a été remarquée, bien qu'il soit facile de remarquer la même biomasse de la microflore sporulant dans le sol de pins à pignons, de lavande, et d'olivier, alors que le sol du jardin montre une faible charge microbienne résistante à la température de 80°C. Cependant on peut noter facilement l'absence totale des souches qui résistent à la chaleur dans les 6 échantillons de sol d'une forêt, de pois chiches, de pois, d'eucalyptus, de blé et le sol de grenade.

## III. Isolement des souches

Un total de 44 souches a été isolées et purifiées sur milieu gélose nutritive (GN). Les isolats écrit en rouge = résultats du traitement thermique (**tableau 3**).

**Tableau 3:** Symboles des échantillons.

P	L	O	J	F	C	S	E	B	G
Pins à pignons	Lavande	Olivier	Jardin	Forêt	Pois chiches	Pois	Eucalyptus	Blé	Grenade

#### IV. Identification des souches de *Bacillus* isolées

##### IV.1. Aspect macroscopique des colonies :

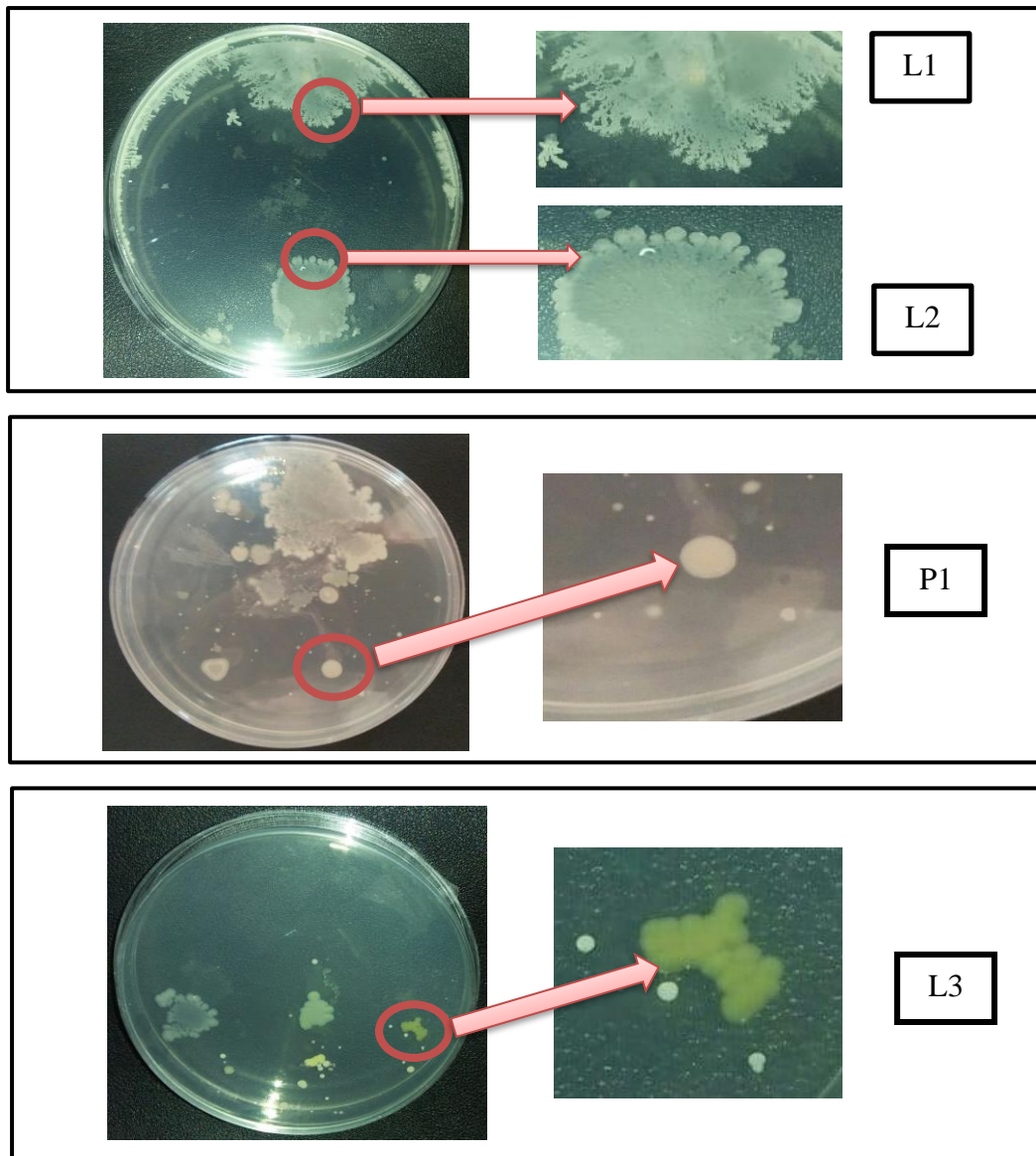
L'observation des colonies sur Gélose Nutritive (GN) après l'incubation confirme la pureté des isolats : les résultats de l'observation macroscopique à l'œil nu (aspect des colonies) (**tableau 5**), la taille, la forme, la couleur, la surface et la consistance des colonies est résumé dans le tableau suivant (**tableau 4**).

**Tableau 4:** Codes des isolats et leurs nombres.

Code des isolats									
Sol de pins à pignons	Sol de lavande	Sol d'olivier	Sol d'un jardin	Sol de forêt	Sol de pois chiches	Sol de pois	Sol d'eucalyptus	Sol de blé	Sol de grenade
P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7.	L1-L2-L3-L4-L5-L6.	O1-O2-O3-O4-O5-O6-O7-O8.	J1-J2-J3-J4-J5.	F1-F2-F3.	C1-C2-C3.	S1-S2.	E1-E2-E3.	B1-B2-B3-B4.	G1-G2-G3.

**Tableau 5:** Présentation de différents aspects macroscopique des souches isolées.

Critères Souches	Couleur	Forme	Surface	Consistance	Taille
<b>L2</b>	Blanchâtre	Irrégulire	Lisse	Crouteuse	Grande
<b>L3</b>	Jaunâtre	Ronde	Lisse	Crémeuse	Petite
<b>P1</b>	Translucide	Ronde	Lisse	Crémeuse	Moyenne
<b>L1</b>	Blanchâtre	Irrégulier	Rugueuse	Crouteuse	Grande



**Figure 16:** Présentation des différents aspects macroscopique des colonies après 48h d'incubation à 37°C sur GN.

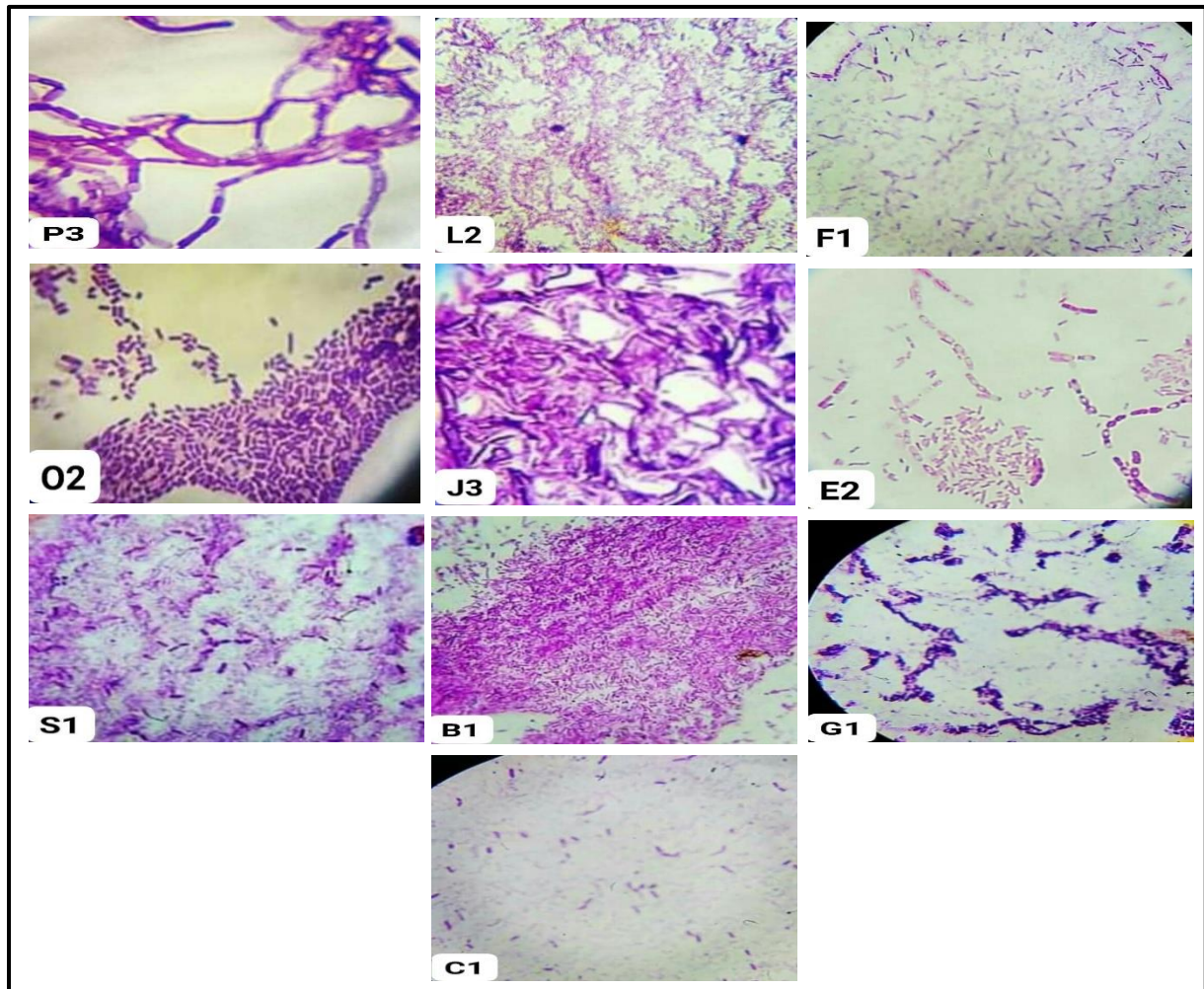
#### IV.2. Etude microscopique des colonies :

