

REPUBLIQUE ALGERINNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

LAKEHAL Fatiha & DOUKARI Hanine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité:

BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES

THÈME

*Identification et effet des rayons ultra-violet sur
deux bactéries isolées à partir d'un sol pollué par les
hydrocarbures*

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale

DEVANT LE JURY :

Président : Mr. DJIBAOUI R.

MCA

C. Université de Mostaganem

Examineur : Mr. BEKADA A.

Professeur

Université de Tissemsilet

Encadreur : Mr. CHIBANI A.

MCA

Université de Mostaganem

Soutenue publiquement le **26/06/2016**

Dédicace

Paix et salut sur notre premier éducateur *MOHAMMED* le prophète pour ce qu'il a donné à l'humanité

A ma mère, la lumière qui éclaire ma vie, qui m'a toujours encouragé, aidé, qui m'a guidé Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien est impossible, que dieu te garde près de nous, merci *Maman*

A Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci pour ton amour et ta confiance totale. A toi très cher *Papa*.

A mes chères sœurs et frères et toute ma famille.

A mes camarades *Farída, Fatíma, Halíma*, que *Sabrine* et *DOUKARI Haníne* particulièrement pour tous les bons moments que nous avons partagés.

A M^{me}. *BENCHOUK. A*, qui nous aide symbole de force, de courage, d'honnêteté et de douceur.

Et à mon encadreur *Dr. CHIBANI. M.A*, merci pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

Ainsi qu'à toute la promotion de *BMO* 2015/2016.

L. Fatíha

Dédicace

À ma mère, la lumière qui éclaire ma vie, qui m'a toujours encouragé, aidé, qui m'a guidé
Dans le droit chemin, qui m'a appris que rien est impossible, que dieu te garde près de
nous, merci *Maman*

À Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années d'études. Merci
pour ton amour et ta confiance totale. A toi très cher *papa*.

A mes chères sœurs et frères et toute ma famille.

A mes camarades *Lobna, Chrifa, Sihame, Hiba, Fatima* qu'*Imane* et
LAKEHAL Fatíha particulièrement pour tous les bons moments que nous avons
partagés.

À Mme *BENCHOUK, A.* et Mme *BENATTOU Nesrine* qui nous aide
symbole de force, de courage, d'honnêteté et de douceur.

Et à mon encadreur *Dr. CHIBANI, A.* merci pour votre disponibilité et vos précieux
conseils.

Ainsi qu'à toute la promotion de *BMO* 2015/2016.

D. Hanine

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions " الله " qui nous a donné la Patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire
Pais et salut sur notre premier éducateur le prophète *Mohammed* pour ce qu'il a donné à l'humanité.

Nous tenons aussi à présenter nos sincères remerciements à
Notre encadreur le *Dr. CHIBANI A.* Pour la confiance qu'il nous a accordée en acceptant cet encadrement

Pour sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce mémoire, pour son aide, ses critiques et ses suggestions, et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous remercions *Mr. DJIBAOUI. R.* d'avoir accepté la présidence du jury de la soutenance.

Nous remercions *Mr. BEKADA. A* qui a accepté d'examiner ce modeste travail.
Nous tenons aussi à remercier Mme *BENCHOUK, A.* pour ses encouragements, ses conseils, qui ont été pour nous d'un grand apport.

Nous voudrions remercier aussi les techniciens du laboratoire de microbiologie *Djillali, Radouen, Nadia* et particulièrement *Hafida* pour sa patience, son aide précieuse et ses valeureux conseils.

Finalement, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

A vous tous, un grand *Merci*

L. Fatíha
D. Haníne

Liste des abréviations et signes utilisés

API 20 E : Appareil et Procédés d'Identification des 20 Entérobactéries.

API 20 NE: Appareil et Procédés d'Identification des 20 Non Entérobactéries.

ANA: Anaérobiose.

BN: Bouillon Nutritive.

CO₂: dioxyde de carbone

H₂S: Sulfure d'Hydrogène.

K⁺: Potassium.

LD: Lethal Dose

LDC: Lysinedécarboxylase.

nm: nanomètre.

ODC: Ornithosedécarboxylase.

ONPG: β-galactosidase

SOS: est un système de survie des bactéries en réponse à des lésions importantes à leur ADN.

TDA: L-tryptophane.

UFC /ml : Unité Format Colonie / millilitre.

UV : Ultra-Violet.

VP: Voges-Proskauer.

µl : microlitre.

Liste des annexes

Annexe 01 : Le protocole coloration de Gram décrit par (**Prescott *et al.*, 2003**).

Annexe 02 : Le protocole recherche des spores décrit par (**W. Dorner, 1926**).

Annexe 03 : Les milieux de culture King A et King B (**Marchal et Bourdon, 1982**).

Annexe 04 : Le protocole du test de lécithinase (**De VOS *et al.*, 2009**).

Annexe 05 : Le protocole du test d'amylase (**De VOS *et al.*, 2009**).

Annexe 06 : Le protocole du test de la caséinase (**De VOS *et al.*, 2009**).

Annexe 7 : Photo de spectrophotomètre.

Annexe 8 : L'appareil d'UV.

Liste des figures

	Pages
Figure 1 : les étapes de la formation d'un sol.....	07
Figure 2 : cycle de la roche.....	08
Figure 3 : facteurs affectant l'efficacité de biodégradation.....	15
Figure 4 : les compositions d'un nucléotide.....	17
Figure 5 : l'Adénine est associée à la Thymine et la Guanine associée à la Cytosine	18
Figure 6 : l'ADN dans la cellule	18
Figure 7 : aspect macroscopique de la souche P6 sur le milieu King B	37
Figure 8 : aspect macroscopique de la souche B1 sur le GN.....	37
Figure 9 : aspect microscopique de la souche P6 après coloration de Gram (Gx100)	38
Figure 10 : aspect microscopique de la souche B1 après coloration de Gram (Gx100)	38
Figure 11 : aspect microscopique de la souche B1 après coloration de Spores (Gx100)	39
Figure 12 : aspect macroscopique de la souche P6 après le test de catalase	39
Figure 13 : aspect macroscopique de la souche B1 après le test de catalase	39
Figure 14 : résultat de test oxydase pour la souche P6	41
Figure 15 : résultat de test oxydase pour la souche B1	41
Figure 16 : résultat de souche P6 en Mannitol Mobilité	41
Figure 17 : résultat de la croissance de souche P6 en VF.....	41
Figure 18 : résultat du test Nitrate réductase pour la souche P6	41
Figure 19 : résultat de souche B1 en Mannitol Mobilité	42

Figure 20 : résultat de la croissance de souche B1 en VF	42
Figure 21 : résultat du test Nitrate réductase pour la souche B1.....	42
Figure 22 : la croissance de la souche P6 sur le milieu King B	42
Figure 23 : la croissance de la souche B1 sur le Gélose de jaune d'œuf	42
Figure 24 : la croissance de la souche B1 sur le Gélose au lait	43
Figure 25 : identification biochimique de la souche P6 par galerie Api 20 NE	43
Figure 26 : profil biochimique de la souche P6 sur le site web d'internet	44
Figure 27 : résultat final de la souche P6 par le site web d'internet	44
Figure 28 : identification biochimique de la souche B1 par galerie Api 20 E	45
Figure 29 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 45°C pendant 24 h	47
Figure 30 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 55°C pendant 24 h	47
Figure 31 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 65°C pendant 24 h	47
Figure 32 : représente la croissance de <i>P. luteola</i> après les différentes dilutions	50
Figure 33 : la courbe de survie (la courbe de mortalité) de la souche <i>Pseudomonas luteola</i>	51
Figure 34 : représente la croissance de <i>B. thuringensis</i> après les différentes dilutions	52
Figure 35 : la courbe de suivre (la courbe de mortalité) de la souche <i>Bacillus thuringensis</i>	53

Liste des tableaux

	Pages
Tableau 1 : abondance des micro-organismes dans les sols	11
Tableau 2 : liste des bactéries capables de dégradés les hydrocarbures.....	15
Tableau 3 : les groupes de mutagènes chimiques.....	22
Tableau 4 : observations macroscopiques des colonies.....	37
Tableau 5 : résultats de l'étude microscopique des souches isolées.....	38
Tableau 6 : résultats des tests biochimiques des isolats.....	40
Tableau 7 : profil biochimique de la souche B1 sur le site web d'internet	45
Tableau 8 : Résultat de calcul réalisé par le site web d'internet pour la soucheB1	46
Tableau 9 : le nombre de colonies par UFC en ml chez <i>P. luteola</i> après l'exposition à l'UV à différentes doses.....	51
Tableau 10 : le nombre de coloniespar UFC en ml chez <i>B. thuringensis</i> après l'exposition à l'UV à différentes doses.....	53

Introduction générale

Chapitre I

La pollution du sol

Chapitre II

La mutagenèse

Matériels et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion et perspectives

Annexes

Références bibliographiques

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Liste des annexes

Résumé

Abstract

المخلص

Introduction

Chapitre I : la pollution du sol

I-1. Généralité sur le sol	05
I-1-1. Les principes de la formation des sols ou pédogenèse	06
I-1-2. La composition du sol.....	09
I-1-3. Les caractères biologiques du sol	09
I-1-4. Les micro-organismes du sol	10
I-2- Pollution du sol	12
I-2-1. la pollution du sol par les hydrocarbures	13
I-2-2. La bio-remédiation du sol par les micro-organismes.....	14

Chapitre II : La mutagenèse

II-1. La structure d'ADN	17
II-2. Les mutations	19
II-3. La mutagenèse	20
II-3-1. Les agents mutagènes.....	21
II-3-1-1. Les agents chimiques.....	21
II-3-1-2. Les agents physiques.....	22

II-4. Amélioration des souches par mutagenèse.....	24
• Le but de travail	25

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III-1. Provenance des échantillons	27
III-2. L'identification de souches purifiées.....	27
III-2-1. Etude morphologique	28
III-3. Sélection des bactéries par des milieux spécifiques	29
III-4. Profil résistance à la température	29
III-5. Etudes biochimiques (les tests d'orientations)	29
III-6. Méthodes de la métagenèse par UV.....	32
III-6-1. Préparation de pré culture	32
III-6-2. Culture	32
III-6-3. Mesure de la concentration microbienne	33
III-6-4. Exposition à l'UV	33
III-6-5. Dilution décimale	35
III-6-6. La courbe de survie (la courbe de mortalité)	35

Résultats et discussion

1. L'identification de souches purifiées.....	37
1-1. Examen macroscopique.....	37
1-2. Examen microscopique	38
1-3. Les résultats des tests biochimiques	39
1-4. Caractérisations des souches isolées	43
2. L'effet de la température sur la souche B1	47
3. L'effet de l'UV sur la survie des isolats.....	48

Conclusion et perspective

Références bibliographiques

Annexes

Résumé:

La pollution du sol par les hydrocarbures est un problème d'environnement et de santé en général. Il est donc nécessaire de décontaminer des milieux pollués. La bio-rémediation s'avère être une alternative très intéressante. Dans cette étude, nous avons identifié deux isolats bactériens isolés initialement à partir du sol contaminé par le pétrole (**P6**, **B1**). L'identification est basée sur les études morphologiques (étude macroscopique et microscopique) et biochimiques (les différentes tests biochimiques d'orientation pour identifier nos isolats). En plus de ces tests basés sur la morphologie des bactéries nous avons utilisé des galeries API 20 E et API 20 NE pour déterminer le genre et l'espèce de nos isolats. La souche **P6** a été rattachée au genre *Pseudomonas*. L'incapacité de cette souche à dégrader le mannitol et l'oxydase positive nous a permis de supposer qu'il s'agit de *Pseudomonas luteola*. La souche **B1** a été rattachée au genre *Bacillus*. L'incapacité de cette souche à dégrader le mannitol et l'oxydase négative nous a permis de supposer qu'il s'agit de *Bacillus thuringensis*. Les deux isolats ont été exposés au rayonnement ultraviolet à des doses différentes pour l'établissement de la courbe de survie de chaque souche.

Mots clés : bio-rémediation, *Pseudomonas*, *Bacillus*, hydrocarbures, mutagenèse.

Abstract:

Soil pollution by oil is an environmental and health problem. It is therefore necessary to decontaminate polluted environments. Bioremediation proved to be a very interesting alternative. In this study, we identified two originally isolated bacterial isolates from soil contaminated by oil (P6, B1). Identification is based on morphological studies (macroscopic and microscopic examination) and biochemical (deferent biochemical tests to identify the orientation of our isolates). In addition to these tests based on the morphology of the bacteria we used galleries API 20 E and API 20 NE to determine the genus and species of our isolates. P6 strain was related to the genus *Pseudomonas*. The inability of this strain to degrade mannitol and positive oxidase test led us to suppose that this is *Pseudomonas luteola*. B1 strain was related to the genus *Bacillus*. The inability of this strain to degrade mannitol and negative oxidase test allowed us to assume that it is *Bacillus thuringiensis*. Both isolates were exposed to increasing doses of ultraviolet radiation in order to establish the survival curve of each strain.

Keywords: bioremediation, *Pseudomonas*, *Bacillus*, hydrocarbons, mutagenesis.

المخلص

بشكل عام يعتبر تلوث التربة عن طريق النفط ومشتقاته مشكلة بيئية وصحية. ولذلك كان من الضروري تطهير ونقية البيئات الملوثة. برهنت طريقة المعالجة الحيوية على أنها تكون بديلا مثيرا للاهتمام. من خلال هذه الدراسة، حددنا اثنين من العزلات البكتيرية كانت قد عزلت مسبقا من تربة ملوثة بالنفط (P6، B1). وقد استند هذا التعرف و التحديد على الدراسات المورفولوجية للمستعمرات والخلايا (فحوص المعاينة و الفحوص المجهرية) و الإختبارات البيوكيميائية. وبالإضافة إلى هذه الاختبارات قمنا بإجراء اختبارات API و API 20 NE لتحديد جنس ونوع من العزلات لدينا. ومن ذلك كله تم ربط العزلة P6 إلى جنس *Pseudomonas*. وعدم قدرة هذه السلالة على تحليل سكر المانيتول وإيجابية اختبار أوكسيديز سمح لنا أن نفترض أن هذه العزلة هي *Pseudomonas luteola*. وبنفس الطريقة تم ربط العزلة B1 بجنس العصيات *Bacillus*. عدم قدرة هذه السلالة على تحليل سكر المانيتول واختبار الأوكسيديز السلبي سمح لنا أن نفترض أنها *Bacillus thuringiensis*. تعرضت كل من العزلات للأشعة فوق البنفسجية بجرعات مختلفة بهدف إنشاء منحنى القتل لكلا السلالتين.

الكلمات المفتاحية :

المعالجة الحيوية، *Bacillus*، *Pseudomonas*، النفط، الطفرات.

Introduction

La présence de la matière organique dans les déchets des sédiments du sol, sous-sol et les nappes phréatiques ont incité des études sur l'écologie microbienne des environnements souterrains (**Chapelle, and Lovley 1990**). De nombreuses recherches ont révélé des communautés microbiennes métaboliquement actives, hétérogènes largement distribués dans la stratosphère à des profondeurs variables (**Balkwill, 1989 ; Sinclair, and Ghiorse, 1989**). Ceux-ci comprennent aérobie (**Balkwill, et al 1989**) et micro-aerophilic (**Benoit and Phelps, 1991**) bactéries chemoheterotrophic ainsi que les méthanogènes anaérobies et les bactéries sulfate réductrices (**Jones, et al 1989**). Les micro-organismes dans le sol peuvent avoir un rôle potentiel dans la bioremédiation *in situ* de déchets mixtes contenant des composants organiques comme les hydrocarbures. Les bactéries telluriques possèdent une gamme variée d'activités métaboliques (**Lovley and Phillips 1992 ; Hicks, and Fredrickson 1989**); mais on sait peu sur les caractéristiques de survie des micro-organismes du sol. Les connaissances sur la survie dans des environnements hostile seraient utiles d'évaluer le succès de la biorestauration *in situ* dans ces domaines. Un élément important de la défense d'une cellule contre les produits chimiques toxiques est la capacité de réparer les dommages causés à son matériel génétique. Les processus de réparation d'ADN peuvent être critiques dans des environnements contenant des mélanges de déchets organiques puis que les dommages à l'ADN résultent des rayonnements ionisants et de produits chimiques (**Harm 1980**). Les microorganismes aptes à la bioremediation des déchets mixtes devraient avoir la capacité de tolérer et / ou réparer les lésions de l'ADN qui seraient autrement conduire à une mutation ou la mort. Deux obstacles limitant le contrôle des réponses bactériennes aux rayonnements ionisants et sont les coûts et l'accès à la source. Une solution possible est l'utilisation d'agents facilement disponibles à bas prix, endommageant l'ADN tels que les rayonnements UV pour modéliser les effets des rayonnements ionisants sur la survie microbienne. La lumière UV dans la gamme de 200 à 300 nm inflige des dommages à l'ADN et l'ARN bactérien (**Smith, 1977 ; Harm, 1980**). Un grand nombre des mécanismes moléculaires qui réparent les dommages UV sont identiques ou se chevauchent avec ceux qui sont impliqués dans la réparation des dégâts d'irradiation ionisants (**Coggle, 1983 ; Smith, 1977**). Par conséquent la lumière ultraviolette peut être utile dans la modélisation de la capacité d'une bactérie à tolérer les rayonnements ionisants.

