

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITE AMAR THELIDJI LAGHOUAT



FACULTE DES SCIENCE

Département De Biologie

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie

Thème

Isolement et identification des bactéries

Précipitant la calcite (CaCO_3)

Présenté par :

M. Djoudi Omar et M. Hadbi Mostafa

Jury de soutenance

Nom et Prénom

M. SIFI Brahim

M. GASEM Mohamed Amine

M. KRANTAR kamel

qualité

Président

Examinateur

Encadreur

Soutenance 11 Juillet 2021

Dédicaces

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail réalisé grâce à l'aide
De Allah*

Tout puissant

A

*Celui qui m'a toujours encouragé et soutenu durant toutes mes années
D'études.*

*Merci, chère 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 matériel, pour ça tendresse,
Que dieu tout puissant garde mes parents et les protège*

A

Mes très chers frères : Aziz et Radzwane

A

*Mes très chères sœurs : Hasna et ses enfants, Ma sœur décédée, que
Dieu lui fasse miséricorde*

A

Mes proches

A

Mes chères amies, pour tous les

Moments que nous avons partartagons

DJOUDI Omar

Remerciements :

Je dois tout d'abord remercier <<Allah>>, le tout puissant, pour m'avoir donné le courage et la santé pour réaliser ce modeste travail.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et les collègues spécialement mon binôme Djoudi Omar qui m'ont apporté leur soutien moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Un grand merci également à mon encadreur Ms Krantar Kamal qui fut le premier à me faire découvrir le sujet qui a guidé notre mémoire.

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury qui me font le grand honneur d'évaluer notre travail.

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement tous les membres de ma famille pour leur soutien et leur encouragements.

Mostafa Hadbi

Isolement et identification des bactéries précipitant la calcite

Résumé : Dans le cadre d'isolement et l'identification des bactéries qui présentent une activité uréase élevée pour précipiter la calcite , nous avons isolé 24 isolats à partir des sol alcalins dans différentes régions de wilaya de Laghouat sur différents milieu du culture liquide et solide et les identifiés par des études morphologiques et des examens biochimiques qui nous a permis de sélectionner 4 souches de bacilles sp, après nous avons tester ces souches par test de conductivité et sur milieu BCP pour mise en évidence l'activité enzymatique uréase qui est essentielle à la précipitation de la calcite. Enfin en mesure le rendement de la calcite par ces souches.

Mots clés : Bactéries, Uréase, Calcite, BCP.

المخلص: في إطار العزل والتعرف على البكتيريا التي لها نشاط يوريزا عالي لترسيب الكالسيت، قمنا بعزل 24 عزلة من التربة القلوية في مناطق مختلفة من ولاية الأغواط على أوساط زراعية مختلفة سائلة وصلبة وتعرفنا عليها من خلال الدراسات المورفولوجية و الاختبارات البيوكيميائية التي سمحت لنا باختيار 4 سلالات من Bacillus sp، بعدها اختبرنا هذه السلالات الاربعة عن طريق اختبار الناقلية الكهربائية وعلى وسط زراعي BCP لمعرفة وجود نشاط لترسيب الكالسيت. وفي الاخير قمنا بقياس مردودية انتاج انزيمي لليوريزا الضرورية الكالسيت.

الكلمات مفتاحية: البكتيريا, اليوريزا, الكالسيت, BCP.

Abstract: In the context of isolation and identification of bacteria that exhibit high urease activity for precipitated calcite, we isolated 24 isolates from alkaline soils in different regions of wilaya of Laghouat on different liquid and solid culture medium and them. identified by morphological studies and biochemical examinations which allowed us to select 4 strains of bacillus SP, afterwards we tested these strains by conductivity test and on BCP medium to demonstrate the enzymatic urease activity which is essential for the precipitation of calcite. Finally measure the yield of calcite of these strains.

Keywords: Bacteria, Urease, Calcite, BCP.

Liste des Abréviations :

A : Aragonite (CaCO_3)

ACC : Amorphe de Carbonates de Calcium.

As : Arsenic.

Ba²⁺ : ion Barium

BCCM : Minéralisation Bactérienne du Carbonate de Calcium

BCP : Pourpre de bromocrésol

BNC : Bouillon Nutritif Calcium

BNGUC : Bouillon Nutritif Glucose-Urée-Calcium

BN : Bouillon Nutritif

BNU : Bouillon Nutritif Urée

C : Calcite (CaCO_3)

Ca²⁺ : ion Calcium

CaCl₂ : Chlorure de calcium

CaCO₃ : Carbonates de Calcium.

CC : Carbonates de Calcium.

Cd : cadmium

CE : Conductivité électrique

cm : centimètre

Co: Cobalt

CO₃²⁻ : ion Carbonate

CO(NH₂)₂ : Urée ou Carbamide

Cr : Chromium

Cu : Cuivre

DIC : Carbone Inorganique Dissous

Fe : Fer

Ech : Echantillon

EICP : Précipitation de Calcite Induite par Enzyme

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

g : gramme

g/l : gramme par litre

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

h : heur

H⁺ : Proton

HCO₃⁻ : ion bicarbonate

H₂CO₃ : Acide carbonique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

L : Liter

Log K_s : Logarithme de produit de solubilité

m : mètres

M : Molaire

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

Mg : Magnésium

mg/l : milligramme/litre

MICP : Précipitation Microbienne de Carbonate de Calcium Induite

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

mol /L : Mol par litre

Nacl : Chlorure de sodium

Ni : Nickel

OH⁻ : ions hydroxyde

Pb : Plomb

Pb²⁺ : ion Plomb

PH : Potentiel hydrogène

S/m : Siemens sur mètre

SP : Sporosarcina pasteurii

Sr²⁺ : ion Strontium

U/ml : Unité enzymatique par millilitre

UV : Ultraviolet

V : Vatérite (CaCO₃)

XRD : Diffraction des rayons X

Zn : zinc

% : Pourcentage

σ : Conductivité électrique

Å : Angstrom

C° : Degré Celsius.

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.	07
02	Microphotographie de la calcite.	08
03	Différentes macles de calcite.	09
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.	10
05	Aragonite de Rabotrath (Échantillon RAB-04, photographie au microscope électronique à balayage, mode électrons secondaires).	10
06	Cristaux de vatérite pris par MEB en lentilles, rose du sable et en fleur.	11
07	Les trois polymorphes de CaCO ₃ : calcite, aragonite et vatérite.	12
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 .	13
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 vatérite (V), les points triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C).	14
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⁺ .	17
11	Processus générant des environnements sursaturés essentiels à la précipitation de calcite	18

12	Résumé de la MICP biomédiée utilisant l'hydrolyse de l'urée.	21
13	Précipitations de calcite dues à l'uréolyse.	22
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.	24
15	Bio-cémentation des graines des sables.	30
16	Illustration simplifiée des carbonates métallique formé par (MICP).	33
17	Images SEM et profils XRD de bioprécipités produits par les souches de <i>S. luteola</i> UB3 et UB5 avec des métaux divalents (a–g) et un mélange de $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ (h).	34
18	Procédé de traitement EICP pour la solidification des sables éoliens.	36
19	Observation visuelle des motifs de surface : (a) zone 1 ; (b) zone 2 ; (c) zone 3 ; (d) zone 4.	36
20	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.	37
21	Diagramme schématique de la capture et du stockage du carbone.	38
22	Photos montrant différentes zones d'échantillonnage de wilaya Laghouat : (A) : Assafia, (G) Ghicha, (S) station de concassage de pierre (Aine Madii).	39
23	Les photos montrant des échantillons prélevés dans des sacs stériles, (a) : Échantillon prélevé dans la région Assafia, (b) : Échantillon prélevé dans la région Ghicha, (c) : Échantillon prélevé dans la région station de concassage de pierre (Aine Madii).	40
24	Les solution mère des soles prélevés.	41
25	Les erlenmeyers scellés par l'aluminium sur un plaque d'agitateur.	41
26	Schéma représente les procédures de la coloration à l'encre de chine.	44

27	Schéma de conservation de courte durée des bactéries purifiées.	46
28	Deux milieux de (GNU-BCP) à gauche acide à PH 5.2 de couleur jaune et à droite neutre à PH 6.8 de couleur pourpre.	47
29	Une photo illustrant le montage expérimental utilisé pour filtrer le dépôt de calcite.	49
30	(a) le dépôt de calcite séché à gauche, (b) Le dépôt de calcite sur la balance.	49
31	Résultats de l'isolement dans BNGUC.	50
32	Résultats de l'isolement dans GNGUC.	50
33	Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.	51
34	Résultats de coloration de Gram de quelques souches bactériennes.	53
35	Résultat de coloration de spore à l'encre de Chine, (A) Forme végétative, (B) Endospore.	54
36	Résultats de mobilité de mannitol des 24 isolats.	55
37	Les résultats de croissance des 4 souches dans le milieu GNUC au BCP à différents PH.	58
38	Les résultats Dosage quantitatif de l'uréase par mesure de conductivité électrique σ de 4 isolats.	59

Liste des Tableaux :

Tableau	Titer	Page
01	Produit de solubilité KS à 25C°.	06
02	La disponibilité générale des cristaux de carbonate de calcium.	06
03	Bactéries produisant de l'uréase à partir de diverses sources et quantité d'activité uréase et précipitation de calcite.	20
04	Un résumé des bactéries qui péages ou éliminent les métaux lourds.	32
05	Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.	51
06	Résultats de coloration de Gram, Coloration de spore et des tests biochimiques effectués sur 24 isolats bactériennes.	55
07	Les résultats de Test de croissance des 4 isolats sélectionnées dans différents milieux de culture.	57
08	Les résultats de Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ .	59
09	Bouillon nutritif avec urée et calcium (BNUC), Bouillon nutritif avec urée (BNU), Bouillon nutritif avec calcium (BNC).	60
10	Les résultats de test de formation de calcite (CaCO ₃).	60

Table des matières

Résumé

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction Générale 03

Partie 1 : Synthèse bibliographique

1. Généralité sur le carbonate de calcium (CaCO₃)..... 05

1.1 La calcite..... **07**

1.2 L'aragonite..... **09**

1.3 La vaterite..... **10**

1.4 La production de carbonates de calcium (CaCO₃)..... **12**

1.5 Paramètres impactant de la production de carbonates de calcium (CaCO₃)..... **12**

2. Précipitation de calcite (CaCO₃) par des bactéries..... 14

2.1 Précipitation bactérienne de calcite par processus (MICP) via l'hydrolyse de l'urée..... **17**

2.2 Facteurs affectant l'efficacité de la MICP via l'hydrolyse de l'urée..... **25**

2.2.1 Type de bactérie..... **25**

2.2.2 La température..... **25**

2.2.3 PH..... **26**

2.2.4 Concentration de réactifs..... **27**

2.2.5 Concentration de cellules bactériennes..... **28**

3. Utilisation de la bioprécipitation de calcite (CaCO₃)..... 28

3.1 Amélioration des Sols..... **28**

3.2 Construction de bio-cément..... **30**

3.3 Elimination des Métaux Lourds et Les Radionucléides..... **31**

3.4 Lutte contre désertification..... **35**

3.5 Séquestration du CO₂..... **37**

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Prélèvement des échantillons.....	39
2. Analyse microbiologique.....	40
2.1 Préparation de milieu de culture.....	40
2.2 Préparation des solutions mère.....	40
2.3 Isolement.....	41
2.3.1 Isolement dans un milieu liquide.....	41
2.3.2 Isolement dans un milieu solide.....	42
2.4 Purification.....	42
3. Identification.....	42
3.1 Etude morphologique.....	42
3.1.1 Examen macroscopique des cultures.....	42
3.1.2 Examen microscopique des bactéries.....	43
3.1.2.1 Coloration de Gram.....	43
3.1.2.2 Teste de spore « Coloration à l'encre de Chine ».....	43
3.2 Tests biochimiques.....	44
3.2.1 Test de catalase.....	44
3.2.2 Mannitol mobilité.....	44
3.2.3 Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée- calcium (GNUC).....	45
4. Conservation des isolats.....	45
4.1 Conservation courte durée.....	45
5. Test de croissance des 4 isolats sélectionnées dans différents milieux de culture.....	47
6. Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP).....	47
7. Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique.....	48
8. Les conditions de formation de calcite.....	48
9. Test de formation la calcite (CaCO₃).....	48

Partie 3 : Résultats et discussions

1. Isolement.....	50
2. Purification.....	50
3. Etude morphologique.....	51
3.1 Aspect macroscopique.....	51
3.2 Aspect microscopique.....	53
3.2.1 Coloration de Gram.....	53
3.2.2 Coloration de spore.....	53
4. Tests biochimiques.....	54
4.1 Test de catalase.....	54
4.2 Mannitol mobilité.....	54
4.3 Hydrolyse biochimique de l'urée.....	55
5. La croissance des 4 isolats sélectionnées dans différents milieux de culture....	56
6. Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP).....	57
7. Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ.....	58
8. Les condition de formation de calcite.....	59
9. Test de formation la calcite (CaCO₃).....	60
Conclusion.....	61

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Générale

La grande diversité et variabilité des métabolismes microbiennes ainsi que leur capacité à interagir avec un grand nombre d'éléments et minéraux ont ouvert de 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 la 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 biominéraux, la minéralisation biologiquement contrôlée consiste en des activités cellulaires qui dirigent spécifiquement la formation de minéraux, lesquelles les microorganismes contrôlent 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 est influencée par le processus de précipitation minérale passive laquelle la matière organique présente à la surface des cellules telles que les substances polymériques extracellulaires associées aux biofilms, 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 voies métaboliques, des cycles d'azote et du soufre, et par photosynthèse oxygénique/anoxygénique, mais la voie la plus utilisée est la voie uréolytique (dégradation de l'urée) en raison de 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 bactériennes (Krisharapriya et al., 2015).

En tant que microbiologistes et à partir de nos connaissances on a visé comme objective de rechercher et d'isoler et identifier les bactéries qui présentent une activité uréase élevée pour précipiter le carbonate de calcium sous forme de calcite.

Notre mémoire est organisé en 3 parties :

- Une introduction générale pose la problématique et définit les objectifs et le plan de travail.
- La première partie présente une revue bibliographique visant à mettre en évidence la calcite comme élément plus stable par rapport à l'aragonite et à la vaterite, et à comprendre les conditions de sa formation, et de son dépôt au sein d'un processus biologique, appelé (MICP). Avec présenter toutes les applications possibles de cette technique (MICP).
- Dans la deuxième partie, nous décrivons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude.
- En fin, dans La troisième partie on synthétise le travail par une discussion des résultats expérimentaux obtenus.

Partie 1:
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 vatérite et l'aragonite. La calcite est la forme la plus stable thermodynamiquement, tandis que la vatérite 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 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 vatérite, 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 le 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	Brečević 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 vatérite 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. Dans 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 accélérer 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 le 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)	Très commun	Très commun
Aragonite (A)	Très commun	Rare
Vatérite (V)	Rare	Très rares
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 cristalllographique 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**).