Cette étude est réalisée en observant sous microscope optique l'aspect des cellules pour confirmer la pureté des bactéries qui ont une forme bâtonnet à Gram positif sporulantes (les bactéries qui apparaissent en violée).

Sur 44 souches isolées, 34 ont présentées ces deux caractéristiques microscopiques, et qui ont subis ensuite un criblage pour sélectionner les souches de *Bacillus* qui présente un spectre antimicrobien.



L'examen microscopique révèle des souches sous forme de bâtonnets droits à extrémités arrondies, de taille variable à Gram positif, avec des spores ovales centrales ou subterminales non déformantes et des spores terminales déformantes. Ces bacilles étaient soit regroupées en diplobacilles, soit regroupées en chaînettes, soit isolées (**figure 17**).



**Figure 17:** Observation microscopique des souches P3, L2, O2, J3, F1, C1, S1, E2, B1, G1, après une coloration de Gram (Gross 100\*10).

### V. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne

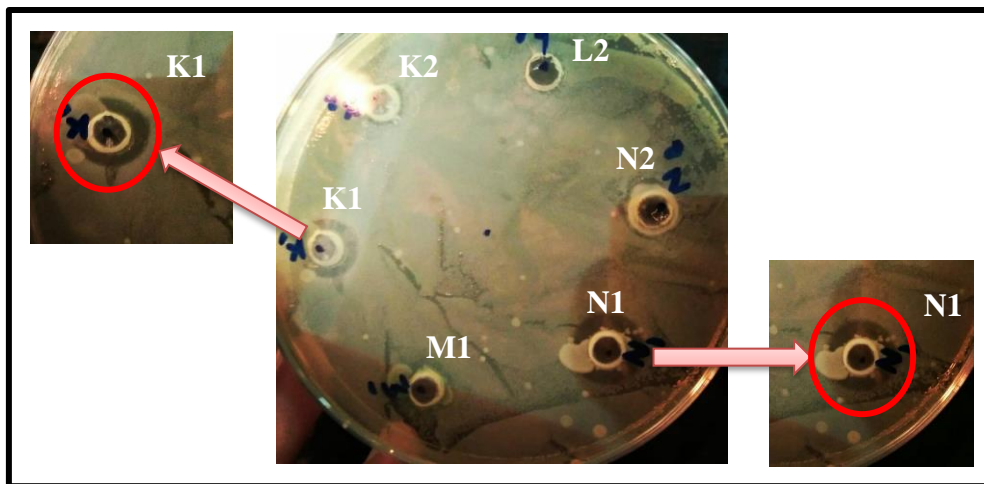
Cette méthode est utilisée pour la recherche de l'activité antimicrobienne des souches de *Bacillus* isolées contre les souches suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*.

### V.1. Production des substances antimicrobiennes

Consiste à produire des métabolites secondaires par les souches de *Bacillus* diffusés dans un milieu de fermentation liquide, pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne.

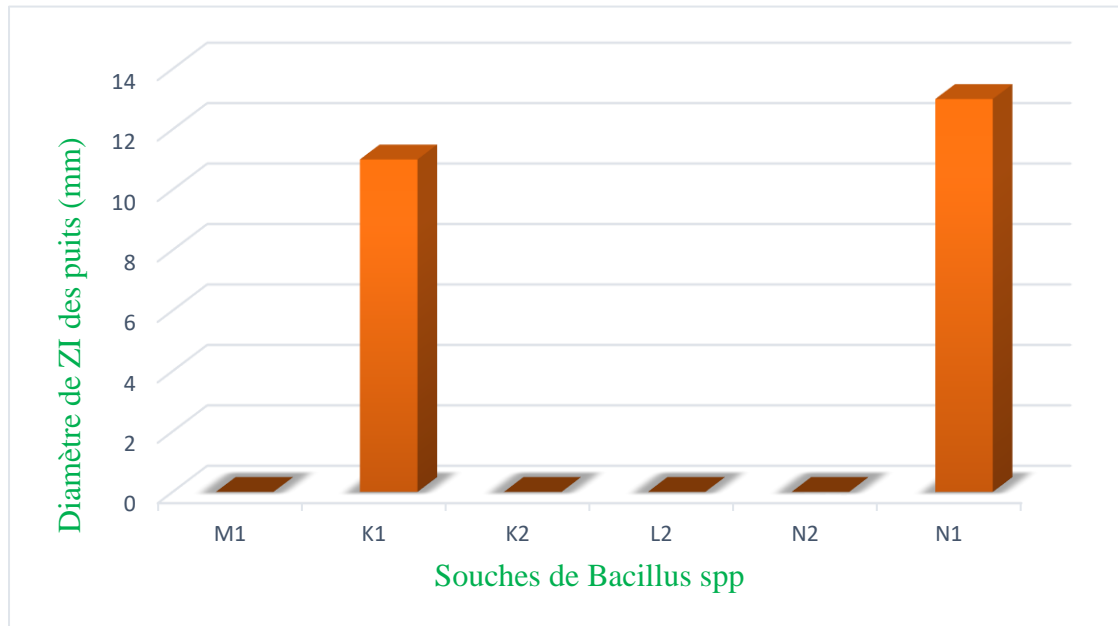
### V.2. Antibiogramme

L'activité antimicrobienne des surnageants de cultures des souches de *Bacillus* sélectionnées K1, K2, L2, N2, N1, M1 a été évaluée sur milieu solide ensemencé par une suspension de *Escherichia coli* par la technique des puits.



**Figure 18 :** Effet de l'activité antimicrobienne des six souches de *Bacillus* ensemencées par la méthode des puits vis à vis *Escherichia coli* : M1, K1, K2, L2, N2, N1.

Des zones claires d'inhibition autour des puits contenant le surnageant de fermentation des souches isolées ont apparues après l'incubation, ce qui indique qu'il y a synthèse de substances bioactives contre la souche test (**figure 18**).



**Figure 19 :** Diamètre des zones d'inhibition après la mise en évidence de l'activité antimicrobienne du *Bacillus* spp.

Les résultats (**figure 19**) montrent que seuls les deux souches K1 et N1 présentent une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*. En effet, la souche K1 a donné une zone d'inhibition égale à 11 mm de diamètre, et la souche N1 présente une zone d'inhibition de 13 mm de diamètre contre la souche cible *E. Coli*, par contre, les autres souches M1, K2, L2 et N2 sont dépourvues de l'activité antimicrobienne.

Par conséquent, la souche N1 présente un spectre d'activité antimicrobien plus important que la souche K1, comme indique le **tableau 6**.

**Tableau 6:** Présentation des résultats de l'antibiogramme des souches de *Bacillus spp.*

Souches de <i>Bacillus</i> isolé	Souches testés ( <i>E. Coli</i> ).
M1	-
K1	+
K2	-
L2	-
N2	-
N1	++

- : absence d'activité antimicrobienne.

