

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة عمار ثلجي الأغواط

UNIVERSITE AMAR THELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCE

قسم البيولوجيا

Département De Biologie



Mémoire

Envue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème

Optimisation de la production de biocalcite (CaCO₃) par quelques souches de *Bacillus* sp.

Présenté par :

RAMDHANI Fatima El Zahra

CHENAFI Djawahir

BEN CHERIFA Aïcha

Jury de soutenance

Président: Mr. GACEM Mohamed Amine	MCB	Université Amar Télidji-Laghouat
Examineur : Mr.ZERROUKI Mohamed Hocine	MAA	Université Amar Télidji-Laghouat
Rapporteur : Mr. KRANTAR Kamel	MAA	Université Amar Télidji-Laghouat

Soutenuie Juillet2022

Remerciements

**Tout d'abord, je voudrais remercier « Allah » tout-puissant pour ce
Il nous a donné le courage et la santé pour faire cet humble travail.**

**Un grand merci également à encadreur Ms KrantarKamel, qui
connaissait le sujet et nous a aidé à le compléter de puis sa création
jusqu'à la réalisation de ce mémoire.**

**Nous tenons à remercier sincèrement les membres du jury acceptés
C'est un grand honneur d'évaluer notre travail.**

**Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce
travail et à tous nos enseignants dans toutes les phases de l'étude.**

Dédicace

*J'ai l'honneur dédier ce modeste travail réalise grâce laide
De<Allah>Tout puissant*

A

*Celui qui m'a toujours encouragé soutenu durant toutes mes années D'études.
Merci, chéré maman, pour vos encouragements et votre amour pour moi
Tout au long de mon parcours d'études.et toutes mes félicitations à vous,
Mon cher papa.Ce travail est pour vous.Et ma chère mère,qui m'a donné vie et
courage,et l'amour Pour leur soutien moral et mat-riel,pour ça tendresse ,que
dieu tout puissant garde mesarents et les protège*

A

Mes chers frères:MohamedAyoubetAmjad

A

Mes chères sœurs:Samah, Khadija et ses enfants

A

Mes proches

A

*Mes chères amies Karima,Fariha et Khadija à tous
Les moments que nous avons partagés.*

RAMDHANI Fatima Elzahra

Dédicace

Dédiant ce travail à ma famille, elle qui m'a donné une digne éducation, et son amour ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui : surtout à mon cher père de savourer l'effort qui s'agitait en moi, de sa sévérité. À toi, grand-père, c'est ma plus profonde gratitude pour ton amour éternel, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse te faire. Voici mes frères (El hadj, youcef, Sahli) et mes sœurs (Halima et ses enfants) qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant ces années scolaires.

CHENAFI Djawahir

Dédicace

Dédicace à mes chers parents, source de vie, d'amour et d'affection pour mes chers frères et leurs enfants, source de joie et de bonheur pour tous les membres de ma famille, source d'espoir et de motivation pour tous mes amis, pour tous mes proches et collègues .

BEN CHERIFA Aïcha

Résumé:

Optimisation de la production de biocalcite par quelques souches de *Bacillus* sp.

Dans le cadre de l'amélioration de la production de biocalcite par les bactéries du genre *Bacillus*, nous avons sélectionné quatre souches parmi les isolats de l'année passée et nous avons étudié l'effet du pH sur la production de la biocalcite, les pH choisies sont 6.7 ; 7.7 ; 9 et 12. Les résultats obtenus dans notre travail ont montré que les optimums de production de la biocalcite à 37°C étaient à pH 12 pour les souches 3.2 et 2.1, à pH 7.7 pour la souche 2.2 et à pH 9 pour la souche 3.3, avec des rendements à pH=6.7 pour la souche 3.3 et à pH= 7.7 pour la souche 2.2 et à pH=9 pour la souche 3.3 et les souches 3.2 et 2.1 dans pH=12.

Mots clés ; Biocalcite ; *Bacillus* sp. ; pH ; Optimisation.

تحسين إنتاج البيو كالسيت بواسطة بعض سلالات بكتيريا العصيات

كجزء من تحسين إنتاج البيو كالسيت بواسطة بكتيريا جنس العصيات ، اخترنا أربع سلالات من بين عزلات العام الماضي ودرسنا تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج البيو كالسيت ، ودرجة الحموضة المختارة هي 6.7 ؛ 7.7 ؛ 9 و 12. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في عملنا أن الإنتاج الأمثل للبيو كالسيت عند 37 درجة مئوية كان عند الرقم الهيدروجيني 12 للسلالات 3.2 و 2.1 ، عند الرقم الهيدروجيني 7.7 للسلالة 2.2 وعند الرقم الهيدروجيني 9 للسلالة 3.3 ، مع المحصول عند الرقم الهيدروجيني = 6.7 للسلالة 3.3 وعند الأس الهيدروجيني = 7.7 للسلالة 2.2 وعند الأس الهيدروجيني = 9 للسلالة 3.3 والسلالات 3.2 و 2.1 في الأس الهيدروجيني = 12

الكلمات المفتاحية: البيو كالسيت ، العصيات ، درجة الحموضة ، تحسين الإنتاج

Optimization of biocalcite production by some strains of *Bacillus* sp.

As part of the improvement of the production of biocalcite by bacteria of the genus *Bacillus*, we selected four strains among the isolates of the past year and we studied the effect of pH on the production of biocalcite, the pH chosen are 6.7; 7.7; 9 and 12. The results obtained in our work showed that the optimum production of biocalcite at 37°C was at pH 12 for strains 3.2 and 2.1, at pH 7.7 for strain 2.2 and at pH 9 for strain 3.3 , with yields at pH=6.7 for strain 3.3 and at pH= 7.7 for strain 2.2 and at pH=9 for strain 3.3 and strains 3.2 and 2.1 in pH=12

Keywords; calcite. *Bacillus* sp. pH. Optimization

Liste des Abréviations :

A : Aragonite

ACC : Amorphe de Carbonates de Calcium.

BCCM : Minéralisation Bactérienne du Carbonate de Calcium

BCP : Pourpre de bromothymol

BNC : Bouillon Nutritif Calcium

BNGUC : Bouillon Nutritif Glucose-Urée-Calcium

BN : Bouillon Nutritif

BNU : Bouillon Nutritif Urée

CaCO₃ : Carbonates de Calcium.

CC : Carbonates de Calcium.

DIC : Carbone Inorganique Dissous

Ech : Échantillon

EICP : Précipitation de Calcite Induite par Enzyme

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

GN : Gélose Nutritif

GNGUC : Gélose Nutritif Glucose -Urée-Calcium

GNU-BCP : Gélose Nutritif Urée au BCP

GNUC : Gélose Nutritif Urée-calcium

GSc: Gélose de Sang cuite

Log K_s : Logarithme de produit de solubilité

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MICP : Précipitation Microbienne de Carbonate de Calcium Induite

S/m : Siemens sur mètre

SP : *Sporosarcinapasteurii*

U/ml : Unité enzymatique par millilitre

UV : Ultraviolet

V : Vatérite

XRD : Diffraction des rayons X

Liste des Figures:

Figure	Titre	Page
01	(a) : Projection de la structure cristallographique de la calcite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (b) : Photo MEB de la calcite.	06
02	Microphotographie de la calcite.	07
03	Différentes macles de calcite.	07
04	(A) : Projection de la structure cristallographique de l'aragonite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (B) : Photo MEB de l'aragonite.	08
05	Aragonite de Rabotrath (Échantillon RAB-04, photographie au microscope électronique à balayage, mode électrons secondaires).	09
06	Cristaux de vaterite pris par MEB en lentilles, rose du sable et en fleur.	09
07	Les trois polymorphes de CaCO ₃ : calcite, aragonite et vaterite.	09
08	Diagramme de prédominance acido-basique relatif aux espèces H ₂ CO ₃ , HCO ₃ ⁻ et CO ₃ ²⁻ L'acide carbonique H ₂ CO ₃ est le résultat d'hydratation du CO ₂ dissous dans l'eau pure (Équation 2) CO ₂ + H ₂ O → H ₂ CO ₃ .	11
09	Effets du pH sur les taux de production des polymorphes du CaCO ₃ à 7C° (A), 24C° (B) et 58C° (C). Les points ronds correspondent aux résultats obtenus pour la vaterite (V), les points triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C).	11
10	Classification des processus de biominéralisation du CaCO ₃ trouvés dans les bactéries : (a) une minéralisation influencée biologiquement ; (b) biologiquement minéralisation induite ; (c) minéralisation biologiquement contrôlée. Les hexagones gris représentent les précipités de CaCO ₃ . Les cations Ca ²⁺ peuvent être remplacé par, par ex. autres éléments alcalino-terreux tels que Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Ba ²⁺ .	14
11	Processus générant des environnements sursaturés essentiels à la précipitation de calcite	15
12	Résumé de la MICP biomédiée utilisant l'hydrolyse de l'urée.	17
13	Précipitations de calcite dues à l'uréolyse.	18
14	Illustration schématique de la production de calcite par le procédé de précipitation microbienne de la calcite (MICP) : 1 - hydrolyse de l'urée ; 2 - équilibre chimique ; 3 - hétérogène, nucléation ; 4 - stratification successive.	19
15	Bio-cémentation des graines des sables.	24
16	Illustration simplifiée des carbonates métalliques formés par (MICP).	27
17	Observation visuelle des motifs de surface : (a) zone 1 ; (b) zone 2 ; (c) zone 3 ; (d) zone 4.	28
18	Site d'essai sur le terrain : (a) zones d'essai 1 à zones d'essai 4 sur le site d'essai sur le terrain ; (b) croquis en plan des zones d'essai 1 aux zones d'essai 4 ; (c) les caractéristiques géomorphologiques spécifiques des zones d'essai.	28
19	Schéma représente les procédures de la coloration à l'encre de chine	29

20	photo de conditions de formation de calcite à different PH.	33
21	Une photo illustrant le montage expérimental utilisé pour filtrer le dépôt de calcite, (a) Papier Filtre, (b) Entonnoir, (c) Erlenmeyer.	34
22	le dépôt de calcite sur la balance.	35
23	Aspect macroscopique des colonies des bactéries.	35
24	Résultats de coloration de Gram de quelques souches bactériennes.	37
25	Résultats de coloration de sporelencre de chaine.	38
26	Résultats de manitolmobilité de 4isolates.	38
27	Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=6.7	39
28	Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=7.7	42
29	Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=9	42
30	Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=12	44
31	rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=6.7.	44
32	rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=7.7.	45
33	rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=9.	45
34	rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=12.	45

Liste des Tableaux:

Tableau	Titre	Page
01	Produit de solubilité KS à 25C°.	05
02	La disponibilité générale des cristaux de carbonate de calcium.	05
03	Bactéries produisant de l'uréase à partir de diverses sources et quantité d'activité uréase et précipitation de calcite.	16
04	Un résumé des bactéries qui péages ou éliminent les métaux lourds.	26
05	Les souches bactérienne utilisé dans ce travail	31
06	les conditions de optimisation formation de la calcite à different pH	35
07	Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées	37
08	Résultats de coloration de Gram, Coloration de spore et des tests biochimiques effectués sur 4 isolats bactériennes.	40
09	Bouillon nutritif avec urée et calcium (BNUC), Bouillon nutritif avec urée (BNU), Bouillon nutritif avec calcium (BNC).	40
10	Les résultats de test de formation de calcite (CaCO ₃) dans different pH	41
11	les résultat idéal de rendement produit par les souches dans chaque pH	45

Table des matières

Résumé

المخلص

Abstrat

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction..... 01

Partie1 :Synthèsebibliographique

1. Généralité sur le carbonate de calcium (CaCO₃)..... 04

1.1 La calcite..... 06

1.2 L'aragonite..... 08

1.3 La vatérite..... 09

1.4 La production de carbonates de calcium (CaCO₃)..... 09

1.5 Paramètres impactant de la production de carbonates de calcium (CaCO₃)..... 10

2. Précipitation de calcite (CaCO₃) par des bactéries..... 12

2.1 Précipitation bactérienne de calcite par processus (MICP) via l'hydrolyse de l'urée 14

2.2 Facteurs affectant l'efficacité de la MICP via l'hydrolyse de l'urée 19

2.2.1 Type de bactérie..... 19

2.2.2 La temperature..... 20

2.2.3 pH..... 21

2.2.4 Concentration de réactifs 22

2.2.5 Concentration de cellules bactériennes..... 22

3. Utilisation de la bioprécipitation de calcite (CaCO₃)..... 23

3.1 Amélioration des Sols..... 23

3.2 Construction de biociment..... 24

3.3 Illimitation des Métaux Lourds et Les Radionucléides..... 25

3.4 Luttecontredésertification..... 27

Partie2 :Matériels et Méthodes

1. Lieu de travail..... 31

2. L'objectif de travail..... 31

3. Matériel biologique..... 31

3.1..Souches microbiennes..... 31

4. Authentification des souches..... 31

4.1.Étude morphologique..... 32

4.1.1. Examen macroscopique des cultures..... 32

4.1.2. Examen microscopique des bactéries..... 32

4.1.2.1Coloration de Gram..... 32

4.1.2.2. Test formation de spore « Coloration à l'encre de Chine »..... 32

4.2. Tests biochimiques.....	33
4.2.1. Test de catalase.....	33
4.2.2. Mannitol mobilité.....	33
4.2.3. Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée	34
5. Test de formation la calcite (CaCO₃).....	34
6. Optimisation la formation de calcite à différents pH.....	34

Partie3 :Résultats et discussions

1. Étudemorphologique.....	37
1.1 Aspect macroscopique.....	37
1.2 Aspect microscopique.....	38
1.2.1 Coloration de Gram.....	38
1.2.2 Coloration de spore.....	38
2..Testsbiochimiques.....	39
2.1. Test de catalase.....	39
2.2. Mannitol mobilité.....	39
2.3Hydrolysebiochimique de l'urée.....	39
3. Test de formation la calcite(caco₃).....	40
4. Optimisation la Formation de calcite à différents pH.....	40
Discussion.....	47
Conclusion.....	51
Références bibliographiques	
Annexe	

Introduction

La grande diversité et variabilité des métabolismes microbiennes ainsi que leur capacité à interagir avec un grand nombre d'éléments et minéraux ont ouvert la possibilité des vastes champs de recherche sur la bio-minéralisation et notamment sur la bioprécipitation de la calcite, qui offre la possibilité de développer des techniques innovantes et respectueuses de l'environnement, telles que les industries des matériaux de construction, la consolidation et la stabilisation des sols, le contrôle de l'érosion (**Marin et al., 2021**), fabrication des biobriques (**Cheng et al., 2020**), prévention de la liquéfaction, lutte contre désertification (**Sun et al., 2021**), et remédiation pour la contamination par les métaux lourds (**Mugwar et al., 2016**).

La bio-minéralisation est définie comme une altération chimique d'un environnement par l'activité microbienne qui se traduit par la précipitation de minéraux, il existe trois mécanismes différents impliqués dans la production de bio minéraux, la minéralisation biologiquement contrôlée consiste en des activités cellulaires qui dirigent spécifiquement la formation de minéraux, lesquelles le micro-organisme contrôle la nucléation et la croissance des minéraux et sont directement synthétisés à un endroit précis à l'intérieur ou sur la cellule, sous certaines conditions, la bio-minéralisation influencée par le processus de précipitation minérale passive laquelle la matière organique présente à la surface des cellules telles que les substances polymères extracellulaires associées aux bio films, et la minéralisation biologique qui induit une modification chimique de l'environnement par une activité biologique qui se traduit par une sursaturation et la précipitation des minéraux (**Anbu et al., 2016**).

Une grande communauté de bactéries peut précipiter le carbonate de calcium par MICP à travers des différentes voies métaboliques, des cycles d'azote et du soufre, et par photosynthèse oxygénique/anoxygénique, mais la voie la plus utilisée c'est la voie uréolytique (dégradation d'urée) à cause des critères essentiels, une longue durée de vie, non-pathogénicité et de capacité de survie dans des environnements salins et alcalins comme les espèces *Sporosarcina* et bacilles (**Marin et al., 2021**).

Les chercheurs trouvent que les bactéries uréase positives influencent la précipitation du carbonate de calcium par la production d'une enzyme uréase, qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en CO₂ et en ammoniac. Ce qui entraîne une augmentation du pH et une précipitation de la calcite dans l'environnement bactérien (**Krisharapriya et al., 2015**).

Sur la base de nos connaissances, nous visons à atteindre l'objectif suivant :

- Connaître le pH appropriés pour augmenter le rendement de biocalcite produit par quelques souches de *Bacillus* sp. , à température constante de 37°C.

Notre mémoire est organisé comme suite:

- une introduction qui pose la problématique et définit les objectifs de notre travail.
- Une partie présentant une revue bibliographique visant à mettre en évidence la biocalcite et comprendre les conditions de sa formation, et de son dépôt au sein d'un processus biologique, appelé (MICP), avec une présentation des applications possibles de cette technique (MICP).
- Une partie expérimentale où on détaille notre méthodologie.
- Enfin, une discussion des résultats expérimentaux obtenus avec conclusion et perspectives.

Partie I
Synthèse Bibliographique

1. Généralité sur le carbonate de calcium (CaCO₃) :

Le carbonate de calcium, sous forme de calcaire, constitue environ 3 à 4% de la croûte terrestre. L'élément calcium peut être trouvé dans la nature, dissous dans les mers et les océans, et fondu dans la lave volcanique (carbonatite-lave), il est, après tout, un composant important dans les plantes ainsi que dans les exo- ou endosquelettes des êtres vivants (**Krauss., 2009**). Sa formule chimique (CaCO₃) désigne une matière première qu'on retrouve dans la nature (**Aït-Kadi et Bouzenad., 2015**), sous trois formes : la calcite, la vaterite et l'aragonite. La calcite est la forme la plus stable thermodynamiquement, tandis que la vaterite est la moins stable. Le contenu chimique de ces trois polymorphes est le même, mais leurs formes cristallines sont différentes. Ils peuvent être trouvés dans chez certaines bactéries à l'état naturel et dans certaines roches, mais elles s'obtiennent aussi par synthèse, chacune en fonction des conditions expérimentales du milieu réactionnel. La calcite, de structure rhomboédrique est le polymorphe le plus stable dans les conditions ambiantes ; on la retrouve dans les roches sédimentaires comme le calcaire et la craie. L'aragonite, de structure orthorhombique est le polymorphe synthétisé à haute température et haute pression et se retrouve dans les coquilles de mollusque et les roches métamorphiques comme le marbre. La vaterite, de structure sphérique ou cubique quant à elle est le polymorphe le plus rare car instable dans les conditions de température et de pression normales. La précipitation calcaire se fait préférentiellement sous forme d'aragonite dans les milieux marins, de calcite dans les milieux limniques (**Billy., 2020**). Il existe également des formes apparentées, dont deux types d'hydrates (CaCO₃, 6H₂O et CaCO₃, H₂O) et une forme amorphe (ACC).

En fonction des conditions expérimentales de précipitation (Sursaturation, température, pH, présence d'additifs), l'un ou l'autre de ceux-ci peut être obtenu. Polymorphe en particulier ou un mélange de ces trois formes. Toutes les formes métastables se transforment en passant par une phase moins stable à la phase stable jusqu'à la calcite contenant la plus faible solubilité. Le tableau suivant montre les produits de solubilité des polymorphes du carbonate de calcium dans l'ordre de solubilité décroissante à 25°C (**Babou, 2010**).

Tableau 1 : Produit de solubilité KS à 25C° (Babou, 2010).

Composé	-Log Ks	Référence
Carbonate de calcium Amorphe (ACC) CaCO ₃ ,6H ₂ O	6.40	Brecevic et Nielsen ; 1993
CaCO ₃ , H ₂ O	6.62	Bischoff et al .,1993
Vatérite	7.15	Plummer et Busenberg ; 1982
Aragonite	8.32	Plummer et Busenberg ; 1982
Calcite	8.48	Plummer et Busenberg ; 1982

Lors de la précipitation du carbonate de calcium, la vaterite se développe initialement puis se transforme en calcite stable dans des circonstances typiques de température et de pression. Lorsque l'aragonite se forme, sa transformation en calcite prend plus de temps car leurs produits de solubilité sont assez proches. S'il est vrai que la calcite est le produit le plus stable à température ambiante, les précipités obtenus sont souvent un mélange de polymorphes avec un produit majoritaire. Dans certaines applications carbonate de calcium industriel, le contrôle du polymorphisme est très important. En effet, dans l'industrie papetière par exemple, lorsque le CaCO₃ est utilisé comme additif, les propriétés telles que la qualité d'impression, la couleur et la brillance dépendent de la polymorphe présent. Températures élevées lors de la synthèse du carbonate de calcium accélèrent la transformation d'un polymorphe à un autre. Lorsque le carbonate de calcium est synthétisé à partir de solutions aqueuses hautement saturées, l'aragonite se forme à 70C° et la vaterite à 30C° (John et Farrington, 1957).

Tableau 2 : ci-dessous montre la disponibilité générale des cristaux de carbonate de calcium (Babou, 2010).

	Biologique	Non biologique
Calcite (C)	Trèscommun	Trèscommun
Aragonite (A)	Trèscommun	Rare
Vatérite (V)	Rare	Trèsrares
Carbonate de calcium non cristallin	Rare	Non existant

Les paragraphes suivants discutent plus en détail des formes de carbonate de calcium (CaCO_3) Les plus connus : la calcite, l'aragonite et le vaterite.