Notre étude s'inscrit dans cette optique et le principal objectif de ce travail était une caractérisation complète et l'identification des isolats qui sont isolés à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures.

L'ensemble des travaux entrepris a été mené avec deux objectifs :

- ✓ Le premier chapitre portera sur la pollution du sol et particulièrement par les hydrocarbures.
- ✓ Le deuxième chapitre sera consacré à la définition la mutation et la mutagenèse.

La deuxième partie, représente le travail pratique et qui indique les différentes techniques mises en œuvre afin de caractériser les deux souches isolées et l'étude d'effet d'UV sur la croissance de ces souches. Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont comparés et discutés dans la troisième partie. Enfin la dernière partie concernera la conclusion finale et soulignera les perspectives de ce travail

I-1. Généralité sur le sol

Le mot « sol » est un mot banal que chacun utilise très fréquemment, sans être nécessairement conscient de sa signification. Il faut dire qu'elle peut être très différente selon les préoccupations, les cultures, les connaissances, les époques (**Joffe, 1949 ; Simonson, 1968 ; Buol *et al.*, 1973 ; Boulaine, 1989**). Plusieurs perceptions peuvent être dégagées des divers travaux publiés.

La manière la plus triviale de perception le sol est de le considérer comme support mécanique, celui des pas, le substrat où l'on marche, mais aussi celui des bâtiments, des machines et des engins motorisés. C'est une attitude très pragmatique et probablement aussi très spontanée. Une autre perception, elle aussi très utilitaire, est en relation avec la constante préoccupation des hommes de se procurer des aliments pour assurer leur nourriture et des fibres pour se protéger. Le sol « support des plantes » est une perception très ancienne qui remonte aux origines de l'agriculture et qui étroitement liée à l'évolution des civilisations. Le sol est vu essentiellement comme un milieu de culture est c'est la définition donnée par plusieurs auteurs au début du 20^e. Siècle tels E. Ramann, E. W. Hilgard, F. Wahnschaffe, et M.A.E. Mitscherlich (cités par **Joffe, 1949**). Cette conception peut être rapprochée de celle de chimistes comme **Justus von Liebig (1840)** pour qui le sol est assimilable à un milieu contenant les éléments nutritifs des plantes (**Buol *et al.*, 1973**).

Pendant longtemps et encore maintenant pour les géologues, le sol relève de la géologie en ce sens qu'il est considéré comme la partie superficielle des roches altérées par les agents climatiques, biologiques et anthropiques. C'est une perception restrictive et surtout tout à fait incomplète comme on peut le constater avec la conception que l'on a aujourd'hui qui s'identifie beaucoup plus à une vision écologique générale. Cette dernière conception trouve principalement, n'est pas très nouvelle. Comme nous le verrons un peu plus loin, l'histoire nous permettra de comprendre pourquoi l'adoption de certaines idées a rencontré des difficultés. Mais l'historien et plus particulièrement l'archéologue voient aussi dans le sol un enregistrement de toute l'histoire du milieu alors que l'artiste et le philosophe y voient un objet mystique, mélange de sources de la vie et de la mort (**Buol *et al.*, 1973**). Quel que soit le caractère passionnant de telle ou telle approche cependant, et quelle que soit, malgré tout, la sensibilité de chacun, il est utile de se limiter à l'aspect scientifique des choses pour rester dans le domaine du rationnel.

- **Définition du sol**

Sol, formation généralement meuble constituée d'un complexe organe-minéral qui résulte de la transformation superficielle des roches sous l'action conjointe des agents météoriques et des êtres vivants.

La conception du sol comme un objet global et dynamique semble avoir son origine en Allemagne et a été développée par les pédologues russes (**d'après Joffe, 1949**). Joffe (**1949**) en propose la définition suivante. « Le sol est un corps naturel de constitution minérale et organique, différencié en horizons d'épaisseur variable, qui diffère du matériau sous-jacent par sa morphologie, ses propriétés physiques et chimiques, sa composition et ses caractères biologiques ». Bien qu'étant complète, cette définition conserve néanmoins un certain caractère statique qui ne reflète pas complètement la réalité. Assez tôt cependant, (**Brown, 1929**) définissait une « nouvelle science du sol » considérant à la fois l'origine des sols et leurs relations géographiques. Plus tard cependant, en mettant l'accent sur le fait que le sol est un écosystème, l'approche de **Jenny (1980)** établit de façon incontestable que le sol doit être considéré comme un corps naturel avec sa propre organisation et sa propre histoire. Le caractère systémique du sol s'est ainsi progressivement imposé et cela est important pour sa description et la compréhension de son fonctionnement qui nécessite de prendre en compte l'existence de flux de matière et d'énergie entre les différents compartiments constituant ce que l'on peut appeler le « système sol ».

I-1-1. Les principes de la formation des sols ou pédogenèse

Les sols se forment à partir des affleurements rocheux qui portent alors le nom de roche mère ou roche parentale (du sol) quelle que soit la nature des matériaux, qu'il s'agisse de roches plutoniques, métamorphiques, volcaniques, sédimentaires ou de formations superficielles (alluvions, moraines, éboulis, etc.). Des processus physiques, chimiques et biologiques désagrègent et altèrent les roches mères dont les minéraux primaires sont plus ou moins transformés ; la phase ultime de l'altération est la formation de nouveaux minéraux dits secondaires, comme la kaolinite dans les sols tropicaux. Simultanément, les végétaux et la faune qui se développent sur les substrats minéraux produisent de la matière organique fraîche (feuilles, fruits, cadavres d'animaux, excréments) qui est décomposée par une armée de bactéries et de champignons microscopiques. Au cours de la transformation de la matière organique, des minéraux solubles et gazeux sont libérés (minéralisation) et réagissent avec d'autres molécules organiques pour former de l'humus, matière organique brune qui se présente à l'état de colloïdes (humification). Les produits de la décomposition des roches et de

la matière organique se mélangent pour former des agrégats organe-minéraux qui donnent aux sols leur structure.

Au cours de l'altération et de l'humification, une partie des sels solubles est entraînée dans l'eau qui s'infiltre par percolation à travers le sol, processus appelé lixiviation ; les colloïdes sont déplacés en suspension par la circulation de l'eau, phénomène du lessivage. Dans le premier cas, les sels dissous sont évacués hors du sol ; dans le second, les colloïdes sont redistribués et s'accumulent dès que l'eau ne peut plus les déplacer. Ainsi, durant la pédogenèse, la tranche de sol se différencie et se présente comme une superposition de couches, que l'on appelle des horizons, d'une épaisseur allant de quelques centimètres à quelques décimètres, parfois de un à deux mètres, et exceptionnellement de plusieurs dizaines de mètres. Dans la partie supérieure, l'horizon A est un horizon d'appauvrissement en substances minérales et de transformation de la matière organique ; l'horizon B est un horizon où s'accumulent les particules insolubles et les nouveaux minéraux. Au-dessous, l'horizon C correspond à la roche mère en cours de décomposition.

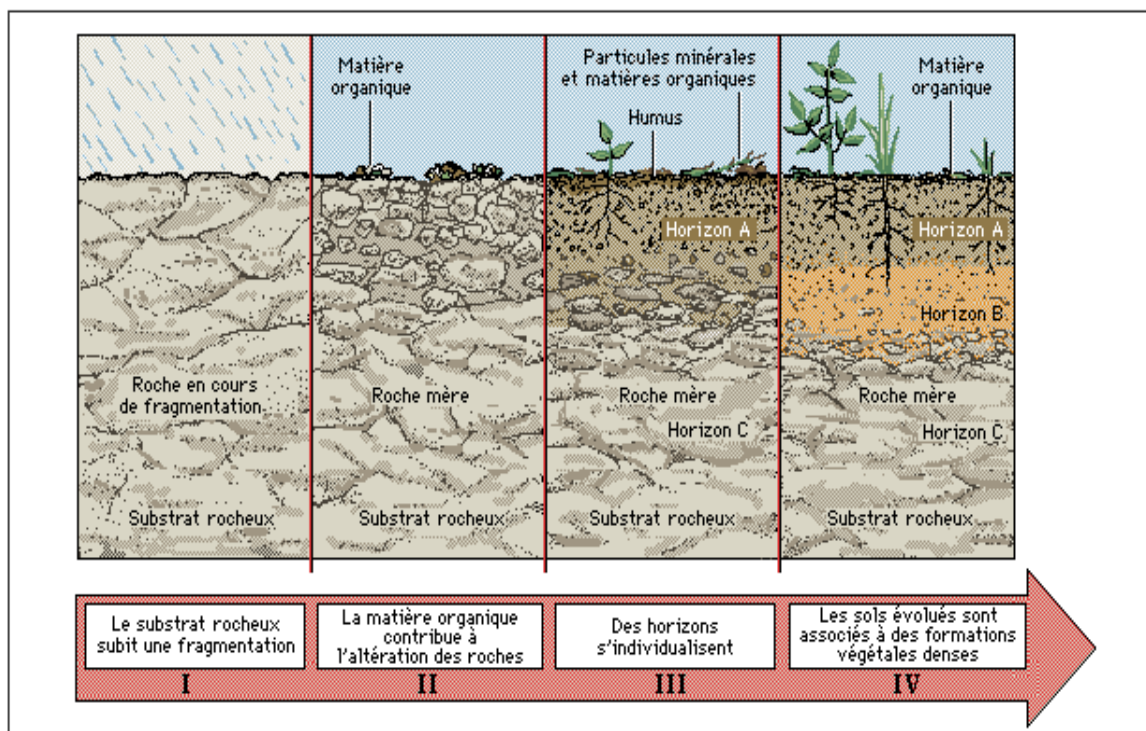


Figure 01 : les étapes de la formation d'un sol (Microsoft® Encarta® 2009).

La formation d'un sol résulte de la fragmentation des roches en particules de plus en plus fines et de l'incorporation de celles-ci à de la matière organique en cours de décomposition. L'eau, les racines et les alternances de gel et de dégel contribuent à la fragmentation des roches (I). La roche désagrégée constitue la roche mère, qui s'amenuise

petit à petit (II). Les animaux et les végétaux participent à la formation des sols (pédogenèse), de leur vivant, en agissant sur la fragmentation des roches et, après leur mort, en fournissant de la matière organique fraîche. À mesure que le sol se développe, des couches appelées horizons s'individualisent (III). L'horizon A, proche de la surface, est en général riche en matière organique, tandis que l'horizon C est surtout minéral et possède une composition très voisine de la roche initiale. Un sol évolué est associé à un couvert végétal dense, qui l'entretient par recyclage de la matière organique. À ce stade, le sol comporte un horizon B, qui correspond à l'accumulation de minéraux lessivés (entraînés mécaniquement depuis la surface).

Le cycle de la roche représente l'interaction des processus internes (endogènes) et externes (exogènes) de la Terre. Il décrit notamment les processus de transformation de chacun des trois principaux types de roches (roches sédimentaires, métamorphiques et magmatiques) en roches de l'un ou l'autre des deux autres types, voire en roches d'un type spécifique différent. Les sédiments compactés, cimentés et parfois recristallisés forment des roches sédimentaires; les roches soumises à de fortes chaleurs et pressions forment des roches métamorphiques; les roches issues du refroidissement puis de la solidification de magma forment des roches magmatiques (ou ignées).

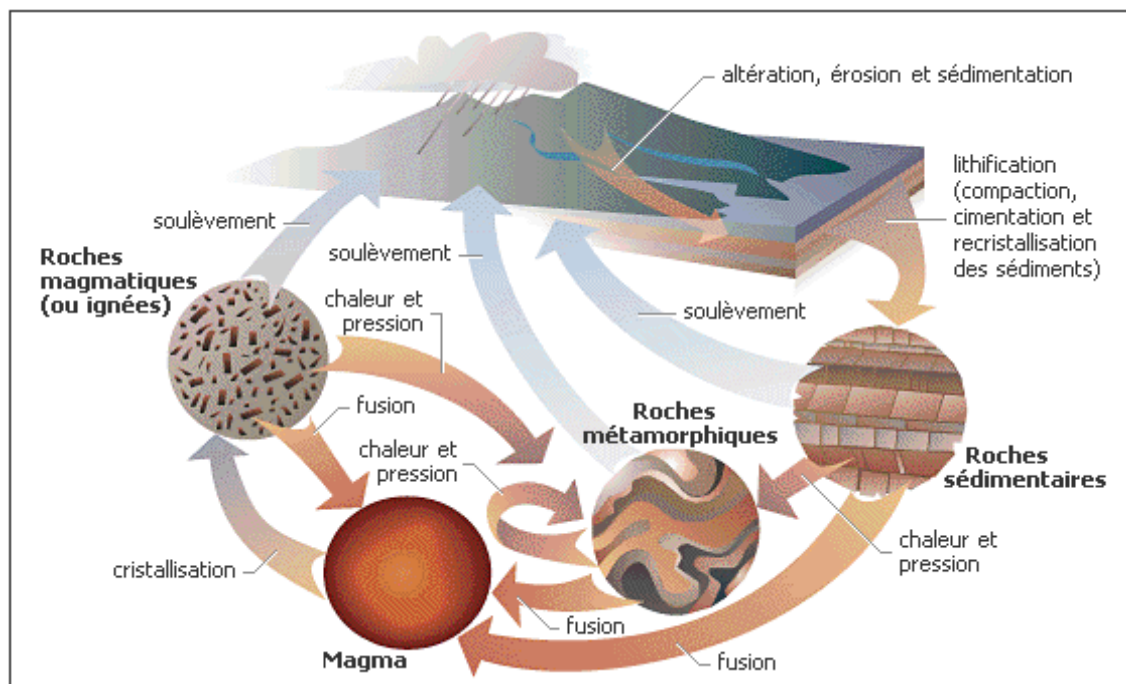


Figure 02 : cycle de la roche (Microsoft ® Encarta ® 2009).

I-1-2. La composition du sol

Les sols se composent de débris minéraux insolubles produits par la fragmentation et l'altération des roches mères, de sels minéraux solubles, de matière organique vivante et morte, de gaz et d'eau.

Les propriétés physiques du sol sont déterminées par le calibre des particules qui le composent. Les particules minérales vont de la catégorie des cailloux et des graviers à celle des particules inférieures à 2 μ . Les débris grossiers, tels que les sables et les graviers, sont chimiquement inactifs, mais les particules minérales plus petites, les colloïdes, principalement les argiles, servent de réserve de nutriments qui sont absorbés par les racines des plantes. Le calibre et la nature de ces minuscules particules minérales déterminent en grande partie la capacité d'un sol à stocker l'eau, élément vital pour toutes les plantes.

La partie organique du sol comprend des débris végétaux qui ne sont pas décomposés, des restes d'animaux (matière organique fraîche) et des quantités variables de matière organique amorphe (en cours de décomposition), appelée humus. Elle constitue de 2 à 5 % de la masse du sol dans les régions humides, mais en représente moins de 0,5 % dans les sols arides ou plus de 95 % dans les sols tourbeux.

Les solutions du sol correspondent à de l'eau infiltrée qui, par percolation, se charge de gaz dissous (oxygène, dioxyde de carbone) et de substances minérales dissoutes ou dissociées par l'hydrolyse (ions minéraux). Elles véhiculent les substances nutritives (les cations Na^+ , Mg^{++} , K^+) qui sont captées par les poils absorbants des racines. Quand un ou plusieurs éléments nutritifs nécessaires à la croissance des plantes font défaut dans les solutions, le sol n'est pas fertile.

Les gaz contenus dans le sol sont principalement l'oxygène, l'azote et le dioxyde de carbone. L'oxygène est important pour le métabolisme des plantes et leur croissance ; sa présence est nécessaire au développement des bactéries du sol et des autres organismes essentiels à la décomposition des matières organiques.

I-1-3. Les caractères biologiques du sol

Les caractères biologiques des sols dépendent de la matière organique. Le terme général qui désigne le mélange complexe de matières organiques dans le sol est l'humus. L'humus n'est pas un mélange stable de produits chimiques, mais plutôt un mélange variable dynamique représentant toutes les étapes de la décomposition d'une matière organique morte, de la plus simple à la plus complexe. Le processus de décomposition est causé par l'action

d'un grand nombre de bactéries microscopiques et de champignons. Ces micro-organismes, dans le cycle de la nutrition, attaquent et digèrent les composants organiques complexes qui constituent la matière vivante et les réduisent en composants simples pour que les plantes puissent s'en nourrir. Un exemple caractéristique de l'action des bactéries est la formation d'ammoniac à partir des protéines animales et végétales. D'autres bactéries oxydent l'ammoniac pour former des nitrites et d'autres bactéries encore agissent sur ces nitrites pour former des nitrates, un composant d'azote qui peut être utilisé uniquement par les plantes. Certains types de bactéries sont capables de fixer ou d'extraire l'azote de l'air (fixation d'azote) et de le rendre disponible dans le sol. Même les résidus de débris organiques qui n'ont pas été décomposés contribuent à la qualité du sol en le rendant plus léger et plus poreux.