+ : Faible activité antimicrobienne.

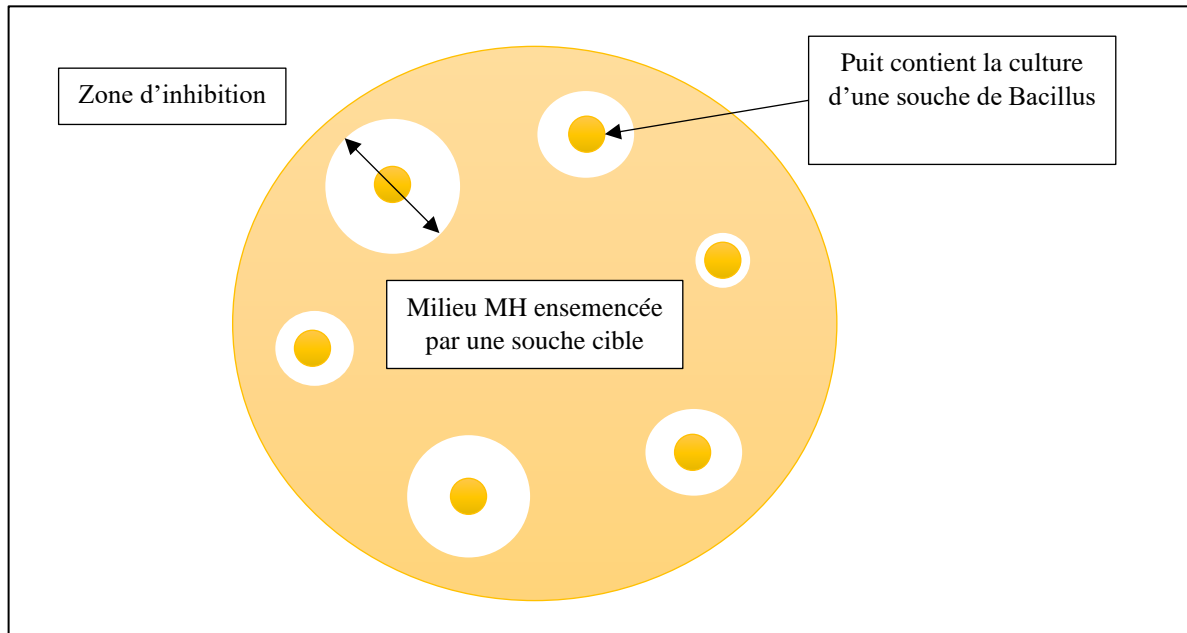
++ : Forte activité antimicrobienne.

## VI. Effet de sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques chez *Bacillus spp*

L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la méthode des puits. Elle permet de détecter l'effet inhibiteur des souches de *Bacillus* envers les souches cibles utilisées. Les résultats doivent montrer les diamètres des zones d'inhibition de souches de *Bacillus* vis-à-vis des bactéries cibles.

Le résultat positif est traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance des souches de *Bacillus* et le choix de source est basé sur l'importance de la taille de cette zone (Omura, 1992).

Plus que la zone d'inhibition est importante, plus que la sensibilité des souches cibles est grande vis-à-vis les antibiotiques produits par les souches de *Bacillus* testées, c'est-à-dire la source de nutriment ajoutée au milieu de culture à un bon effet sur la production des antibiotiques par les souches étudiées, et par conséquent l'activité antimicrobienne est étroitement liée à la composition des milieux de culture (Figure 20).



**Figure 20 :** Schéma représentative d'une boîte de Pétri contient le milieu MH ensemencé par la méthode des puits.

### Discussion :

Ce travail consiste à isoler et identifier des souches du genre *Bacillus spp* à partir du sol et la détermination de l'activité antibactérienne de ces isolats.

Les *Bacillus* sont des bactéries ubiquitaires. Elles sont fréquemment saprophytes le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote (**Schultz et al., 2017 ; Ping et al., 2019**). Et à travers cela, nous avons choisi d'effectuer notre prélèvement à partir du sol, afin d'isoler des souches de *Bacillus* sur lesquels nous avons mené notre recherche.

Un des critères morphologiques fondamentaux des sols facilement accessibles est sa couleur, elle donne de précieuses indications sur la présence des microorganismes. La couleur plus foncée (noire) est généralement associée à l'accumulation d'une forte teneur en matières organiques dans le sol, sa teneur diminue avec la profondeur et la couleur s'éclaircie (**Escadafal et al., 1988 ; Delaunois et al., 2008 ; Weill, 2008 ; Ardouin, 2012**), et donc la présence d'une charge microbienne qui nécessite des besoins nutritionnels et présente des fortes capacités à augmenter leur taux de croissance quand les conditions en ressources sont abondantes ; de ce fait, il serait plutôt impliqué dans la dégradation de la matière organique fraîche (**Wauthy, 1982 ; Balandreau, 2000 ; Fierer et al., 2007**). C'est pourquoi nous avons essayé de choisir des échantillons de sol plus foncés afin d'obtenir la plus grande diversité bactérienne possible (**figure 13**).

D'après les résultats, l'échantillonnage de dix différents échantillons de sol a permis l'isolement de 44 souches bactériennes (**figure 14**), ce nombre reste très négligeable par rapport à l'énorme diversité en souches bactériennes d'un écosystème où les conditions climatiques et physicochimiques sont optimales. Le nombre de souches isolées diffère légèrement selon la région dont on a répertorié.

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et est à ce titre un réservoir majeur de la diversité microbienne. De nombreux facteurs biotiques et abiotiques interviennent pour moduler la structure des communautés bactériennes des sols tant en termes de diversité que d'effectifs (**Hassink, 1993 ; Borneman et al., 1996 ; Borneman et Triplett, 1997 ; Noguez, 2005**).

Cette capacité à survivre et à se développer dans des écosystèmes aussi différents est basée sur la production de leurs endospores robustes, leur diversité de propriétés physiologiques et leurs exigences de croissance (**Abriouel et al., 2011**).

Comme chaque sol a ses propres caractéristiques physicochimiques, chaque sol contient donc une biodiversité qui lui est propre, que ce soit en termes de densité ou de diversité d'individus.

Dans une étude de (**Cherif, 2018**) a montré également la présence d'une importante diversité bactérienne dans des échantillons de sol collectés de la rhizosphère du blé de trois régions différentes et que chaque sol présente une microflore différente de l'autre.

Au niveau du sol, la charge, l'activité et la distribution des communautés bactériennes est hétérogène et varient considérablement d'une région à une autre suivant : le pH, la disponibilité des nutriments, d'énergie, le contenu en carbone et en azote, le taux de matière organique, la texture des sols, la température, l'humidité, la salinité et les variations climatiques (**Ranjard et Richaume, 2001 ; Gignoux et al., 2001 ; Muller et al., 2002 Dequiedt et al., 2011**).

Les spores font partie des formes les plus résistantes des organismes vivants, intervient lorsque les conditions deviennent défavorables à la croissance et permettent à la bactérie de survivre et résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur (**Nicholson et al., 2002 ; Setlow, 2006**).

En effet, le traitement thermique a permis de détecter un nombre de *Bacillus* ce qui indique qu'elles sont résistantes aux conditions défavorables de milieu (la chaleur) (**figure 15**).

Plusieurs auteurs ont rapporté que les spores du groupe *Bacillus* pouvaient survivre plusieurs millions d'années dans des niches écologiques spécifiques, en raison de la persistance des spores à la chaleur, aux radiations et aux agents chimiques (**Cano et Borucki, 1995 ; Vreeland et al., 2000 ; Cortezzo et Setlow, 2005 ; Setlow, 2006**).

Dans le même contexte plusieurs travaux sont basés sur des traitements thermiques de la souche *Bacillus*, et indiquent que ce traitement permet d'isoler les formes sporulées et à éliminer les formes végétatives (**Caudrillier, 2008 ; Batahri, 2014 ; Benabdallah, 2014 ; Bouhafs et Boussebou, 2015 ; Medane, 2017 ; Bouali, 2017 ; Cherif, 2018 ; Kaya et Kayath, 2018**).



L'assurance de l'appartenance des souches de genre *Bacillus* a été assurée par l'étude de certains caractères morphologiques à savoir l'étude des caractéristiques des colonies isolées (forme, aspect et taille).