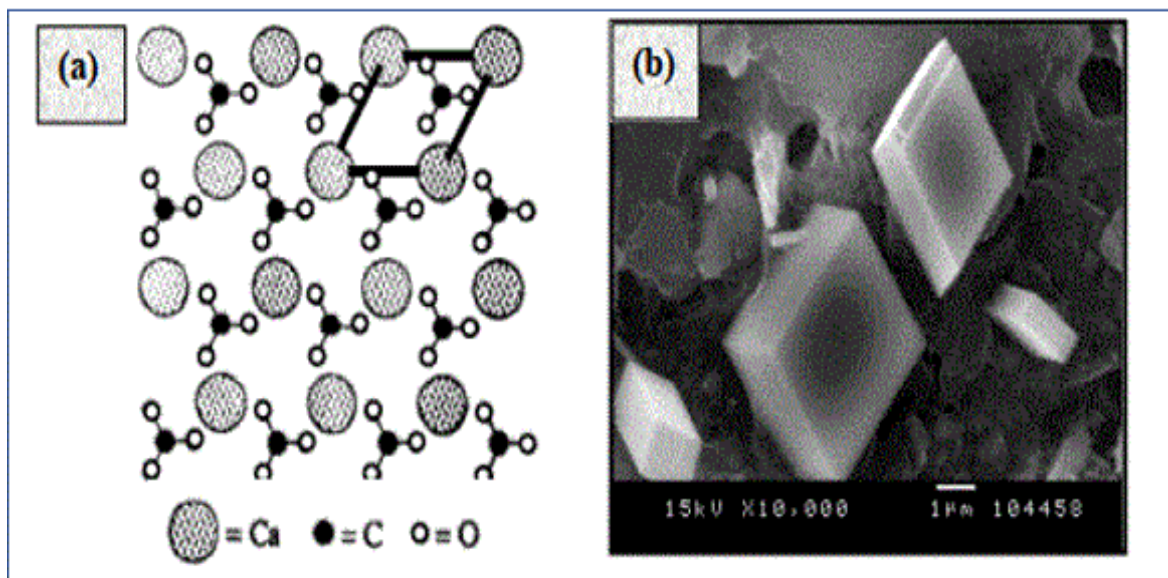


Figure 1 : (a) : Projection de la structure cristalllographique de la calcite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (b) : Photo MEB de la calcite (**Teghidet,**

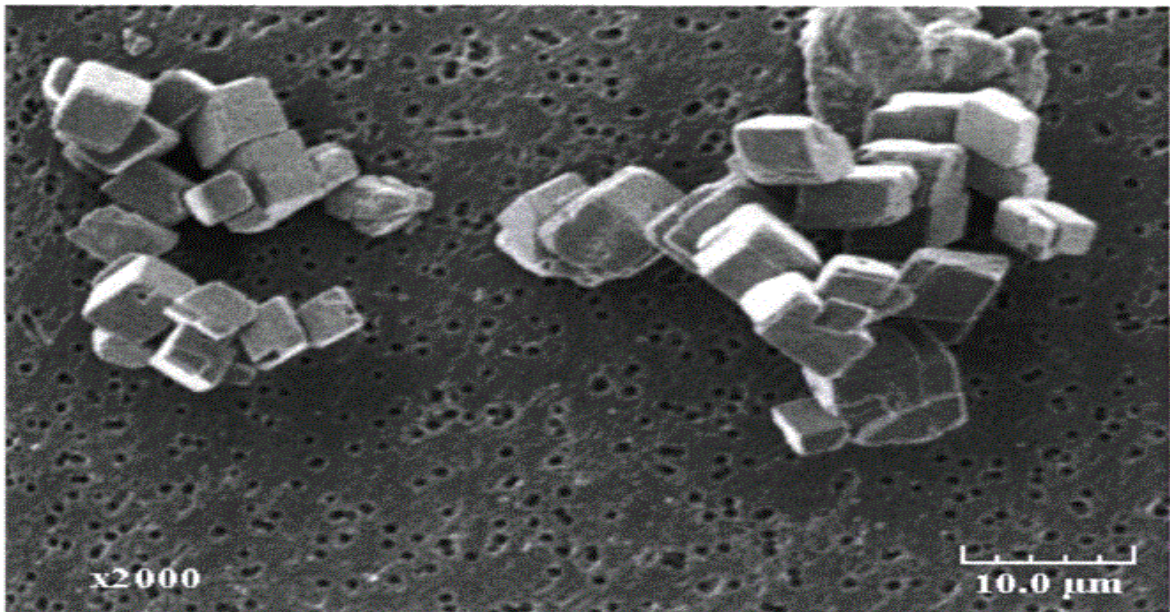


Figure 2 : Microphotographie de la calcite (Babou, 2010)

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).

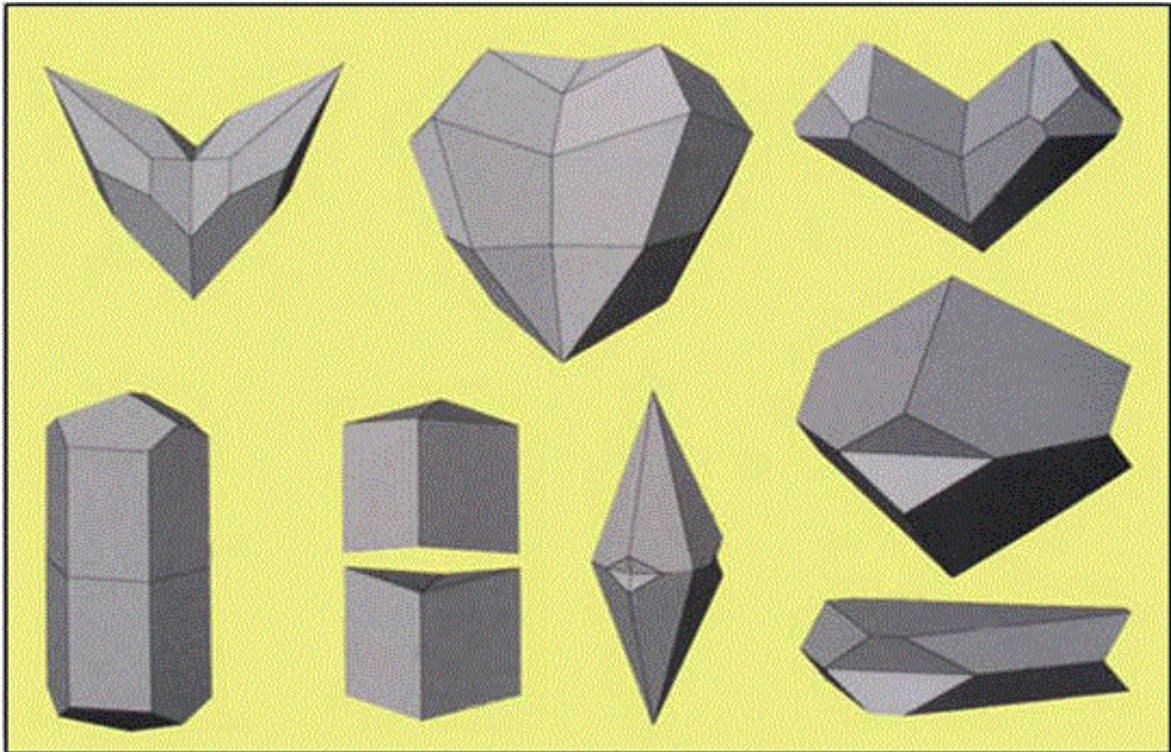


Figure 3 : Différentes macles de calcite (Teghidet, 2012).

1.2 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 coordinence 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).

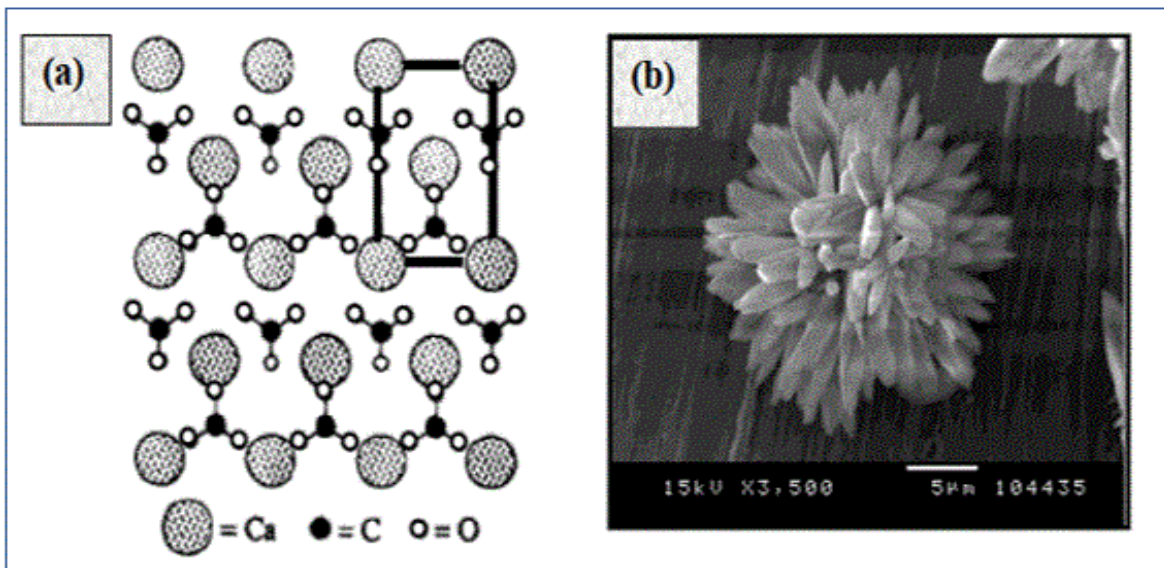


Figure 4 : (A) : Projection de la structure cristallographique de l'aragonite sur le plan de base (la maille élémentaire est représentée en gras), (B) : Photo MEB de l'aragonite (Teghidet, 2012).

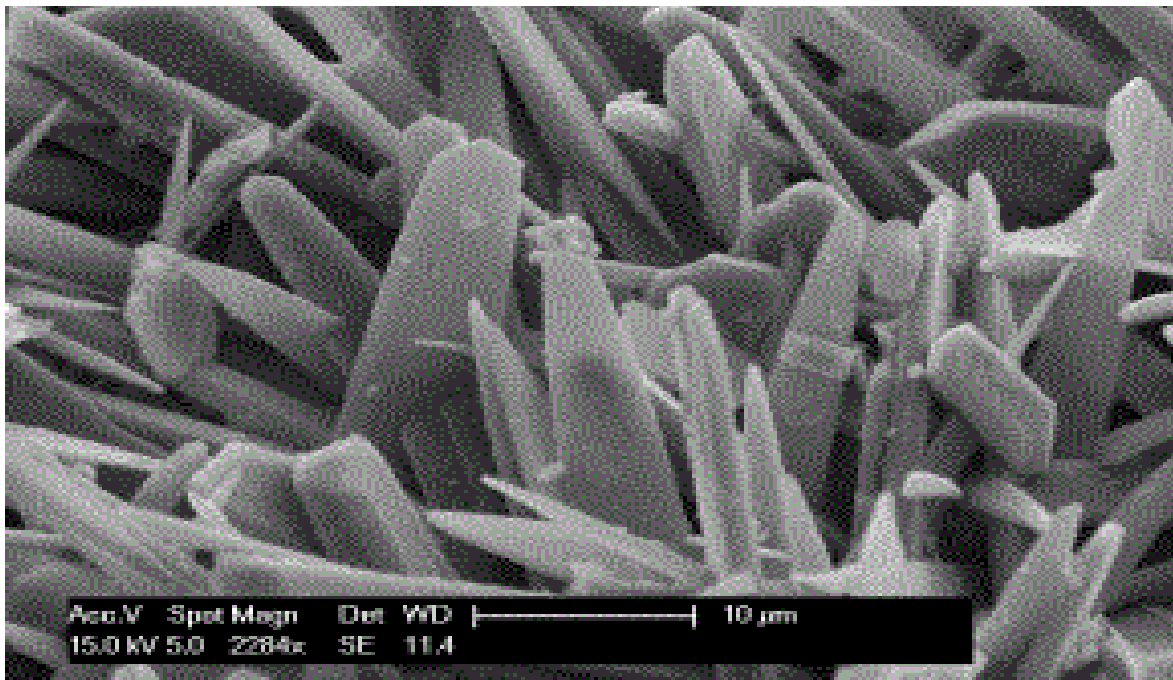


Figure 5 : Aragonite de Rabotrath (Échantillon RAB-04, photographie au microscope électronique à balayage, mode électrons secondaires) (Blondieau et al, 2016).

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 vaterite en aragonite est rapide (quelques heures en contact de l'eau) (**Figure 6**) (**Ras Hadda., 2018**).

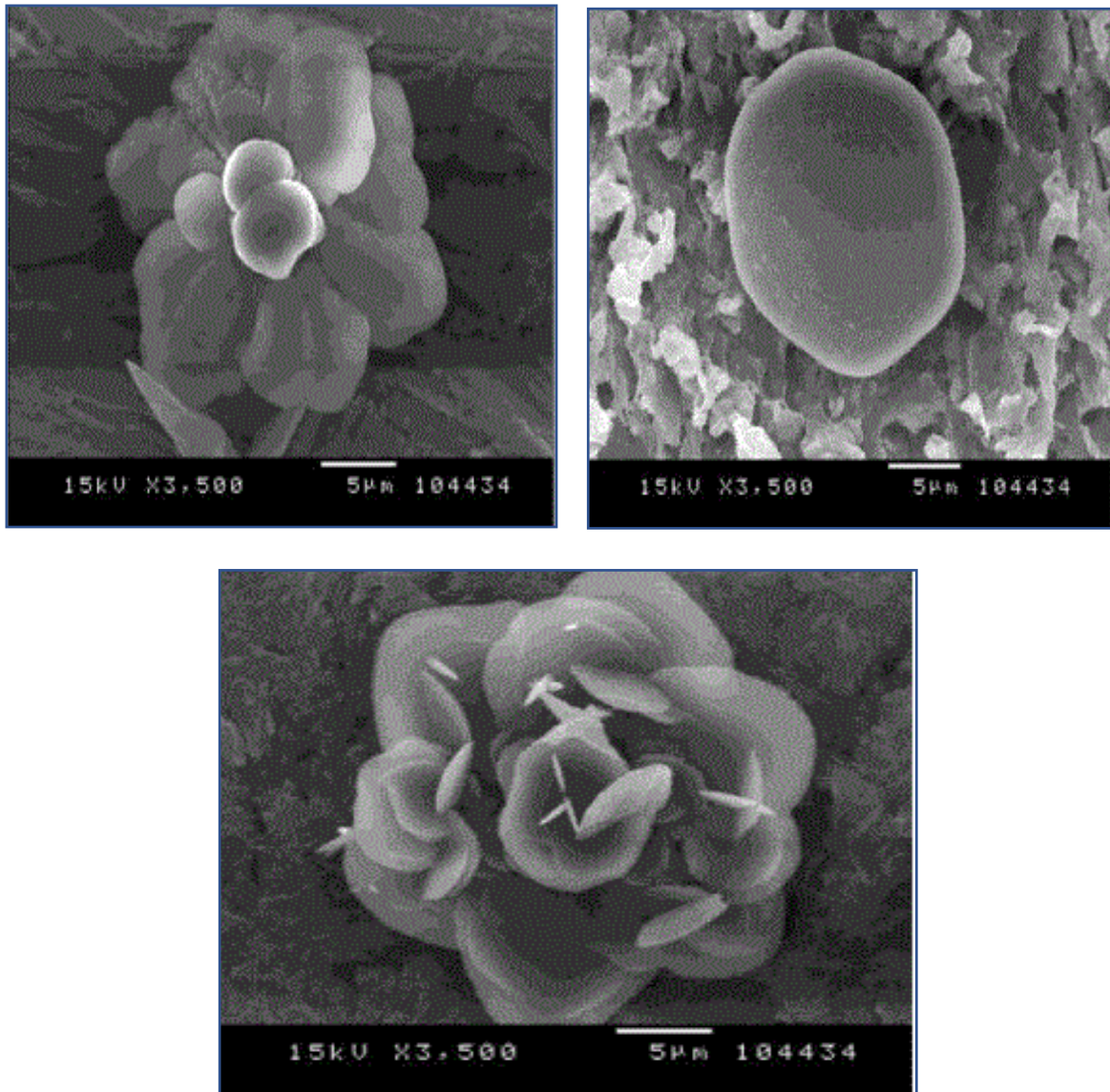


Figure 6 : Cristaux de vaterite pris par MEB en lentilles, rose du sable et en fleur (**Ras Hadda, 2018**).

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**) : $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{CaCO}_3$ (**Whiffin et al., 2007**).

Ainsi le CaCO₃ formés peuvent se présenter sous six polymorphes. Les plus fréquemment rencontrés sont (**Figure 7**) 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.

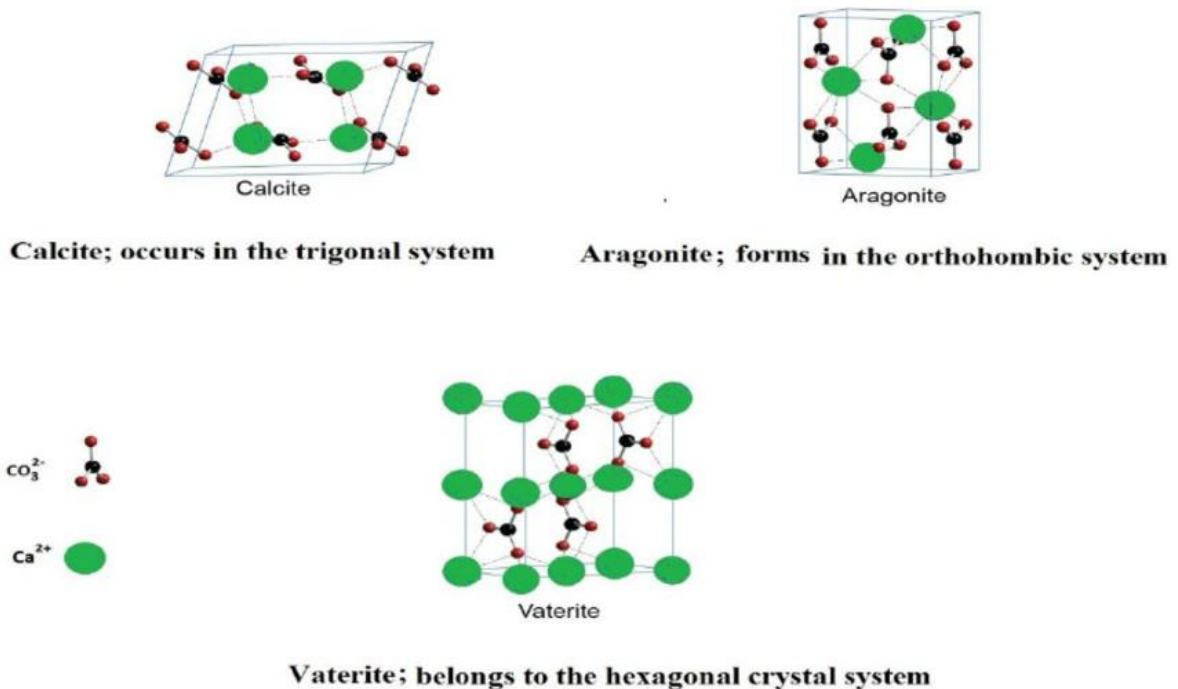


Figure 7 : les trois polymorphes de CaCO₃ : calcite, aragonite et vaterite (**Maleki et al, 2015**).

