

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie



N° d'ordre :79/D3C/2018
N° de série :03/MB/2018

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
En Biotechnologies microbiennes, Génomes et Environnement

THÈME

Biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier poussant au sud est
Algérien. Effet du climat sur le comportement de cette flore.

Présentée par : AIMENE Wissame

Devant le JURY

Président :	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafide	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse :	Pr. BENHIZIA Yacine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
	Dr.CHERIF-SILINI Hafsa	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1

28/06/2018

2017/2018

Remerciements

Au début, j'aimerais remercier « Allah » qui m'a donné la volonté et le courage pour la réalisation et la finalisation de ce travail.

Je tiens à remercier Mr. BENHIZIA Yacine, qui a accepté de diriger ce travail et a veillé à son bon déroulement, en m'apportant des critiques constructives et des conseils pertinents et surtout son encouragement et son compréhension.

Je remercie HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid (Professeur à l'Université Constantine 1) de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Mes sincères remerciements vont également à Mr. BOUDEMAGH Allaoueddine (Professeur à l'Université Constantine 1) et Mme. CHERIF-SILINI Hafsa (Docteur à l'université Ferhat Abbas Sétif 1) d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes sincères remerciements sont adressés à Dr. Natalie Ferry, docteur à « School of environment and life sciences », université de Salford, pour son bon accueil et les analyses qu'elle m'a autorisé de réaliser.

Je tiens à remercier aussi Mr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid pour son aide et ses conseils dans le domaine de l'analyse phylogénétique, qu'il m'a permis d'appréhender avec des outils simples et très didactiques.

J'aimerais bien remercier Mr. Bouziani Mohammed, MAA à l'université d'Oum El Bouaghi., de m'avoir aidé à effectuer tous les échantillonnages. Je souhaiterais lui dire merci aussi pour sa gentillesse et sa générosité.

Je veux également remercier Mr. Bouden Ismail, MAA à l'université du Geulma qui m'a aidé beaucoup dans la réalisation de ce travail.

Pour terminer, je souhaiterais remercier mes amis du laboratoire «Meroua, Radja, Liela, Assia, Mouna, Hanane, Sabra, Hiba, Meriem, Basma, Maya et Razika » pour leur aide, leur soutien et pour les bons moments qu'on a passés ensemble.

Merci à tous.

Dédicaces

Je dédie se modeste travail :

À ma chère mère « Khadîdja » et à l'esprit de mon très cher père « Foudil » qui ont fait de moi ce que je suis.

À mon mentor dans les moments difficile « cher époux Ismail » pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour.

À mes petits anges « ma fille Hanine » et «mon fis Mohammed Abderrahmane » qui m'ont donné un coup de pouce pour compléter ma thèse.

À mes chères sœurs et mes chers frères qui ont toujours été derrière moi et mes besoins.

À mes chères amies « la fameuse équipe de lab» pour leur gentillesse et leur encouragement.

À tous les membres de ma famille.

Résumé :

La flore bactérienne des trois parties du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (Feuilles, fruits et tronc) a fait l'objet d'un isolement, puis identification suite aux tests phénotypiques et moléculaire (par le biais de l'ADNr 16S). L'évaluation de la population bactérienne à travers les différentes saisons (en 2012) a été effectuée pour démontrer la dynamique temporelle de la population cultivable.

L'analyse statistique a révélé des différences significatives dans la distribution des souches bactériennes qui se traduit par une baisse ou une augmentation des niveaux de population pendant les différentes saisons.

Les caractères morphologiques et les tests d'orientations simples ont permis de sélectionner 78 isolats représentatifs parmi plus de 200. Les résultats de l'identification phénotypique ont permis de classer la majorité des isolats au niveau de genre. Ainsi que, l'étude de l'effet des facteurs abiotiques sur la croissance des isolats a révélé que les isolats testés tolèrent et survivent dans des conditions abiotiques sévères.

D'après l'analyse partielle du gène codant pour l'ARNr 16S, 2 isolats ont été identifiés parfaitement avec 100% de similarité, des isolats ont été identifiés entre 97% à 99% de similarité avec celle des souches conservées dans Genbank, alors que d'autres souches ont été identifiées entre 78% à 96%. Globalement, on a recensé 33 espèces bactériennes appartenant à 16 genres. Les genres les plus présentés dans toutes les parties de l'arbre sont *Bacillus* (36,84 %), *Pseudomonas* et *Enterobacter* représentant 17,1 % pour chacun, mais toutefois ces distributions sont hétérogènes. *Lysinibacillus* est le troisième genre le plus isolé avec 10,52%. Contrairement aux autres genres qui restent minoritaires tel que *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, et *Brevibacterium*.

Ce travail de recherche a donné et pour la première fois en Algérie une idée globale sur la diversité de la flore bactérienne du palmier dattier et mise en évidence de l'impact du climat sur la dynamique de cette flore.

Mots clés : *Phoenix dactylifera*, Phyllosphère, ADNr 16S, diversité bactérienne.

Abstract

Bacterial flora of the three parts of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) (Leaves, fruits and trunk) was isolated and then identified following phenotypic and molecular tests (using 16S rDNA). Evaluation of the bacterial population through the different seasons (in 2012) was carried out to demonstrate the temporal dynamics of the cultivable population.

Statistical analysis revealed significant differences in the distribution of bacterial strains with increase or decrease of bacterial levels during the different seasons.

Morphological characters and simple orientation tests allowed selecting 78 representative isolates from more than 200. The results of phenotypic identification made it possible to classify the majority of isolates at the genus level. As well as, the study of the effect of a biotic factors on the growth of isolates revealed that the tested isolates tolerate and survive under severe a biotic conditions.

According to the partial analysis of the gene coding for 16S rRNA, 2 isolates were identified perfectly with 100% similarities, some isolates were identified between 97% to 99% similarity to the strains conserved in Genbank, while others strains were identified between 78% to 96%. Overall, there were 33 bacterial species belonging to 16 genera. The most common genera in all parts of the tree are *Bacillus* (36.84%), *Pseudomonas* and *Enterobacter* representing 17.1% for each, but however its distribution is heterogeneous. The genus *Lysinibacillus* is the third most isolated genus (10.52%). Unlike other genera that remain minority such as *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, and *Brevibacterium*.

This work gave for the first time in Algeria a global idea about the diversity of the date palm bacterial flora and highlighted the impact of climate on the dynamics of this flora.

Key words: *Phoenix dactylifera*, phyllosphere, 16S rDNA, bacterial diversity.

ملخص

تم عزل السلالات البكتيرية من الاجزاء المختلفة من شجرة نخيل التمر (*Phoenix dactylifera*) وقد تم تحديدها بعد اجراء عدة اختبارات نمطية وجزيئية (باستخدام ADNr16S). اجري تقييم المجموعة البكتيرية خلال الفصول المختلفة (سنة 2012) لإثبات الديناميكيات الزمنية للمجموعة البكتيرية القابلة للزرع.

كشف التحليل الإحصائي عن وجود فروق ذات دلالات احصائية في توزيع السلالات البكتيرية وهذا إما بارتفاع او انخفاض مستويات المجموعة خلال الفصول المختلفة .

أصرفت الصفات النمطية وإختبارات التوجيه البسيطة لإختيار 78 عزلة تمثل أكثر من 200 وقد أتاحت نتائج التحديد الظاهري إلى تصنيف غالبية العزلات على مستوى الجنس.

وكذلك أظهرت دراسة تأثير العوامل الإحيائية على نمو العزلات وأن العزلات المختبرة تحتمل وتعيش في ظل ظروف لا إحيائية حادة.

وفقا للتحليل الجزيئي للتشفير الجين ARNr16S تم تحديد 2 عزلات بشكل نهائي (100%) وتم تحديد بعض العزلات التي تتشابه ما بين 97 الى 99 % مع السلالات المحفوظة في Genbank. في حين البعض الآخر من العزلات تم تحديدها ما بين 78 و 96%.

عموما تم تحديد 33 نوع بكتيري ينتمي الى 16 جنس. الاجناس الاكثر تواجدا في جميع اجزاء الشجرة هي Bacillus بنسبة 36.84 % , *Pseudomonas* و *Enterobacter* بنسبة 17.1 % ومع ذلك كان التوزيعهم غير متجانس. أما ثالث جنس هو *Lysinibacillus* بنسبة 10.52%. على عكس بعض الاجناس التي تم عزلها والتي تبقي بنسبة ضئيلة مثل *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, *Brevibacterium*.

هذا العمل البحثي اعطى ولأول مرة في الجزائر فكرة عامة عن التنوع البكتيري المتواجد على مستوى شجرة النخيل وكذا توضيح تأثير المناخ على ديناميكيات هذه الفلورة.

الكلمات المفتاحية: ADNr 16S, phyllosphère, *Phoenix dactylifera*, التنوع البكتيري.

Table des matières

Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction.....	1
<i>Première partie : Etude bibliographique</i>	
1. La biodiversité et l'écologie microbienne d'un écosystème.....	3
1.1. Définition de la Biodiversité.....	3
1.2. L'écologie microbienne d'un écosystème.....	4
1.3. Écologie microbienne de la phyllosphère.....	5
2. Facteurs affectant le développement des microorganismes dans la phyllosphère.....	6
2.1. Température	7
2.2. L'humidité.....	8
2.3. Activité de l'eau.....	8
2.4. Le pH.....	9
3. Ecosystème du palmier dattier et communauté microbienne.....	9
3.1. Plante et Fruit.....	9
3.2. Colonisation épiphyte de la partie aérienne du palmier dattier.....	12
4. Approches d'analyse en écologie microbienne.....	15
4.1. Approches culturelles.....	15
4.1.1. Milieu de culture sélectif, d'enrichissement et d'isolement.....	15
4.1.2. Tests biochimiques et profils d'activité métabolique.....	16
4.1.3. Limites de l'approche classique.....	17
4.2. Méthodes moléculaires	18

4.2.1. Amplification de l'ADN par PCR.....	19
4.2.2. Utilisation de l'ADNr 16s comme marqueur moléculaire.....	20
4.2.3. Clonage moléculaire et le séquençage des ADNr 16S.....	22
4.2.4 Techniques d'empreintes moléculaires.....	23
4.2.4.1. La DGGE et ses variants.....	23
4.2.4.2. Le Polymorphisme de conformation des simples brins [Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)].....	24
4.2.4.3. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T- RFLP).....	25
4.2.5. Approche de type métagénomique.....	26
4.2.6. Identification et taxonomie.....	27
4.2.7. Analyse phylogénétique.....	28
4.3. Complémentarité d'information fournie par les méthodes culturales et moléculaires	29

Deuxième partie : Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Zone d'étude	30
2. Échantillonnage.....	31
3. Récupération des suspensions cellulaires.....	32
4. Déterminations des taux de bactéries.....	32
5. Isolement et purification des bactéries.....	32
6. Conservation des isolats	32
7. Identification phénotypique des isolats.....	33
7.1. Tests biochimiques et d'activité métabolique.....	33
7.1.1. Production de l'oxydase.....	33
7.1.2. Production de la catalase.....	33
7.1.3. Hydrolyse de l'urée.....	33
7.1.4. Recherche de la cellulase.....	34
7.1.5. Utilisation du citrate.....	34
7.1.6. Réduction des nitrates.....	34
7.1.7. Recherche d'Ornithine (ODC), de la lysine décarboxylase(LDC) et de l'arginine	

dihydrolase (ADH).....	34
7.1.8. Production d'indole.....	35
7.1.9. Réaction de Voges-Proskauer (VP) et le Rouge de Méthyle (RM).....	35
7.1.10. Assimilation des substrats carbonés.....	35
7.1.11. Assimilation des acides aminés.....	35
7.2. Tests physiologiques.....	35
7.2.1. Tolérance au chlorure de sodium.....	35
7.2.2. Effet de la Température.....	36
7.2.3. Effet du pH.....	36
8. Identification moléculaire des isolats.....	36
8.1. Extraction de l'ADN génomique.....	37
8.1.1. Extraction directe sur colonie.....	38
8.1.2. Extraction de l'ADN génomique par la méthode phénol chloroforme-alcool isoamylique.....	38
8.2. Amplification par PCR du gène d'ARNr 16S.....	40
8.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	42
8.4. Clonage moléculaire et transformation de fragments de gène ADNr 16S amplifiés.....	43
8.5. Extraction des plasmides clonés et séquençage de bigdye.....	44
8.6. Séquençage d'ADNr 16S en utilisant les tubes « smartseq ».....	47
8.7. Comparaison des séquences de l'ADNr 16S.....	47
8.8. Analyse phylogénique.....	47
9. Analyse statistique.....	48

II. Résultats et discussion

1. Flore bactérienne du palmier dattier, diversité et distribution temporelle des espèces bactériennes.....	49
1.1. Diversité bactérienne à la surface du palmier dattier.....	49
1.1.1. Identification des bactéries par approche phénotypique.....	50
1.1.1.1. Effet des facteurs abiotique sur la croissance des isolats.....	58
1.1.2. Identification moléculaire par amplification et séquençage de l'ADNr 16S.....	62
1.1.2.1. Discussion taxonomique.....	66

1.1.2.2. Phylogénie.....	68
1.2. Distribution des isolats sur l'arbre à travers les saisons.....	71
2. L'effet des conditions climatiques sur les taux de population bactérienne du palmier dattier.....	74
Conclusion générale.....	87
Références bibliographique.....	89
Annexes	

Liste des abréviations

AW: Acivity Water.

BLAST : Basical Local Alignment Search Tool.

CMC: Carboxy-Methyle Cellulose.

CE-SSCP : Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism.

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

DMF: Di-Méthyl-Formamide.

DO: Densite Optique.

EMBL: European Molecular Biology Laboratory.

Fe : Feuille.

Fr : Fruit.

GN: Gélose Nutritive.

LBB : Luria-Bertani Broth.

LB : Luria-Bertani.

ONM : l'office national de la météorologie

OTU : Unité Opérationnelle Taxonomique.

PCA: Plate Count Agar.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RM : Rouge de Méthyle.

rpm : round par minute

T : Tronc.

TBE : Tris-Borate-EDTA.

T-RFLP : Terminal Restriction Length Polymorphism.

TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis.

VP : Voges-Proskauer.

UFC : Unités Formant Colonie.

X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-Dgalactopyranoside.

ODC : Ornithine Décarboxylase.

LDC : Lysine Décarboxylase.

ADH : Arginine Dihydrolase.

SOC: Super Optimal broth with Catabolite repression.