1.1 La calcite :

La calcite est le polymorphe thermodynamiquement stable du carbonate de calcium sous pression et la température ambiante. Il est largement utilisé dans l'industrie comme matière première pour la production de chaux ainsi que dans les opérations de désulfuration des fumées humides. à titre d'exemple Il peut être trouvé sous une variété de formes dans la nature. Bragg a caractérisé sa structure pour la première fois en 1914 (Grandjean., 2013). (Figure 1) représente une structure cristallographique constituée de plans d'ions calcium perpendiculaires à l'axe c. Les plans sont distants de 3,028 mètres et les ions Ca^{2+} y sont disposés en triangles équilatéraux distants de 4,96 mètres. « Le » plan A d'ions carbonate sépare deux plans de calcium, à égale distance. En conséquence, chaque ion calcium est entouré de six molécules d'oxygène. Deux unités de CaCO_3 sont représentées en gras dans le maillage élémentaire de la figure 1. Les cristaux de calcite ont une forme approximativement de rhomboèdres cubiques (Tadier., 2009).

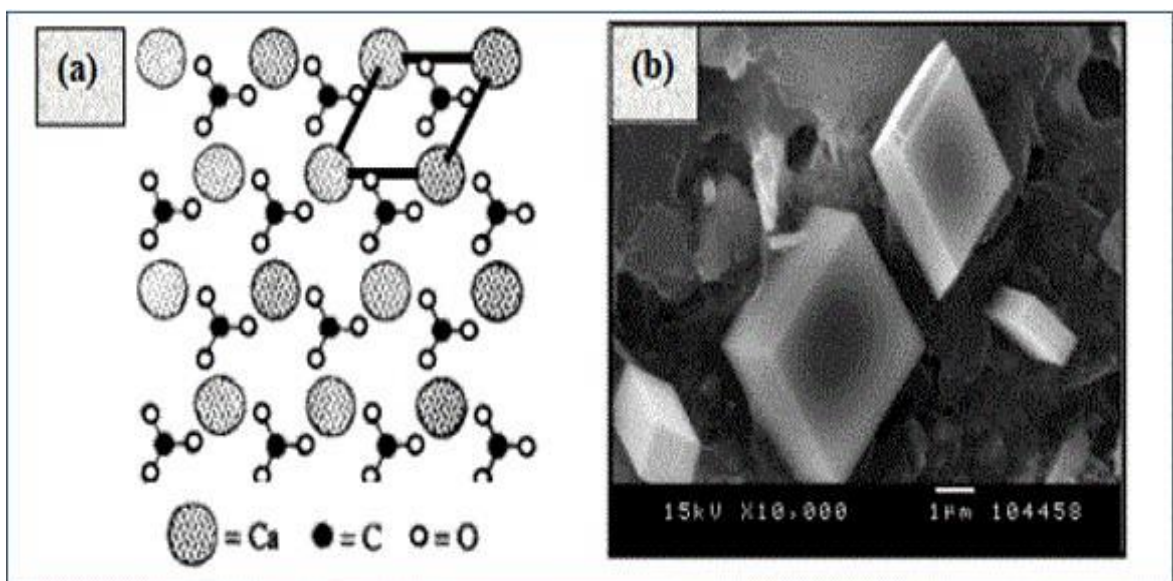


Figure 1 : (a) : Projection de la structure cristallographique de la calcite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (b) : Photo MEB de la calcite (Teghidet, 2012).

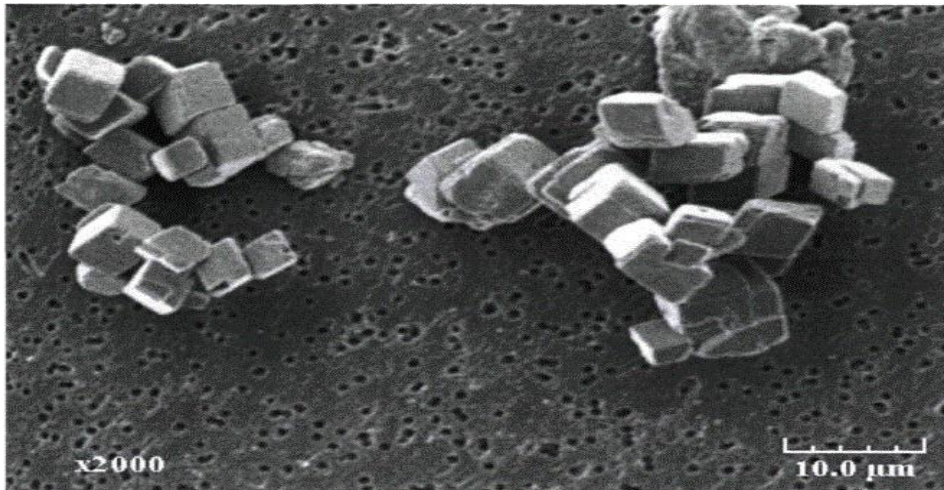


Figure 2 : Microphotographie de la calcite (Babou, 2010)

La calcite est un minéral fascinant qui montre une grande diversité de formes. Le point commun de toutes ces formes est leur mode de fragmentation : si on casse un cristal de calcite on obtient, non pas des fragments informes qui rappelleraient le verre brisé, mais des parallélépipèdes qui ressemblent à des cubes déformés et que les cristallographes nomment rhomboèdres. Ceux-ci se fragmentent à leur tour en d'autres rhomboèdres plus petits, aussi loin que le pouvoir séparateur du microscope permet de les observer. Selon les données de la littérature, la calcite peut présenter jusqu'à 700 formes de cristaux différents toujours dans le même système et aussi un certain nombre de macles (association intime de deux ou plusieurs cristaux selon des plans précis). Si lors de la croissance des cristaux maclés plusieurs formes cristallines sont présentes (voir figure I.2), la morphologie de la calcite peut devenir très complexe et leur détection est parfois difficile même pour les experts (Teghidet., 2012).

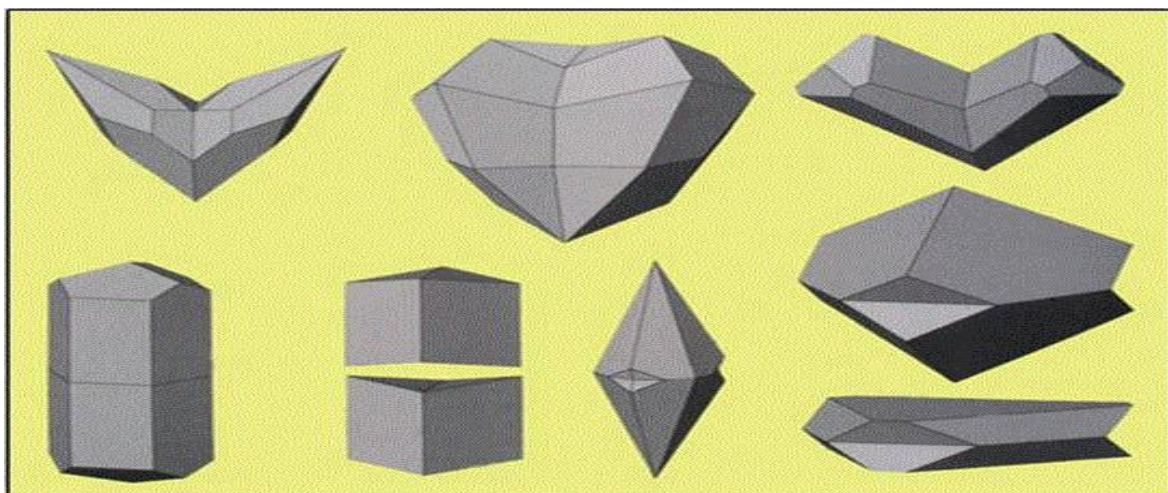


Figure 3 : Différentes macles de calcite (Teghidet, 2012).

1.3 L'aragonite

L'aragonite est présente dans des sédiments carbonatés marins récents et correspond au deuxième polymorphe de CaCO_3 le plus abondant de la Terre. Elle est le composant principal de la perle, du corail et des coquilles de nombreux êtres vivants. La structure de l'aragonite décrite par Bragg en 1924 est atteinte quand le rayon atomique du cation est supérieur à 1Å et ne permet plus de coordination 6 stable. Dans ce cas, le CaCO_3 précipite dans une structure orthorhombique (Grandjean., 2013).

L'aragonite cristallise sous la forme orthorhombique ses paramètres de maille sont : $a = 4,94\text{Å}$, $b = 7,94\text{Å}$ et $c = 5,72\text{Å}$ Elle est également constituée d'un empilement de plans d'ions calcium, disposés en triangles équilatéraux, tel que donné en (figure 4). A la différence de la calcite, les plans de calcium sont dans ce cas séparés par deux plans d'ions carbonate, ce qui fait que chaque ion calcium est entouré de neuf anions oxygène. La maille élémentaire contient quatre Motifs CaCO_3 et ses cristaux ont généralement l'aspect de bouquet d'aiguilles Figure 4.B pour rappel, cette forme métastable du carbonate de calcium constitue le principal composant de la perle, du corail, et des coquilles de nombreux êtres vivants (Teghidet., 2012).

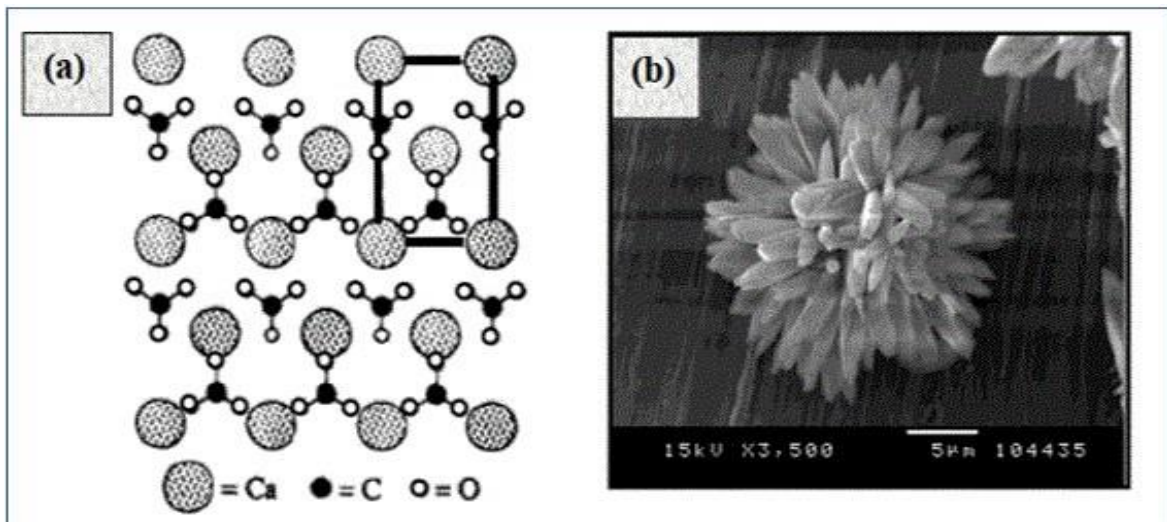


Figure 4 : (A) : Projection de la structure cristallographique de l'aragonite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (B) : Photo MEB de l'aragonite (Teghidet., 2012).

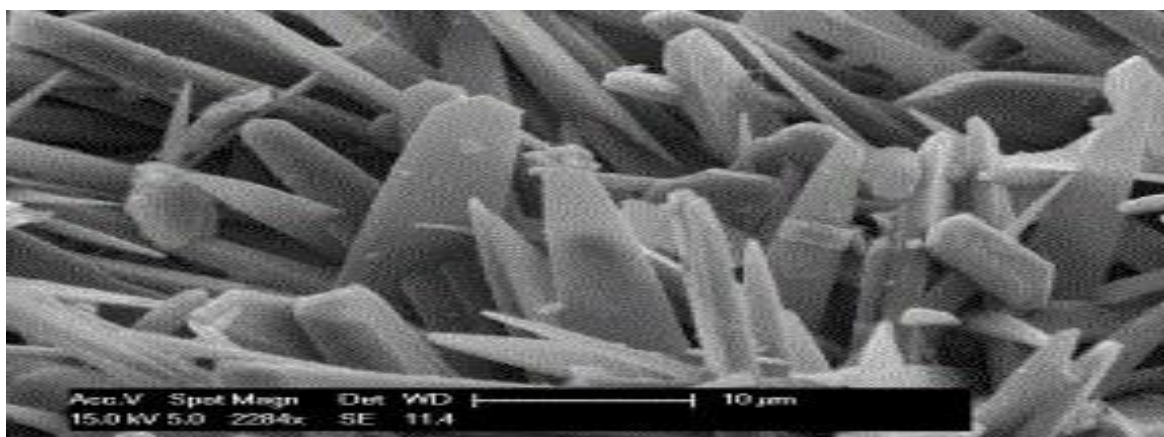


Figure 5 : Aragonite de Rabotrath (Échantillon RAB-04, photographie au microscope électronique à balayage, mode électrons secondaires) (Blondieau et al, 2016).

1.3 La vatérite :

Il s'agit encore de CaCO_3 anhydre. Cette forme est intermédiaire entre la calcite et l'aragonite. Elle cristallise dans le système hexagonal, elle est la moins stable des trois formes anhydres, du fait de sa grande instabilité en contact de l'eau à température ambiante, Ses caractéristiques sont mal connues. De plus elle n'existe pas dans la nature. Trois faciès sont couramment rencontrés, les faciès dits en "lentilles", en "fleurs" et la "rose des sables". Le faciès le plus fréquemment observé est en lentilles. La transformation des lentilles de vatérite en aragonite est rapide (quelques heures en contact de l'eau) (Figure 6) (Ras Hadda., 2018).

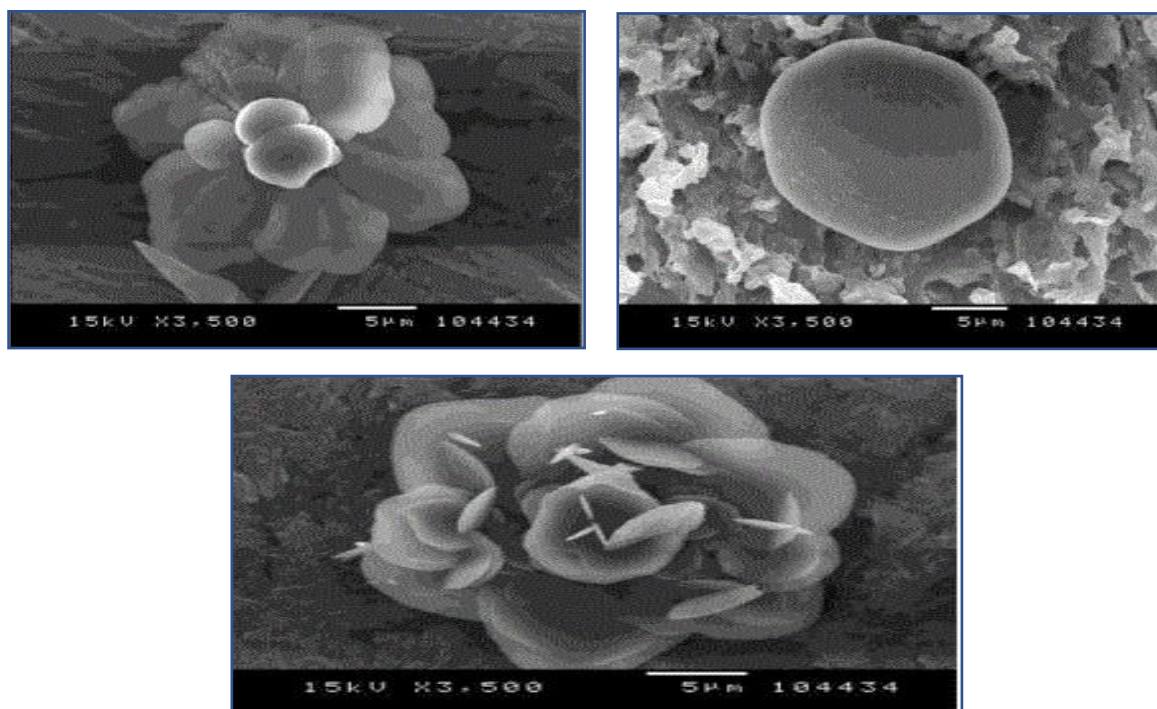
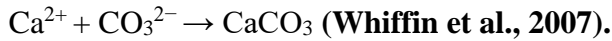


Figure 6 : Cristaux de vatérite pris par MEB en lentilles, rose dusable et en fleur (Ras Hadda, 2018).

1.4 La production de carbonates de calcium (CaCO₃) :

La production de carbonates de calcium (CaCO₃) en générale se réalise par une réaction chimique entre les ions Ca²⁺ et CO₃²⁻ dans un milieu aqueux (**Équation 1**) :



Ainsi le CaCO₃ formés peut se présenter sous six polymorphes. Les plus fréquemment rencontrés sont la calcite, la forme la plus stable, de système cristallin rhomboédrique, l'aragonite, métastable, de système cristallin orthorhombique, la vaterite, instable, de système cristallin hexagonal (**Figure 7**).

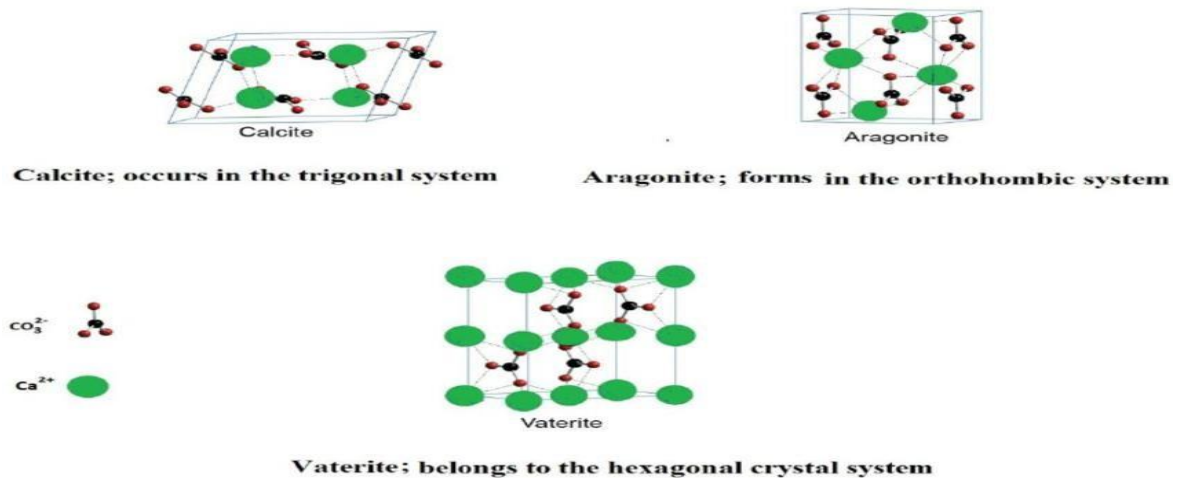


Figure 7 : les trois polymorphes de CaCO₃ : calcite, aragonite et vaterite(Maleki et al, 2015).

Le carbonate de calcium formé est peu soluble dans l'eau pure. A 16°C, il se Dissout à raison de 13,1 mg/l La réaction de dissolution : CaCO₃ → Ca²⁺ + CO₃²⁻(Camille., 1973)

1.4 Paramètres Impactant de la Production de Carbonates de Calcium(CaCO₃):

La production de CaCO₃ dépend de la concentration en ions de calcium et Carbonate doit être suffisant pour qu'aucun des éléments ne soit limitant. Or, L'ion carbonate est issu de la dissociation successive du polyacide H₂CO₃. Ainsi, D'après le diagramme de Prédominanceacide-basique relatif aux carbonates, en-dessous d'un pH de10,3, les ions CO₃²⁻ sont minoritaires dans le milieu (**Figure8**). Et la production de CaCO₃ serait donc favorisée à un pH supérieur à 11,3, pH à Partir duquel les ions CO₃²⁻sont prédominants (Medevielle, 2019).

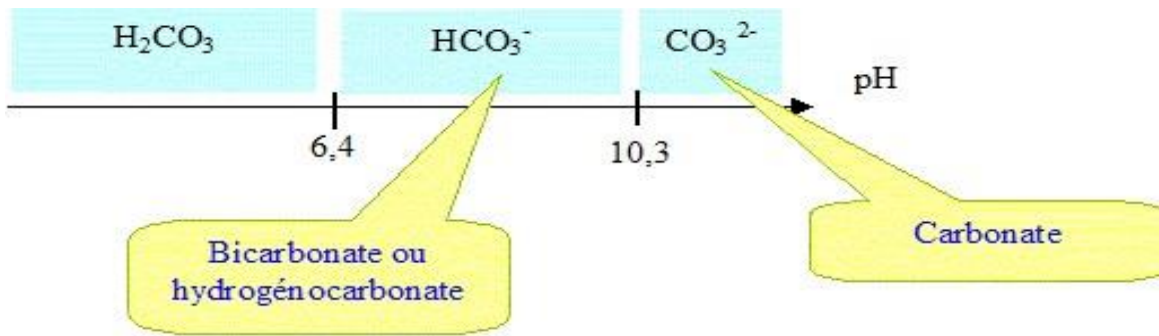


Figure 8 : Diagramme de prédominance acide-basique relatif aux espèces H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-} . L'acide carbonique H_2CO_3 est le résultat d'hydratation du CO_2 dissous dans l'eau pure (**Équation 2**) $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ (burns2005) (**Photo Internet**).

La pression de ce gaz peut également influencer la formation de $CaCO_3$. En effet, plus il y a de CO_2 et plus il pourra se solubiliser pour former du H_2CO_3 qui, suivant le pH du milieu, pourra se dissocier en HCO_3^- puis CO_3^{2-} . En outre, la nucléation et la croissance des cristaux en l'un ou l'autre des polymorphes (calcite, aragonite et vaterite) est déterminée par différents facteurs : le pH, la température, la pression de CO_2 ou encore la présence de cations. D'après les études menées sur la cristallisation du $CaCO_3$, les paramètres les plus influençant sont le pH et la température du milieu. En effet, ont pu observer des gammes de températures et de pH dans lesquelles les polymorphes, du $CaCO_3$ étaient prédominants (**Figure 9**). Au-delà d'un pH de 12, la calcite est la forme prédominante. A pH inférieur à 12, l'aragonite et la vaterite sont majoritaires par rapport à la calcite mais leurs prédominances varient en fonction de la température. Ainsi à température faible ($7C^\circ$) la vaterite est majoritaire et à température élevée ($58C^\circ$) c'est l'aragonite qui prédomine (**Medevielle, 2019**).