Les souches appartenant au genre *Bacillus* possèdent toutes les caractères cultureux décrits par (Euzéby, 2010 ; Abe et al., 2018 ; Meddas et al., 2019). Les bactéries se développent bien à la surface de la gélose, l'aspect des colonies obtenues est extrêmement variable, on révèle quatre types de colonies (Tableau 5) : des colonies Grandes, blanchâtres de forme irrégulières, crouteuses, lisses ou rugueuses ; petites colonies crémeuses, de couleur jaunâtres, rondes, et d'une surface lisse ; et de moyennes colonies rondes, d'une couleur translucide, lisse, et de consistance crémeuses (Figure 16).

Globalement les caractères morphologiques ont permis de rattacher les isolats aux genres *Bacillus*, précédemment cités. Ces résultats s'accordent avec celui du (Batahri, 2014 ; Bouhafis et Boussebou, 2015 ; Abe et al., 2018 ; Kaya et Kayath, 2018 ; Meddas et al., 2019), par des observation phénotypiques sur des cultures incubées en milieu GN qui révélais que tous les souches de *Bacillus* possèdes l'ensembles des caractères macroscopiques que nous avons déjà signalés.

**Tableau 7:** Illustration du nombre des souches selon les caractères culturels et morphologiques des isolats du sol.

Aspect macroscopique des colonies	Nombre des souches
Colonies Grandes, blanchâtres de forme irrégulières, lisses et crouteuses	26,5% souches
Colonies petites crémeuses, de couleur jaunâtres, rondes, et d'une surface lisse.	14,7% souches
Colonies moyennes rondes, d'une couleur translucide, lisse, et de consistance crémeuse.	35,3% souches
Colonies Grandes, blanchâtres de forme irréguliers, crouteuses et rugueuses.	23,5% souches



L'utilisation de la coloration de Gram combinée à une observation microscopique montre que la majorité des isolats testés apparaissent comme des bacilles à Gram positif, produisant des spores (**figure 17**).

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bactéries Gram positives, aérobies et endospores qui se caractérisent par leurs morphologies cellulaires en forme de bâtonnet (**Abriouel et al., 2011 ; Celandroni et al., 2019**).

Ces résultats sont proches à ceux obtenus par (**Euzéby, 2010 ; Benabdallah, 2014 ; Bouhafis et Boussebou, 2015 ; Abe et al., 2018 ; Meddas et al., 2019**), et l'ensemble des tests effectués sur *Bacillus* montrent que ce sont des bâtonnets à gram positive avec des spores.

Des colonies à différents aspects macroscopique et microscopique sont apparues après une série de purification, 34 souches ont été retenues selon les critères de sélection déjà fixés auparavant, des bacilles à Gram positif sont capables de former les spores.

Les microorganismes, notamment les bactéries, produisent une diversité extraordinaire de métabolites secondaires. Parmi les métabolites secondaires les plus étudiés se trouvent les molécules à activité antibiotique telles que les antibactériens ou les antifongiques (**Galet., 2014**).

Dans l'étude, de l'activité antimicrobienne des six isolats de souches *Bacillus* isolées du sol a été évaluée contre *Escherichia coli*. Les résultats obtenus ont montrés que la croissance d'*E.coli* a été inhibée par deux souches de *Bacillus* codées respectivement N1 et K1. Par contre les quatre d'autre souches codées : M1, K2, L2, N2 sont incapables de produire les substances antimicrobiennes (**figure 18**).

Les membres du groupe *Bacillus sensu lato* sont considérés comme de bons producteurs de substances antimicrobiennes, y compris les antibiotiques peptidiques et lipopeptidiques et les bactériocines (**Abriouel et al., 2011**).

Ainsi que, les bactéries du genre *Bacillus* sont connues pour produire des produits naturels, tels que la bacitracine, la polymyxine, la tyrosidine, la grmysidine, la subtiline et la sirkuline. Ils possèdent des activités antagonistes contre de nombreux pathogènes bactériens et fongiques et sont souvent utilisés comme agents pour le traitement et / ou la prévention de différentes infections végétales et animales (**Kıvanç et al., 2014**).

Par ailleurs, la croissance de l'antibiorésistance de ce germe *E. coli* lors des infections communautaires est considérée aussi comme un phénomène alarmant puisque les taux de résistance restent très élevés (Zahir et al., 2018).

Les résultats montrent que le diamètre d'inhibition varie entre 11 mm et 13 mm. La meilleure activité inhibitrice a été observée avec la souche N1 avec ZI=13mm (figure 19).

Les chercheurs utilisent principalement des méthodes de diffusion sur gélose à partir des puits ou des disques pour évaluer l'activité des substances antimicrobiennes.

Oscariz et al., (1999) ont rapporté que la souche de *B. cereus* isolée du sol était active contre la plupart des bactéries Gram-positives, Aslim et al., (2002) ont démontré que les souches de *Bacillus* avaient des effets plus importants sur les bactéries Gram-positives que sur les bactéries Gram-négatives.

Cependant, Prescott et al., (2008) dans leurs recherches ont rapporté que la bacitracine produite par *Bacillus sp*, inhibe *E. coli* et *S. aureus*, ce qui confirme les résultats de notre étude.

Dans toutes ces études, la zone d'inhibition autour des disques a été mesurée, tandis que dans notre étude les zones d'inhibition autour des puits ont été mesurées. Il a été conclu que *Bacillus spp*, isolés au cours de cette étude à partir des échantillons de sol possédaient une activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes à Gram négatif.

Cette inhibition peut être due à la capacité de certaines espèces de *Bacillus* à synthétiser des composés antimicrobiens, exercent une activité plus ou moins importante à l'égard d'*E. Coli* (tableau 6). Alors que nombreuses souches de la collection de *Bacillus* isolés du sol ont une forte activité antimicrobienne.

L'activité antimicrobienne de *Bacillus spp*, a été remarquée par les travaux des autres chercheurs. Oscariz et Pisabarro (2000), ont isolé et identifié la céréine 7, une bactériocine produite par *B. cereus* Bc7 qui inhibe la croissance de *Listeria spp*.

Bizani et Brandelli (2002), ont isolé et identifié la céréine 8A. Il s'agissait d'une bactériocine produite par *B. cereus* qui inhibe la croissance de *Listeria spp*, et *M. luteus*.

Cependant, dans une autre étude, *Bacillus subtilis* GA1 a été utilisée comme biopesticide, cette souche inhibe la flore d'altération des mangues, tels que *Colletotricum sp* ; *Candida sp* ; *Penicillium sp* ; *Pseudomonas sp* ; et permis de conserver les mangues pour plus de dix jours (Marcellin, 2015).

Dans la dernière étude, la production des antibiotiques par les souches de *Bacillus* en milieu liquide a été testé, afin de déduire l'importance de la composition de milieu de culture et l'effet de nutriment concernant quelques sources de carbone et d'azote sur l'activité antibactérienne de ce genre de *Bacillus spp* (**figure 20**).

Plusieurs travaux ont prouvé que l'activité antimicrobienne est étroitement liée à la nature et la composition des milieux de culture notamment en sources de carbone et d'azote (**El-Banna et Qaddoumi, 2016 ; Arab et Kabaz, 2018**).

El-Banna et Qaddoumi en 2016 à montrer qu'il y avait un degré élevé de variation dans le niveau d'activité antimicrobienne lorsque différentes sources de carbone étaient testées dans le milieu.

Arab et Kabaz (2018), est également montrer que la cinétique de production des antibiotiques de la souches *TAS18* sur différents milieux est affecter par le type de la source de carbone ou d'azote additionnés et qui sont peut soit ralentir ou diminuer la production.

Et par conséquence Sanchez et *al.*, (2010), à prouver que l'effet de la source de carbone sur la production d'antibiotiques a fait l'objet d'études continues tant pour l'industrie que pour les groupes de recherche, non seulement du point de vue de la fermentation, mais aussi du point de vue biochimique et biologique moléculaire.

Donc, les influences des composants du milieu et des conditions environnementales sont une étape initiale et importante pour améliorer la production de métabolites du genre *Bacillus*.

# Conclusion

Les bactéries du genre *Bacillus spp*, sont caractérisées par leurs capacités à produire des métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne, pour cela les souches de *Bacillus spp* ont fait l'objet de plusieurs études exhaustives en raison de leur potentiel biotechnologique dans le domaine de la lutte biologique.

La surproduction des antibiotiques exige l'utilisation des méthodes d'amélioration de la biosynthèse. L'une d'elle consiste à la recherche des conditions de culture favorables, dans ce concept, notre recherche consiste à l'isolement des souches de *Bacillus spp* à partir du sol de différentes régions puis sélectionner les espèces ayant la plus forte production en substances antimicrobiennes, et optimiser cette production en changeant les sources de carbones et d'azotes dans le milieu de culture.

