

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Microbiologie Appliquée*

### THEME

---

## Isolement et Evaluation de l'activité biologique des myxobactéries

---

**Présenté par :**

- BOUGHERARA Farha.
- BOUKRAA Safia.

**Devant le jury composé de :**

DJEBLI Ahmed	MAB	Président
BENAMAR Ibrahim	MAB	Examineur
MASSAOUDI Omar	MCB	Encadreur

Soutenu publiquement le : 10/07/ 2021.



## **Remerciement**

Nous tenons à remercier en premier lieu Allah pour tout puissant de nous avoir donnée le courage, la santé et la patience pour achever ce travail.

Nous tenons à remercier notre famille mais surtout, nos parents pour leur soutien et pour leur encouragement qui ont été indispensables pour mener à bien ce travail.

Nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances et nos profonds respects à notre encadreur Dr. MASSAOUDI Omar, pour sa patience, sa rigueur et ses précieux conseils qui nous ont aidés dans la réalisation de ce travail.

Nos remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu acceptés de juger ce modeste travail, tous les enseignants et les ingénieurs du département de biologie qui nous devons le plus de respect.

Toutes les significations de remerciements sincères à ceux qui ont joué un rôle important dans ce travail, M. BENZAADOUN Mebarak.

En fin, nous adressons nos sympathies et nos remerciements également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

## Dédicace

*je dédie ce travail :*

*À moi-même pour ma force et ma patience dans les jours les plus difficiles, même s'ils étaient mauvais, mais j'ai appris et compris et j'ai finalement atteint mon objectif.*

*À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*À mes chères sœurs Souad et Nesrine pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,*

*À mon cher frère, Ahmed pour l'appui et l'encouragement,*

*À mon cher mari,*

*À toute mes amis Karima, Nassima, Dallah, Safia, Meriem et Ibtissem pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*À Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation de ce mémoire.*

*BOUGHERARA Farha.*

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers et affectueux parents qui m'encouragent et me poussent toujours vers la réussite, à mon père « Djilali » et mon cher Maman « Mebrouka » pour tous vos sacrifices.*

*Mes frères Belkheir, Ayoub,*

*Mes sœurs Kelthoume, Zahia, Malika et Sara.*

*Ma famille, mes amis et collègues.*

*Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation de ce mémoire.*

*BOUKRAA Safia.*

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	Différents types de cellules myxobactériennes.	<b>10</b>
<b>Figure 2</b>	Fructifications myxobactériennes.	<b>11</b>
<b>Figure 3</b>	Essaim de colonies de diverses myxobactéries	<b>12</b>
<b>Figure 4</b>	La morphogenèse cellulaire des myxobactéries, illustrée par l'exemple de <i>Stigmatella aurantiaca</i>	<b>13</b>
<b>Figure 5</b>	Taxonomie actuelle de l'ordre des Myxococcales	<b>15</b>
<b>Figure 6</b>	Structures chimiques de certains métabolites secondaires bioactifs des myxobactéries	<b>18</b>
<b>Figure 7</b>	Carte géographique montrant les zones de prélèvement des échantillons	<b>21</b>
<b>Figure 8</b>	Méthode d'isolement (micro-prédateur) des myxobactéries à partir du sol.	<b>23</b>
<b>Figure 9</b>	Méthode d'isolement (cellulolytique) des myxobactéries à partir du sol.	<b>24</b>
<b>Figure 10</b>	Des souches myxobactérienne conservée dans le milieu VY.	<b>26</b>
<b>Figure 11</b>	Observation direct de corps de fructification myxobactériennes par loupe binoculaire Gx20.	<b>32</b>
<b>Figure 12</b>	Aspect des colonies myxobactérienne sur milieu WA.	<b>33</b>
<b>Figure 13</b>	Différentes formes d'essaims des mycobactéries du sol sur milieu VY	<b>34</b>
<b>Figure 14</b>	Observation microscopique à l'état frais des cellules végétatives des isolats myxobactériennes par la coloration du bleu de méthylène.	<b>34</b>
<b>Figure 15</b>	Observation macroscopique de la zone d'inhibition des souches de référence examinées par les myxobactéries.	<b>38</b>
<b>Figure 16</b>	Histogramme représentant les changements d'isolats en fonction des souches de référence	<b>39</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1</b>	Sources pratiques et préférentielles pour l'isolement de différentes myxobactéries.	<b>16</b>
<b>Tableau 2</b>	Nombre des isolats de myxobactéries obtenus à partir des zones d'échantillonnage (M1 : la méthode de proie bactérienne, M2 : la méthode de papier filtre).	<b>29</b>
<b>Tableau 3</b>	Nombre de couleurs du corps de fructification dans les isolats obtenus.	<b>33</b>
<b>Tableau 4</b>	L'activité antimicrobienne des isolats de myxobactéries obtenus.	<b>35</b>

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribo-Nucléique.

**ARN** : Acide Ribo-Nucléique.

**ASV** : Avec Solution Vitaminique.

**FB** : Organes de Fructifications.

**NRPS** : Peptides Non Ribosomiques Synthétases.

**PKS** : Polyketides Synthèses.

**RAM** : Résistante AntiMicrobien

**SSV** : Sans Solution Vitaminique.

**WA** : Water Agar.

## ملخص

لقد ثبت أن الكائنات الحية الدقيقة قادرة على القيام بعمليات أيضية متنوعة. تنتج هذه الكائنات الدقيقة مجموعة واسعة من المنتجات الطبيعية المتنوعة هيكلية مع أنشطة بيولوجية مهمة مثل بعض المضادات الحيوية ومضادات الفطريات. يهدف هذا العمل إلى عزل وتنقية البكتيريا من التربة الجذرية لنخيل التمر التي تم جمعها من مناطق صحراوية مختلفة من الجزائر (الأغواط، غرداية، المنيعية وتمنراست) وتقييم نشاطها كمضاد للميكروبات. تم عزل البكتيريا المخاطية بطريقة الافتراس وطريقة ورق الترشيح، وأظهرت النتيجة أنه تم الحصول على 26 عزلة من البكتيريا المخاطية، ولوحظ أعلى محصول للعينات المأخوذة من تربة غرداية وتمنراست. أكد الوصف المورفولوجي أن هناك أجساماً للفاهكة بأحجام وألوان مختلفة (أبيض، أصفر، برتقالي، شفاف، بني) ومستعمرات منتشرة على سطح الأجار على شكل أسراب (شكل أسراب). يشير النشاط المضاد للبكتيريا المخاطية إلى أن جميع العزلات أظهرت نشاطاً ضد سلالة مرجعية واحدة على الأقل، وأهمها السلالة التي تم عزلها من منطقة تمنراست بطريقة الافتراس حيث أظهرت نشاطاً ضد جميع السلالات المختبرة. تعترف هذه الدراسة بوجود البكتيريا المخاطية في الصحراء الجزائرية.

**الكلمات المفتاحية:** التربة، البكتيريا المخاطية، نشاط مضاد للمكروبات.

## Abstract:

The microorganisms have been shown to be rich in potentially useful secondary metabolites. These microorganisms produce a wide range of structurally diverse natural products with important biological activities such as certain antibiotics, antifungals. This work aims to isolate and purify myxobacteria from rhizospheric soil of the date palm collected from different Saharan areas of Algeria (Laghouat, Ghardaïa, El-Menia and Tamanrasset) and to evaluate their antimicrobial activity. The isolation of the myxobacteria was carried out by the predation method and the filter paper method, the result indicates that 26 isolates of the myxobacteria were obtained, the highest yield was observed for the samples taken from soil of Ghardaïa and Tamanrasset. The morphological description confirmed that there are fruiting bodies with varying sizes and different colors (white, yellow, orange, transparent, brown) and colonies spread out on the surface of the agar in the form of swarms (form of swarming). The antimicrobial activity of the myxobacteria indicates that all isolates showed activity against at least one reference strain, the most important strain is E5M1Cb since it showed activity against all the strain tested. This study recognizes the presence of Myxobacteria in the Algerian desert.

**Key words:** Soil, Myxobacteria, Antimicrobial activity.

## Résumé :

Les microorganismes sont avérés être riche en métabolites secondaires potentiellement utiles. Ces microorganismes produisent une vaste gamme de produits naturels structurellement divers avec des activités biologiques importantes comme certains antibiotiques, antifongiques. Ce travail vise à isoler et à purifier les myxobactéries à partir du sol rhizosphère du palmier dattier collectés de différences zones sahariennes d'Algérie (Laghouat, Ghardaïa, El-Menia et Tamanrasset) et à évaluer leur activité antimicrobienne. L'isolement des myxobactéries réalisé par la méthode de prédation et la méthode de papier filtre, le résultat indique qui on a obtenu un total de 26 isolats des myxobactéries, le rendement le plus important a été observé pour les échantillons prélevées à partir de sol de Ghardaïa et Tamanrasset. La description morphologique a confirmé qu'il y a des corps fructifié avec des tailles variables et des couleurs différentes (blanc, jaune, orange, transparent, marron) et des colonies étalé sur la surface de la gélose en forme d'essaims (forme de swarming). L'activité antimicrobienne des myxobactéries indique que tous les isolats ont montré une activité contre au moins une souche de référence, la souche la plus importante est la souche qui isolé à partir de la zone de Tamanrasset par la méthode de prédation puisqu'elle a montré une activité contre toute les souches testées. Cette étude reconnaît la présence de Myxobactéries dans le désert algérien.

**Mots clés :** Sol, Myxobactéries, Activité antimicrobienne.

## Table des matières

Remerciement.....	
Dédicace .....	
Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des abréviations.....	III
Résumé.....	IV
Table des matières .....	IV
Introduction.....	1
Recherche Bibliographie.....	4
1. Historique : .....	5
2. Biologie des Myxobactéries : .....	5
2.1 Morphologie et Structure : .....	5
2.2 Cycle de vie : .....	9
3 Génome et phylogénie : .....	10
4 Distribution et Ecologie : .....	11
5 Métabolisme secondaire des Myxobactéries : .....	13
5.1 Biosynthèse des métabolites secondaires : .....	13
5.2 Applications : .....	15
Matériel et Méthode.....	16
1. Prélèvement et traitement des échantillons : .....	17
2. Isolement des myxobactéries : .....	18
2.1. Isolement par la méthode de prédation : .....	18
2.2. Isolement par la méthode de papier filtre : .....	19
3. Purification des myxobactéries : .....	20
4. Conservation : .....	21
5. Evaluation du pouvoir antimicrobien : .....	21
5.1. Les microorganismes utilisé pour déterminée l'activité des myxobactéries : .....	22
5.2. préparation de la suspension microbienne : .....	22
5.3. L'activité d'antagoniste : .....	22
Résultats et Discussion.....	23
1. Isolements et purification : .....	24
2. Caractère morphologique : .....	26
2.1 Corps de fructification : .....	26
2.2 Colonies des souches de myxobactéries : .....	28
2.3 Aspects microscopiques : .....	29
3. Activité antimicrobienne des myxobactéries : .....	30
Conclusion.....	35
Références Bibliographie.....	38
Les annexes.....	46

# **Introduction**

## Introduction

---

La résistance aux antimicrobiens (RAM) deviennent plus fréquentes et sont de plus en plus difficiles à traiter et, par conséquent, elle est maintenant considérée comme une menace croissante pour la santé dans le monde. Sans intervention, la RAM pourrait causer l'émergence de certaines maladies telles que les maladies chroniques, cardiovasculaires, cancéreuses, ont souligné une urgence et ont poussé les scientifiques à lancer des recherches pour découvrir de nouvelles substances bioactives (Hargraves, S, *et al*, 2020).

Au cours des deux dernières décennies, les myxobactéries sont considérées comme une source majeure de molécules bioactives (Wenzel et Muller 2007). En effet, les céramides et les cérobroside ont été isolés à partir de l'espèce *Cystobacter fuscus*, alors que l'antibiotique TA a été purifié à partir de *Myxococcus xanthus*... (Shimkets L.J *et al*, 2006).

Les myxobactéries sont des bacilles à Gram négatif. En raison de leur mouvement, les colonies se développent sous forme d'essaims (swarms) minces et étalés. (Dworkin, 1984 ; Garcia *et al*, 2009).

Il s'est avéré généralement que les nouvelles souches bactériennes sont souvent une source fiable pour de nouveaux métabolites secondaires, en effet, un nouvel isolat doit contenir des nouveaux clusters de gènes par lequel la bactérie devient capable de biosynthétiser des nouvelles molécules (Ahmed *et al* 2016). Donc notre travail vise surtout à isoler des nouvelles souches myxobactériennes, qui constituent une source de molécules bioactives mal exploitée, à partir du sol de la rhizosphère du palmier dattier localisé dans les zones arides du désert algérien connu par leur climat chaud et sec. Ensuite, une évaluation de l'activité antimicrobienne des souches de myxobactéries obtenues est réalisée. Les myxobactéries isolées à partir du sol du Sahara Algérien ne sont jamais exploitées comme source de métabolites secondaires, ce qui permet d'augmenter la chance d'avoir de nouvelles souches qui produisent de nouveaux métabolites bioactifs.

Afin d'arriver au but fixé, nous avons suivi la méthodologie suivante :

- ✓ L'isolement et la purification des myxobactéries à partir des échantillons de sol Rhizosphérique du palmier dattier prélevés de différentes zones du Sahara

## Introduction

---

algérien (De la porte du désert "Laghouat " vers Ghardaïa, El-Menia jusqu'à Tamanrasset).