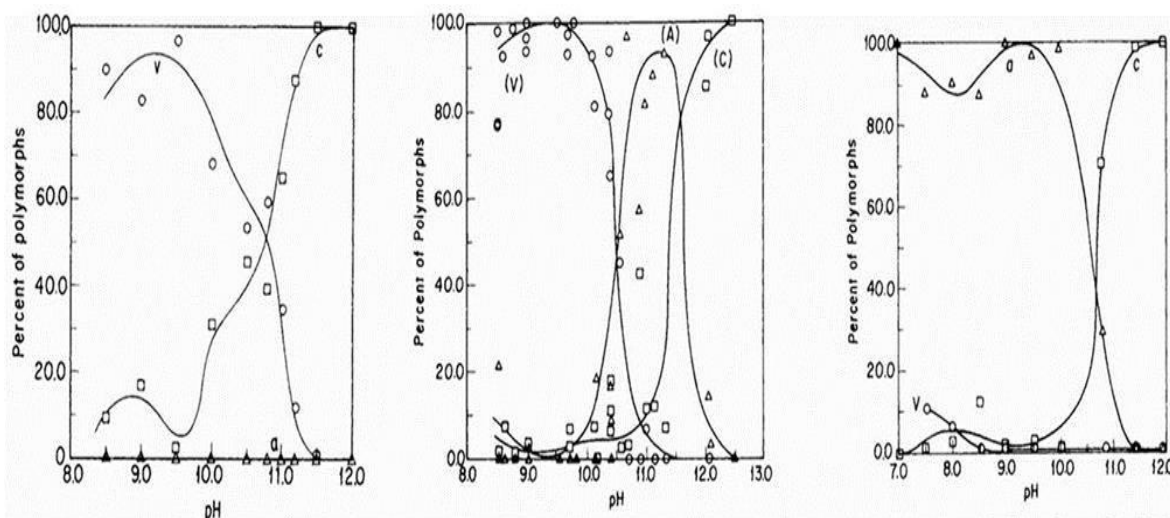


Figure 9 : Effets du pH sur les taux de production des polymorphes du $CaCO_3$ à $7C^\circ$ (A), $24C^\circ$ (B) et $58C^\circ$ (C). Les points ronds correspondent aux résultats obtenus pour la vaterite (V), les points

triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C) (Medevielle, 2019).

De plus un autre facteur important à prendre en compte est la présence d'autres Cations que Ca^{2+} . Ainsi, et ont observé que l'ajout de ces ions dans un milieu censé favoriser la production de calcite, menait à la formation d'aragonite. La précipitation des carbonates de calcium est un phénomène naturel qui peut s'effectuer de manière abiotique et biotique. Ainsi la capacité à former des carbonates de calcium se trouve chez de nombreuses espèces du vivant telles que les micro-organismes comme les bactéries, Et même les végétaux supérieurs ainsi que les animaux supérieurs (mollusques, crustacés, les vertébrés etc.)(Medevielle, 2019).

2. Précipitation de calcite (CaCO_3) par des bactéries :

La minéralisation bactérienne du carbonate de calcium (BCCM) ou sa précipitation due à une altération chimique de l'environnement induite par l'activité microbienne est connue sous le nom de précipitation microbiologique du carbonate de calcium induite (MICP) (Ghosh et al.,2019), Dans des circonstances appropriées, la plupart des bactéries construisent des cristaux de calcite, ce qui est une activité biogéochimique importante très répandue parmi les bactéries dans de nombreux contextes tels que l'eau de mer et les sédiments, l'eau douce et les sols.

Différentes espèces bactériennes peuvent précipiter des cristaux de carbonate de calcium de différentes tailles, formes et types (Perito et al., 2020), Les bactéries peuvent participer au phénomène MICP par le biais de divers mécanismes tels que l'hydrolyse de l'urée, la photosynthèse, la réduction du sulfate, l'oxydation anaérobie du sulfure, la formation de biofilm et l'adsorption minérale sur des substances polymères extracellulaires, Il y a eu beaucoup d'intérêt pour les micro-organismes qui peuvent produire de l'uréase (urée amidohydrolase) et donc hydrolyser l'urée pour provoquer la précipitation du CaCO_3 , *Sporosarcinapasteurii* (SP), anciennement connue sous le nom de *Bacilluspasteurii*, est une bactérie du sol non pathogène formant des endospores, mieux reconnue pour sa capacité à précipiter le CaCO_3 par uréolyse. *S. pasteurii* a piqué l'intérêt des chercheurs en raison de son comportement inhabituel de précipitation de CaCO_3 , Il fait l'objet de recherches pour des utilisations potentielles telles que le stockage souterrain du carbone, la cicatrisation de bâtiments en maçonnerie d'importance archéologique et le scellement à long terme des fissures dans les constructions à grande échelle, Pour mieux comprendre la force générée par le CaCO_3 , les chercheurs ont étudié les phénomènes MICP dans les systèmes en vrac, les colonnes de sable et les processus de bio-cimentation. L'implication bactérienne a également été étudiée afin de

mieux comprendre son importance dans le contrôle des taux de dépôt de minéraux, l'activité de l'uréase, la taille des cristaux et l'implication des cellules bactériennes (**Ghosh et al., 2019**).

Le BCCM ou MICP est régulé par quatre facteurs clés : la concentration de calcium (Ca^{2+}) et la disponibilité des sites de nucléation, la concentration de carbone inorganique dissous (DIC) et le pH (**Marvasi et al., 2020**). Les trois premiers facteurs régulent le taux de saturation de la concentration en ions carbonate (CO_3^{2-}) (**Ghosh et al., 2019**). Les bactéries peuvent modifier l'environnement en augmentant le DIC et en déplaçant le pH vers l'alcalinité via plusieurs processus physiologiques, Et fournissent en même temps des sites de nucléation pour la minéralisation. Lorsque ces circonstances existent en présence d'ions calcium, elles peuvent augmenter la précipitation de CaCO_3 lorsqu'un état de sursaturation survient. Les voies métaboliques impliquées dans la précipitation du CaCO_3 comprennent des voies autotrophes et hétérotrophes avec une contribution différente. Les voies hétérotrophes appartenant au cycle de l'azote sont celles principalement utilisées pour les applications MICP, Ils comprennent l'ammonification des acides aminés, la réduction des nitrates dissemblables et la décomposition de l'urée ou de l'acide urique.

Ces voies produisent la formation d'ions carbonate et bicarbonate, ainsi que de l'ammoniac en tant que produit final métabolique, ce qui provoque une augmentation du pH. Lorsque le H^+ est utilisé (**Perito et al., 2020**), Si des ions calcium et des sites de nucléation sont présents dans le micro-environnement, la MICP se produit dans les surfaces bactériennes telles que les parois cellulaires ou les substances éso polymères (EPS), en raison de leurs propriétés de liaison aux métaux, Elles fonctionnent comme des sites de nucléation et sont des modèles particulièrement bien adaptés pour la nucléation hétérogène et le développement cristallin. Les EPS fonctionnent comme des modèles matriciels, affectant la forme des cristaux de CaCO_3 , Le polymorphisme, l'emplacement et l'espace de croissance sont tous des facteurs à prendre en compte. Les cristaux de CaCO_3 sont couramment observés à la surface des cellules bactériennes. Le polymorphe généré (principalement la calcite, l'aragonite et la vaterite) est déterminé par des facteurs environnementaux ainsi que par des souches bactériennes (**Marvasi et al., 2020**).

Diverses voies de biominéralisation ont été identifiées à cet égard : (a) La minéralisation influencée par la biologie fait référence à des situations dans lesquelles la précipitation minérale est facilitée par la nucléation sur des polymères organiques générés par des bactéries, par exemple, ceux trouvés sur les surfaces cellulaires ou les composés polymères extracellulaires (EPS). La biominéralisation se produit dans de tels cas dans un fluide déjà saturé et ne nécessite pas que les cellules soient métaboliquement actives. (b) La minéralisation d'origine biologique comprend toutes les circonstances dans lesquelles la précipitation des phases minérales carbonatées est causée

de modifications chimiques du microenvironnement entourant les cellules induites par leurs activités métaboliques, Ces changements chimiques se caractérisent principalement par une élévation du pH, ou $[\text{HCO}_3^-]$ à pH constant. C'est ce qu'on appelle le « moteur d'alcalinité ». (c) La minéralisation régulée biologiquement fait référence à des situations dans lesquelles des stades particuliers de précipitation minérale (tels que la nucléation et / ou la croissance) sont sous contrôle génétique. Les trois classes ont des occurrences connues de carbonatogenèse bactérienne. Les processus de biominéralisation peuvent également être classés comme actifs ou passifs, selon qu'ils ont besoin d'énergie (et ont donc besoin de cellules métaboliquement actives) ou non (ils ont besoin de cellules qui ne sont pas nécessairement vivantes).

Enfin, les processus de biominéralisation sont classés en fonction de l'endroit où ils se produisent dans la cellule (intra ou extracellulaire) (Görgen et al., 2020).

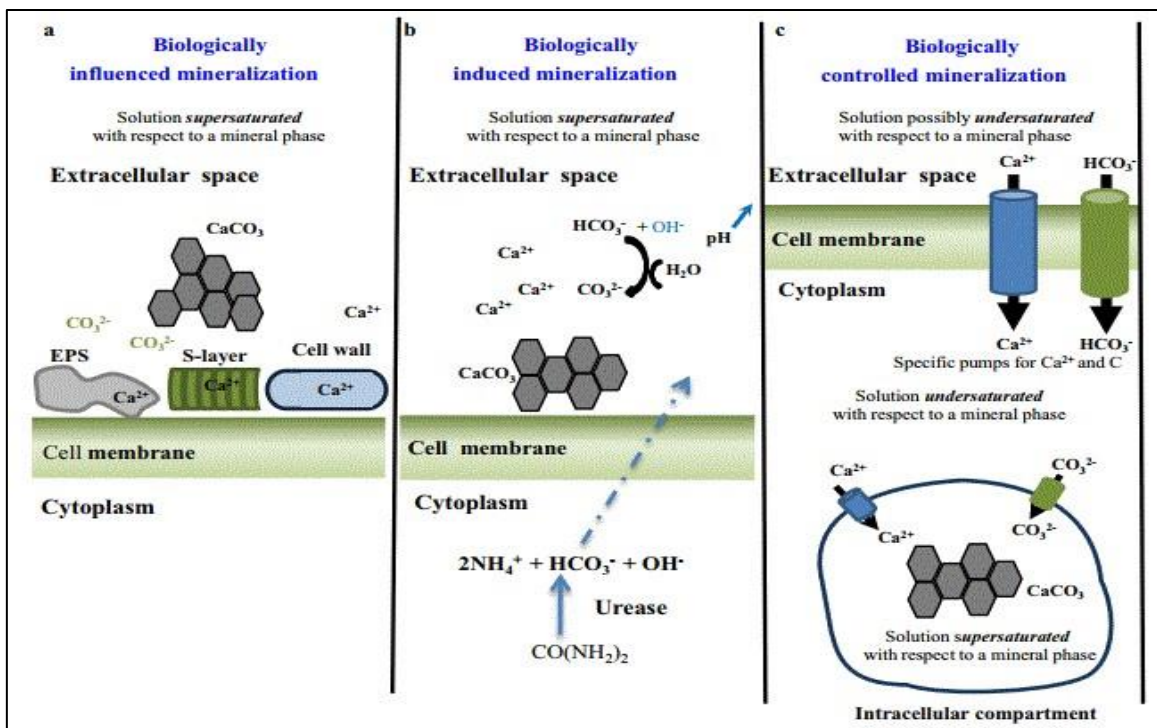


Figure 10 : Classification des processus de biominéralisation du CaCO_3 trouvés dans les bactéries : (a) une minéralisation influencée biologiquement ; (b) biologiquement minéralisation induite ; (c) minéralisation biologiquement contrôlée. Les hexagones gris représentent les précipités de CaCO_3 . Les cations Ca^{2+} peuvent être remplacé par, par ex. Autres éléments alcalino-terreux tels que Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba_2 (Görgen et al., 2020).

2.1 Précipitation bactérienne de calcite par processus (MICP) via l'hydrolyse de l'urée :

La précipitation microbienne de carbonate (MICP) est un processus biochimique que les bactéries utilisent lorsqu'ils interagissent avec une solution chimique riche en calcium. Selon l'étude

MICP, le CO₂ généré interagit avec la solution de biominéralisation en encourageant la production de carbonate, Et le carbonate se combine avec l'ion calcium (Ca²⁺) conduisant à la précipitation de carbonate de calcium CaCO₃ (Rajasekar et al., 2017).

Plusieurs procédés de précipitation du carbonate de calcium ont été découverts au cours des deux dernières décennies. La photosynthèse, l'hydrolyse de l'urée, la réduction du sulfate, l'oxydation anaérobie du sulfure, le biofilm et les composés polymères extracellulaires ne sont que quelques exemples (Anbu et al., 2016). Chaque mécanisme favorise une voie chimique différente (Figure 11), qui peuvent toutes être efficaces pour la précipitation de CaCO₃.

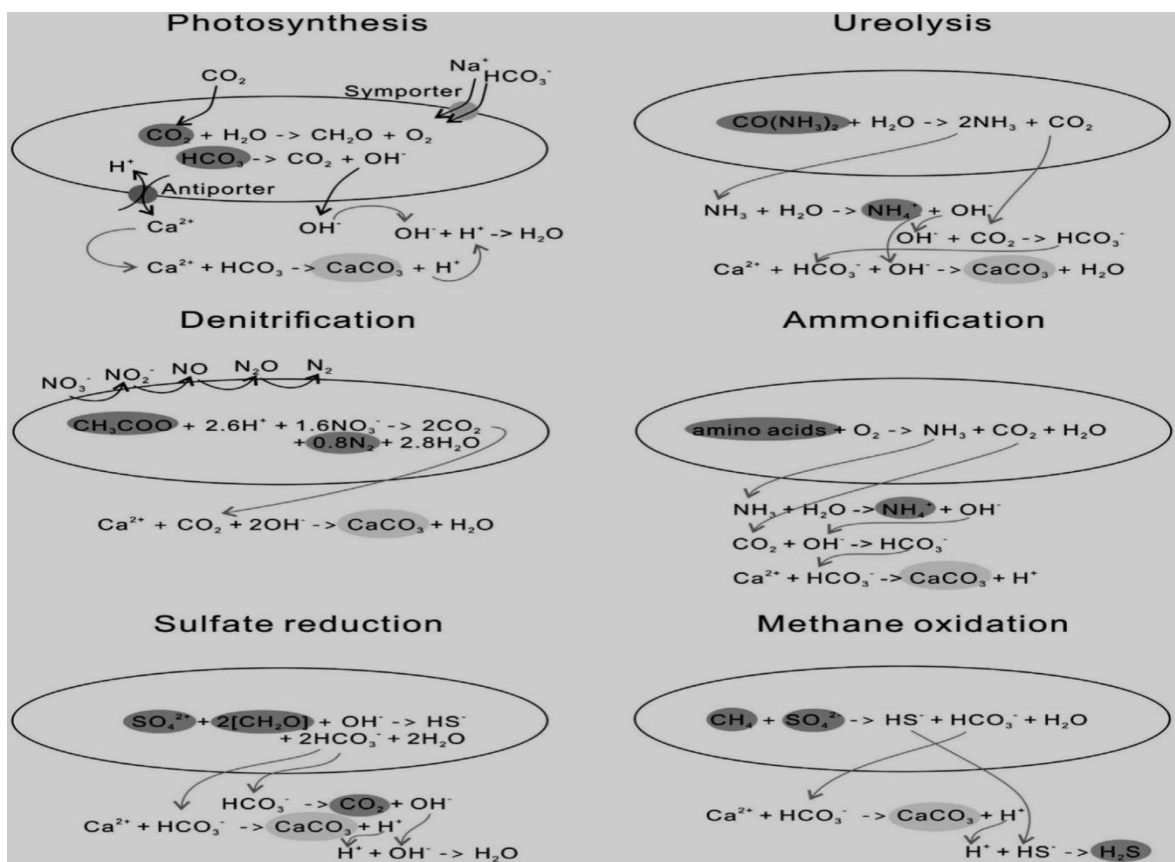


Figure 11 : Processus générant des environnements sursaturés essentiels à la précipitation de calcite (Rajasekar et al., 2017).

Cependant, la précipitation du carbonate de calcium par les bactéries via l'hydrolyse de l'urée est le mécanisme le plus couramment exploité. L'activité uréase se trouve dans un large éventail de micro-organismes, l'une des bactéries les plus couramment étudiées est *Sporosarcinapasteurii* (SP), anciennement *Bacilluspasteurii*, est une bactérie du sol non pathogène formant des endospores bien connue pour sa capacité à précipiter CaCO₃ par uréolyse. *S. pasteurii* a attiré l'attention des chercheurs pour sa caractéristique unique de précipitation de CaCO₃. Il est à l'étude pour son utilité possible dans une multitude d'applications, y compris le stockage souterrain du carbone, la

cicatrisation des structures de maçonnerie archéologiquement importantes et le scellement à long terme des fissures dans les structures. à grande échelle (Ghosh et al., 2019). Le critère le plus important à prendre en compte pour la sélection d'une souche bactérienne pour la biominéralisation est sa capacité à synthétiser l'uréase. Actif. Certaines bactéries pathogènes telles que *Helicobacterpylori*, *Proteusvulgaris*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonasaeruginosa* produisent également une infection à l'uréase et sont impliquées dans la formation de calculs urinaires intracellulaires Le processus de précipitation du carbonate de calcium (CaCO₃) est un mécanisme simple et facilement contrôlable de MICP qui peut produire des concentrations élevées de CaCO₃ en peu de temps L'uréase influence le processus chimique associée à la formation de biominéraux à travers quatre paramètres différents (Anbu et al., 2016).

Tableau 3 : Bactéries produisant de l'uréase à partir de diverses sources et quantité d'activité uréase et précipitation de calcite (Anbu et al, 2016).

Bacteria	Isolation site	Urease activity	Calcite precipitation	References
<i>Bacillus sp.CR2</i>	Mine tailing soil Urumqi, China	432 U/ml	2.32 mg/cell mass (mg)	Achal and Pan (2014)
<i>L.sphaericus CH5</i>	Abandoned express way and abandoned mining sites, Grangwondo, Korea	-	980 mg/ 100 ml	Kang et al (2014a)
<i>Sporosarcinapasteurii</i>	Phenotypic mutant strain	550 U/ml	-	Achal et al .,(2009a)
<i>B. Pasteurii NCIM 2477</i>	Culture obtained from NCIM, Pune, India	18 U/ml	-	Sarada et al ., (2009)
<i>K. flava CR1</i>	Mining ore soil, Urumiq, China	472 U/ml	-	Achal et al .,(2011)
<i>B.megateriumSS3</i>	Calcareous soil, Andhra Pradesh, India	690 U/ml	187 mg/ 100 ml	Dhami et al .,(2013b,2014)
<i>B. thuringiensis</i>	Calcareous soil, Andhra Pradesh, India	620 U/ml	167 mg/ 100 ml	Dhami et al .,(2013)
<i>Halomonas sp. SR4</i>	Mine tailing, China	374,5 U/ml	-	Achal et al ., (2012a,b,c)

De plus, plusieurs études ont montré la précipitation de carbonates de calcium dans les cyanobactéries ont rapporté qu'*Achromatiumoxaliferum* précipite les cristaux de calcite au moyen

intracellulaire. Ils ont observé que plus de 70% du volume total de la taille des cellules est occupé par des inclusions intracellulaires de cristaux de carbonate de calcium, entouré de membranes sans formation de vésicules. Plus récemment, (Xu et al., (2019)) ont rapporté une précipitation de calcite et d'aragonite par lyse induite par un virus de cellules cyanobactériennes et ont suggéré que ce nouveau mécanisme augmente le processus de biominéralisation du carbonate de calcium (Castro-Alonso et al. 2019). Hammes et Verstraete et Silva-Castro, ont rapportés que l'uréase influence le processus chimique associé à la formation de biominéraux à travers quatre facteurs différents : pH, concentrations de carbone inorganique dissous (DIC), concentrations de calcium et disponibilité des sites de nucléation. Les trois premiers facteurs influencent la concentration en ions carbonate (CO_3^{2-}) tandis que le dernier paramètre favorise la formation stable et continue de carbonate de calcium. Pendant le processus de biominéralisation, les bactéries servent généralement de sites de nucléation pour la précipitation du carbonate de calcium. Ces quatre facteurs ont une influence majeure sur là à la fois sur l'activité uréolytique et sur la formation de carbonate de calcium. Les ions Ca^{2+} se lient à la surface des bactéries chargées négativement, créant un environnement favorable au Ca^{2+} adsorption. Ainsi, les ions Ca^{2+} se lient plus fréquemment à la surface cellulaire chargée négativement des bactéries. Les cellules bactériennes sont très importantes pour la précipitation du CaCO_3 car les bactéries fournissent des sites de nucléation (nucléation hétérogène) et affectent les types de minéraux formés. Okwadha et li ont découvert qu'une concentration élevée de cellules bactériennes augmente la quantité de précipitation de carbonate via MICP. Cela se produit en raison de l'augmentation de la concentration d'uréase augmentant le taux d'hydrolyse de l'urée (Rajasekar et al., 2017).