La nature de l'humus dépend de l'intensité de la minéralisation et de l'humification, elle-même influencée par l'activité biologique. Or, celle-ci est conditionnée par un grand nombre de facteurs que sont le climat, la végétation, la nature de la roche mère, la disposition du relief. On distingue quatre types d'humus. Le mull est un humus doux élaboré sous la forêt de feuillus des climats tempérés ou sous la prairie établie sur roche calcaire. Le mor, ou humus brut, se forme sous les climats froids ou très pluvieux, sur des substrats pauvres en bases (roches cristallines, sables siliceux) en présence d'une végétation pauvre en azote (forêt de conifères, lande de bruyères). Le Moder est un humus intermédiaire entre le mull et le mor, et la tourbe se forme dans des milieux privés d'air parce qu'ils sont saturés en eau presque en permanence.

Dans des conditions naturelles primitives (celles que l'on trouve dans les régions qui n'ont jamais été labourées ou déboisées), il existe un équilibre entre la quantité d'humus détruite ou absorbée par les plantes et la quantité de matière organique fraîche qui s'ajoute, due au cycle végétal et à la durée de vie des animaux. Quand l'agriculture est pratiquée ou le processus naturel altéré par des activités humaines ou par des accidents, comme le feu, l'équilibre est rompu et une réduction du contenu organique du sol se produit jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint.

I-1-4. Les micro-organismes du sol :

Les organismes du sol appartiennent, d'une part à tous les groupes connus des micro-organismes (bactéries, champignons, actinomycètes, algues, protozoaires, et d'autre part à certains groupes d'animaux, essentiellement, des nématodes, des annélides et des arthropodes.

Les micro-organismes constituent, indépendamment des animaux et des végétaux, un troisième groupe d'organismes, les protistes. Ils sont unicellulaires ou multicellulaires, mais ne présentent pas de différenciation en tissus et organes. Ils comprennent 02 groupes :

- Les protistes inférieures ou procaryotes et les protistes supérieures ou eucaryotes.
- Les procaryotes sont dépourvus de véritable noyau et contiennent une molécule simple d'ADN souvent circulaire. Ils comprennent les bactéries, les actinomycètes (bactéries filamenteuses), et les cyanophycées (algues bleu-vert).

Les eucaryotes possèdent un noyau pourvu d'une membrane nucléaire et des chromosomes. Ce sont les champignons, les algues, les protozoaires, ces deux derniers groupes représentant une biomasse moins importante dans le sol (**tableau1**).

Tableau 1 : abondance des micro-organismes dans les sols (**Bonneau et Souchier, 1994**).

Organismes	Nombre (UFC/g de sol sec)
Bactéries	10^8
Actinomycètes	10^5 à 10^6
Champignons	10^5
Algues	10^4 à 10^5
Protozoaires	10^4

- **Bactéries :**

Sont les organismes les plus nombreux du sol (**tableau 1**). Elles sont unicellulaires, parfois mobiles et leurs taille peut varier de 0,2 à 10 μm . des échanges de matériel génétique se produisent par conjugaison (transfert de matériel génétique d'un donneur vers un receveur avec contact direct), par transduction (transfert direct d'ADN par un virus attaquant la bactérie), ou par transformation (transfert d'un fragment de matériel chromosomique d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, sans contact direct). Il existe plus de 200 genres bactériens différents.

- **Actinomycètes :**

Ce sont des bactéries hétérotrophes qui forment une structure végétative de type mycélien, plus fine que celle des champignons (1 à 1,5 μm) ; Dans le sol, les genres les plus

fréquents sont les *Streptomyces* qui représentent jusqu'à 90% des genres identifiés, et les *Nocardia*. Ils sont particulièrement aptes à dégrader des substances organiques difficilement décomposables et produisent des vitamines et des antibiotiques (**Bonneau et Souchier, 1994**).

- **Champignons :**

Bien que moins nombreux que les bactéries dans les dénombrements sur boîte de Pétri, les organismes hétérotrophes eucaryotes que sont les champignons sont les principaux responsables de la décomposition des résidus organiques dans les sols, ils sont divisés en sous-groupes selon leurs caractères morphologiques. Les basidiomycètes appartiennent à la classe des champignons dits supérieures. Ce sont des décomposeurs très actifs de résidus ligneux comme la cellulose et/ou la lignine. Le nombre d'espèces fongiques dégradant la lignine a été estimé à 2.000 (**Atlas 1995**); elles sont classées en fonction du type de pourriture du bois, qui correspond à différents types d'attaques enzymatiques : pourriture brune et pourriture blanche.

- **Algues :**

Les algues microscopiques sont des organismes unicellulaires, groupés en colonies ou filamenteux. Leurs principales activités dans les sols sont la fixation du CO₂, la fixation biologique de l'azote, et la consolidation des surfaces, leur capacité à solubiliser des minéraux, à produire des substances de croissance pour les plantes et à absorber ou dégrader les polluants des sols a été soulignée dans la littérature.

I-2. Pollution du sol

La pollution du sol correspond à l'accumulation de composés toxiques : produits chimiques, sels, matières radioactives ou agents pathogènes qui, tous, ont des effets nocifs sur la croissance des plantes et la santé des animaux. L'utilisation accrue d'engrais et de nombreux produits insecticides et fongicides après la fin de la Seconde Guerre mondiale est, depuis les années 1960, source d'inquiétude sur l'état des sols. Certes, l'application d'engrais contenant les principaux éléments nutritifs, à savoir azote, phosphore et potassium, n'a pas, globalement, contribué à la pollution des sols ; cependant, les apports excessifs d'engrais azotés et de phosphore contribuent à la pollution des eaux ; de même, l'utilisation excessive d'oligoéléments peut nuire à l'état des sols. L'irrigation des terres arides mène souvent à une pollution par le sel.

Dans un passé récent, le soufre provenant de déchets industriels a pollué certains sols, de même que la pulvérisation des cultures avec de l'arséniate de plomb a conduit à l'accumulation d'arsenic. De nos jours, les épandages excessifs de matières organiques, fumier, lisier, en plus des apports d'engrais minéraux, conduisent à une pollution par excès de nitrates que les eaux de pluie entraînent vers les nappes phréatiques et les cours d'eau.

Rappelons aussi le grave problème de la pollution par les matières radioactives, iode-131, césium-137 par exemple, éléments répandus dans l'atmosphère lors de la catastrophe de Tchernobyl et qui sont concentrés par les végétaux et les animaux herbivores, puis par les carnivores. Enfin, l'emploi excessif d'insecticides organochlorés pose de graves problèmes dans la mesure où ces composés se dégradent lentement et, de plus, s'accumulent progressivement dans la chaîne alimentaire dont l'homme est le maillon terminal.

I-2-1. La pollution du sol par les hydrocarbures

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnements sanitaires et économiques. (**Mbonigaba et al., 2009**).

L'évolution de la pollution par les hydrocarbures moyennant les analyses quantitatives et qualitatives s'avère très onéreuse bien qu'elle soit indispensable en fournissant des données physico- chimiques quantitatives. De plus, ces analyses ne permettent pas de connaître l'impact de ces polluants sur le milieu vivant. Néanmoins, ces mesures permettent de connaître la pollution et de mesurer les concentrations des polluants présents et aussi en mesurer l'effet.

Le développement de la bio- indication ouvre ainsi la voie à une surveillance écologique plus large intégrant les effets sur l'environnement grâce à des organismes sentinelles (**Garrec et Van Haluwyn, 2002**) par ailleurs, le problème majeur recentré dans les sols pollués par les produits pétroliers est l'atteinte de la nappe phréatique affectant ainsi des eaux, leur contamination peut nécessiter soit l'intervention de procédés physico- chimiques ou alors biologiques (**Vandecasteele, et al 2005**).

Une manière intéressante de traiter les sols pollués *in situ*, c'est d'utiliser les ressources que nous offrent les plantes dont certaines d'entre elles se révèlent d'excellents bio- accumulateurs pour certains polluants. On parle alors de phyto- remédiation. Cela écrit, ces techniques qui ont une bonne image auprès du public, lorsqu'aucune technique ne peut être mise en œuvre, il faut se résoudre au confinement du site.

I-2-2. La bio-remédiation du sol par les micro-organismes

Les techniques de bio-remédiation utilisent les propriétés dépolluantes de microorganismes (essentiellement des bactéries, mais aussi des champignons) endogènes ou exogènes au site contaminé (**Boopathy, 2000 ; Vidali, 2001**). La biodégradation d'un composé est souvent le résultat de l'action de multiples organismes (**Vidali, 2001**). Majoritairement, la bio-remédiation peut être appliquée *in-situ*. Ces techniques, relativement peu coûteuses, sont appréciées du grand public (**McGrath et al., 2002**). Elles peuvent être subdivisées en plusieurs catégories selon le principe biologique ou mode de dépollution mis en œuvre.

I-2-2-1. La biodégradation

Les bactéries et les champignons sont des acteurs essentiels dans le recyclage des composés organiques de toute nature (**Tableau 2**), contribuant, ainsi, à la biodégradation d'un grand nombre de substances utilisées comme source d'énergie ou comme source de carbone directement assimilable par les cellules (**Pelmont, 1995**) (**figure3**).

Selon **Pelmont, 1995**, les caractéristiques des bactéries aptes à dégrader les hydrocarbures sont les suivantes :

- Génétiquement stable.
- Apte à se reproduire rapidement suite à entreposage de longue durée.
- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers.
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimales.
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques.
- 63% pigmentés (orange, jaune et rouge).
- La majorité des souches bâtonnées Gram négatives.
- Des bactéries motiles ou mobiles.
- 20% des bactéries Gram positives, filamenteux.

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (**Klug et Markovetz, 1991; Davies et Westlake, 1997; Blasig et al., 1984; Fedorak et al., 1984; Meulenberg et al., 1997; Yamada-Onodera et al., 2002**).

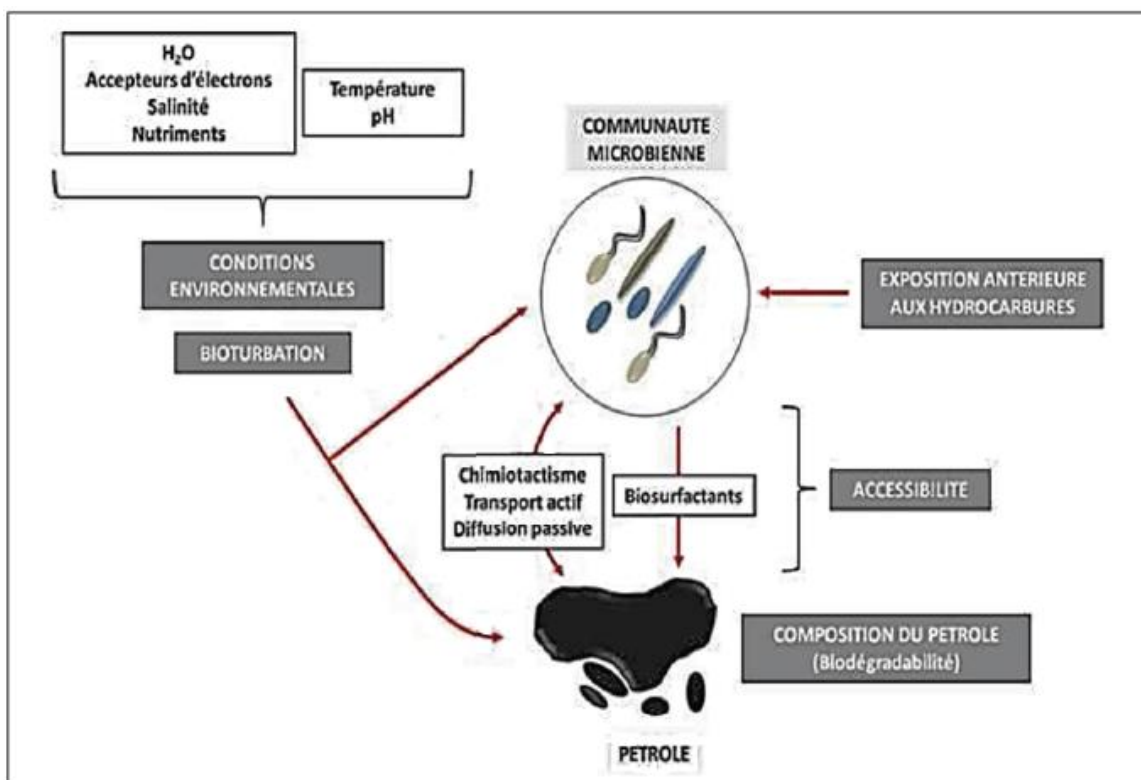


Figure 3 : facteurs affectant l'efficacité de biodégradation (Sauret, 2011).

Tableau 2 : liste des bactéries capables de dégradés les hydrocarbures (Jagadevan et Mukherji, 2004).

Composés	Micro-organismes
Alcanes	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Micrococcus</i> sp. <i>Condida antarctica</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Ochrobactrum</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Seiratiamarcescens</i> <i>Condidatropicalis</i> <i>Alcaligenesodorans</i>
Mono-aromatiques	<i>Brevibacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Alcaligenesodorans</i>
Poly- aromatiques	<i>Sphingomonaspaucimobilis</i> <i>Achromobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Mycobacterium flaviscens</i> <i>Rhodococcus</i> sp.

II-1. Structure de l'ADN:

L'acide désoxyribonucléique (ou ADN) est une molécule que l'on retrouve dans tous les organismes vivants. L'ADN est présent dans le noyau des cellules eucaryotes, dans le cytoplasme des cellules procaryotes, dans la matrice des mitochondries ainsi que dans les chloroplastes. Certains virus possèdent également de l'ADN encapsulé dans leur capsid. L'ADN est le support de l'information génétique. Il est à la base de la synthèse des protéines. L'ADN possède une structure en forme de double hélice (découverte en **1953** par **James Watson, Francis Crick**). L'ADN est un polymère de bases désoxyribonucléiques, plus communément appelées nucléotides. Chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphate (ou acide phosphorique) lié à un sucre, le désoxyribose, lui-même lié à une base azotée. Ces bases sont au nombre de quatre : l'adénine (notée A), la thymine (notée T), la cytosine (notée C) et la guanine (notée G). Le squelette de l'ADN est formé de la répétition sucre-phosphate.

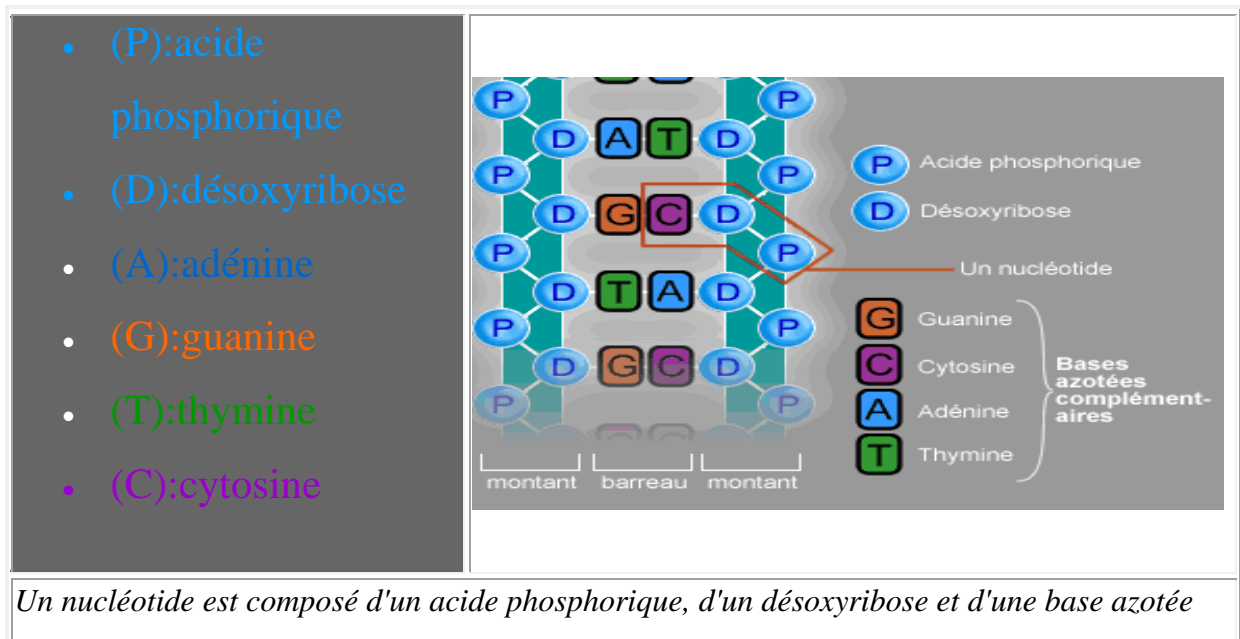


Figure 4 : les compositions d'un nucléotide

(<http://www.dgpc.ulaval.ca/bio90192/chap4/notesadn/notesadn4.htm>).

Les bases azotées adénine et guanine appartiennent au groupe des purines alors que les bases thymine et cytosine appartiennent au groupe des pyrimidines. Les purines sont formées de deux cycles alors qu'il n'y en a qu'un pour les pyrimidines.



Figure 5 : l'Adénine est associée à la Thymine et la Guanine associée à la Cytosine.