- ✓ Evaluation de l'activité biologique des isolats obtenus, contre certaines souches bactériennes et une seule souche fongique qui sont pathogènes pour la santé humaine.

# **Recherche Bibliographique**

### 1. Historique :

Les myxobactéries appartiennent à la Deltaproteobacteria, qui contient également les genres *Bdellovibrio*, *Geobacter*, *Pelobacter*, *Anaeromyxobacter* et certains réducteurs de sulfate tels que *Desulfovibrio* et *Desulfonema*. Environ 50 espèces de myxobactéries ont été attribuées à dix-sept différents genres (**Dworkin M et al. ,2006**).

La première myxobactérie, *Polyangium vitellinum*, a été découverte et nommé par le botaniste allemand **Link H.F** relié en **1809** qui considérait la fructification comme un gastromycète. En **1857**, le biologiste britannique **Berkeley M.J** découvre et nomme deux autres genres et espèces, *Stigmatella aurantiaca* et *Chondromyces crocatus* qu'il classés comme hyphomycètes. Le botaniste américain **Thaxter R**, en **1892**, fut le premier à identifier ces espèces comme myxobactéries et décrire leurs cycles de vie.

Plusieurs études sur Ces bactéries ont suivi depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, nouveaux axes de recherche sur les myxobactéries ont été introduits comme la biologie du développement par **Dworkin et Gibson, 2010** et la génétique moléculaire par **Kaiser et al, 2002**. Un nouveau champ a été ouvert par la découverte de métabolites secondaires biologiquement actifs par **Reichenbach, 1996**. Ces myxobactéries étant recherchés au niveau du sol par **Dawid en 2000** même la taxonomie de ces derniers par **Mohr en 2018**.

### 2. Biologie des Myxobactéries :

#### 2.1 Morphologie et Structure :

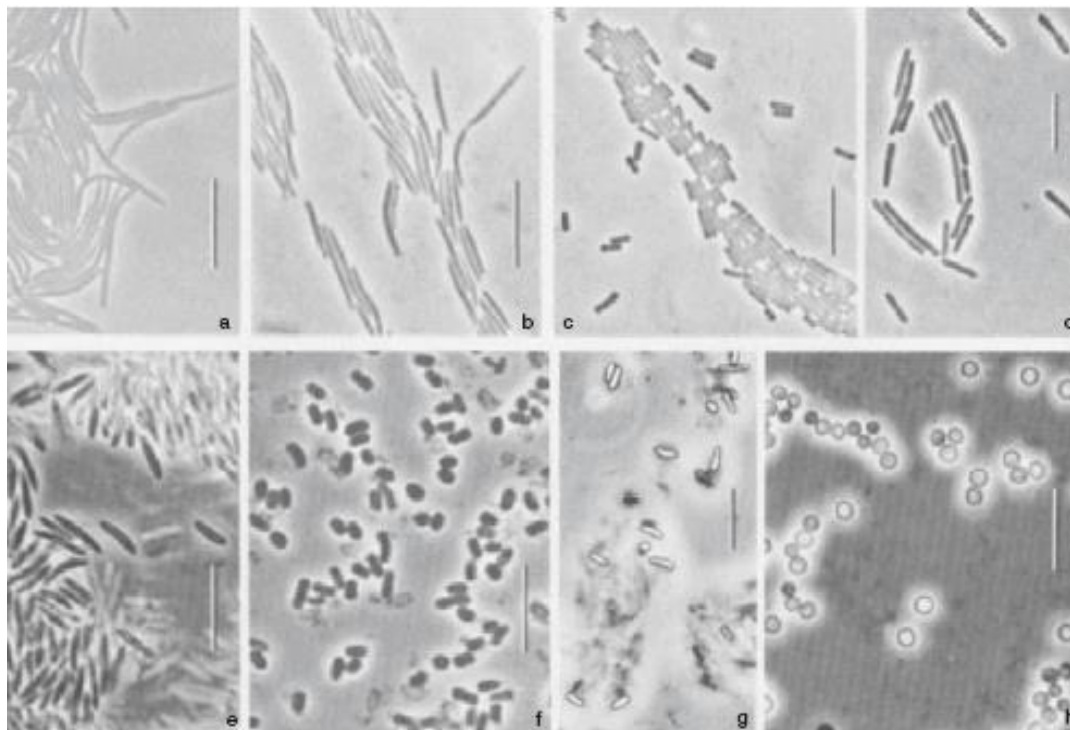
Les cellules des myxobactéries sont des bâtonnets de taille moyenne, selon les espèces elles mesurent 0,6-0,9 µm de large et 3-8 µm de long. Les cellules végétatives se présentent sous deux types différents :

- ❖ Cellule de type I : tiges minces, généralement inclinées, flexibles 1µm de diamètre et jusqu'à 20 µm de longueur (sous-ordre : Cystobactéries).
- ❖ Cellule de type II : tiges rigides cylindriques aux extrémités arrondies vers le haut 1 µm de large et jusqu'à 10 µm de long (sous-ordre Sorangineae).

## Recherche bibliographie

---

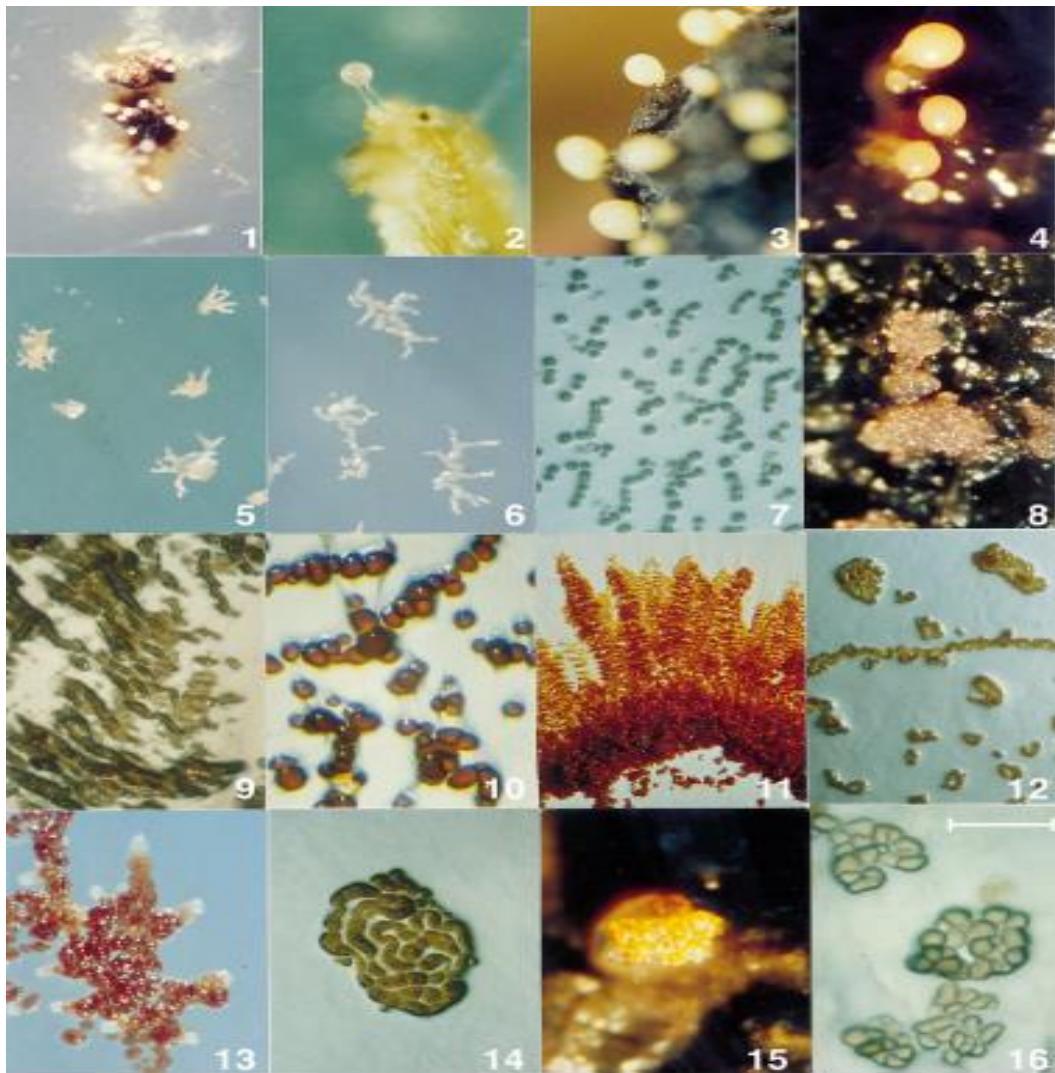
La forme des cellules végétatives ainsi que celle des myxospores est utilisé pour la détermination (**Figure 1**), donc généralement permettant une première identification systématique (**Dawid W., 2000**).



**Figure 1** : Différents types de cellules myxobactériennes. (a – d) Cellules végétatives. a) *Cystobacter ferrugineus*, b) *Stigmatella aurantiaca*, c) *Chondromyces crocatus*, d) *Sorangium compositum*. (e – h) Myxospores des membres des *Cystobacterineae*. e) Myxospores de *Cystobacter ferrugineus*, f) Myxospores de *Cystobacter velatus*, g) Myxospores induites expérimentalement de *Stigmatella aurantiaca*, et h) myxospores provenant d'un organe de fructification *Myxococcus xanthus*. Toutes les photographies sont en contraste de phase. Barres= 10micro m. (**Shimkets L.J et al, 2006**).

La plupart des myxobactéries ont une partie de «développement» de leur cycle de vie, qui est la capacité de développer des structures multicellulaires tridimensionnelles complexes appelées organes de fructification\_(FB) qui contiennent des myxospores en réponse à la famine. Les FB sont disponibles dans de nombreuses couleurs (rouge, jaune et orange), formes (monticules à structures arborescentes) et tailles (10  $\mu\text{m}$  à 1 mm).

Les myxobactéries forment des fructifications, qui affichent couleurs et sont donc souvent identifiés avec l'œil nu (**Dawid W., 2000**).

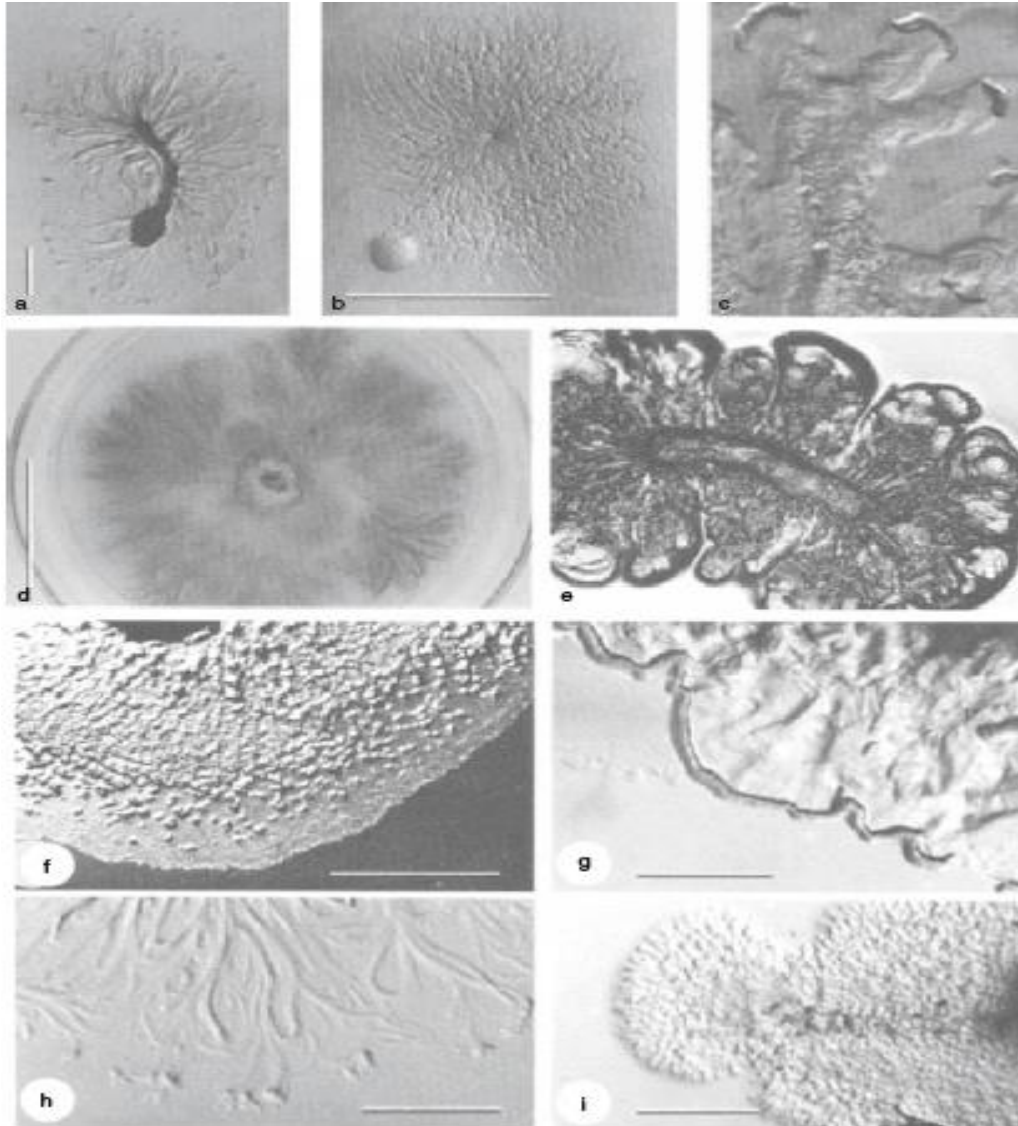


**Figure 2 :** Fructifications myxobactériennes. 1 : *Mx. fulvus*, 2 : *Mx. stipitatus*, 3 : *Mx. virescens*, 4 : *Mx. xanthus*, 5 : *Cc. coralloides*, 6 : *Cc. exiguus*, 7 : *An.disciformis*, 8 : *Ar. gephyra*, 9 : *Ar. serpents*, 10 : *Cb. fuscus*, 11 : *Cb. ferrugineus*, 12 : *Cb. moins*, 13 : *Cb. violaceus*, 14 : *Cystobacter spec*, 15 : *Pl. aureum*, 16 : *pl. compositum*, LM (bar = 240  $\mu$ m). Abréviations : LM, microscope optique (lumière transmise et incidente) ; SM, stéréo microscope (transmis et lumière incidente). (**Dawid W., 2000**).