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 : $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-}$ (**Camille., 1973**)

1.5 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 suffisante 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

Prédominance acido-basique relatif aux carbonates, en-Dessous d'un pH de 10,3, les ions CO_3^{2-} sont minoritaires dans le milieu (**Figure 8**). Et la production de CaCO_3 serait donc favorisée à un pH supérieur à 11,3, pH à Partir duquel les ions CO_3^{2-} sont prédominants (**Medevielle, 2019**).

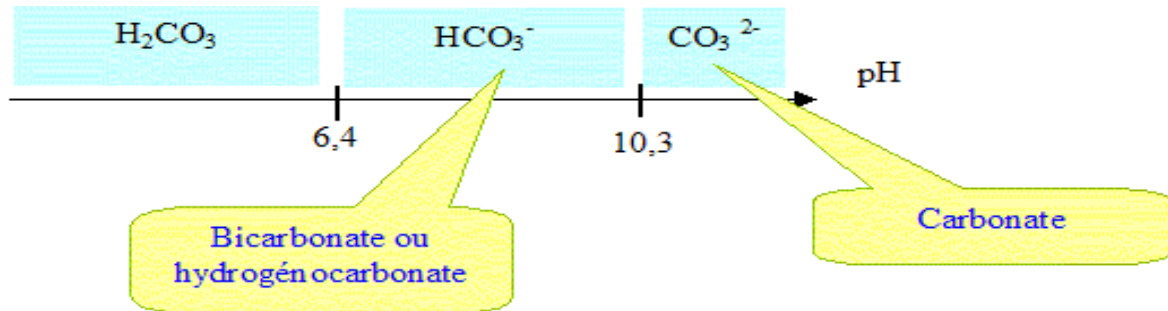


Figure 8: Diagramme de prédominance acido-basique relatif aux espèces H_2CO_3 , HCO_3^- et CO_3^{2-} . L'acide carbonique H_2CO_3 est le résultat d'hydratation du CO_2 dissous dans l'eau pure (**Équation 2**) $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ (burns2005) (**Photo Internet**).

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, on peut 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. À 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 (7°C) la vaterite est majoritaire et à température élevée (58°C) c'est l'aragonite qui prédomine (**Medevielle, 2019**).

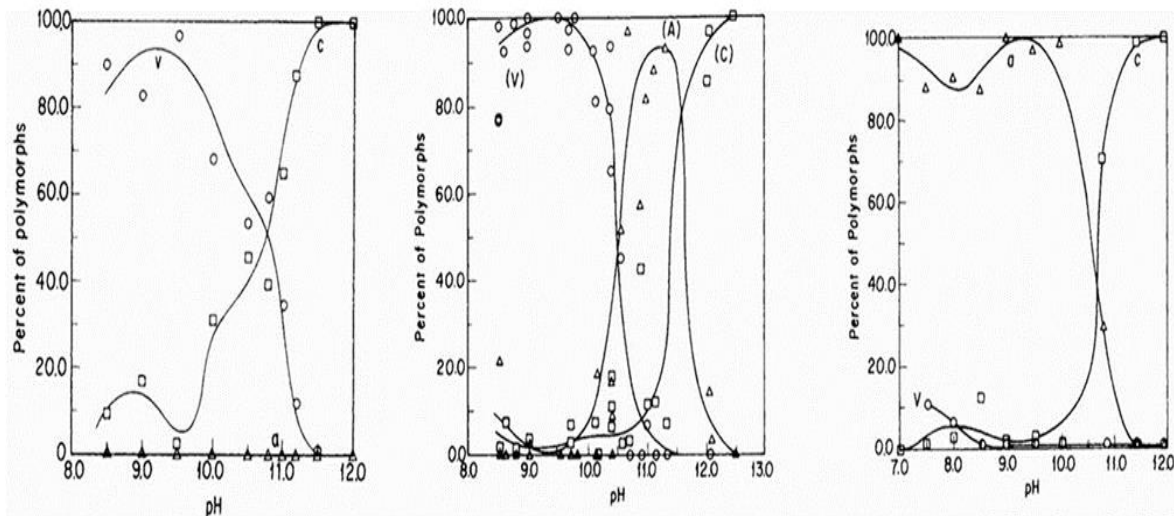


Figure 9 : Effets du pH sur les taux de production des polymorphes du CaCO₃ à 7°C (A), 24°C (B) et 58°C (C). Les points ronds correspondent aux résultats obtenus pour la vaterite (V), les points triangulaires, à ceux obtenus pour l'aragonite (A) et les points carrés à ceux obtenus pour la calcite (C) (Medevielle, 2019).

De plus un autre facteur important à prendre en compte est la présence d'autres Cations que Ca²⁺. Ainsi, on a 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 (CaCO₃) 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 , *Sporosarcina pasteurii* (SP), anciennement connue sous le nom de *Bacillus pasteurii*, 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 $[HCO_3^-]$ 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) (Görger et al, 2020).

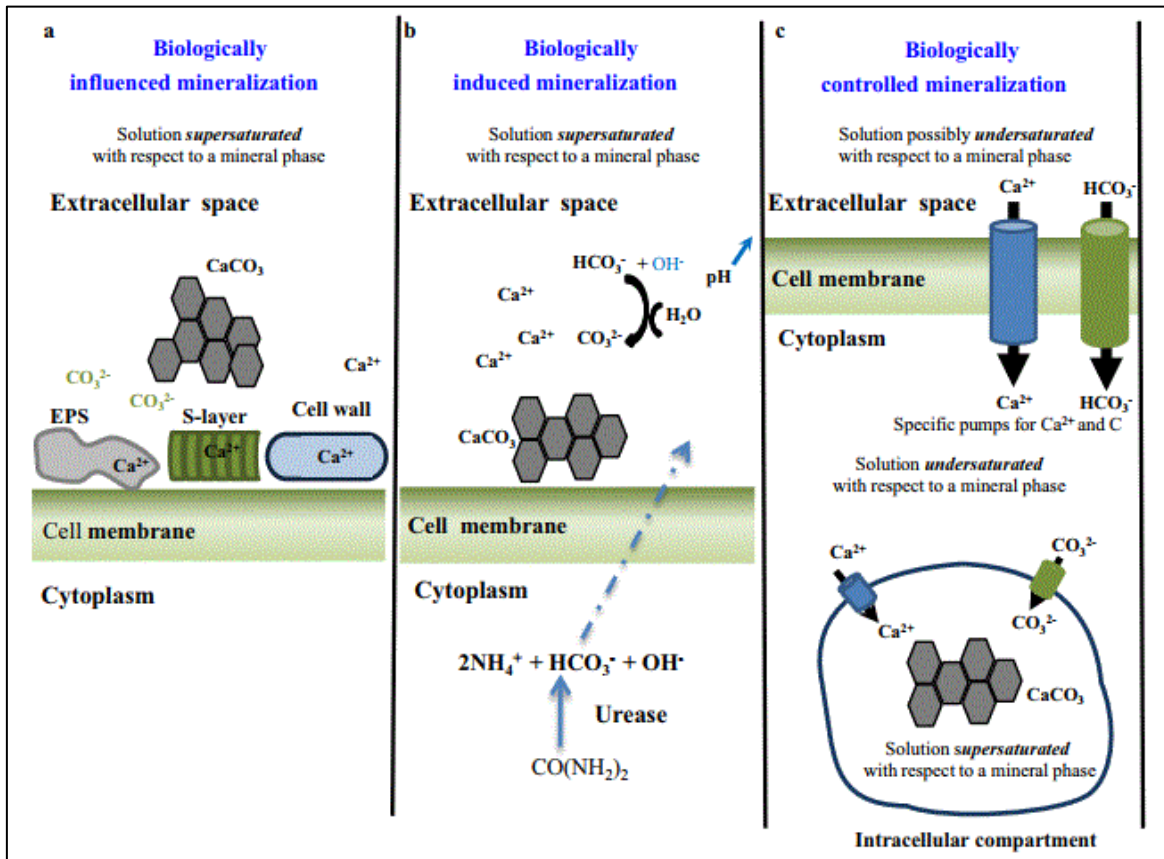


Figure 10 : Classification des processus de biominéralisation du CaCO₃ trouvés dans les bactéries : (a) une minéralisation influencée biologiquement ; (b) biologiquement minéralisation induite ; (c) minéralisation biologiquement contrôlée. Les hexagones gris représentent les précipités de CaCO₃. Les cations Ca²⁺ peuvent être remplacé par, par ex. autres éléments alcalino-terreux tels que Mg²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺ (Görger 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.

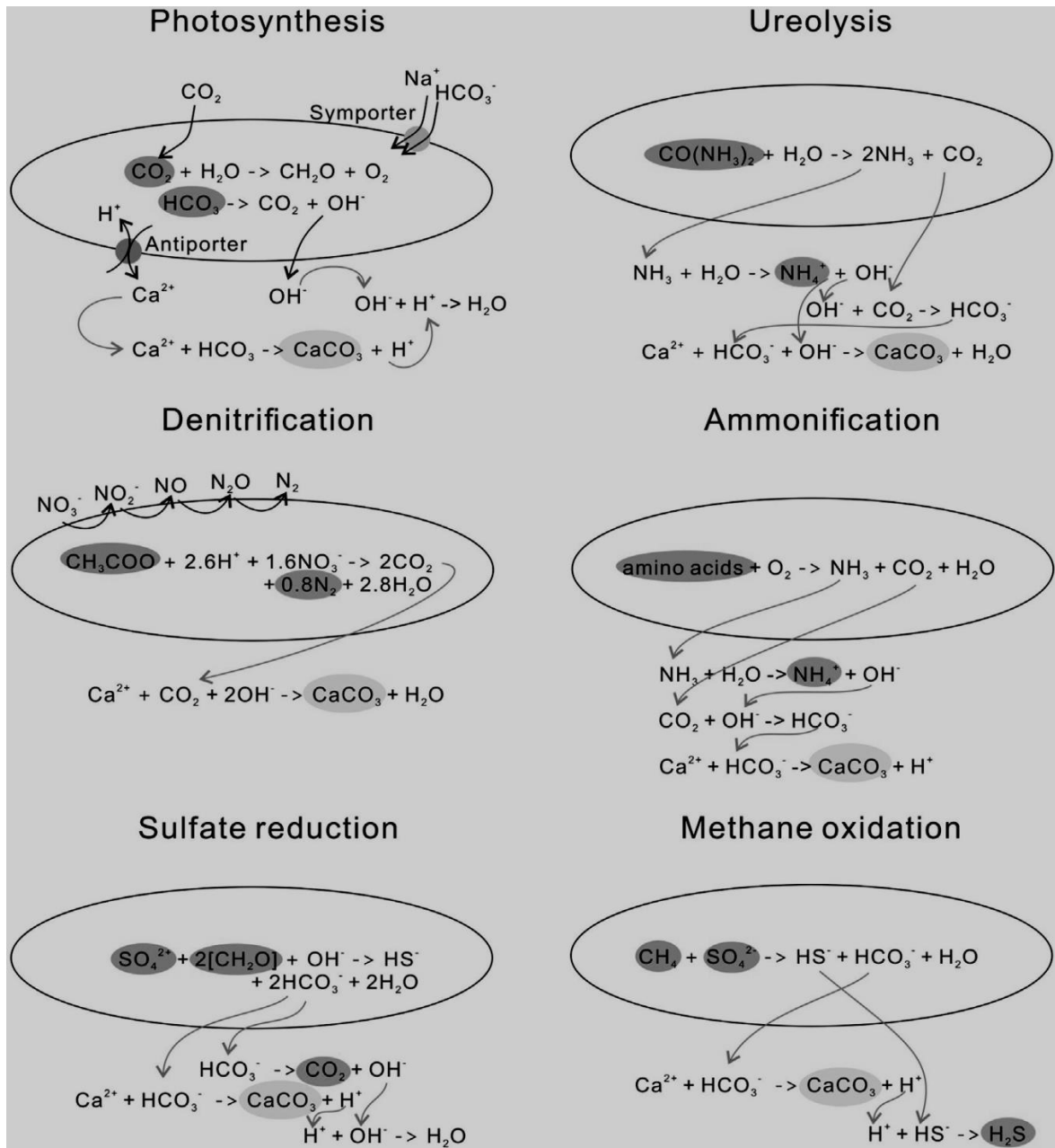


Figure 11 : Processus générant des environnements sursaturés essentiels à la précipitation de calcite (Rajasekar et al, 2017).

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 *Sporosarcina pasteurii* (SP), anciennement *Bacillus pasteurii*, 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 *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* 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>Sporosarcina pasteurii</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'*Achromatium oxaliferum* 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**).

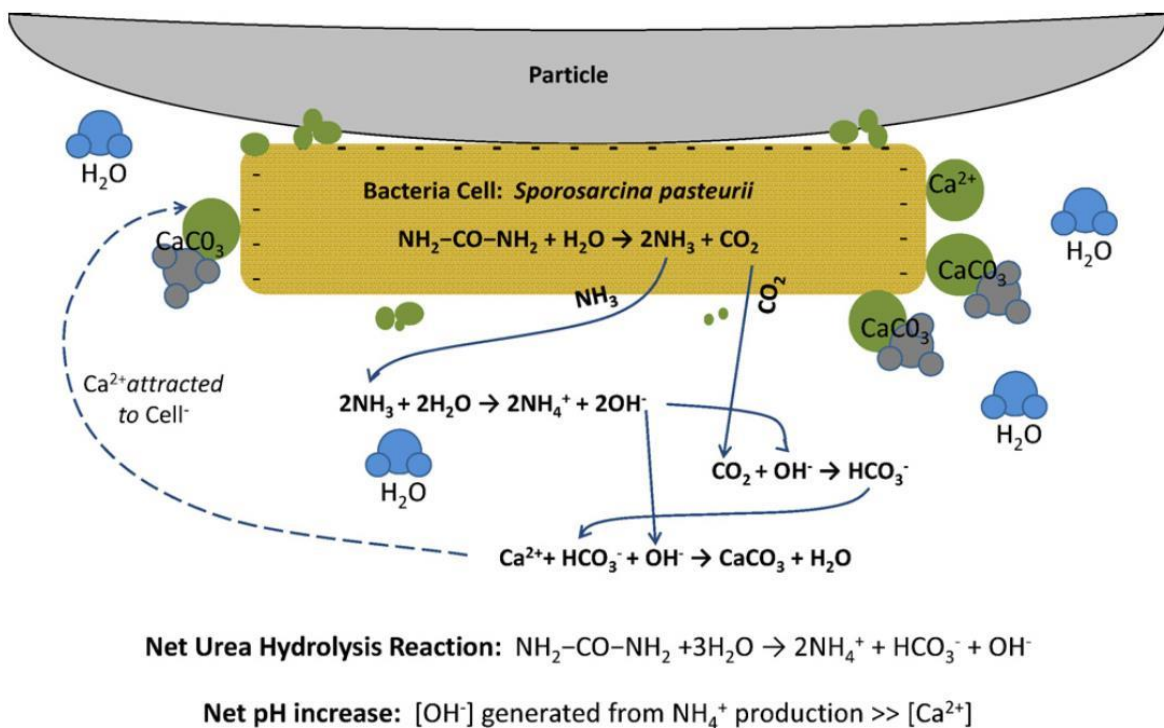


Figure 12 : Résumé de la MICP biomédiée utilisant l'hydrolyse de l'urée (**Ashraf et al 2017**).

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

Uréase

(1): $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3$ (Mujah et al., 2016).

(2): $\text{NH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{CO}_3$ (Anbu et al., 2016).

Spontanée

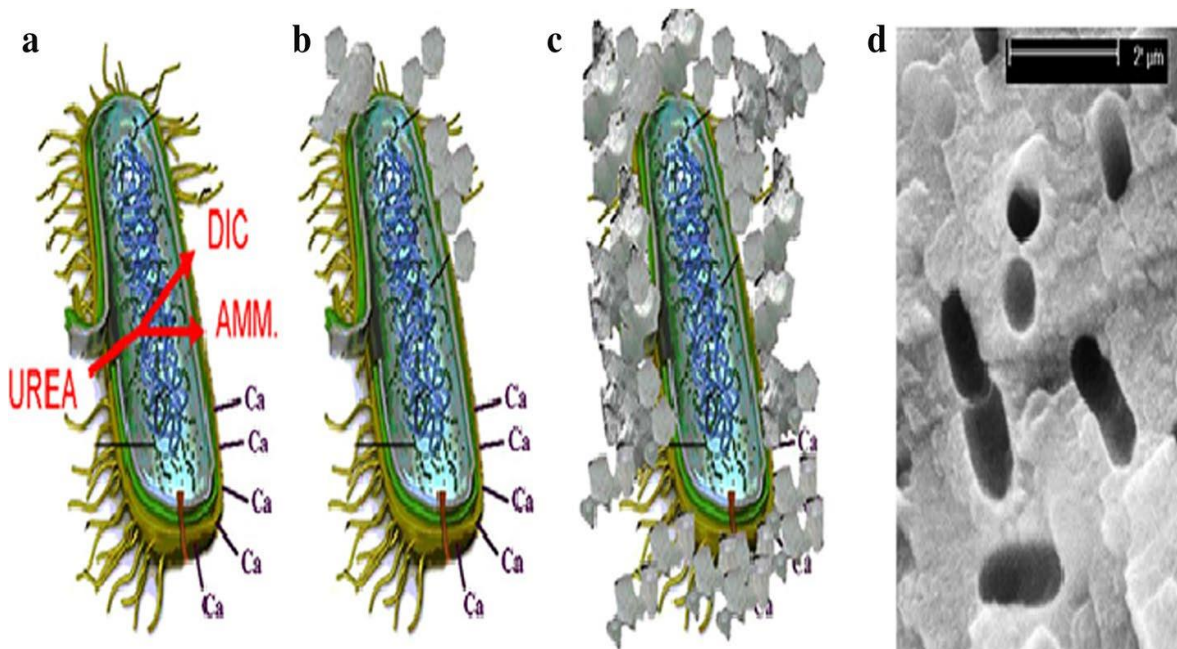


Figure 13 : Précipitations de calcite dues à l'uréolyse (Anbu et al, 2016).