(<http://www.dgpc.ulaval.ca/bio90192/chap4/notesadn/notesadn4.htm>).

Watson et Crick ont eu accès aux travaux de plusieurs chercheurs, en particulier à Cambridge, qui cherchaient à déterminer la structure de l'ADN grâce à l'observation de la diffraction de rayons X à travers des cristaux d'ADN purifié. Ces travaux leur ont permis de conclure :

- à l'existence de deux chaînes dans la molécule d'ADN.
- à leur association en une forme d'hélice.
- à une association antiparallèle de ces deux chaînes.

A partir de ces différents points (deux chaînes antiparallèles en hélice, associées par des bases azotées complémentaires deux à deux), Watson et Crick ont pu réaliser un modèle moléculaire tridimensionnel de la molécule d'ADN.

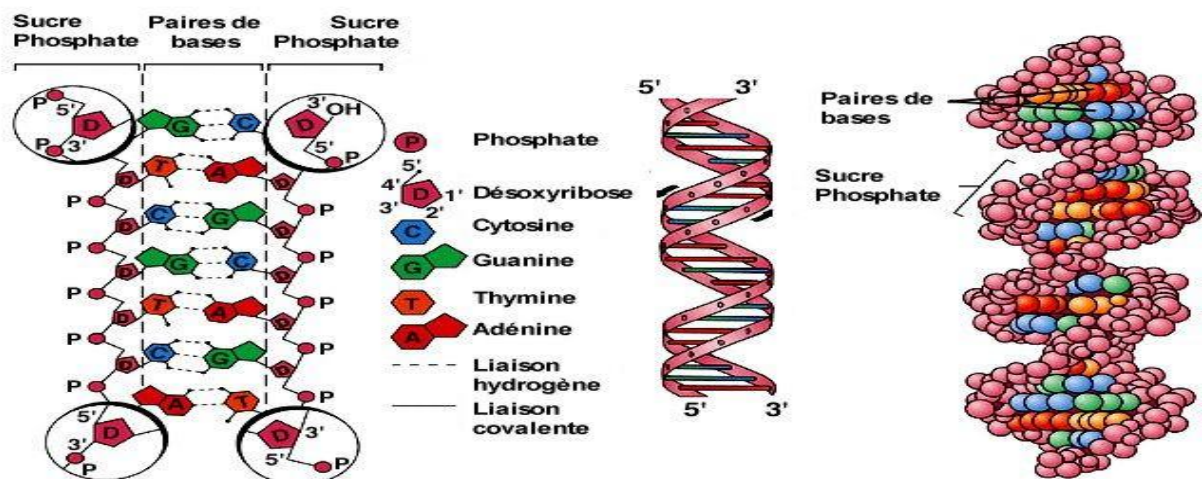


Figure 6 : l'ADN dans la cellule. (<http://edumed.unige.ch/dnaftb/1/concept/index.html>).

En février 1953, on raconte que Francis Crick à Cambridge en annonçant qu'il avait, avec James Watson, découvert rien de moins que le secret de la vie. C'est la découverte de la structure de l'ADN qui allait permettre, dans les années suivantes, de comprendre les bases

moléculaires de l'hérédité. L'ADN constitue le matériel génétique de la cellule et le matériel génétique d'un être vivant doit :

- **Détenir l'information génétique propre à son espèce comme nous le verrons,** l'ordre d'enchaînement des nucléotides constitue un message, une information permettant à la cellule d'assembler dans le bon ordre les acides aminés de ses protéines. Et c'est la sorte de protéine que fabrique un être vivant qui détermine ses caractéristiques physiques.
- **Pouvoir se reproduire avec le moins d'erreurs possibles.** À chaque fois qu'une cellule se divise en deux cellules, l'information doit être reproduite intégralement de façon à ce que chacune des deux cellules obtenues détienne l'ensemble de l'information qui était dans la cellule de départ.
- **Pouvoir se modifier (mais pas trop).** L'ADN n'est pas une molécule d'une stabilité à toute épreuve. Des modifications accidentelles peuvent modifier le message. Un nucléotide, par exemple, peut être remplacé par un autre ce qui modifie le message. Ce sont ces modifications qui permettent l'évolution. Sans elles, l'évolution ne serait pas possible.
- **Pouvoir être traduit en caractéristiques physiques.** Le message contenu dans l'ADN doit pouvoir être "lu" par la cellule. Ce n'est pas tout de détenir de l'information, mais encore, cette information doit pouvoir être utilisée, elle doit pouvoir être traduite en quelque chose de concret, en protéines dans le cas de l'ADN.

Chacune de ces propriétés fondamentales de la vie découle de la structure de l'ADN. La découverte de la structure de l'ADN a permis de comprendre sous quelle forme est l'information dans la cellule, comment cette information peut se reproduire, comment elle peut se modifier permettant ainsi l'évolution et comment elle peut être traduite en caractéristiques physiques transmissibles à travers les générations.

II-2. Les Mutations :

Elles sont toujours liées à un changement dans le matériel génétique (ADN). Des mutations apparaissent spontanément mais avec une fréquence très faible. Elles sont de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} par génération, c'est à dire que parmi 10^5 à 10^6 gamètes, un seul sera muté pour un locus donné.

La mutation est une modification héréditaire du matériel génétique d'un individu en absence de confrontation avec un matériel génétique étranger (**Guiraud, 1993**). Cette altération peut être induite par divers agents chimiques et physiques sur l'ADN et peut être due à des erreurs rares dans la réplication de l'ADN (**Winter et al, 2000**). La position de la mutation sur les gènes est importante. Le changement se traduit par une variation phénotypique de la cellule, mais qui peut être inaperçue, si elle survient sur une partie non codante du génome (**Nicklin et al, 2000**). On distingue : la mutation ponctuelle, la plus fréquente. Il s'agit de la plus simple mutation correspondant à la substitution d'un nucléotide par un autre, mettant en jeu l'altération d'une unique base, ce qui modifie un codon de telle sorte que l'acide aminé soit aussi modifié. Cette mutation est dite faux sens. Alors que, si le nouveau codon code pour un codon stop, la mutation est dite non-sens (**Winter et al, 2000**). La délétion, l'insertion, la duplication ou la translocation, concernent des modifications portant sur des chromosomes entiers par modification de leur nombre ou de leurs structures.

II-3. La mutagenèse :

La mutagenèse ou mutagenèse est le processus d'apparition d'une mutation, il peut être naturel ou artificiel (par exposition de l'ADN à un « agent mutagène »). Dans la nature, ce processus peut être à l'origine du cancer, de maladies héréditaires ou d'innovations évolutives et est le principal responsable de la biodiversité des espèces. **Charlotte Auerbach, Robson et Muller** contribuent à la découverte et au développement de la mutagenèse comme génie génétique. La mutagenèse dirigée ou aléatoire est aussi une approche utilisée par le génie génétique et la biologie pour comprendre la fonction des gènes ; elle consiste en l'introduction volontaire de mutations par l'action d'agents mutagènes chimiques ou physiques dans une séquence ADN afin de déduire des informations sur le rôle des gènes, à partir de l'analyse des effets de ces mutations. La modification *in vitro* de la séquence en acides aminés d'une protéine permet d'évaluer l'importance de ces acides aminés dans la fonction de la protéine. Le but est donc de muter le gène et de produire la protéine. Cette technique est aussi utilisée en production de variétés nouvelles.

La mutagenèse consiste soit à détecter les mutations naturelles, soit à provoquer des mutations par diverses méthodes physiques et chimiques. La méthode physique fait l'objet de notre étude, l'application des radiations (UV) comme un agent mutagène physique, sur deux souches bactériennes (*Bacillus*, *Pseudomonas*) isolés à partir d'un sol pollué par les hydrocarbures.

II-3-1. Les agents mutagènes

Un mutagène est un agent naturel ou résultant de l'activité humaine, physique ou chimique qui peut altérer la structure de l'ADN (**Dupont, 2001**).

II-3-1-1. Les agents chimiques :

Une grande variété de produits chimiques est en mesure de causer des mutations de l'ADN (**Winter et al, 2000**). On distingue 4 groupes d'agents chimiques (**Boucher, 2002**) : les analogues de bases, agents désaminant (ou modifiant l'ADN), les agents alkyles et agents intercalant.

II-3-1-1-1. Les analogues de bases

Il s'agit des molécules qui ressemblent par leurs structures aux bases azotées ordinaires, mais qui affichent des propriétés légèrement différentes en ce qui concerne l'appariement des bases (**Tortora et al, 2003**). Ces produits exigent des conditions d'utilisation précises et ne sont bien efficaces que sur des cellules en multiplication (**Guiraud, 1993 et Dupont, 2001**). Lorsqu'ils sont incorporés, ils subissent des modifications tautomériques similaires aux bases normales mais à des fréquences plus élevées ce qui aboutit à une mutation (**Nicklin et al, 2000 et Griffiths et al, 2001**).

II-3-1-1-2. Agents désaminant ou agents modifiant l'ADN

Ces agents donnent des mutations ponctuelles mais également des mutations plus étendues et inactivant (**Guiraud, 1993**). Son mode d'action est de modifier chimiquement des bases d'ADN (généralement au repos). Certaines sont à l'origine de l'addition de groupement alkyl ou aryl (**Winter, 2000**).

II-3-1-1-3. Agents intercalant

Ce sont des composants plats, à 3 anneaux, similaires en structure à une paire de bases. Ils peuvent s'insérer dans l'ADN provoquant une distorsion de l'hélice et donc un glissement durant la réplication, l'insertion et la délétion de bases (**Nicklin et al, 2000; Winter et al, 2000; Griffiths et al, 2001**). Les agents intercalant peuvent également s'empiler entre les bases, dans l'ADN simple brin. De cette façon, ils peuvent stabiliser les bases, qui ont formé des boucles lors du décalage du cadre de lecture (**Griffiths et al, 2001**).

II-3-1-1-4 Agents alkyles

Ce sont des réactifs capables d'entraîner des méthylations, méthylations ou alkylations supérieures au niveau des bases mais aussi à celui des groupements phosphatent. Ils sont actifs sur l'ADN au repos. L'alkylation s'effectue en N ou O avec une efficacité variable selon la base, la position et le microorganisme utilisé (**Guiraud, 1993**).

Tableau 3: les groupes mutagènes chimiques. (**Manuel on mutation breeding, 1977**).

Groupes de mutagènes	Produits simples
Bases analogues	S-bromo-uracil, S-bromo-déoxyuridine, 2-amino-purine.
Antibiotiques	Azasérine, mitomycin C, streptomgrin, actinomycin D.
Agents alkylisants	
Moutarde de soufre	Sulfide d'éthyl-2-chloroéthyle
Moutarde de nitrogène	Amine 2-chloroéthyl-diméthyle
Epoxides	Oxide d'éthylène
Ethylèneimines	Ethylèneimine
Sulfates, sulfonâtes, sulfones, et lactones	Méthanesulfonate d'éthyle
diazoalkanes	diazométhane
Composés nitroso	N-éthyl-N-nitroso urea
Acides	Acide de sodium
Hydroxylamine	Hydroxylamine
Acide nitrique	Acide nitrique

II-3-1-2. Les agents physiques :

II- 3-1-2-1. Les radiations ionisantes : Les radiations ionisantes hautement énergétiques, comme les rayons X ou gamma provoquent dans la molécule d'ADN des altérations étendues qui provoquent des coupures dans les brins et la destruction de sucres et de bases (**Winter et al, 2000**). Ils induisent aussi la formation des radicaux libres.

II- 3-1-2-2. Les radiations non ionisantes : La lumière ultraviolette La lumière UV est fréquemment utilisée au laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu (**Nicklin et al, 2000**). Les conséquences les plus graves de l'exposition à la lumière UV, sont les modifications de l'ADN, molécule qui porte toutes les informations

nécessaires à la vie des cellules et des individus (**Angulo, 2004**). Les rayons UV provoquent des transitions GC en AT, des mutations décadentes et des délétions (**Guiraud, 1993**).

L'exposition directe de l'ADN aux rayonnements UV, se traduit par la formation de liaisons covalentes indésirables entre certaines bases. Les thymines adjacentes dans un brin d'ADN peuvent se lier deux à deux pour former des dimères de thymine. S'ils ne sont pas extirpés, ces dimères peuvent occasionner des dommages graves à la cellule, généralement létale. Parce qu'ils empêchent ces dimères de répliquer l'ADN touchée ou de se transcrire correctement (**Titora et al, 2003 et Angulo, 2004**). Cette structure de d'irisation des bases pyrimidiques, appelée dimère cyclo butyle conduit à empiler les bases et peut mener à des délétions après répllication de l'ADN. Elle provoque aussi une distorsion de l'hélice de l'ADN (**Winter et al, 2000 et Nicklin et al, 2000**).

La lumière UV agit en induisant la formation des radicaux, qui provoquent la formation des dommages oxydatifs de l'ADN (**Borel et al, 1999**). Les ions bisulfites Désamine la cytosine en uracile Provoque des transitions de GC en AT Bromure d'éthyle S'intercale dans le double hélice, et provoque un glissement de paires de bases adjacent, ce qui résulte des mutations de fra shift. Agents intercalant Acridine orange pro flavine S'intercale entre les bases empilées de la double hélice de l'ADN, ce qui induit l'addition ou la délétion d'une paire de base et donc une mutation fra shift. L'agent alkyles Ethyl-methane sulfonât (EMS) ajout de groupes méthyles en différentes positions de bases. Il n'est pas incorporé dans la structure de l'ADN mais altère une base en une forme qui provoque le mauvais appariement. Ceci provoque des transitions de GC en AT, des transvasions et des micros délétions.

Les radiations ultraviolettes sont classées en trois groupes en fonction de la longueur d'onde : les UVC (190 à 280 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVA (320 à 400 nm) (**Borel et al, 1999**). Les radiations UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques. Les lampes germicides à faible pression de mercure sont efficaces ($\lambda = 245$ nm) (**Guiraud, 1993**). En raison de la faible pénétration du rayonnement UV, le volume de la suspension microbienne traité doit être limité, exposé sous une faible épaisseur (pas plus de 1cm) et légèrement agité (**Guiraud, 1993**). Les cellules sont étalées à la surface d'une boîte de Pétri et mises à l'action des rayons ultraviolets, le temps d'irradiation est déterminé expérimentalement (**Galzy, 1993**).

II-4 Amélioration des souches par mutagenèse :

Un mutagène est tout agent physique ou chimique qui augmente significativement les cas mutationnels et la proportion de mutations du niveau spontané: dans le passé (**Rieger *et al.*, 1976**). L'utilité de tout mutagène en amélioration des bactéries dépend non seulement de l'efficacité mutagénique, de la relation entre la fréquence de mutation et la dose, mais aussi de l'efficacité mutagénique, et de la production de changements désirables libres sans association avec les changements non désirés (**Konzak *et al.*, 1965**). Cette proportion peut être altérée par la variation des facteurs modificateurs.

Une mutation naturelle est un phénomène rare (**Guiraud, 1993**). Il n'affecte qu'une faible fraction de l'ensemble des cellules bactériennes d'une large population (10^{-6} à 10^{-9} par génération). La mutation est mesurable par le taux de mutations qui est la probabilité pour une bactérie de muter pendant une unité de temps défini souvent par le temps de génération (**Dupont, 2001**). La mutation naturelle est spontanée, ne dépend pas des conditions du milieu, la présence par exemple d'un antibiotique dans le milieu ne favorise pas l'apparition des formes résistantes à tel antibiotique.

La mutation n'affecte habituellement qu'un seul caractère en respectant les autres. La mutation d'un caractère donné ne modifie pas la probabilité de mutation d'un autre caractère. La probabilité pour une bactérie de subir simultanément deux mutations distinctes est le produit des probabilités individuelles de ces deux mutations, ce qui indique que le caractère mutation est indépendant (**Guiraud, 1993**).

Les modifications apportées par la mutation sont rendues permanentes par la réplication de l'ADN et elles sont transmises aux cellules filles à l'issue de la division cellulaire. Le caractère acquis est alors transmissible à la descendance, la mutation est donc héréditaire (**Winter *et al.*, 2000**). La mutation discontinue « brusque » ; ne s'effectue pas à la suite d'une longue période d'adaptation progressive, avec des formes intermédiaires mais habituellement en une seule étape, donc elle apparaît selon la loi de tout ou rien.

Le but de notre travail est :

- 1- Identification des souches bactériennes isolées à partir d'un sol pollué par des hydrocarbures.
- 2- L'exposition des souches identifiées au rayonnement ultra-violet à différentes doses pour établir une courbe de survie à chaque souche.

III-1. Provenance des échantillons :

Dans cette étude, on a utilisé deux bactéries isolées mais non-identifier, provenant du Laboratoire de Recherche «Microbiologie et Biologie Végétale» université de Mostaganem après l'isolement et la purification. Ces isolats ayant été isolés à partir du sol pollué par le pétrole, les échantillons du sol ont été prélevés de la raffinerie d'Arzew (Oran).

III-1-1. Conservation des isolats (à long et court terme).

Deux techniques peuvent être utilisées pour la conservation des souches pures.