Les myxobactéries présentent un comportement social exprimé par l'absorption collective de nourriture, la motilité coopérative et le développement social (**Dworkin, M., 1996 et Shimkets, L.J., 1990**) Sur les surfaces solides mais aussi à l'interface eau-air, ils montrent un mouvement de glissement. Ce mouvement s'accompagne d'une flexion des cellules et d'une sécrétion de mucus. La vitesse de glisse est de 10 à 60  $\mu$ m/min. (**Lünsdorf, H. et Reichenbach, H., 1989, Burchard, R.P. 1984**).

## Recherche bibliographie

Les cellules affamées orchestrent leur comportement de glissement et se relaient les signaux pour atteindre une densité cellulaire élevée nécessaire à la construction du FB. Ce déplacement fait sur milieu solide en formant des colonies à aspect caractéristique de (swarming) ou essaim (**Dworkin 1966 ; Reichenbach 2005**).



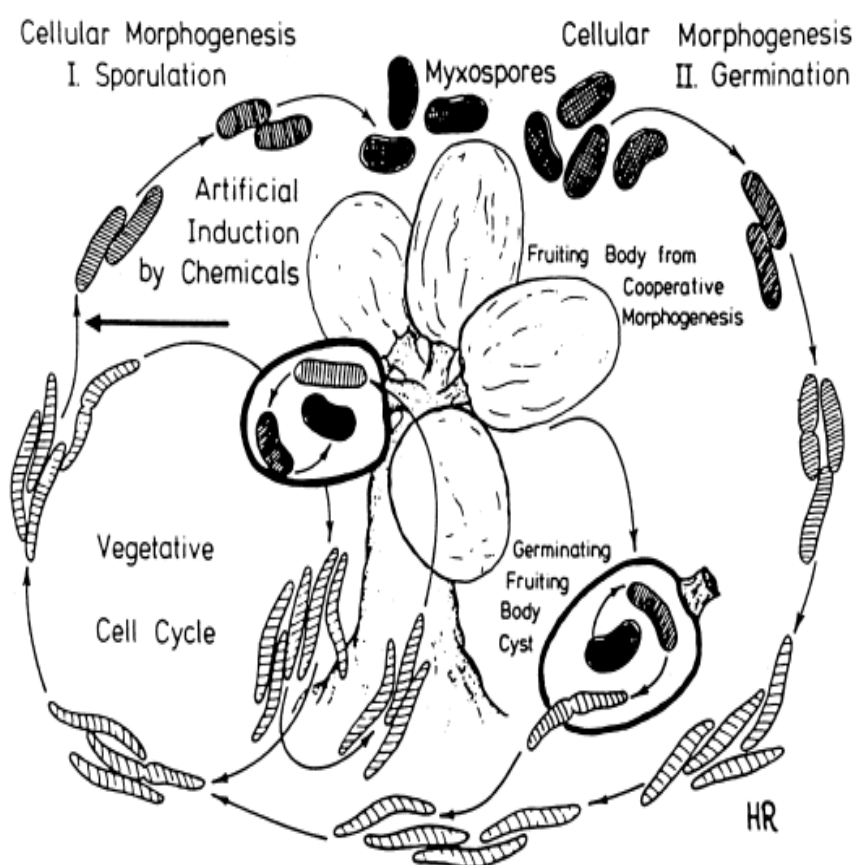
**Figure 3 :** Essaim de colonies de diverses myxobactéries. (a, b, d, f et h) Essaims de membres des *Cystobacterineae*. (c, e et g) Essaims de membres des *Sorangineae*. i) Essaims de membres des *Nannocystineae*. a) *Stigmatella erecta*, b) *Myxococcus xanthus*, c) *Polyangium sp*, d) *Cystobacter violaceus*, e) *Nannocystis exedens*, f) *Corallocooccus coralloides* (**Reichenbach, 2005**). g) *Polyangium sp*, h) *Stigmatella erecta*, i) *Nannocystis exedens* ; tout l'essaim a sombré dans la gélose qui est profondément corrodée ; microscope à dissection, éclairage oblique. Barre = 2  $\mu$ m (**Shimkets L.J et al, 2006**).

### 2.2 Cycle de vie :

La capacité à former des fructifications est la plus évidente et propriété la plus intéressante des myxobactéries (**Dawid W., 2000**).

Lors que les nutriments sont rares, les cellules de myxobactéries s'agrègent pour former des corps de fructification (FB), un processus désormais considéré comme une forme de signalisation cellulaire par contact. Ces corps de fructification (FB) peuvent prendre différentes formes et couleurs selon l'espèce. Au sein des corps de fructification, les cellules sont d'abord dans un état végétatif et on forme de bâtonnets, puis se développent en myxospores de forme rondes avec d'épaisses paroi cellulaire.

La forme des cellules végétatives ainsi que celle des myxospores est utilisé pour la détermination, donc généralement permettant une première identification systématique (**Dawid W., 2000**).



**Figure 4** : La morphogénèse cellulaire des myxobactéries, illustrée par l'exemple de *Stigmatella aurantiaca* (**Gerth, K. and Reichenbach, H. (1978)**).

### 3 Génome et phylogénie :

Le génome des myxobactéries est un anneau bactérien typique chromosome, et avec 9450 kpb, il a environ deux fois plus taille de celle d'*Escherichia coli* et environ la taille de celle du genre *Streptomyces* (Dawid W., 2000).

Les myxobactéries ont des génomes géants de très grande taille qui est mesurée par 9 à 10 millions nucléotides, la teneur élevée en G+C est typiquement caractéristique des myxobactéries, et probablement une adaptation pour résister aux expositions périodiques à des niveaux élevés de rayonnement ultraviolet. Le génome est complexe assez grand pour une bactérie et cette masse peut avoir une certaine relation avec son style de vie (Yee et Inouye., 1982).

La taxonomie des myxobactéries est basée principalement sur les caractéristiques morphologiques : les cellules végétatives (forme, taille), les colonies de swarming et spécifiquement les corps de fructification (forme, taille, couleur et structure) (Reichenbach 2005).

La position phylogénétique des myxobactéries a été mise sur une base solide par l'ARNr/ADN 16S études (Ludwig et, 1983 ; Shimkets et Woese, 1992 ; Sproer et al, 1999). Ces études ont montré que les myxobactéries sont un groupe cohérent appartenant à la classe de Deltaproteobacteria, phylum de proteobacteria, et que les plus proches voisins sont d'une façon inattendue *Bdellovibrio* et les anaérobies strictes sulfato-réducteurs (Stackebrandt et al, 1988).

Également évident est que l'ordre Myxococcales est divisé en trois sous-ordres : une division majeure qui sépare les sous-ordres *Cystobacterineae* et *Sorangineae* (Reichenbach, 1974b) et un deuxième séparant les *Nannocystineae* (Reichenbach, 2005).

Actuellement les 3 sous ordres comportent de 10 familles, 29 genres et 58 espèces (Mohr 2018).

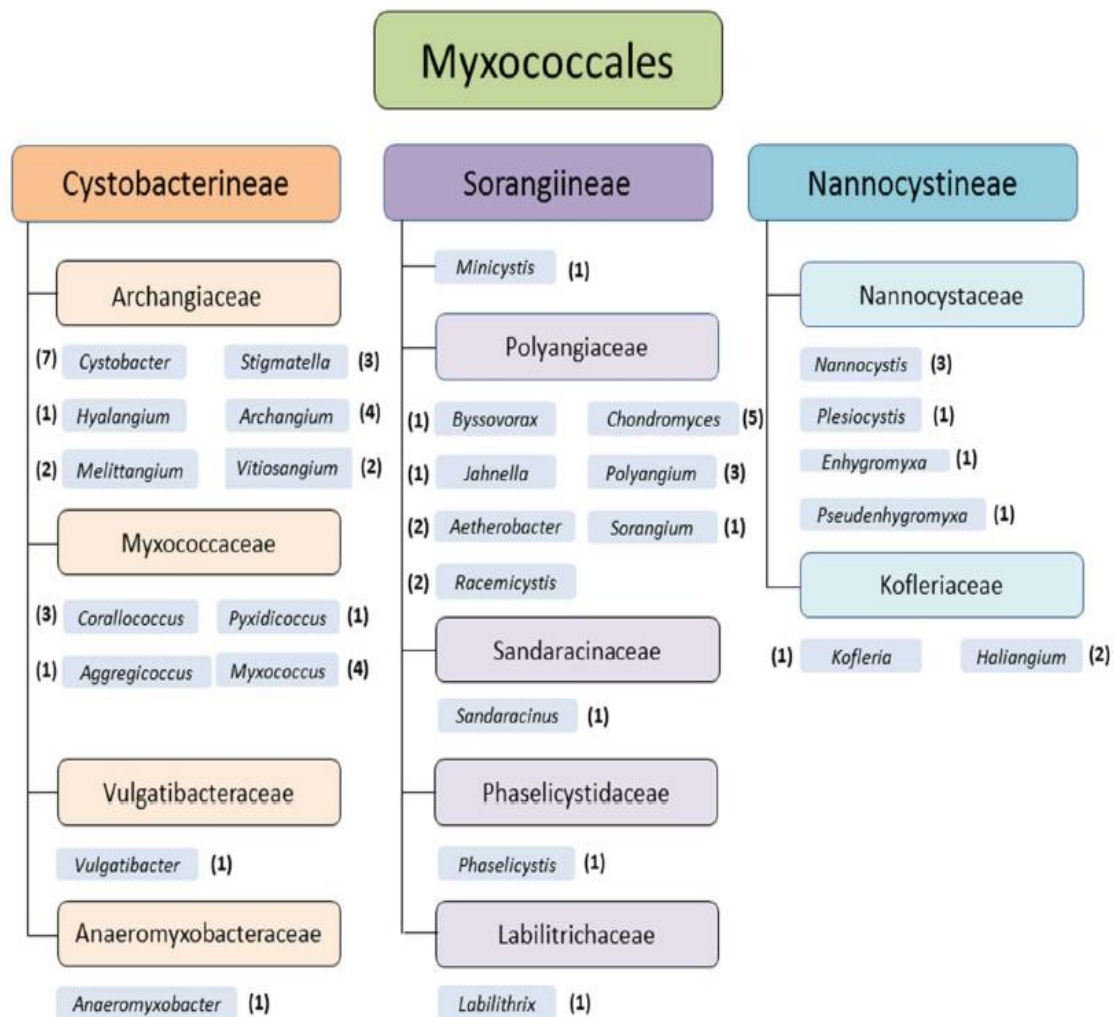


Figure 5 : Taxonomie actuelle de l'ordre des Myxococcales. Mohr (2018).

#### 4 Distribution et Ecologie :

Les myxobactéries sont des bactéries glissantes que l'on trouve presque partout dans la biosphère, où elles se nourrissent de matières vivantes et en décomposition.

Les principaux habitats des myxobactéries sont la terre, la bouse, la matière végétale en décomposition et l'écorce d'arbres vivants et morts. Néanmoins, les myxobactéries ont été isolées des milieux marins ainsi que d'une variété de climats zones (Dawid W., 2000). Cependant, puisque les myxospores peuvent tolérer des conditions environnementales considérables extrêmes, et puisque la plupart des techniques d'isolement impliquent la culture d'échantillons qui ont été largement séchés, il n'a pas été possible de déterminer, dans de nombreux cas, si les myxobactéries étaient là par

## Recherche bibliographie

hasard et ont simplement sur vécu forme de spores ou grandissaient et prospéraient dans cet environnement (**Reichenbach H., 1999**).

Dans quelques cas, les organismes isolés ont été testés pour leur capacité à croître dans des conditions similaires à ceux dans lesquels ils étaient isolés. Parfois, ils ont pu (**Dawid et al, 1988**) mais plus souvent pas (**Rückert, 1983**).

**Iizuka et al. (1998)** ont isolé deux myxobactéries de milieux marins, qui ont été par la suite caractérisé et assigné au nouveau genre *Haliangium*.