(b) 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).

(3) : $2\text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 2\text{OH}^-$ (Luhar et Gourav., 2015).

(4): $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ (Satyanarayana et al., 2012).

(5) : $\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O}$ (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).

(6) : $\text{Cell} + \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Cell}^- \text{Ca}^{2+}$ (Wang et al, 2021).

(7) : $\text{Cell}^- \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^- + \text{OH}^- \rightarrow \text{Cell}^- \text{CaCO}_3 + \text{H}_2\text{O}$ (Wang et al, 2021).

(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).

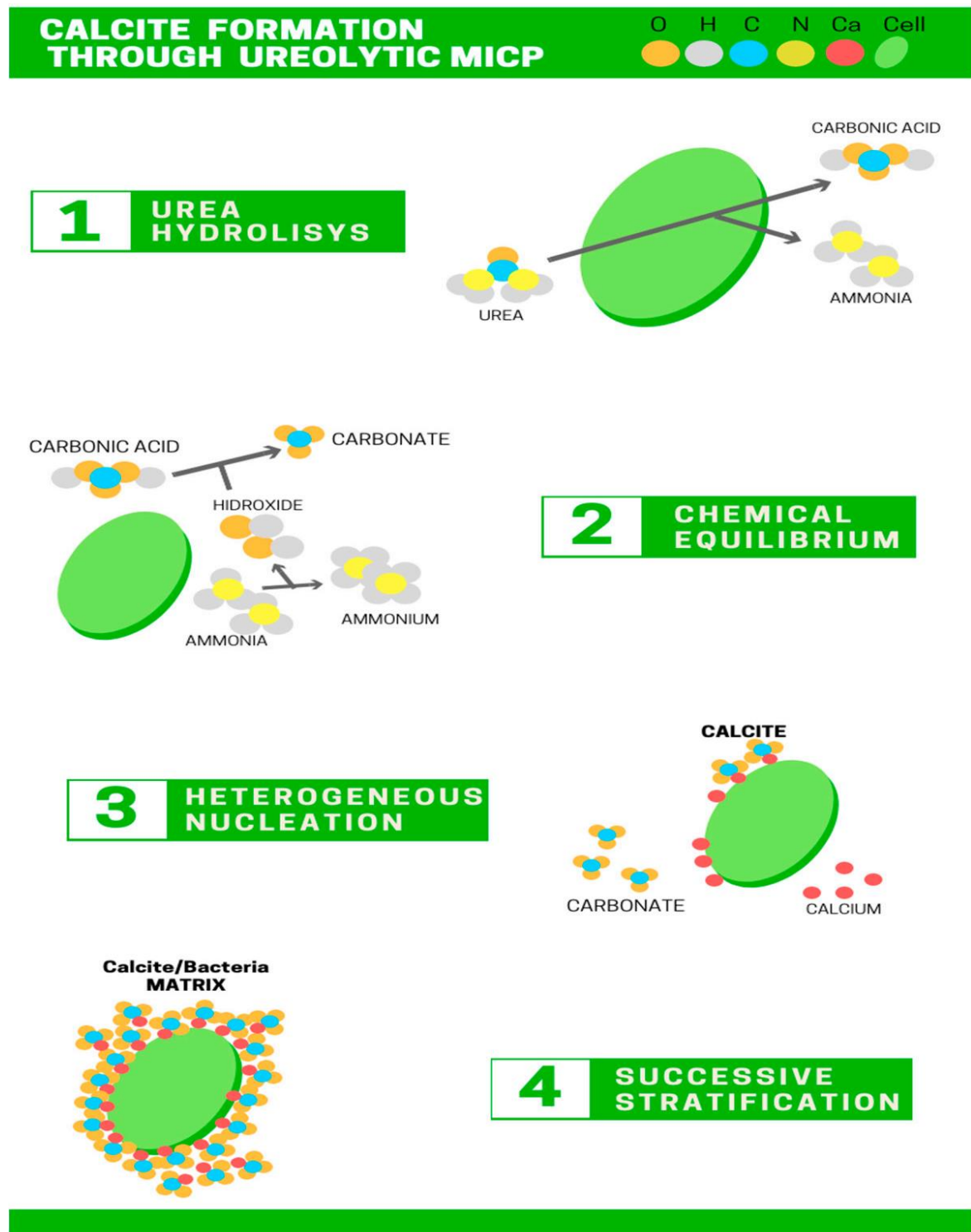


Figure 14 : Illustration schématique de la production de calcite par le procédé de précipitation microbienne de la calcite (MICP) : 1 - hydrolyse de l'urée ; 2 - équilibre chimique ; 3 - hétérogène, nucléation ; 4 - stratification successive (Torres-Aravena et al., 2018).

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 CaCO₃ sont affectées par divers facteurs environnementaux. En effet, de nombreux facteurs influencent l'activité de l'uréase et la précipitation du CaCO₃, 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 CaCO₃ 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 (CaCO₃) (**Tableau3**), notamment Le groupe Bacillus est un type courant de bactérie utilisé pour la production d'uréase et la précipitation du carbonate de calcium (CaCO₃). Par exemple, *B. megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. CR2 et *B. thuringiensis* et *Sporosarcina pasteurii* (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. megaterium* 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 *Sporosarcina pasteurii* qui avait une activité uréase et une précipitation de CaCO₃ plus élevées que la souche sauvage de *Sporosarcina pasteurii* 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 CaCO₃ 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-CaCl₂ (pH = 8, c [Ca²⁺] = 25,2 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 (NH₄⁺) contribue à la formation d'un environnement alcalin favorable à la précipitation du CaCO₃. 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 préférait 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. (2014b) 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 CaCO_3 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 CaCO_3 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 CaCO_3 car davantage de cellules bactériennes concentrées à l'intérieur de la culture et fonctionnent comme sites de nucléation pour la précipitation des cristaux de CaCO_3 . 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 CaCO_3 . DeJong et al. (2011) ont expliqué que les sites de nucléation pour la précipitation des cristaux de CaCO_3 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 Ca^{2+} et CO_3^{2-} pour former CaCO_3 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 (CaCO_3) :

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 principale du sol, Généralement dû à des interactions mécanique ou chimique avec l'écoulement du fluide (**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 jointoiment 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 précipitation 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**).

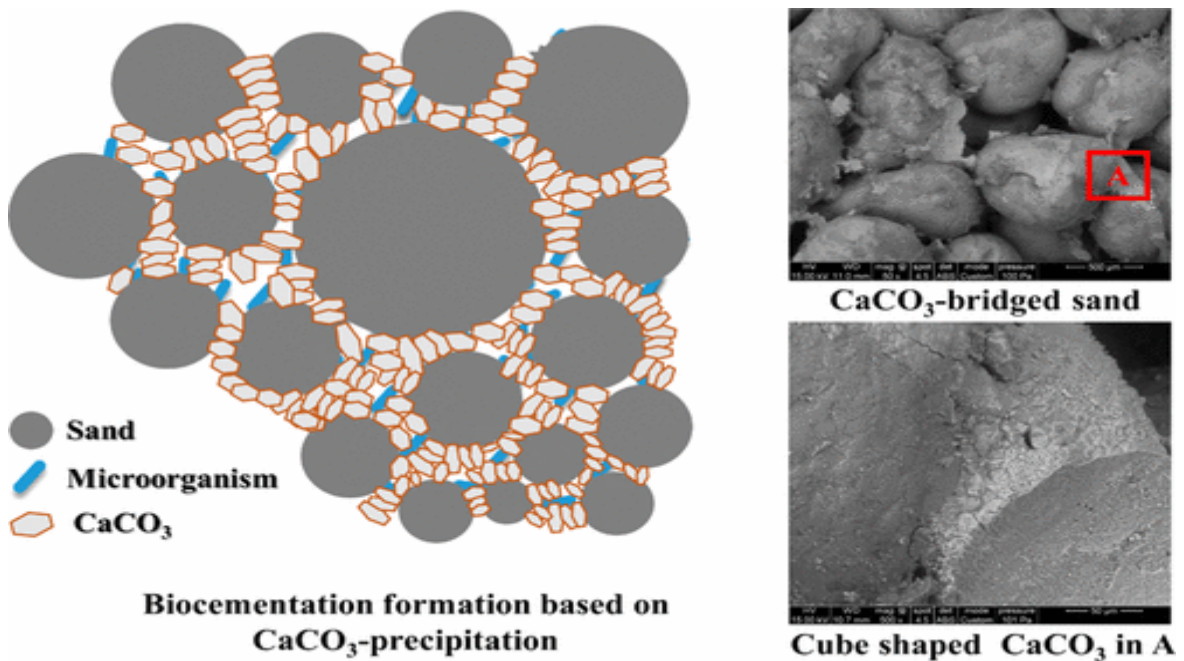


Figure 15 : Bio-cémentation des grains des sables.

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 colmater 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 induite dans le béton pendant le malaxage (**krishnapriya et al, 2015**).

2. Elimination 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**).

L'élimination des métaux lourds est l'un d'une grande importance en raison de leur toxicité et leur récalcitrance dans l'environnement, une grande variété des techniques, Physiques, chimique et biologiques ont été proposée pour éliminer les éléments toxiques dans l'environnement (**Uaxinque-Flores et al., 2020**).

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 à Les processus physico-chimiques (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 technologie de l'environnement traditionnelles et montré que les microorganismes urolétiques 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 formé.

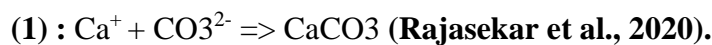


Tableau 4 : Un résumé des bactéries qui péages ou éliminent les métaux lourds (**Rajasekar et al., 2020**).

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)

Sporosarcina sp; <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 pumilu</i>	Chromium (Cr), Cuivre (Cu), and Zinc (Zn)
S.rhizophila	Plomb (Pb), Cadmium (Cd) and Zinc (Zn)
V.boronicumulans	

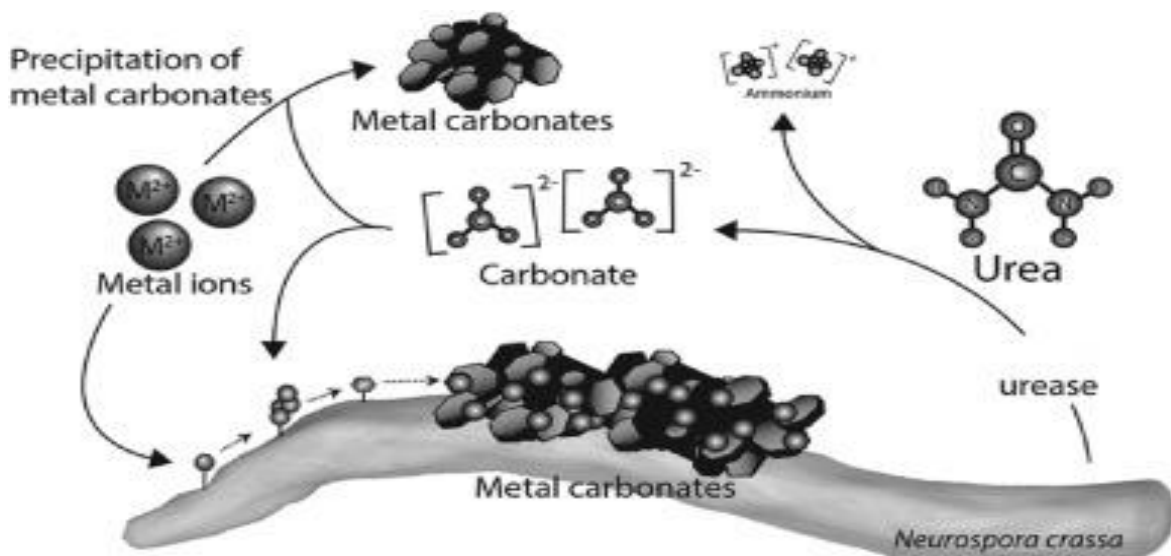


Figure 15 : Illustration simplifiée des carbonates métallique formé par (MICP) (Rajasekar et al., 2020).

Les souches de *Sporosarcina luteola* UB3 et UB5 en milieu BNU ont également la capacité de précipité des carbonates avec d'autres métaux divalents tels que Mn, Pb, Sr, Zn, Ba , et Mg produisant de la Rhodochrosite ($MnCO_3$) , Cerussite ($PbCO_3$) , Otavite (Cd) , Strontianite ($SrCO_3$) ,Hydrozincite (Zn_5CO_3) , Witerite ($BaCO_3$) et Hydromagnesite (Mg_5CO_3) (Figure 16) (Cuaxinque-Flores et Al., 2020), Les ions métalliques divalents sont Co-précipités au sein de la phase carbonate en sa substitution aux ions calcium qui permettant une séquestration pendant une longue période (Mugwar et al., 2016), Aussi précipitation biologique des contaminants métalliques a été explorée comme technologie corrective pour les systèmes d'eaux souterraines contaminé (Mugwar et al., 2016).

et pour l'élimination des radionucléides dans les eaux usées provenant des activités nucléaires commerciales qui pose un problème majeur associé à la gestion des déchets nucléaires hautement toxiques pour l'environnement et la santé humaine (Anbu et al., 2020), Le MICP impliqué pour nettoyer les radionucléides de l'environnement en toute sécurité par la stimulation des microorganismes uréolitiques pour favoriser la précipitation du CaCO_3 et à son tour précipitation des radionucléides par substitution des ions calcium et la formation des minéraux carbonatés radionucléides.

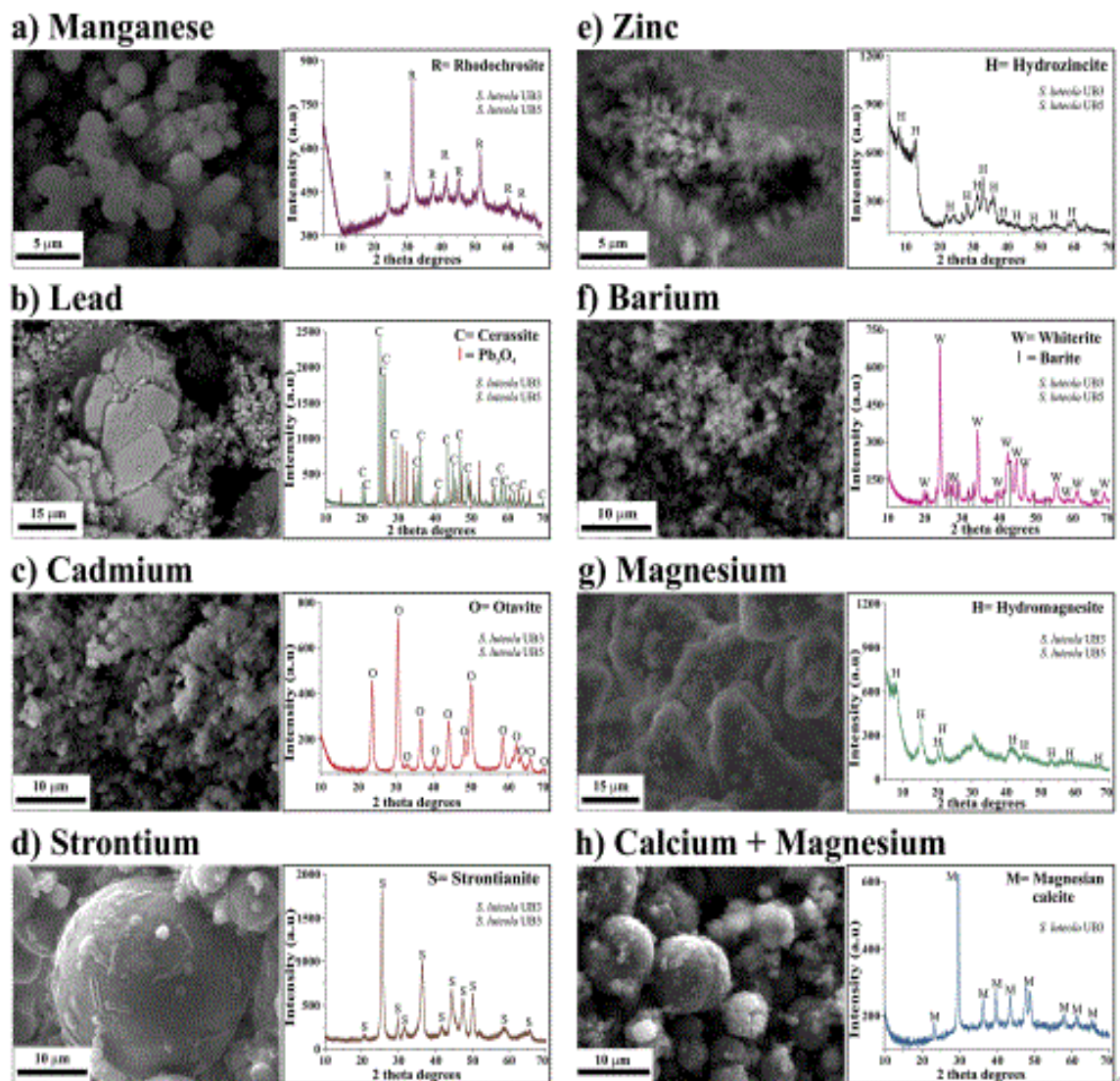


Figure 17 : Images SEM et profils XRD de bioprécipités produits par les souches de *S. luteola* UB3 et UB5 avec des métaux divalents (a–g) et un mélange de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (h).