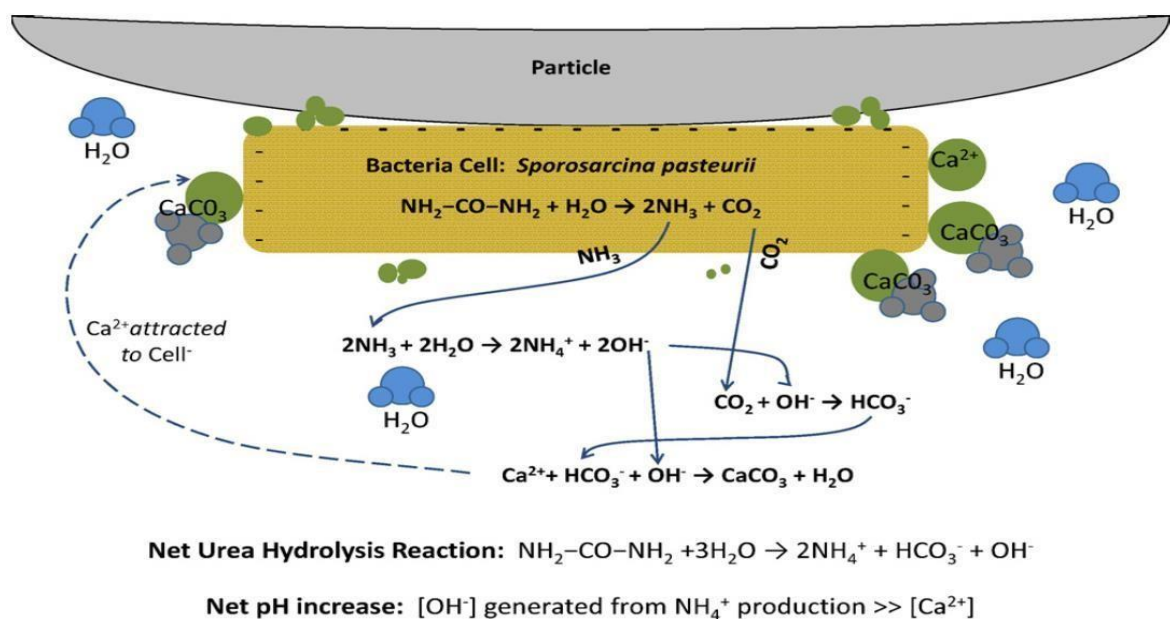
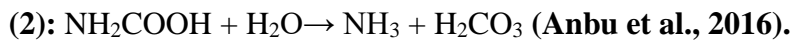


Figure 12 : Résumé de la MICP biomédiée utilisant l'hydrolyse de l'urée (Ashraf et al., 2017) .

(a) de l'urée : l'urée est hydrolysée en acide carbamique et en ammoniac par l'enzyme uréase Hydrolyse (**équation (1)**). De plus, l'acide carbamique est transformé en acide carbonique et en ammoniac via un équilibre chimique spontané (**équation (2)**)(TorresAravena et al., 2018).

(b) **Uréase**



Spontanée

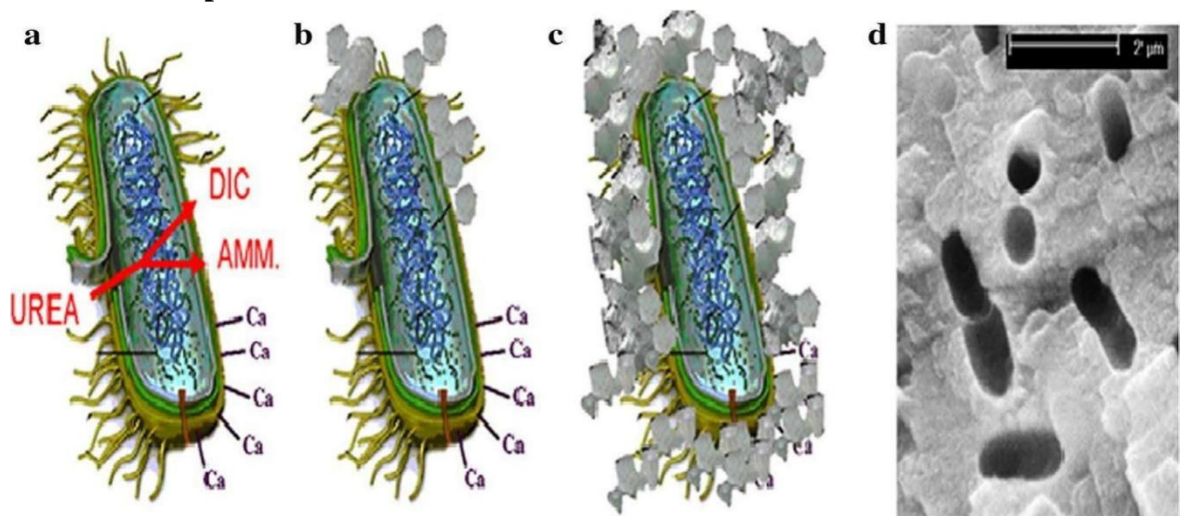
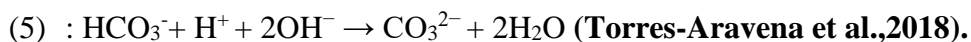
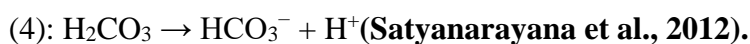
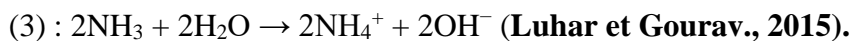
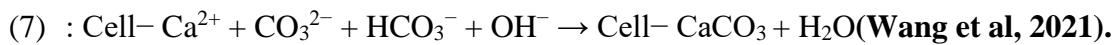
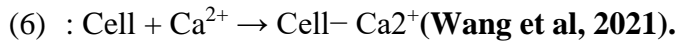


Figure 13 : Précipitations de calcite dues à l'uréolyse(Anbu et al, 2016).

(c) Équilibre chimique : lorsque l'urée est hydrolysée, l'ammoniac est converti en ammonium, ce qui libère des ions hydroxyde et élève le pH du microenvironnement, entraînant la production d'ammoniac, L'équation (3). Les équations (4) et (5) montrent que les ions hydrogène provoquent la formation de carbonate à partir d'acide carbonique (Torres-Aravena et al., 2018).



(c) Nucléation hétérogène : les ions calcium sont liés à la surface externe de la cellule par des groupes fonctionnels chargés négativement dans la paroi cellulaire (**équation (6)**). La formation de calcite se produit à la surface de la cellule une fois que l'activité des ions calcium est suffisante et que les conditions de saturation sont favorables à la précipitation du CaCO_3 (**équation (7)**)(Torres-Aravena et al, 2018).



(d) Stratification successive : Sur la surface externe de la cellule, des couches successives de calcite se forment (stratification). Le transfert de nutriments est limité et les cellules sont incrustées de cristaux de calcite, entraînant la mort cellulaire (Torres-Aravena et al., 2018).

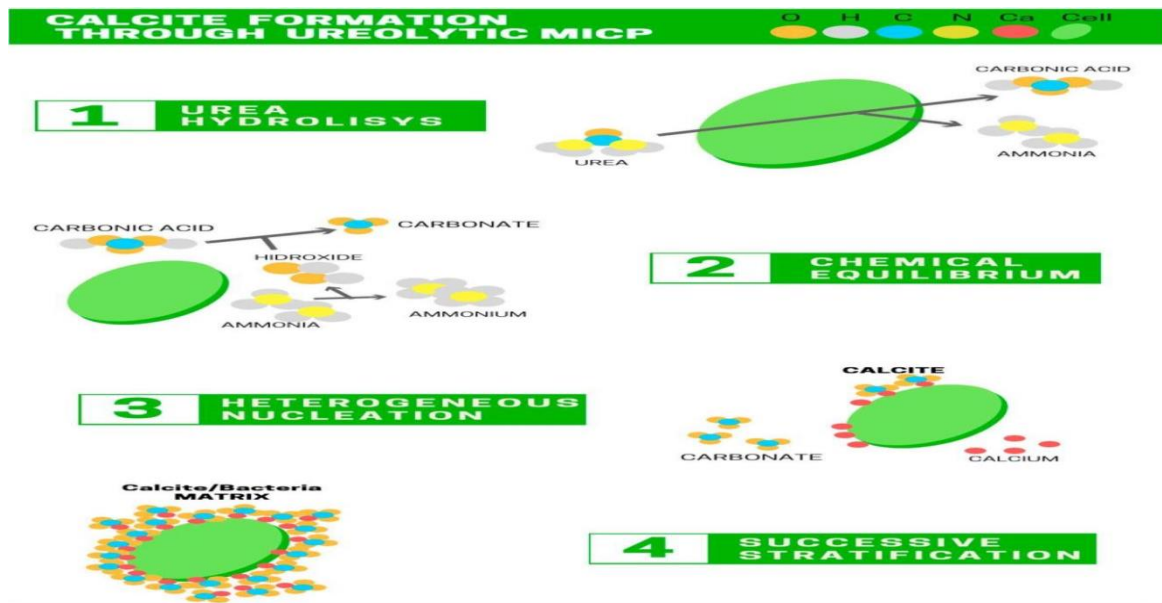


Figure 14 : Illustration schématique de la production de calcite par le procédé de précipitation microbienne de la calcite (MICP) : 1 - hydrolyse de l'urée ; 2 - équilibre chimique ; 3 - hétérogène, nucléation ; 4 - stratification successive (Torres-Aravena et al., 2018).

2.2 Facteurs affectant l'efficacité de la MICP via l'hydrolyse de l'urée :

L'activité de l'uréase et la quantité de précipitation de CaCO_3 sont affectées par divers facteurs environnementaux. En effet, de nombreux facteurs influencent l'activité de l'uréase et la précipitation du CaCO_3 , notamment le type de bactérie, les concentrations de cellules bactériennes, le pH, la température, les concentrations d'urée et de calcium (Anbu et al., 2016).

2.2.1 Type de bactérie :

La capacité de production d'uréase et de précipiter de CaCO_3 dépend fortement du type de bactérie. Il a été démontré que divers types de bactéries peuvent produire l'enzyme uréase et précipiter des quantités variables de carbonate de calcium (CaCO_3) (Tableau 3), notamment Le groupe *Bacillus* est un type courant de bactérie utilisé pour la production d'uréase et la précipitation du carbonate de calcium (CaCO_3). Par exemple, *B. megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. CR2 et *B. thuringiensis* et *Sporosarcinapasteurii* (SP), anciennement

Bacillus pasteurii, est le principal organisme utilisé dans le groupe des bacilles pour une variété d'applications, y compris la dépollution des métaux lourds et des radionucléides, l'assainissement des fissures du béton et l'amélioration des sols, tandis que *B. megaterum* est utilisé pour améliorer la résistance et la durabilité du béton dans les matériaux de construction et les structures, **Achal et coll. (2009a)** ont créé une souche mutante de *Sporosarcinapasteurii* qui avait une activité uréase et une précipitation de CaCO_3 plus élevées que la souche sauvage de *Sporosarcinapasteurii* MTCC 1761 (**Anbu et al., 2016**).

2.2.2 La température :

La température influencera grandement à l'activité de l'uréase, qui à son tour affecte au niveau de MICP (**Soon et al., 2014**). La température optimale pour la plupart des uréases varie de 20C° à 37C° , et la plage optimale pour les réactions enzymatiques dépend des conditions environnementales et de la concentration des réactifs dans le système (**Anbu et al., 2016**). **Ferris et coll. (2003)** ont étudié la vitesse cinétique de l'uréase et la dépendance à la température d'hydrolyse de *S. pasteurii* précipité CaCO_3 dans les eaux souterraines artificielles à 10C° et 20C° . Selon les recherches de Ferris et al. (2004), le taux d'hydrolyse de l'urée de *S. pasteurii* à 20C° est de 10 fois plus rapidement à 20C° comparativement 10C° (**Benoit., 2016**). Dam et al (2014) ont constaté que l'uréase est complètement stable à 35C° , mais lorsque la température monte à 55C° , l'activité enzymatique diminue d'environ 47%. **Gilman et coll. (1995)** ont indiqué que lorsque la température ambiante passait de 5C° à 20C° , la vitesse de dégradation de l'urée des bactéries productrices d'uréase augmentait d'environ 18 fois. Les fluctuations de température modifieront également la morphologie et la stabilité chimique des cristaux de carbonate de calcium. **Wang et coll. (2005)** La diffraction des rayons X (XRD) et la microscopie électronique à balayage (MEB) ont été utilisées pour analyser les propriétés de cristallisation du carbonate de calcium produit par *S. pasteurii*. Ils ont constaté qu'à 5C° , les cristaux de carbonate de calcium causés par les bactéries sont principalement de la calcite, avec un aspect amorphe, aggloméré et mal cristallisé, alors qu'à 25C° elle induisait uniformément calcite bien cristallisée distribuée avec forme sphérique apparence, **Kralj et al., (1994)** ont découvert que le changement de température de la solution de sel inorganique n'affecte que la vitesse de cristallisation du carbonate de calcium, **Huang et al., (2009)** un mélange de bactéries de sable traité avec une solution support urée- CaCl_2 ($\text{pH} = 8$, $c [\text{Ca}^{2+}] = 25,2 \text{ mm}$) à 10C° , 20C° , 30C° , 40C° . La production de calcite a été calculée après 10 jours de mélange. Les résultats ont montré que le rendement en calcite est plus élevé à 30C° , environ 5 fois celui à 40C° ou 20C° (**Tang et al., 2020**). Essentiellement,

toutes ces études montrent que la température du milieu influencera l'activité enzymatique, ce qui affectera également la quantité de carbonate de calcium précipité, Et la distribution et la morphologie de carbonate de calcium précipité, Même sur la croissance et la survie des bactéries **(Bouraoui., 2019)**.

2.2.3 pH :

Le changement de pH provoqué par la formation d'ions hydroxyles (OH^-) générés par la production d'ions ammonium (NH_4^+) contribue à la formation d'un environnement alcalin favorable à la précipitation du CaCO_3 . La présence d'ions OH^- augmente le pH autour des cellules, comme l'ont démontré Ferris et al. (2004), qui ont découvert que le MICP préfère un environnement alcalin (6,5 pH 9,3). La variabilité des valeurs de pH peut influencer sur le mouvement bactérienne et l'adhésion dans la biocémentation du sol. Qui est un facteur clé ayant un impact sur la distribution homogène de la précipitation des cristaux de CaCO_3 . Comme indiqué précédemment, des cristaux de CaCO_3 uniformément répartis dans les sols biocimentés sont souhaitables pour le traitement MICP car ils produisent des échantillons uniformément bien cimentés avec une résistance plus élevée. Cheng et al. (2014) ont découvert un lien entre le pH initial du sol et la formation de cristaux de CaCO_3 en fonction de la variation de la solubilité du CaCO_3 causée par différentes valeurs de pH initial dans une étude préliminaire. Cristaux sous l'effet de conditions de sursaturation (c'est-à-dire un changement de valeur de pH), les débats sur ce sujet se poursuivront (c'est-à-dire le changement de la valeur du pH), les débats sur cette question se poursuivront **(Mujah et al., 2016)**. "Lors de la diminution du pH, le carbonate commence à se dissoudre. La plupart des précipitations de calcite se produisent dans des conditions alcalines de pH 8,7 à 9,5 ont étudié l'activité des bactéries halophiles et alcaliphiles produisant de l'uréase à des concentrations élevées de sel inorganique et à un pH supérieur à 8,5. Les résultats montrent que les bactéries halophiles et alcaliphiles sont plus tolérantes aux conditions dans lesquelles d'autres bactéries productrices d'uréase ne peuvent survivre. Cela montre que certains groupes de bactéries capables de survivre et de précipiter le carbonate de calcium existent et peuvent survivre à des conditions extrêmes telles que des concentrations élevées de sel inorganique et un pH alcalin élevé" **(Rajasekar., 2018)**.

2.2.4 Concentration de réactifs :

Dans les applications de laboratoire et de terrain MICP, les concentrations de réactifs sont les agents d'influence les plus facilement contrôlables. Des concentrations d'urée allant de 6 mM à 1,5 M et des concentrations de calcium allant de 25 mM à 1,5 M dans deux études d'Eligabany et al. (2012) et Al Qabany et Soga (2013), ont découvert qu'utilisant de concentrations plus faibles et de débits d'entrée inférieurs (0,042 mol / L / h) ont abouti une efficacité plus élevée, une distribution plus égale de CaCO₃ et une résistance à la compression plus forte du produit traité. Bien que l'utilisation de concentrations plus faibles dans le traitement MICP à grande échelle peut nécessiter l'injection de plus grandes quantités de fluide, Et ainsi rendre le processus plus lent et plus coûteux, D'autres difficultés liées au blocage de fluide. L'espace poreux dans les régions d'injection et la distribution hétérogène du CaCO₃ lorsque des concentrations élevées de substrat sont utilisées (Stefani., 2017).

2.2.5 Concentration de cellules bactériennes :

La quantité de calcite précipitée à partir de MICP augmente lorsqu'il y a une concentration élevée de cellules bactériennes (Jacob., 2017). Selon Whiffin (2004), le taux d'hydrolyse de l'urée par les bactéries uréolytiques peut être utilisé pour calculer l'activité de l'uréase. En d'autres termes, plus la concentration bactérienne dans une culture est élevée, plus l'activité uréase est importante. L'augmentation de l'activité uréase augmente la synthèse de CaCO₃ car davantage de cellules bactériennes concentrées à l'intérieur de la culture et fonctionnent comme sites de nucléation pour la précipitation des cristaux de CaCO₃. De même, Hammes&Verstraete (2002) ont également confirmé que la disponibilité des sites de nucléation est un facteur déterminant essentiel pour déterminer la quantité de production de CaCO₃. DeJong et al., (2011) ont expliqué que les sites de nucléation pour la précipitation des cristaux de CaCO₃ se produisent en raison de l'attachement des cellules bactériennes à la surface des grains du sol à laquelle les bactéries catalyseraient la réaction entre les ions Ca²⁺ et CO₃²⁻ pour former CaCO₃ qui finirait par lier deux ou plus particules de sol ensemble au fur et à mesure qu'elles grossissent. Étant donné que la disponibilité des sites de nucléation dépend grandement de la quantité de cellules bactériennes attachées sur les particules de sol. la concentration bactérienne est un facteur essentiel dans le succès de cette application (Mujah., 2017).

3. Utilisation de la bioprécipitation de calcite (CaCO₃) :

3.1 Amélioration des Sols :

L'amélioration des sols est l'un des problèmes les plus importants dans les pratiques de génie géo-technique(Choi et al., 2020), En raison des divers problèmes comme l'inondation l'instabilité des pentes , des barrages , et la liquéfaction (Zhang et al., 2020), et l'érosion interne des barrages et digues c'est l'un des modes de rupture les plus fréquentes, Elle se caractérise par le détachement de fines particules de la structure principal du sol, Généralement dû à des interactions mécanique ou chimique avec l'écoulement du fluides (Jiang et al., 2019).

Les méthodes actuelles pour améliorer les propriétés techniques des sols sont divers en ce qui concerne la méthodologie, l'uniformité du traitement, le coût, L'impact environnemental, Les exigences d'accessibilité du site, toutes ces méthodes présentent des avantages et des inconvénients (De Joing et al., 2006). Les méthodes traditionnelles de renforcement du Sol telles que le jointoiement chimique et consolidation pré-compactage présentent généralement des inconvénients tel qu'une consommation d'énergie élevée, une longue période de construction, un coût élevée, une pollution élevée (Zhang et al., 2020), Récemment l'utilisation des connaissances interdisciplinaires du génie civil, Chimie et la microbiologie pour modifier les propriétés d'ingénierie du sol par des techniques d'amélioration biologique (Umar et al., 2016).

L'amélioration biologique des sols est une nouvelle technique dans laquelle les processus chimiques et biologiques conduisent à une amélioration des propriétés physiques et mécaniques du Sol, Compatible avec l'environnement et applicable à divers types de sols (kalantary et al., 2015).

Les méthodes bio-médiée d'amélioration des sols a été considérée comme une approche inventive et nouvelle en ingénierie géotechniques (Umar et al., 2016), Parmi ces méthodes la bio-cémentation basée sur la précipitation de calcite induite microbiologiquement (MICP) est une technique bio-médiée prometteuse, dans laquelle les grains de sable sont liés entre eux par la formation de cristaux de carbonate de calcium (CC) (Wernes et al., 2020).

La précipitation de carbonate de calcium par les bactéries urélotiques améliore du sol en raison de cristallisation des particules de sol (Gowthaman et al., 2019). Cette technique utilise les voies métaboliques des bactéries pour des précipitations de calcite dans toute la matrice du sol (Figure 14). Qui résulte à une augmentation de la résistance et de la rigidité du sol (Cheng et al., 2013), dans un premier temps l'hydrolyse enzymatique de l'urée libère des ions ammonium et carbonate dans le milieu tout en augmentant le pH, les ions carbonate produits précipitent en

présence d'ions calcium sous forme de cristaux de carbonate de calcium à la surface du sol (Choi et al., 2020), et le carbonate de calcium produit liés les Particules de sol entre elle , Ce qui cimente et colmate les sols, et améliore ainsi la résistance et réduit la conductivité hydraulique des sols (Umar et al., 2016).