- **Conservation à court terme :**

La conservation de courte durée se fait par ensemencement d'une colonie sur gélose solide inclinée, après incubation à 30°C pendant 24h, les géloses sont conservées à 4°C pour quelques semaines (Font de Valdez, 2002).

- **Conservation à long terme :**

Les bactéries sont conservées dans des cryo-tubes de 1 ml contenant 0.30ml de glycérol stérile (50% V /V) additionné de suspension bactérienne en phase exponentielle (0,70 ml). Le mélange homogénéisé est conservée à -20°C (Font de Valdez, 2012).

III-2. L'identification de souches purifiées:

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (Lamouliatte *et al.*, 1992).

Sur chacun des boites servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Chaque colonie suspectée est purifiée deux fois par isolement sur le milieu King A, King B pour l'isolat P6 et gélosé nutritive pour l'isolat B1. Pour une identification préliminaire de ces bactéries, nous sommes basés sur des études :

- Morphologique (les formes caractéristiques des colonies, leurs arrangement, la présence ou non de spores et leur coloration de Gram, coloration des spores).
- Etude biochimiques (test de mobilité, test de catalase et de type respiratoire...)

- Le profil biochimique par l'utilisation des galeries API 20E pour *Bacillus* et API 20 NE pour *Pseudomonas*.

III-2-1. Etude morphologique :

Suite à la purification des isolats, deux souches ont été retenues, dont nous avons étudié les genres conformément au protocole de **Carr *et al.*, (2002)**.

a- Aspect macroscopique

Cette méthode est basée sur l'observation visuelle des colonies, (la forme, la couleur, contour, l'élévation ...) permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification (**Singleton, 1999**).

b- Aspect microscopique :

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de Gram :

- **L'état frais :**

Permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparé avec l'eau physiologie et placée entre lame et lamelle. L'observation ce fait au microscope au grossissement $\times 100$ (**Singleton, 1999**).

- **Coloration de Gram :**

Est une coloration complexe qui permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté, ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (Gram+). La consistance et la valeur de coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries selon leur Gram. (**Marchal et Bourdon, 1982**).

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par (**Prescott *et al.*, 2003**). (Voir annexe 1).

- **Recherche des spores :**

Coloration par vert de Malachite, les spores apparaissent vert foncé sur fond vert clair (**Delarras, 2007**). La coloration des spores a été effectuée selon le protocole décrit par (**Dorner, 1926**). (Voir annexe 2).

III-3. Sélection des bactéries par l'utilisation de milieux de cultures spécifiques

III-3-1. Croissance sur milieu King (King A et King B)

Les milieux King A et King B (voir annexe 3) permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques. La production de pigments est favorisée par la composition du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

Le milieu King A favorise la production de pyocyanine, pigment permettant l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Les cultures typiques sont colorées en bleu-vert.

Le milieu King B favorise la synthèse de la pyoverdine, pigment vert fluorescent produit par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autre *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*).

III-4. Profil résistance à la température

La thermorésistance des spores est réalisée pour les bacilles. On a ensemencé trois boîtes de pétri contenant le GN par les Bacillus puis on a incubé les boîtes de Pétri à 45°C, 55°C et 65°C pendant 24h à 48h.

La croissance de cette bactérie indique la résistance des souches à ces températures.

III-5. Etude biochimiques (les tests d'orientations):

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les bactéries étudiés et les enzymes qu'ils possèdent. Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes. Les épreuves biochimiques permettent, en général, de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (Tortora *et al*, 2003)

III-5-1. Etude du type respiratoire

Selon Marchal et Bourdon(1982), Le type respiratoire est mis en évidence par l'ensemencement d'un milieu gélosé (viande- foie) dans des tubes fins et profonds dans lesquels l'oxygène n'est présent qu'en surface et sur une zone étroite de 1cm.

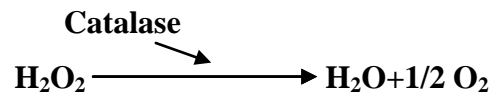
Après incubation des milieux à 30°C pendant 24 heures, 4 types respiratoires peuvent être distingués :

- Croissance en surface : bactéries aérobies strictes.
- Croissance en profondeur : bactéries anaérobies strictes.
- Croissance le long du tube : bactéries aéro-anaérobies facultatives.

- Croissance dans la partie supérieure proche de la surface : bactéries micro aérophiiles.

III-5-2. Recherche de la catalase

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Sur la lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie bactérienne à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (**Tortora *et al.*, 2003**).

III-5-3. Test d'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase, enzymes entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre.

Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase contenant de l'oxalate N-diméthyle para-nitro-phénylène-diamine, qui est préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile, déposé sur une lame et mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement indique que le test est positif (**Singleton, 1999**).

III-5-4. Recherche de nitrate réductase

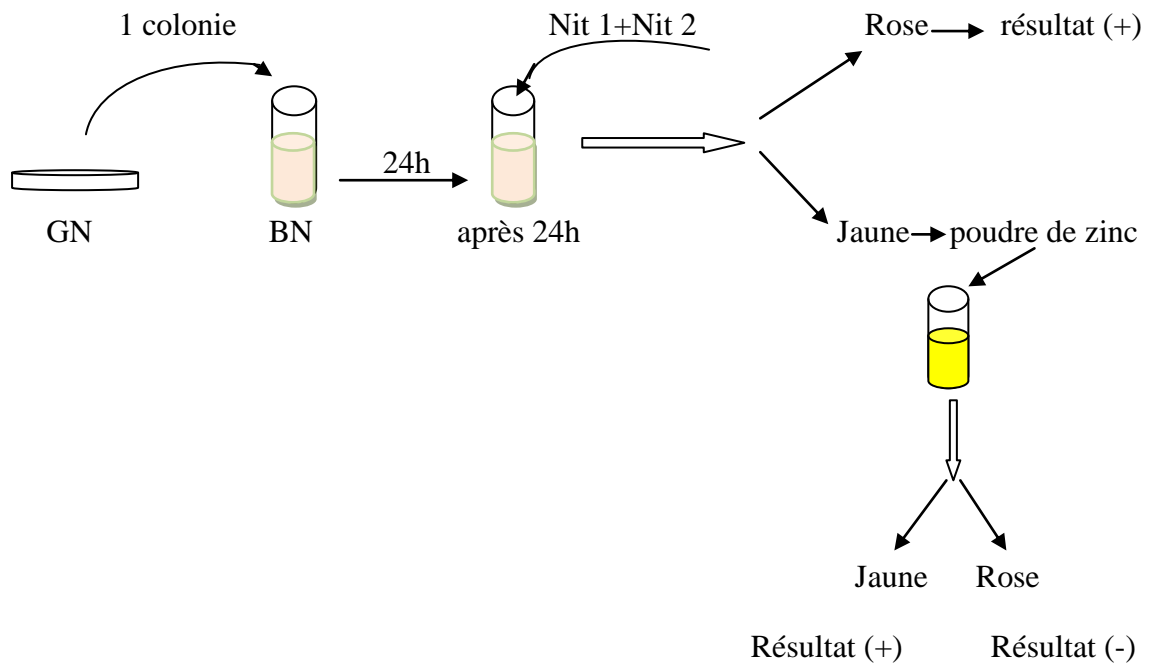
L'étude de réduction des nitrates se fait par la mise en évidence des nitrites formés. Ces derniers en milieu acétique ou sulfurique, donnent une coloration rose. Les nitrates peuvent aller également jusqu'au stade azote (N_2).

A une culture de 24 à 48h d'incubation à 30°C en bouillon nitraté, cinq gouttes des réactifs de Nit 1 puis Nit 2 ajoutés. Après agitation, la lecture est immédiate. Plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- Lorsque la coloration est jaune ou rouge ; les nitrates sont réduits en réduites, on parle de nitrate réductase positive (NR+).

- Lorsque le milieu reste incolore, de la poudre de zinc est ajouté (réducteurs des nitrates), après cinq minutes les tubes sont de nouveau observés :
 - Si le milieu devient rose ou rose, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie : nitrate réductase négative (NR-).
 - Si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduit au-delà du stade nitrites : nitrate réductase positive (NR+) (**Tortora et al., 2003**).

Ce test se fait selon le protocole suivant :



III-5-5. Test de Mannitol mobilité

Le Mannitol est un produit de réduction de D-Mannose. Sa dégradation conduit à la formation du fructose dont l'attaque aboutit à la formation des acides à chaînes très courtes (acide acétique, Acide formique). Le milieu Mannitol mobilité permet la recherche simultanément de la fermentation du Mannitol et la mobilité des bactéries (**Marchal et Bourdon, 1982**).

- La fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune.
- Les souches mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement.

III-5-6. Recherche de lécithinase

Ce test a été réalisé par l'ensemencement de la souche en strie sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (**voir annexe 4**). Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition de zone claire autour de la culture prouve que la souche possède la lécithinase (**De Vos et al., 2009**).

III-5-7. Recherche d'amylase

Ce test a été réalisé en cultivant la souche sur une gélose nutritive contenant 1% d'amidon (**voir annexe 5**). Après avoir obtenue une bonne culture bactérienne, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie, par contre un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

III-5-8. Recherche de la caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé (**voir annexe 6**). Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (**De Vos et al., 2009**).

III-5-9. Utilisation des galeries API

L'utilisation de galeries miniaturisées prêtes à l'emploi ont permis l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires (API 20 NE et API 20 E, bio Mérieux sa), qui occupent une place de choix pendant notre étude.

III-6. Méthodes de la mutagenèse par UV

III-6-1. Préparation de la pré-culture

- Prélever une colonie à partir d'un milieu gélosé et la mettre dans des tubes contenant 5 ml de BN.
- Incuber à 30°C pendant 24 heures sous agitation rotative (150 tour/min).

III-6-2. Culture

Transférer 5 ml de chaque pré culture dans des erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de BN. Incuber à 30°C pendant 24 heures sous agitation. L'agitation de 150 tours/min facilite l'aération des souches et leurs accès au substrat.

III-6-3. Mesure de la concentration microbienne

La concentration microbienne est suivie par mesure des densités optiques avec spectrophotomètre à 600 nm. (**Voir annexe7**).

III-6-4. Mutation par UV

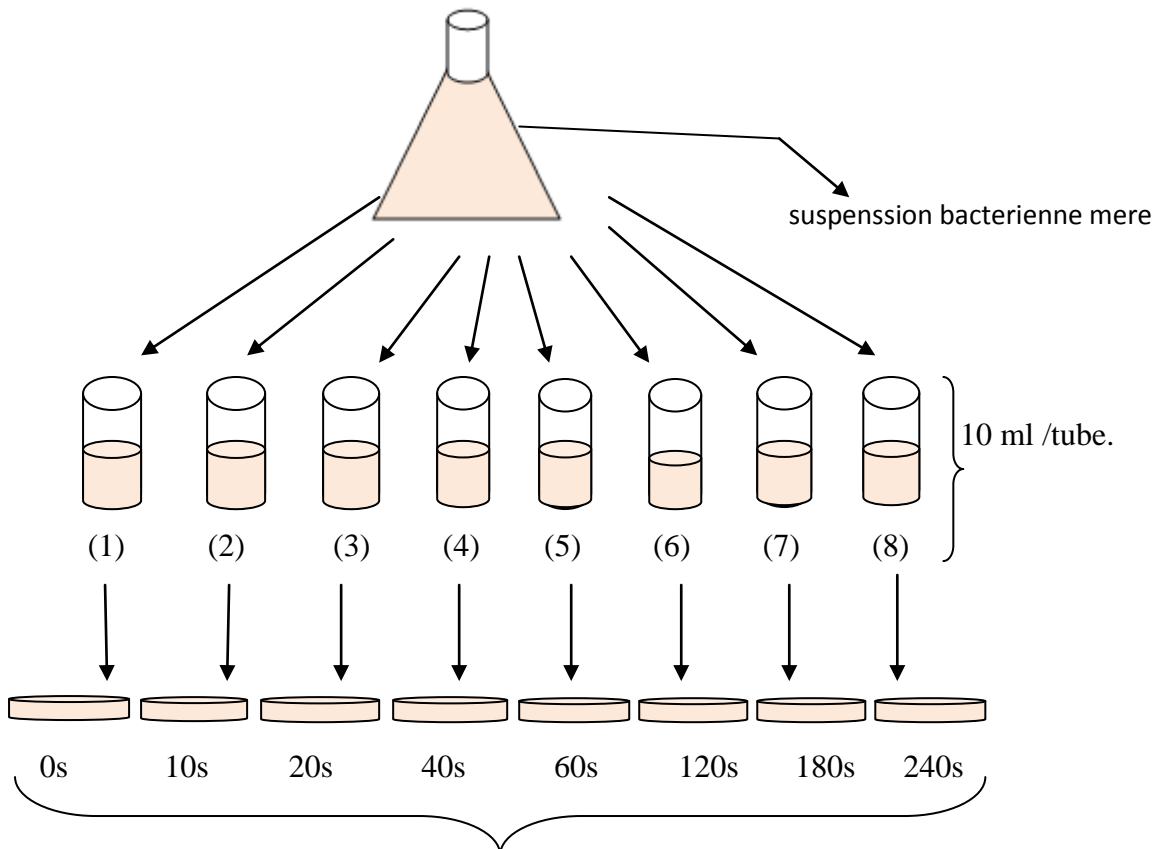
Il est nécessaire de pouvoir disposer d'un outil de mesure rapide, simple et peu coûteux afin d'effectuer un diagnostic initial ou de suivre une dépollution. Dans cette optique, l'Ultra-violet pourrait être une bonne méthode de caractérisation puisque, d'une part, les hydrocarbures ayant un caractère aromatique, absorbent dans le domaine UV- visible et, d'autre part, cette méthode a fait ses preuves dans de nombreux domaines (**El Khorassani, 1998 ; Roig, 1999 ; Vaillant, 2000**).

- **Principe**

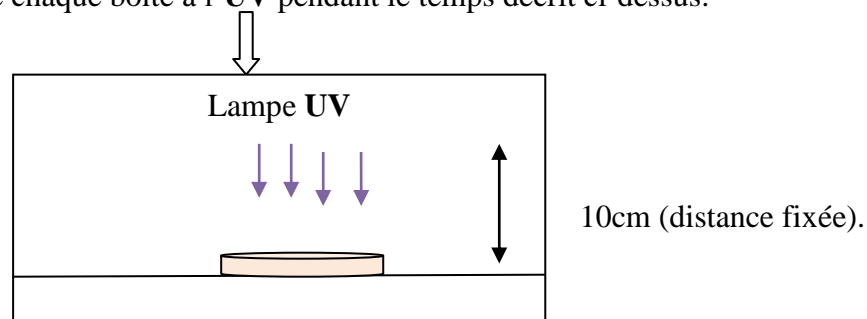
L'effet biologique des rayonnements UV (200-350 nm) est basé sur l'absorption du rayonnement lumineux par la matière vivante. Cette absorption est occasionnée par un transfert d'énergie du rayonnement vers la structure électronique de la molécule.

Les échantillons étaient irradiée dans une cabine à UV en plexiglass (46 x 15 x 30 cm) couverte de papier d'aluminium qui contenait la source de lumière UV à 254 nm (lampe germicide 15 W NIS) fixé au sommet de la cabine (**Voir annexe 8**). La source de lumière était placée 10 cm des échantillons. La dose totale d'UV a été déterminée par le temps d'exposition au débit de fluence UV. Après l'irradiation tous les tubes ont été couverts par du papier aluminium pour empêcher la photo réactivation.

Le travail se fait selon le protocole suivant :



On expose chaque boîte à l'UV pendant le temps décrit ci-dessus.

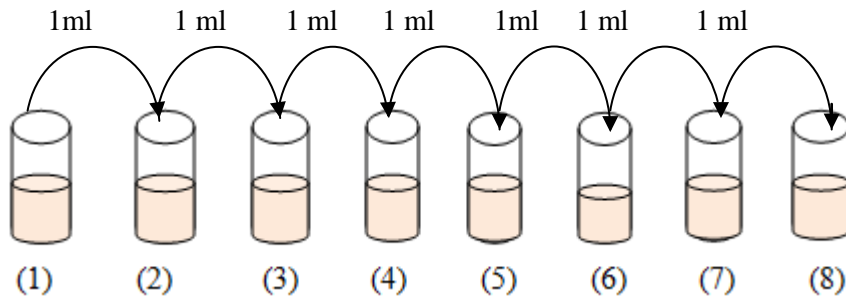


- **Mode opératoire**

Après la mesure de la concentration microbienne dans la suspension mère, les échantillons sont mis dans 08 tubes chacun contient 10 ml, ensuite, on met le contenu de chaque tube dans une boîte de Pétri pour passer une par une sous les rayons UV. On marque sur chaque boîte la durée qu'elle va être exposée à l'UV (0s, 10s, 20s, 40s, selon le schéma suivant) mais la distance entre la lampe à UV et la boîte est toujours fixe (10 cm).

III-6-5. Dilution décimale

Après l'exposition à l'UV, les dilutions décimales sont préparées, selon le protocole suivant ;



La dilution de chaque traitement été effectuer jusqu'à 10^{-8} . Puis 0,1 ml de chaque dilution estensemencée sur gélose nutritive et incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures, pour déterminer la viabilité des bactéries. Les colonies sont exprimées en UFC/ml.