Les organismes auraient besoin de 2% de Na Cl pour leur croissance. Cependant, puisque cette mesure a été faite sur la base de l'expansion des essaims de colonies plutôt que la croissance en soi, la demande doit être regardée avec prudence. (**Fudou et al. 2002**). Une étude des sources communes pour différentes myxobactéries est donnée dans dessous :

**Tableau 1** : Sources pratiques et préférentielles pour l'isolement de différentes myxobactéries (**Shimkets, L.J., et al, 2006**).

Substrate	Myxobacterial species typically found <sup>b</sup>
Soil	<i>Nannocystis exedens</i> , <sup>5</sup> <i>Sorangium cellulosum</i> , <sup>4</sup> <i>Archangium serpens</i> , <sup>4</sup> <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <sup>4</sup> <i>Polyangium</i> spp., <sup>3</sup> <i>Cystobacter</i> spp., <sup>3</sup> <i>Melittangium</i> spp., <sup>3</sup> <i>Myxococcus fulvus</i> , <sup>2</sup> <i>Mx. virescens</i> , <sup>2</sup> and <i>Mx. stipitatus</i> <sup>2</sup>
Dung of herbivores	<i>Myxococcus fulvus</i> , <sup>5</sup> <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <sup>5</sup> <i>Mx. virescens</i> , <sup>4</sup> <i>Cystobacter fuscus</i> , <sup>4</sup> <i>Cb. ferrugineus</i> , <sup>4</sup> <i>Archangium serpens</i> , <sup>4</sup> <i>Nannocystis exedens</i> , <sup>3</sup> <i>Cb. violaceus</i> , <sup>3</sup> <i>Polyangium</i> spp., <sup>3</sup> <i>Stigmatella erecta</i> , <sup>2</sup> <i>Mx. xanthus</i> , <sup>2</sup> <i>Melittangium</i> spp., <sup>2</sup> and <i>Cb. velatus</i> <sup>1</sup>
Bark and rotting wood	<i>Stigmatella aurantiaca</i> , <sup>4</sup> <i>Chondromyces apiculatus</i> , <sup>4</sup> <i>Sorangium cellulosum</i> , <sup>4</sup> <i>Coralloccoccus coralloides</i> , <sup>4</sup> <i>Myxococcus fulvus</i> , <sup>3</sup> <i>Cm. pediculatus</i> , <sup>2</sup> and <i>Haploangium</i> spp. <sup>2</sup>

<sup>a</sup>The frequency of myxobacteria on a specific substrate may vary substantially in different environments. Furthermore, some species may be underestimated from a particular source because the isolation technique usually applied may not result in the isolation of a particular organism.

<sup>b</sup>Frequency of the encountered species: <sup>5</sup>, ubiquitous; <sup>4</sup>, very frequent; <sup>3</sup>, moderately frequent; <sup>2</sup>, relatively rare; and <sup>1</sup>, rare.

La plupart des myxobactéries semblent être principalement des organismes du sol. Cependant, presque tous sont des «micro prédateurs» (**Singh, 1947**) et sont attirés par les habitats avec riches communautés microbiennes, qu'elles peuvent coloniser comme substrats secondaires. Même si certain les myxobactéries peuvent être isolées plus facilement de sources autres que le sol, leur présence dans le sol du même environnement peut souvent être démontré.

Le substrat préféré d'un particulier les espèces peuvent varier sous différents climats et conditions édaphiques. (Nellis et Garner, 1964 ; Reichenbach H. observations non publiées)

### 5 Métabolisme secondaire des Myxobactéries :

La majorité des voies métaboliques secondaires analysées à ce jour impliquent des polyketides synthèses (PKS) et / ou des peptides non ribosomiques synthétases (NRPS), qui présentent des mécanismes de biosynthèse très inhabituels.

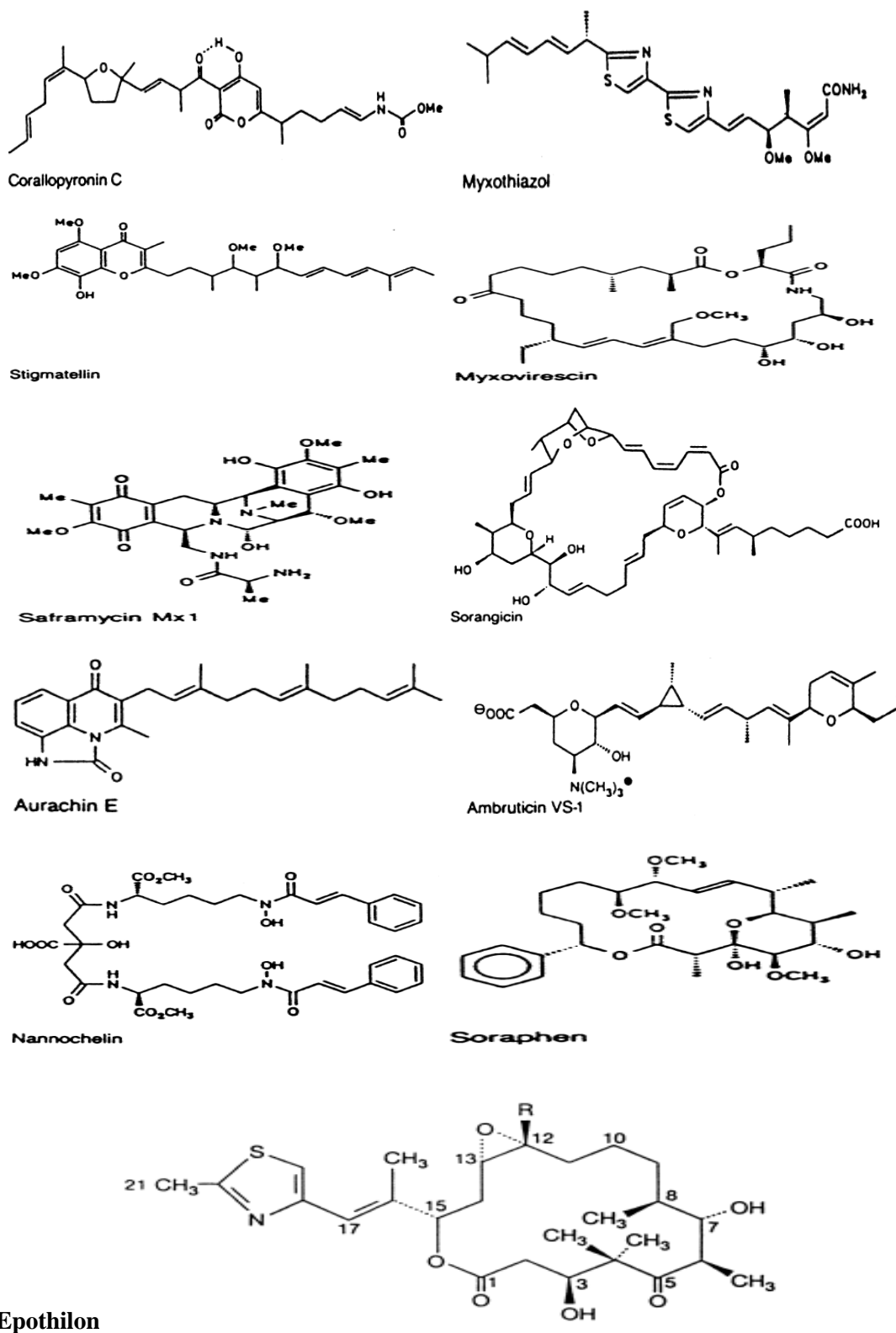
Environ 80% de tous les métabolites secondaires biologiquement actifs sont synthétisés par les procaryotes (par exemple *Streptomyces*, *Bacillus* et *Pseudomonas*), environ 20% par les eucaryotes (principalement des champignons). Quelque 10 000 composés bioactifs d'origine microbienne sont connus. Les myxobactéries produisent un grand nombre des molécules bioactives avec des activités antifongiques, antibiotiques et anti tumorales (Höfle, G. et Reichenbach, H., 1990).

Le potentiel biosynthétique des myxobactéries est plutôt prometteur : 50 à 100% de toutes les myxobactéries produisent des composés ayant des activités biologiques, appartenant à différentes les classes moléculaires telles que les polyketides d'acétate et de propionate, les peptides linéaires et cycliques, les composés hétérocycliques, etc. (Höfle, G. et Reichenbach, H., 1990) .La densité de gènes biosynthétiques des myxobactéries prédatrices est plus élevé qu'à non prédatrices(Korp et al, 2016).

#### 5.1 Biosynthèse des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires myxobactériennes appartiennent majoritairement aux classes des polyketides, polypeptides non ribosomiques et leurs hybrides (50% des composés sont des hybrides) ainsi qu'à d'autres classes de terpenoïdes, phénylpropanoïdes et alcaloïdes à moindre degré (Weissman et Muller., 2010).

La première structure chimique d'une myxobactérienne l'antibiotique l'ambrucitine est devenue connu (Connor, D.T et al, 1977), celui du myxothiazole formé par *Mx. fulvus* a suivi (Gerth, K et al, 1980).



**Figure 6** : Structures chimiques de certains métabolites secondaires bioactifs des myxobactéries (Höfle, G. et Reichenbach, H., 1990).

Durant la biosynthèse, l'utilisation de simples blocs de construction tel que les acides tricarboxyliques Coenzyme A et les acides aminés est indispensable pour l'assemblage du métabolite. Chaque méga enzyme est composé de modules fonctionnels qui se composent de domaines liés entre lesquels, ces derniers assurent les étapes de l'activation et la sélection de monomères, la liaison covalente de substrat, l'élongation de la chaîne et la libération. Typiquement chaque module est responsable à l'incorporation d'un bloc de construction dans la chaîne croissante du produit, en effet des modifications post synthétiques sont nécessaires pour l'activer (**Wenzel et Muller., 2007**).

### 5.2 Applications :

L'opportunité la plus prometteuse pour la biotechnologie applications avec des myxobactéries est dans la production de métabolites secondaires qui inhibent la croissance d'autres organismes. (**Oxford, 1947 ; Norén, 1953 ; Kato, 1955 ; Norén and Raper, 1962**).

Plusieurs des inhibiteurs myxobactériennes sont à l'étude pour une application potentielle et une production à grande échelle. Le plus prometteur d'entre eux est l'épothilone, qui est actuellement évalué dans le cadre d'essais cliniques humains de phase trois en tant que médicament anti tumoral par trois sociétés pharmaceutiques différentes (**Gerth et al, 1996**). Les isomères d'épothilone stabilisent les microtubules polymérisés, entraînant un arrêt mitotique et une cytotoxicité lors de la prolifération (**Bollag et al, 1995**).

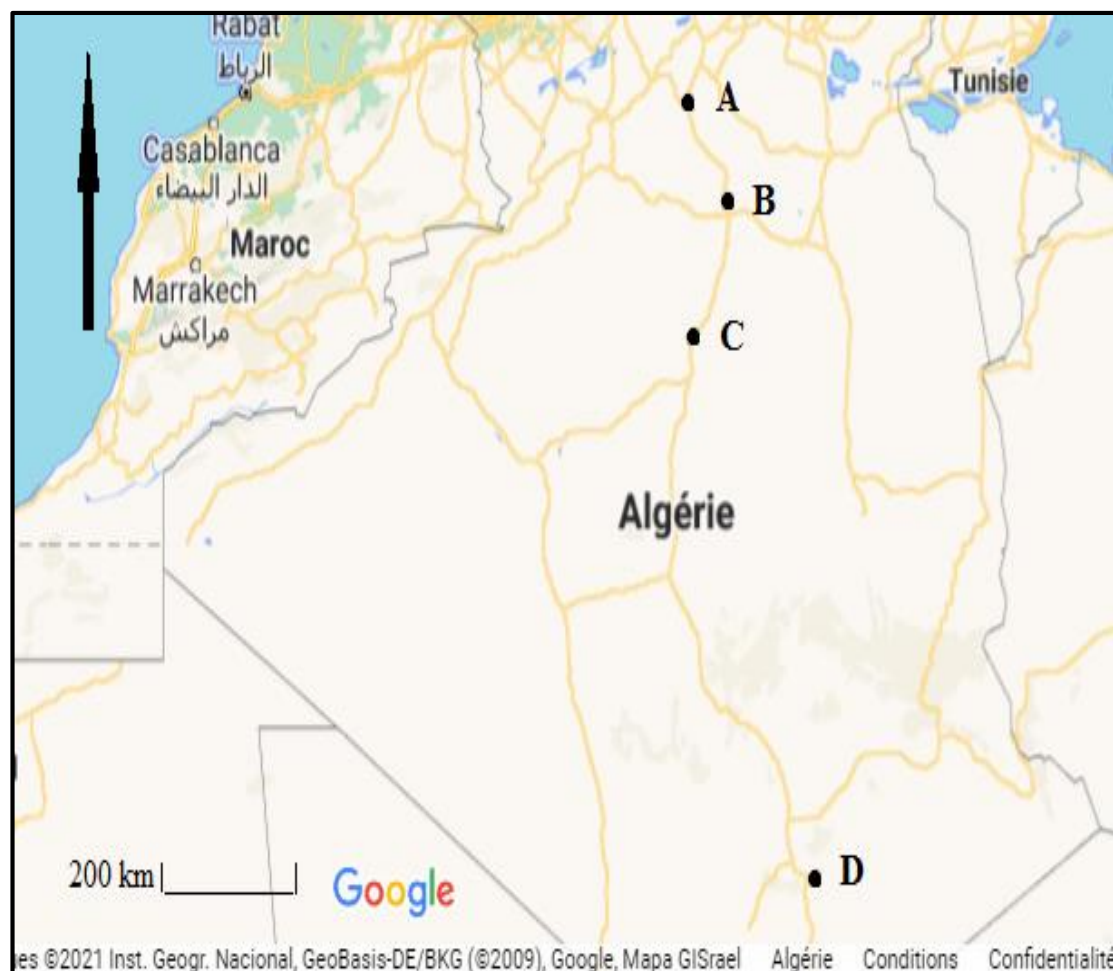
Les activités biologiques antibactériennes, antifongiques, antiviral, anti malaria, cytotoxique et même immunosuppressive et stimulatrice d'insuline des métabolites myxobactériens, aussi bien que leurs structures chimiques et modes d'action uniques sont à l'origine de leur grand intérêt pharmaceutique (**Mohr., 2018**).