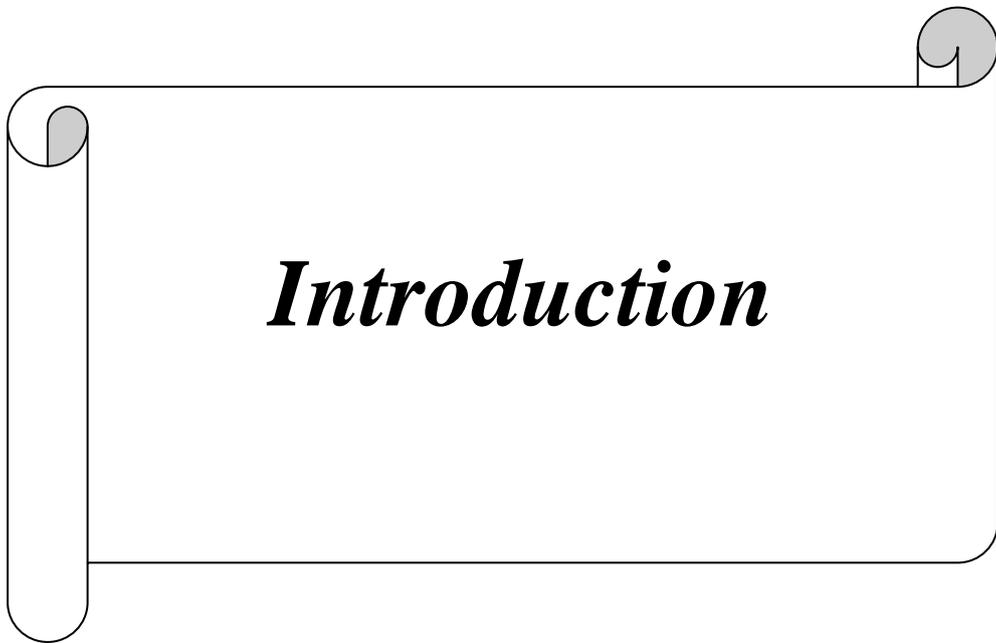
Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 1	Différentes partie d'un palmier dattier (Agoudjil <i>et al.</i> , 2011)	10
Figure 2	L'évolution des dattes chez le palmier dattier (Barreveld, 1993).	11
Figure 3	Schéma d'une feuille du palmier dattier (Munier 1973).	12
Figure 4	Différentes approches moléculaires appliquées à l'étude de la biodiversité microbienne	19
Figure 5	Site du prélèvement des échantillons à Tolga.	30
Figure 6	Schéma de la démarche aléatoire pratiquée lors de l'échantillonnage. a : tronc, b :feuilles et c : fruits	31
Figure 7	Les trois principales étapes d'étude de l'écologie microbienne par méthode moléculaire (Renouf, 2006).	37
Figure 8	Mesure de la concentration et la pureté d'ADN via le Nano-Drop.	39
Figure 9	Boîtes de Petrie contenant les cellules transformées (colonies blanches).	44
Figure 10	Electrophorèse de plasmide après digestion sur gel d'agarose à 1%. H : marqueur de taille ; 2, 3: les clones contenant l'insert ; 1, 4, 5, 6 : des clones ne contient pas l'insert.	45
Figure 11	Aspect macroscopique de quelques isolats bactériens isolés sur gélose nutritive. (T : Tronc, Fe : Feuille, Fr : Fruit, H : hiver, P : Printemps, A : Automne, E : Été) (Exemple : T 1.1E : souche (1) isolée de l'arbre numéro (1) pendant la saison d'été).	51
Figure 12	Formes cellulaires et type de gram de quelques souches identifiées.	52
Figure 13	Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés. A : Souches Fr, B : Souches T et C : Souches Fe.	59
Figure 14	Influence du pH sur la croissance des souches testées. A : Souches (Fe), B : souches T et C : Souches Fr.	60
Figure 15	Electrophorèse sur gel d'agarose pour les produits de la PCR de l'ADNr 16S, H: marqueur de taille (HyperLadder) ; 1 → 7, 1' → 7', 8 → 12: bands d'ADNr 16S de quelques souches étudiées.	62

Figure 16	Arbre phylogénétique basé sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16S des souches bactériennes Gram négative. Arbre établi par la méthode Neighbor- Joining avec le modèle de correction de Kimura- 2-paramètre (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.	68
Figure 17	Arbre phylogénétique basé sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16S des souches bactériennes Gram positive. Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-paramètre (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.	69
Figure 18	Bilan de la répartition des genres bactériens à la surface du palmier dattier	70
Figure 19	Proportions des genres bactériens identifiés pendant chaque saison.	73
Figure 20	Population bactérienne dénombrée sur les dattes ((ns) : non significatif ($p>0.05$), (*): significatif ($p<0.05$)).	76
Figure 21	A : Evolution de la charge de la population bactérienne sur les dattes ; B,C,D : Les moyennes de la température, la pluie et l'humidité saisonnée enregistrée dans la région du tolga en 2012.	79
Figure 22	Population bactériennes dénombrées sur les feuilles (ns : non significative ; *** : hautement significative ($p<0.001$)).	81
Figure 23	Population bactériennes dénombrées sur les troncs (ns : non significative ($p>0.05$) ; ** : très significative ($p<0.01$) ; *** : hautement significative ($p<0.001$)).	83
Figure 24	Flore bactérienne dénombrée pendant l'hiver sur les différents compartiments.	84
Figure 25	Flore bactérienne dénombrée pendant le printemps sur les différents compartiments.	85
Figure 26	Flore bactérienne dénombrée pendant l'été sur les différents compartiments.	85
Figure 27	Flore bactérienne dénombrée pendant l'automne sur les différents compartiments.	86

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	La flore endogène des dattes.	14
Tableau 2	Composants et volume du mélange réactionnel de PCR sur colonie.	40
Tableau 3	Les conditions de la PCR.	40
Tableau 4	Mélange réactionnel de PCR pour l'amplification du gène ARNr 16S des isolats.	41
Tableau 5	Les Conditions de la PCR.	41
Tableau 6	Les composants et volumes requis pour la réaction de clonage.	43
Tableau 7	Les composants et volumes nécessaires pour la réaction de restriction PCR2.1 par EcoRI.	45
Tableau 8	Composants et volumes requis pour la création de mélange réactionnel de séquençage au Big Dye v3.1.	46
Tableau 9	Condition de la PCR de BigDye.	46
Tableau 10	Les caractéristiques phénotypiques des isolats étudiées.	54
Tableau 11	Pourcentages d'homologie des séquences d'ADNr 16S des isolats avec celles déposés au Genbank.	63
Tableau12	Diversité en genres bactériens pendant les différentes saisons sur les différents compartiments du palmier dattier.	71
Tableau13	Evolution des populations bactériennes dénombrées sur le milieu PCA de différents prélèvements en fonction des saisons.	75



Introduction

Introduction

La phyllosphère des plantes peut être colonisée par une variété de microorganismes très complexes : moisissures, levures et bactéries. Cependant cette dernière est considérée comme la flore la plus dominante (Lindow et Brandl, 2003). D'un point de vue écologique, la phyllosphère est l'une des niches qui présentent une grande importance agricole et environnementale et l'une des plus importants réservoirs qui peuvent contenir une diversité bactérienne saprophytique et pathogénique (whipps *et al.*, 2008).

L'importance du microbiote saprophytique pour la couverture végétale et les cultures agricoles a permis d'élargir les champs d'investigation dans ce domaine. Les bactéries phyllosphériques peuvent favoriser la croissance des plantes et à la fois supprimer et stimuler la colonisation et l'infection des tissus par les microorganismes phytopathogènes.

La structure et la diversité des populations bactériennes à la surface des plantes ont été recherchées sur une variété de plantes et d'arbres. Néanmoins, et malgré que le palmier dattier est cultivé depuis plus de 4000 J.C. ans, et l'un des arbres d'importance socio-économique, un nombre limité de travaux voire nul n'a franchi l'étude de l'écologie bactérienne de cette plante à partir de ses différentes parties comme les feuilles, les fruits et le tronc du palmier dattier. La plus part des travaux ont été consacrés à l'étude des agents pathogènes qui infectent le palmier dattier et provoquent des maladies et des pertes économiques énormes pour les pays producteurs (Djerbi, 1990). En revanche, peu de travaux sont consacrés à l'étude de la composition de l'écosystème microbien de la baie de datte, et des facteurs environnementaux susceptibles d'interagir sur l'évolution de cette flore (Hasnaoui *et al.*, 2010 ; Hamad *et al.*, 2012 ; Shenasi *et al.*, 2002). Aussi, d'autres études ont été dirigées pour connaître la qualité microbiologique des dattes sur le marché (Aidoo *et al.*, 1996 ; Umar, 2014) en raison de son impact sur la consommation humaine d'une part, et sur son impact sur la détérioration des dattes pendant le stockage d'autre part. Il est désormais bien établi que la flore bactérienne du palmier dattier n'a pas été étudiée auparavant. Ces données doivent probablement contribuer à une meilleure compréhension de l'écologie de la communauté bactérienne présente sur le palmier dattier.

Ce travail de recherche a pour objectif principal de décrire la diversité et la dynamique de la population bactérienne de la baie de datte, feuille et tronc du palmier dattier puis d'évaluer l'impact du climat sur cette population. Pour la présentation de ce travail, deux parties sont illustrées dans cette présente thèse :

- Une première partie correspond à la synthèse bibliographique. Elle permet de situer le travail dans son contexte scientifique et de souligner la démarche d'étude en écologie microbienne.
- La seconde partie traite le travail expérimental et décrit successivement le matériel et les méthodes utilisées (I) et l'ensemble des résultats et discussion obtenus (II) qui se termine par une conclusion générale.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, université frères Mentouri Constantine 1. L'identification moléculaire des souches bactériennes est réalisée au sein du laboratoire de « School Of Environnement And Life Sciences », université de Salford, Royaume uni.

1. Biodiversité et écologie microbienne d'un écosystème

1.1. Définition de la Biodiversité

La diversité biologique ou biodiversité a été définie comme: « la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. La biodiversité a également été définie comme un ensemble d'identités mesurables selon différentes échelles du l'espace et du temps (Alain, 2003).

La biodiversité est habituellement divisée en trois niveaux : La diversité génétique, spécifique et écosystémique. La diversité génétique, elle se définit par la variabilité des gènes à l'intérieur d'une même espèce (diversité intraspécifique) ou d'une population, elle est caractérisée par la différence de deux individus d'une même espèce ou sous-espèce.

La diversité spécifique (ou diversité interspécifique), correspond à celle qui existe au niveau des différentes espèces trouvées dans une aire donnée. Chaque groupe défini peut être caractérisé par le nombre des taxons qui le composent.

La diversité écosystémique, qui correspond à la diversité des écosystèmes qui existe au niveau des environnements physiques et des communautés biotiques dans un paysage, elle concerne les interactions des populations naturelles et de leur environnement physique.

La diversité est difficile à quantifier, néanmoins divers indicateurs écologiques sont utilisés pour l'étudier et la décrire. Les indicateurs de la biodiversité par rapport à la composition sont par exemple la richesse en termes d'espèces présentes et les fréquences géniques. Afin de comprendre la biodiversité d'un écosystème, il faut étudier et comprendre les facteurs biologiques et environnementaux qu'agissent et contrôlent la distribution, la taille et l'abondance des espèces dans une communauté, le taux d'échanges génétiques entre les populations, la croissance des populations et le recyclage des éléments nutritifs. Ces indicateurs sont des composants importants pour la compréhension de la biodiversité en ce qui concerne la façon dont elle change, ainsi que les causes et les conséquences de ce changement (Whipps *et al.*, 2008).

1.2. Écologie microbienne d'un écosystème

L'écologie microbienne consiste à caractériser la biodiversité microbienne d'un écosystème, à caractériser les interactions entre microorganismes (chaînes trophiques), à identifier le rôle des microorganismes dans l'écosystème, à étudier les interactions hôtes-microorganismes (symbiose, commensalisme, parasitisme, agent pathogène).

L'écologie microbienne constitue aujourd'hui une discipline distincte dans les sciences biologiques. Les avancées scientifiques en biologie et l'intérêt croissant, dans les années 60, sur les sujets concernant l'environnement, ont contribué au développement exponentiel des études en écologie microbienne (Atlas *et al.*, 1992). Des ouvrages comme "Principles of Microbial Ecology" de Thomas D. Brock (1966), "Experimental Microbial Ecology" de Sheldon Aaronson (1970), "Microbial Ecology" de Martin Alexander (1971) et le premier journal scientifique "The journal of Microbial Ecology" (Springer Verlag) en 1974, ont marqué le début d'une époque à partir de laquelle l'écosystème microbien s'affirme comme un domaine d'importance pour la science, l'industrie et l'environnement (Guerrero, 2002). L'écologie microbienne couvre donc des domaines très variés.

Dans le domaine de l'environnement et de la conservation des ressources, les études en écologie microbienne se sont consacrées notamment à la bioremédiation, qui consiste à éliminer des polluants organiques ou minéraux par des microorganismes. L'équilibre de ces écosystèmes favorise les processus biologiques de recyclage des eaux de décontamination des métaux lourds et de la biodégradation des déchets (Flemming *et al.*, 1990; Pringault *et al.*, 2010; Murphy, 2010).

D'un point de vue agronomique, les micro-organismes ont un rôle essentiel dans l'équilibre du sol, participant activement aux cycles nutritifs d'éléments comme le carbone et l'azote, la dégradation du méthanol et influençant la croissance végétale et la santé des plantes (Øvreås et Torsvik, 1998; Glick, 2003). La relation de ces micro organismes avec les plantes peut avoir un caractère pathogène (Nehl *et al.*, 1996) mais peut aussi être bénéfique, en favorisant la croissance (Compant *et al.*, 2005). Certaines populations sont aussi utilisées comme agents de lutte biologique constituant ainsi une ressource importante pour les programmes de protection intégrée contre les ravageurs (El-Hassni *et al.*, 2006; Dihazi *et al.*, 2012 ; Sebihi *et al.*, 2016).

1.3. Écologie microbienne de la phyllosphère

En parallèle au terme rhizosphère, le terme phyllosphère a été utilisé pour indiquer les parties aériennes des plantes, entre autre les feuilles, les tiges, les bourgeons, les fleurs et les fruits (Whipps *et al.*, 2008). Néanmoins la majorité des investigations effectuées sur la microbiologie de la phyllosphère des plantes ont été concentrées sur les feuilles qui représentent la structure aérienne la plus dominante sur la terre (Morris et Kinkel, 2002). Cependant peu de travaux ont été abordés sur les bourgeons et les fruits pour l'évaluation de leurs contenus en microbes (Lindow et Brandl, 2003).

La phyllosphère représente une niche environnementale importante pour étudier les interactions microbiennes et les microorganismes colonisateurs. La phyllosphère support d'une variété de microbes constituée de bactéries, de levures et de champignons. Les bactéries sont les plus étudiées en raison de leur dominance numérique sur les feuilles (Lindow et Brandl, 2003). Une estimation de la diversité bactérienne sur la phyllosphère de 20000 plantes vasculaires dans une forêt tropicale a suggéré la présence de 2 à 13 millions d'espèces bactériennes dans cet habitat (Lambais *et al.*, 2006).

La population bactérienne épiphyte se diffère dans la taille et la composition d'une espèce à une autre et même sur des individus appartenant à la même espèce en réponse aux modifications et fluctuations environnementales. Selon des études, un grand nombre de facteurs peuvent influencer la diversité et modifier la composition de la communauté bactérienne dans la phyllosphère telles que les caractéristiques environnementales, physicochimiques [la disponibilité des sources de carbone (Wilson et Lindow, 1994 ; Mercier et Lindow, 2000), d'énergie et en accepteurs d'électrons, la température (Rosso *et al.*, 1995), le pH (Abekhti *et al.*, 2013), la teneur en eau ou encore la lumière], la sélection exercée par la génétique de la plante (Rasche *et al.*, 2006) et des propriétés spécifiques présentées par les microorganismes de la phyllosphère (Lindow et Brandl, 2003).

Plusieurs travaux ont été publiés sur l'écologie microbienne de la phyllosphère et de nombreuses plantes ont été examinées pour découvrir la composition de ces réservoirs naturels en espèces microbiennes, et de comprendre les interactions microbiennes qui peuvent s'effectuer sur la surface des plantes et les mécanismes d'adaptation aux modifications de la phyllosphère

(Ercolani, 1991 ; Thompson *et al.*, 1993 ; Legard *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 2001; Kadivar et Stapleton, 2003; Idris *et al.*, 2004; Lambais *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2006, Martins *et al.*, 2013). Ercolani (1991) a étudié la communauté bactérienne sur les feuilles d'olivier pendant plusieurs années, et il a observé des modèles distincts de la colonisation microbienne pendant les différentes périodes de l'année. La diversité bactérienne était la plus faible pendant les mois les plus chauds et les plus secs de la saison, tandis qu'elle était la plus élevée pendant les mois les plus frais et pluvieux. Thompson *et al.* (1993) ont étudié les bactéries épiphytes de la betterave sur l'ensemble des saisons de croissance, ils ont isolé plus de 78 espèces bactériennes, représentent 37 genres bactériens connus (Thompson *et al.*, 1993). Par coïncidence, dans les deux études décrites ci-dessus, les communautés sur les jeunes feuilles étaient composées d'un grand nombre de taxons que ceux des vieilles feuilles. Une autre étude similaire a été effectuée sur le blé, a révélé la présence de 88 espèces bactériennes, représentent 37 genres bactériens décrites précédemment (Legard *et al.*, 1994).