44 souches présentant les caractéristiques de *Bacillus spp* ont été isolées, et subi une fermentation afin de produire des métabolites ayant une activité antimicrobienne. Deux souches (K1 et N1) ont montré une activité vis-à-vis le germe cible d'*Escherichia coli*, et donc les espèces de genre *Bacillus* sont actifs contre les bactéries à gram négatifs.

L'effet des sources de nutriments sur la production des molécules actives de ces souches du genre *Bacillus spp* a été étudiée, la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture ont une influence sur la production des antibiotiques chez les bactéries du genre *Bacillus spp*.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- Isolement et identification moléculaire des souches ayant une forte production des substances antimicrobiennes.
- La détermination des protocoles permettant l'extraction, la purification et la caractérisation des molécules produites en utilisant des techniques chromatographiques.
- Optimisation de production de ce genre de métabolites en utilisant d'autres sources d'énergie et d'azote.

# Références

1. **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. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(5), 2284-2293.
2. **Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., et Gálvez, A. (2011).** Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*, 35(1), 201-232.
3. **Aharonowitz, Y. (1980).** Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 209-233.
4. **Amin, A., Khan, M. A., Ehsanullah, M., Haroon, U., Azam, S. M. F., et Hameed, A. (2012).** Production of peptide antibiotics by Bacillus sp: GU 057 indigenously isolated from saline soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1340-1346.
5. **Arab, D., et Kabaz, N. 2018.** Effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques par la souche TAS18 d'*Actinomadura sp.* isolée d'un sédiment marin de Tipaza.
6. **Ardouin, A. (2012).** Guide pratique pour la description des sols de France. *CEN Bourgogne*.
7. **Arora, P. K. (2019).** Microbial Technology for the Welfare of Society. *Springer Singapore*.
8. **Aslim, B., Saglam, N., et Beyatli, Y. (2002).** Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. *Turkish Journal of Biology*, 26(1), 41-48.
9. **Balandreau, J. (2000).** La diversité microbienne. *Aménagement et Nature*.
10. **Baron, S. (1996).** Medical Microbiology, 4th edition, *University of Texas Medical Branch at Galveston*.
11. **Batahri, N. I. (2014).** Propriété d'adhésion et pouvoir enzymatique des bacilles thermophiles isolés du lait liquide et en poudre.
12. **Benabdallah, A. M. (2014).** Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre Bacillus de la Sebkhha D'Oran (caractérisation phénotypique).
13. **Bizani, D., et Brandelli, A. (2002).** Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated Bacillus sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 512-519.

14. **Borneman, J., et Triplett, E. W., (1997).** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2647-2653.
15. **Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M. (1996).** Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol.* 62: 1935-1943.
16. **Bouali, W. (2017).** Contribution à l'élaboration d'un soucier bactérien et caractérisation de la flore *Bacillus cereus* dans le Sud-Ouest Algérien.
17. **Bouhafs, M., Boussebou, A. R. (2015).** Recherche et identification des bacilles thermophiles facultatifs en industrie laitière.
18. **Briat, J. F., et Job, D. (2017).** Les sols et la vie souterraine : Des enjeux majeurs en agroécologie. *Editions Quae.*
19. **Bron, S., Meima, R., Marten, V. D. J., Wipat, A., et Harwood, C. R.** Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species.
20. **Bruyninckx, H. (2019).** Terres et sols : vers l'utilisation et la gestion durables de ces ressources vitales. *Agence européenne pour l'environnement*, 1831-2632.
21. **Bundale, S., Begde, D., Nashikkar, N., Kadam, T., et Upadhyay, A. (2015).** Optimization of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil. *Advances in Microbiology*, 5(06), 441.
22. **Calvet, R. (2003).** Le sol : propriétés et fonctions. Constitution, structure, phénomènes aux interfaces (Vol. 1). *France Agricole Editions.*
23. **Calvet, R. (2003).** Le sol: propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques, applications agronomiques et environnementales (Vol. 2). *France Agricole Editions.*
24. **Cano, R. J., et Borucki, M. K. (1995).** Revival and identification of bacterial spores in 25-to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*, 268(5213), 1060-1064.
25. **Caudrillier, J. (2008).** Evaluation et validation des traitements thermiques appliqués à une gamme de matériels et milieux de culture.
26. **Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., et Ghelardi, E. (2019).** Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PloS one*, 14(5).
27. **Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Daffonchio, D., et Boudabous, A. (2003).** Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 990-1000.



28. **Cherif, H. (2018).** Amélioration de la croissance du blé dur en milieu salin par inoculation avec bacillus sp. et pantoea agglomerans isolées de sols.
29. **Cortezzo, D. E., et Setlow, P. (2005).** Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of Bacillus subtilis to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, 98(3), 606-617.
30. **Cote, C. K., Heffron, J. D., Bozue, J. A., et Welkos, S. L. (2015).** Bacillus anthracis and other Bacillus species. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1789-1844). Academic Press.
31. **Deguine, J. P., Gloanec, C., Laurent, P., Ratnadass, A., et Aubertot, J. N. (2016).** Protection agroécologique des cultures. *Éditions Quae*.
32. **Delaunois, A., Ferrie, Y., Bouche, M., Colin, C., et Rionde, C. (2008).** Guide pour la description et l'évaluation de la fertilité des sols destiné aux agriculteurs et aux agronomes. *Montpellier: Chambre d'Agriculture du Tarn, INRA*.
33. **Dequiedt, S., Saby, N. P. A., Lelièvre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., Bispo, A., Lemanceau, P., et Ranjard, L. (2011).** Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography* 20, 641–652.
34. **Deveau, A., Antony-Babu, S., Robin, C., Le Tacon, F., Uroz, S., et Frey, K. P. (2014).** Les bactéries, des partenaires méconnus de la truffe. *Le Trufficulteur Français*, 87(2), 16.
35. **El-Banna, N., et Qaddoumi, S. S. (2016).** Antimicrobial activity of Bacillus cereus : Isolation, identification and the effect of carbon and nitrogen source on its antagonistic activity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 8(2), 7-13.
36. **Elshaghabee, F., Rokana, N., Gulhane, R. D, Sharma, C., et Panwar, H. (2017).** Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1490.
37. **Eric, D. (2008).** *Bacillus cereus*, p 14-15.
38. **Eric, D. (2008).** *Bacillus Cereus*. Lavoisier. 400 PAGES.
39. **Escadafal, R., Girard, M. C., et Courault, D. (1988).** La couleur des sols: appréciation, mesure et relations avec les propriétés spectrales.
40. **Euzéby, J. (2010).** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 5), 1009-1010.

41. **Fierer, N., Bradford, M. A., et Jackson, R. B. (2007).** Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354-1364.
42. **Galet, J. (2014).** Vers la compréhension des dialogues microbiens dans les écosystèmes du sol: étude de l'interaction entre Streptomyces et Pseudomonas.
43. **Gignoux, J., House, J., Hall, D., Masse, D., Nacro, H. B., et Abbadie, L. (2001).** Design and test of a generic cohort model of soil organic matter decomposition: the Somko model. *Global Ecology et Biogeography*, 10: 639-660.
44. **Graumann, P. (2007).** *Bacillus. Cellular and molecular biology.*
45. **Greenwood, D., Barer, M., Slack, R., et Lrving, W. (2012).** Medical Microbiology, With Studentconsult online access, 18: *Medical Microbiology*, p 237-238.
46. **Hamilaoui, L. Dehoum, H. et Chebabhi, K. (2005).** Contribution à l'étude de la lutte biologique des champignons phytopathogènes par l'utilisation de Bacillus sp, Faculte des science et science de l'ingeniorat departement de biologie.
47. **Harwood, C. R., (2013).** *Bacillus (Vol. 2). Springer Science et Business Media.*
48. **Hassink, J., Bouvman, L. A., Zwart, K. B., et Brussaard L. (1993).** Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grasslands soils. *Soil Biol Biochem.* 25: 47- 55.
49. **Hoorman, J. J., (2011).** The role of soil bacteria. *Ohio State University Extension, Columbus*, 1-4.
50. **Katz, E., et Demain, A. L. (1977).** The peptide antibiotics of Bacillus : chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 41(2), 449.
51. **Kaya, O. M. D et Kayath, A. C (2018).** Identification rapide des bactéries du genre Bacillus en utilisant une nouvelle génération des gènes de ménage codant pour les enzymes fibrinolytiques.
52. **Khan, A., et Rao, T. S. (2019).** Molecular evolution of xenobiotic degrading genes and mobile DNA elements in soil bacteria. In *Microbial Diversity in the Genomic Era* (pp. 657-678). Academic Press.
53. **Kıvanç, S. A., Takım, M., Kıvanç, M., et Güllülü, G. (2014).** Bacillus Spp. isolés de la conjonctive et de leur activité antimicrobienne potentielle contre d'autres pathogènes oculaires. *African Health Sciences*, 14 (2), 364–371.
54. **Lemaire, G., et Nicolardot, B. (Eds.). (1997).** Maîtrise de l'azote dans les agrosystèmes : Reims (France), 19-20 novembre 1996 (No. 83). *Editions Quae.*
55. **Long, S. S., Prober, C. G., et Fischer, M. (2017).** Principles and practice of pediatric infectious diseases E-Book. *Elsevier Health Sciences*, p 770-772.