D'autre part la synthèse des acides gras polyinsaturés récemment observée offre la possibilité de les utiliser pour le traitement de désordres cardiovasculaires, cérébrale ou en domaine industriel comme complètement additionné au plusieurs types des aliments et produits laitiers (**Garcia., 2011**).

# **Matériel et Méthodes**

### 1. Prélèvement et traitement des échantillons :

Quatre échantillons de sol Rhizosphérique du palmier dattier sont prélevés à partir de différentes zones situés dans le Sahara algérien (Laghouat, Ghardaïa, El-Menia et Tamanrasset) durant le mois de février et mars 2021. (**Figure 7**).



**Figure 7** : Carte géographique montrant les zones de prélèvement des échantillons (Google maps). **A** : Laghouat, **B** : Ghardaïa, **C** : El-Menia, **D** : Tamanrasset.

Selon la méthode de (**Reichenbach et Dworkin 1992**). Creuser les cinq premiers centimètres du sol à l'aide d'une spatule stérile après les échantillons est prélevés puis placés sur une feuille d'aluminium.

Les échantillons doit être séché à l'air pour éliminer les forme végétatives des microorganismes (**Reichenbach et Dworkin., 1992**). Aussi rapidement que possible car si non l'échantillon pourrait moisir, créant des problèmes plus tard pendant l'isolement.

### 2. Isolement des myxobactéries :

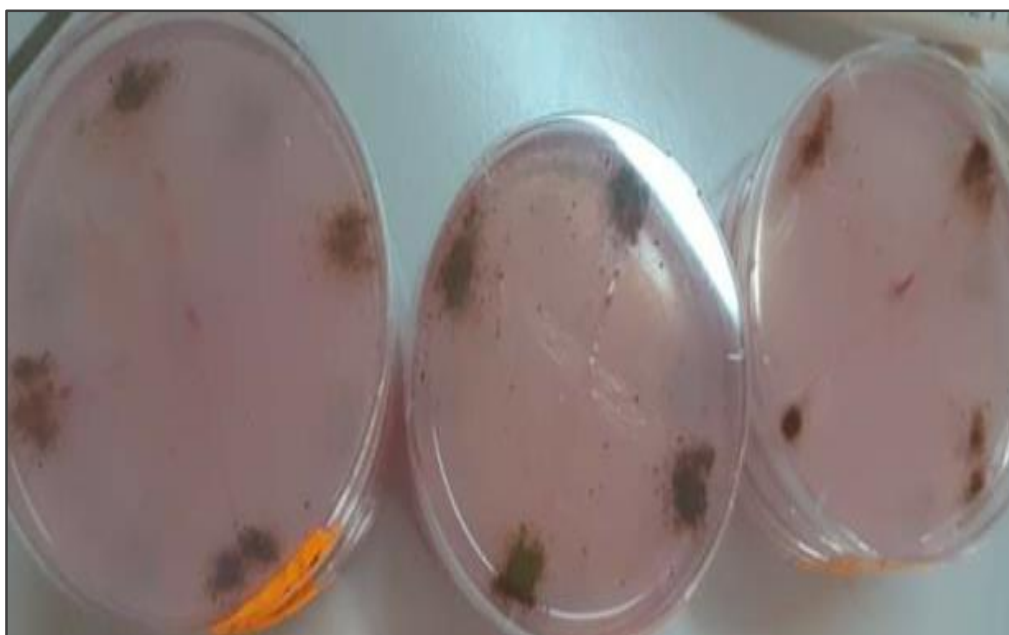
#### 2.1. Isolement par la méthode de prédation :

De nombreuses bactéries et levures peuvent être utilisées comme nourriture organismes par les myxobactéries. Organismes alimentaires qui sont facilement reconnaissables et peuvent être facilement éliminés plus tard sont, bien entendu, préférés. Les myxobactéries fonctionnent mieux si les microbes utilisés pour la prédation sont vivants plutôt que morts. Dans la première étude, une souche d'*Aerobacter* a été utilisée comme l'organisme alimentaire (Singh, 1947). Ces sont donc des prédateurs, pour l'isolement de ce dernier le milieu gélose à Léau « water agar » est utilisé avec *E. coli* vivant comme seule source de C et N (Kathrin et al 2017).

Comme le pH est très difficile à ajuster dans ce milieu complètement non tamponné, addition de 1 ml de solution tampon.

Additionné à ce milieu après stérilisation 1 ml d'une solution vitaminique et du 1 ml cycloheximide (0.25g de cycloheximide par 5ml Méthanol).

Puis le *E. coli* vivant doivent êtreensemencée sur les plaques de gélose à l'eau à l'aide d'un écouvillon en forme de croix, à la fin de ce croix un peu de matériel d'échantillonne de sol sèche est placé. Ainsi, nous gardons ces cultures à 30 ° C (Krzemieniewska et Krzemieniewski, 1927b), pendant 10 à 15 jours. (Figure 8).



**Figure 8 :** Isolement des myxobactéries par la méthode de prédation à partir du sol.

### 2.2. Isolement par la méthode de papier filtre :

Pour l'isolement des myxobactéries dégradant la cellulose, une gélose minérale avec de la cellulose comme seule source de carbone est utilisée. Alors que  $\text{NH}_4^+$  est une excellente source d'azote pour, bien meilleurs résultats sont obtenus quand  $\text{NO}_3^-$  est utilisé dans le milieu d'isolement, comme dans Gélose ST21. (Shimkets, L. J et al, 2006).

Le milieu ST21 préparée à partir de deux solution A et B que autoclaves séparément, le PH de chacun est ajusté à 7,2 avant la stérilisation. Puis combinée les solutions A et B (2/3 solution A, 1/3 solution B) et ajoutée 1 ml de solution trace d'élément.

La cellulose est appliquée sous la forme de papier filtre (Whatman 1  $\text{cm}^2$ ) stérile, qui est placé au-dessus de la surface de la gélose (Shimkets, L. J et al, 2006). À raison de 3 à 4 morceaux par boîte. Sur le papier filtre un peu d'échantillon de sol est placé.

Puisque les cultures doivent être incubées plus longtemps (30 °C pendant 10 à 15 jours) avant la cellulose décomposeurs peut être reconnue, inclusion de le cycloheximide dans le milieu est essentielle (Shimkets, L. J et al, 2006).



**Figure 9** : Isolement des myxobactéries par la méthode de papier filtre à partir du sol.

### 3. Purification des myxobactéries :

Dans le cas le plus simple, des cultures pures de myxobactéries peut être obtenu en une seule étape à partir du corps de fructification, qui contiennent généralement une population de myxospores, au moins tant qu'elles sont jeunes. (**Shimkets, L. J et al, 2006**).

Lors de premières étapes de purification en transférant soigneusement par une seringue (de 1 ml qui peut être stérilisée et flambée à chaque fois) le corps de fructification de la boîte d'isolement mise sous la loupe binoculaire, au milieu WA avec *E. coli* mort (préparée en suspension autoclavée puis étalées en tapis à la surface de milieu par un écouvillon).

Parfois, les organes de fructification transférés ne germer. Cela peut arriver, par exemple, si les organes de fructification trouvés sur un granulé de fumier ont été identifié comme une espèce bactériolytique et ont donc été transférés dans un frottis bactérien, alors qu'en réalité les organes de fructification avait été produit par un dégraisseur de cellulose (**Shimkets, L. J et al, 2006**).

Avec la tête pointue de seringue, le corps fructifié peut-être piqué délicatement et placé dans la nouvelle boîte. (**Shimkets, L. J et al, 2006**). Les étapes ultérieures consistent au repiquage successif jusqu'à l'obtention des colonies pures, il est effectué par la pipette pasteur en prélevant de l'inoculum de première purification et l'ensemencant en striés dans le milieu VY/2 et l'incubée à 30 C° pendant 10jours. la pureté de l'isolat peut être vérifiée au microscope,

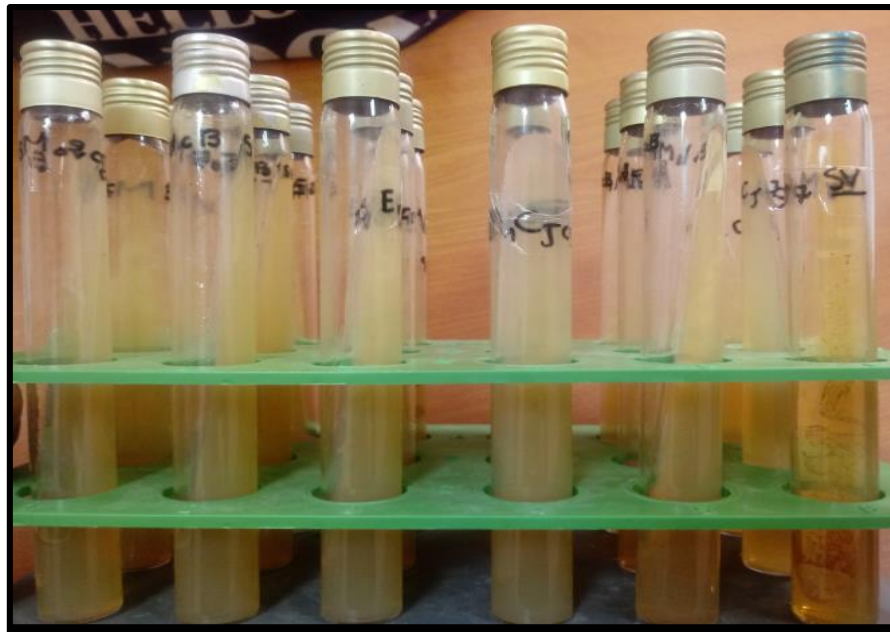
Les frottis bactériens sont mieux inoculés à leur bord pour que le développement essaim ait également une chance de se propager sur la surface de gélose libre, ce qui donne parfois une meilleure séparation des contaminants (**Shimkets, L. J et al, 2006**). Nouveaux transferts peut être fabriqué à partir des sections les plus pures de les essaims en développement, de préférence bord de l'essaim, jusqu'à l'obtention d'essaims qui semblent suffisamment pur pour justifier un transfert vers un dernier milieu CY et incubée toujours à 30 C° pendant 10 jours.

### 4. Conservation :

Une méthode excellente pratiquée pour la conservation des myxobactéries est conservées dans le milieu VY/2 à température ambiante ou à 30°C restent généralement viables pendant environ 2 à 3 semaines. Stockage de telles cultures à 4°C entraîne une perte rapide de viabilité.

Les myxospores sur milieu gélosé peuvent induire avec succès la germination des spores même après plusieurs années de stockage (**Shimkets, L. J et al, 2006**). Si des organes de fructification sont produits, les cultures resté viables pendant beaucoup plus longtemps.

Nous remplissons des quantités de 10 ml de milieu VY/2 dans ampoules en verre stériles puis inclinée ces tubes jusqu'a gélifiée. Ensuite nous ensemençons les souches myxobactériennes qui présent une activité anti microbiennes et incubés à température 30°C pendant 7jours et transférant à température ambiante pendant longtemps.



**Figure 10 :** Conservation des souches myxobactériennes dans le milieu VY.

### 5. Evaluation du pouvoir antimicrobien :

L'évaluation de l'activité antagoniste des isolats des myxobactéries basée sur des tests qui réalésé sur milieu solide contre quel qu'une souche bactérienne et certaine champignon.

### 5.1. Les microorganismes utilisés pour déterminer l'activité des myxobactéries :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne les extraits ont été testés contre trois bactéries à gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*) et deux bactéries à gram négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas auroginosa*), ainsi que une seule levure (*Candida albicans* IP444).

### 5.2. Préparation de la suspension microbienne :

On prépare l'inoculum par le milieu BHIB à partir des cultures jeune de 18 h de manière que la charge microbienne soit  $10^8$  cellules / ml qui correspond à une absorbance entre 0,08 et 0,1 sur la longueur d'onde 620 nm du spectrophotomètre. Dans chaque suspension la charge des cellules est ajusté jusqu'à arriver à celle désiré. Ensuite cette charge qui obtenir est ensemencée en tapis sur le milieu Muller-Hinton à l'aide d'un écouvillon.

### 5.3. L'activité d'antagoniste :

L'activité des isolats est effectuée par la méthode des cylindres d'agar (Xie et al. 2005 ; Kumar et al, 2012).