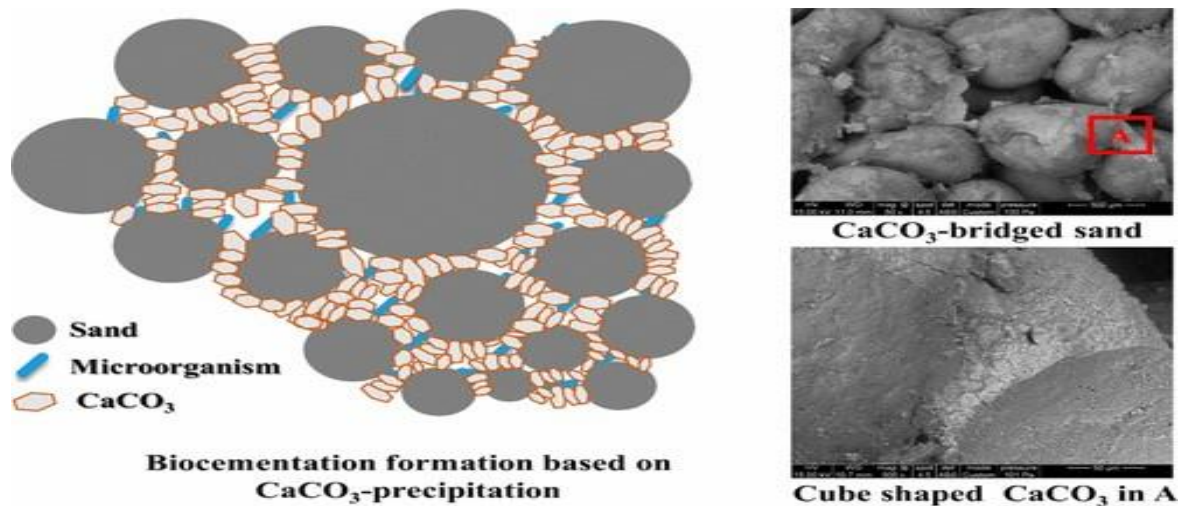


Figure 15 : Bio-cémentation des grains des sables.

La bio cémentation peut être définie comme le processus d'amélioration des sols par la production des matériaux liant les particules par moyens microbienne, Mais la bio colmatage peut être définie comme réduction de la conductivité hydraulique des sols ou des roches Poreuse par des matériaux de remplissage par le processus MICP (Umar et al., 2016), La bio colmatage du sol limite l'écoulement de l'eau dans le sol et réduit sa perméabilité (Anbu et al., 2016).

La perméabilité du sol a été réduite par l'accumulation des substances polymères extracellulaire (EPS) (Anbu et al., 2016), Les cristaux de CaCO_3 précipité dans les sols, provoquant une augmentation de la résistance à l'écoulement en conséquence la perméabilité est réduite (Choi et al., 2020).

2. Construction de bio-cement :

Le béton est un mélange d'agrégats minéraux inertes par exemple du sable, du gravier, des pierres concassées et du ciment (Worrell et al., 2001), Le ciment est le matériaux le plus utilisé dans les industries de la construction (Marin et al., 2021).

Mais la production de ciment est un processus très énergivore, La consommation d'énergie de l'industrie du ciment est estimée à environ 2% à 5% de la consommation d'énergie industrielles mondiale (**Worrell et al., 2001**), Le processus de production du ciment nécessite la génération d'une température très élevée (1500C°) en brûlant des combustibles fossiles (**Zaghloul et al., 2021**), et l'estimation montre que l'industrie du ciment contribue presque 5% des émissions mondiale de CO₂(**Irfan et al., 2019**), qui rend le ciment comme matériaux non durable et rend nécessaire de trouver des alternatives (**Zaghloul et al., 2021**).

En plus le béton il est sensible à la formation des micro-fissures et contient des pores qui sont hautement indésirables car ils fournissent une voie ouverte pour la pénétration d'eau et d'autres substances nocives, cela conduit à la corrosion des armatures et réduit la résistance et la durabilité du béton. Récemment la précipitation de la calcite induite microbiologiquement (MICP) a été proposée comme une technique alternative et efficace pour colmates les micro-fissures et les pores du béton (**Krishnapriya et al, 2015**), Les fissures se forment dans le béton en raison des cycles de vieillissement et de gel-dégel (**Anbu et al., 2016**). Les bactéries à incorporer dans le béton doivent être résistantes aux alcalis pour supporter le pH élevé du béton et former des endospores pour résister aux contraintes mécaniques induites dans le béton pendant le malaxage (**krishnapriya et al, 2015**).

2. Illimitation des Métaux Lourds et Les Radionucléides :

Tous les métaux lourds sont présents naturellement à l'état des traces dans l'environnement, mais au cours des dernières décennies, en raison de l'urbanisation et les activités anthropiques excessives des métaux lourds tels que le chrome, l'arsenic, le cadmium, le plomb et le zinc (**Rajasekar et al., 2020**), Constitue une menace majeur pour l'environnement à cause de leur toxicité, Leur non-biodégradabilité et leur accumulation persistante (**Anbu,et al., 2020 ;Papageorgiou et al., 2021**).

Récemment, la bio-minéralisation a été introduite pour éliminer les métaux lourds ou les convertir d'une forme soluble à une forme insoluble à partir des sites contaminés (**Rajasekar et al., 2020**), Cette techniques s'appuie sur l'activité métaboliques des bactéries et manipulation des conditions physico-chimiques de leur environnement pour précipiter certains types de bio-minéraux.

Le MICP est l'un des méthodes alternatives efficace par rapport aux processus physicochimiques (la précipitation chimique, La floculation, L'échange d'ions , Le processus membranaire, L'immobilisation et l'adsorption) (**Anbu et al., 2020**), et plusieurs études sont

constamment publiées pour optimiser le processus afin de devenir une approche prometteuse durable et écologique par rapport aux technologies de l'environnement traditionnelles et montré que les microorganismes urolétiqes capables d'éliminer les métaux lourds jusqu'à 98% par MICP (**Tableau**) (**Rajasekar et al., 2020**). (**Figure**), Par exemple le calcium ou le magnésium peut être ajouté au cours de la phase initiale pour atteindre la formation minérale cible l'équation (1), (2) du carbonate de magnésium peuvent être formés.

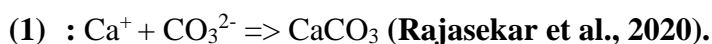


Tableau 4 : Un résumé des bactéries qui pièges ou éliminent les métaux lourds (**Rajasekar et al., 2020**).

Microorganisme	Métaux Lourds étudié
<i>Enterobacter cloacae</i> ; <i>Sporosarcina koreensis</i>	Plomb (Pb)
<i>Sporosarcina ginsengisoli</i>	Arsenic (As)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ; <i>Terrabacter tumescens</i>	Cadmium (Cd)
<i>Kocuria flava</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Oceanobacillus indicireducens</i> ; <i>Bacillus pumilus</i>	Cuivre (Cu)
<i>Sporosarcina sp</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Oceanobacillus indicireducens</i> ; <i>Bacillus pumilus</i>	Zinc (Zn)
<i>Terrabacter tumescens</i>	Nickel (Ni)
<i>Terrabacter tumescens</i>	Cobalt (Co)
<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Oceanobacillus indicireducens</i> ; <i>Bacillus pumilus</i>	Chromium (Cr), Cuivre (Cu), and Zinc (Zn)
<i>S. rhizophila</i>	Plomb (Pb), Cadmium (Cd) and Zinc (Zn)
<i>V. boronicumulans</i>	

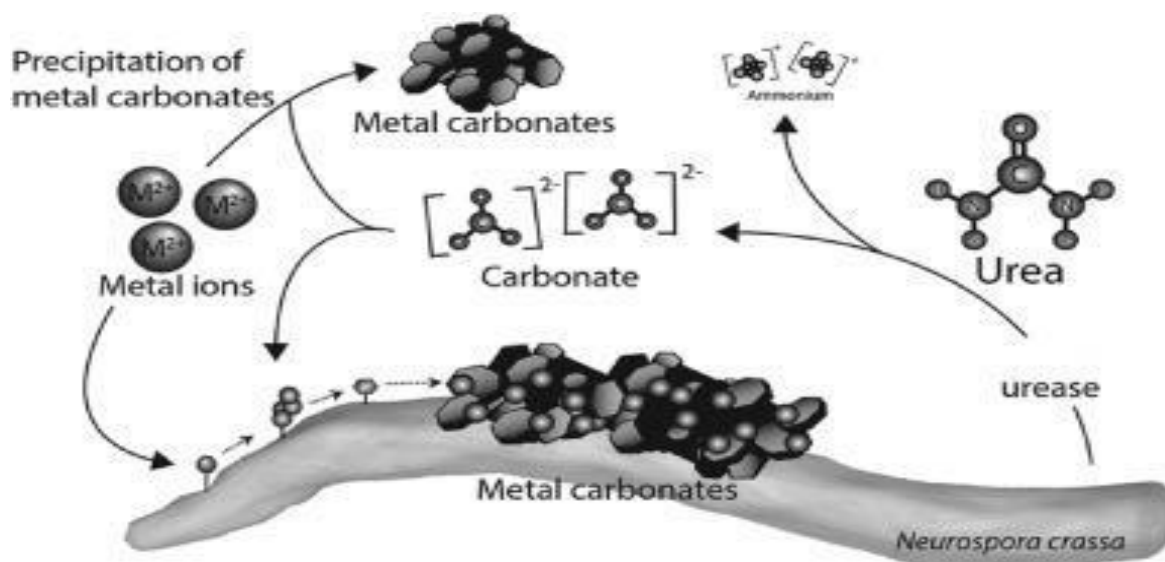


Figure 16: Illustration simplifiée des carbonates métallique formé par (MICP) (Rajasekar et al., 2020).

3.5 Lutte contre désertification :

Une tempête de sable est un phénomène météorologique qui se manifeste par des vents Violents qui provoque une déflation et un transport des particules de sable dans l'atmosphère, Les tempêtes de poussière sont similaires mais le substrat soulevé est le sol desséché.

La désertification met en danger le fonctionnement des écosystèmes et influence à la fois le développement économique et stabilité des zones arides et semi-aride.

L'une des conséquences de la désertification est la fréquence des tempêtes de sable et la lutte contre la désertification et le contrôle de la dégradation des terres restent des défis mondiaux. La précipitation de la calcite induite microbiologiquement (MICP) ou la précipitation de carbonate de calcium induite par voie enzymatique (EICP), récemment développées et fournit une méthode alternative pour le contrôle des tempêtes de sable (Sun et al., 2021) cette dernière offre plusieurs avantages par rapport au MICP, tels que l'élimination de la culture bactérienne, la diminution des coûts et l'enzyme libre soluble dans l'eau simplifiant l'application in situ.

La technique MICP ou EICP est principalement limitée à des tests en laboratoire, et il existe un peu d'application d'ingénierie à grande échelle, une expérience à grande échelle (50 000 m²) dans le désert de Tengger en Chine a été tester la faisabilité de l'EICP en tant que méthodes de prévention des tempêtes de sable (Figure 18) (Sun et al., 2021).

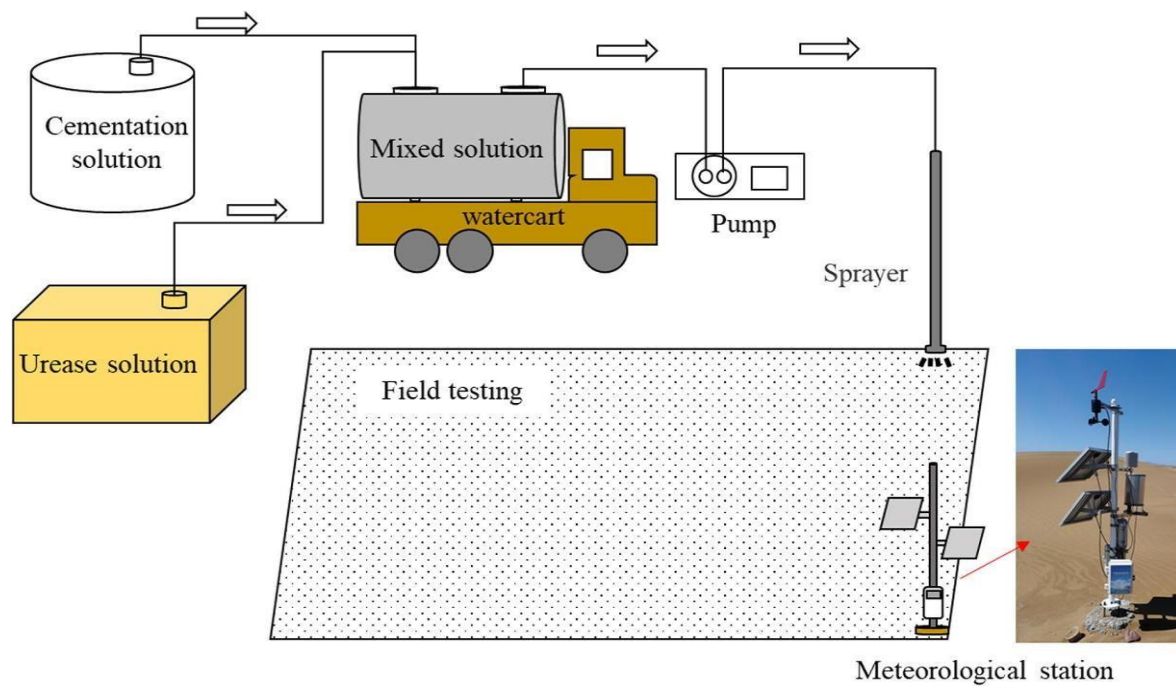


Figure 17 : procédé de traitement EICP pour la solidification des sables éoliens (Sun et al., 2021).

L'observation visuelle montre que la zone traitée par EICP était plus blanche que les différentes zones de test (**Figure 19**) et les sables éoliens solidifiés avec une résistance superficielle plus élevée (**Figure 20**).

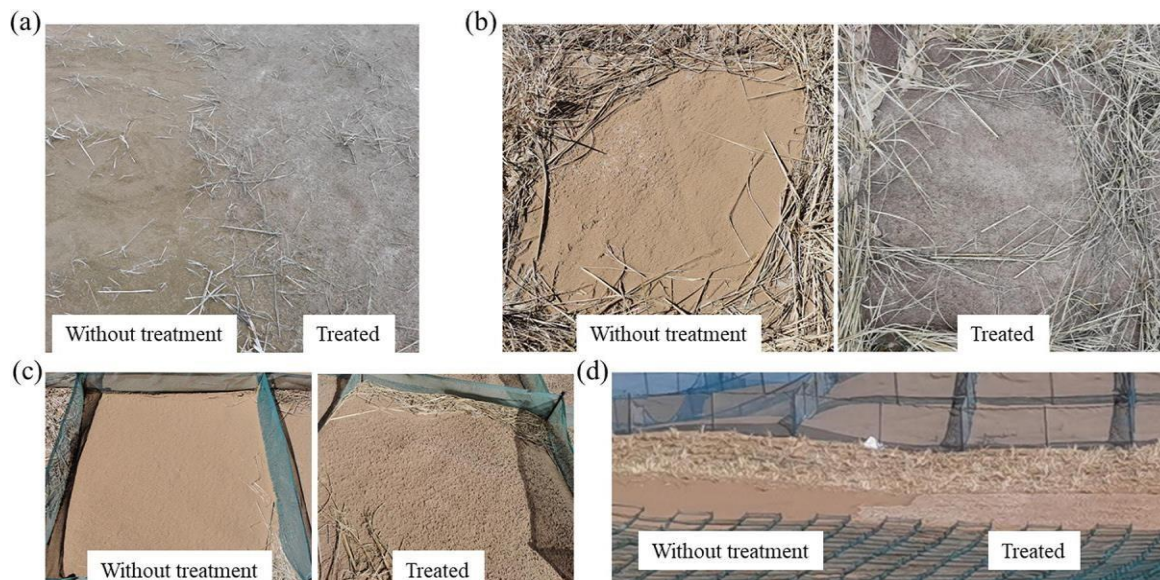


Figure 18 : Observation visuelle des motifs de surface : (a) zone 1 ; (b) zone 2 ; (c) zone 3 ; (d) zone 4 (Sun et al., 2021).

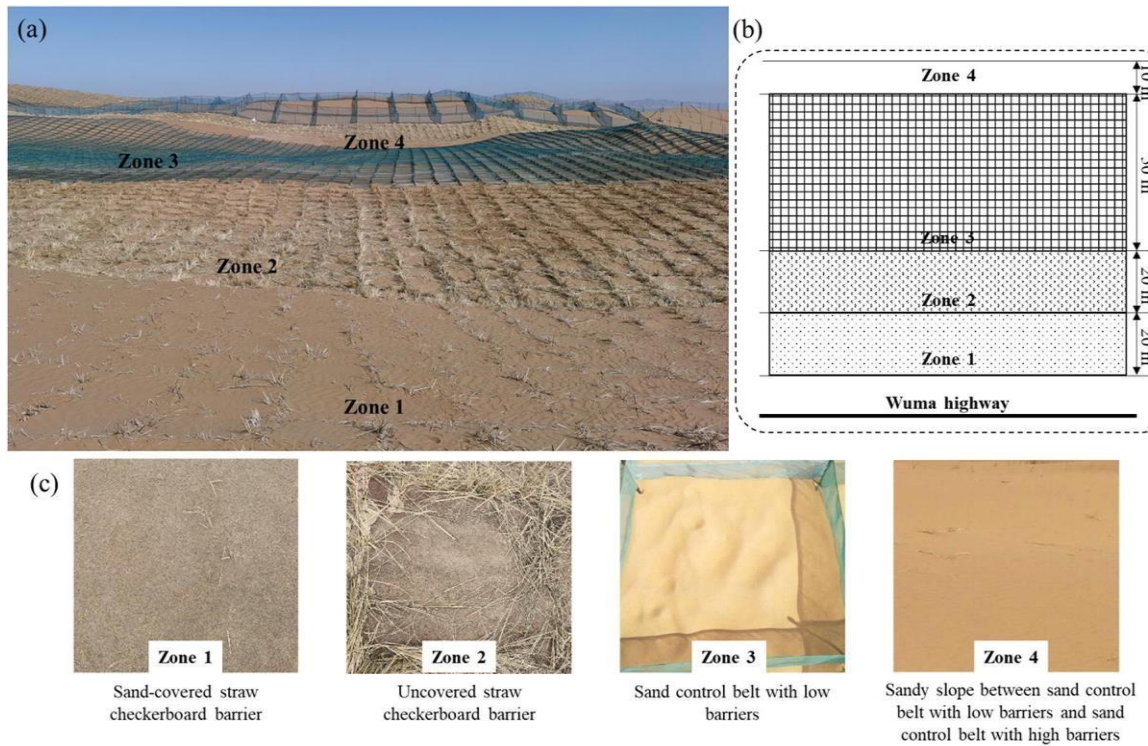


Figure 19 : Site d'essai sur le terrain : (a) zones d'essai 1 à zones d'essai 4 sur le site d'essai sur le terrain ; (b) croquis en plan des zones d'essai 1 aux zones d'essai 4 : (c) les caractéristiques géomorphologiques spécifiques des zones d'essai (Sun et al., 2021).

Partie II
Matériels et Méthodes

1. Lieux de travail:

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie au département de biologie à l'université Ammar Thlidji -Laghouat.

2. L'objectif du travail:

Cette étude s'inscrit dans la continuité du travail réalisé par les étudiants Djoudi et Hadbi dans le cadre de leur PFE en 2021.

Et à pour objectifs :L'étude de l'effet du pH sur le rendement de précipitation de la calcite (CaCO_3) par quatre souches de genre *Bacillus* sp.

3-Matériel biologique:

3.1- Souches microbiennes :

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail nous ont été remis par Mr. Krantar Kamel (Tableau 5).

Tableau 5: Les souches bactériennes utilisées dans ce travail.

Les échantillons	Le genre	Références
Ech 2.1	<i>Bacillus</i> sp	Djoudi et Hadbi (2021)
Ech2.2	<i>Bacillus</i> sp	Djoudi et Hadbi (2021)
Ech 3.2	<i>Bacillus</i> sp	Djoudi et Hadbi (2021)
Ech 3.3	<i>Bacillus</i> sp	Djoudi et Hadbi (2021)

4-Authentification des souches :

Les souches ont été authentifiées à l'aide de procédures traditionnelles, qui comprennent l'évaluation de leurs aspects morphologiques ainsi que de leurs caractéristiques physiologiques et biochimique.

4.1 Étude morphologique :

4.1.1 Examen macroscopique des cultures :

Le premier examen effectué sur les cultures est un examen macroscopique. L'apparence des colonies est influencée par le milieu utilisé, ainsi que par la durée et la température d'incubation. Seules des colonies bien isolées peuvent le représenter avec précision (**Bent Mohamed et Mint Sidi Baba, 2008**).

4.1.2 Examen microscopique des bactéries :

Au microscope optique, l'étude de la morphologie bactérienne comprend l'examen de la forme des bactéries et la détermination de leur assemblage.

4.1.2.1 Coloration de Gram :

La coloration de Gram est la coloration différentielle microbiologique et la plus largement utilisée. Elle permet de différencier les bactéries selon 2 critères : Leur forme et leur affinité pour les colorants (**Frederick., 2008**).

4.1.2.2 Teste de spore « Coloration à l'encre de Chine » :

La coloration à l'encre de Chine est une méthode simple et rapide utilisée pour visualiser les spores au microscope optique.

Procédure de la coloration à l'encre de chine :

1. Appliquez une goutte d'encre de Chine sur un bord d'une lame microscopique propre.
2. À l'aide d'une pipette pasteur, retirez un peu de culture et dispersez-la dans la goutte de colorant sans l'étaler.
3. Prenez une autre lame de verre microscopique, placez-la près du mélange échantilloncolorant à un angle d'environ 30 ° - 45°.

4. Déplacez la lame vers la goutte du mélange colorant échantillon jusqu'à ce que le contact soit établi avec la goutte à l'angle spécifique. Ensuite, avancez la lame doucement et rapidement vers l'avant sur la lame d'échantillon, en attirant le mélange de colorants derrière elle en un film mince.

5. Laisser le frottis sécher complètement avant de l'examiner au microscope avec des objectifs à fort grossissement (100X) avec une goutte d'huile à immersion (**Lavallée.,2008**).