Des études de type métagénomique ont démontré que les protéobactéries sont le groupe le plus dominant sur la surface des feuilles. Les firmicutes peuvent également former une grande partie de la communauté bactérienne dans certaines situations, avec quelque Acidobacteria, Actinobactéries et les cyanobactéries (Kadivar et Stapleton 2003; Idris *et al.*, 2004; Lambais *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2006). Yang *et al.* (2001) ont conclu d'après une étude menée sur la phyllosphère des plantes cultivées que ces dernières peuvent soutenir un grand nombre de nouvelles bactéries et des communautés microbiennes phyllosphériques très complexe que l'on avait pensé (Yang *et al.*, 2001), et cela est confirmé par l'étude de Lambais *et al.* (2006) portée sur des communautés bactériennes de la phyllosphère dans une forêt brésilienne tropicale, et ils ont trouvé que 97% des espèces bactériennes identifiées étaient des espèces non décrites précédemment. Donc, la prédiction de la biodiversité d'un écosystème donnée est basée sur les moyens et les méthodes exploitées afin de déterminer les éléments constitutifs de ce milieu.

2. Facteurs affectant le développement des microorganismes dans la phyllosphère

Par leur métabolisme, les microorganismes élaborent des éléments biosynthétiques nécessaires à leur reproduction. La disponibilité des substrats et les conditions de biosynthèse dans un écosystème donné peuvent varier selon plusieurs facteurs spécifiques à un biotope. Dans la réponse aux changements physico-chimiques de l'environnement, les microorganismes modifient leur comportement métabolique par une réponse adaptative. Cette réponse peut comprendre une

phase de latence ou d'inactivité, mais elle peut aussi induire la répression ou la modulation de l'expression de certains gènes afin d'optimiser l'utilisation d'énergie pour les fonctions cellulaires indispensables à leur survie dans les conditions qui leurs sont imposées.

Les facteurs écologiques affectant un écosystème microbien donné sont nombreux et agissent de façon simultanée. Dans le cas où la biocénose est soumise à des conditions de pH, de température et de pression osmotique extrême, la sélection s'opère en supprimant certains individus de la population, altérant par conséquent sa structure.

2.1. Température

La température est l'un des facteurs climatiques les plus importants ayant un impact sur la croissance, la dynamique et la structure des communautés microbiennes (Rosso *et al.*, 1995) et a été reconnu comme une variable environnementale importante qui influence la structure des populations (Pettersson et Baath, 2003; Bell *et al.*, 2009 ; Aljasser, 2010). La température optimale de croissance de chaque microorganisme est très variable. Si une augmentation de température peut accélérer les réactions enzymatiques favorisant ainsi la croissance, au delà d'une certaine température, certaines protéines peuvent se dénaturer affectant ainsi le développement de la cellule. Quand la température descend en dessous de la température optimale, la structure lipidique de la membrane cellulaire est modifiée, affectant le transport actif des substrats organiques et inorganiques et diminuant ainsi l'affinité au substrat (Nedwell, 1999; Pomeroy et Wiebe, 2001).

L'influence de ce paramètre sur la dynamique des populations a été constatée dans plusieurs travaux. Landa *et al.* (2004) ont étudié l'effet de la température sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* (un agent de biocontrôle sur des phytopathogènes d'origine fongique) et ont conclu que lorsque la température n'est plus optimale, les activités biologiques deviennent moins performantes et les effets antagonistes deviennent plus faibles. Un comportement similaire a été observé chez *Trichoderma sp.*, où son effet inhibiteur sur d'autres espèces devient limité lorsque la température est inférieure à la température optimale (Mukherjee et Raghu, 1997) . En outre, Aljasser (2010) a étudié l'effet de la température sur l'évolution de la flore bactérienne pendant le stockage des dattes et a trouvé que la flore bactérienne évoluée différemment à différentes températures.

Il a été montré aussi que dans des écosystèmes microbiennes comme celui du sol ou marin, la modification de structure d'une population au cours des saisons est principalement liée à des variations de température (Pommier *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2009).

2.2. L'humidité

Parmi les différents paramètres que le climat rassemble, la température et l'humidité sont des facteurs connus comme ayant un impact sur la dynamique et la structure des communautés microbiennes.

Les conclusions de plusieurs études dans différents écosystèmes ont montré que l'humidité peut affecter la croissance et la diversité microbienne (Shenasi *et al.*, 2002 ; Butenschoen *et al.*, 2011) , Cependant, dans certaines conditions, une augmentation excessive de l'humidité peut ralentir l'activité microbienne (Linn et Doran, 1982; Horz *et al.*, 2004), et on peut constater que la présence d'eau à la surface des plantes pendant les pluies, favorise la prolifération des microorganismes épiphytique, alors que les même plantes soumises à des périodes de sécheresse montre une diminution de la microflore épiphytique (Ercolani, 1991). L'effet de biocontrôle de certaines espèces peut être aussi affecté par ce paramètre. Le potentiel antagoniste de *Pseudomonas* et de *Bacillus* vis à vis de champignons pathogènes peut diminuer dans des conditions de faible humidité (Andrews, 1992).

2.3. Activité de l'eau

L'effet de l'humidité sur le développement des populations repose sur des principes liés à la quantité d'eau qui peut être amenée à un milieu (Zamora *et al.*, 2006). Mais, pour le développement des microorganismes, le plus important c'est la disponibilité de cette eau. Ce paramètre, désigné par le terme activité de l'eau (a_w : activity of water) (Scott, 1953), représente la pression de vapeur d'eau d'un produit par rapport à la pression de vapeur saturante à la même température. Cette eau libre, qui est un facteur fondamental dans la croissance microbienne qui est considérée comme un des principaux paramètres influençant la conservation des aliments (Leistner, 2000; Al jasser, 2010 ; Hasnaoui *et al.*, 2010 ; Shenasi *et al.*, 2002).

Chaque microorganisme présente des besoins en eau spécifique (Leistner et Rodel, 1975; Mossel, 1975; Scott, 1957; Pitt, 1975), dans la majorité des cas, les levures sont plus exigeantes que les bactéries et les champignons (Christian, 1980). Moore et al. (2001) ont étudié l'effet de l' a_w sur la croissance de différents microorganismes de la baie de datte (bactéries, levures et

champignons) montrant que chaque type de microorganisme requiert des Aw spécifiques pour se développer.

2.4. Le pH

La gamme de pH où les microorganismes présentent une croissance optimale est variable selon le type de microorganisme. Dans des écosystèmes aquatiques ou écosystèmes telluriques l'influence du pH a été vérifiée (Chamier, 1987; Rousk *et al.*, 2010). Sur la pellicule des plantes et des fruits, ce paramètre est plus difficile à mesurer, dû au fait que cet environnement n'est pas sous forme liquide. Cependant, les exsudats pelliculaires ont certainement une activité ionique, ce qui peut en partie déterminer le potentiel hydrogène de la surface extérieure. De plus, l'excrétion de protons par la plante modifie également la composition du milieu externe (Vos *et al.*, 1986). Tous ces mécanismes influent donc sur le pH, et par conséquent sur la croissance des microorganismes dans cet environnement.

3. Ecosystème du palmier dattier et communauté microbienne

3.1. Plante et Fruit

Le palmier dattier ou (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante monocotylédone arborescente appartenant à la famille des Palmacées (Figure 1). Sa culture est une des plus anciennes au monde, elle représente environ 100 million de pieds sur une surface estimée par 1,3 million d'hectare. Parmi les 200 genres que cette famille comprend et plus de 2500 espèces (El Hadrami et Al-Khayri, 2012), l'espèce *Phoenix dactylifera* L. est parmi les espèces les plus importantes de la famille des Arecacees . L'espèce *Phoenix dactylifera* L. qui produit des dattes comprend plus de 5000 variétés, que les botanistes appellent cultivars (El Hadrami et El Hadrami, 2009).

En Algérie, on compte plus d'un millier de cultivars dont Deglet Nour, la variété la plus appréciée (Bougeoudoura *et al.*, 2008) recensés sur 17 wilayas réparties sur le territoire du sud algérien où le climat est chaud et sec. Il est établi en plusieurs oasis, sa culture s'étend depuis la frontière Marocaine à l'ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'est et depuis l'Atlas Saharien au nord jusqu'à Reggane (sud-ouest), Tamanrasset (centre) et Djanet (sud-est) (Bougeoudoura *et al.*, 2008). Ces palmiers (18 201 640 palmiers-dattiers) assurent une production de 7 893 570 de quintaux par an, éparpillés sur une surface globale de 163 985 ha. Avec ce

potentiel, l'Algérie figure parmi les grands pays à fort potentiel phoenicole (Blama Merzaia, 2014).

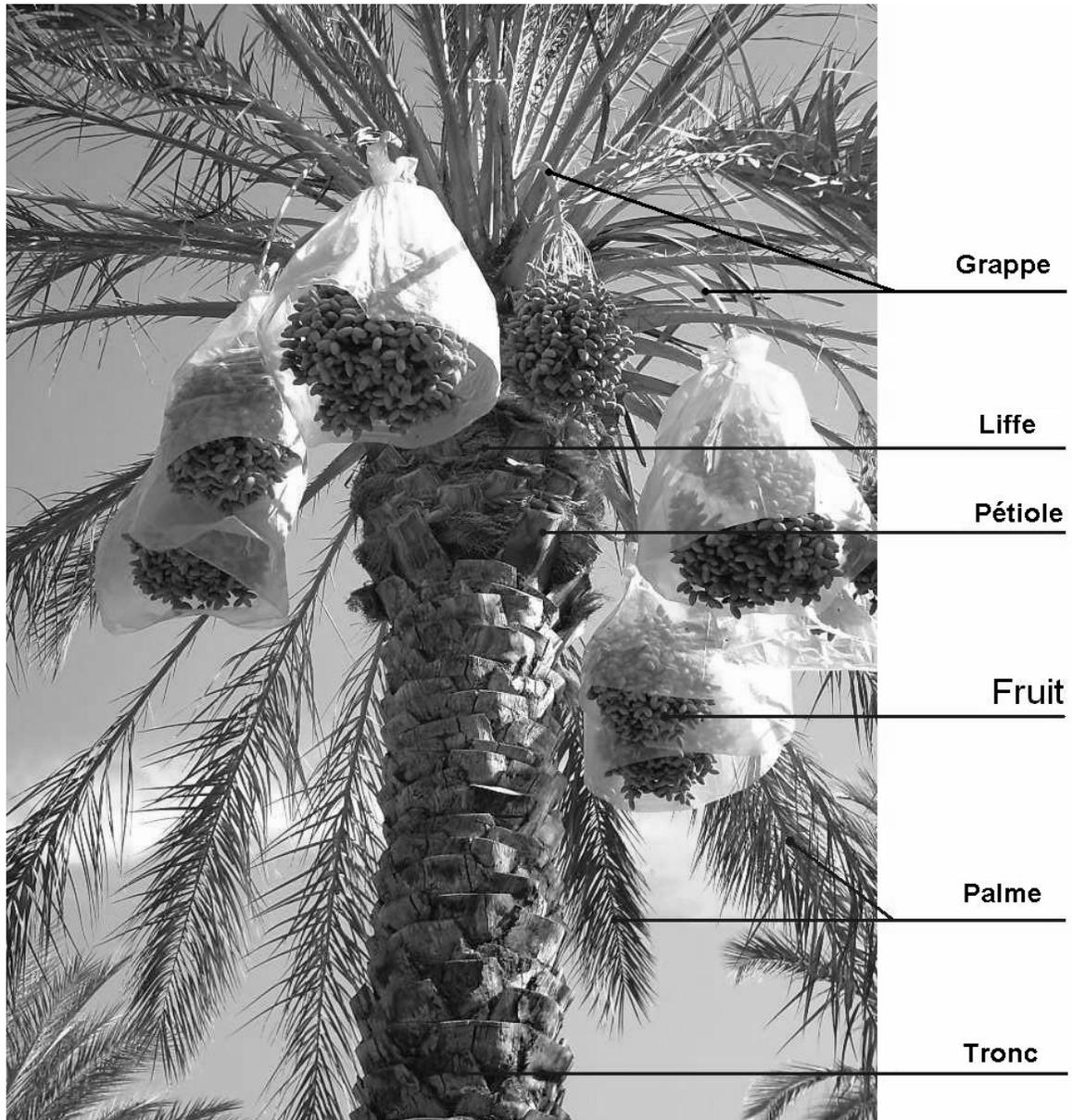


Figure 1: Différentes partie d'un palmier dattier (Agoudjil *et al.*, 2011)

Les dattes sont des fruits a graine unique d'une forme cylindrique, arrondie ou ovoïde, avec mésocarpe recouvert d'un épicarpe mince, de couleur un peu jaunâtre à brun rougeâtre. Le développement des dattes passe par plusieurs étapes de maturation au cours desquelles on distingue les différentes modifications phénologiques, décrites traditionnellement par des changements dans la couleur, la texture et le goût/saveur (Figure 2).

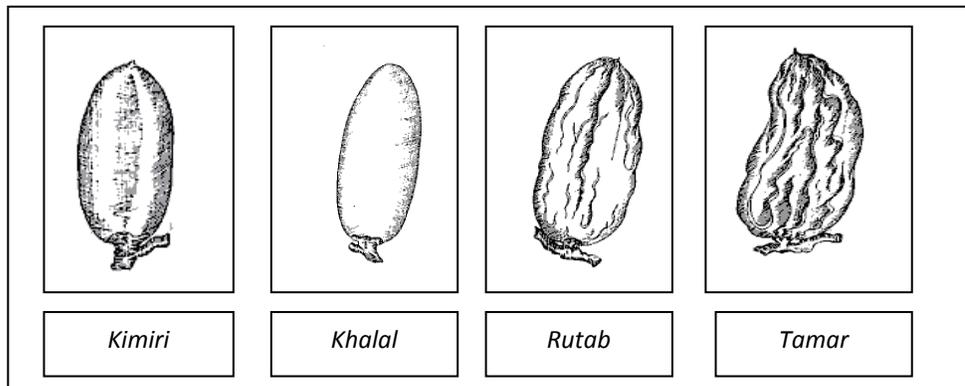


Figure 2 : L'évolution des dattes chez le palmier dattier (Barreveld, 1993).

La différence dans ces stades a été attribuée à des changements dans la composition chimique telle que la composition en sucre et les tannins (Myhara *et al.*, 2000).

Les dattes vertes (kimiri) contiennent de l'eau et du tanin en maximum quantité. Au cours de ce stade un grossissement rapide du fruit est observé en raison de l'accumulation des hydrates de carbone et de l'humidité. Il est astringent à cause du taux élevé de tanin, l'acidité est assez élevée, avec des taux moyens en protéines de 5,6%, en lipides 0,5%, et en cendres de 3,7% (Al-Hooti *et al.*, 1998). A la fin de ce stade, la couleur commence à devenir jaune ou rouge, selon les cultivars.

Au deuxième stade de la maturation (*khalal*), les dattes commencent à perdre de l'eau et de l'acidité, et parallèlement accumulent des quantités considérables de saccharose. Les teneurs en protéines, lipides et cendres diminuent jusqu'à 2,7 ; 0,3 et 2,8%, respectivement. Le poids du fruit augmente, ainsi que la longueur et le diamètre (Al-Hooti *et al.*, 1998). La couleur de la datte vire au jaune ou au brune, suivant les clones. Dans le troisième stade (*Rutab*) la perte d'eau est accélérée, et les fruits deviennent plus doux dans la texture et le saccharose accumulé au cours du stade *khalal* est converti en sucres invertis (glucose, fructose). Les dattes sont parfois consommées à ce stade. Dans la maturité finale (*tamar*), les fruits contiennent la moindre quantité d'eau et conservent une texture douce au goût sucré. La teneur en tanins est à son niveau le plus bas (Myhara *et al.*, 2000). La couleur du fruit devient de plus en plus foncée, surtout chez les dattes molles.