Dans cette méthode, les souches de myxobactéries sont ensemencées en stries serrées à la surface de milieux gélosés (CY), coulés en boîtes de Pétri. Après incubation à 30°C pendant sept jours, pour chaque souche étudiée et sur le milieu de culture utilisé, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce. Les cylindres d'Agar sont déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les bactéries tests (souches de référence).

Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant deux heures pour permettre un pré diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures (Gungi et al, 1983).

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après les 24 heures d'incubation ensuite comparés afin de conclure si le diamètre des cylindres d'Agar a un effet significatif ou non sur les résultats du test d'activité antibactérienne.

# **Résultats et Discussion**

### 1. Isolements et purification :

Le but principal de notre travail est l'isolement et la purification des myxobactérie à partir des échantillons du sol prélevé de la rhizosphère du Sahara Algérien. En effet, ces microorganismes sont connus par production des molécules bioactives.

Quatre échantillons de sol rhizosphérique séché de palmier dattier collectés à partir de quatre zones sahariennes de l'Algérie partageant le même caractère d'un climat aride, ont été utilisés pour l'isolement des myxobactéries par la méthode de proie bactérienne (*E coli* vivante) et la méthode de papier filtre. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2** : les résultats d'isolement de myxobactéries à partir de différents échantillons du sol, par l'utilisation de deux méthodes d'isollements : M1 : la méthode de proie bactérienne, et M2 : la méthode de papier filtre.

Zone d'échantillon	A : Laghouat		B : Ghardaïa		C : El-Menia		D : Tamanrasset	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
	2	0	5	4	2	4	5	4
<b>Totale des isolats</b>	2		9		6		9	

Un totale de 26 isolats de myxobactéries ont été obtenues à partir de différents échantillons du sol.

Les résultats d'isolement de myxobactéries obtenu similaire avec les travaux ultérieurs, en effet, **Charousova et al (2017)**, qui pu isoler 45 souches de myxobactéries à partir de 10 échantillons provenant de sols forestiers, agricoles et alpins de Slovaquie.

D'une autre part, **Wang et al, (2020)** ont isolée 21 myxobactéries à partir de sols forestiers acides de Dinghushan de pH 3,6 à 4,5 par l'utilisation de la méthode standard de culture.

**Zhang et al, (2012)** ont isolées et identifiées un total de 58 souches de myxobactéries à partir de 25 échantillons de sol collectés à partir des régions d'Akesu au Xinjiang (la Chine).

La comparaison entre les deux méthodes d'isolement utilisés indique que la méthode par prédation était plus efficace (14 isolats obtenus) par rapport à la deuxième méthode par papier-filtre (12 isolats obtenus). Ces résultats indiquent que le sol du désert algérien est très riche en myxobactéries prédatrices par rapport aux myxobactéries cellulolytique, en effet, ces derniers sont plus abondants dans les régions caractérisées par leur richesse en sources nutritionnelles, comme les forêts. Alors que les sols localisés dans les régions sahariennes, sont caractérisés par un épuisement des sources nutritionnelles, donc les myxobactéries qui habitent dans ces régions utilisent généralement la prédation pour se nourrir.

Cette méthode de prédation est parmi les techniques standards d'isolement largement utilisées et décrites dans la littérature (**Meliah et Lisdiyanti., 2018**),

En effet les résultats de **Charousova et al, (2017)** indiquent qu'elle est plus productive qu'à celle du papier filtre. Les microorganismes qui existent dans le sol peuvent servir comme proies pour ces organismes prédatrices. (**Shimkets et al. 2006**).

Le sol est un habitat complexe et hétérogène sur de courte distance qui comprend de nombreux espèces et ou plusieurs formes de ressources nutritives coexistent. Le choix de la zone d'échantillonnage peut influencer grandement sur l'exactitude de l'analyse de sol. En général, il vaut mieux avoir plusieurs petits échantillons de localités différentes d'un gros lot d'un endroit unique (**H. Reichenbach et M. Dworkin, observations non publiées**).

Les régions de Ghardaïa et Tamanrasset ont donné le rendement le plus significatif avec des 9 isolats pour chaque région, suivis par la zone d'El-Menia qui donne 6 isolats, tandis que le rendement le plus faible a été observé pour la région de Laghouat qui donne 2 isolats seulement.

La déférence de rendement de chaque zone est expliquée par la déférence de caractéristique de sol en particulier le pH, l'humidité et la teneur en matière organique qui jouent un rôle important dans la densité et la diversité des populations microbiennes (**Dawid., 2000**).

L'utilisation du sol prélevé à partir de la rhizosphère de palmier dattier pour l'isolement des myxobactéries semble efficace pour l'obtention des myxobactéries. En effet, **Reichenbach et Dworkin, (1992)** indique que les meilleurs rendements des myxobactéries sont obtenus à partir d'échantillons rhizosphérique de plantes. **Shimkets, L. J., et al, (2006)** approuvé que les échantillons prélevés entre les racines des plantes et près de la base des tiges, donnent les meilleurs rendements.

D'autre comparaison de nos résultats avec ceux de **Zhao et al, (2013)** montre la productivité des sols rhizosphérique en général, et la rhizosphère racinaire des palmiers dattiers en particulier. Dans lequel **Zhao et al** ont isolé 50 souches à partir de 22 échantillons de sol rhizosphérique collectés de jardin botanique en Chine.

L'un des problèmes qui se posent lors de l'isolement des myxobactéries à partir du sol est la contamination par les moisissures, c'est pourquoi **Mohr et al, (2016)** ont utilisé 50 mg/L de cycloheximide comme antifongique pour freiner la croissance des moisissures.

Ce qui retient notre attention, c'est que les résultats obtenus dans l'isolement et la purification sont apparus précocement lors de l'ajout de la solution vitaminique dans les milieux de culture, ce qui indique que ce type des myxobactéries exige un milieu très riche en nutriment.

## 2. Caractère morphologique :

### 2.1 Corps de fructification :

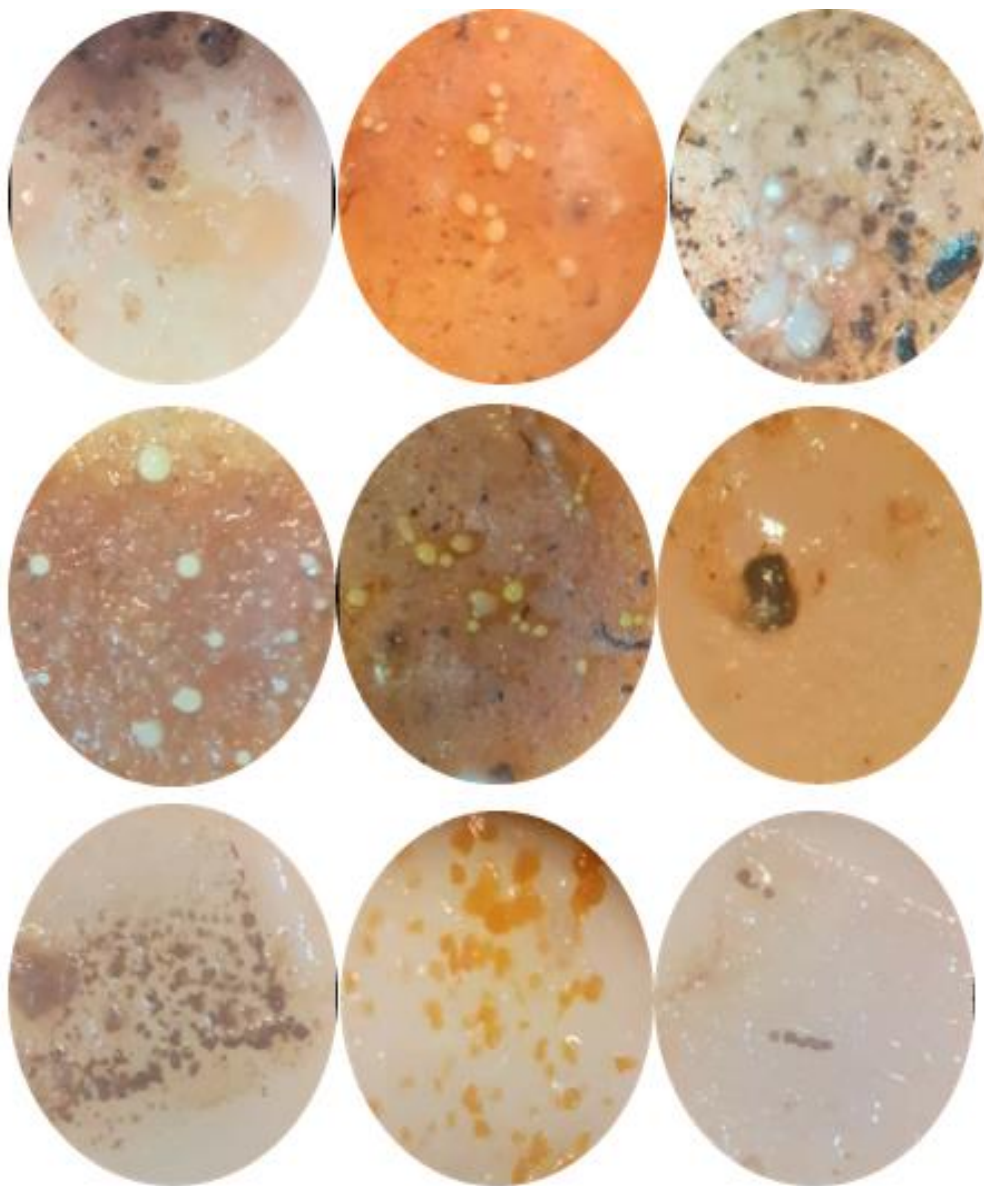
Un caractère des myxobactéries est leur capacité à former des organes de fructification a été réalisé. Les fructifications ont été observées à la loupe binoculaire (G x 20 ou G x 40) sur milieu WA et milieu ST21, et commencent à apparaître dès 10 à 15 jours d'incubation.

La taille des fructifications myxobactériennes varie entre 10 et 1000 µm ou plus selon l'espèce. Beaucoup peuvent être vus avec à l'œil nu, les corps de fructification

## Résultat et Discussion

---

sont en générale brillamment coloré en jaune, orange, blanc, brun ou marron, transparente et gris. (**Figure 11**).



**Figure11** : observation direct de corps de fructification myxobactériennes par loupe binoculaire Gx20.

La répartition des fructifications sur l'essaim est généralement aléatoire. La fructification se déroule dans l'essaim du centre vers la périphérie. La forme, la structure et la couleur des organes de fructification sont spécifique à l'espèce en fait des espèces myxobactériennes sont principalement définis par leurs organes de fructification (**Shimkets et al, 2006**).

## Résultat et Discussion

---

Les résultats de couleur des corps de fructifications de différentes souches isolées représentées dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3** : Nombre des couleurs du corps de fructification dans les isolats obtenus.

Couleur	Blanche	Orange	Transparente	Marron	Gris	Jaune
Les isolats	11	3	3	2	4	3

La couleur blanche est la plus courante dans les isolats, suivie de la couleur transparente avec quatre isolats ; les couleurs Orange, gris et jaune avec le même nombre de 3 isolats, et enfin la couleur marron à raison de 2 isolats.

### 2.2 Colonies des souches de myxobactéries :

On observe des colonies transparentes sur le milieu WA « avec *E coli* mort » après 4 jours d'incubation des corps de fructification dans ce milieu, le résultat dans la figure suivante :



**Figure 12** : Aspect des colonies myxobactérienne sur milieu WA.

## Résultat et Discussion

---

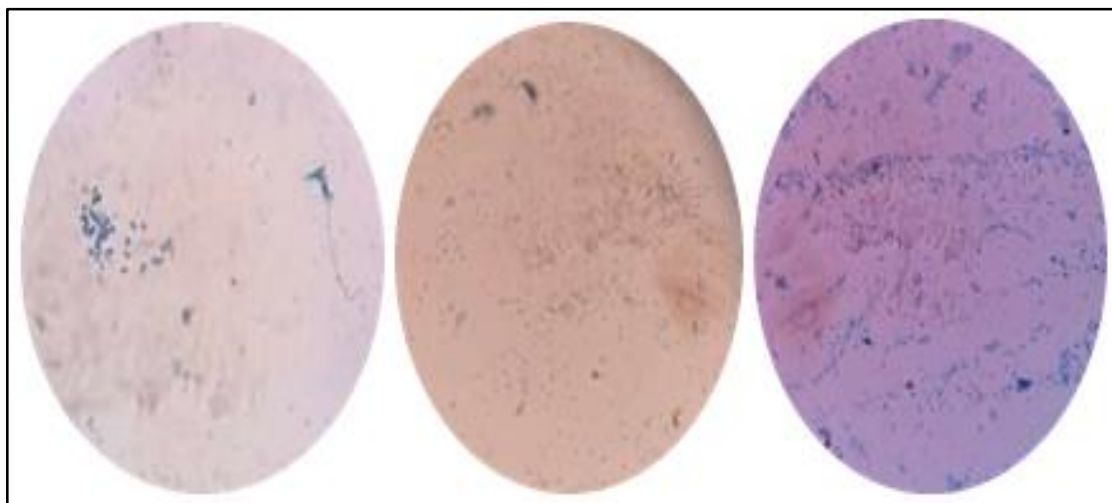
Sur des milieux pauvres en nutriments, comme le milieu VY et le milieu CY, les colonies de mycobactéries étalé sur la surface de la gélose forment des d'essaims « forme de swarming » (**Figure13**).