56. **Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G., et Germain, P. (1996).** Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Process Biochemistry*, 31(1), 13-20.
57. **Loynachan, T. (2008).** Soil Bacteria.
58. **Makkar, R. S., Cameotra, S. S., et Banat, I. M. (2011).** Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, 1(1), 5.
59. **Malik, H. M., Gull, M., Omar, U., Kumosani, T. A., Al-Hejin, A. M., Marzouki, H. Z., et Lyer, A. P. (2018).** Evaluation of the antibacterial potential of desert truffles (*Terfezia* spp) extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Exp Biol Agric Sci*, 6, 652-660.
60. **Marcellin, O. M., Koffi, L. B., Thomas, D. A., Marcellin, D. K., et Marc, O. (2015).** Utilisation de *Bacillus subtilis* GA1 pour la lutte contre les germes d'altération de la mangue en Côte D'ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(3), 3954-3965.
61. **Marinelli, F. (2009).** Antibiotics and *Streptomyces* : the future and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2 : 20-23.
62. **Martin, J. F., et Demain, A. L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological reviews*, 44(2), 230.
63. **Medane, H. (2017).** Identification et caractérisation de la thermorésistance des spores *Bacillus Cereus* isolées de la poudre de cacao.
64. **Meddas, S. A., Oulebssir, M. H., Hadjouti, R., Reghmit, N., Houas, Y., Amirat, D., Naitbouda, L., et Doumandji, M. B (2019).** Caractérisation des *Bacillus* spp, isolées du sol d'olivier et étude de leurs potentialités de biocontrôle contre la mouche de l'olive *Dacuss Oleae* (Gmel) au nord de l'Algérie.
65. **Monteiro, L., Mariano, R. D. L. R., et Souto-Maior, A. M. (2005).** Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(1), 23-29.
66. **Muller, A. K., Westergaard, K., Christensen, S., et Sorensen, S. J. (2002).** The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microb Ecol*. 44: 49-58.
67. **Musy, A., et Soutter, M. (1991).** Physique du sol (Vol. 6). *PPUR presses polytechniques*.
68. **Ndiaye, O., Diop, A. T., Akpo, L. E., et Diène, M. (2014).** Dynamique de la teneur en carbone et en azote des sols dans les systèmes d'exploitation du Ferlo : cas du CRZ de Dahra. *Journal of Applied Biosciences*, 83, 7554-7569.

69. **Nicholson, W. L. (2002).** Roles of Bacillus endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 410-416.
70. **Noguez, A. M., Arita, H. T., Escalante, A. E., Forney, L. J., Garcia, O. F., et Souza, V. (2005).** Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol. Biogeogr.* 14: 241-248.
71. **Omura, S. (1992).** The expanded horizon for microbial metabolites. *Gene*. 115 : 141-149.
72. **Oscáriz, J. C., et Pisabarro, A. G. (2000).** Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 361-369.
73. **Oscáriz, J. C., Lasa, I., et Pisabarro, A. G. (1999).** Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178(2), 337-341.
74. **Pebret, F. (2003).** Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. *Heures de France*.
75. **Pérez, G. A., Romero, D., et De Vicente, A. (2011).** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 187-193.
76. **Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., et Fiedler, H. P. (2000).** Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of biotechnology*, 80(2), 135-142.
77. **Ping, D. Y., Chao, X. Z., Lian, Y. G., Wei, L., Feng, Z. Q., Hong, Y. D., et Yi, X. C. (2019).** A newly isolated *Bacillus subtilis* strain named WS-1 inhibited diarrhea and death caused by pathogenic *Escherichia coli* in newborn piglets. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1248.
78. **Prescot, M. L., Harley, P.J., et Klein, A. D. (2008).** Microbiology. 7th ed: Publishing.
79. **Prod, G., et Bille, J. (2017).** Aerobic Gram-Positive Bacilli. *Infectious Diseases*, 2, pp.1537-1552.
80. **Ranjard, L., et Richaume, A., (2001).** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, 152: 707-716.
81. **Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., et Oliveira, R. (2006).** Biosurfactants : potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.

82. **Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., et Bannan, J. D. (2009).** Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(10), 2429-2436.
83. **Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., et Langley, E. (2010).** Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167.
84. **Sánchez, S., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., et Rodríguez, S. R. (2010).** Carbon source regulation of antibiotic production. *The Journal of antibiotics*, 63(8), 442-459.
85. **Sanchez, S., et Demain, A. L. (2002).** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906.
86. **Sansinenea, E., et Ortiz, A. (2011).** Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology letters*, 33(8), 1523-1538.
87. **Schallmeyer, M., Singh, A., et Ward, O. P. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50(1), 1-17.
88. **Schultz, M., Burton, J. P., et Chanyi, R. M. (2017).** Use of *Bacillus* in human intestinal probiotic applications. In *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 119-123). Academic Press.
89. **Serari, Y. (1984).** Biosynthèse des antibiotiques peptidiques de *Bacillus*.
90. **Setlow, P. (2006).** Spores of *Bacillus subtilis* : their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
91. **Shibu, M. E., Leffelaar, P. A., Van Keulen, H., Aggarwal, P. K., (2006).** Quantitative description of soil organic matter dynamics – A review of approaches with reference to rice-based cropping systems. *Geoderma*, 137: 1-18.
92. **Shukla, A. K., Singh, R., Gupta, P. P., et Srivastava, A. K. (2014).** 6 Isolation of *Bacillus* spp. From soil for antimicrobial production and antibiotic resistance by Ashish Kumar Shuklai- Ravindra Singh- Pushpendra Singh- Paras Gupta and Arvind Kumar Srivastava. *Life sciences leaflets*, 48, to 55.
93. **Siboukeur A. (2011).** Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, isolée à partir du lait camelin. *Mémoire de Magister en Biologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla*. 31- 37pp.
94. **Slepecky, R. A., et Hemphill, E. H. (2006).** The Genus *Bacillus*—*Nonmedical*.

95. **Souza, R. D., Ambrosini, A., et Passaglia, L. M. (2015).** Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401-419.
96. **Todar, k. (2003).** Online textbook. Emeritus, University of Wisconsin-Madison. Department of bacteriology.
97. **Vijayabharathi, R., Brunthadevi, P., Sathyabama, S., Bruheim, P., et Priyadarisini, V. B. (2012).** Optimization of resistomycin production purified from *Streptomyces aurantiacus* AAA5 using response surface methodology. *Journal of Biochemical Technology*, 3(4), 402-408.
98. **Voelker, F., et Altaba, S. (2001).** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. *Microbiology*, 147(9), 2447-2459.
99. **Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., et Whitman, W. B. (Eds.). (2011).** Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3). *Springer Science et Business Media*.
100. **Vreeland, R. H., Rosenzweig, W. D., et Powers, D. W. (2000).** Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 407(6806), 897-900.
101. **Walser, M., Mathis, D. S., Köchli, R., Stierli, B., Maeder, M., et Brunner, I. L. (2018).** Le sol forestier vit: diversité et fonctions des organismes vivants du sol. *Institut fédéral de recherches WSL*.
102. **Wang, Y. H., Feng, J. T., Zhang, Q., et Zhang, X. (2008).** Optimization of fermentation condition for antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila* with response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 735-744.
103. **Wauthy, G. (1982).** Revue critique des relations entre la faune, la matière organique et les microorganismes dans les horizons organiques forestiers.
104. **Weber, D. J., et Rutala, W. A (1988).** Bacillus Species. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 9(8), pp. 368-373.
105. **Weill, A. (2008).** Guide sur les profils de sol agronomiques: un outil de diagnostic de l'état des sols.
106. **Zahir, I., Houari, A., Iraqui, M., et Ibnsouda, S. (2018).** Valorisation de l'activité antibactérienne des microorganismes isolés à partir des biotopes marocains et caractérisation partielle de leurs principes actifs.