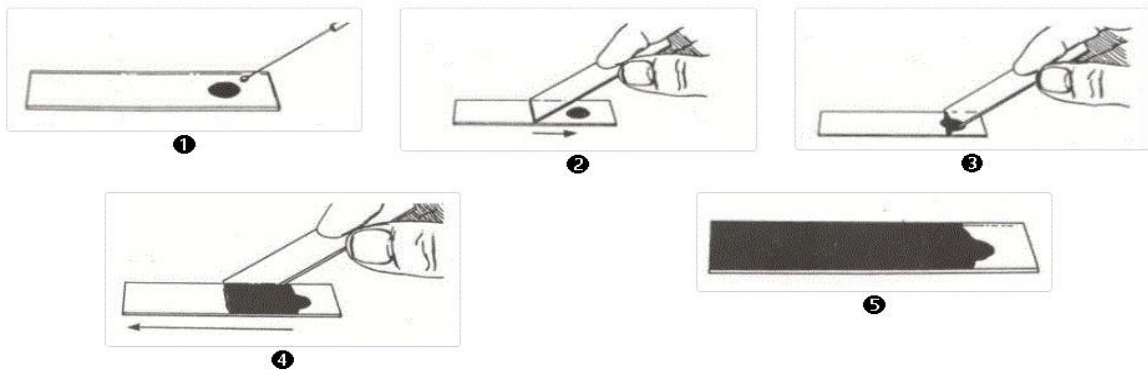


Figure 20 : schéma représente les procédures de la coloration à l'encre de chine (**Site internet**).

4.2. Tests biochimiques :

4.2.1 Test de catalase :

Cette méthode consiste à prélever une partie de la colonie et à l'émulsionner dans une goutte de peroxyde d'hydrogène. La libération des bulles de gaz signifie la production de catalase (**Bekada, 2019**).

4.2.2 Mannitol mobilité :

Il s'agit d'une gélose molle qui vient dans des tubes et peut être utilisée pour examiner la fermentation du mannitol et la motilité bactérienne. Pour l'ensemencement, une pipette Pasteur a été utilisée pour faire une piqûre centrale jusqu'au fond des tubes. La fermentation du mannitol est caractérisée par un changement de couleur du milieu au jaune.

Alors que les bactéries mobiles sont disséminées à partir de la ligne d'ensemencement. Et provoquant un trouble dans le milieu. Tandis que les bactéries immobiles ne poussent que le long de la strie d'ensemencement (**Aissaoui, 2013**).

4.2.3 Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée calcium (GNUC) :

Le test biochimique suivant est effectué dans le cadre de notre recherche de bactéries urolytiques alcalophiles capables d'hydrolyse de l'urée par l'enzyme uréase dans un milieu basique.

On repiqués tous les colonies purifiées obtenus de l'étape précédente de purification sur notre milieu sélectif, Gélose Nutritif Urée – Calcium (GNUC) a pH de 10.0, Qui est regroupé seulement les bactéries alcalines urolytiques, Et qui est le même milieu d'isolement mais sans l'addition de glucose les bactéries poussées dans ce milieu, Normalement sont des bactéries 100% alcalines urolytiques.

5-Test de formation de la calcite (CaCO_3) :

Les souches bactériennes sélectionnées (**Ech02.1**, **Ech02.2**, **Ech03.2**, **Ech03.3**) ont été soumises à un test de production de calcite, les souches bactériennes vivantes ont été inoculées dans un bouillon nutritif urée-calcium (BNUC), de pH différent de milieu, Tous les erlenmeyers ont été incubés à l'air ambiant sur l'action à la plaque d'agitateur pendant 10 jours. Pour empêcher le milieu de s'évaporer sur plaque d'agitation pendant 10 jours, Les Erlenmeyer ont été scellés avec de l'aluminium Et l'expérience a été répétée plusieurs fois.

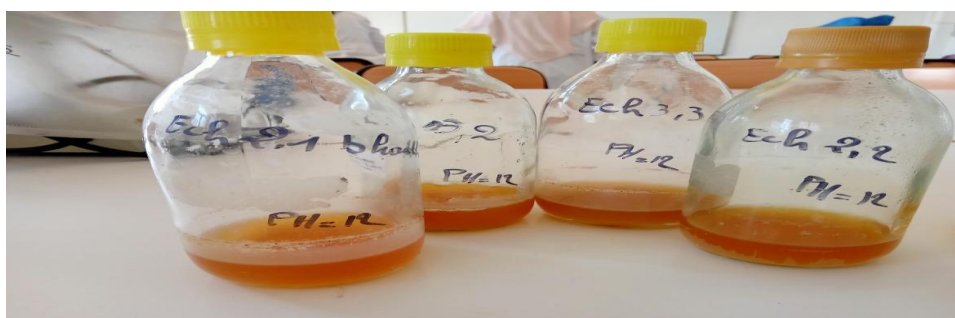


Figure 21 : photo de conditions de formation de calcite à différents pH.

6. Optimisation de la formation de la calcite à différents pH :

Les isolats bactériens sélectionnés (Ech02.1, Ech02.2, Ech03.2, Ech03.3) ont été soumis à un test pour comprendre les conditions de formation de calcite (figure 24), les souches bactériennes vivantes ont été inoculées dans un bouillon nutritif urée-calcium (BNGUC), de pH différent (6.7/7.7/9/12). Tous les erlenmeyers ont été incubés à 37°C dans une étuve sur plaque d'agitation pendant 10 jours.

Tableau6 : les conditions de optimisation formation de la calcite à differentpH .

Isolates	pH	Temperature/Incubation	Aération	Milieu
Ech2.1	6.7/7.7/9/12	37°C / 10 Jours	Agitation aérobie	BNGUC
Ech 2.2	6.7 / 7.7 / 9 / 12	37°C / 10 Jours	Agitation aérobie	BNGUC
Ech 3.2	6.7 / 7.7 / 9 / 12	37°C / 10 Jours	Agitation aérobie	BNGUC
Ech 3.3	6.7 / 7.7 / 9 / 12	37°C / 10 Jours	Agitation aérobie	BNGUC

- A la fin de la période d'incubation, le papier filtre est d'abord pesé. Ensuite, nous avons fait l'installation expérimentale suivante:

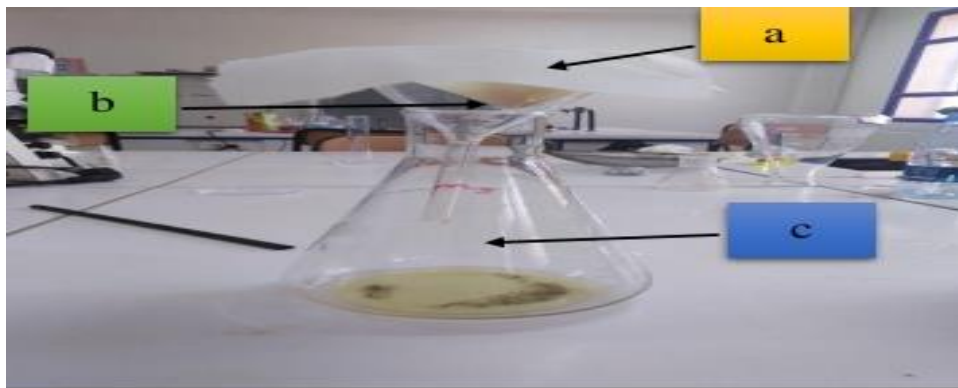


Figure 22: Une photo illustrant le montage expérimental utilisé pour filtrer le dépôt de calcite, (a) Papier Filtre, (b) Entonnoir, (c) Erlenmeyer.

Ensuite, On séparés tout ce qui est phase solide et liquide à partir du papier filtre, et laissons sécher un peu (a), et après quelques minutes, nous pesons la quantité de calcite précipitée (b) (**Figure 23**).



Figure 23 : le dépôt de calcite sur la balance.

Partie III
Résultate ET Discussion

1. Étude morphologique :

1.1 Aspect Macroscopique :

La première étape de la caractérisation phénotypique des souches bactériennes c'est la description macroscopique des colonies isolées, Nous avons réalisés l'examen macroscopique à 4 souche isolée après la purification sur GNGUC (**Figure 24**), et on observés des variations importantes des colonies par apport les critères de pigmentation, Taille, Forme...Etc (**Tableau 5**).



figure24 : Aspect macroscopique des colonies des bactéries

Tableau 7 : Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.

	Chromogénèse	Forme	Transparence	Aspect de surface	Consistance
Ech02.1	Blanche	Irrégulier et plate, de bord ondulé	-	Lisse	Sèche
Ech02.2	Blanche	Circulaire, d'élévation opaque, de bord régulier	-	Lisse	Sèche
Ech03.2	Blanche	Circulaire et plate de bord régulier	-	Lisse	Sèche
Ech03.3	Blanche	Circulaire et plate de bord régulier	-	Lisse	Sèche

1.2 Aspect microscopique :

1.2.1 Coloration de Gram :

Les résultats obtenus de la coloration de Gram sont montrés dans le (**Tableau 6**), La majorité des souches isolées appartiennent aux groupes de Gram + en différents arrangement (paire, amas, coccobacille, streptobacille) (**Figure 25**).

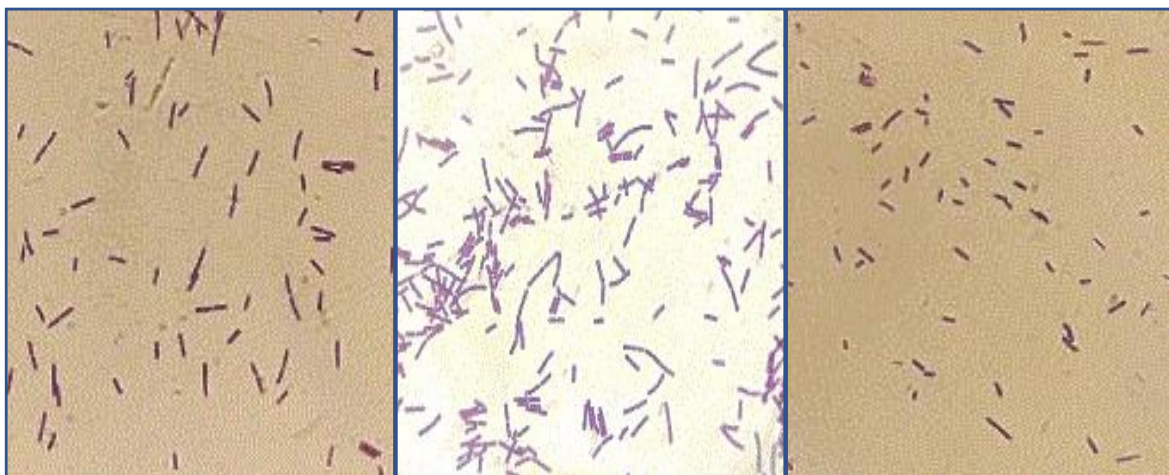


Figure 28 : Résultats de coloration de Gram de quelques souches bactériennes.

1.2.2 Coloration de spore :

Les 4 souches isolées ont été colorés par encre de chine, et les résultats montrés dans le (**Tableau 6**), Les spores bactériennes ne sont pas colorées mais elles sont devenues rendues visibles sur un fond bleu sous forme de corps incolores (**Figure 26**).

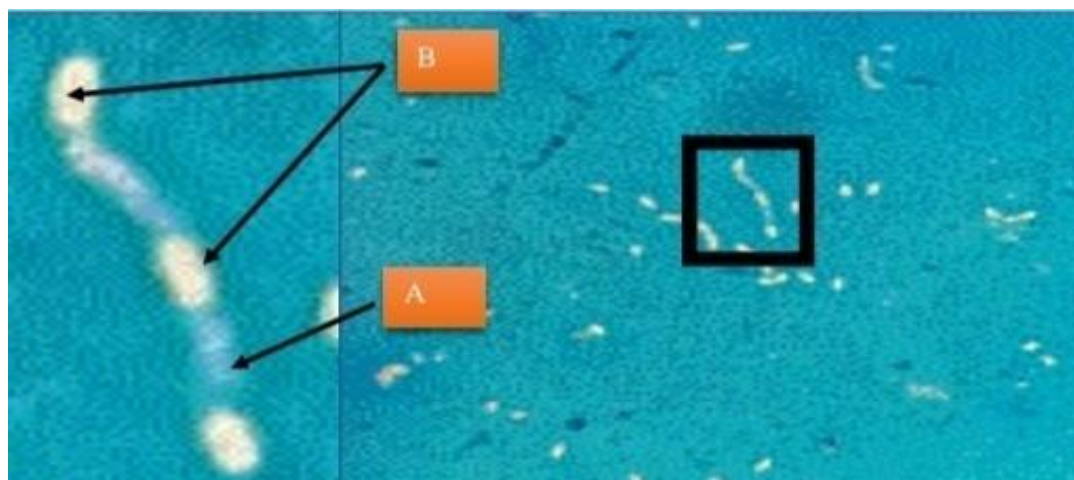


Figure 26: Résultat de coloration de spore l'encre de chine, (A) Forme végétative, (B)Endospore

2-Teste biochimique:

2.1 Test de catalase :

La catalase est une enzyme fréquemment produite par des bactéries avec un processus de métabolisme respiratoire qui décompose le peroxyde d'hydrogène et libère de l'oxygène (Bekada., 2019) : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$

La libération des bulles de gaz signifie la production de catalase, On a réalisé ce test pour mettre en évidence la présence ou l'absence de l'enzyme catalase. Et les résultats sont montrés dans le (Tableau 6).

2.2 Mannitol mobilité :

On a utilisé ce test sur 4 isolats pour examiner la fermentation du mannitol et la motilité bactérienne (Figure 27). et les résultats obtenus sont montrés dans le (Tableau 6).



Figure 27: Résultat de manitol mobilité de 4 isolates

2.3 Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée-calcium (GNUC) :

Le milieu sélectif (GNUC) à pH 10.0 a été utilisé pour détecter la présence ou l'absence d'enzyme uréase, Les résultats sont trouvés dans (Tableau 6).

Tableau 8: Résultats de coloration de Gram, Coloration de spore et des tests biochimiques effectués sur 4 isolats bactériennes.

Coloration de Test de Gram spores		Catalase	Mannitol	Mobilité	Uréase
Ech02.1	Grosbacille Gram + + / Terminale	+	-	+	+
Ech02.2	Streptobacille Gram + + / Terminale +	+	-	+	+
Ech03.2	Grosbacille Gram + + / Centrale	+	-	+	+
Ech03.3	Grosbacille Gram + + / Centrale	+	-	+	+

3. Test de formation la calcite (CaCO₃) :

Nous disons que la formation de calcite nécessite des bactéries qui produisent l'enzyme **uréase** responsable de la décomposition de l'urée avec la présence d'ions calcium en quantité suffisante avec un pH et une température appropriée dans une série de réactions.

Tableau 09 : Bouillon nutritif avec urée et calcium (BNUC), bouillon nutritif glucose urée calcium. Isolats bactériennes (Ech02.1, Ech02.2, Ech03.2, Ech03.3)

Milieu	Précipitation de CaCO ₃
BNUC	+
BNGUC	+

4. Optimisation de formation de calcite à differentpH:

La calcite est le minéral le plus répandu sur la terre... On la trouve partout, Sous diverses formes, y compris les roches, Craie, Marbre, Chaux...ainsi de suite. Et puisque les cristaux de calcite sont difficiles à voir au microscope optique, aussi pour les experts, L'objectif le plus important du test est de démontrer la formation de calcite (CaCO₃) par production de la craie. Après 10 jours d'incubation et après filtration de la calcite précipitée par composition expérimentale appropriée, nous avons obtenu un rendement important de craie. Et les résultats sont présentés dans le (**Tableau 10**).

Partie III : Résultate ET Discussion

$$R_{\text{calcite/urée}} = \frac{\text{quantété de calcite précipité}}{\text{quantéte de urée utilisé}} \text{ g/g}$$

Tableau 10 : Les résultats de optimisation de formation de calcite (CaCO₃)àdifferent pH.

Isolats	Précipitation de CaCO ₃	Poids en (g) du papier filtre avec calcite	Poids en (g) du calcite	Rendement en (g) de Calcite	Le pH
Ech02.1	+	0.95	0.35	0.4375	6.7
Ech02.2	+	0.77	0.16	0.2000	6.7
Ech03.2	+	0.90	0.29	0.3625	6.7
Ech03.3	+	0.99	0.38	0.4750	6.7
Ech 2.1	+	1.32	0.30	0.3750	7.7
Ech 2.2	+	1.15	0.53	0.6625	7.7
Ech0 3.2	+	0.97	0.36	0.4500	7.7
Ech03.3	+	0.81	0.24	0.3000	7.7
Ech02.1	+	1.10	0.35	0.4375	9
Ech02.2	+	1.07	0.28	0.3500	9
Ech03.2	+	1.25	0.4	0.5000	9
Ech03.3	+	1.28	0.46	0.5750	9
Ech02.1	+	1.48	0.67	0.8375	12
Ech02.2	+	1.05	0.23	0.2875	12
Ech03.2	+	1.59	0.75	0.9375	12
Ech03.3	+	1.22	0.41	0.5125	12

Les diagramme de poids de carie des souches sélectionne dans même pH:

Des courbes graphiques montrant les changements de poids de calcite en termes de ph dans quatre souches différentes *debacillus*sp, où nous avons testé quatre médianes de pH à (pH=6, 7 / pH=7, 7 / pH=9 / pH=12).

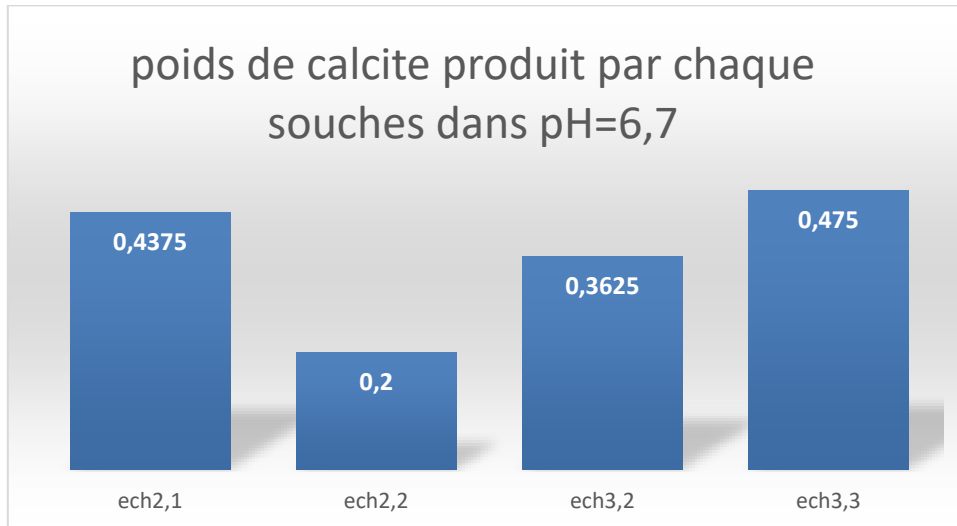


Figure27 :Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=6.7

Les résultats totaux du poids de calcite à chaque souche ont montré qu'à ph = 6.7 le résultat idéal était pour la souche ech 3.3, avec un poids de calcite précipité 0.4750 g, suivi de la souche ech 2.1, avec un poids de calcite précipité 0.4375 g, et ech3.2, avec un poids de calcite précipité 0.3625 g, suivi de la souche ech2.2, avec un poids de calcite précipité 0,2000g.

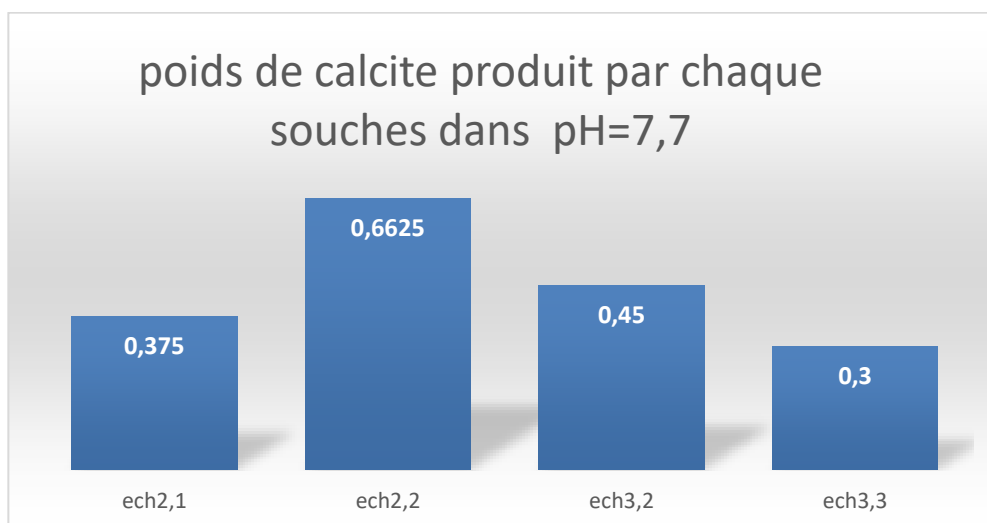


Figure28 :Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=7.7.

Les résultats totaux du poids de calcite à chaque souche ont montré qu'à ph = 7.7 le résultat idéal était pour la souche ech 2.2, avec un poids de calcite précipité 0.6625 g, suivi de la souche ech 3.2, avec un poids de calcite précipité 0.4500 g, et ech2.1, avec un poids de calcite précipité 0.3750 g, suivi de la souche ech3.3, avec un poids de calcite précipité 0.3000.

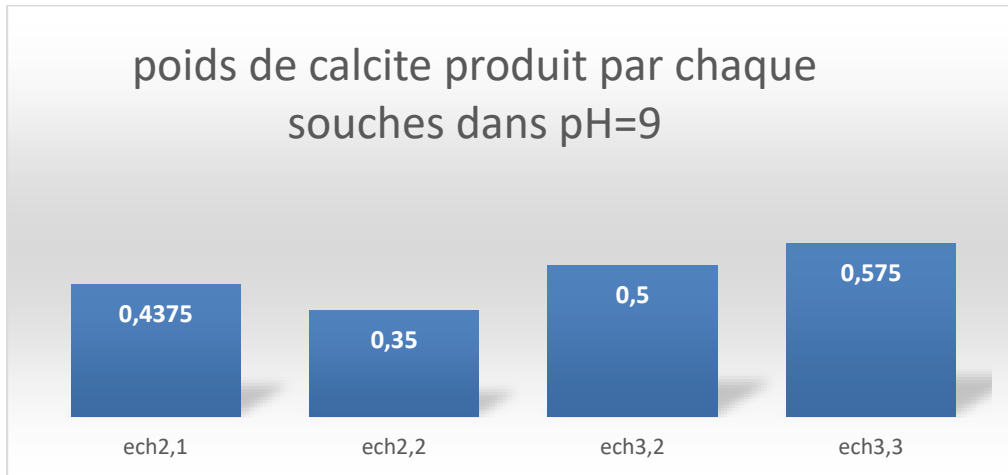


Figure29 :Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=9.