**Figure 13** : Différentes formes d'essaims des mycobactéries du sol sur milieu VY.

### 2.3 Aspects microscopiques :

Les cellules végétatives des mycobactéries apparaissent à l'aide de microscope optique (Gx100). Ils sont des bâtonnets qui est minces avec des extrémités effilées et parfois épaisses en forme de cigare, de bateau ou d'aiguille avec des bouts arrondis (**Figure 14**).



**Figure14** : Observation microscopique à l'état frais des cellules végétatives des isolats mycobactériennes par la coloration du bleu de méthylène.

### 3. Activité antimicrobienne des myxobactéries :

Les résultats de l'activité antimicrobienne des isolats myxobactériennes contre les différents microorganismes testés sont présentés dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4 :** L'activité antimicrobienne des isolats de myxobactéries obtenus.

Souches testées		Le diamètre de la zone d'inhibition en Millimètre					
		<i>Candidat albicans</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>p auroginosa</i>
E5M2Cb	SSV	8.35	6	6.84	6	6	8.09
	ASV	11.61	6	7.25	6.50	6	8.50
Elg1M1Cj	SSV	14.16	9.87	8.86	6	6	7.32
	ASV	13.77	10.04	9.70	6.30	6	7.46
E5M1Cj	SSV	12.86	8.08	8.12	6	6.44	30.82
	ASV	13.72	8.20	10.30	7.24	7.45	35.07
E5M2Cj	SSV	14.54	7.09	7.81	9.38	8.25	14.23
	ASV	14.02	7.90	10.37	10.28	9.60	17.66
E5M1Cb	SSV	31.65	9.05	7.30	8.13	9.69	7.82
	ASV	35.24	8.10	8.16	9.18	8.77	10.27
E2M2Co	SSV	7.96	6	7.39	6.20	6	31.59
	ASV	8.36	6	7.91	7.93	6	32.03
E3M2Cb	SSV	6	6	8.60	6	7.40	6
	ASV	6	6	9.65	6	8.30	6
E4M1Cb	SSV	8.00	9.30	15.35	13.20	6.20	6
	ASV	9.65	10.05	19.12	14.25	7.00	6

## Résultat et Discussion

<b>E1M1Cm</b>	SSV	8.50	7.28	6	6	6	9.67
	ASV	9.34	9.67	6	6	6	10.20
<b>E5M1Ct</b>	SSV	6	10.26	10.09	6	6.70	6
	ASV	6	11.45	11.30	6	7.60	6
<b>E4M2Cg</b>	SSV	6	6	6	7.00	6	6
	ASV	6	6	6	9.00	6	6
<b>E2M2Cb</b>	SSV	6	6	6.74	12.86	7.30	6
	ASV	6	7.96	7.36	16.19	8.40	7.96
<b>E1M2Cg</b>	SSV	7.40	8.75	6	10.48	9.30	10.50
	ASV	9.13	10.22	6	11.25	11.00	12.56
<b>E2M1Cb</b>	SSV	10.88	6	6	10.01	9.50	7.88
	ASV	11.86	6	6	11.20	12.33	9.42
<b>E4M2Cb</b>	SSV	6	7.01	9.22	6	20.83	22.96
	ASV	6	9.17	10.55	6	22.80	27.00
<b>E3M1Cb</b>	SSV	6	8.27	9.46	6	19.56	21.28
	ASV	6	12.18	10.14	6	22.33	25.83
<b>E5M2Co</b>	SSV	6	7.62	6	6	22.11	22.72
	ASV	6	8.00	6	6	23.25	24.00
<b>E3M1Cb</b>	SSV	6	6	6	6	19.36	17.53
	ASV	6	6	6	6	20.00	18.60
<b>E6M2Co</b>	SSV	6	8.42	10.12	6	22.49	10.12
	ASV	6	10.68	12.55	6	23.01	11.86
<b>E4M2Cg</b>	SSV	6	6	6	6	19.61	11.34
	ASV	6	6	6	6	22.65	14.86

## Résultat et Discussion

<b>E3M1Cb</b>	SSV	6	6	6	6	18.95	10.16
	ASV	6	6	6	6	20.70	12.33
<b>E5M1Ct</b>	SSV	6	6	6	6	17.13	10.53
	ASV	6	6	6	6	18.50	12.66
<b>E4M1Cg</b>	SSV	6	6	6	6	20.68	12.50
	ASV	8.30	6	9.40	6	22.81	16.31
<b>E2M2Cb</b>	SSV	6	8.50	9.17	6	21.00	18.56
	ASV	6	9.66	10.32	6	23.32	21.42
<b>Elg2M1Ct</b>	SSV	6	6	6	6	19.00	17.20
	ASV	6	6	6	6	21.62	19.43
<b>E5M1Ct</b>	SSV	6	6	6	6	18.77	13.89
	ASV	6	6	6	6	20.79	15.02
Totale d'activité		8	9	6	6	16	18

(SSV : Sans Solution Vitaminique, ASV : avec Solution Vitaminique).

A travers le tableau on remarque les isolats les plus actifs sont : E5M1CJ/ E5M2CJ /E5M1Cb /E4M1Cb /E1M2Cg /E2M1Cb /E4M2Cb /E3M1Cb /E6M2CO / E4M1Cg /E2M2Cb. Surtout la souche qui est l'isolat la plus active E5M1Cb.

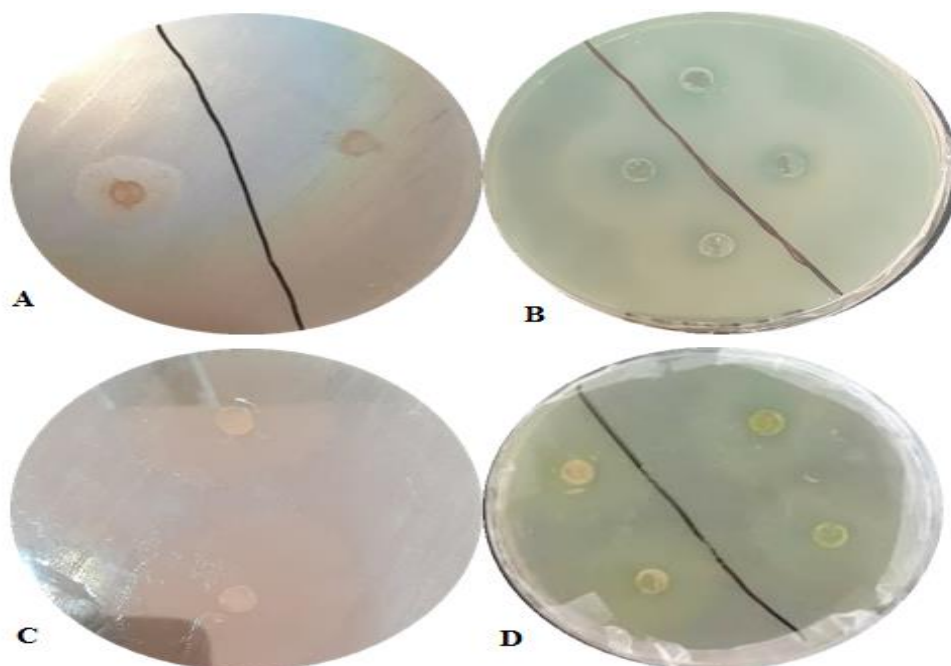
Les isolats moyennement actifs sont : E5M2Cb/ E2M2CO/ E3M2Cb/ E5M1Ct/ E4M2Cg/ E2M2Cb/ E3M1Cb/ E4M2Cg / E3M1Cb/ E5M1Ct/ Elg2M1Ct / E5M1Ct.

Les isolats les moins actifs sont : ElgM1CJ/E1M1Cm/E5M2CO.

Tous les isolats obtenus possèdent une activité contre au moins l'une des souches de référence utilisées, ainsi que le diamètre de la zone d'inhibition en présence de la solution vitaminique dans le milieu de production donne une valeur significative

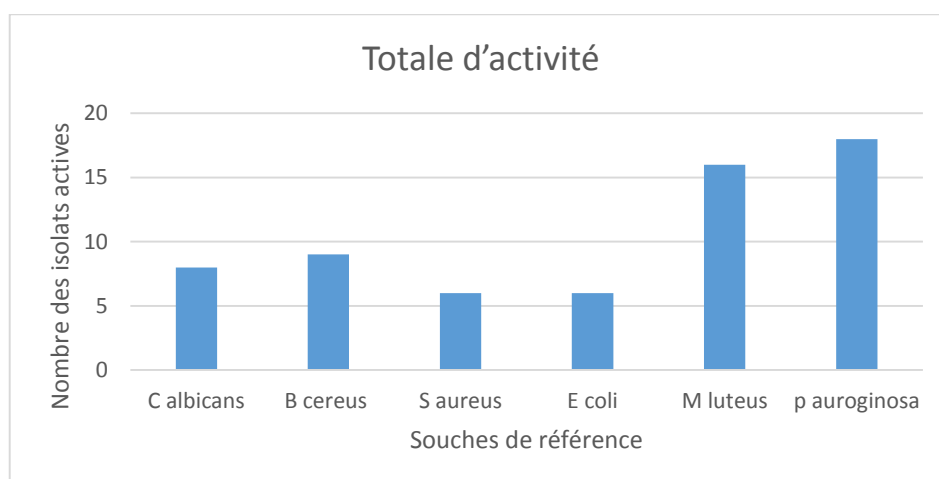
## Résultat et Discussion

par rapport à l'autre valeur (en absence de la solution vitaminique), est ce que montre la figure suivante :



**Figure 15** : Observation macroscopique de la zone d'inhibition des myxobactéries examinées par les souches de référence (A.B : milieu de production SSV, C.D : milieu de production ASV).

Le résultat de l'activité antimicrobienne montrant dans le tableau 4 est résumé dans la **Figure 16**.



**Figure 16** : Histogramme représentant l'efficacité des isolats en fonction des souches de référence.

## Résultat et Discussion

---

A travers les résultats de la figure 16 on remarque que le pourcentage des isolats actifs contre les bactéries à Gram positif est 19.87%, d'autre part les isolats actifs contre les bactéries à Gram négatif est 15.38%, alors que le pourcentage des qui a montré une activité antifongique est 5.12%.

La plus part des isolats possède une activité contre les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négative, cela due à la présence d'une paroi riche en Lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatifs qui le protègent contre les molécules bioactives sécrétées par les myxobactéries (**Kagan, J. C. 2017**).

Ces résultats indique que les isolats qui inhibé la croissance des autres microorganismes sont l'un de bonne producteur des métabolites secondaires bioactives.

# **Conclusion**

## Conclusion

---

L'évolution constante de la résistance bactérienne aux antibiotique est rapide de plus en plus, ce qui provoque des insuffisances de la thérapeutique antibactérienne ou des échecs thérapeutique .il devient alors crucial de chercher de nouveaux composés bioactifs d'origine naturelle afin de stimuler continuellement la découverte et le développement des nouveaux médicaments.

Les myxobactéries appartiennent aux groupes les plus intéressants de producteurs des substances naturelles. Ces dernières conduisent fréquemment à de nouveaux métabolites secondaires, qui montrer la bio activité. En raison du besoin urgent particulier de nouveaux antibiotiques, en particulier des groupes non décrits des myxobactéries sont au centre de nos activités d'isolement.

Les environnements inexplorés des zones tropicales et subtropicales tel que le désert algérien peuvent contenir des souches myxobactériennes rares et nouvelles .c'est pour cela le but principal de ce travail est l'isolement des souches de myxobactéries et la mise en évidence de leur pouvoir antimicrobienne.

L'isolement et la purification des myxobactéries à partir de sol Sahara algérien donnée une totale de 26 isolats, en effet 9 isolats a été isolé à partir de la zone de Tamanrasset et Ghardaïa, tandis que la zone de El-Menia a été donnée 6 isolats, par contre l'isolement de la zone de Laghouat est presque inexistant (2 isolats). Ce ça peut être expliqué par déférence caractéristique du sol "le PH, l'humidité et la teneur en matière organique qui jouent un rôle important dans l'existence et la densité des populations microbiennes ".

On remarque aussi que le meilleur rendement des isolats sont obtenus par la méthode de prédation environ 14 souches, tandis que la 2ème méthode de papier filtre donnée 12 souches.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes et une souche fongique, les résultats de l'activité obtenus montre un pourcentage d'inhibition varient d'une souche à l'autre.

## Conclusion

---

Les 26 souches qui sont isolées montrées de différents niveaux de l'activité antimicrobienne sur six organismes d'essais .ces résultats indique que se souches qui sont capable d'inhibées la croissance des autre microorganismes considérées comme bonne producteur des métabolites secondaire bioactive qui on peut exploitée dans le domaine de la biotechnologie.

Des antibiotiques et des composés bioactifs sont isolées à partir des microorganismes dans différents environnements (**charousova et al, 2017 ; Devi et al, 2017**). De plus, les résultats de cette étude confirment que les myxobactéries, sont également dotées d'un pouvoir antagoniste intéressant.

Actuellement les myxobactéries présente un grand intérêt, en raison de la demande insistance pour de nouvelles substances bioactive.

En fin, cette expérience ouvrir de nouvelles perspectives pour des recherches ultérieurement qui auront certainement la chance de creuser plus profondément cette problématique qui s'avéré de plus en plus présente dans un monde ou' la technologie devient son maitre et port le dernier mot.