107. Zeigler, D. R., et Perkins, J. B. (2008) 24 The Genus Bacillus. *Practical Handbook of*, 309.

# **Annexe**



**Annexe 01 : Coloration de Gram.**

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
2. Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure à l'aide d'une anse de platine, et mélanger avec l'eau afin d'obtenir une suspension homogène.
3. Sécher et passer le frottis au-dessus de la flamme du ben Bunsen 3 ou 4 fois sans trop le chauffer.
4. Recouvrir totalement la lame avec le violet de Gentiane.
5. Laisser agir 20 secondes à 1 minute selon la force du colorant utilisé.
6. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
7. Couler sur la lame la solution de Lugol pendant 20 secondes à 1 minute.
8. Rincer aussitôt à l'eau distillée.
9. Versez quelques gouttes d'alcool sur la lame.
10. Rincer aussitôt à l'eau distillée.
11. Recolorer la lame avec quelques gouttes de fuchsine à chaque extrémité du frottis.
12. Laisser la fuchsine 10 à 20 secondes.
13. Rincer à l'eau distillé.
14. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement (objectif à immersion x100).

Certaines bactéries apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positives, et certaines d'autre apparaissent colorées en rose, elles sont dites Gram négatives.

**Annexe 02 : Préparation des milieux de cultures utilisés.****Gélose nutritive**

Peptone .....	15g
Extrait de viande .....	10g
Extrait de levure .....	02g
Chlorure de sodium .....	05g
Agar .....	20g
Eau distillée .....	1000ml
pH = 6,8-7,4	

**Gélose Mueller-Hinton**

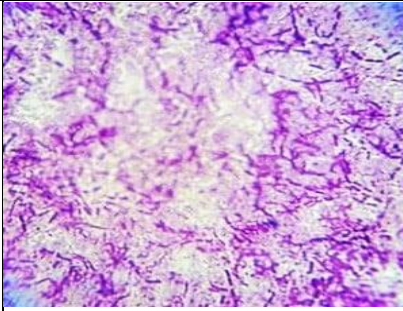
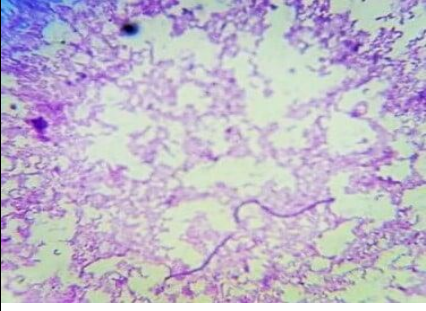


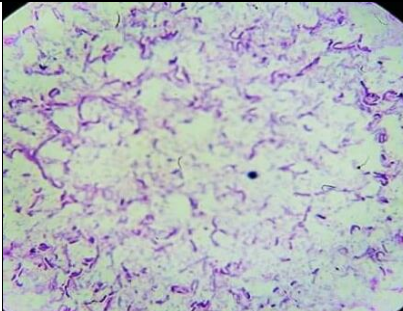
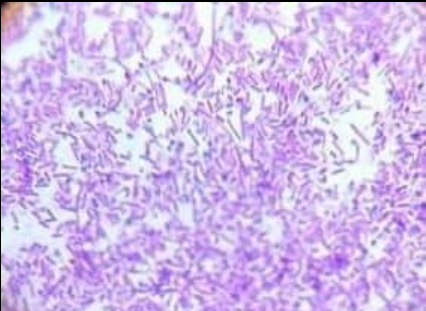
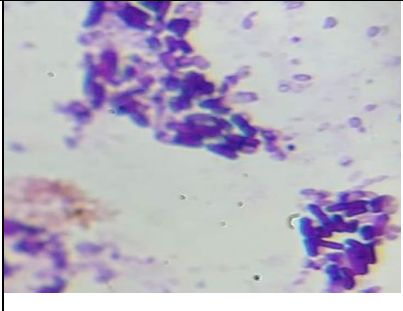
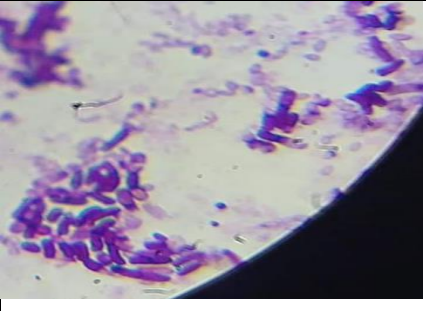
Infusion de viande de bœuf .....	300g
Hydrolysate de caséine .....	17,5g
Amidon .....	01,5g
Agar .....	17g
Eau distillée .....	1000ml
pH = 7,4	

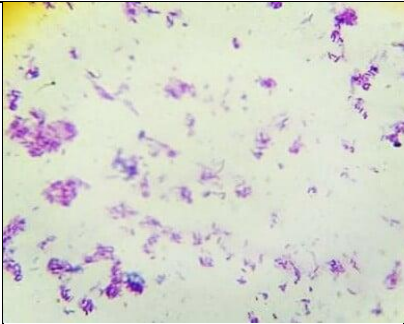
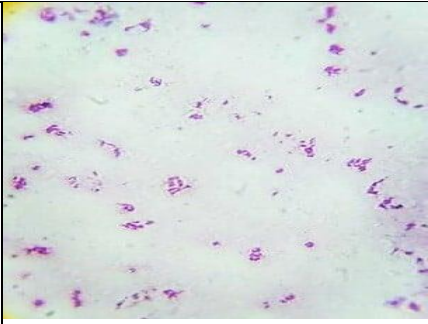
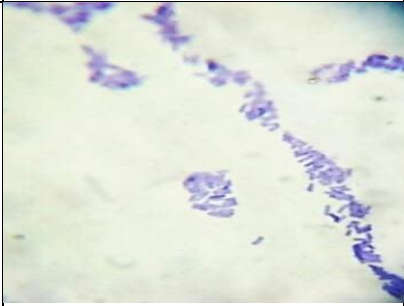
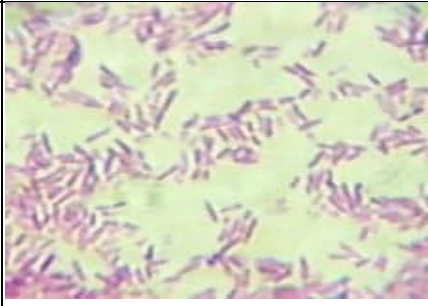


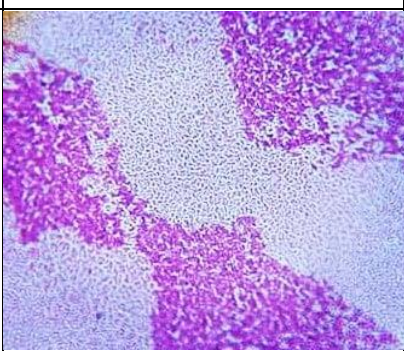
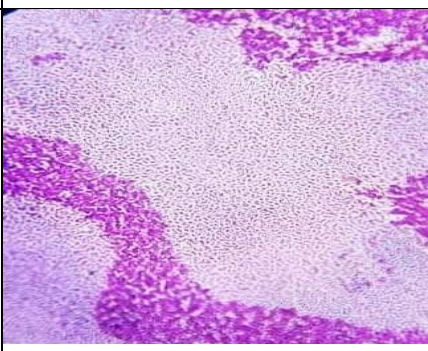


**lysogeny Broth**

Extrait de levure .....	05g
Peptone .....	10g
Eau distillée .....	1000 ml
pH = 6,8	


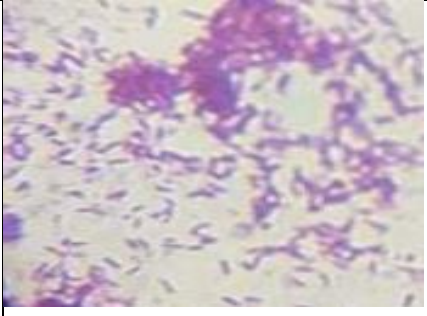
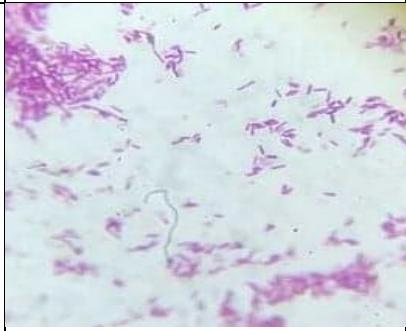
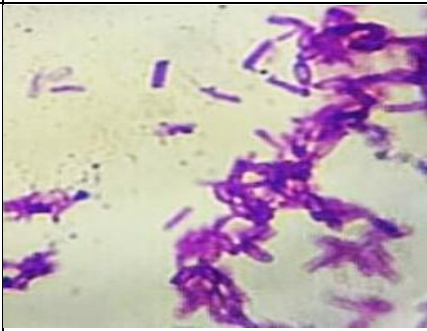

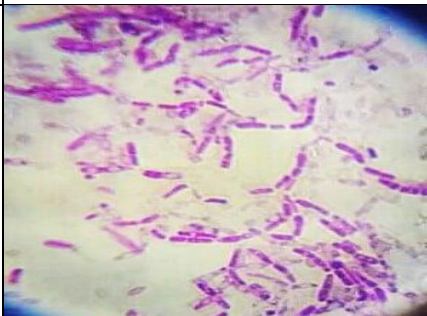
## Annexe 03 :

Tableau 8: Caractères cultureux et morphologiques des isolats du sol.