Les résultats totaux du poids de calcite à chaque souche ont montré qu'à $\text{pH} = 9$ le résultat idéal était pour la souche ech 3.3, avec un poids de calcite précipité 0.5750 g, suivi de la souche ech3.2 , avec un poids de calcite précipité 0.5000 g, et ech2.1, avec un poids de calcite précipité 0.4375 g, suivi de la souche ech2.2, avec un poids de calcite précipité 0,3500 .

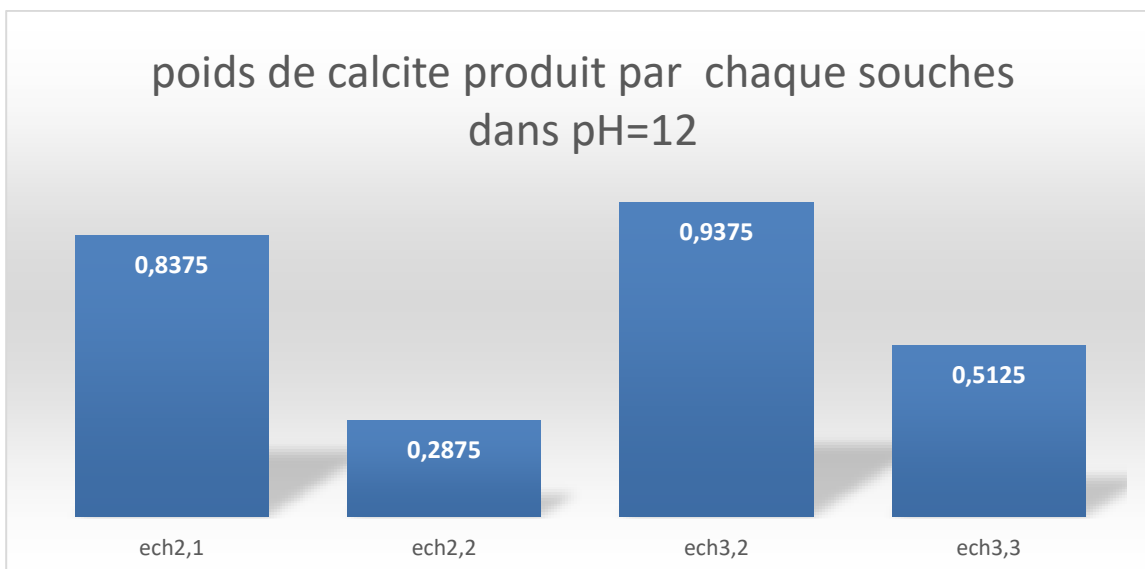


Figure30 :Poids de calcite produit par chaque souche dans pH=12.

❖ Les résultats totaux du poids de calcite à chaque souche ont montré qu'à $\text{pH} = 12$ le résultat idéal était pour la souche ech 3.2, avec un poids de calcite précipité 0.9375 g, suivi de la souche ech 2.1, avec un poids de calcite précipité 0.8375 g, et ech3.3, avec un poids de calcite précipité 0.5125 g, suivi de la souche ech2.2, avec un poids de calcite précipité 0,2875 g.

Le rendement de Calcite précipète:

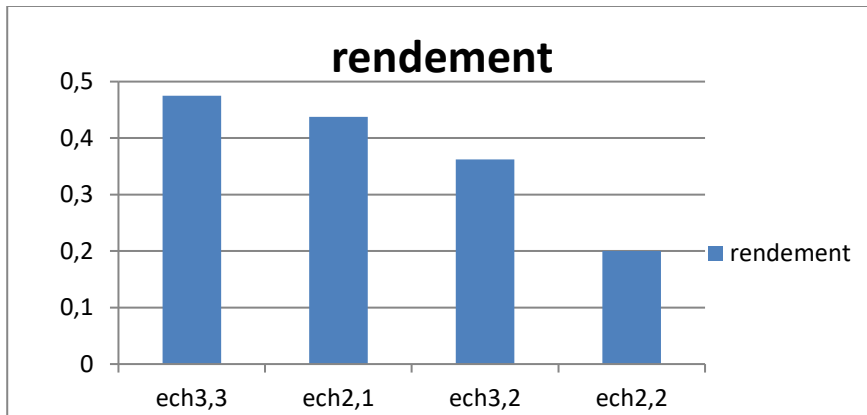


Figure31:rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=6.7.

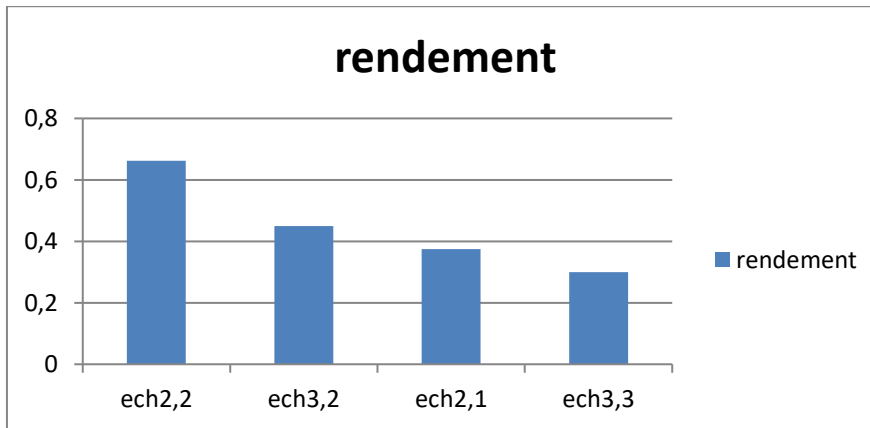


Figure32:rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=7.7.

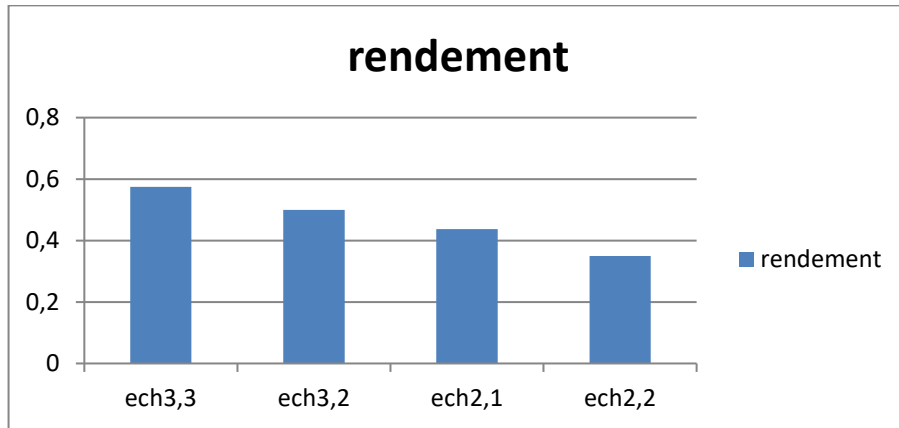


Figure33:rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=9.

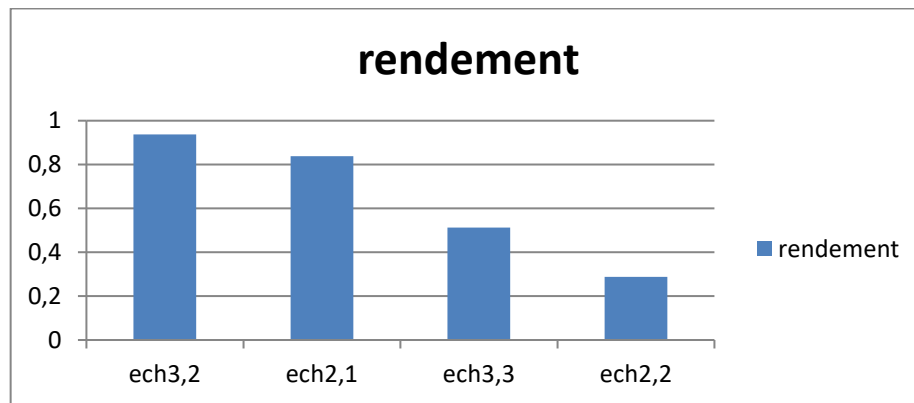


Figure34:rendement de calcite produit par chaque souche dans pH=12.

Les commentaires:

Ci-dessus, des courbes graphiques montrant les changements de rendement de calcite en termes de ph dans quatre souches différentes de bacillussp, où nous avons testé quatre médianes de ph à (PH=6, 7 / PH=7, 7 / PH=9 / PH=12).

- ❖ A un pH = 6,7, la valeur optimale était à une souche de 3,3 rendements 0.4750.
- ❖ A un pH=7.7, la valeur optimale était à une souche de 2.2 rendement 0.6625.
- ❖ A un pH =9, la valeur optimale était à une souche de 3.3 rendement 0.5750
- ❖ A un pH=12, la valeur optimale était à une souche de 3,2rendement 0.9375 et le souche2.1a rendement 0.8375.

Tableau 11, les résultat idéal de rendement produit par les souches dans chaque pH .

<i>pH</i>	<i>6.7</i>	<i>7.7</i>	<i>9</i>	<i>12</i>
<i>isolates</i>	<i>Ech 3.3</i>	<i>Ech 2.2</i>	<i>Ech 3.3</i>	<i>Ech 3.2 et 2.1</i>

Discussion

. Processus MICP et objets micro-organismes participants:

Le MICP est un phénomène naturel omniprésent (Stocks-Fischer et al., 1999) qui se produit avec un large éventail de espèces microbiennes dans différents environnements (sols, océans, eaux douces, lacs salés, etc.) (Hammes et al., 2003 ; Wei et al., 2015). Il existe trois groupes de micro-organismes qui peuvent être impliqués dans la précipitation du carbonate de calcium. Un groupe est le groupe de micro-organismes photosynthétiques (tels que les cyanobactéries et microalgues), qui sont phototrophes. Les deux autres sont des hétérotrophes et sont apparentés aux sulfatescycle (bactéries réductrices de sulfate) et cycle de l'azote (par exemple, bactéries réductrices de nitrate et bactéries hémolytiques), séparément (Al-Salloum et al., 2017; de Moynck et al., 2010).

L'urée est un important transporteur d'azote organique et de grandes quantités d'urée sont libérées dans l'environnement par l'urine et la biodégradation. Dans le sol et l'eau, l'uréase produit par des bactéries, des champignons, des plantes et des animaux, joue un rôle important dans l'azote global. Parcourez la décomposition de l'urée (Kaversky et Talma, 2018). L'hydrolyse de l'urée, qui est catalysée par l'uréase, qui Les ions ammonium et carbonate sont libérés dans l'environnement, ce qui est un processus rapide par rapport à la décomposition de l'urée sans uréase (10¹⁴ fois) et la réaction peut être facilement contrôlée. Avec la présence de Ca²⁺ des ions de carbonate de calcium peuvent se former. À ce jour, l'un des systèmes MICP les plus populaires est sur la base de l'hydrolyse de l'urée catalysée par des bactéries diurétiques pouvant produire de l'uréase. Au cours du processus, l'urée se décompose et Le pH du milieu environnant augmente du fait de la production d'ammoniac qui contribue à la formation de calcite à la surface des particules ainsi qu'au contact des particules en présence d'ions calcium. Rôle de bactéries peuvent être décrites comme suit, (1) elles produisent de l'uréase par hydrolyse de l'urée, (2) elles augmentent le pH en génération alcaline, (3) il fournit des sites de nucléation pour la production de précipitations (van Bassen, 2009).

Sporosarcina pasteurii (*S. pasteurii*, également connu sous le nom de *Bacillus pasteurii*, *B. pasteurii*) EST largement utilisé un micro-organisme typique du MICP, en raison de la forte activité de l'uréase (donnant une grande efficacité du processus MICP), Grande adaptabilité au milieu environnant sans agents pathogènes. *S. pasteurii* est une bactérie Gram positive, aérobie, alcaline (DeJong et al., 2006 ; Zhao et al., 2014), classée dans le groupe de risque 1 (peu susceptible de causer des maladies humaines) (Venda Oliveira et al., 2015). Ils sont soit ronds, en forme de tige ou en spirale, et le diamètre des cellules est généralement compris entre 0,5 et 3 µm. Ainsi, le libre passage de ces bactéries est généralement empêché lorsque Les pores de la gorge sont inférieurs à 0,4 µm (DeJong et al., 2006). Soit les bactéries utilisées dans les études MICP sont achetées provenant d'entreprises ou isolées localement à partir d'échantillons d'eau, de sol ou de boues (Omorieg et al., 2017). pour le type Les souches, telles que ATCC 11859, sont cultivées dans des conditions de croissance aérobie (limites d'oxygène insuffisantes croissance) à température ambiante (température optimale autour de 30°C) dans la gamme de pH de 6 à 9. Précoce La phase

stationnaire peut être atteinte environ 40 heures après la plantation. Pour réaliser le MICP, l'injection d'une solution bactérienne et l'injection de réactifs chimiques sont nécessaires. En ce qui concerne la L'injection bactérienne, la méthode d'augmentation (ajout de cultures microbiennes pré-cultivées) et la méthode de biostimulation (ajout de nutriments pour stimuler la croissance de bactéries indigènes spécifiques) sont utilisées par Des chercheurs pour améliorer les performances des bactéries. Dans la plupart des études de laboratoire, la biostimulation est utilisée Pour injecter des bactéries dans un sol préparé industriellement. Pour les expériences de terrain, **Gomez et al. (2018)** a déjà réalisé un essai réussi d'une thérapie de biostimulation de 12 mètres sur le terrain. Bien qu'il existe peu d'études À propos de la biostimulation au niveau du champ, c'est une méthode efficace qui utilise des bactéries indigènes, réduisant risques environnementaux et coût de l'agriculture et du transport. Pour l'injection de la solution de cimentation, des réactifs chimiques commerciaux (urée, ions calcium) sont utilisés. Pour considérations durables, environnementales et rentables, les chercheurs ont utilisé des alternatives pour remplacer le pur Réactifs chimiques dans des domaines spécifiques. Selon Danjo et Kawasaki (2016), l'urée est disponible dans les zones côtières zones, résultant par exemple de la biodégradation des poissons morts ainsi que de l'urine d'animaux Il est utilisé comme source de carbone. Dans une région aux ressources limitées comme le Sahel au Sahara (**Bernardi, 2012**).

Facteurs influençant l'activité microbienne:

Le contrôle de l'activité biologique permet de contrôler le moment, la vitesse et la distribution spatiale des réactions chimiques (**DeJong et al., 2010**). Obtenir le maximum de biomasse et d'activité enzymatique et fixer le les bactéries à l'endroit désiré est vitale pour assurer le succès final du MICP.

1. L'uréase et son activité:

IL est clair qu'avec une activité plus élevée de l'uréase, plus de précipitations peuvent être obtenues s'il y a d'autres conditions propice. Dans la majorité des études, l'activité uréasique est toujours mesurée et calculée selon La méthode Whifin avant injection (**Whiffin, 2004**). L'activité d'uréase est égale à la pente de conductivité courbe d'évolution en fonction du temps dans les cinq premières minutes de mesure.

2. pH et température

Le pH et la température ont une incidence directe sur la croissance et l'activité uréasique des bactéries. *S. pasteurii* est sensible au pH et à la température pendant le processus de cimentation comme certaines études l'ont montré (**Kim et al., 2018 ; Sun et al., 2019**). Le pH et la température ont également des impacts sur les équilibres de dissolution et précipitations pendant le processus MICP. On parle ici principalement de l'influence de l'activité microbienne *causée* par ces paramètres. Le pH a un effet biochimique crucial sur l'activité de l'uréase produite par *S. pasteurii* (**Whiffin, 2004**). Le pH optimal pour la croissance des bactéries et l'activité de l'uréase ne sont pas les mêmes. Pour la culture des bactéries, le pH optimal est d'environ 9, tandis que le pH optimal pour l'activité uréasique est généralement proche de la neutralité pour *S. pasteurii* (**Mobley et al., 1995**). Selon **Whifin (2004)**, un pH compris entre 6,25 et 7,7 donne une activité uréasique supérieure à 40 mM urée/min et le maximum (autour de 43 mM urée/min) se situe vers pH =7. **Cheng et al. (2014)** ont constaté qu'un pH inférieur à 3,5 et supérieur à 9,5 est défavorable au

processus de cimentation. Les résultats expérimentaux d'Omorieg et al. (2017) ont montré que la plage de pH de 7,5 à 8 était la optimale pour l'activité uréasique de cinq souches de *S. pasteurii*. Au cours du processus MICP, Stocks-Fischer et al. (1999) ont déterminé que le MICP commence à pH= 8,3 et son taux augmente jusqu'à pH 9. **Kim et al. (2018)** étudié l'effet du pH (de l'ordre de 6 – 10) d'une solution d'urée-CaCl₂ et a trouvé que le pH =7 était conditions optimales pour la biocimentation.

La température affecte la croissance microbienne et l'activité de l'uréase. **Bahmani et al. (2017)** ont étudié l'uréase activité de *S. pasteurii* à différentes températures (10, 15, 21, 35, 50, 60 et 80 C), et a constaté que l'uréase l'activité augmente avec la température jusqu'à une température optimale de 60 C. Au cours du processus de culture des bactéries, la température optimale pour que différentes souches de *S. pasteurii* atteignent l'activité uréase spécifique maximale est de 25 C ou 30 C, par ex. pour la DSMZ 33 la température optimale est de 30 C (**Omorieg et al., 2017**). Cheng et al. (2014) ont constaté que l'augmentation de la température pouvait augmenter la production de calcite ; cependant, la résistance était inférieure à celle obtenue à température ambiante. Pour la cimentation de matériaux relativement grossiers (1 à 3 mm), une température modérée de 20 C était optimale (Mahawish et al., 2018). Dans Soleil et al. (2019), 30 C a entraîné le taux le plus élevé de précipitations de CaCO₃. Kim et al. (2018) étudié l'influence des températures entre 20 et 50 C et ont trouvé que 20, 25, 30 C étaient les températures optimales pour différentes souches de *S. pasteurii*.

3. solution de ciment:

Dans les protocoles MICP, la solution de cimentation (CS) fournit certainement les produits chimiques essentiels pour le procédé MICP (comme source d'urée et de Ca²⁺). Parfois, il comprend également des ingrédients tels qu'un stabilisateur de pH (NaHCO₃), une source de carbone ou des nutriments (bouillon nutritif, levure) pour préserver les bactéries. La concentration de CS fait référence à Concentration d'urée et de Ca²⁺ dans CS. C'est un paramètre important lors de la conception du protocole MICP (DeJong et al., 2013). Plusieurs auteurs ont mené des expériences en laboratoire en utilisant différentes concentrations de CS sur différents types de sol et ont tenté de déterminer la concentration optimale pour leurs conditions expérimentales.

Conclusion

Conclusion

La précipitation microbienne induite de calcite (MICP) est une caractéristique ancienne des bactéries, qui a été découverte récemment. La biocalcification possède un grand champ d'applications dans divers domaines de la vie économique et écologique de l'homme. Le pH joue un rôle important dans la précipitation microbienne de la calcite, c'est ce qui a été démontré dans cette étude les meilleurs taux de rendement de formation de biocalcite ont été réalisés à des pH de 12 et 9 (0.9375 g/g et 0.5750 g/g respectivement) Ech 3.2 et Ech 2.1. La souche Ech 2.2 a fait l'exception parmi les souches testées car elle a enregistré un rendement élevé à pH 7.7 (0.6625 g/g).

En perspectives de ce travail on propose de passer à des tests sur le terrain pour étudier le:

- ✓ Rôle de la biocalcite dans le biociment.
- ✓ Rôle de la biocalcite dans la lutte contre l'érosion.

Références bibliographiques

Références

- Abo-El-Enein, S., Ali, A., Talkhan, F. N., & Abdel-Gawwad, H. (2013).** Application of microbial biocementation to improve the physicommechanical properties of cement mortar. *HBRC Journal*, 9(1), 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2012.10.004><https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2012.10.004>
- Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., & Reddy, M. S. (2008).** Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by *Sporosarcinapasteurii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(3), 433-438. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0514-7><https://doi.org/10.1007/s10295-008-0514-7>
- AdharshRajasekar. (2018).** *Calcite-precipitating indigenous bacteria in landfills and their application towards ground improvement*. Thèse Doctorat, University of Liverpool, P42.
- Aissaoui Nadia. (2013).** *Etude molécules d'antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrémophile issue d'une sebkha Algérienne d'EL Goléa*. Mémoire Master, Université de Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie, P38-39.
- Aït-Kadi, D., Bouzenad, A. (2015).** *Analyse dumarche du carbonate de calcium Caco3*. Université Laval Québec, Département de génie mécanique, Laboratoire de fiabilité et maintenance des systèmes, P05.
- Almajed, A., Lemboye, K., Arab, M. G., & Alnuaim, A. (2020).** Mitigating wind erosion of sand using biopolymer-assisted EICP technique. *Soils and Foundations*, 60(2), 356-371. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2020.02.011><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2020.02.011>
- Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016).** Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2><https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2>
- Aouf, R. S. (2021, 25 mai).** *Bio-bricks made from human urine could be environmentally friendly future of architecture*. Dezeen. <https://www.dezeen.com/2018/11/06/bio-bricks-human-urine><https://www.dezeen.com/2018/11/06/bio-bricks-human-urine-environmentally-friendly-university-cape-town/><https://www.dezeen.com/2018/11/06/bio-bricks-human-urine-environmentally-friendly-university-cape-town/>
- Ashraf, M.S., Azahar, S.B., NurZulaikha, Y. (2017).** Soil Improvement Using MICP and Biopolymers: A Review. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 226 (2017) 012058, DOI:10.1088/1757-899X/226/1/012058.