III-6-6. La courbe de survie (la courbe de mortalité):

Le taux de cellules vivantes après les différents traitements à UV a été tracée en fonction du temps d'exposition et le graphe résultant est appelé la courbe de survie. Cette courbe est utilisée pour déterminer la LD_{50} et la LD_{95} . Ceci est la dose d'UV qui tue 50% et 95% de la population bactérienne respectivement.

Conclusion et perspectives

Une fois répandus, les hydrocarbures ont tendance à s'étaler à la surface du sol et à s'infiltrer en laissant un corps d'imprégnation à partir duquel l'huile est immobile. Cette « galette » prendra différentes formes suivant la nature du milieu, la nature et la quantité du polluant. Des études ont permis d'évaluer la profondeur maximale de pénétration, ce qui permet d'apprécier la probabilité de pollution d'une nappe sous-jacente.

L'étude expérimentale, divisée en deux parties, a consisté tout d'abord à faire une caractérisation des souches, isolées à partir du sol pollué par le pétrole, les échantillons du sol ont été prélevés depuis de la raffinerie d'Arzew (Oran). La seconde partie concerne l'étude d'effet d'UV caractérisation sur la croissance de ces souches.

La caractérisation phénotypique de ces souches nous a permis de la classer notre isolat dans le genre *Pseudomonas* et *Bacillus*. Cette dernière est mésophile à légèrement thermo tolérante avec un optimum de 45°C.

Étant donné que ces genres sont largement diversifiés, les tests biochimiques et l'utilisation des galerie s'étaient nécessaires, et ça nous a permis de mettre en évidence que la souche *Pseudomonas* appartenant à l'espèce *luteola* avec 94% de similitude. Et la souche *Bacillus* appartenant à l'espèce *thuringensis* avec 100% de similitude. Ce qui nous mène à dire qu'il s'agit bien de nos travaux publiables.

La technique d'induction des mutations physiques, par l'utilisation d'UV, présentent des propriétés distinctes et très variées. Suivant les conditions de traitement.

Malgré tout cela, l'utilisation des techniques d'induction des mutations reste d'actualité et présente des résultats satisfaisants dans l'amélioration des souches bactériennes. Cependant, davantage d'études doivent se faire pour une meilleure utilisation et une efficacité de ces méthodes.

Il faudra orienter les études sur les mutagenèses supposés être les plus recommandés par leur efficacité produire des mutations par l'utilisation des rayonnements UV qui est efficace et donne de bons résultats. Cependant, l'ordre d'application des mutagenèses est d'une grande importance et nécessite des recherches très poussées.

Une meilleure détermination des conditions de traitement pour l'application des techniques d'induction des mutations (effets de la température, dose et concentration des

mutagènes), et leurs répétitions dans le temps est une nécessité afin d'arriver à des résultats fiables. L'application de cette méthode ou une autre similaire pour pareilles bactéries pourrait faire l'objet davantage de recherches.

Une meilleure disponibilité des agents mutagenèse (physique et chimique) dans les laboratoires de recherche biologiques à l'Université de Mostaganem pour une plus grande application, ce qui accorde les chances d'obtention de bons mutants.

Mise en place dans l'avenir de laboratoires ou de lieux d'application des techniques d'induction des mutations et des outils moléculaires où tous les paramètres seront maîtrisés pour l'obtention d'un plus grand nombre de mutations biologiquement utiles.

Des études très poussées doivent être orientées à l'endroit d'une meilleure connaissance des propriétés des agents mutagènes pour une plus facile utilisation mais surtout pour une estimation plus exacte de la dose appropriée.

1. L'identification de souches purifiées:

1-1. Examen macroscopique

L'étude macroscopique a permis d'isoler 02 colonies distinctes par les caractéristiques regroupées dans le **tableau 4**. (P6) et(B1).

Tableau 4 : observations macroscopiques des colonies

	Diamètre	Couleur	Forme	Elévation	Contour	Opacité	Surface	Consistance
P6	1 mm	Beige dans le GN (King B, vert fluorescent à pigment diffusible).	Ronde	Convexe	Régulier	Opaque	Lisse brillante	Crémeuse
B1	2 mm	Blanche	Ronde	Plate	Régulier	Translucide	Rude	Tendre non visqueuse

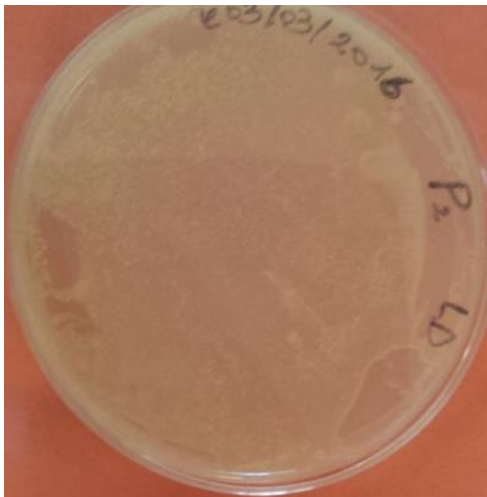


Figure7 : aspect macroscopique de la souche **P6** sur le milieu King B

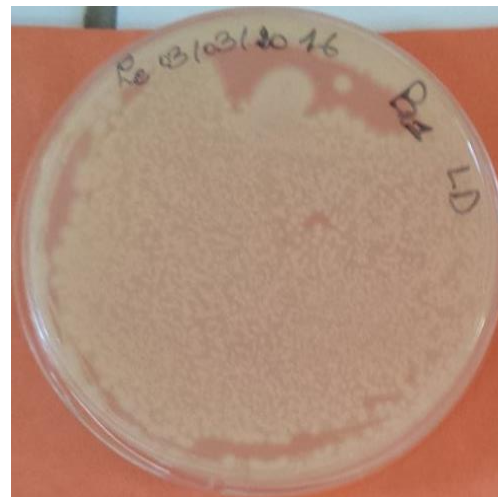


Figure 8 : aspect macroscopique de la souche **B1** sur le GN

1-2. Examen microscopique

Les observations microscopiques ont été réalisées suivant trois étapes : la première une observation à l'état frais de la forme et de la mobilité des bactéries ; la deuxième observation après l'addition du vert de Malachite + Fushine afin de mettre en évidence les spores si elles existent et la dernière après la coloration de Gram, les résultats sont rassemblés dans le **tableau 5**.

Tableau 5 : résultats de l'étude microscopique des souches isolées.

	Présence de spores	Mobilité	Forme de cellules	Gram
P6	(-)	(+)	bacille	(-)
B1	(+)	(+)	bacille	(+)

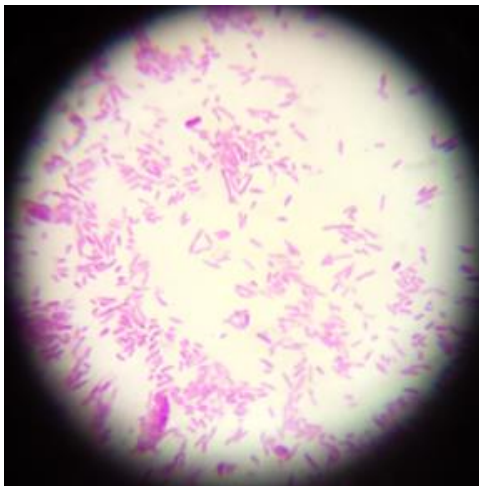


Figure 9 : aspect microscopique de la souche P6 après coloration de Gram (Gx100)

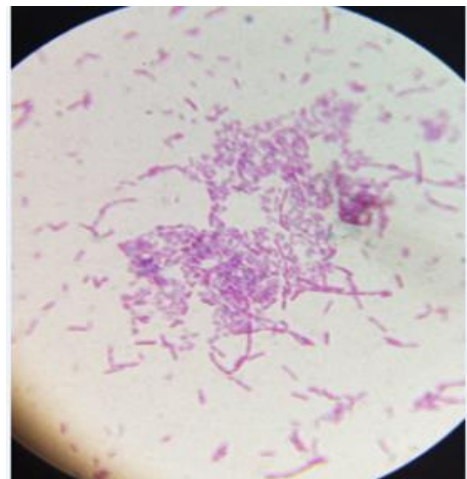


Figure 10 : aspect microscopique de la souche B1 après coloration de Gram (Gx100)

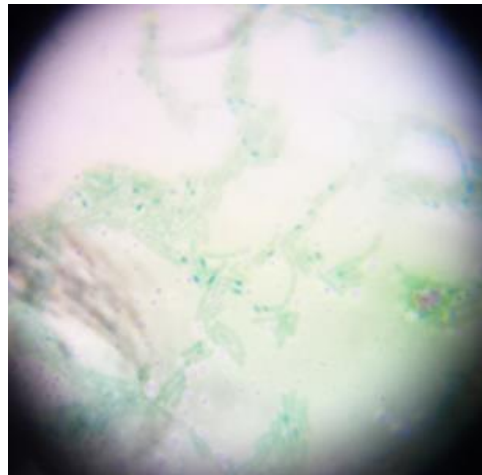


Figure 11 : aspect microscopique de la souche B1 après coloration de Spores (Gx100)

1-3. Les résultats des tests biochimiques

En ce qui concerne les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats par le biais du système (API 20 E, API 20 NE) et les tests complémentaires, sont regroupés dans le **tableau 6**, ci- après



Figure 12: aspect macroscopique de la souche P6 après le test de catalase



Figure 13: aspect macroscopique de la souche B1 après le test de catalase

Tableau 6 : résultats des tests biochimiques des isolats.

Souches		P6	B1
Caractères biochimiques		AS	AAF
Métabolisme énergétique	Type respiratoire (VF)	+	-
	Oxydase	+	+
	Catalase	+	+
	Nitrate réductase	+	+
Milieu King	King A	-	-
	King B	+	-
Lécithinase		-	+
Amylase		-	-
Caséine		-	+

AS : Aérobie strict.

AAF :Aéro- anaérobie facultative.

King A (-) : absence de pyocianine

King B : presence de pyoverdine .



Figure 14 : résultat de test oxydase pour la souche P6

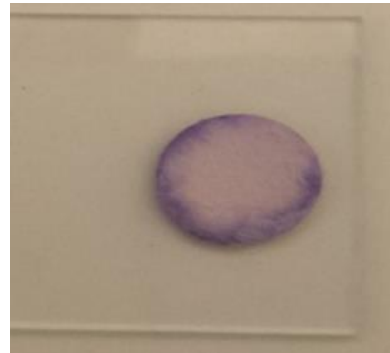


Figure 15 : résultat de test oxydase pour la souche B1



Figure 16: résultat de souche P6 en Mannitol Mobilité



Figure 17 : résultat de la croissance de souche P6 en VF



Figure 18 : résultat du test Nitrate réductase pour la souche P6



Figure 19: résultat de souche B1 en Mannitol Mobilité



Figure 20 : résultat de la croissance de souche B1 en VF



Figure 21 : résultat du test Nitrate réductase pour la souche B1

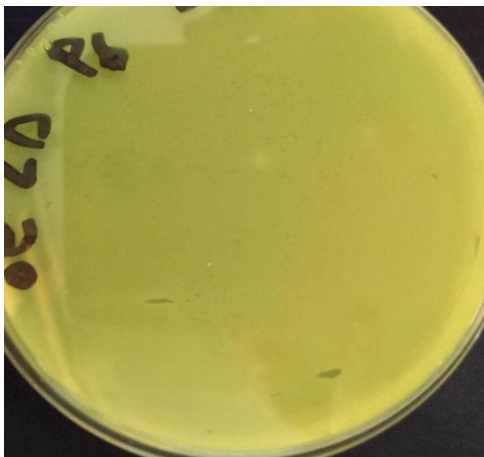


Figure 22 : la croissance de la souche P6 sur le milieu King B



Figure 23 : la croissance de la souche B1 sur le Gélose de jaune d'œuf



Figure 26 : profil biochimique de la souche P6 sur le site web d'internet.

NO₃ :réduction des nitrates en nitrites; **TRP** : L-tryptophane; **D glu** : fermentation; **ADH** : arginine di hydrolase; **URE**: URE ase; **ESC** :ESCulinase; **GEL** :Gelatinase; **PNPG** : 4-nitrophnyl-β Dgalactopyranoside; tests d'assimilation; **GLU** : Glucose; **ARA** : Arabinose; **MNE** : D-mannose; **MAN** : D-mannitol ; **NAG** : N-acetyl-glucosamine; **MAL** : D-maltose; **GNT** : potassium gluconate; **CAP** : acide caprique; **ADI** : acide adipique; **MLT** : acide malique; **CIT** : tri sodium citrate; **PAC** : acide phénylacétique; **OX** : oxydase.

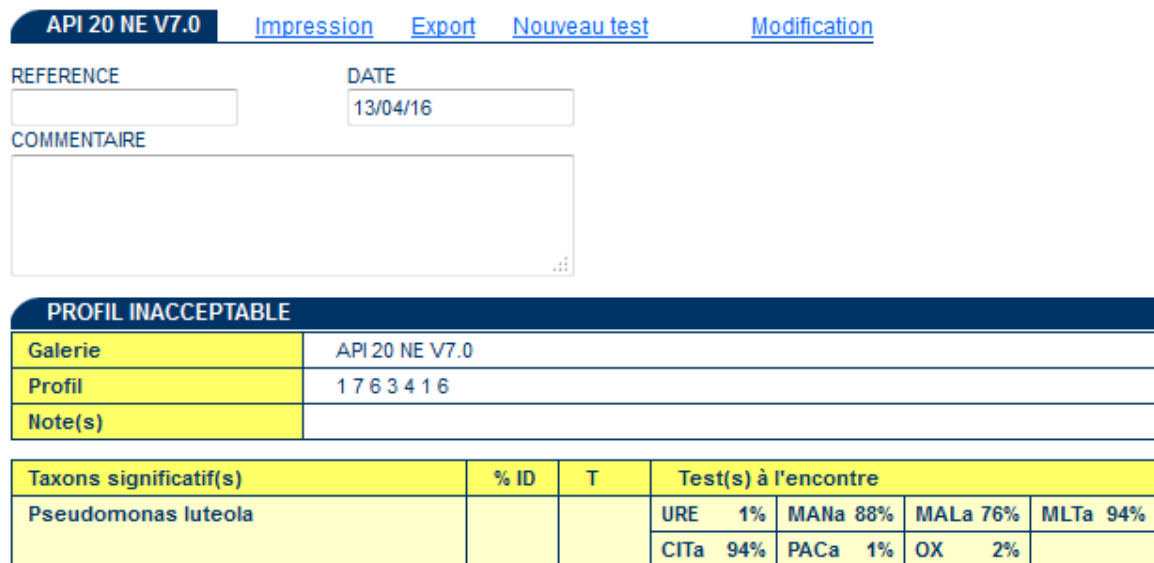


Figure 27 : résultat final de la souche P6 par le site web d'internet.

La souche B1, d'après l'étude macroscopique et microscopique, a été rattachée au genre Bacillus. Celle-ci forme de petites colonies circulaires de couleur blanche, rude, (Figure 8). La souche a forme bacillaire, à Gram positif (Figure 10), oxydase négatif, catalase positive et présente un caractère aéro-anaérobie (Tableau 6) (Figure 20).

L'incapacité de cette souche à dégrader le mannitol et l'oxydase négative nous permet de supposer qu'il s'agit de *Bacillus thuringensis* (à partir de site d'internet). L'habitat naturel du *Bacillus thuringensis* n'est pas bien connu, mais elle est trouvée fréquemment dans le sol, l'eau et environnements légèrement humides (De et al., 2010).



Figure 28 : identification biochimique de la souche B1 par galerie Api 20 E.

Tableau 7 : profil biochimique de la souche B1 sur le site web d'internet.

Caractère	Positif	Négatif	Douteux
ANA	⊙+	⊙-	⊙?
ONPG	⊙+	⊙-	⊙?
ADH	⊙+	⊙-	⊙?
LDC	⊙+	⊙-	⊙?
ODC	⊙+	⊙-	⊙?
CITrate Simmons	⊙+	⊙-	⊙?
H2S	⊙+	⊙-	⊙?
URE	⊙+	⊙-	⊙?
TDA	⊙+	⊙-	⊙?
INDole	⊙+	⊙-	⊙?
VP	⊙+	⊙-	⊙?
G-Latianse	⊙+	⊙-	⊙?

Tableau 7 (la suite)

D-GLUcose	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
D-MANnitol	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
INOsitol	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
D-SORbitol	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
L-RHAMnose	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
D-SACcharose	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
D-MELibiose	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
AMYgdaline	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
L-ARABinose	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
OXYdase	<input type="radio"/> +	<input checked="" type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
NITrites	<input checked="" type="radio"/> +	<input type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
MOBilité	<input checked="" type="radio"/> +	<input type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?
Lécithinase	<input checked="" type="radio"/> +	<input type="radio"/> -	<input type="radio"/> ?

Quand le caractère est négatif et le pourcentage de 100%, la probabilité est formation de 0. Il en est de même pour un caractère positif et le pourcentage de 0%. Ce premier mode de calcul exclut ainsi les taxons qui présentent un caractère à priori absurde.