Souches de <i>Bacillus</i>	Coloration de Gram +	Souches de <i>Bacillus</i>	Coloration de Gram +
G2		J4	
J1		J1	
F2		B3	
C2		E1	



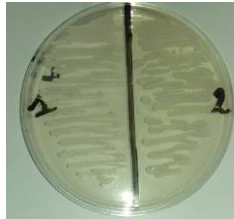



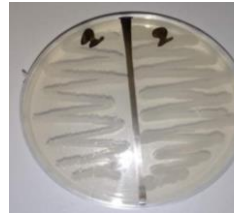


O5		O4	
L5		L4	
L1		L3	
O3		O7	
P2		O6	


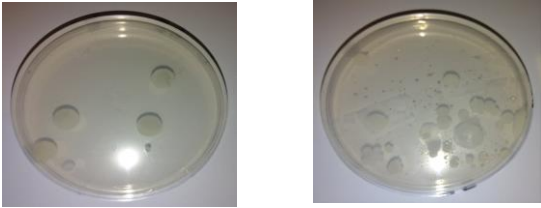
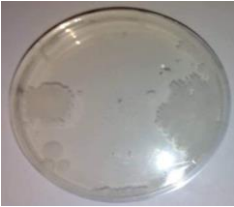



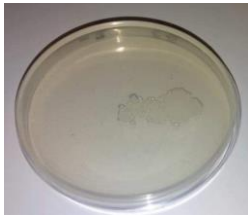
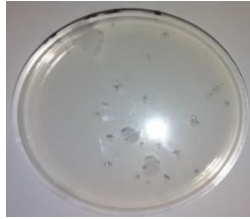

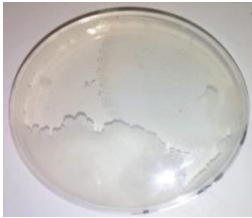
B2		P2	
P5		O1	
P1		P4	

## Annex 05 :

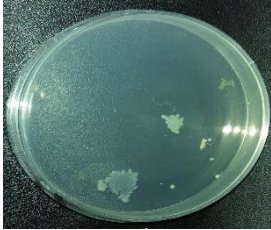

Tableau 9: Quelques aspects des colonies isolée à partir des échantillons du sol sur GN.

Sol de pins à pignons	Ensemencement sur GN	$10^{-1}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$ (T.T)
	Isolement sur GN			
Sol de lavande	Ensemencement sur GN	$10^{-3}$ (T.T)	$10^{-5}$	$10^{-6}$
	Isolement sur GN			
Sol d'olivier	Ensemencement sur GN	$10^{-2}$	$10^{-1}$	$10^{-4}$ (T.T)
	Isolement sur GN			

Sol de jardin	Ensemencement sur GN	$10^{-3}$	$10^{-1}$	$10^{-3}(T.T)$
	Isolement sur GN			
Sol d'un foret	Ensemencement sur GN	$10^{-1}$	$10^{-2}$	
	Isolement sur GN			
Sol de pois chiches	Ensemencement sur GN	$10^{-2}$		
	Isolement sur GN			

Sol de pois	Ensemencement sur GN	$10^{-1}$ 
	Isolement sur GN	
Sol d'eucalyptus	Ensemencement sur GN	$10^{-1}$ $10^{-2}$  
	Isolement sur GN	
Sol de blé	Ensemencement sur GN	$10^{-1}$ $10^{-2}$  
	Isolement sur GN	



Sol de pois	Ensemencement sur GN	$10^{-2}$ 	$10^{-1}$ 
	Isolement sur GN		

## Résumé

Il a été montré que les bactéries du genre *Bacillus spp* sont largement utilisées en industries grâce à leurs intérêts à produire des antibiotiques et leurs résistances aux conditions extrêmes. Afin de sélectionner des espèces du genre *Bacillus spp*, 10 échantillons du sol de différentes régions de la wilaya d'Ain Témouchent et de Tlemcen sont prélevés dans des conditions stériles. Après une série de dilution et d'ensemencement, 44 différentes souches sont isolées et purifiées sur la base d'une identification macroscopique et microscopique, 34 souches ont été retenues selon les critères de ce genre qui appartient ou bacilles à Gram positif et capable de former des spores.

De plus, l'activité antibactérienne de ces souches a été testée contre les bactéries pathogènes suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, mais seule *Escherichia coli* a été expérimenté et a montré que les deux souches codés K1 et N1 présentent une activité sur les bactéries à gram négatif, par leurs zones d'inhibition.

La recherche d'une source de nutriment favorable à la production des antibiotiques doit être réaliser par l'étude de l'effet de sources de carbone et d'azote sur la production de ces métabolites secondaires en milieu liquide, mais, le planning de ce travail n'est pas encore terminé à cause de la pandémie.

**Mots clés :** sol, bactéries du sol, *Bacillus spp*, Antibiotique, Activité antimicrobien, Source de carbone, Source d'azote.

## Abstract

It has been shown that bacteria of the genus *Bacillus spp* are widely used in industry thanks to their interest in producing antibiotics and their resistance to extreme conditions. In order to select species of the genus *Bacillus spp*, 10 soil samples from different regions of the wilaya of Ain Témouchent and Tlemcen are taken under sterile conditions. After a series of dilution and inoculation, 44 different strains are isolated and purified on the basis of a macroscopic identification and then a microscopic observation step, 34 strains were retained according to the criteria of what genus belongs or bacilli to Gram positive and capable of forming spores.

In addition, the antibacterial activity of these strains was tested by the well method which must perform against the following pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, but thanks to the confinement only *Escherichia coli* was tested and showed that the two strains encoded K1 and N1 exhibit activity on gram-negative bacteria, through their zones of inhibition.

The search for a nutrient source favorable to the production of antibiotics must be carried out by studying the effect of carbon and nitrogen sources on the production of these secondary metabolites in liquid medium, but the planning of this work is not yet finished because of the pandemic.

**Key words:** soil, soil bacteria, *Bacillus spp*, Antibiotic, Antimicrobial activity, Carbon source, Nitrogen source.

## المخلص

لقد ثبت أن البكتيريا من جنس *Bacillus spp* تستخدم على نطاق واسع في الصناعة بفضل قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية ومقاومتها للظروف القاسية. من أجل اختيار أنواع من جنس *Bacillus spp*، تم أخذ 10 عينات من التربة من مناطق مختلفة من ولاية عين تموشنت وتلمسان تحت ظروف معقمة. بعد سلسلة من التمديد و الزراعة، تم عزل 44 سلالة مختلفة وتنقيتها على أساس التحديد العياني ثم خطوة الملاحظة المجهرية، تم الاحتفاظ بـ 34 سلالة وفقاً لمعايير الجنس الذي ينتمي إليه أو العصيات + Gram وقادرة على تكوين ابواغ.

بالإضافة إلى ذلك، تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لهذه السلالات بطريقة الحفر ضد البكتيريا المسببة للأمراض التالية: *Staphylococcus aureus*، *Candida albicans*، *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، ولكن بسبب الحجر الصحي تم اختبار *Escherichia coli* فقط وأظهر أن السلالتين المشفرة K1 و N1 تظهر نشاطاً ضد البكتيريا Gram -، من خلال تثبيطها.

يجب أن يتم البحث عن مصدر غذائي ملائم لإنتاج المضادات الحيوية من خلال دراسة تأثير مصادر الكربون والنيتروجين على إنتاج هذه المستقلبات الثانوية في الوسط السائل، ولكن العمل المخطط لم ينتهي بعد بسبب الوباء.

**الكلمات المفتاحية:** التربة، بكتيريا التربة، *Bacillus spp*، المضادات الحيوية، نشاط مضادات الميكروبات، مصدر الكربون، مصدر النيتروجين.