En générale, les dattes sont très riches en nutriments tel que les sucres (80% du poids sec), les fibres (6.04 à 11.05%), les protéines (2.5%) et la acides aminées , les éléments minéraux(Elles sont de bonnes sources en potassium(552 mg dans 100g de datte), fer (2,69%).

calcium (65%), magnésium (20%) et phosphore (72%), les vitamines(A,B2,B3,B5,B6,et B9), les acides organiques (citrique, malique, et acide oxalique), et les composés phénoliques (Abekhti *et al.*, 2013).

Malgré cette richesse en nutriments et surtout dans le dernier stade de maturation (tamar), la surface des dattes ne favorise pas la croissance des bactéries ou d'autre microorganisme, ceci est due aux changements des caractéristiques physico-chimique du fruit, à l'augmentation de la concentration en sucre et la diminution de l'activité de l'eau au-delà du seuil ne permettant pas la prolifération microbienne (Shenasi *et al.*, 2002 ; Hasnaoui *et al.*, 2010).

Les autres parties constitutives du palmier dattier comme le tronc, et les feuilles, sont formées par différents éléments qui permettent aux microorganismes de coloniser et de créer des niches écologiques (figure 3). En plus, la cuticule des autres organes végétaux tels que les feuilles, ont la capacité de retenir l'eau. Cette rétention dépend de l'humidité relative de façon à ce que lorsque les valeurs d'humidité sont plus élevées, l'absorption de l'eau sera plus importante. La présence d'eau cuticulaire est un facteur essentiel pour la croissance des microorganismes (Kerstiens, 1996).

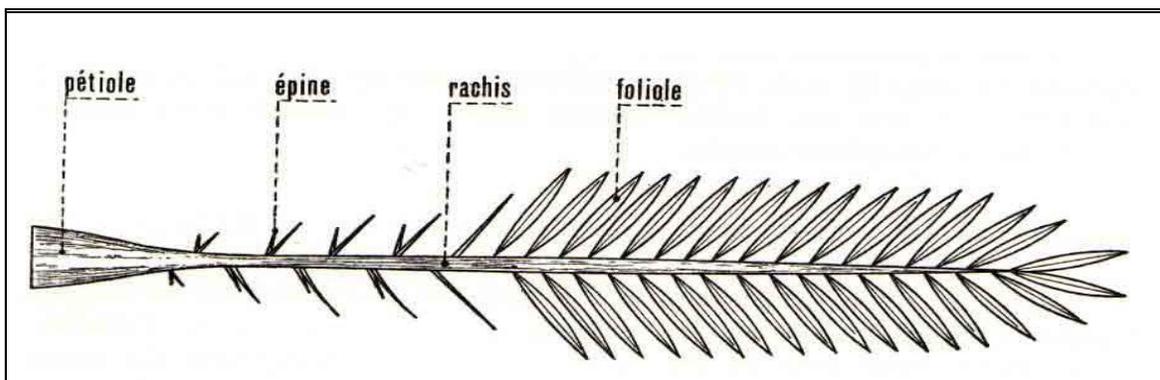


Figure 3 : Schéma d'une feuille du palmier dattier (Munier 1973).

3.2. Colonisation épiphytétique de la partie aérienne du palmier dattier

Le tronc, les feuilles, les bourgeons, les fleurs puis les futurs fruits de datte constituent les parties aériennes du palmier dattier. La présence des microorganismes n'a pas été vérifiée dans ces organes, sauf pour les dattes.

La microflore présente à la surface des dattes a été vérifiée dans plusieurs études. Les conclusions de ces travaux montrent l'existence d'une variété de moisissures, levures et de bactéries (Aidoo *et al.*, 1996; Ragab *et al.*, 2001; Mohammed et Hossein, 2005; Al-sheikh, 2009; Shenasi *et al.*, 2002 ; Hasnaoui *et al.*, 2010 ; Hamad *et al.*, 2012; Umar *et al.*, 2014). De

nombreuses études ont permis d'identifier les différents intervenants de ce consortium microbiologique, et les facteurs qui peuvent l'influencer. Les différents facteurs contribuant à la contamination des dattes: les transformations physico-chimiques du fruit ; évolutions du taux de sucres, effet du pH neutre, effet de la température et de l'humidité (Al- Shaikly *et al.*, 1986).

La diversité fongique contaminant les dattes a été mise en évidence dans plusieurs travaux. *Aspergillus sp.*, *Stemphylium botryosum*, *Phomopsis diopspyri*, *Cladosporium sp.*, *Citromyces ramosus*, *Macrosporium sp.*, *Alternaria sp.* et *Penicillium* ont été les plus fréquemment identifiées sur les dattes (Abekhti *et al.*, 2013). Vu la variabilité des espèces fréquemment isolées des dattes, il n'y a pas une espèce particulière qui domine les dattes qui peut être considéré comme la flore originale des dattes. En générale, des espèces appartenant au genre *Aspergillus*, *Alternaria* sont les plus isolées de dattes et considérées même les principales espèces responsables de l'altération des fruits (Ragab *et al.*, 2001; Shenasi *et al.*, 2002; Hasnaoui *et al.*, 2010 ; Hamed *et al.*, 2012).

La présence des champignons est souvent associée à un effet néfaste sur les dattes mais la prolifération des champignons sur les dattes peut se dérouler juste pendant les premiers stades de la maturation, sauf les champignons xerophiliques comme *Catenularia fuliginia* sont capable de croître sur les dattes sèches (Abkhti *et al.*, 2013).

Taouda *et al.* (2013) ont montré que toutes les variétés de dattes analysées (14 variétés) sont contaminées par les levures et les moisissures. 50% des levures isolées appartiennent à *Saccharomyces cerevisiae* alors que les autres levures appartiennent à *Zygosaccharomyces fermentati*, *Hansenula anomala*, *Lodderomyces elongisporus* et *Kluyveromyces fragilis*. Les moisissures sont représentées par *Aspergillus niger* (l'espèce majoritaire), *Penicillium notatum* et *Rhizopus oryzae*.

La présence des bactéries sur les dattes a été mentionnée dans plusieurs travaux. L'isolement et le dénombrement des bactéries à la surface des dattes préemballées et vendues à Greater Glasgow ont révélé la présence des coliformes à des niveaux élevés, et la présence de *Staphylococcus aureus* en très faible quantité (Aidoo *et al.*, 1996). Une étude effectuée sur six cultivars de palmier dattier au stade rutab vendu à différents points à Al-Hofuf Ville en Arabie saoudite a révélé la présence des bactéries aérobies mésophiles, satphylocoques, et des coliformes (Hamad *et al.*, 2012).

D'autres études similaires effectuées sur plusieurs variétés de dattes cultivées au Maroc pour analyser leur composition chimique et microbiologique. Ils ont rapporté la présence aussi des champignons et des levures, mais l'absence des coliformes et des staphylocoques (Hasnaoui *et al.*, 2010). Une étude plus récente a révélé la présence de trois genres *Klebsiella*, *Yersinia* et *Enterocci* représentant Cinq espèces (*Klebsiella Terrigena* (2), *K. pneumonia*, *K. oxytoca*, *Yersinia enterocolitica*) (Abekhti *et al.*, 2013).

L'analyse microbiologique des dattes de plusieurs variétés a été effectuée sur les différents stades des maturations en prenant en compte la variation différenciable dans la composition chimique des dattes comme facteur influençant la flore microbienne. Ils ont conclu qu'on peut attribuer la différence dans la composition microbienne aux différents stades de maturation et aux sélections exercées par le génotype de la variété de dattier (Shenasi *et al.*, 2002). Dans une autre étude Al-Shaickly *et al.* (1986) ont déterminé l'ampleur de la contamination des dattes durant la maturation, ils ont suivi l'apparition de la flore bactérienne sur 4 variétés de dattes iraqiennes, ceci leurs a permis de constater que la contamination par les bactéries n'étaient pas régulière durant tous les stades de maturation. La flore naturelle des dattes est constituée par des microorganismes sous formes de spores, formes végétatives, bactéries, levures et moisissures (tableau 1).

Tableau 1: La flore endogène des dattes (Al. Shaickly *et al.*, 1986).

Bactéries	Moisissures	Levures
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Zygosaccharomyces cavarae</i>
<i>B. Lichiniiformis</i>	<i>Penallium</i>	<i>Z.Globiformis</i>
<i>B. Pumilus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Z.Barkeri</i>
<i>B. Pasteurii</i>	<i>pythium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>B.Cereus</i>		<i>Torula spp</i>
<i>B.Subtilis</i>		<i>Mycoderma spp</i>
<i>Microoccusureae</i>		<i>Candida krusei</i>
<i>M. Luteus</i>		<i>mycoderma</i>
<i>M. varians</i>		

4. Méthodes d'analyse en écologie microbienne

4.1. Méthodes culturelles

La composition spécifique des communautés microbiennes a longtemps été abordée par isolement de souches sur des milieux de cultures artificiels plus ou moins sélectifs et les plus adaptées pour un type donné de microorganisme en fonction des conditions physiques et nutritionnelles de milieu préalablement identifiées. Donc, la plupart de nos connaissances sur les microorganismes proviennent d'études réalisées sur des cultures pures isolées de l'environnement.

Cette technique a été mise au point pour réaliser des cultures pures à la fin du 19^{ème} siècle et a constitué une étape importante en microbiologie par la mise en place des outils nécessaires au développement de la taxonomie bactérienne, de l'étude des pathologies d'origine microbienne, de l'étude de la biodiversité microbienne des aliments et la compréhension du rôle des microorganismes dans les différents écosystèmes (Pelczar *et al.*, 1993).

Les techniques culturelles de microbiologie contribuent d'une façon importante à l'étude des écosystèmes microbiens. Parmi elles, l'isolement des microorganismes en culture pure, l'observation microscopique et les tests biochimiques, sont des outils souvent utilisés dans ce type d'étude.

L'utilisation des milieux de cultures sélectifs pour étudier la composition spécifique des communautés microbiennes fait l'objet de vifs débats (Hill *et al.*, 2000; Ritz, 2007; Nichols, 2007). Même si ces méthodes donnent des résultats peu représentatifs des communautés (Amann *et al.*, 1995), elles sont toujours utilisées afin d'étudier la fonction et la contribution écologique de certaines espèces ou groupes particuliers de populations (Köpke *et al.*, 2005).

4.1.1. Milieu de culture sélectif, d'enrichissement et d'isolement

L'étalement d'un échantillon environnemental sur un milieu de culture, permet la multiplication des microorganismes visant soit à l'isolement clonale soit à l'estimation du nombre de microorganismes cultivables. Cette étape, parfois précédée d'une phase d'enrichissement visant à favoriser la croissance d'un microorganisme précis. Les conditions de culture utilisés pour l'enrichissement peuvent être soit électifs ou sélectifs pour l'isolement des microorganismes aux phénotypes particuliers. Les étapes d'enrichissement et

d'isolement sont nécessaires pour accéder aux caractéristiques phénotypiques, néanmoins elles ne permettent d'accéder qu'à un nombre réduit des espèces présentes dans un écosystème.

La cultivabilité des microorganismes dépend du type de milieu utilisé et des conditions de culture. Un seul milieu ne peut pas reproduire toutes les conditions environnementales auxquelles un microorganisme est soumis pour sa croissance. Un milieu de culture générique sous conditions d'incubations standard est donc inadapté à la croissance de l'ensemble des microorganismes dans un échantillon, surtout si ceux-ci proviennent d'environnements extrêmes à fort gradient physico-chimiques.

Il existe plusieurs moyens classiques pour modifier la sélectivité d'un milieu : ajouter un composé utilisé par un organisme comme source nutritive, supprimer un composé utilisé uniquement par les organismes que l'on ne souhaite pas isoler, ajouter des antibiotiques, modifier les propriétés physico-chimiques du milieu (pH, potentiel redox, etc.), modifier les conditions d'incubation (température, teneur en eau, pression osmotique, lumière, etc.).

Plusieurs travaux ont simulé des conditions de croissance environnementale en milieu de culture synthétique, en adaptant les concentrations en nutriments (Bruns *et al.*, 2002; Connon et Giovannoni, 2002; Cho et Giovannoni, 2004), en augmentant les périodes d'incubations (Davis *et al.*, 2005), en ajoutant des molécules signes dans la communication intercellulaire (Bruns *et al.*, 2002), en permettant le contact avec la source environnementale par l'utilisation de membranes et en utilisant dans la composition du milieu des substrats provenant de l'environnement d'origine des microorganismes étudiés (Bruns *et al.*, 2002; Connon et Giovannoni, 2002; Cho et Giovannoni, 2004). Ces études, tentant de faire correspondre les conditions *in vivo* avec les conditions *in vitro*, ont montré une augmentation significative de la diversité et de la quantité des microorganismes cultivables.

4.1.2. Tests biochimiques et profils d'activité métabolique

L'analyse de la diversité métabolique peut être réalisée en examinant le comportement catabolique d'un individu ou d'une communauté vis à vis de plusieurs substrats. Les données obtenus concernant la dégradation de ces substrats peuvent être rassemblées formant ainsi un profil métabolique. Le choix des tests biochimiques est dépendu des tests préliminaires comme les critères macroscopiques, coloration de la spore, mobilité, et production de catalase.

Le système miniaturisé d'identification « API » se montrent très efficaces pour reconnaître le genre et parfois même l'espèce. Bochner (1989) propose l'utilisation de systèmes

de microplaques (Biolog), contenant différents substrats carbonés pour réaliser l'identification de différentes souches de bactéries. Plus tard, Garland et Mills (1991) ont adapté son utilisation à l'étude des communautés microbiennes. Les empreintes métaboliques générées par cette méthode, nommées par Lehman et al. (1995) 'Community Level Physiological Pattern' (CLPP), seront la base de plusieurs études en écologie microbienne (Insam, 1997). Le carbone étant un facteur clé dans plusieurs écosystèmes microbiens (Grayston *et al.*, 1998), l'utilisation de cette technique apparaît comme tout spécialement adaptée pour la détermination de la versatilité métabolique d'un échantillon environnemental.

L'étude d'une communauté microbienne peut être réalisée d'un point de vue de la diversité génétique mais aussi dans un point de vue du potentiel métabolique. La corrélation entre ces deux approches a été le sujet de nombreux travaux de recherches (Giller *et al.*, 2004; Bertilsson *et al.*, 2007). La réponse métabolique d'une communauté face à des facteurs biotiques ou abiotiques reste un facteur important pour la caractérisation fonctionnelle de cet écosystème.

4.1.3. Limites des méthodes classiques

Les techniques de culture sont traditionnellement utilisées pour l'étude des microorganismes et accéder à ses caractéristiques phénotypiques. Néanmoins elles ne permettent d'accéder qu'à un nombre réduit des espèces présentes dans l'écosystème a étudié et présentes plusieurs limitations. Il a été fréquemment rapporté que le comptage direct en microscopie dépassait de plusieurs ordres le nombre de cellules viables dénombrées par culture sur boîtes de Pétri (Gaüzere, 2012). Cette différence d'ordre technique est directement liée aux conditions de croissance *in vitro* hautement artificielles (Terzieva *et al.*, 1996).

Ainsi, le milieu de culture utilisé ne peut être adéquat à tous les microorganismes et l'ensemble des paramètres de la niche biologique ne peuvent être reproduites pour convenir à toute la communauté microbienne présente. Dans ces conditions, certains microorganismes hors de leur écosystème naturel peuvent passer à un état de dormance. Ainsi, d'autres populations numériquement inférieures peuvent supplanter des populations majoritaires mais moins adaptées au milieu de culture.