Tableau 8 : résultat de calcul réalisé par le site web d'internet pour la souche B1.

Taxon	Probabilité
<i>B.thuringensis</i>	1.0000

L'identification du taxon *B. thuringensis* est extrêmement probable.

La présence de des différentes souches à savoir *Pseudomonas*, *Bacillus*, isolées de sol contaminée par les rejets de la raffinerie d'Arzew était prévisible vu qu'elles font parties des genres bactériens hydrocarbonoclasts prédominants cités dans les travaux de Leahy et

Collwel (1990) et Floodgate (1995). Ces organismes dégradant les hydrocarbures et sont ubiquistes (Atlas, 1995; Olivera *et al.*, 1997). Nous avons identifié *Pseudomonas* qui peut être isolé du sol selon les études de Hassen *et al.* (1998), ainsi que *Bacillus* qui peut être isolé du sol.

2. L'effet de la température sur la souche B1

Afin d'évaluer l'influence de la température sur la croissance de la souche B1 isolé, différentes valeurs de températures ont été testées : 45°C, 55°C, 65°C. Les résultats obtenus sont représentés par les figures 29, 30, 31.



Figure 29 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 45°C pendant 24 h.

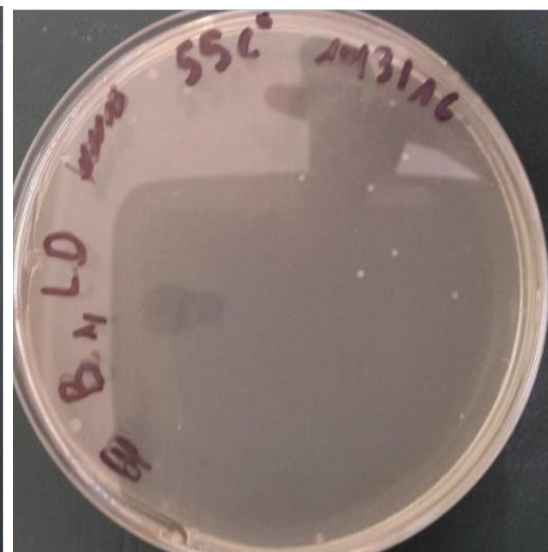


Figure 30 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 55°C pendant 24 h.

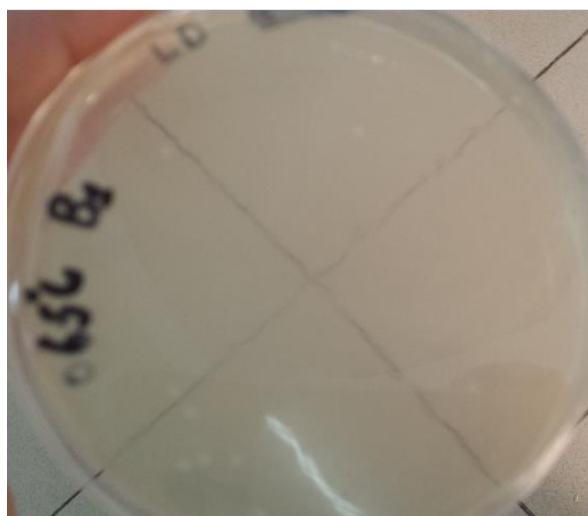


Figure 31 : aspect macroscopique de la souche B1 après l'incubation à 65°C pendant 24 h.

D'après les résultats obtenus, on peut constater que l'isolat B1 a une croissance normale à la température de 45°C, par contre il y a aucune croissance sur les deux boîtes qui incubées sous la température 55°C et 65°C.

3. L'effet de l'UV sur la survie des isolats:

Le rayonnement UV a été montré létale et mutagène dans une variété d'organismes, y compris les bactéries (**Witkin, 1976**). Il est généralement considéré que les dimères de pyrimidine sont des lésions de l'ADN induites par le rayonnement UV (**Kunz and Glickman 1984 ; Franklin et al 1985 ; Glickman et al 1986**). D'autres lésions telles que les ruptures d'ADN et des glycols de thymine sont également induits par le traitement UV (**Miguel and Tyrrell 1983**).

La corrélation entre la quantité d'énergie absorbée par l'ADN et l'effet biologique observée (la survie, la fréquence de mutation) est illustrée dans la région de longueurs d'onde 254-320 nm (**Peak et al 1984**).

Les observations faites dans les papiers de **Witkin (1989)**, selon laquelle les mutations apparaissent uniquement en raison des erreurs commises dans SOS système de réparation, sont largement acceptées.

Après que les deux souches *Pseudomonas*, *Bacillus* ont été exposées à des doses de rayonnement UV (00, 10, 20, 40, 60, 120, 180 et 240 secondes) pour tracer les courbes de survies, des dilutions ont été préparés et un volume bien précis 0,1 ml était étalé sur un milieu de culture. Puisque le moniteur de surveillance UV ou lux était pas disponible, la quantité réel de rayonnement exposée directe aux cellules était inconnue. Par conséquent, on a considéré que le temps de l'exposition aux UV est le seul variable qu'on peut le contrôler.

Après incubation des boîtes à 30 °C en fait le dénombrement des colonies après 24h, les résultats pour les deux isolats sont présentés dans la **figure 32** pour *Pseudomonas luteola*, et la **Figure 34** pour *Bacillus therungensis* Les colonies sont comptées quelle que soit la taille, à l'œil nu ou à l'aide d'un compteur colonie, (**Tableau 9** et **Tableau 10**).

À travers la courbe de survie de *Pseudomonas luteola* (**Figures 33**), on peut noter que la dose létale LD₉₅ est inférieure à 10 secondes d'exposition. Après 10 secondes d'exposition des cellules de *P. luteola* aux rayons UV, 99% des cellules ont été tuées.

La fluctuation de la courbe de survie de *P. luteola* observée au traitement de 20 secondes a été notée par plusieurs chercheurs comme **Lin and Wang (2001)** en travaillant sur *E. coli* K12

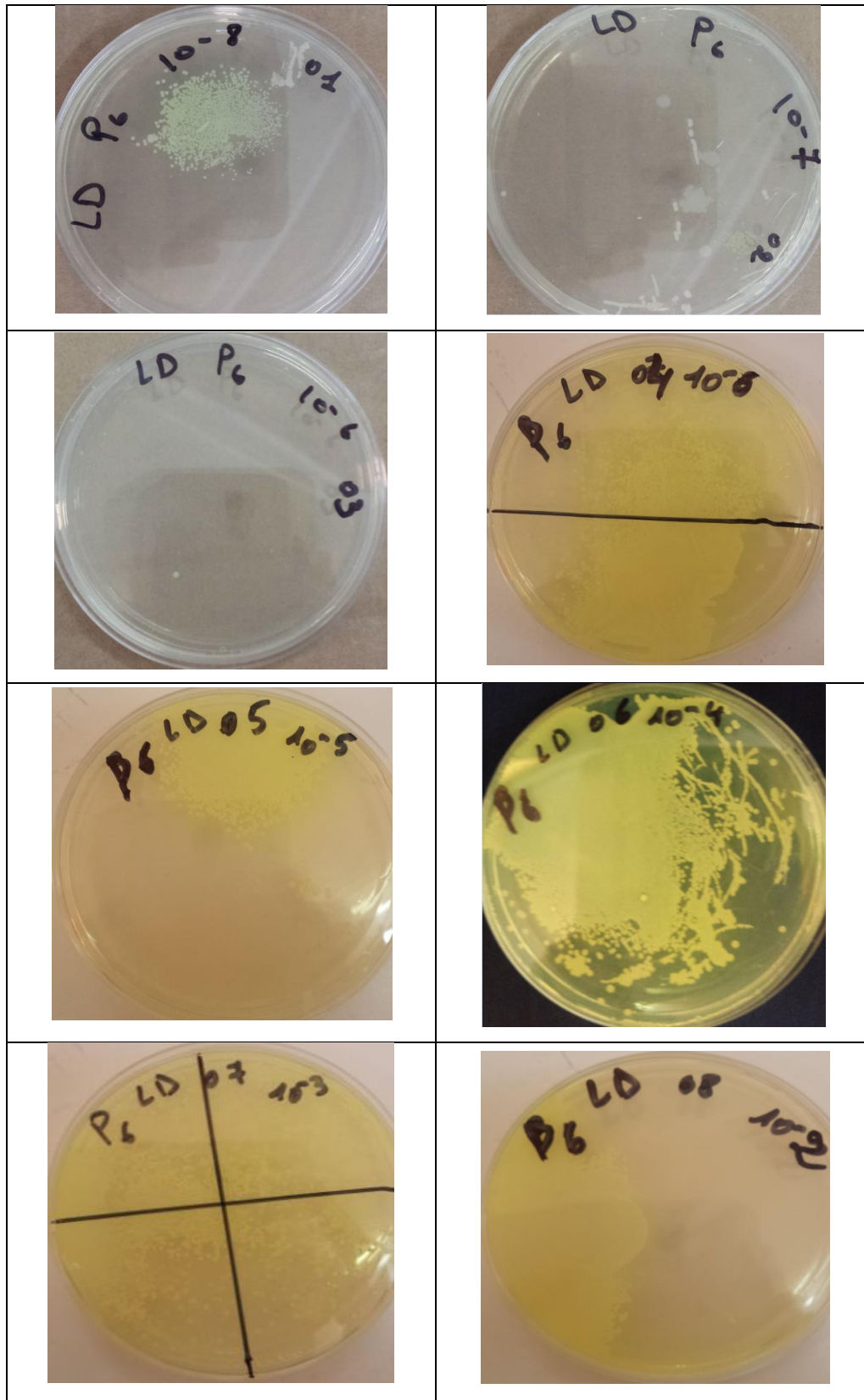


Figure 32 : représente la croissance de *P. luteola* après les différentes dilutions.

Tableau 9 : le nombre de colonies en UFC/ ml chez *P. luteola* après l'exposition à l'UV à différentes doses.

Temps (s)	0	10	20	40	60	120	180	240
Survive (UFC /ml)	260×10^9	38×10^8	10^7	90×10^7	100×10^6	294×10^5	280×10^4	40×10^3
%	100	1,46	0,038	0,35	0,0385	0,011	0,001	0,000154

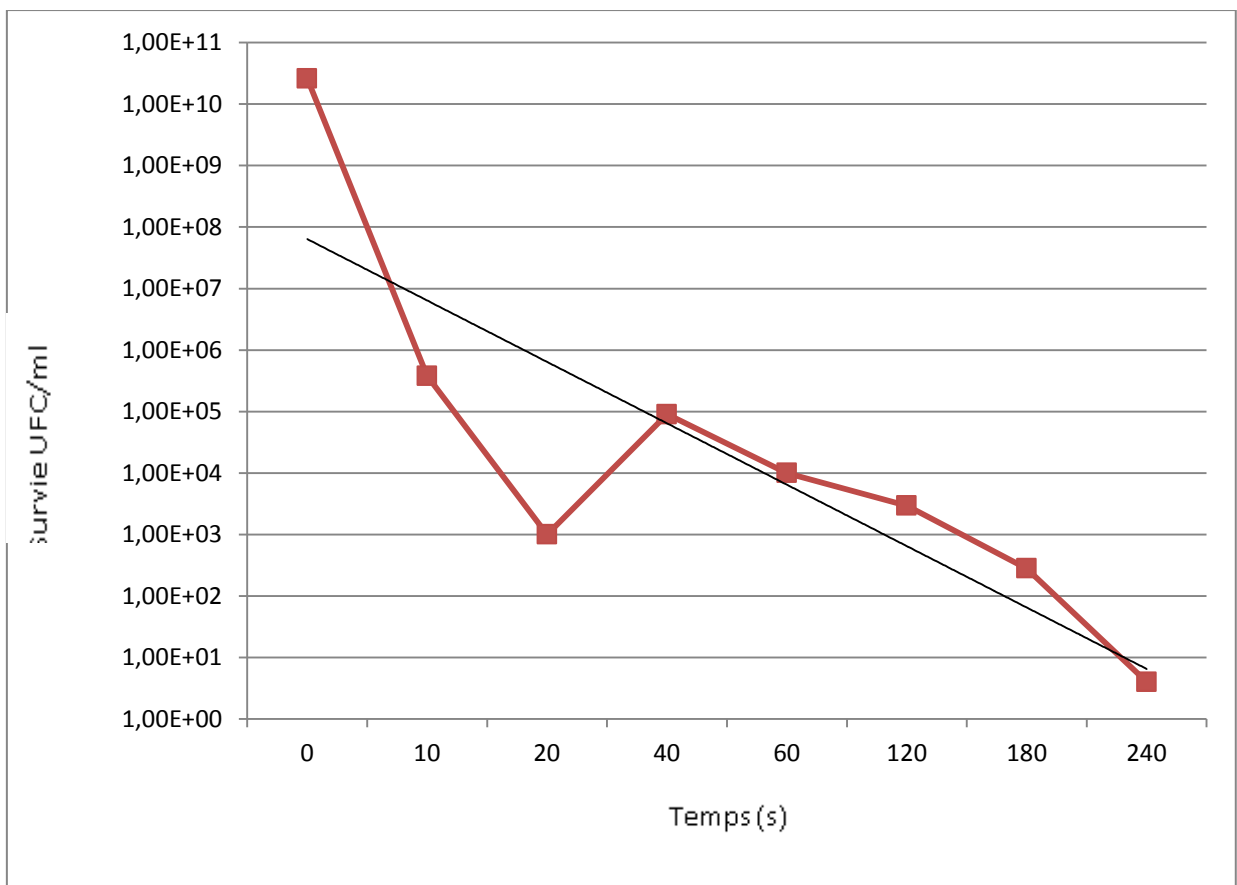


Figure 33: la courbe de survie (la courbe de mortalité) de la souche *Pseudomonas luteola*.

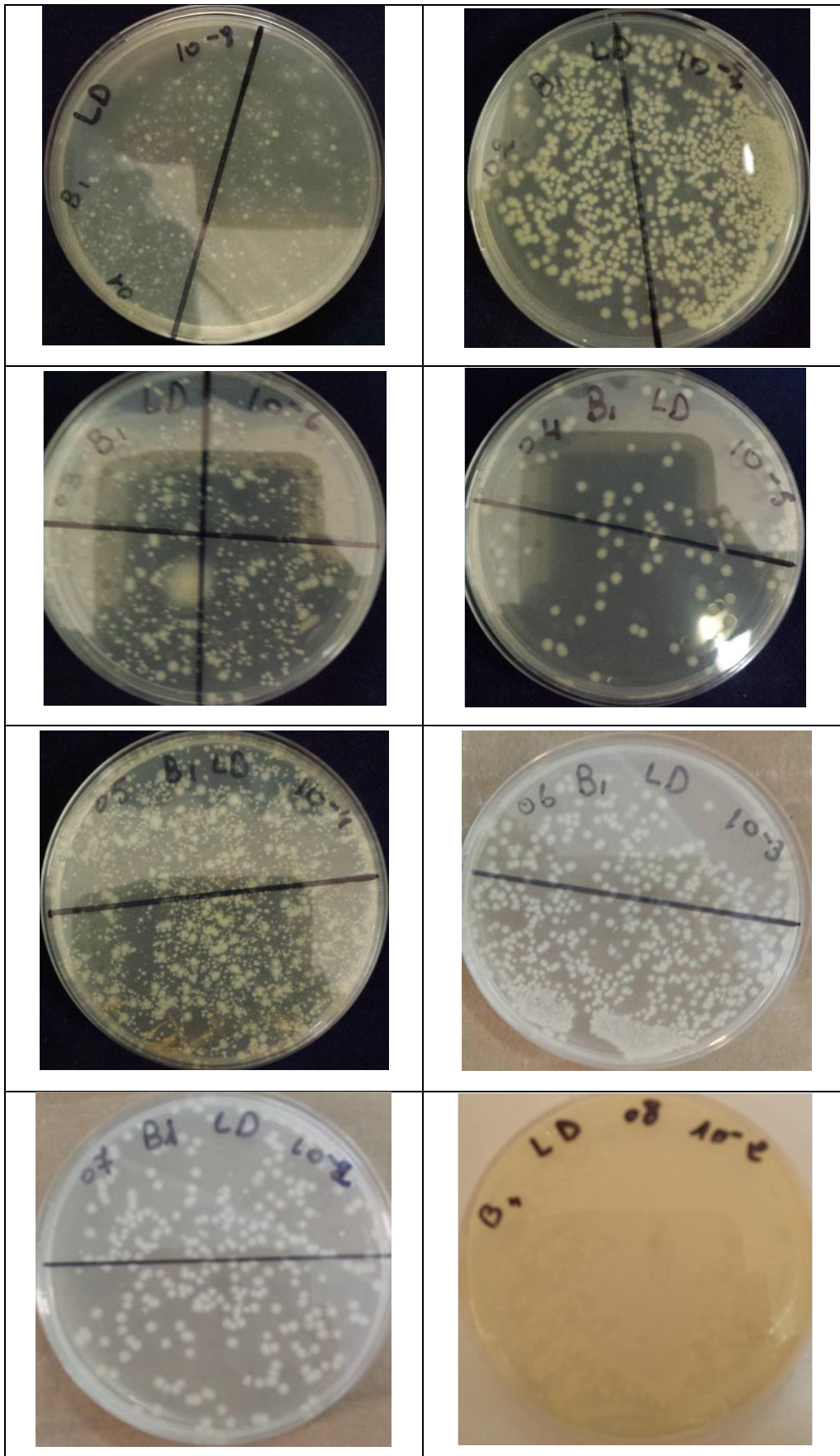


Figure 34 : représente la croissance de *B. thuringiensis* après les différentes dilutions.