3.4 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**).

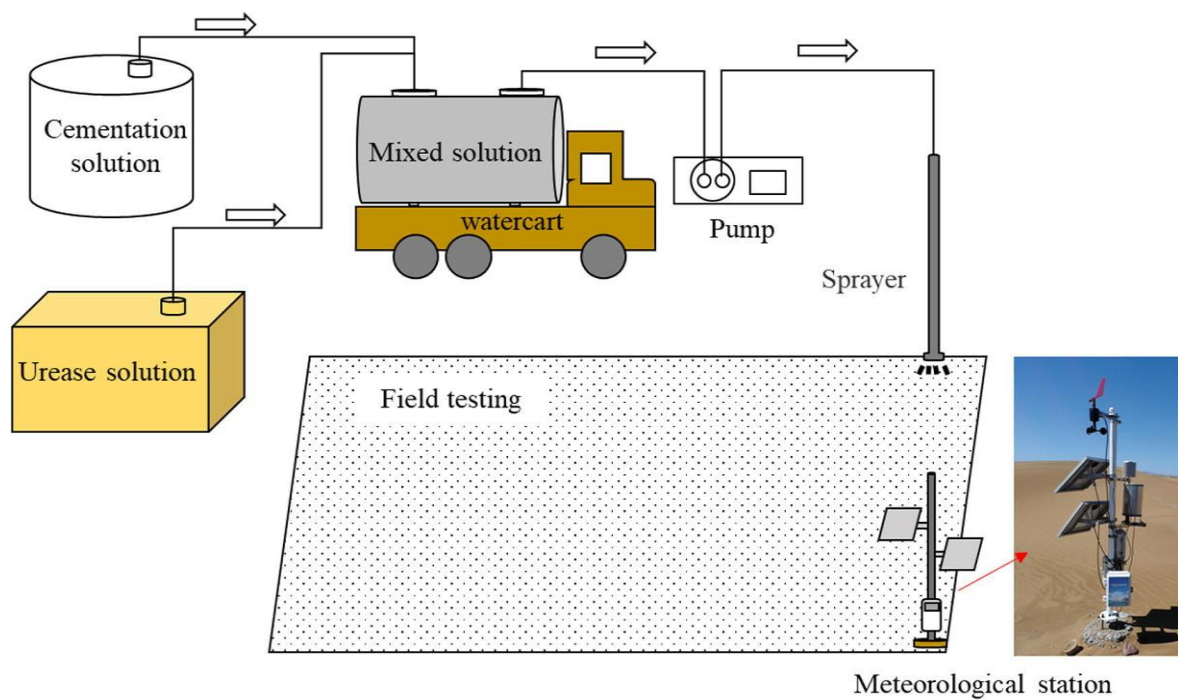


Figure 18 : procédé de traitement EICP pour la solidification des sables éoliens (Sun et al., 2021).

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**).

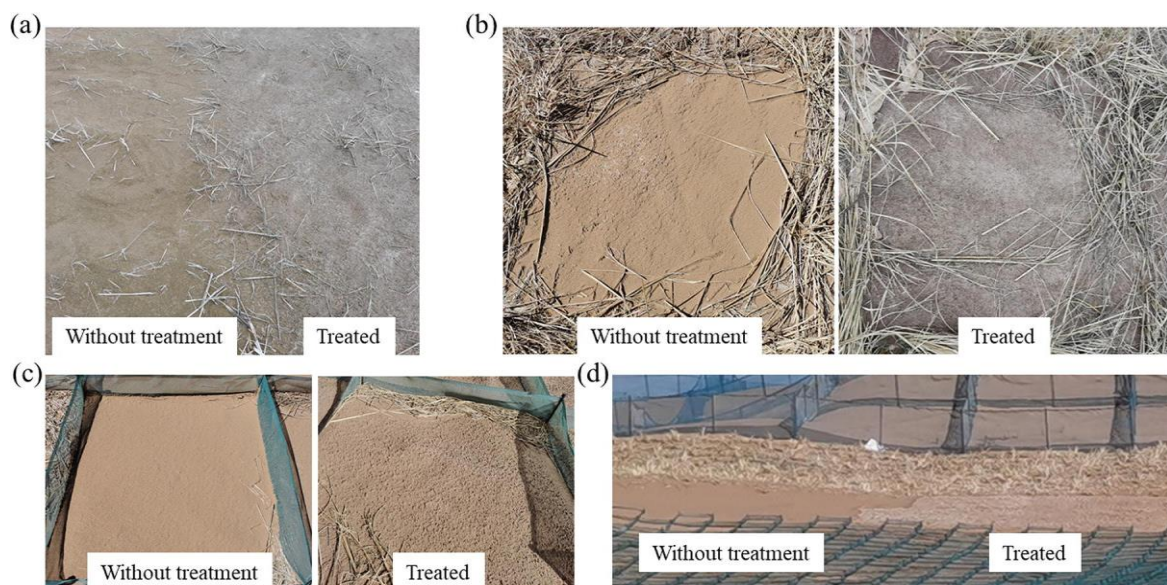


Figure 19 : Observation visuelle des motifs de surface : (a) zone 1 ; (b) zone 2 ; (c) zone 3 ; (d) zone 4 (Sun et al., 2021).

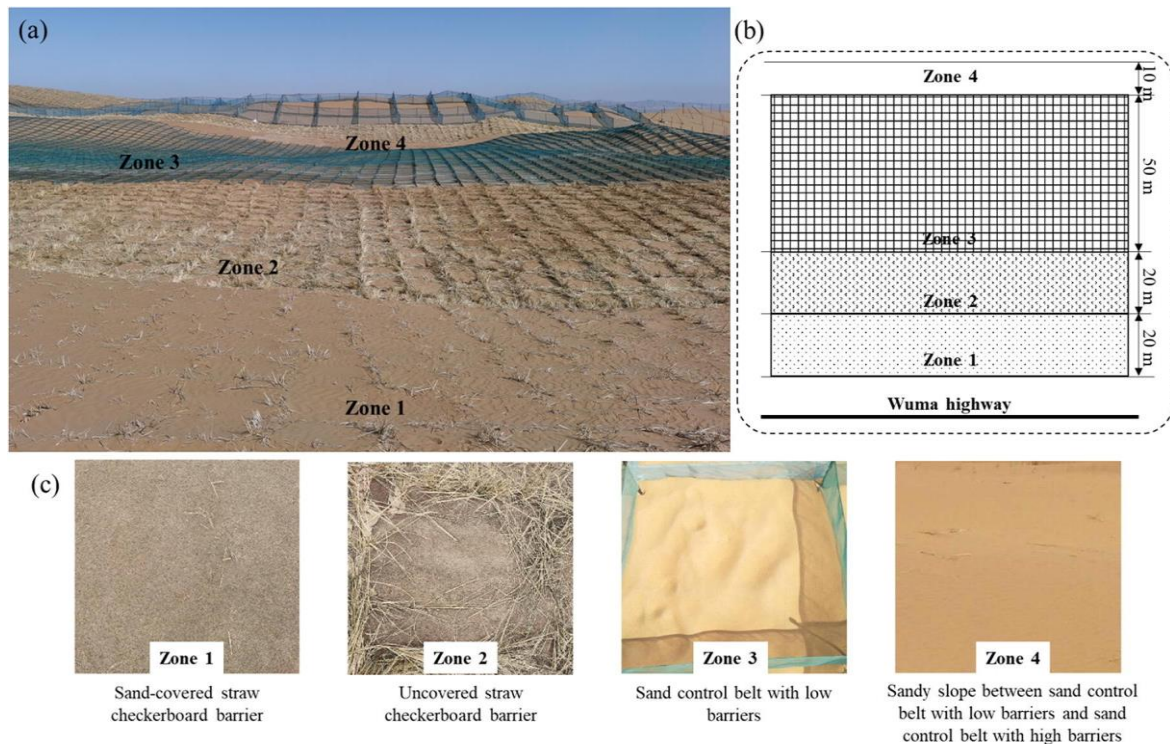


Figure 20 : Site d'essai sur le terrain : (a) zones d'essai 1 à zones d'essai 4 sur le site d'essai sur le terrain ; (b) croquis en plan des zones d'essai 1 aux zones d'essai 4 : (c) les caractéristiques géomorphologiques spécifiques des zones d'essai (**Sun et al., 2021**).

5. Séquestration du CO₂ :

Le réchauffement climatique est un problème environnemental majeur survenant principalement en réponse à l'augmentation de CO₂ dans l'atmosphère terrestre. Dans la nature, Le CO₂ est séquestré par fixation chimique du CO₂ sous forme de carbonate comme calcite, L'aragonite, la magnésite et la dolomite, mais par vitesse très lente (**Worrell et al., 2001**). Nombreux chercheurs ont proposé des méthodes alternatives de séquestration biologique du CO₂, mais la méthode la plus efficace d'élimination du CO₂ de l'environnement c'est le MICP. Dans cette méthode le CO₂ est converti en minéraux carbonatés qui peuvent former différents cristaux tels que la calcite, L'aragonite d'une manière plus écologique que les méthodes conventionnelles de séquestration du CO₂ atmosphère.

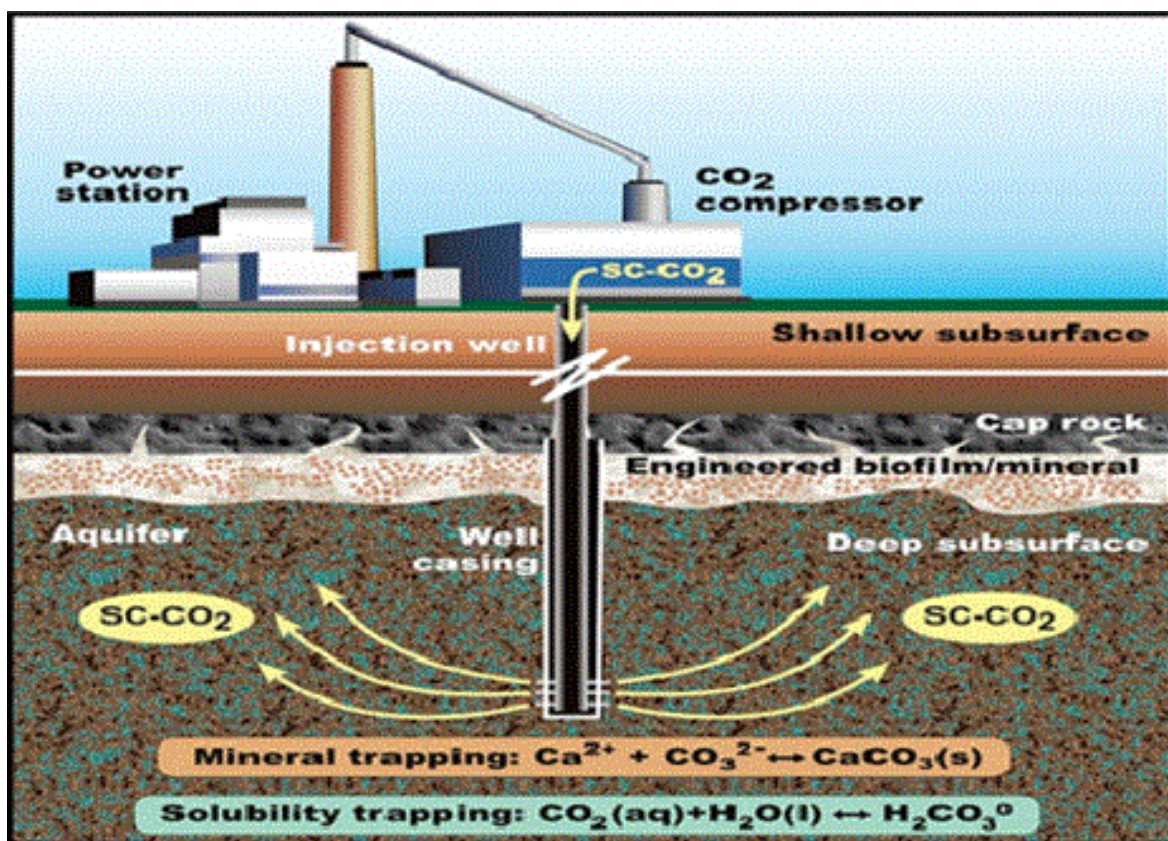


Figure 21 : Diagramme schématique de la capture et du stockage du carbone (Anbu et al., 2016).

Partie 2 :

Matériels et Méthodes

1. Prélèvement des échantillons :

Dans le but de trouver et isolée des souches possédant une activité uréase élevée et ayant la capacité de précipiter la calcite CaCO_3 . Nous avons collecté des échantillons à partir des diverses zones de wilaya Laghouat (**Figure 22**) : (A) : Assafia, (G) Ghicha, (S) station de concassage de pierre (Aine Madii).

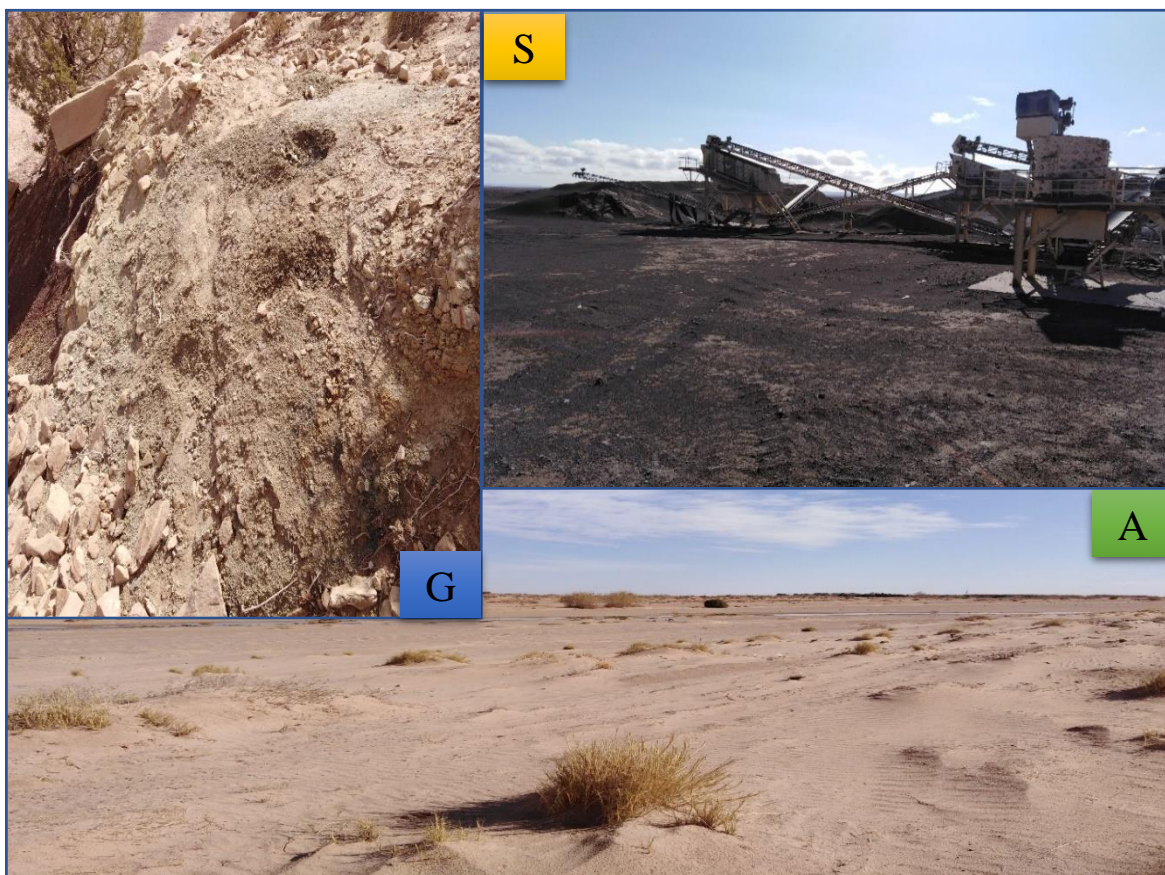


Figure 22 : Photos montrant différentes zones d'échantillonnage de wilaya Laghouat : (A) : Assafia, (G) Ghicha, (S) station de concassage de pierre (Aine Madii).