Un autre inconvénient vient de l'envahissement de la gélose par certaines espèces de microorganismes (*Bacillus spp*, moisissures) encombrant le dénombrement et l'isolement des souches (Taha *et al.*, 2007). Ceci est du à la sélectivité intrinsèque des milieux de culture d'une part et de l'inhibition de la croissance en raison de concentrations élevées des substrats (exemple

des microorganismes oligotrophes). D'autre part les populations enrichies et adaptés au milieu liquide peuvent être incapables de se développer sur des milieux solides.

Parmi les autres défis de l'approche classique, la découverte de microorganismes se retrouvant dans un état physiologique connu sous le nom de "viable mais non cultivable" juste après leur séparation de leur milieu naturel. L'extraction de l'ADN totale est la méthode la plus adaptée à ce type de microorganisme. Mais, certaines expériences ont montré que ces cellules sont capables de croître dans des conditions de culture très particulières (Cocolin *et al.*, 2013).

4.2. Méthodes moléculaires

L'utilisation de la biologie moléculaire dans l'étude de la microbiologie environnementale a amené des changements considérables, apportant un large éventail de techniques et de méthodes. Cette nouvelle approche a permis d'élargir les champs d'investigations et l'horizon des connaissances, contribuant ainsi à une vision différente de l'écosystème microbien.

La nouveauté de ces approches est l'analyse génétique des espèces préalablement cultivées ou de l'ADN total directement extrait des échantillons environnementaux (figure 4). Ce deuxième cas peut être particulièrement intéressant, car il permet d'appréhender des communautés microbiennes, soit par des « approches de type métagénomique » à partir du séquençage de l'ADN directement extrait d'un échantillon, évitant ainsi des étapes de culture et de clonage ou d'amplification (Shendure, 2008), soit en ciblant des gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique : les gènes de l'ARN ribosomiques (16S, 23S) ou les gènes dits fonctionnels associés à des fonctions écologiques spécifiques (*rpoB*, *nifH*, *nirS*, etc.) (Dahllöf *et al.*, 2000).

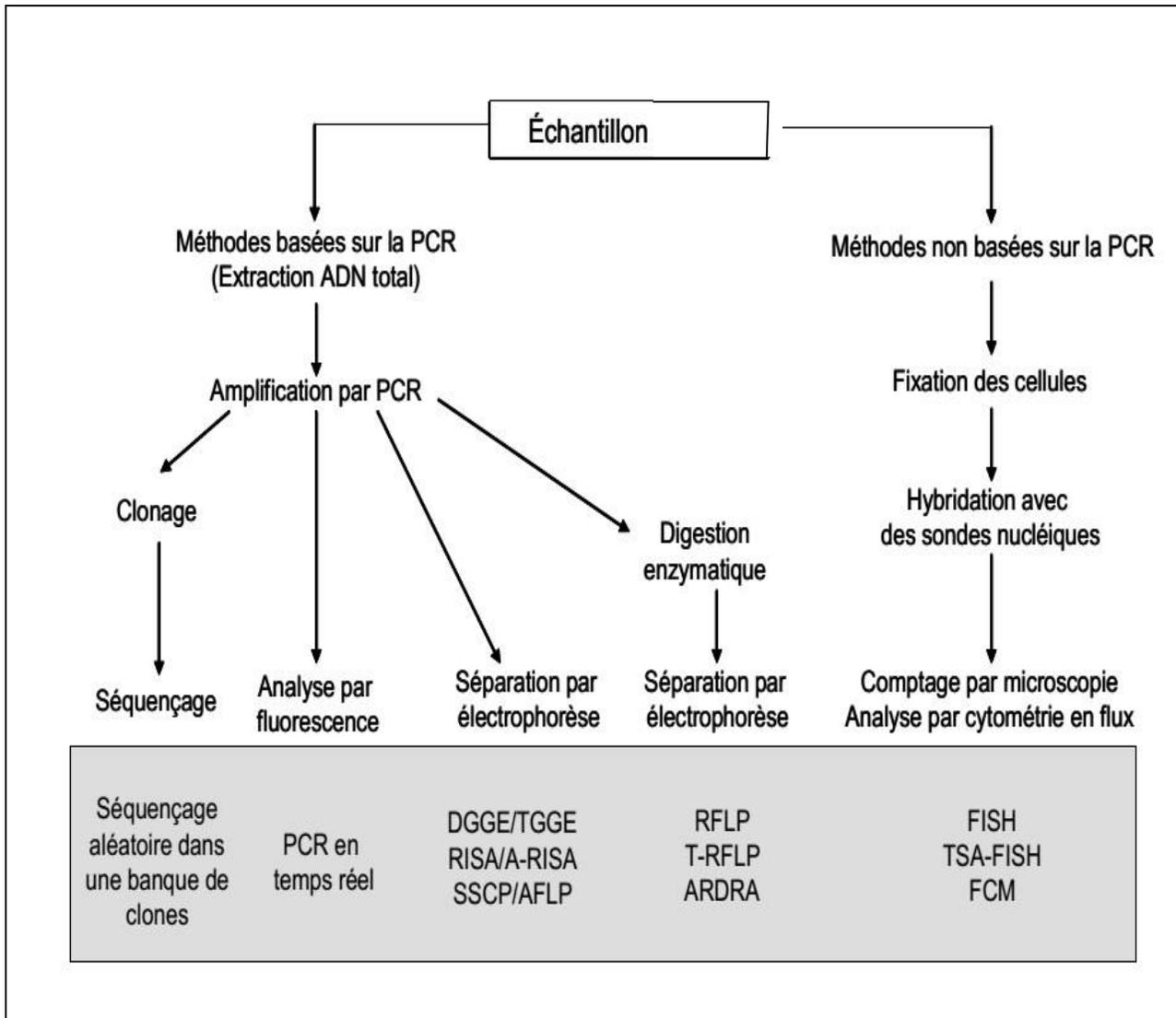


Figure 4 : Différentes approches moléculaires appliquées à l'étude de la biodiversité microbienne.

4.2.1. Amplification de l'ADN par PCR

La quantité d'ADN extrait d'un microorganisme est trop faible pour être considérée comme échantillon représentatif et d'être séquencé et analysé, donc une étape d'amplification et d'agrandissement du nombre de copie d'ADN est nécessaire par la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

Cette technique a été mise au point en 1986 par Mullis et ses collaborateurs (1986) ce qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993. La PCR a révolutionné la biologie moléculaire comme peuvent le montrer les 247 920 articles publiés depuis sa découverte (PubMed,

février.2009). Une vingtaine de cycles permet de multiplier le nombre de molécules d'ADN présentes par un million (Lalam, 2006).

Les biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR, concernent le fait que, dans un mélange de séquences, il y aurait une amplification préférentielle de certaines séquences par rapport à d'autres. Cela est lié d'une part, à l'abondance de certaines séquences parmi l'ensemble et d'autre part, à la constitution de ces séquences, notamment leur richesse en bases G et C qui modifie le taux de dénaturation de l'ADN et par conséquent, le taux d'amplification (Head *et al.*, 1998 ; Polz et Cavanaugh, 1998).

Une première difficulté de cette technique est liée à l'étape d'extraction de l'ADN, avec la possibilité de co-extraire des inhibiteurs de la PCR (acides humiques, tannins, etc.). Pour réduire la présence de ces substances, des étapes de purifications d'ADN sont rajoutées au protocole d'extraction. Néanmoins, une purification excessive peut induire la perte d'une fraction d'échantillons. Une autre solution pour minimiser l'effet inhibiteur de ces composées consiste à rajouter de la BSA (bovine serum albumin) sur laquelle ces substances se fixeront (Plante *et al.*, 2011).

La lyse cellulaire, étape clé dans l'extraction d'acides nucléiques, peut influencer de façon déterminante la représentativité de la diversité des échantillons, dans la mesure où la constitution des tissus de certaines espèces peut amener à une lyse incomplète des cellules (Frey *et al.*, 2006). D'autre part, l'application de protocole d'extraction trop sévère peut endommager les acides nucléiques (Wintzingerode *et al.*, 1997).

Enfin, la formation d'hétéroduplexs ou molécules chimériques due à des erreurs d'élongation peut interférer dans l'analyse, générant des bandes ou des pics difficiles à interpréter (Muyzer, 1999).

4.2.2. Utilisation de l'ADNr 16S comme marqueur moléculaire

Parmi les différents marqueurs génétiques possibles, l'ADNr codant pour l'ARN ribosomique s'est avéré comme la cible moléculaire de choix pour les études en écologie microbienne (Giovannoni *et al.*, 1990; Smit *et al.*, 1999; Anderson et Cairney, 2004).

Ces séquences existent dans tous les organismes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule : le codage de l'ARNr qui compose les ribosomes ; structure responsable de la synthèse des protéines. Ces gènes présentent l'avantage d'être constitués d'une alternance de régions variables et de régions conservées (Gutell *et al.*, 1994; Stackebrandt *et al.*,

2002). Les régions conservées permettent d'avoir accès à différents niveaux de taxonomie et l'identification des grands groupes de microorganismes (Eucaryotes, eubactéries et archaebactéries) (Woese *et al.*, 1990) et les régions variables permettent une identification au niveau de l'espèce (Amann *et al.*, 1995).

Dans l'étude des bactéries, l'ADNr 16S a été choisi comme marqueur moléculaire préférentiel. Le choix de Woese et ses collaborateurs s'est porté sur la petite sous-unité de l'ARNr (16S chez les Procaryotes et 18S chez les Eucaryotes) pour plusieurs raisons (Pace *et al.*, 1985; Ludwig et Schleifer, 1994; Ludwig *et al.*, 1998) :

- Sa présence est universelle et il y accomplit le même rôle chez tous les organismes.
- Sa séquence est une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution varient, permettant de comparer des espèces très proches sur des domaines hypervariables et des espèces très éloignées sur des domaines très conservés.
- Il a évolué lentement.
- Il n'est pas le résultat de transferts latéraux.
- Il est relativement facile à isoler en raison de son abondance dans les cellules.
- Sa séquence est facilement obtenue par des méthodes standard d'extraction et de séquençage.
- Il est préféré au 5S et au 23S en raison de sa taille moyenne et de sa structure secondaire moins marquée. Sa séquence est suffisamment longue pour réaliser des comparaisons statistiquement cohérentes.

Ce gène est constitué par différents domaines dont la vitesse d'évolution est très variable. Les parties conservées, où la vitesse d'évolution est presque nulle, sont identiques chez toutes les bactéries et sont indiqués comme sites d'hybridation pour des amorces universelles.

Un avantage majeur lié à l'utilisation de l'ADNr 16S est la possibilité d'utiliser les autres séquences disponibles dans des bases de données bioinformatiques telles que Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). En revanche, la classification des bactéries au niveau de l'espèce basée sur la seule comparaison des gènes d'ARNr 16S n'est souvent pas pertinente. Ainsi, certaines espèces de *Bacillus*, distinguées sur la base de leur phénotype, présentent des séquences d'ARNr 16S identiques (Maughan et Auwera, 2011).

Dans la classification bactérienne reposant sur le seul critère ARNr 16S, ils ont considéré que deux gènes d'ARNr 16S montrant plus de 96% de similarités de séquence appartiennent à des microorganismes de même genre, et que deux gènes ayant plus de 98% de similarité appartiennent à la même espèce. Alors que d'autres chercheurs ont proposés d'utiliser des seuils de 97% pour le genre et de 99% pour l'espèce (Janda et Abbott, 2007), cependant certains auteurs suggèrent d'utiliser un seuil de 99,5% pour l'espèce (Woo *et al.*, 2008). Pour les taxonomistes, l'absence des seuils bien établis pour la définition du genre ou de l'espèce constitue un obstacle inhérent à l'établissement d'une classification robuste et même pour les utilisateurs de n'est pas confusion lors de ses recherches.

En se basant sur d'autres critères comme le taux d'hybridation ADN, ils ont déclaré que des valeurs d'hybridation ADN-ADN supérieures ou égales à 70% et des valeurs de ΔT_m inférieures ou égales à 5°C (Wayne *et al.*, 1987) constituaient des bornes raisonnables de l'espèce microbienne. Les espèces répondant à ces critères génotypiques doivent partager également de nombreuses similitudes phénotypiques et il se constate que des espèces différentes peuvent avoir des gènes d'ARNr 16S similaires à 99% (Torsvik *et al.*, 1998). Pour cela, la notion d'espèce étant difficile à définir par rapport aux bases moléculaires. La plupart des auteurs préfèrent donc classer les gènes d'ARNr 16S en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs), définies par un seuil de similarité, plutôt que de les affilier à des espèces ou des genres (Torsvik *et al.*, 1998).

L'un des désavantages de l'utilisation de ce gène est l'ubiquité des gènes ribosomiques et la possibilité que l'ADN d'autre origine que celle de la communauté en étude, puisse être amplifié simultanément à celui envisagé, perturbent l'analyse et l'interprétation des résultats. C'est le cas de l'ADN plastidial et mitochondrial, qui du fait de similitudes de région avec l'ADN bactérien, permet l'hybridation de certaines amorces universelles et par conséquent un résultat positif à l'amplification. Pour éviter ce type de problème, il est nécessaire de choisir des régions spécifiques à la communauté en question ou dans le cas où sa présence est inévitable, il faut donc repérer les pics ou bandes liés à cette amplification aspécifique et les supprimer des profils obtenus (Yang et Crowley, 2000).

4.2.3. Clonage moléculaire et séquençage d'ARNr 16S

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne et c'est l'une des premières à avoir été employée pour s'affranchir de toute étape de culture. Les différentes étapes de cette technique consistent : à extraire l'ADN ou l'ARN total de l'échantillon

environnemental, à amplifier spécifiquement les gènes codant pour l'ARN ribosomique, puis à cloner le produit d'amplification et enfin, à séquencer et à analyser les clones de la banque. Les ADNr 16S de la communauté sont amplifiés sélectivement *in vitro* à l'aide d'amorces universelles bactériennes ou archéennes et d'une ADN polymérase thermostable. Ces ADNr 16S sont ensuite séparés par clonage en utilisant des méthodes standards (Giovannoni *et al.*, 1990). Du fait de leur petite taille (environ 1500 pb), les ADNr 16S amplifiés sont généralement clonés dans des plasmides. Différents kits très efficaces et d'emploi facile sont commercialisés (TOPO TA cloning Kit (Invitrogen)). Les inserts de bonne taille pourront ensuite être séquencés, soit directement après extraction du plasmide, soit après réamplification de l'insert à partir d'amorces du plasmide flanquant les sites de clonage.

4.2.4. Techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreinte moléculaire sont des méthodes couramment utilisées en écologie microbienne, visant la caractérisation de communautés microbiennes. Ces méthodes impliquent l'amplification d'un gène ou marqueur moléculaire cible, qui doit être ubiquitaire à la communauté à étudier, mais qui doit porter une variabilité taxonomique permettant la différenciation des espèces. Les amplifiants sont ensuite traités de façon à pouvoir être distingués, illustrant ainsi la diversité sous forme d'un profil.

La comparaison de ces profils permet d'évaluer des changements structurels et de diversité d'une communauté donnée. Les différentes techniques développées se différencient par les principes de séparation de l'ADN, qui basés peut être soit sur la taille des fragments amplifiés, soit sur leur constitution ou conformation secondaire ; on peut citer par exemple: DGGE/TGGE (Denaturing or Temperature Gradient Gel Electrophoresis), la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), la SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), l'ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) et la l'ARISA (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis).

4.2.4.1. DGGE et ses variantes

La DGGE est une méthode très utilisée en écologie microbienne mais elle est initialement développée dans le domaine médical pour détecter des mutations impliquées dans des maladies génétiques. Cette technique a été utilisée pour distinguer les différentes populations de micro-organismes dans des échantillons naturels après amplification de leur ADNr 16S (Muyzer *et al.*,

1993; Muyzer, 1999). Elle permet de discriminer par électrophorèse des fragments d'ADN de taille identique ou quasi-identique mais de composition différente.