Tableau 10 : le nombre de colonies en UFC / ml chez *B. thuringensis* après l'exposition à l'UV à différentes doses.

Temps (s)	0	10	20	40	60	120	180	240
Survie (UFC /ml)	292X10 ⁹	290X10 ⁸	168X10 ⁷	80X10 ⁶	298X10 ⁵	293X10 ⁴	200X10 ³	100X10 ³
Survie %	100	7,53	5,75	2,74	1,02	0,10	0,068	0,00342

La figure 35 représente la courbe de survie de la souche *Bacillus thuringensis*, on peut noter que la dose létale LD₉₅ est d'environ 20 secondes d'exposition. C'est-à-dire après 20 secondes d'exposition des cellules de *Bacillus thuringensis* aux rayons UV, 95% des cellules ont été tuées.

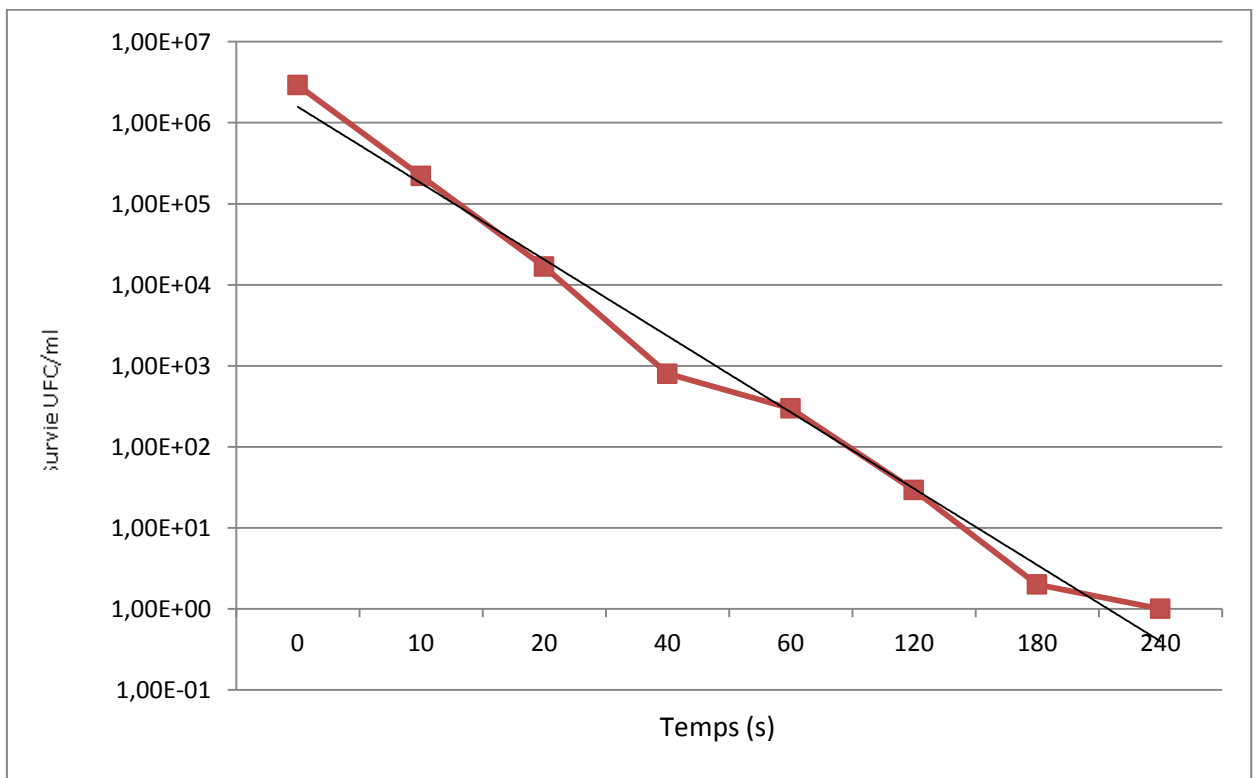


Figure 35: la courbe de survie (la courbe de mortalité) de la souche *Bacillus thuringensis*.

Références bibliographiques

- Angulo, J.F.** (2004) Le Soleil, indispensable mais dangereux ami. CLEFS CEA - N°49.
- Atlas, R M.,** (1995) Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 31(4-12): 178-182.
- Atlas, R.M.,** (1981). Microbiological degradation of petroleum hydrocarbons an environmental perspective. *Microbial Reviews* 45,180-209.
- Badis A, Laouaddia-Sellami N, GuetarniD, Kihal M, et Ouzrout R.** (2004). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux population Caprines locale (Arabia et Kabyle). *Science et Technologies-N° 23*, juin (2005), pp.3.-37.
- Balkwill, D.L.** (1989) Numbers, diversity and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol.* 7, 33-52.
- Blasig R, Mauersberger S, Riege P, Schunck W-H, Jockisch W, Franke P, Müller H-G.** Degradation of long-chain n-alkanes by the yeast *Candida maltosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1984;28 (6):589–597.
- Bonneau M, et Souchier B.** (1994) *Pédologie II :Constituants et propriétés du sol.* 2ème Ed. Paris: Masson; p. 619-654.
- Boopathy, R.** (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63–67.
- Borel, C. C. Goupillon ; T. Pilorge** (1999) Les effets des rayonnements sur la cellule vivante. CEA, Institut Curie, CNRS, France.
- Boucher, I.** (2002) Les modifications génétiques chez les microorganismes. Québec.
- Boulaine, J.** 1989. Histoire des pédologues et de la science des sols. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris
- Brown, P. E.** 1929. The new soil science. *Science*, LXX, 1826, 619-622.
- Buol, S.W., F. D. Hole & McCracken R.J.** (1973) *Soil genesis and classification.* Iowa state University press.

Carr, F.J., Chill, D., et Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Rev. Microbiol*, 28 : (4) 281-370.

Chapelle, F.H. and Lovley,D.R. (1990) Rates of microbial metabolism in deep coastal plain aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1865-1874.

Charlotte Auerbach"Lotte", J. M. Robson, & Muller, (1947) Chemical Production of Mutations. *Science* 105:243-247.

Coggle, J.E. (1983) Biological effects of radiation, pp. 1-23, International Publications Service. Taylor & Francis Inc., New York.

Davies et Westlake, D.W.S., (1979). Crude oil utilisation by fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 146-156

De A. S., Salunke P. P., Parikh H. R. et Baveja S. M., (2010). *Chryseomonasluteola* from bile culture in adult male with severe jaundice. *J of laboratory physicians*, 2:40-41.

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

DelarrasC., (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou decontrol sanitaire.* 427 p.

DornerW. (1926) Un procédé simple pour la coloration des spores. Avecune planche en couleurs. *Le Lait*, 6 (51), 8-12.

Dupont, J.Y. (2001) Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth A. Montelone , Division of Biology, Kansas State University.

El Khorassani H., (1998). Caractérisation d'effluents industriels par spectrophotométrie ultraviolette appliquée à industrie pétrochimique. *Thèse de Doctorat* de l'Université d'Aix-Marseille I, Chimie de l'environnement.

Fedorak, P. M., K. M. Semple and D. W. S. Westlake. 1984. Oil degrading capabilities of yeasts and fungi isolated from coastal marine environments. *Can. J. microbial.*, 30: 565.571.

Fliermans, C.B. and Balkwill, D.L. 0989 Microbial life in deep terrestrial sub surfaces. *Bioscience* 39, 370-377.

Floodgate G D., (1995). Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology *Aquatic Microbial Ecology*, 09, 3-11.

Font de valdez,G(2002). Maintenance of lactic acid bacteria.In food Microbiology protocols. Spencer. D. F. T. ET R agout ET spencer,A.L eds Humana press. Totowa New jersey. Argentine. 163- 171.

Franklin W. A., Doetsch P. W. and Haseltine W. A. Structural determination of the ultraviolet light- induced thymine-cytosine pyrimidine- pyramine (6-4) photo-product. *Nucleic Acid Res.* 13 (1985) 5317-5325.

Galzy, P. (1993) Le génie génétique : obtention et sélection des mutants. In Biotechnologie par René Scriban. 4eme édition. Technique et documentation, Lavoisier. p : 451-456.

Garrec J.P., Van Haluwoyn C. (2002). Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tec. & Doc. Lavoisier (Ed.). Paris. 117 pp.

Glickman B.W., Schaaper R. M., Haseltine W. A., Dunn R.L. and Brash D.E. (1986) C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 6945-6949.

Griffiths, A. J. F. ; W. M. Gelbart; J. H. Miller; R. C. Lewontin. (2001) Analyse génétique moderne. Edition : De Boeck université. p : 197-228.

Guiraud, J. P. (1993) Génétique microbienne : Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Techniques et documentation – Lavoisier. p : 89-111

Harm, W. (1980) Biologicaeffects of ultraviolet radiation, pp. 23-31, Cambridge UP, Cambridge.

Hassen A., N. Jedidi, M. Cherif, A. M'hiri, A. Boudabous& O.V. Cleemput., (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals.*Bio resour. Technol.*, 64:7-15.

Hicks, R.J. and Fredrickson, J.K. (1989) Aerobic metabolic potential of microbial populations indigenous to deep subsurface environments.*Geomicrobiology* 7, 67 78.

Jagadevan S. and S. Mukherji., (2004) Successful *In-situ* Oil Bioremediation Programmes- Key Parameters.*Indian Journal of Biotechnology*, (3), 495-50.

James Dewey Watson,Francis Crick, The Annotated and Illustrated Double Helix, edited by Alexander Gann and Jan Witkowski (2012) Simon & Schuster, ISBN 978-1-4767-1549-0.

Jenny, H. 1980. The soil resource origin and behavior. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Joff, J. S. 1949. Pedology. Somerset. Press, New Brunswick, New Jersey.

Jones, R.E., Beeman, R.E. and Suflita, J.M. (1989). Anaerobic metabolic processes in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology* 7, 117-130.

Justus Von Liebig (1840): the chemical gatekeeper /William H. Brok. P. cm.

Klug M. J., Markovetz A. J. (1991) Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 5:1-43.

Kunz B. A. and Glickman B. W. (1984) The role of pyrimidine dimers as premutagenic lesion: a study of targeted vs untargeted mutagenesis in the lac I gene of *Escherichia coli*. *Genetics.* 106 347-364.

Lamouliatte H., Mégrand F., et Cayla R., (1992) Helicobacter pylori et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. Editions techniques. EMC.

Laurent P., Burchon L., Guespin-Michel J. F., et N. Orange., (2000). Production of pectate lyases and cellulases by *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium evidence for two critical temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1538-1543.

Leahy J.G. & Colwell RR., (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 54, 305-315.

Lin K. and Wang A. (2001) UV mutagenesis in *Escherichia coli* K-12: Cell survival and mutation frequency of the chromosomal genes lacZ, rpoB, ompF, and ampA. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology Vol.1:*32-46

Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P. (1992) Reduction of uranium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 850-856.

Manual on mutation breeding. 1077. , Technical Report Series NO. 119. International

Atomic Energy, Vienna.

Marchal N. et Bourdon J. L ., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. *Doin*, Paris.

Mbonigaba J.J.M., Nzeyimana I, Bucagu C, Culot M, (2009) Caractérisation physique, chimique et microbiologique de trois sols acides tropicaux du Rwanda sous jachères naturelles et contraintes à leur productivité. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.* 13 (4): 545-558.

McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E (2002) Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, 75: 1-56

Meulenberg.R, Rijinaarts H.H.M, Doddema H.J, Field J.A., (1997). Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS MicrobiolLett.* 152: 45-49

Microsoft ® Encarta ® 2009. © 1993-2008 Microsoft Corporation.

Miguel A. G. and Tyrrel R. M (1983) Induction of oxygen- dependent lethal damage by monochromatic UVB (313) radiation: strand breakage, repair and cell death. *Carcinogenesis*, 4. 375-380.

Nicklin, J; K. Graeme-Cook ; T. Paget; R. Killington. (2000) L'essentiel en microbiologie. Port Royal livres. BERTI Editions.p: 113-121.

Olivera, N.L., Esteves, J.L. and Commendatore, M.G., (1997). Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International BiodeteriorationBiodegradation*40, 75-79.

Pelmont, J. (1995). Bactéries et environnement: Adaptation physiologique. Vol 2. p. 541-572. Office des Publications Universitaires.

Phelps, T.J., Raione, E.G., White, D.C. and Fliermans, C.B. (1989) Microbialactivities in deep 136 subsurfaceenvironments. *Geomicrobiology* 7, 79-91.

Prescott et al, (2003) :Microbiologie.2ème Edition française. Traduction de la 5ème Edition américaine par Claire-Michelle-Bacq-Calberg et Jean Dussart. Edition de Boeck-

Roig B., (1999). Couplage UV/UV : applications analytiques environnementales. *Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille I.* Chimie de l'environnement.

Sauret. C., (2011). Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la récurrence des pollutions. Thèse de Doctorat. Université Pierre Et Marie Curie. Microbiologie environnementale.

Simonson, R. W. 1968. Concept of soil. *In: Advances in Agronomy* (ed A. G. Norman). Academic Press, New York, London.

Sinclair, J.L. and Ghiorse, W.C. (1989) Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae, and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology* 7, 15-31.

Singleton P., (1999), Bactériologie, Edition *Duonod* 4^{ème} édition Paris. 415 p.

Smith, K.C. (1977) Ultraviolet radiation effects on molecules and cells. In: *The Science of Photobiology* (Smith, K.C., Ed), pp. 113-142, Plenum, New York.

Tortora. G..J; B.R. Funk; C.L. Case. (2003) Introduction à la microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique Inc. Pp. 945.

Vaillant S., (2000). La matière organique des eaux résiduaires urbaines : caractérisation et évolution. *Thèse de Doctorat* de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. Chimie et microbiologie de l'eau.

Vandercastele, M., Glowinski, J., and Venance, L. (2005) Electrical synapses between dopaminergic neurons of the *Substantia nigra* pars compacta. *Journal of Neuroscience*, 25(2):291–298.

Vidali, M. (2001) Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163–1172.

Winter, P. C; G. I. Hickey; H.L. Fletcher (2000) L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI Editions. p : 101-115.

Witkin E. M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40 869-907.

Witkin E. M. (1989) Ultraviolet mutagenesis and the SOS response in *Escherichia coli*. A personal perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 14, sup. 6 13-34.

Yamada-Onodera et al., (2002). Dégradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology* 30.828-831.

<http://www.dgpc.ulaval.ca/bio90192/chap4/notesadn/notesadn4.htm>

<http://edumed.unige.ch/dnaftb/1/concept/index.html>

[file:///C:/Users/Cybersoft/Documents/mém/Tableaux/apiweb™%20-%20
Résultat%20d'identification.htm](file:///C:/Users/Cybersoft/Documents/mém/Tableaux/apiweb™%20-%20Résultat%20d'identification.htm)

Listes des annexes

Annexe 1 : Coloration de Gram.

- 1- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre
- 2- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène
- 3- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes ou (2min)
- 4- Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée
- 5- Couvrir de lugol pendant 30 secondes
- 6- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 7- Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette
- 8- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- 9- Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes
- 10- Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes
- 11- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres. (**Prescott, L.M, 2003**).

Annexe 2 : Coloration de spores.

Préparation

- Vert de malachite 5 g
- Eau distillée 100ml

Principe

- Réaliser un frottis
- Recouvrir toute la lame par le vert de malachite a 5%

- Chauffer la lame jusqu'à l'évaporation de la solution
- Laisser refroidir
- Rincer la lame avec l'eau de robinet
- Colorer la lame par la fushine a 0.5% (laisser 1 minute)
- Rincer la lame et sécher

Annexe 3 : les milieux King A et King B.

Milieu de King A

Pour 1 litre de milieu :

Peptone	20,0g
Glycérol	10,0g
Sulfate de potassium	10,0g
Chlorure de magnésium	1,4g
Agar	12,0g
PH	7,2

Milieu de King B (g/l) :

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone	20,0 g
- Glycérol.....	10,0 ml
- Phosphate di potassique	1,5 g
- Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	1,5g
- Agar bactériologique.....	15,0g
PH du milieu prêt- à- l'emploi à 25°C	7,2 ± 0,2.

Annexe 4 : préparation de jaune d'œuf .

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf- après avoir flambée la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4 fois le volume en eau distillée stérile ,mélangez rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heure.

Le milieu Mossel au jaune d'œuf

Milieu Mossel de base 90 ml
Emulsion de jaune d'œuf 10ml

Annexe 5 : Gélose à amidon :

Gélose nutritive 100ml
Amidon 01g

Annexe 6 : Gélose au lait .

Lait 05g
Agar 01g
Eau distillée 100m

Annexe 7 : Photo de spectrophotomètre.



Annexe 8 : L'appareil d'UV.