# **Références Bibliographiques**

### B

1. **Berkeley, M. J. (1857).** *Introduction to Cryptogamic botany* (Vol. 12). H. Bailliere. pp. 313-315. H. Bailliere Publishers, London.
2. **Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., & Woods, C. M. (1995).** Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer research*, 55(11), 2325-2333.
3. **Burchard, R. P. (1984).** Gliding motility and taxes. In *Myxobacteria* (pp. 139-161). Springer, New York, NY.

### C

4. **Charousová, I., Steinmetz, H., Medo, J., Javoreková, S., & Wink, J. (2017).** Soil myxobacteria as a potential source of polyketide-peptide substances. *Folia microbiologica*, 62(4), 305-315.
5. **Connor, D. T., Greenough, R. C., & Von Strandtmann, M. (1977).** W-7783, a unique antifungal antibiotic. *The Journal of organic chemistry*, 42(23), 3664-3669.

### D

6. **Dawid, W. (2000).** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS microbiology reviews*, 24(4), 403-427.
7. **Dawid, W., Gallikowski, C. A., & Hirsch, P. (1988).** 3.8 Psychrophilic myxobacteria from Antarctic soils. *Polarforschung*, 58(2/3), 271-278.
8. **Devi, S.I., Lotjem, H., Devi, E.J., Potshangbam, M., Ngashangva, N., Bora, J., Sahoo, D ET Sharma, C. (2017).** Bio mining the forest ecosystem of northeast India for identification if antimicrobial metabolites from fungi through submerged fermentation. *Bio resource Technology*, 241, 1168-1172.
9. **Dworkin, M. (1984).** Research on the myxobacteria: past, present, future. In *Myxobacteria* (pp. 221-245). Springer, New York, NY.
10. **Dworkin, M. (1996).** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological reviews*, 60(1), 70-102.
11. **Dworkin, M. A. R. T. I. N. (1966).** Biology of the myxobacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 20(1), 75-106.

12. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes: Vol. 7: proteobacteria: delta and epsilon subclasses. Deeply rooting bacteria. Springer Science & Business Media. p80-88, p130-142.

### F

13. Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T., & Yamanaka, S. (2002). Haliangium ochraceum gen. nov., sp. nov. and Haliangium tepidum sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *The Journal of general and applied microbiology*, 48(2), 109-115.

### G

14. Garcia, R. O. (2011). Exploiting the natural products of novel myxobacteria: phylogenetic and fatty acid perspectives and bioactive compound discovery. thèse doctorat, université de la Saare, Sarrebruck, pp.1-11.
15. Garcia, R. O., Krug, D., & Müller, R. (2009). Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods. *Methods in enzymology*, 458, 59-91.
16. Gerth, K., & Reichenbach, H. (1978). Induction of myxospore formation in *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). *Archives of Microbiology*, 117(2), 173-182.
17. Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H., & Reichenbach, H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 49(6), 560-563.
18. Gerth, K., Irschik, H., Reichenbach, H., & Trowitzsch, W. (1980). Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales) I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics*, 33(12), 1474-1479.
19. Gräf, W. (1975). Myxobakterien der Gattung *Myxococcus* als indirekte Fäkalstoffindikatoren in Oberflächengewässern. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B*, 160, 28-39.

20. Gunji, S., Arima, K., & Beppu, T. (1983). Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(9), 2061-2069.

### H

21. Hargraves, S., Greub, G., & Jacquier, N. (2020). Peptides antimicrobiens : une alternative aux antibiotiques ? *Education*, 1, 14-16..
22. Höfle, G., & Reichenbach, H. (1990). Biologically active substances from microorganisms—an interdisciplinary research project at the GBF. *Sci Ann Rep*, pp. 5-22.

### I

23. Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., & Yamanaka, S. (1998). Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS microbiology letters*, 169(2), 317-322.

### K

24. Kagan, J. C. (2017). Lipopolysaccharide detection across the kingdoms of life. *Trends in immunology*, 38(10), 696-704.
25. Karamanos, Y., Singer, M., & Søgaard-Andersen, L. (1999). 25th International Conference on the Biology of the Myxobacteria. *Molecular microbiology*, 31(6), 1863-1869.
26. Kathrin I. Mohr et Joachim Wink. (2017). Discovery of natural products from soil inhabiting bacteria-an introduction. Assistance: Wera Collis, Romy Schade pp7-10.
27. Kato, H. (1955). Notes on myxobacteria II. Antibacterial strains of *Myxococcus fulvus*. *Ecol. Rev*, 14, 26-28.
28. Korp, J., Gurovic, M. S. V., & Nett, M. (2016). Antibiotics from predatory bacteria. *Beilstein journal of organic chemistry*, 12(1), 594-607.
29. Krzemieniewska, H., & Krzemieniewski, S. (1927). Rozsiedlenie miksobakteryj [Über die Verbreitung der Myxobakterien im Boden]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 5(1), 102-139.
30. Kumar, V., Bharti, A., Gupta, V. K., Gusain, O., & Bisht, G. S. (2012). Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest: isolation and screening for their antibacterial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 871-880.

### L

31. Link, H. F. (1809). Observaciones in ordines plantarum naturales. Dissertatio I. *Mag Ges Naturf Freunde Berlin*, 3, 3-42.
32. Ludwig, W., Schleifer, K. H., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1983). A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. *Archives of Microbiology*, 135(1), 58-62.
33. Lünsdorf, H., & Reichenbach, H. (1989). Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacteriales). *Microbiology*, 135(6), 1633-1641.

### M

34. Meliah, S., & Lisdiyanti, P. (2018). Isolation, Characterization and Molecular Identification of Myxobacteria from Two Outermost Islands of Indonesia. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*, 25(2), 121-129.
35. Mohr, K. I. (2018). Diversity of myxobacteria—we only see the tip of the iceberg. *Microorganisms*, 6(3), 84.
36. Mohr, K. I., Stechling, M., Wink, J., Wilharm, E., & Stadler, M. (2016). Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost. *MicrobiologyOpen*, 5(2), 268-278.

### N

37. Nellis, L. F., & Garner, H. R. (1964). Methods for isolation and purification of *Chondromyces*. *Journal of bacteriology*, 87(1), 230-231.
38. Norén, B. (1953). On the production of antibiotics by myxobacteria. *Svensk. Botan. Tidskr*, 47, 402-410.
39. Norén, B., & Raper, K. B. (1962). Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity. *Journal of bacteriology*, 84(1), 157-162.

**O**

- 40. Oxford, A. E. (1947).** Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free liquid medium. *Journal of bacteriology*, 53(2), 129-138.

**R**

- 41. Reichenbach, H. (1974).** Die Biologie der Myxobakterien. *Biologie in unserer Zeit*, 4(2), 33-45.
- 42. Reichenbach, H. (1999).** The ecology of the myxobacteria. *Environmental microbiology*, 1(1), 15-21.
- 43. Reichenbach, H. (2005).** The Myxococcales. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley TJ, Garrity GM ed Bergey's manual of systematic bacteriology, springer, (USA), vol, Part C, pp.1059-1071.
- 44. Reichenbach, H., & Dworkin, M. (1992).** The myxobacteria. In *The prokaryotes*. Springer, New York, NY, vol 4. (pp. 3416-3487).
- 45. Rosenberg, E., & Varon, M. (1984).** Antibiotics and lytic enzymes. In *Myxobacteria* (pp. 109-125). Springer, New York, NY.
- 46. Rückert, G. (1983).** Myxobakterien in Böden extremer Biotope. *Mitteilgn Dtsch Bodenkundl Gesellsch*, 38, 355-360.

**S**

- 47. Shimkets, L. J. (1990).** Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological reviews*, 54(4), 473-501.
- 48. Shimkets, L. J. (1990).** The Myxococcus xanthus FprA protein causes increased flavin biosynthesis in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 172(1), 24-30.
- 49. Shimkets, L. J., Dworkin, M., & Reichenbach, H. (2006).** The myxobacteria, p 31–115. *The prokaryotes*. Springer, New York, NY, vol, pp. 39-59.
- 50. Shimkets, L., & Woese, C. R. (1992).** A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9459-9463.
- 51. Singh, B. N. (1947).** Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *Microbiology*, 1(1), 1-10.

- 52. Spröer, C., Reichenbach, H., & Stackebrandt, E. (1999).** The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(3), 1255-1262.
- 53. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Trüper, H. G. (1988).** Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(3), 321-325.

### T

- 54. Thaxter, R. (1892).** On the Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Botanical Gazette*, 17(12), 389-406.
- 55. Trzilová, B., Miklošovicová, L., Golaisova, E., & Bobkova, M. (1980).** Indikatoren der Verunreinigung des Donauwassers im tschechoslowakischem Abschnitte. *Acta Ecologica (Bratislava)*, 8, 91-102.
- 56. Trzilová, B., Miklošovicová, L., Morhácová, G., & Golaisová, E. (1981).** Wasserqualität der Zuflüsse des tschechoslowakischen Donauabschnittes von limnologischer und hygienischer Sicht. *Biologia. Seria C: Vseobecna biologia*. p36:765–774.

### W

- 57. Wang, C., Lv, Y., Li, A., Yao, Q., Feng, G., & Zhu, H. (2020).** Culture-dependent and-independent methods revealed an abundant myxobacterial community shaped by other bacteria and pH in Dinghushan acidic soils. *PloS one*, 15(9), e0238769.
- 58. Weissman, K. J., & Müller, R. (2010).** Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Natural product reports*, 27(9), 1276-1295.
- 59. Wenzel, S. C., & Müller, R. (2007).** Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. *Natural product reports*, 24(6), 1211-1224.

### X

- 60. Xie, Z. P., Xu, Z. N., Shen, W. H., & Cen, P. L. (2005).** Bioassay of mildiomycin and a rapid, cost-effective agar plug method for screening

high-yielding mutants of mildiomycin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8), 1433-1437.

### Y

61. Yee, T., & Inouye, M. (1982). Two-dimensional DNA electrophoresis applied to the study of DNA methylation and the analysis of genome size in *Myxococcus xanthus*. *Journal of molecular biology*, 154(2), 181-196.

### Z

62. Zhang, X., Li, Z., Tan, Z., Guo, J., & Zhu, H. (2012). Isolation and identification of myxobacteria in the saline-alkaline soils of Akesu in Xinjiang. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 52(2), 160-168.
63. Zhao, Z., Zhang, X., Tan, Z., Guo, J., & Zhu, H. (2013). Isolation and identification of cultivable myxobacteria in the rhizosphere soils of medicinal plants. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 53(7), 657-668.

# **Les annexes**

## **Les annexes**

---

Composition des solutions et milieux de culture utilisés

### **Milieux solides**

#### **Water agar (WA):**

- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  1.5g.
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g.
- Agar 18g.
- Solution tampon 1ml.
- Solution vitaminique 1ml.
- Eau distillée 1000ml.
- PH=7.2

#### **Solution vitaminique**

- Biotine 0.01g.
- Nicotinsäure 0.1g.
- Thiamine 0.05g.
- 4-Aminobenzoessäure 0.05g.
- Pantothenat 0.025g.
- Pyridoxamin 0.25g.
- Cyanocobalamin 0.1g.

La solution vitaminée est stérilisée par filtration et conserve à 4° C.

#### **ST21 :**

##### **Solution A :**

- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g.
- Extrait de levure 0.002g.
- Agar 10g.

Compléter dans environ les deux tiers du volume d'eau dans l'eau distillée.

## Les annexes

---

### Solution B:

- KNO<sub>3</sub> 1g.
- MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 1g.
- CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O 1g.
- FeCl<sub>3</sub> 0.2g.
- MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0.1g.

Compléter dans le volume d'eau restant. Autoclaver séparément .combiner les solutions A et B et ajouter 1ml de solution d'oligo-éléments par litre de milieu.

### VY/2-agar :

- Extrait de levure 5ml (2.5g/5ml).
- CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0.5g.
- Solution vitaminique 0.5ml.
- solution tampon 1ml.
- Agar 8g.
- Eau distillé 500ml.

Stériliser la vitamine B12 séparément par filtration. Préparer et stocker les cellules de levure sous forme de stock autoclavée suspension (2.5g de levure de boulangerie /5ml d'eau distillée .ajuster le PH à 6.5 et Autoclaver).Régler PH du milieu à7.2avec KOH avant.et après autoclavage et refroidissement à 50°C (utiliser du papier indicateur de PH).

### CY-agar :

- Farine de soja 2g.
- Glucose 1g.
- Amidon 2g.
- Extrait de levure 1g.
- MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g.
- CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.5g.
- Fe EDTA 1g.

## **Les annexes**

---

- Eau distillé 500ml.
- PH7.2

### **Trace élément :**

- FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0.1g.
- MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 0.1g.
- ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0.1g.
- Eau distillée 100ml.

### **Milieus liquides**

#### **Bouillon Miller Hinton :**

- Agar 17g.
- Miller Hinton Broth 21g.
- Eau distillée 1000ml.
- PH=7.4

#### **Bouillon Braine Heart infusion (BHIB) :**

Protéose peptone	10g.
Infusion cerveau de veau	12.5g.
Infusion cerveau de bœuf	5g.
Chlorure de sodium	5g.
Phosphate disodique	2.5g.
Glucose	2g.
Eau distillée	1000ml.

PH=7.2.