Les échantillons sont prélevés dans la couche supérieure du sol (0 - 15 cm), où l'activité biologique est souvent la plus élevée à la surface que la profondeur. Les échantillons sont collectés dans des sacs d'échantillons stériles (Figure 23), et transportés au laboratoire pédagogique de l'université Amar Telidjt pour analyse microbiologique.



Figure 23 : Les photos montrant des échantillons prélevés dans des sacs stériles, (a) : Échantillon prélevé dans la région Assafia, (b) : Échantillon prélevé dans la région Ghicha, (c) : Échantillon prélevé dans la région station de concassage de pierre (Aine Madii).

2. Analyse microbiologique :

2.1 Préparation de milieu de culture :

Un bouillon nutritif glucose-urée-calcium (BNGUC) avec une concentration d'urée de 2%, Et un pH de 9,0 (Krishnapriya et al.,2015) a été préparé pour isolée des souches a une activité uréase.

2.2 Préparation des solutions mère :

Les solutions mères ont été préparées dans huit béchers à partir de huit échantillons (Figure 24), chacun contenant 5 g de sol basique et 45 ml d'eau physiologique stérile (Xianojun et al., 2008). Ces solutions ont été agitées manuellement pendant quelques minutes jusqu'à ce qu'elles soient uniformes.



Figure 24 : Les solution mère des soles prélevés.

2.3 Isolement :

2.3.1 Isolement dans un milieu liquide :

L'isolement a été effectué dans huit erlenmeyers de 200 ml, dans chaque erlenmeyer, nous avons placé 45 ml de milieu de culture (BNGUC) et 5 ml de solution mère ont été ajoutés à chaque erlenmeyer. De plus, Les 8 erlenmeyers ont été incubés à l'air ambiant sur un plaque d'agitateur pendant 48 h (**Figure 25**). Pour empêcher le milieu de s'évaporer, Les Erlenmeyer ont été scellés avec de l'aluminium.



Figure 25 : Les erlenmeyers scellés par l'aluminium sur un plaque d'agitateur.

2.3.2 Isolement dans un milieu solide :

L'isolement a été réalisé dans le milieu Gélose Nutritif Glucose -Urée-Calcium (GNGUC) (Noor et al.,2020) à pH 9,0, contenant les mêmes composants que (BNGUC) à l'exception 20 g/l agar-agar pour solidifier le milieu., On ensemencés 8 boîtes de Pétri selon la technique de l'ensemencement de surface par écouvillon, où chaque boîte de Pétri représente un échantillon fini, et l'incubation à l'étuve à 30C° pendant 48 h.

Ensuite, Trois colonies différentes sont prélevées de chaque boîte de Pétri et chaque colonie a été repiquée dans un Gélose Nutritif Glucose-urée-calcium (GNGUC) en utilisant la technique d'équisement par quatre quadrants, Pour bien isoler des colonies distinctes (Villeneuve et Lavallée., 2008). Au total, 24 boîtes de Pétri ont été réalisées à l'issue de cette étape.

2.3.3 Purification :

En milieu (GNGUC), les bactéries isolées sont purifiées par subculture sur ce milieu jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et très homogènes.

3. Identification :

Les bactéries isolées sont identifiées à l'aide de procédures traditionnelles, qui comprennent l'évaluation de leurs aspects morphologiques ainsi que de leurs caractéristiques physiologiques et biochimique.

3.1 Etude morphologique :

3.1.1 Examen macroscopique des cultures :

Après purification, 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).

Les éléments d'identification macroscopique sont :

Les colonies se présentent sous une variété de formes et de tailles, notamment circulaires, filamenteuses, irrégulières, rhizoïdes, etc.

- ✓ **Élévation** : convexe, couronnée, plate ... et ainsi de suite.
- ✓ **Les bords** : peuvent être réguliers, ondulés, lobés, filamenteux, Et autres.
- ✓ **L'apparence sur la surface** : lisse, rugueuse.
- ✓ **La consistance** : Colonies grasses et crémeuses non visqueuses, colonies grasses et crémeuses visqueuses, colonies sèches.
- ✓ **La chromogènes** : Pigmentation/couleur de la colonie.

3.1.2 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.

3.1.2.1 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**).

3.1.2.2 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 échantillon-colorant 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 a immersion (**Lavallée.,2008**).

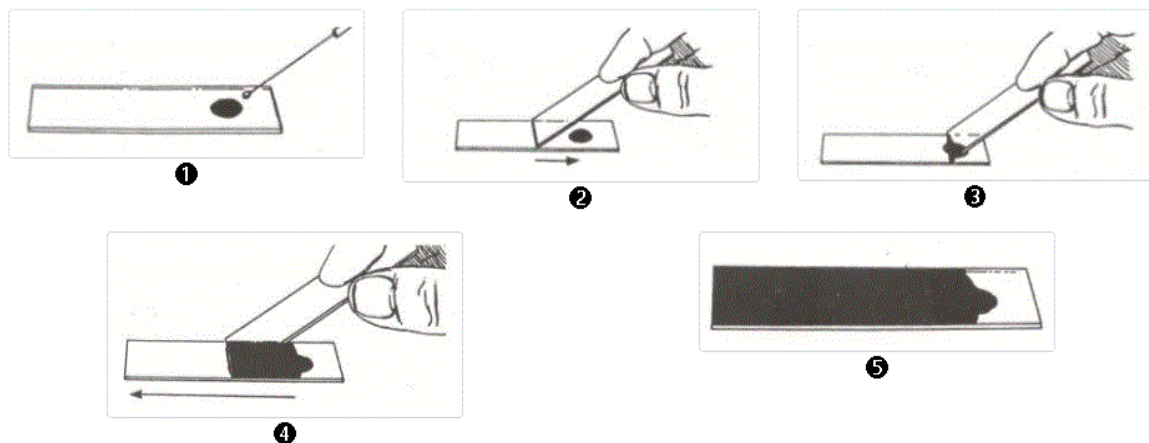


Figure 26 : schéma représente les procédures de la coloration à l'encre de chine (**Site internet**).

3.2 Tests biochimiques :

3.2.1 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**).

3.2.2 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).

3.2.3 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.

4. Conservation des isolats :

4.1 Conservation courte durée :

Les souches obtenues à partir de l'étape précédente ci-dessus ont été conservées dans un milieu de conservation solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C (Hasnal, 2015).

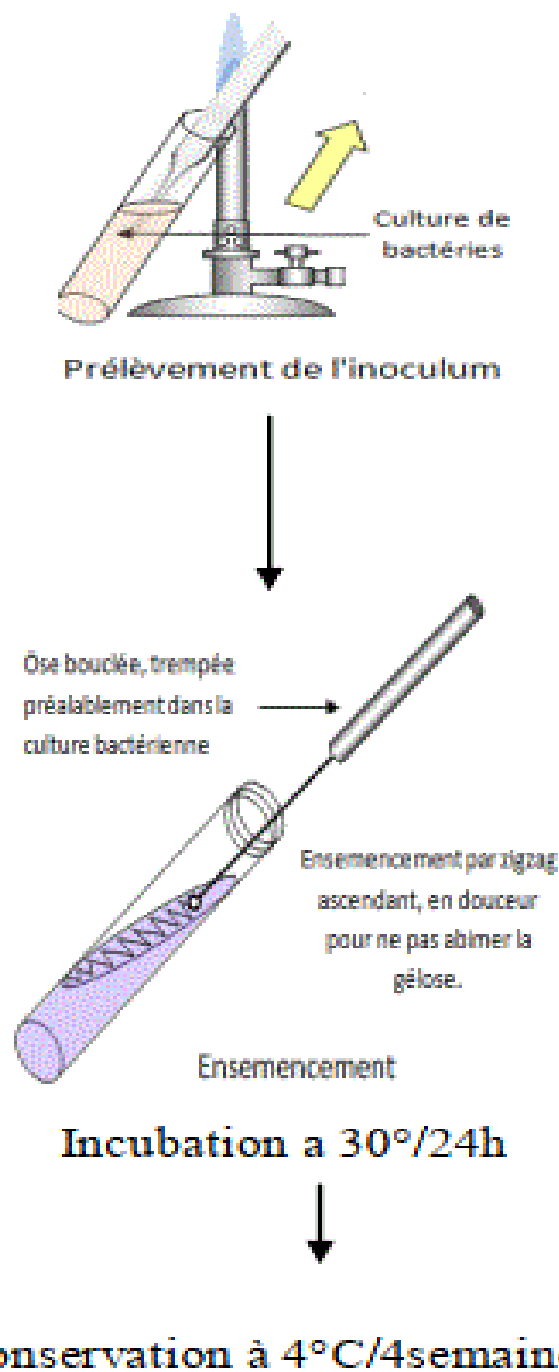


Figure 27 : schéma de conservation de courte durée des bactéries purifiées (Hasnal., 2015).

5. Test de croissance des 4 isolats sélectionnés dans différents milieux de culture

Par la suite, 4 souches bactériennes sur 24 ont été sélectionnées, et la croissance de ces quatre souches a été testée dans différents milieux de culture suivant :

- Gélose Nutritif (GN).
- Gélose de Sang Cuite (GSc).
- Chapman.
- Moussel.

6. Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP) :

Le Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP), est un milieu de culture non sélectif et non enrichi utilisé en microbiologie pour l'identification des bactéries dégradatives de l'urée seulement. C'est un milieu différentiel, comportant un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol (BCP). Ce dernier donne une couleur pourpre au PH de milieu devient 6.8 ou plus. Et quand le PH de milieu au BCP devient acide de ou moins PH 5,2 le couleur de milieu devient jaune, Et passe de jaune à pourpre foncé si l'urée de milieu est utilisée par ces bactéries.

Maintenant, En utilisant les composants listés dans l'annexe, Et on préparés deux milieux de (GNU-BCP), chacun ayant un pH différent de l'autre, l'un acide a PH 5.2 et l'autre neutre a PH 6.8 (Figure 27), puis ont examiné la croissance des quatre souches sélectionnées (Ech02.1, Ech02.2, Ech03.3, Ech06.1) dans chaque de ces deux milieux.



Figure 28 : Deux milieux de (GNU-BCP) à gauche acide a PH 5.2 de couleur jaune et à droite neutre a PH 6.8 de couleur pourpre.

7. Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ :

La méthode de conductivité a été appliquée pour surveiller l'action de l'enzyme uréase. L'activité d'uréase assure l'hydrolyse substrat d'urée non ionique en produits ioniques, ce qui entraîne une augmentation proportionnelle de la conductivité dans des conditions standard. Pour dosage enzymatique, 1,0 ml de (bouillon nutritif (BN) + bactéries) a été ajouté à 9,0 ml d'une solution d'urée à 1,11 M. Un électroconductimètre a été utilisé pour mesurer immédiatement la conductivité après 5 minutes, 30 minutes et 120 minutes. Le taux d'augmentation de la conductivité en ms/min représente l'activité de l'uréase. À ce dosage, quatre isolats bactériens (**Ech02.1**, **Ech02.2**, **Ech03.3**, **Ech06.1**) ont été étudiés en fonction de leur activité uréase (**Krishnapriya et al.,2015**).

7. Les conditions de formation de calcite :

Les isolats bactériennes sélectionnées (**Ech02.1**, **Ech02.2**, **Ech03.3**, **Ech06.1**) ont été soumises à un test pour comprendre les condition de formation de calcite, les souches bactériennes vivants ont été inoculées dans un bouillon nutritif urée-calcium (BNUC), de PH standard de, BN avec de l'urée uniquement (BNU) et BN avec du chlorure de calcium uniquement (BNC), , BNUC et BNU ont été préparés pour contenir 10% d'urée, BNUC et BNC ont été préparés avec 100 g/l de chlorure de calcium, Les trois bouillons (BNUC, BNU, BNC) ont été stérilisés par UV pendant 120 min, Les trois bouillons non inoculés (BNUC, BNU, BNC) a été utilisé comme témoin négatif. Tous les erlenmeyers ont été incubés à 37C° dans une étuve sur plaque d'agitation pendant 48 h, Et l'expérience a été répétée plusieurs fois (**Noor et al 2020**).

8. Test de formation la calcite (CaCO₃) :

Les souches bactériennes sélectionnées (**Ech02.1**, **Ech02.2**, **Ech03.3**, **Ech06.1**) ont été soumises à un test de production de calcite, les souches bactériennes vivants ont été inoculées dans un bouillon nutritif urée-calcium (BNUC), de PH standard de milieu, Tous les erlenmeyers ont été incubés à l'air ambiant sur l'action à la plaque d'agitateur pendant 30 jours (Figure 25). Pour empêcher le milieu de s'évaporer sur plaque d'agitation pendant ces

Jours, Les Erlenmeyer ont été scellés avec de l'aluminium Et l'expérience a été répétée plusieurs fois (Noor et al 2020).

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

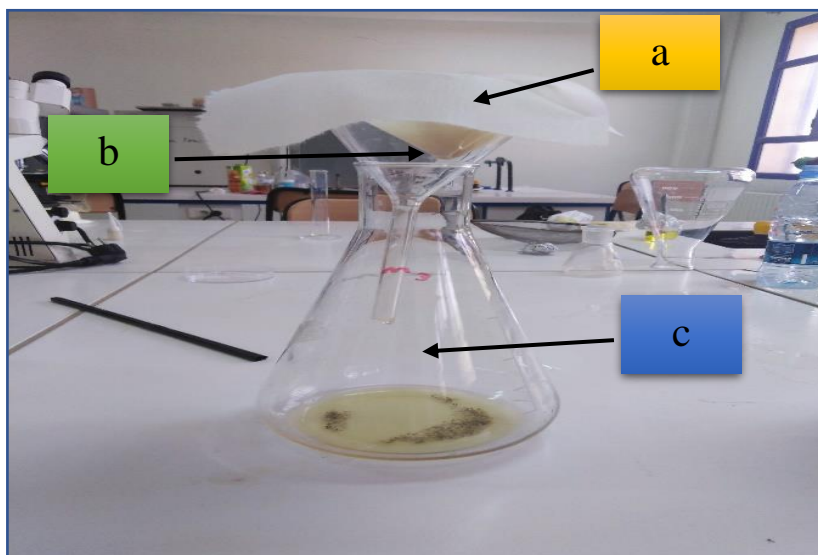


Figure 29 : Une photo illustrant le montage expérimental utilisé pour filtrer le dépôt de calcite, (a) Papier Filtre, (b) Entonnoir, (c) Erlenmeyer.

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 30**).

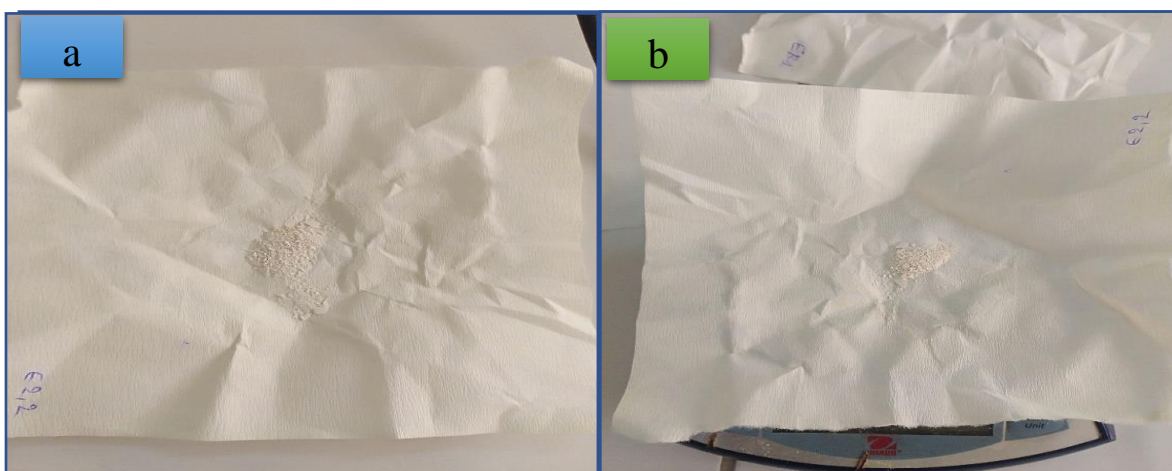


Figure 30 : (a) le dépôt de calcite sécher à gauche, (b) Le dépôt de calcite sur la balance.

Partie 3 :

*Résultats et
discussions*

1. Isolement :

On a utilisé dans notre étude pour isoler des souches urolytique un milieu considéré comme sélectifs pour ces genres qui est : Bouillon Nutritif Glucose-Urée-Calcium (BNGUC) de 2 % d'urée et PH 9, pour minimiser la croissance des autre bactéries et avoir juste les bactéries urolytiques alcalophiles, La solution mère a été préparer à partir les échantillons du soles alcalines, et l'ensemencement a été fait immédiatement après le dernier dans des condition aseptique, Après une incubation à l'air ambiant sur un plaque d'agitateur pour fournir l'oxygène dissoutes dans les 48 h (**Figure 31**), Les bactéries ont été ensemencées dans le gélose nutritif glucose-urée-calcium (GNGUC) par écouvillon (**Figure 32**).