Le principe de la séparation est basé sur les changements de mobilité électrophorétique des fragments amplifiés migrant dans un gel vertical de polyacrylamide et contenant un gradient de dénaturants (formamide et/ou urée). Lorsque les fragments d'ADN migrent au sein de ce gel d'électrophorèse, une fusion partielle du double brin d'ADN se produit dans des régions discrètes de celui-ci, retardant sa migration.

Cette méthode présente des avantages qui lui permettent de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de base (Muyzer 1999). Cette technique présente l'inconvénient d'être longue et laborieuse à mettre en œuvre et ne permet pas de résoudre les séquences très riches en GC (Wu *et al.* 1999).

Des variantes de la DGGE, différentes par leur type de gradient, existent également :

- La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Dans cette technique, la séparation des fragments d'ADN se fait grâce à un gradient de température (Muyzer, 1999).
- La CDGE (Constant Denaturant Gel Electrophoresis). Dans cette technique, la concentration de l'agent dénaturant est uniforme dans le gel et est équivalente à la température de la plus basse zone de fusion.
- La TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis). En TTGE, la migration des fragments d'ADN se fait dans un gel possédant une concentration uniforme d'agent dénaturant et la température augmente graduellement durant la migration (Farnleitner *et al.*, 2000; Ogier *et al.*, 2002).

Ces techniques ont été appliquées à l'étude des bactéries de plusieurs plantes (Renouf *et al.*, 2007 ; Nisiotou *et al.*, 2011 ; Guilherme *et al.*, 2012 ; Sàber *et al.*, 2014), des levures (Hernán-Gómez *et al.*, 2000; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Nisiotou *et al.*, 2007; Renouf *et al.* , 2007), et de la communauté fongique (Doare'-Lebrun *et al.*, 2006; Laforgue *et al.*, 2009).

4.2.4.2. Polymorphisme de conformation des simples brins [Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)] :

De la même façon, la SSCP a d'abord été développée pour détecter des mutations des gènes humains (Orita et Iwahana, 1989; Hayashi, 1991), puis appliquée aux études en écologie

microbienne (Lee *et al.*, 1996; Schwieger et Tebbe, 1998). Les travaux réalisés révèlent que cet outil est bien adapté pour l'étude de communautés microbiennes.

Son principe est basé sur le comportement électrophorétique de molécules d'ADN simple brin en conditions non dénaturantes. Les amplifiants peuvent être analysés sur un gel de polyacrylamide ou par capillarité à l'aide d'un séquenceur automatique (CE-SSCP). Dans ce dernier cas, l'amplification d'ADN implique l'utilisation d'un fluorochrome sur l'une ou les deux amorces utilisées. Cette technique permet la séparation de mélanges complexes au sein d'une population et ainsi de distinguer des amplifiants de taille similaire mais ayant des séquences nucléotidiques différentes.

La SSCP a été utilisée à plusieurs reprises pour des études de communautés microbiennes, notamment la communauté bactérienne (Grube *et al.*, 2011) et la communauté fongique (Dellinger *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2011).

Cette technique s'est révélée très sensible, permettant la détection d'espèces représentant moins de 1,5 % de l'ADN total extrait (Lee *et al.*, 1996). Le principal désavantage de la SSCP réside dans la possibilité de ré-appariement des brins séparés (Lee *et al.*, 1996; Selvakumar *et al.*, 1997) avec pour conséquence la présence de plusieurs bandes provenant d'une seule espèce (Schwieger et Tebbe, 1998).

4.2.4.3. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP)

Cette technique, utilisée pour analyser la diversité microbienne de différents environnements (Liu *et al.*, 1997; Moeseneder *et al.*, 1999 ; Guilherme *et al.*, 2013). La T-RFLP exploite le polymorphisme de taille de fragments amplifiés obtenus après restriction enzymatique des brins d'ADN.

Elle consiste à amplifier de l'ADN en utilisant l'une ou les deux amorces marquées en 5' par un fluorochrome, suivie d'une digestion des produits de PCR par des endonucléases de restriction. De cette digestion résulte plusieurs fragments de différentes longueurs selon la séquence de l'ADN et le type d'enzyme utilisée. Ces fragments sont ensuite analysés par un séquenceur capillaire où seulement les fragments de restriction terminaux (T-RF) seront détectés et représentés sous forme de pics appelés d'OTU (Operational taxonomic Unit).

La puissance de cette analyse dépend de la performance de la digestion enzymatique (Spiegelman *et al.*, 2005). Le choix de sites de restriction en régions conservées génère parfois

des profils similaires difficiles à distinguer ; il est alors conseillé la combinaison de plusieurs enzymes (Dunba *et al.*, 2001). Néanmoins, en optimisant les conditions d'analyse, la T-RFLP est une technique très sensible, qui permet la détection des espèces représentant 0,5 % de l'ADN total (Liu *et al.* 1997).

La caractérisation de communautés microbiennes par des méthodes d'empreintes moléculaires peut être biaisée par des différents facteurs. Une des limitations de ces approches concernent les seuils de détection. Seules les populations dominantes peuvent être détectées : une espèce qui génère des bandes ou un signal de fluorescence faible ne sera pas distinguée du bruit de fond et donc pas pris en compte pour estimer la diversité (Bent et Forney, 2008). L'existence de fragments provenant d'espèces différentes mais qui présentent le même comportement électrophorétique, fait qu'une bande ou un pic peut appartenir à plusieurs microorganismes (Gelsomino *et al.*, 1999). Le contraire est également possible, plusieurs bandes peuvent appartenir à un même organisme du fait de l'hétérogénéité du code génétique. Les données apportées par les techniques d'empreintes moléculaires permettent d'accéder à la diversité d'une communauté microbienne ; néanmoins cette information est difficilement reliée à la structure fonctionnelle.

Malgré les biais et les limitations inhérents aux techniques d'empreintes moléculaires, elles restent toujours des outils à forts potentiels pour l'étude de la diversité microbienne (Yannarell et Triplett, 2005). La richesse d'informations générée par ces techniques permet de corréliser la structure d'une communauté à différents facteurs abiotiques et biotiques (Dorigo et Volatier, 2005; Loisel *et al.*, 2006). Pour mieux bénéficier de ces techniques, il est nécessaire d'optimiser les étapes qui précèdent l'électrophorèse afin de réduire ces biais, de prendre en compte les limitations inhérentes à ces approches et de choisir la technique la plus en adéquation avec les objectifs de l'étude.

4.2.5. Approche de type «métagénomique»

Le terme métagénomique, utilisé la première fois par Handelsman *et al.* (1998), se rapporte à l'étude des génomes de l'ensemble des organismes présents dans une niche environnementale donnée. Le principe de cette approche repose sur l'isolement et le séquençage directe de l'intégralité des acides nucléiques présents dans un échantillon prélevé dans un environnement donné, et ceci sans aucun isolement ou culture de bactéries au préalable (Handelsman *et al.*, 1998).

Les méthodes métagénomiques ont été appliquées à de nombreux écosystèmes et ont permis de mettre en évidence une grande variété de nouveaux génotypes (Venter *et al.*, 2004 ; Gill *et al.*, 2006; Delong *et al.*, 2006) mais également d'apporter des informations concernant l'abondance, la distribution des espèces et la structure fonctionnelle des communautés (Kurokawa *et al.*, 2007). Ces dernières années, les nouvelles techniques de séquençage ont contribué de façon décisive au développement des approches de métagénomique.

Les méthodes de séquençage de nouvelle génération, appliquées soit aux gènes préalablement amplifiés soit à l'ADN environnemental directement extrait, permettent la description de la diversité microbienne à un haut niveau de résolution, et une grande rapidité d'analyse.

Le pyroséquençage haut débit développé par la société "454 Life Sciences" (Connecticut USA) utilisant les séquenceurs GS FLX (Roche) (Margulies *et al.*, 2005), a été appliqué pour l'étude de communautés microbiennes par des approches de métagénomique (Liu *et al.*, 2007; Frias-lopez *et al.*, 2008; Schütte *et al.*, 2008). Cette technique permet d'avoir accès à de milliers de séquences simultanément, évitant le biais du clonage, une fois que la quantité d'ADN requise est très faible (Harkins et Jarvie, 2007).

Le "lumina sequencing" ou "Solexa sequencing" est aussi une technique de séquençage nouvelle génération, souvent utilisée dans des études d'écologie microbienne (Qin *et al.*, 2010). Elle permet un débit de séquence encore plus important que le pyroséquençage (GS FLX titanium). Néanmoins, ces deux techniques présentent l'inconvénient de générer des fragments très courts, ce qui requiert des techniques de co-assemblage de séquences, à partir d'alignements avec des données de référence et utilisant des algorithmes d'insertion/délétion (Hugenholtz, 2002). Ces procédures peuvent conduire à des erreurs de reconstruction phylogénétique qui affectent ainsi l'interprétation des résultats (Fox *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 2007).

4.2.6. Identification et taxonomie

L'identification d'un microorganisme consiste à déterminer à quel groupe taxonomique il appartient. Cette notion présuppose donc une classification existante. Le processus d'identification est basé sur la comparaison des propriétés phylogéniques ou biochimiques de l'espèce isolée par rapport à plusieurs souches considérées comme représentatives.

Jusqu'au début des années 1960, la taxonomie microbienne s'appuyait sur des méthodes biochimiques et phénotypiques (taxonomie phénotypique et numérique), basées sur le

comportement métabolique d'un isolat vis à vis de certains substrats et sur un nombre restreint de caractères tels que la morphologie ou la taille. Cette classification s'est révélée inefficace, fournissant peu d'information pour l'identification de beaucoup d'organismes. Suite à l'avènement des méthodes moléculaires, Fox et al. (1977) propose les acides nucléiques comme marqueurs de l'évolution et d'identification des organismes. Cette nouvelle approche, basée sur le principe que chaque microorganisme possède un génome qui lui est spécifique, a pallié les limitations inhérentes aux méthodes classiques, et modifié profondément la classification des microorganismes.

L'identification moléculaire s'effectue par l'analyse comparative de séquences d'un gène ou de régions orthologues aux organismes étudiées. Carl Woese en 1987, suggère la possibilité d'utiliser de gène de l'ADNr 16S comme marqueur de phylogénie (Woese, 1987). La même année, Wayne définit l'espèce procaryote et considère que deux souches appartiennent à une même espèce si les valeurs d'hybridation ADN-ADN sont supérieures ou égales à 70 % et une valeur de $T_m(e)$ inférieure ou égale à 5 °C (Wayne *et al.*, 1987). Compte tenu de la généralisation de l'usage de l'ADNr 16S pour l'identification des espèces et les progrès concernant la connaissance de la systématique bactérienne, l'International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) en 2002, a revue la définition d'espèce, considérant que des souches présentant plus de 97% d'homologie de l'ADNr 16S appartient à la même espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002).

4.2.7. Analyse phylogénétique

La phylogénie permet d'étudier l'évolution d'objets biologiques au cours du temps et d'observer des liens de parenté entre eux, prenant comme principe fondamental que la ressemblance de deux individus est due à l'existence d'une ascendance commune. Cette analyse se fait à partir de l'étude de caractères spécifiques comparables pour plusieurs individus. La phylogénie moléculaire a pour objet l'analyse de la similarité entre séquences biologiques (ADN et protéines). Les résultats de cette analyse sont représentés sous forme graphique : arbre phylogénétique. Cette représentation graphique de la phylogenèse facilite ainsi l'interprétation des degrés de parenté entre les groupes étudiés. Plusieurs méthodes basées sur deux approches différentes permettent l'élaboration de ces arbres phylogénétiques.

Les méthodes phénétiques (ou de distances) utilise le calcul préalable de la distance entre deux taxons. Cette distance est inscrite dans une matrice qui servira de base à la construction des

arbres. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) et Neighbor- Joining sont deux exemples de méthodes couramment utilisées.

La méthode UPGMA génère une matrice de distance avec l'ensemble des séquences étudiées. Elle contraint les distances à être ultra-métrique, et donc qu'elles évoluent à une vitesse constante; sachant que cette hypothèse est rarement confirmée, cette méthode devient inappropriée dans l'étude des phylogénies.

Le Neighbor Joining est la méthode de distances préconisée actuellement. Elle corrige la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches prenant en compte la divergence moyenne de chaque séquence avec toutes les autres. Le simple comptage des différences entre deux séquences peut sous-estimer le nombre d'évènements mutationnels. Afin de corriger ce biais, des hypothèses ont été proposées pour expliquer la façon dont les bases ou acides aminés se sont substitués à un locus donné. Pour répondre à ce problème, Kimura (1980) a proposé un modèle de correction. L'objectif est de tenter de restituer au mieux la distance réelle, en prenant en compte les homéoplasies possibles dans les séquences et en supposant une fréquence plus importante pour les transitions que les transversions, ce qui permet d'estimer les distances évolutives en termes de nombre de substitutions de nucléotides.

4.3. Complémentarité d'information fournie par les méthodes culturelles et moléculaires

Les outils moléculaires basés sur des méthodes de culture indépendante présentent l'avantage d'accéder à un grand nombre d'espèces présentes dans une communauté, y compris les microorganismes non cultivables. Néanmoins, cette globalité d'accession représente ainsi l'ADN total des microorganismes qui sont sous différentes formes, ceux qui sont dormants ou ne contribuent pas au système fonctionnel d'un écosystème et ne prend donc pas en considération l'activité cellulaire. Les méthodes culture dépendante malgré tous les biais qui leur sont associés, restent toujours importantes pour les études en écologie. Elles permettent l'isolement d'espèces pour la mise en collection, leurs analyses postérieures et fournissent des informations sur le potentiel fonctionnel d'un écosystème (Ellis *et al.*, 2003) L'application de ces deux méthodes doit donc se faire en synergie, de sorte que la complémentarité des informations générées puisse contribuer à une meilleure compréhension des écosystèmes microbiens (Nichols, 2007).

1. Zone d'étude

Pour étudier la dynamique de la population bactérienne du palmier dattier au cours des différentes saisons et évaluer l'impact des facteurs abiotiques tel que le climat sur cette population ; un champ de la région d'Elmukhref, daïra du Tolga a été choisi (figure 5). La Daïra du Tolga est située à 390 kms au Sud-est de la capitale et à 36 Km au nord-ouest de la wilaya de Biskra, à 128 mètres au dessus du niveau de la mer (latitude 34° 43' 15" N / longitude 5° 23' 2" E). Géographiquement, elle est limitée au nord par la wilaya de Batna, à l'est par la wilaya de Khenchela, l'ouest par la wilaya de M'Sila et Djelfa, et au sud par la wilaya d'El-Oued et Ouargla. Elle fait partie d'un étage climatique saharien (froid en hiver, chaud et sec en été), caractérisé par une température annuelle variante entre 21,9 et 23,07 °C et un faible taux de précipitation estimé par 3 à 128 mm (Dekkiche, 2017). Les sols de cette zone sont variés d'une région a une autre: limono-argileux, argilo-limoneux, calcaire limoneux.



Figure 5 : Site du prélèvement des échantillons à Tolga.

Sa localisation géographique fait d'elle une région agro-saharienne basée sur les vastes étendues des oasis et elle se présente comme l'une des plus importantes régions phoenicoles en

Algérie. Elle est connue mondialement pour la grande qualité de ses dattes, notamment par la variété noble Deglette Nour (Benzouche, 2010).