- Azadi, M., Ghayoomi, M., Shamskia, N., & Kalantari, H. (2017).** Physical and mechanical properties of reconstructed bio-cemented sand. *Soils and Foundations*, 57(5), 698-706. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2017.08.002><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2017.08.002>
- Babou, R. (2010).** *Synthèse De Nanoparticules De Carbonate De Calcium*. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de L'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en génie Agroalimentaire pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.). Département de sols et de génie agroalimentaire Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Université Laval Québec, P07-08-10.
- Bacillus - Actualités Médicales Quotidienne - Actualité Santé. (2018, 30 mai).** *Medical Actu - Actualité Médicales Quotidienne - Actualité Santé*. <https://www.medical-actu.com/cours/bacteriologie/bacillus/><https://www.medical-actu.com/cours/bacteriologie/bacillus/>
- Bekada Djamel Eddine. (2019).** *Intérêt des tests microbiologique dans le cas de la Gastrite B, maladie de Crohn et Rectocolite Hémorragique*. Thèse Doctorat, Université d'Oran, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Département de Biologie, P37.
- Benoit St-Onge. (2016).** *Validation d'un Protocole d'injection pour l'amélioration Des Sols En Place Par Micp Et Analyse De l'état Critique d'un Sable Biocalcifié*. Mémoire Présenté En Vue De L'obtention Du Diplôme De Maîtrise Ès Sciences Appliquées, Université De Montréal, Département De Génies Civil, P05.
- Bent Mohamed, A., Mint Sidi Baba, A. (2008).** *MANUEL DE TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE*. Université de Nouakchott, Faculté des sciences et techniques, Département de Biologie, TP. N°6 - L'examen Microscopique des Bactéries, P18.
- Billy, C. (2020).** Problèmes Posés par le Métabolisme de Quelques Bactéries Calcifiantes Aérobie 1. Etude d'une association bactérienne halophile productrice d'aragonite, En milieu marin. *Journal articles*, P165-P169.
- Blondieau, M., Puccio, S., Compère, P., Hatert, F. (2016).** Minéralogie de l'ancienne mine plomb-zinc de Rabotrath (Lontzen, Belgique). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 85, 2016, p. 30 – 55.
- BouraouiCheima. (2019).** *Renforcement d'un sable par des processus biologiques inspirés par la nature : Etude de l'évolution des propriétés physiques de sable bio-cimenté*. Mémoire Master, Université Mohamed khider –Biskra, Faculté des Sciences et de la Technologie, Département de Génie civil et d'Hydraulique, P16.
- Camille, M. (1973).** La dissolution du carbonate de calcium. *Bulletin de la Société géographique de Liège*, N° 9, 9^e année, décembre 1973, pp. 55-87.
- Canakci, H., Sidik, W., & Halil Kilic, I. (2015).** Effect of bacterial calcium carbonate precipitation on compressibility and shear strength of organic soil. *Soils and Foundations*, 55(5), 1211-1221. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2015.09.020><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2015.09.020>

- Castro-Alonso, M.J. et al. (2019).** Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. *Journal Frontiers in Materials*. 10 June 2019, DOI: 10.3389/fmats.2019.00126.
- Cheng, L., Cord-Ruwisch, R., & Shahin, M. A. (2013).** Cementation of sand soil by microbially induced calcite precipitation at various degrees of saturation. *Canadian Geotechnical Journal*, 50(1), 81-90. <https://doi.org/10.1139/cgj-2012-0023><https://doi.org/10.1139/cgj-2012-0023>
- Cheng, L., Shahin, M. A., & Cord-Ruwisch, R. (2014). Bio-cementation of sandy soil using microbially induced carbonate precipitation for marine environments. *Geotechnique*, 64(12), 1010–1013. <https://doi.org/10.1680/geot.14.T.025>
- Choi, S. G., Chang, I., Lee, M., Lee, J. H., Han, J. T., & Kwon, T. H. (2020).** Review on geotechnical engineering properties of sands treated by microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and biopolymers. *Construction and Building Materials*, 246, 118415. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118415><https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118415>
- Choi, S. G., Chu, J., Brown, R. C., Wang, K., & Wen, Z. (2017).** Sustainable Biocement Production via Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation: Use of Limestone and Acetic Acid Derived from Pyrolysis of Lignocellulosic Biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(6), 5183-5190. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00521><https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00521>
- Cuaxinque-Flores, G., Aguirre-Noyola, J. L., Hernández-Flores, G., Martínez-Romero, E., Romero-Ramírez, Y., & Talavera-Mendoza, O. (2020).** Bioimmobilization of toxic metals by precipitation of carbonates using *Sporosarcinaluteola*: An in vitro study and application to sulfide-bearing tailings. *Science of The Total Environment*, 724, 138124. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138124><https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138124>
- DeJong, J. T., Fritzes, M. B., & Nüsslein, K. (2006).** Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 132(11), 1381-1392. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)1090-0241\(2006\)132:11\(1381\)](https://doi.org/10.1061/(asce)1090-0241(2006)132:11(1381))[https://doi.org/10.1061/\(asce\)1090-0241\(2006\)132:11\(1381\)](https://doi.org/10.1061/(asce)1090-0241(2006)132:11(1381))
- Delarras, C. (2014).** *Pratique en microbiologie de laboratoire - recherche de bactéries et de levures-moisissures*. TECHNIQUE & DOC.
- Dilrukshi, R., Nakashima, K., & Kawasaki, S. (2018).** Soil improvement using plant-derived urease-induced calcium carbonate precipitation. *Soils and Foundations*, 58(4), 894-910. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.04.003><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.04.003>

Références bibliographiques

- Donovan MujahAnak Bernard Lium. (2019).** *Biologically Induced Cementation for Soil Stabilisation*.Thèse Doctorat, Curtin University, Faculty of Science and Engineering, Department of Civil Engineering, P32-33.
- Dromigny, É. (2008).** *Bacillus cereus (Éditions Médicales internationales éd.)*. TECHNIQUE & DOC.
- Frédéric, M. (2014, 2 septembre).** Identification bactérienne par la coloration de GRAM. *biotechnologie*. <http://www.technobio.fr/article-16615932.html>.
- Ghosh, T., Bhaduri, S., Montemagno, C., Kumar, A. (2019).**Sporosarcinapasteurii can form nanoscale calcium carbonate crystals on cell surface. *Plos One*, January 30, 2019, DOI: 10.1371/journal.pone.0210339.
- Gowthaman, S., Mitsuyama, S., Nakashima, K., Komatsu, M., & Kawasaki, S. (2019).**Biogeotechnical approach for slope soil stabilization using locally isolated bacteria and inexpensive low-grade chemicals : A feasibility study on Hokkaido expressway soil, Japan. *Soils and Foundations*, 59(2), 484-499. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.12.010><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2018.12.010>
- Grandjean, M. (2013).** *Étude de la réactivité et de l'hydratation des particules obtenues par carbonatation de saumures alcalines*, Thèse Doctorat. Université de Lorraine, Laboratoire Georessources UMR 7359, P24-25-26.
- Görge, S. (2020).** The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria, *Discover Materials*, 30 November 2020, doi:10.1007/s43939-020-00001-9.
- Hansal Nabila, (2015).***Isolement, Purification, Identification et l'étude des caractéristique biotechnologique de Leuconostocmesenteroides isolé à partir du lait cru de chèvre. Mémoire Master*, Université d'Oran Ahmed Ben Bella, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie, P55.
- HADBI.M.,DJOUDI .,O .(2021).**Isolement et identification des bactéries précipitant la calcite (caco₃).
- Irfan, M., Hossain, S., Khalid, H., Sadaf, F., Al-Thawadi, S., Alshater, A., Hossain, M., &Razzak, S. (2019).** Optimization of bio-cement production from cement kiln dust using microalgae.*BiotechnologyReports*,23, e00356. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00356><https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00356>
- Ivanov, V., Stabnikov, V., Stabnikova, O., & Ahmed, Z. (2020).**Biocementation technology for construction of artificial oasis in sandy desert. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*,32(8),491-494. <https://doi.org/10.1016/j.jksues.2019.07.003><https://doi.org/10.1016/j.jksues.2019.07.003>

- Jiang, N. J., & Soga, K. (2019).** Erosional behavior of gravel-sand mixtures stabilized by microbially induced calcite precipitation (MICP). *Soils and Foundations*, 59(3), 699-709. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2019.02.003><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2019.02.003>
- John L. Wray., Farrington, D. (1957).** *Precipitation Of Calcite and Aragonite. Journal of the American Chemical Society.* Contribution Du Département De Chimie, Université De Wisconsin, Vol 79, P2031-2034.
- Kalantary, F., & Kahani, M. (2015).** Evaluation of the Ability to Control Biological Precipitation to Improve Sandy Soils. *Procedia Earth and Planetary Science*, 15, 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.08.067><https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.08.067>
- Krauss, C. (2009).** *Couches Polycristallines Orientées D'aragonite Biomimétique, Synthétisées Par Voie Electrochimique.* Mémoire Doctorat. L'université de CAEN, Basse-Normandie, P11.
- Kim, G., Kim, J., & Youn, H. (2018).** Effect of temperature, pH, and reaction duration on microbially induced calcite precipitation. *Applied Sciences*, 8(8), 1277. <https://doi.org/10.3390/app8081277>
- Krishnapriya, S., Venkatesh Babu, D., & G., P. A. (2015).** Isolation and identification of bacteria to improve the strength of concrete. *Microbiological Research*, 174, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.009><https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.009>
- Landa-Marbán, D., Tveit, S., Kumar, K., & Gasda, S. (2021).** Practical approaches to study microbially induced calcite precipitation at the field scale. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 106, 103256. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2021.103256><https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2021.103256>
- Lavallée, J. (2008).** *Microscope et objectif à immersion.* <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=60781>.
- Lin, H., Suleiman, M. T., & Brown, D. G. (2020).** Investigation of pore-scale CaCO₃ distributions and their effects on stiffness and permeability of sands treated by microbially induced carbonate precipitation (MICP). *Soils and Foundations*, 60(4), 944-961. <https://doi.org/10.1016/j.sandf.2020.07.003><https://doi.org/10.1016/j.sandf.2020.07.003>
- Liu, S., Du, K., Huang, W., Wen, K., Amini, F., & Li, L. (2021).** Improvement of erosion-resistance of bio-bricks through fiber and multiple MICP treatments. *Construction and Building Materials*, 271, 121573. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121573><https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121573>
- Luhar, S., Gourav, S. (2015).** A Review Paper on Self Healing Concrete. *Journal of Civil Engineering Research* 2015, 5(3): 53-58, DOI: 10.5923/j.jce.20150503.01.

Références bibliographiques

- Mackevičius, R., Sližytė, D., & Zhilkina, T. (2017).** Influence of Calcite Particles on Mechanical Properties of Grouted Sandy Soil. *Procedia Engineering*, 172, 681-684. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.02.080><https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.02.080>
- Maleki, S. et al. (2015).** Calcium Carbonate Nanoparticles; Potential in Bone and Tooth Disorders. *Pharmaceutical Sciences*, (March 2015), 20(4), 175-182.
- Manzur, T., Shams Huq, R., Hasan Efaz, I., Afroz, S., Rahman, F., & Hossain, K. (2019).** Performance enhancement of brick aggregate concrete using microbiologically induced calcite precipitation. *Case Studies in Construction Materials*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.cscm.2019.e00248><https://doi.org/10.1016/j.cscm.2019.e00248>
- Kim, G., Kim, J., & Youn, H. (2018). Effect of temperature, pH, and reaction duration on microbially induced calcite precipitation. *Applied Sciences*, 8(8), 1277. <https://doi.org/10.3390/app8081277>
- Marín, S., Cabestrero, O., Demergasso, C., Olivares, S., Zetola, V., & Vera, M. (2021).** An indigenous bacterium with enhanced performance of microbially induced Ca-carbonate biomineralization under extreme alkaline conditions for concrete and soil-improvement industries. *Acta Biomaterialia*, 120, 304-317. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.016><https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.016>
- Marvasi, M., Mastrome, G., Perito, B. (2020).** Bacterial Calcium Carbonate Mineralization in situ Strategies for Conservation of Stone Artworks: From Cell Components to Microbial Community. *Journal Frontiers in Microbiology*, 30 June 2020, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01386. **Les métaux lourds – la synthèse de l'ASEF – Association Santé Environnement France. (2017, 6 juin).** *Asef-asso.fr*. <https://www.asef-asso.fr/production/les-metaux-lourds-la-synthese-delasef/>
- Microbially induced calcite precipitation using Bacillus velezensis with guar gum. (2020).** *PubMed Central (PMC)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7423064/><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7423064/>
- Medevielle, M. (2019).** *Utilisation de la bioprécipitation de carbonates de calcium pour améliorer la qualité de granulats de béton recyclé*. Thèse Doctorat. L'université Bretagne Loire, P45-46-47
- Mobley, H. L., Island, M. D., & Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological Reviews*, 59(3), 451–480. <https://doi.org/10.1128/MMBR.59.3.451-480.1995>

Références bibliographiques

- Mugwar, A. J., & Harbottle, M. J. (2016).** Toxicity effects on metal sequestration by microbially-induced carbonate precipitation. *Journal of Hazardous Materials*, 314, 237, 248.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.039>
- Mujah, D., Shahin, M. A., & Cheng, L. (2016).** State-of-the-Art Review of Biocementation by Microbially Induced Calcite Precipitation (MICP) for Soil Stabilization. *Geomicrobiology Journal*, 34(6), 524-537. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1225866>.
- Nething, C., Smirnova, M., Gröning, J. A., Haase, W., Stolz, A., & Sobek, W. (2020).** A method for 3D printing bio-cemented spatial structures using sand and urease active calcium carbonate powder. *Materials & Design*, 195, 109032.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109032><https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.109032>
- Noor, E. S. A. T., Khadeja, T. M. E., & Abdelraouf, A. E. (2021).** Isolation, identification and growth conditions of calcite producing bacteria from urea-rich soil. *African Journal of Microbiology Research*, 15(1), 37-46.
<https://doi.org/10.5897/ajmr2020.9445><https://doi.org/10.5897/ajmr2020.9445>
- Papageorgiou, A., Azzi, E. S., Enell, A., & Sundberg, C. (2021).** Biochar produced from wood waste for soil remediation in Sweden : Carbon sequestration and other environmental impacts. *Science of The Total Environment*, 776, 145953.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145953><https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145953>
- Perito, B., Marvasi, M., Mastromei, M. (2020).** Bacterial mineralization of calcium carbonate for conservation of stone artworks. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 949(2020) 012090, DOI:10.1088/1757899X/949/1/012090.
- Portugal, C. R. M. E., Fonyo, C., Machado, C. C., Meganck, R., & Jarvis, T. (2020).** Microbiologically Induced Calcite Precipitation biocementation, green alternative for roads – is this the breakthrough ? A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 262, 121372.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121372><https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121372>
- Rajasekar, A., Wilkinson, S., & Moy, C. K. (2021).** MICP as a potential sustainable technique to treat or entrap contaminants in the natural environment : A review. *Environmental Science and Ecotechnology*, 6, 100096.
<https://doi.org/10.1016/j.ese.2021.100096><https://doi.org/10.1016/j.ese.2021.100096>
- Rajasekar, A., K.S. Moy, C., Wilkinson, S. (2017).** MICP and Advances towards Eco-Friendly and Economical Applications. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 78 (2017) 012016, DOI :10.1088/1755-1315/78/1/012016.

Références bibliographiques

- R. Hadda, S. (2018).** *Etude des méthodes d'évaluation et d'inhibition du pouvoir incrustant des eaux dures*. Thèse doctorat. Université des frères mentouri, Faculté des sciences exactes, Département de chimie, P21.
- Satyanarayana, T., Johri, B. N., & Prakash, A. (2012).** Microorganisms in Environmental Management : Microbes and Environment (2012e éd.). *Springer*. Chapitre 24 : Microbial Concrete a Wonder Metabolic, P550.
- Sharma, A., & R., R. (2016).** Study on effect of Microbial Induced Calcite Precipitates on strength of fine grained soils. *Perspectives in Science*, 8, 198-202. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2016.03.017><https://doi.org/10.1016/j.pisc.2016.03.017>
- Soon, N. W., Lee, L. M., Khun, T. C., & Ling, H. S. (2014).** Factors Affecting Improvement in Engineering Properties of Residual Soil through Microbial Induced Calcite Precipitation. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 140(5), 04014006. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)gt.1943https://doi.org/10.1061/\(asce\)gt.19435606.00010895606.0001089](https://doi.org/10.1061/(asce)gt.1943https://doi.org/10.1061/(asce)gt.19435606.00010895606.0001089)
- Stefani Petrova Botusharova. (2017).** Self-Healing Geotechnical Structures Via Microbial Action. Thèse Doctorat, Cardiff university, *Cardiff School of Engineering*, P28.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., & Bang, S. S. (1999).** Microbiological precipitation of CaCO₃. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563–1571. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00082-6)
- Sun, X., Miao, L., Wang, H., Wu, L., & Zhang, J. (2021).** Enzymatic Calcification to Solidify Desert Sands for Sandstorm Control. *Climate Risk Management*, 100323. <https://doi.org/10.1016/j.crm.2021.100323><https://doi.org/10.1016/j.crm.2021.100323>
- Tadier, S. (2009).** *Étude Des Propriétés Physico-Chimiques Et Biologiques De Ciments Biomédicaux A Base De Carbonate De Calcium : Apport Du Procédé De Co-Broyage*. Mémoire Doctorat. Université de Toulouse, P13.
- Tang, C.S. et al. (2020).** Factors affecting the performance of microbial-induced carbonate precipitation (MICP) treated soil: a review. *Environmental Earth Sciences*, 20 February 2020, DOI: 10.1007/s12665-020-8840-9.
- Teghidet, H. (2012).** *Étude De La Cristallisation Contrôlée De La Calcite Par Voie Electrochimique. Effet Des Ions Etrangers Au Système Calco-Carbonique Sur La Nucléation-Croissance De La Calcite*. Thèse Doctorat. Université Pierre et Marie Curie – Paris, P06-07-08.
- Tempêtes de sable et de poussière. (2020, 16 octobre).** Organisation météorologique mondiale. <https://public.wmo.int/fr/notremandat/domainesd%E2%80%99action/environnement/temp%C3%AAtes-de-sable-et-depoussi%C3%A8re>

Références bibliographiques

- Umar, M., Kassim, K. A., & Ping Chiet, K. T. (2016).** Biological process of soil improvement in civil engineering : A review. *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*, 8(5), 767-774. <https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2016.02.004><https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2016.02.004>
- Villeneuve, M., Lavallée, J. (2008).** Ensemencement par épuisement, <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=60799>.
- Wang, Z. et al. (2021).** Isolation of biosynthetic crystals by microbially induced calcium carbonate precipitation and their utilization for fluoride removal from groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 15 March 2021, Volume 406.
- Whiffin, V., Van Paassen, L., Harkes, M. (2007).** Microbial Carbonate Precipitation as a Soil Improvement Technique. *Geomicrobiology Journal*, 24 :5, 417-423, DOI :10.1080/01490450701436505.
- Worrell, E., Price, L., Martin, N., Hendriks, C., & Meida, L. O. (2001).**
- CARBON DIOXIDE EMISSIONS FROM THE GLOBAL CEMENT INDUSTRY. *Annual Review of Energy and the Environment*, 26(1), 303-329. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.26.1.303><https://doi.org/10.1146/annurev.energy.26.1.303>
- Xiaojun, D., Qing, H., Lijuan, H., Xin, J., Zongding, L. (2008).** Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *International biodeterioration & biodegradation*, P62:257-262.
- Zaghloul, E. H., Ibrahim, H. A., & El-Badan, D. E. S. (2021).** Production of biocement with marine bacteria ; *Staphylococcus epidermidis* EDH to enhance clay water retention capacity. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 47(1), 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.005><https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.005>
- Zhang, Z. J., Tong, K. W., Hu, L., Yu, Q., & Wu, L. L. (2020).** Experimental study on solidification of tailings by MICP under the regulation of organic matrix. *Construction and Building Materials*, 265, 120303. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.120303><https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.120303>
- Zhou, J., Laumann, S., & Heimovaara, T. (2019).** Applying aluminum-organic matter precipitates to reduce soil permeability in-situ: A field and modeling study. *Science of The Total Environment*, 662, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.109><https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.109>

Annexe

Annexe

Annexe

Composition des principaux milieux de culture utilisés	Quantité g/L
Bouillon Nutritif Glucose-Urée-Calcium (BNGUC)	
Peptone.....	10
Extrait de levure	5
Glucose.....	5
Nacl.....	5
Urée.....	20
Cacl ₂	22.19
Gélose Nutritif Urée-Calcium (GNUC)	
Peptone.....	10
Extrait de levure.....	5
Nacl.....	5
Urée.....	20
Cacl ₂	22.19
Agar.....	20
Milieu Mannitol-Mobilité	
Peptone tryptique de viande.....	20
Agar.....	4
Mannitol.....	2
Rouge de phénol à 1%.....	4
PH.....	7.6-7.8
Bouillon Nutritif Urée-Calcium (BNUC)	
Urée.....	100
Peptone.....	10
Extrait de levure.....	5
Nacl.....	5
Cacl ₂	100
Bouillon Nutritif Urée (BNU)	
Urée.....	100
Peptone.....	10
Extrait de levure.....	5
Nacl.....	5
Bouillon Nutritif Calcium (BNC)	
Peptone.....	10
Extrait de levure.....	5
Nacl.....	5
Cacl ₂	100