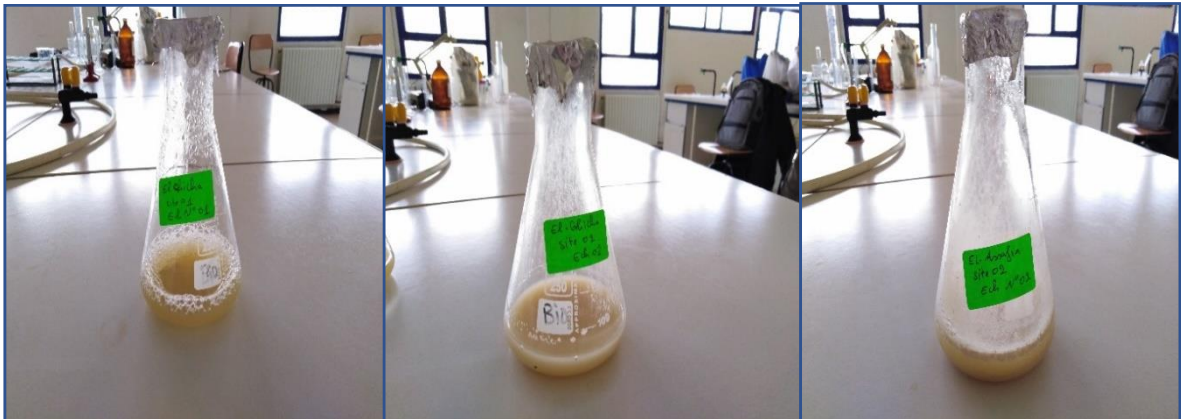


Figure 31 : Résultats de l'isolement dans BNGUC.



Figure 32 : Résultats de l'isolement dans GNGUC.

3. Purification :

24 colonies typiques isolées ont été purifiées par des repiquages séquentiels par l'utilisation le même milieu d'isolement (GNGUC) jusqu'à l'obtention de colonies bien distinctes et très homogènes.

3. Etude morphologique :

3.1 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 24 souche isolée après la purification sur GNGUC (**Figure 33**), et on observés des variations importantes des colonies par apport les critères de pigmentation, Taille, Forme...ect (**Tableau 5**).

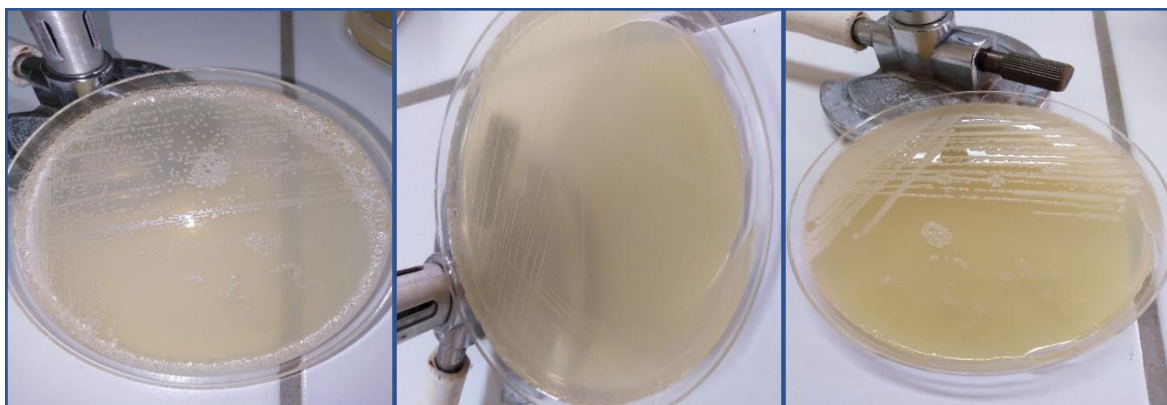


Figure 33 : Aspect macroscopique des colonies des bactéries

Tableau 5 : Aspect macroscopique des colonies des bactéries isolées.

	Chromogénèse	Forme	Transparence	Aspect de surface	Consistance
Ech01.1	Orange	Circulaire, Plate, de bord régulier	-	Muqueuses	Grasses non visqueuse
Ech01.2 Ech01.3	-	Circulaire, d'élévation opaque, de bord régulier	Translucide	Muqueuses	Crémeuse
Ech02.1	Blanche	Irrégulier et plate, de bord ondulé	-	Lisse	Sèche

Ech02.2	Blanche	Circulaire, d'élévation opaque, de bord régulier	-	Lisse	Sèche
Ech02.3	Orange	Circulaire et plate de bord régulier	-	Muqueuses	Grasses non visqueuse
Ech03.1	Jaune	Circulaire et plate 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
Ech04.1 Ech04.2 Ech04.3	Orange	Circulaire et bombé bord régulier	-	Lisse	Crémeuse et grasses non visqueuse
Ech05.1	Blanche	Circulaire et bombé de borde régulier	-	Lisse	Crémeuse et grasses non visqueuse
Ech05.2	Blanche	Irrégulier d'élévation opaque de bord ondulé	-	Lisse	Sèche
Ech05.3	Blanche	Circulaire d'élévation opaque et de bord régulier	-	Lisse	Crémeuse et grasses non visqueuse
Ech06.1	Blanche	Circulaire et plate de bord régulier	-	Muqueuses	Sèche
Ech06.2	Blanche	Irrégulier et plate de bord ondulé	-	Muqueuses	Sèche
Ech06.3	Blanche	Irrégulier et plate de bord ondulé	-	Muqueuses	Sèche

Ech07.1	-	Circulaire d'élévation opaque	Translucide	Muqueuses	Crémeuse
Ech07.2	Orange	Circulaire d'élévation opaque	-	Lisse	Crémeuse
Ech07.3	Blanche	Circulaire d'élévation opaque	-	Lisse	Crémeuse et grasses non visqueuse
Ech08.1 Ech08.2	-	irrégulier d'élévation opaque	Translucide	Muqueuses	Crémeuse et grasses non visqueuse
Ech08.3	Blanche	Irrégulier d'élévation opaque	-	Lisse	Crémeuse

3.2 Aspect microscopique :

3.2.1 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 34**).

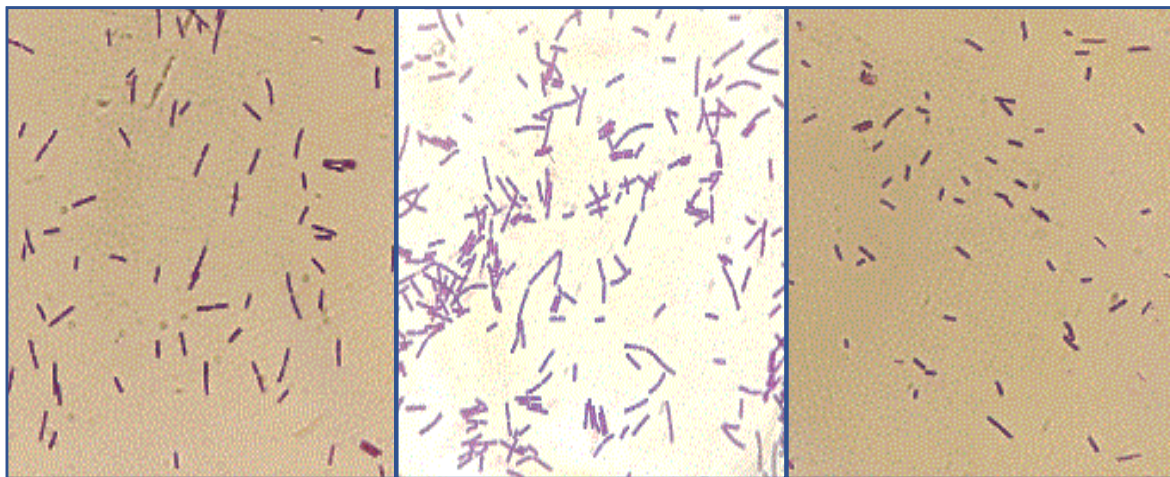


Figure 34 : Résultats de coloration de Gram de quelques souches bactériennes.

3.2.2 Coloration de spore :

Les 24 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 35**).

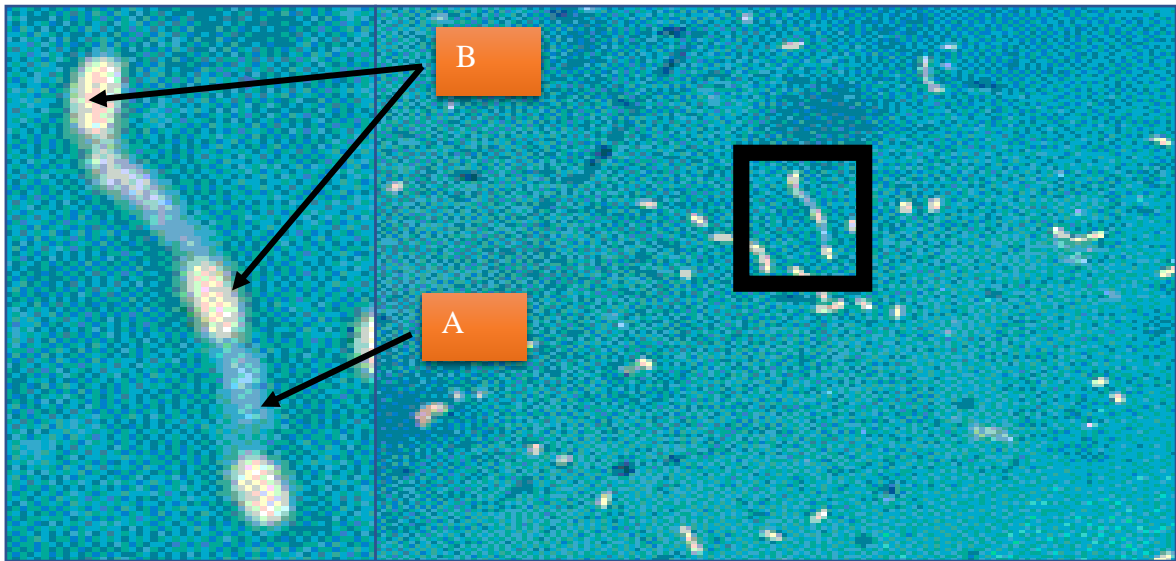


Figure 35 : Résultat de coloration de spore l'encre de chine, (A) Forme végétative, (B) Endospore.

4.1 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) :



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

4.2 Mannitol mobilité :

On a utilisés ce test sur 24 isolats pour examiner la fermentation du mannitol et la motilité bactérienne (Figure 36), et les résultats obtenus monter dans le (Tableau 6).



Figure 36 : Résultats de mannitol mbilité des 24 isolats.

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

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

Tableau 6 : Résultats de coloration de Gram, Coloration de spore et des tests biochimiques effectués sur 24 isolats bactériennes.

	Coloration de Gram	Test de spores	Catalase	Mannitol	Mobilité	Uréase
Ech01.1	Petit bacille Gram +	+ / Centrale	+	+	+	+
Ech01.2	Diplocoque Gram +	-	+	+	-	+
Ech01.3	Diplocoque Gram +	-	+	+	-	+
Ech02.1	Gros bacille Gram +	+ / Terminale	+	-	+	+
Ech02.2	Streptobacille Gram +	+ / Terminale	+	-	+	+
Ech02.3	Petite bacille Gram +	+ / Centrale	+	+	+	+
Ech03.1	Gros bacille Gram +	+ / Terminale	+	-	+	+
Ech03.2	Gros bacille Gram +	+ / Centrale	+	-	+	+
Ech03.3	Gros bacille Gram +	+ / Centrale	+	-	+	+
Ech04.1	Cocci Gram +	-	+	+	-	+

Ech04.2						
Ech04.3						
Ech05.1	Petite bacille Gram +	+ / Centrale	+	-	+	+
Ech05.2	Bacille Gram +	-	+	+	+	+
Ech05.3	Bacille Gram +	+ / Centrale	+	+	+	+
Ech06.1	Gros bacille Gram +	+ / Terminale	+	-	+	+
Ech06.2	Bacille en chaînette Gram +	+ / Centrale	+	+	+	+
Ech06.3	Bacille Gram +	+ / Centrale				+
Ech07.1	Bacille Gram +	-	+	-	+	+
Ech07.2	Petite bacille Gram +	+ / Centrale	+	+	+	+
Ech07.3	Bacille Gram +	-	+	-	+	+
Ech08.1	Diplocoque Gram +	-	-	+	-	+
Ech08.2						
Ech08.3	Cocci Gram +	-	-	+	-	+

5. Test de croissance des 4 isolats sélectionnés dans différents milieux de culture :

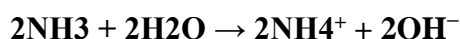
En raison de la difficultés à suivre l'identification des 24 isolats, Car le temps est limité et le manque des produits et les moyens essentielles de l'identification, nous avons sélectionnées 04 isolats de genre bacillus sp, Selon la morphologie de bactérie et position et taille de spore, Ensuite nous avons testés ces isolats dans différentes milieux (GN, Chapman, Gélose de sang cuit, moussel), Pour avoir quelques caractères importantes, qui nous donne une Certaine idée sur l'espèce bactériennes sélectionnées : L'aspect des colonies de ces isolats dans ces milieu, L'exigence des bactéries, Type d'hémolyse, Fermentation de mannitol ...ect , les résultats montrés dans (**Tableau 07**), Dans le gélose de moussel, Le colonie de couleur rose signifier pas d'utilisation du mannitol par les Bacillus (Mannitol -), et la présence d'un halo clair autour de la culture, C'est exprimé que Les protéines du jaune d'oeuf ont été hydrolysées par les protéases des Bacillus, et la présence d'un halo opaque autour de la culture, C'est exprimé aussi que les lécithines ont été hydrolysées par la lécithinase des Bacillus. En exploitant ces résultats et également obtenus à partir du (**Tableau 07**), et on conclus que les quatre isolats bactériennes appartiennent à groupe de **Bacillus cereus sensu lato**.

Tableau 07 : Les résultats de Test de croissance des 4 isolats sélectionnés dans différents milieux de culture.

	Ech02.1	Ech02.2	Ech03.3	Ech06.1
GN	+	+	+	+
Chapman	Mannitol -	Mannitol -	Mannitol -	Mannitol -
Gélose de sang	+	+	β-hémolyse	β-hémolyse
Moussel	Colonie rose avec présence d'un halo clair autour de la culture et présence d'un halo opaque autour de la culture	Colonie rose avec présence d'un halo clair autour de la culture et présence d'un halo opaque autour de la culture	Colonie rose avec présence d'un halo clair autour de la culture et présence d'un halo opaque autour de la culture	Colonie rose avec présence d'un halo clair autour de la culture et présence d'un halo opaque autour de la culture

6. Hydrolyse biochimique de l'urée par utilisation de Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP) :

Le but de l'utiliser ce type de milieu, C'est qu'il contient un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol (BCP), C'est un milieu différentiel, Ce qui nous donne l'occasion pour comprendre la relation entre hydrolyse l'urée par voie bactériennes et augmentation de PH de milieu, quand le PH de milieu au BCP devient acide de ou moins PH 5,2 le couleur de milieu devient jaune, et changer à pourpre si l'urée de milieu est dégradé par ces bactéries, Et quand le PH de milieu au BCP égal ou plus grande de PH 6.8, Le couleur de milieu devient pourpre plus foncé (**Figure 37**), Ce qui expliquer que l'ammoniac (NH₃) provenant de l'hydrolyse de l'urée se transforme en ammonium NH₄⁺, libérant ions hydroxyde OH⁻ et augmentation du pH micro-environnemental Par équation suivante :



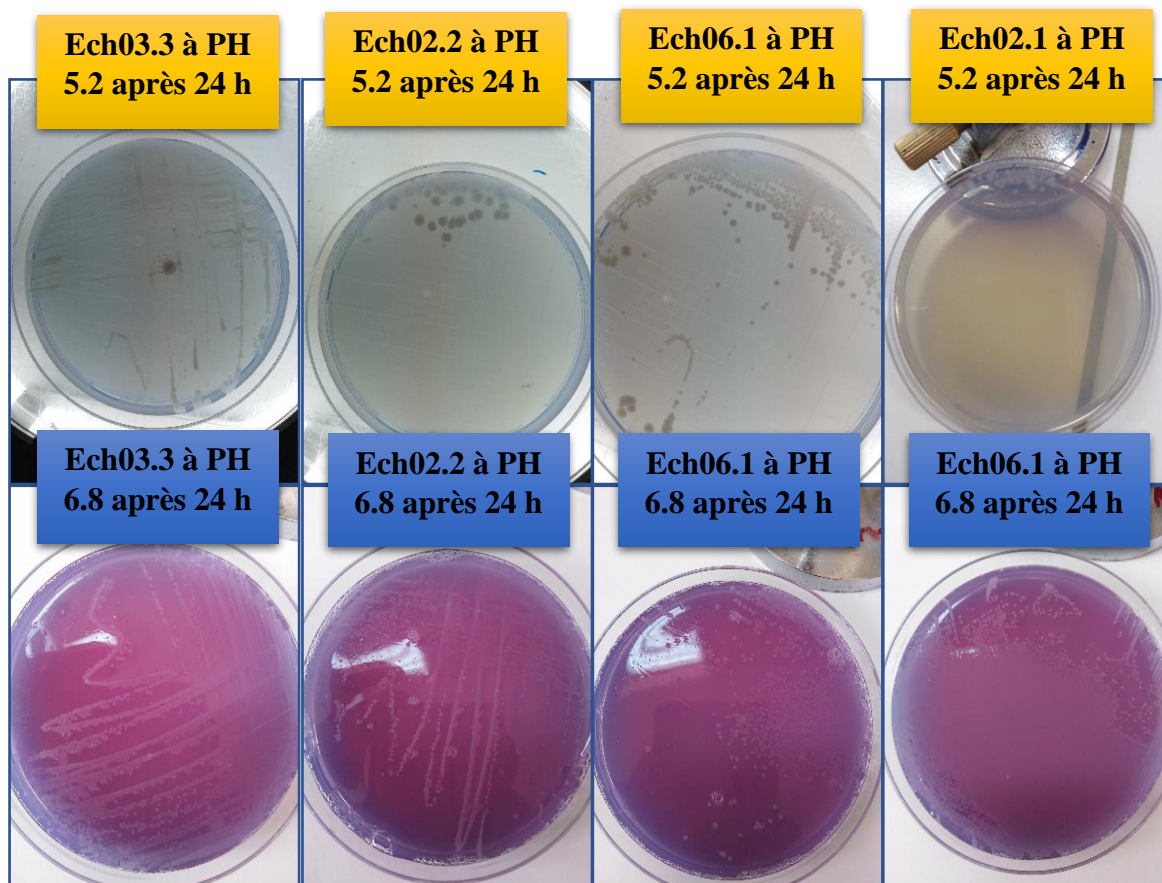


Figure 37 : Les résultats de croissance des 4 souche dans le milieu GNUC au BCP a différentes PH.

7. Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ :

Ce test est complémentaire aux tests précédents ci-dessus. Nous avons suivi l'activité de l'enzyme uréase en suivant la décomposition de l'urée en mesurant la conductivité électrique σ de quatre isolats (Ech02.1, Ech02.2, Ech03.3, Ech06.1) à des instants différents. Et d'après les résultats obtenus à partir du (**Tableau 08**) et (**Figure 38**), Les valeurs de conductivité électrique (EC) varie d'un isolat à l'autre et augmente avec une augmentation de la température dans une période comprise entre 0(s) et 7200(s), et cela s'explique par l'augmentation de l'activité enzymatique de l'enzyme uréase. qui à son tour hydrolyse substrat non ionique (urée) et produisant des produits ioniques (Ca^+ , CO_3^{2-}) selon l'équation : $\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-}$ (**Camille, 1973**).

Qui permet de conclure que ces 4 isolats possèdent un gène responsable de la production de l'enzyme uréase, qui dégrader l'urée en des ions transportant un courant électrique.

Tableau 08 : Les résultats de Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ .

	Ech02.1		Ech02.2		Ech06.1		Ech03.3	
	EC (s/m)	C°	EC (s/m)	C°	EC (s/m)	C°	EC (s/m)	C°
0 (s)	6.59	25.3	6.7	24.4	6.98	25	6.92	24.3
300 (s)	7.51	27.1	7.02	28.3	7.24	28.3	7.04	28.5
1800 (s)	7.68	28.8	7.39	29.7	8.51	29.4	7.82	29.4
7200 (s)	8.07	31.4	7.74	31.4	8.33	30.4	8.33	31.4

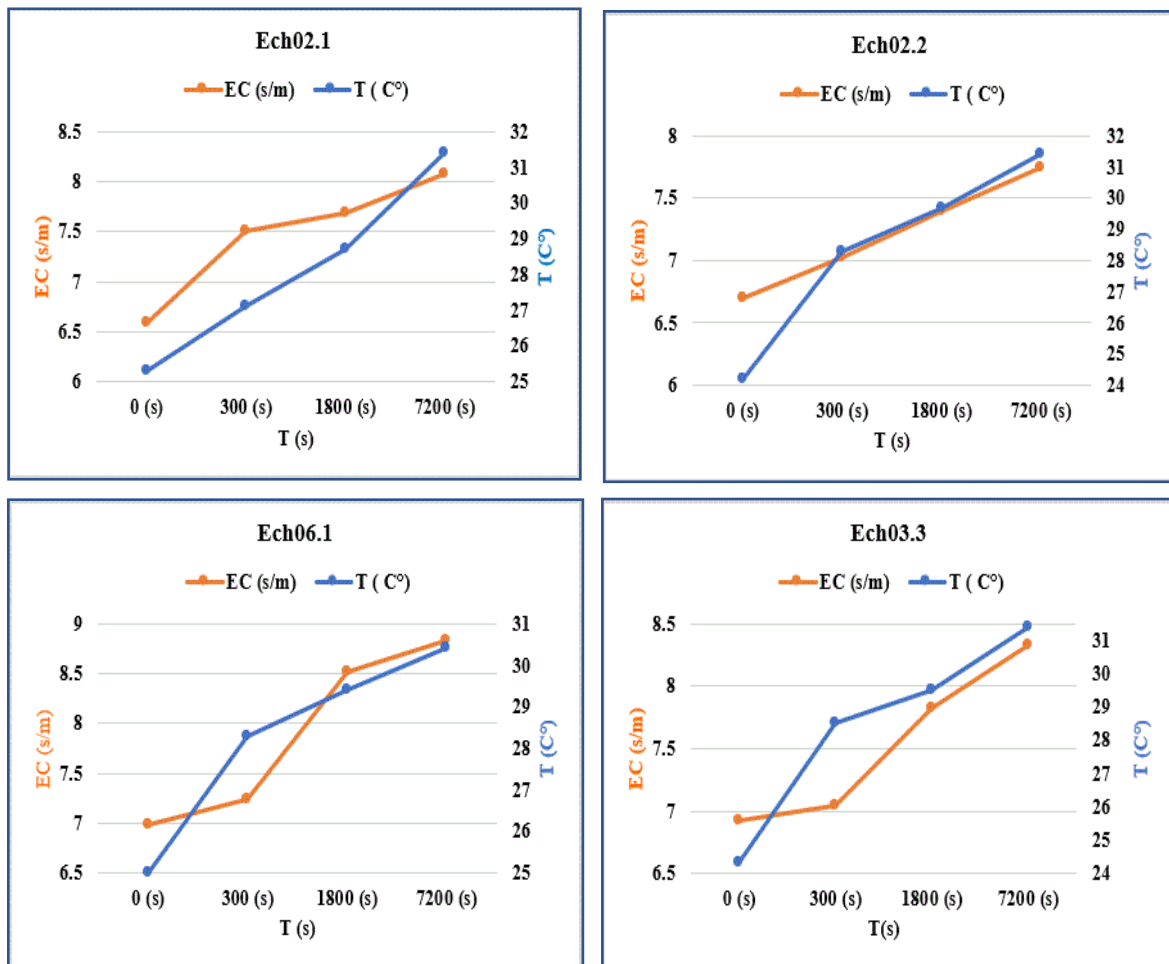


Figure 38 : Les résultats Dosage quantitatif de l'uréase par mesure conductivité électrique σ de 4 isolats

8. Les condition de formation de calcite :

Pour connaître les conditions de formation de la calcite, nous avons effectué ce test et ses résultats sont présentés dans le (Tableau 09). D'après les données du (Tableau 9).

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 (**Partie 01**).

Tableau 09 : Bouillon nutritif avec urée et calcium (BNUC), Bouillon nutritif avec urée (BNU), Bouillon nutritif avec calcium (BNC).

Isolats bactériennes (Ech02.1, Ech02.2, Ech03.3, Ech06.1)

Milieu	Précipitation de CaCO ₃
BNUC	+
BNU	-
BNC	-
Les milieux non inoculés	
BNUC	-
BNU	-
BNC	-

8. Test de formation la calcite (CaCO₃) :

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 30 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**).

Tableau 10 : Les résultats de test de formation de calcite (CaCO₃).

Isolats	Précipitation de CaCO ₃	Poids en (g) du papier filtre sans craie	Poids en (g) du papier filtre avec craie	Rendement en (g) de Craie
Ech02.1	+	2.42	2.85	0.43
Ech02.2	+	2.44	2.72	0.28
Ech03.3	+	2.39	3.47	1.08
Ech06.1	+	2.50	3.50	1

Conclusion

Dans ce travail nous avons présenté une étude expérimentale via une nouvelle technologie, cette technique se base sur l'utilisation des bactéries ont des activités uréase élevée pour favoriser la précipitation de la calcite par voie d'uréolyse.

Une grande variété de micro-organismes peut être utilisée pour le processus de MICP, mais Le genre bacillus c'est l'un des genres bactériennes les plus abondants et largement étudié en raison de sa forte abondance et de sa grande diversité. et Plusieurs souches appartenant au bacillus ont le plus grand potentiel d'utilisation dans MICP, donc nous avons visé comme une tâche principale l'isolement des bactéries appartenant au groupe bacillus et sélection de puissantes bactéries pour favoriser la précipitation de la calcite par l'uréolyse.

Les résultats les plus importants obtenus dans ce travail sont :

- ✓ préparation des milieux de culture sélectifs pour les bactéries uréolytique
- ✓ l'isolement et identification des bacillus sp ayant une activité uréase
- ✓ mise en évidence l'activité enzymatique uréase par test conductivité et sur milieu BCP

Enfin le processus MICP est une technique potentiellement respectueuse de l'environnement pour un large éventail d'applications, mais beaucoup de travail doit être fait pour amener cette technologie pratique aux applications sur le terrain.

Références

- | N° | Référence |
|----|---|
| 01 | Abo-El-Enein, S., Ali, A., Talkhan, F. N., & Abdel-Gawwad, H. (2013). Application of microbial biocementation to improve the physico-mechanical properties of cement mortar. <i>HBRC Journal</i> , 9(1), 36-40. https://doi.org/10.1016/j.hbrcj.2012.10.004 |
| 02 | Achal, V., Mukherjee, A., Basu, P. C., & Reddy, M. S. (2008). Lactose mother liquor as an alternative nutrient source for microbial concrete production by <i>Sporosarcina pasteurii</i> . <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> , 36(3), 433-438. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0514-7 |
| 03 | Adharsh Rajasekar. (2018). <i>Calcite-precipitating indigenous bacteria in landfills and their application towards ground improvement</i> . Thèse Doctorat, University of Liverpool, P42. |
| 04 | Aissaoui Nadia. (2013). <i>Etude molécules d'antibiotiques biosynthétisées par une bactérie extrémophile issue d'une sebkhia Algérienne d'EL Goléa</i> . 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. |
| 05 | Aït-Kadi, D., Bouzenad, A. (2015). <i>Analyse du marché du carbonate de calcium Caco3</i> . Université Laval Québec, Département de génie mécanique, Laboratoire de fiabilité et maintenance des systèmes, P05. |
| 06 | Almajed, A., Lemboye, K., Arab, M. G., & Alnuaim, A. (2020). Mitigating wind erosion of sand using biopolymer-assisted EICP technique. <i>Soils and Foundations</i> , 60(2), 356-371. https://doi.org/10.1016/j.sandf.2020.02.011 |
| 07 | Anbu, P., Kang, C. H., Shin, Y. J., & So, J. S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. <i>SpringerPlus</i> , 5(1). https://doi.org/10.1186/s40064-016-1869-2 |
| 08 | Aouf, R. S. (2021, 25 mai). <i>Bio-bricks made from human urine could be environmentally friendly future of architecture</i> . Dezeen. https://www.dezeen.com/2018/11/06/bio-bricks-human-urine-environmentally-friendly-university-cape-town/ |

- 09 **Ashraf, M.S., Azahar, S.B., Nur Zulaikha, 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.
- 10 **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>
- 11 **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.
- 12 **Bacillus - Actualités Médicales Quotidienne - Actualité Santé. (2018, 30 mai).** *Medical Actu - Actualités Médicales Quotidienne - Actualité Santé*. <https://www.medical-actu.com/cours/bacteriologie/bacillus/>
- 13 **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.
- 14 **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.
- 15 **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.
- 16 **Billy, C. (2020).** Problèmes Posés par le Métabolisme de Quelques Bactéries Calcifiantes Aérobies I. Etude d'une association bactérienne halophile productrice d'aragonite, En milieu marin. *Journal articles*, P165-P169.

- 17 **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.
- 18 **Bouraoui Cheima. (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.
- 19 **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.
- 20 **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>
- 21 **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.
- 22 **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>
- 23 **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>
- 24 **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>

- 25 **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 *Sporosarcina luteola*: 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>
- 26 **DeJong, J. T., Fritzges, 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))
- 27 **Delarras, C. (2014).** *Pratique en microbiologie de laboratoire - recherche de bactéries et de levures-moisissures*. TECHNIQUE & DOC.
- 28 **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>
- 29 **Donovan Mujah Anak Bernard Lium. (2019).** *Biologically Induced Cementation for Soil Stabilisation*. Thèse Doctorat, Curtin University, Faculty of Science and Engineering, Department of Civil Engineering, P32-33.
- 30 **Dromigny, É. (2008).** *Bacillus cereus (Éditions Médicales internationales éd.)*. TECHNIQUE & DOC.
- 31 **Frédéric, M. (2014, 2 septembre).** Identification bactérienne par la coloration de GRAM. *biotechnologie*. <http://www.technobio.fr/article-16615932.html>.
- 32 **Ghosh, T., Bhaduri, S., Montemagno, C., Kumar, A. (2019).** *Sporosarcina pasteurii* can form nanoscale calcium carbonate crystals on cell surface. *Plos One*, January 30, 2019, DOI: 10.1371/journal.pone.0210339.
- 33 **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>
- 34 **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.

- 35 **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.
- 36 **Hansal Nabila, (2015).** *Isolement, Purification, Identification et l'étude des caractéristique biotechnologique de Leuconostoc mesenteroides 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.
- 37 **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. *Biotechnology Reports*, 23, e00356. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00356>
- 38 **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>
- 39 **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>
- 40 **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.
- 41 **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>
- 42 **Krauss, C. (2009).** *Couches Polycristallines Orientées D'aragonite Biomimétique, Synthétisées Par Voie Electrochimique.* Mémoire Doctorat. L'université de CAEN, Basse-Normandie, P11.
- 43 **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>

- 44 **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>
- 45 **Lavallée, J. (2008).** *Microscope et objectif à immersion*. <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=60781>.
- 46 **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>
- 47 **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>
- 48 **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.
- 49 **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>
- 50 **Maleki, S. et al. (2015).** Calcium Carbonate Nanoparticles; Potential in Bone and Tooth Disorders. *Pharmaceutical Sciences*, (March 2015), 20(4), 175-182.
- 51 **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>
- 52 **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>

- 53 **Marvasi, M., Mastrome, G., Perito, B. (2020).** Bacterial Calcium Carbonate Mineralization in situ Strategies for Conservation of Stone Artworks: From CellComponents to Microbial Community. *Journal Frontiers in Microbiology*, 30 June 2020, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01386.
- 54 **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/>.
- 55 **Microbially induced calcite precipitation using *Bacillus velezensis* with guar gum. (2020).** *PubMed Central (PMC)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7423064/>
- 56 **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
- 57 **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>
- 58 **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>.
- 59 **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>
- 59 **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>
- 60 **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>
- 61 **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:10.1088/1757-899X/949/1/012090.
- 62 **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>
- 63 **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.es.2021.100096>
- 64 **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.
- 65 **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.
- 66 **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.
- 67 **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>
- 68 **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.1943-5606.0001089](https://doi.org/10.1061/(asce)gt.1943-5606.0001089).

- 69 **Stefani Petrova Botusharova. (2017).** Self-Healing Geotechnical Structures Via Microbial Action. Thèse Doctorat, Cardiff university, *Cardiff School of Engineering*, P28.
- 71 **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>
- 72 **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.
- 73 **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.
- 74 **Teghidet, H. (2012).** *Etude 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.
- 75 **Tempêtes de sable et de poussière. (2020, 16 octobre).** Organisation météorologique mondiale. <https://public.wmo.int/fr/notre-mandat/domaines-d%E2%80%99action/environnement/temp%C3%AAtes-de-sable-et-de-poussi%C3%A8re>
- 76 **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>
- 77 **76-Villeneuve, M., Lavallée, J. (2008).** Ensemencement par épuisement, <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=60799>.
- 78 **77-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.

- 79 **78-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.
- 80 **79-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>
- 81 **Xiaojun, D.,Qing, H.,Lijuan, H.,Xin, J.,Zongding, L. (2008).** Characterization oof phenol-degrading bacterial strains isolated form natural soil. *International biodeterioration&biodegradation*, P62:257-262.
- 82 **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>
- 83 **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>
- 84 **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>

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 Glucose-Urée-Calcium (GNGUC)	
Peptone.....	10
Extrait de levure.....	5
Glucose.....	5
Nacl.....	5
Urée.....	20
Cacl ₂	22.19
Agar.....	20
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
Gélose Nutritif Urée au BCP (GNU-BCP)	
Bouillon nutritif (BN)	8
Urée.....	30
Agar.....	20
Le pourpre de bromocrésol (BCP).....	0.025

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