2. Échantillonnage

Pour tenir compte de la variabilité intra-parcellaire, le champ a été divisé en trois rangées, et de chaque d'elles, on a prélevé de cinq arbres afin d'assurer une représentativité et homogénéité parcellaire. Pour chaque arbre, des trois parties (Feuille (Fe), fruit (Fr), et tronc (T)) ont été prélevées stérilement. Pour prévenir la contamination croisée, les outils d'échantillonnage ont été stérilisés avec de l'éthanol avant chaque prélèvement. Puis, les échantillons sont placés dans des sacs en plastique stérile, conservés dans une glacière et traités ultérieurement dans le laboratoire. Pour montrer l'effet du climat sur le comportement de la flore bactérienne du palmier, une récolte sur les quatre saisons a été effectuée. Lors de l'échantillonnage, environ 100 g de chaque partie d'arbre sont prélevés de 15 arbres sélectionnés de façon aléatoire en évitant de prélever que des échantillons sains et propres.



Figure 6: Schéma de la démarche aléatoire pratiquée lors de l'échantillonnage. a : tronc, b : feuilles et c : fruits

3. Récupération des suspensions cellulaires

Pour faire décrocher les microorganismes présents à la surface des feuilles, fruits et des troncs, 10 g de chaque échantillon sont mis dans 90 ml de bouillon nutritif, puis suivi par une agitation pendant une demi-heure à température ambiante. Les suspensions cellulaires obtenues ont été divisées en deux parties ; une partie a servi pour faire des dilutions afin de procéder au dénombrement et une partie pour l'incuber pendant 24 heures à 28°C. Cela servira pour la culture et l'isolement des bactéries.

4. Déterminations des taux de bactéries

Pour faire le comptage cellulaire, un volume de 0,1 ml de l'échantillon non dilué ainsi que des séries diluées sont étalés en surface du milieu Plate Count Agar (PCA). Après une période d'incubation de 72 heures, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont retenues pour le dénombrement. Les résultats sont exprimés en Unités Formant Colonie par gramme de matière végétale (UFC/g). La valeur obtenue correspond à une moyenne de trois comptages.

5. Isolement et purification des bactéries

La culture de la population bactérienne cultivable a été procédée à partir de la suspension cellulaire incubé préalablement pendant 24 heures dans le bouillon nutritif et en utilisant la gélose nutritive (GN) additionné d'un antifongique avec une concentration de 30 µg/ml, ciblant ainsi la flore bactérienne totale. À partir de ces suspensions, une ose a été prélevée et ensemencée sur boîte du Pétri par la technique de quatre cadrant. Les boîtes ont été ensuite incubées à 28°C pendant une période de 2 à 3 jours. Chaque colonie caractéristique obtenue a été prélevée séparément pour l'inoculer dans le bouillon nutritif et l'incuber pendant 24 heures à 28°C, puis ensemencer la GN en boîtes de Pétri; cette étape est pour vérifier la pureté des colonies sélectionnées. Dans le cas où les colonies semblent être contaminer, la réalisation d'un repiquage successif sera indispensable jusqu'à l'obtention des colonies pures.

6. Conservation des isolats

Les isolats purifiés ont été ensuite inoculés dans le bouillon nutritif et incubées pendant 24 h. Puis, un ose a été prélevé pour ensemencer la GN inclinée pour la conservation à 4 °C. Pour la conservation a long terme, 0.5 ml de glycérol a été ajouté en tant qu'agent cryoprotecteur aux 0.5 ml de la suspension bactérienne, puis homogénéisé et mis en conservation à -20 °C.

Une vérification après une période de conservation est nécessaire pour assurer la viabilité des bactéries.

7. Identification phénotypique des isolats

La caractérisation phénotypique des souches isolées a été poursuivie grâce à des tests biochimiques, physiologiques, et morphologiques comparés par la suite, aux caractéristiques connues du « Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology ». Les critères morphologiques regroupent les caractéristiques de la cellule bactérienne et les caractéristiques de la colonie. Les critères biochimiques évaluent la présence et/ou l'activité des différentes enzymes tels que l'oxydase, la nitrate réductase, l'uréase, ainsi que d'autres enzymes impliquées dans les voies métaboliques d'assimilation des substrats carbonés. Les critères physiologiques comme la croissance à différentes températures, la tolérance aux variations du pH et aux différentes concentrations en sels.

Avant de procéder à l'identification, les colonies obtenues ont été examinées morphologiquement (macroscopiquement : aspects des colonies) et microscopiquement (coloration du Gram et mobilité) pour en choisir des isolats représentatifs des formes distinctes.

7.1. Tests biochimiques et d'activité métabolique

7.1.1. Production de l'oxydase

A partir de cultures jeunes sur milieu solide, on prend une aliquote de colonie et on l'étale sur le disque d'oxydase. La lecture pendant les premiers 30 seconds. La présence du cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.

7.1.2. Production de la catalase

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 10 volumes. La présence de la catalase se traduit, en quelques secondes, par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

7.1.3. Hydrolyse de l'urée

Le test de l'hydrolyse de l'urée est réalisé sur le milieu GN additionnée urée à 2% et un indicateur du pH (Rouge de phénol) (annexe 1). Après incubation, le virage de la couleur indique que le test est positif.

7.1.4. Recherche de la cellulase

L'activité cellulolytique des isolats bactériens a été déterminée sur la GN additionnée le carboxyméthyle cellulose (CMC) à 0.25%. Après 5 jours d'incubation, les boîtes ont été rancées avec l'eau puis colorées avec un 0,1% de solution de Rouge Congo et incubées 30 minutes dans l'étuve. Les boîtes ont été ensuite décolorées avec une solution de chlorure de sodium à 1 M pendant 30 minutes à température ambiante. Le Rouge Congo se lie fortement aux chaînes de cellulose intactes mais peut être éliminé par lavage à partir des zones dans lesquelles les chaînes de cellulose ont été dégradées. Pour cela, les zones claires autour des zones de croissance bactérienne indiquent donc une activité cellulolytique (Joynson *et al.*, 2014).

7.1.5. Utilisation du citrate

Ce test est réalisé par ensemencement du milieu citrate de Simmons en tubes de gélose inclinée qui est de couleur verte due à la présence de l'indicateur coloré: le bleu de bromotymol. Après 5 jours d'incubation, une croissance avec l'apparition d'une couleur bleue indique l'utilisation du citrate avec production de bases (Wauters *et al.*, 2005).

7.1.6. Réduction des nitrates

Les isolats sont inoculés dans le bouillon nitraté. Après 4 jours d'incubation avec agitation à 28°C, 3 à 4 gouttes des réactifs du nitrate réductase (NR 1 et NR 2) sont ajoutés (Guiraud, 1998). La présence des nitrites est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge. S'il y a absence de nitrite, 4 à 5 mg de la poudre de zinc sont ajoutés aux tubes préalablement testés, le zinc réduit le nitrate s'il est présent et donne une couleur rouge, si le test est négatif (pas de couleur rouge), donc la bactérie a réduit le nitrate en nitrites.

7.1.7. Recherche d'Ornithine (ODC), de la lysine décarboxylase(LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH)

Des tubes contenant les milieux d'Ornithine, de la lysine, et de l'arginine inoculés ont été recouverts d'une couche de vaseline pour engendrer des conditions d'anaérobiose et incubés à 28°C pendant 5 jours. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration pourpre suite à l'alcalinisation du milieu (Hildebrand, 1988).

7.1.8. Production d'indole

La recherche d'indole est examinée sur le milieu eau peptonée exempte d'indole. Après l'inoculation du milieu et l'incubation, une couche du réactif de Kovacs a été ajoutée, puis agitée. L'apparition d'une couleur rouge indique la production d'indole.

7.1.9. Réaction de Voges-Proskauer (VP) et le Rouge de Méthyle (RM)

Les isolats sont inoculés sur le milieu Clark et Labs. Après incubation, le milieu est divisé en deux dans un autre tube stérile pour faire les deux tests. Dans l'un des tubes on a ajouté le rouge de méthyle pour le test RM, et dans l'autre on a ajouté les réactif VP I et VP II pour le test VP. Un virage de couleur vers le rouge indique le test positif.

7.1.10. Assimilation des substrats carbonés

La capacité des isolats à utiliser les substrats carbonés comme seul source de carbone est déterminée par le milieu de base proposé par Larpent (1970) modifié (annexe 1). Les substrats testés sont les suivants : xylose, arabinose, saccharose, fructose, galactose, ribose, lactose, maltose, glucose et le sorbitol. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 72 heures. Une croissance sur ce milieu indique l'utilisation du sucre comme seul source de carbone.

7.1.11. Assimilation des acides aminés

Le pouvoir des isolats à se développer sur un milieu ne contenant que les acides aminés comme seul source d'azote et carbone a été testé sur un milieu de base qui contient le KH_2PO_4 et le MgSO_4 (annexe 1). Les acides aminés testés sont : valine, tyrosine, leucine, proline, thréonine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, lysine, glycine, sérine, histidine, arginine, méthionine, alanine, asparagine, glutamate de sodium, et cystéine. Après ensemencement des souches sur les milieux, une incubation à 28°C pendant 24 heures a été effectuée. S'il n'y avait pas de croissance après 24 heures, on aurait prolongé l'incubation à 48 heures, et même à 72 heures.

7.2. Tests physiologiques

La croissance à différents pH, températures et différentes concentrations de NaCl a été examinée.

7.2.1. Tolérance au chlorure de sodium

La tolérance au chlorure de sodium est contrôlée sur le milieu bouillon nutritif préparé à partir de différentes concentrations allant de : 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 8% à 12%. Après 24

et 48 heures d'incubation à 28°C, la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm à l'aide de spectrophotomètre a été effectuée.

7.2.2. Effet de la Température

Les différentes souches testées sont cultivées sur gélose nutritive et incubées aux températures suivantes : 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C et 50°C. Les lectures sont effectuées après 24, 48, 72, heures d'incubation. Pour la température 4°C, la lecture peut aller jusqu'à 10 jours.

7.2.3. Effet du pH

Les souches sont cultivées sur le bouillon nutritif aux différents pH : 4, 5.5, 7, 8, 8.6, 9.5 et pH 11. Après incubation à 28°C pendant 24 et 48 heures, la mesure de la DO à 600nm.

8. Identification moléculaire des isolats

Les méthodes moléculaires d'étude en écologie microbienne suivent un schéma commun qui peut être divisé en trois étapes (figure 7). Chacune doit être la plus performante possible pour assurer le meilleur seuil de détection de la méthode prise dans sa globalité. Toutes ces méthodes débutent par une extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse.

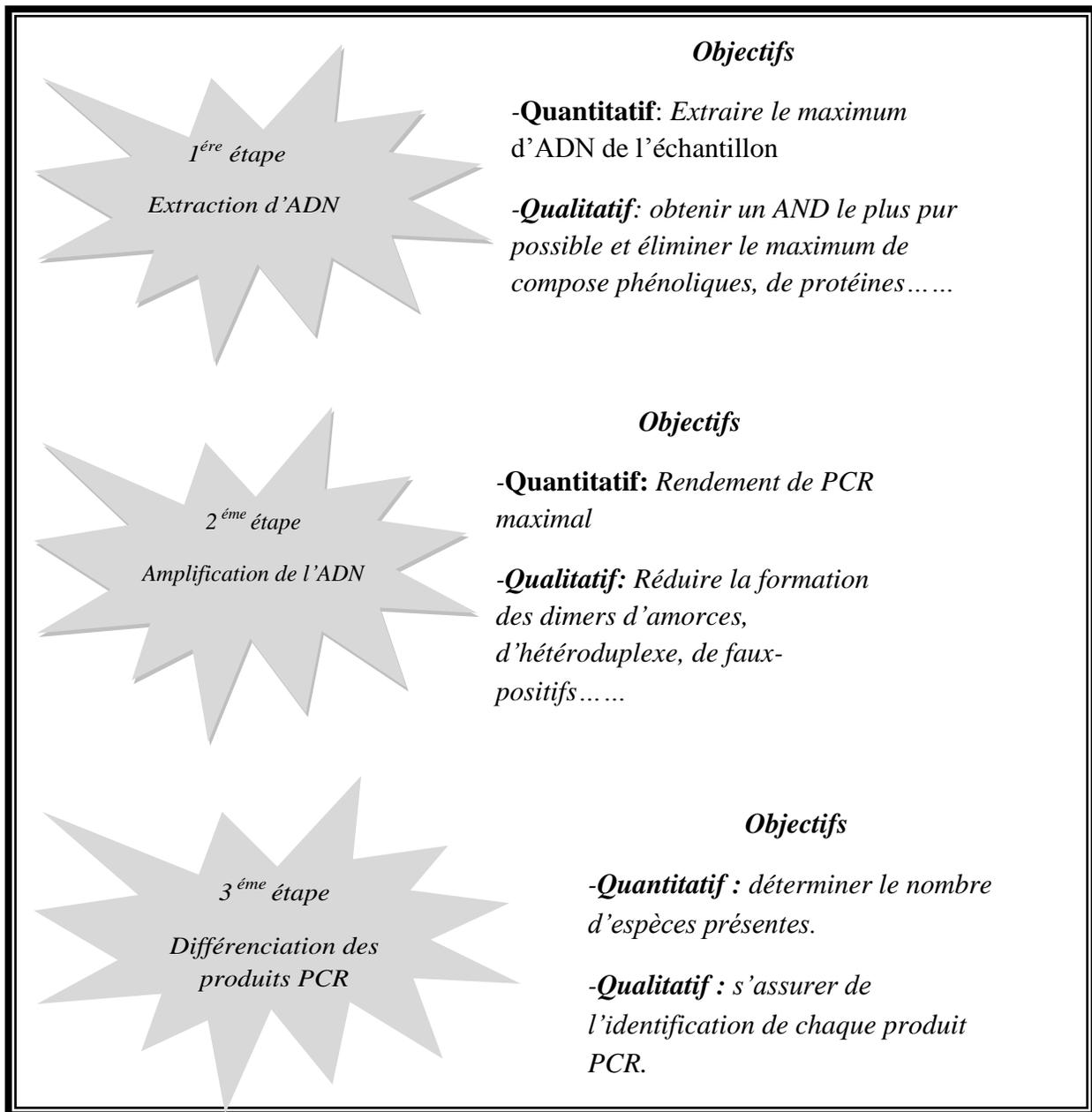


Figure 7: Les trois principales étapes d'étude par méthode moléculaire (Renouf, 2006).

8.1. Extraction de l'ADN génomique

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé (ADN chromosomique des bactéries), de l'origine des cellules (culture liquide,

colonie isolée sur milieu gélosé) et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution du mélange microbien).

8.1.1. Extraction directe sur colonie

Lorsqu'on travaille sur des colonies isolées sur boîtes, il est possible de réaliser directement les PCR à partir de la biomasse présente à la surface de la gélose. Lorsqu'elle est relativement fraîche (maximum quinze jours), une toute petite quantité de biomasse est collectée avec la pointe d'un embout de micropipette préalablement autoclavé, puis directement mise en suspension dans le mélange réactionnel utilisé pour la PCR. Un cycle initial à 95°C pendant 10 minutes est rajouté pour fragiliser les cellules et faciliter l'accès des réactifs à l'ADN.

8.1.2. Extraction de l'ADN génomique par la méthode phénol chloroforme-alcool isoamylique

Après utilisation de l'extraction d'ADN sur colonie, elle n'était pas efficace avec certaines souches ce qui nécessite l'utilisation d'un autre protocole d'extraction d'ADN. L'extraction d'ADN génomique a été menée selon le protocole d'Ausubel et al. (1987) utilisant le phénol chloroforme, que nous avons adapté à nos conditions de travail.

A partir des cultures en phase exponentielle de croissance (18 h) dans le milieu Luria-Bertani-Broth (LBB), une quantité de 2 à 3 ml de la suspension de chaque souche est déposée dans un tube Eppendorf stérile puis soumise à une centrifugation pendant 10 minutes à 7500 rpm (5000g). Les culots obtenus dans chaque tube ont été rétablis en suspension dans 300 µl de tampon de lyse. Les mélanges sont soumis à plusieurs cycles de congélation dans la glace puis à la décongélation à 37 °C pendant 5 minutes. Cette étape est répétée trois à quatre fois. Puis, 4µl de protéinase K ont été additionnés pour chaque tube et soumise à une agitation vigoureuse afin d'assurer la distribution de l'enzyme. Les Eppendorfs sont incubés à 37°C pendant 30 minutes. Aux lysats obtenus sont ajoutés 300 à 500 µl du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis les mélanges sont mixés par le vortex pendant 10 secondes et centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm à température ambiante. La phase supérieure (aqueuse) contenant de l'ADN a été soigneusement prélevée en utilisant une micropipette et transférée dans un nouveau tube de 2 ml marqué précédemment. La précipitation des acides nucléiques est effectuée par l'ajout de 50 µl d'acétate de sodium 3M ainsi que de 500 µl à 1 ml d'éthanol absolu froid (100%) au volume du surnageant obtenu, puis placés dans la glace sèche pendant 15 minutes. Les mélanges ont été

ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 10000 rpm et les surnageants ont été retirés avec précaution en laissant l'ADN sur la paroi du tube. Le culot obtenu est lavé par l'ajout d'éthanol froid 70% (une aliquote de 500 μ l à 1 ml) puis centrifugé pendant 10 minutes à 10000 rpm. Le culot lavé est séché à la température ambiante puis resuspendu dans 50-100 μ l de tampon d'éluion AE. Les différents Eppendorfs contenant d'ADN ont été ensuite stockés dans la glace pour quantifier et qualifier l'ADN extrait puis à -20°C pour l'usage ultérieur.

La quantité et la pureté de l'ADN extraites de chaque isolat ont été ensuite évaluées en utilisant un spectrophotomètre de type Nano Drop (Thermo Fisher, GB) (Figure 8). La quantité de l'ADN est estimée par l'absorbance à 260 nm (les acides nucléiques montrent un maximum d'absorption autour de 260nm) et la pureté est évaluée par le rapport d'absorbance 260 et l'absorbance à 280. Le rapport d'Absorbance 260/ 280 doit être compris entre : 1,7 et 1,9 pour un ADN pur. Si ce rapport est inférieur à 1,7 cela signifie que notre ADN est contaminé par le phénol, par contre s'il est supérieur à 1,9 cela suppose qu'il est contaminé par des protéines, et qu'il faudra le purifier avant de poursuivre les tests. Le calibrage de l'appareil est obtenu avec de l'eau extra pure ou du tampon dans lequel l'ADN est dissout (AE).

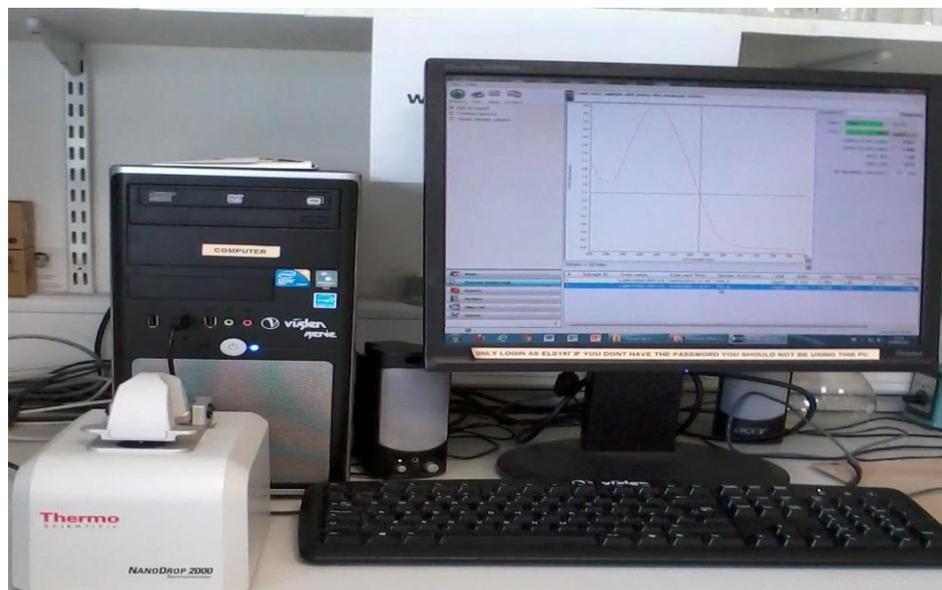


Figure 8: Mesure de la concentration et la pureté d'ADN via le NanoDrop.

8.2. Amplification par PCR du gène d'ARNr 16S

L'amplification de l'ADNr 16S a été faite en utilisant l'ensemble des amorces bactériennes universelles : direct FD1 5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3' et reverse rP2 5' -AGG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3'(Weisberg *et al.*, 1991). Pour la PCR de colonie, le mélange réactionnel de PCR et les volumes requis pour amplifier l'ADN sont consignés dans le tableau 2.

Tableau 2: Composants et volume du mélange réactionnel de PCR sur colonie.

Composants	Volumes
MyTaq mix	25 µL
L'amorce directe FD1	1 µL(0.2 µM)
L'amorce reverse rP2	1 µL (0.2 µM)
L'ADN matrice	Aliquote de colonie
Eau ultra-pure	23 µL
Le volume total du mélange	50 µL

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans le thermocycleur de type Bio-Rad. Le thermocycleur est programmé selon les conditions de PCR montré dans le tableau 3.

Tableau 3 : Conditions de la PCR.

Étapes	Température	Temps (MyTaq®)	Cycles
Pré- Dénaturation	94°C	10 minute	1
Dénaturation	94°C	30 seconds	30
Hybridation	53°C	30 seconds	
Elongation	72°C	1 minute	
Extension	72°C	2 minute	1

Après thermocyclage, les produits de la PCR ont été immédiatement stockés sur la glace pour faire l'électrophorèse, et puis -20 °C pour une utilisation ultérieure.

D'autre part, l'ADN génomique extraite par le phénol chloroforme a été utilisé comme matrice pour faire une amplification spécifique ciblant l'ADN ribosomique 16S (ADNr). Pour amplifier l'ADNr 16S, une procédure de PCR standard de My Taq a été utilisée. Les réactions de la PCR ont été établies en utilisant les réactifs et les volumes indiqués dans le tableau 4 et les conditions de PCR et les cycles indiqués dans le tableau 5.

Tableau 4 : Mélange réactionnel de PCR pour l'amplification du gène ARNr 16S.

Composants	Quantité
MyTaq mix	25 µL
Amorce FD1	1 µL(0.2 µM)
Amorce rp2	1 µL (0.2 µM)
L'ADN matrice	10ng (1µL)
Eau ultra-pure	Jusqu'à 50 µL (~22 µL)
Volume total	50 µL

Tableau 5: Conditions de la PCR.

Étapes	Température	Temps (MyTaq®)	Cycles
Pré-dénaturation	95°C	1 minute	1
Dénaturation	95°C	30 seconds	25
Hybridation	53°C	30 seconds	
Elongation	72°C	1 minute	
Extension	72°C	1 minute	1

8.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les résultats de l'amplification ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% créé avec 0,5X de Tris Borate EDTA (TBE). La préparation du gel et le déroulement de l'électrophorèse sont réalisées comme suit :

- Placer 1 g d'agarose (Bioline, GB) dans un récipient, Erlenmayer ou flacon du Duran suivi par 100 ml de TBE 0,5X.
- Puis, fermer le flacon par le couvercle d'une façon décontracté afin d'éviter l'éclatement du flacon et mis au micro-onde pour 30 secondes. La bouteille a été ensuite tournée et soumis au chauffage répété jusqu'à que l'agarose soit dissout, en prenant soin d'éviter le sur chauffage du liquide.
- Refroidir le mélange à environ 50°C, puis ajouter 4 µl de Gel Red, marqueur de taille d'ADN fluorescent (Biotium, USA), puis mélanger.
- Verser le mélange dans une plaque de gel ou' le peigne a été placé pour la formation des puits du gel.
- Laisser le gel à polymérisé pour 30-40 minutes. Retirer le peigne et ensuite placer le gel dans un réservoir de gel contenant la solution TBE 0,5X.
- Puis, charger 10 µl de chaque produit de PCR dans chaque puits.
- Charger dans l'un des puits, un marqueur de taille de type « HyperLadder I » (Bioline, GB) (Le marqueur de taille a été préparer d'un mélange contenant 3 µl de HyperLadder I, 3 µl le tampon de charge (Bioline, GB) et 4 µl d'eau distillé stérile (volume total 10 µl)).
- Puis, Courir les échantillons à 100 volte jusqu'à ce que les marqueurs de couleur (rouge pour les échantillons MyTaq et bleu pour le HyperLadder) étaient à 3 cm de l'extrémité du gel (~ 75 minutes).
- Observer le gel dans un 'G: Box ' « Chemi transilluminator » (Syngene, UK) pour vérifier le succès de l'amplification et l'obtention de fragments de gènes amplifiés de bonnes tailles par rapport au marqueur de taille d'ADN.

8.4. Clonage moléculaire et transformation de fragments de gène ADNr 16S amplifiés

Une fois l'ADNr 16S amplifiée avec succès, les produits de la PCR ont été purifiés puis clonés dans le vecteur pCR®2.1 en utilisant la méthode de clonage TA énoncée dans le Kit de Clonage ® TA (Life Technologies, GB). Cette méthode est utilisée le clonage TA comme un moyen d'insertion du produit de la PCR amplifié dans le vecteur et l'utilisation des antibiotiques pour la détection des cellules contenant le vecteur et le dépistage par les colonies blanc/bleu pour détecter si une insertion est présente. Après préparation des mélanges réactionnels du clonage (Tableau 6), les mélanges sont mis à incubation à 14°C pendant une nuit.

Tableau 6: Composants et volumes requis pour la réaction du clonage.

Composant	Volume
Produit de PCR (~19.2 ng)	x µL
Tampon de ligation ADN 5X T4	2 µL
Vecteur pCR®2.1 (25 ng/µL)	2 µL
Eau (jusqu'à 9 µL)	x µL
ADN Ligase T4 (5 units)	1 µL
Total volume	10 µL

Après la période d'incubation, les réactions de clonage ont été maintenues sur la glace jusqu'à son utilisation. Ces vecteurs ont été transformés dans des cellules compétentes d'*Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies, GB). Avant de procéder à la transformation, tout d'abord, des boîtes contenant la gélose Luria-Bertani (LB) contenant 100 µg / ml d'ampicilline ont été préparés. Les boîtes ont été stockées à 4 °C jusqu'à l'utilisation. Lors de l'utilisation, ces boîtes doivent être équilibrées pendant 30 minutes à 37 °C, puis 40 µL de X-gal (Bioline, GB), dissout dans le diméthylformamide (DMF) (40 mg /ml) (Sigma-Aldrich, GB) ont été étalé sur chaque boîte et laissé tremper dans la gélose. Pour chaque transformation, un tube de 50 µl de cellules compétentes « TOP10 » a été utilisé. 2 µL de chaque mélange réactionnel ont été ensuite introduits dans un tube de cellules d'*Escherichia coli* et mélangé doucement avec l'embout de la micropipette et incubé sur de la glace pendant 30 minutes. Les cellules sont soumises à un choc thermique à 42 °C en immergeant les tubes dans un bain marie pendant 30 secondes, en prenant soin de ne pas agiter les tubes à ce point. Les tubes ont été ensuite placés sur la glace et 250 µL de bouillon SOC (super optimal broth with catabolite repression) (Life Technologies, GB) ont

été ajouté à chaque tube. Puis, les tubes ont été agité horizontalement dans un incubateur à agitation 225 rpm à 37 °C pendant 1 heure. Après l'incubation, le contenu de chaque tube a été étalé sur les deux boites LB préchauffés à 37°C, 50 µl sur une boite et 200 µl sur une deuxième boite pour assurer au moins une boite avec des colonies individuelles pour leur permettre d'être sélectionnées. Les boites ont été incubées pendant une nuit à 37 °C suivie d'une incubation à 4°C pendant 2 heures pour favoriser le développement maximal de la couleur négative des clones.

Une colonie blanche (figure 9) a été sélectionnée parmi l'ensemble des cellules transformées et cultivé dans 5 ml de bouillon LB contenant 100 µg / ml d'ampicilline pendant une nuit à 37 °C pour l'extraction des plasmides.

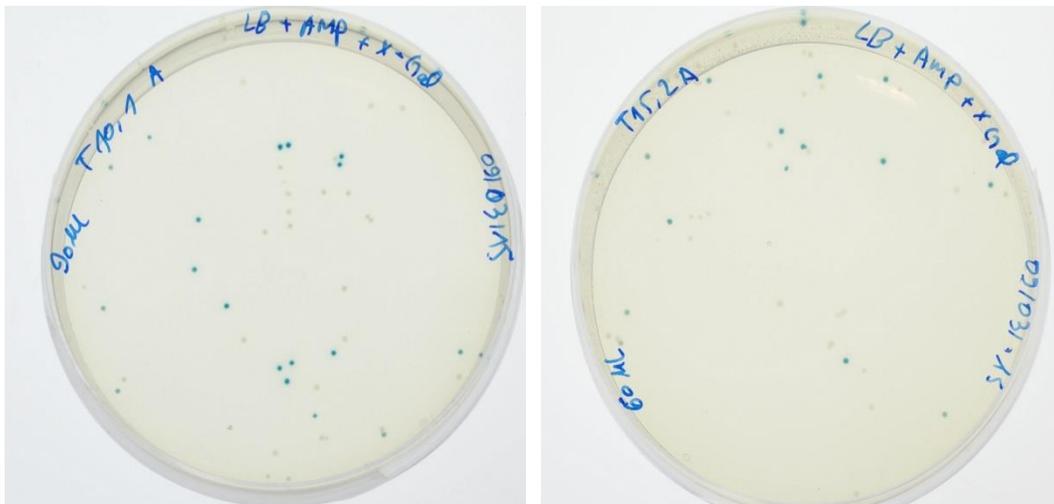


Figure 9: Boites de Pétri contenant les cellules transformées (les colonies blanches).

8.5. Extraction des plasmides clonés et séquençage du bigdye

Les plasmides ont été extraits de ces cultures comme suit. Initialement, 2 mL de chaque culture a été centrifugé à 13.000 g pendant 1 minute. Le Bouillon LB a été ensuite éliminé par pipetage en assurant d'aspirer le maximum de bouillon. Les plasmides ont été extraits à l'aide du kit d'extraction de plasmide miniprep PureYield™ (Promega, GB). Plasmides extraits ont été stockés sur la glace pour une utilisation immédiate ou à -20 °C pour le stockage à long terme. À titre de mesure de diagnostic, les plasmides ont été digérés avec EcoRI pendant 1 heure à 37 °C pour assurer la présence de l'insert de la taille correcte. Les réactions de digestion par restriction ont été créées comme décrit dans le tableau 7.

Tableau 7: Composants et volumes nécessaires pour la réaction de restriction PCR 2.1 par EcoRI.

Composants	Echantillon	Contrôle négatif
ADN Plasmidique (~500ng)	x μL	x μL
Tampon de réaction 10X EcoRI	2 μL	2 μL
L'eau ultra pure	x μL (Jusqu'à 19 μL)	x μL (Jusqu'à 20 μL)
EcoRI (20 U)	1 μL	0 μL
Le volume total	20 μL	20 μL

Après l'incubation, une électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée pour séparer les fragments d'ADN digéré. Un gel d'agarose à 1% a été réalisé comme décrit précédemment. 3 μl de tampon de charge ont été ajoutés à 10 μl de chaque produit de digestion par restriction et de contrôle et chaque échantillon a été ensuite mélangé par pipetage. Tous les 13 μl ont été ensuite déposés dans les puits de gel, en même temps un mélange de marqueur de taille Hyper Ladder I (3 μl), tampon de charge (3 μl), et l'eau (4 μl) a été chargé sur le gel. L'immigration des fragments d'ADN a été faite à 100V pendant 75 minutes. L'apparition d'une bande de taille 1500 pb indique la réussite de clonage et notre gène sont conservés dans les cellules transformées (Figure 11).

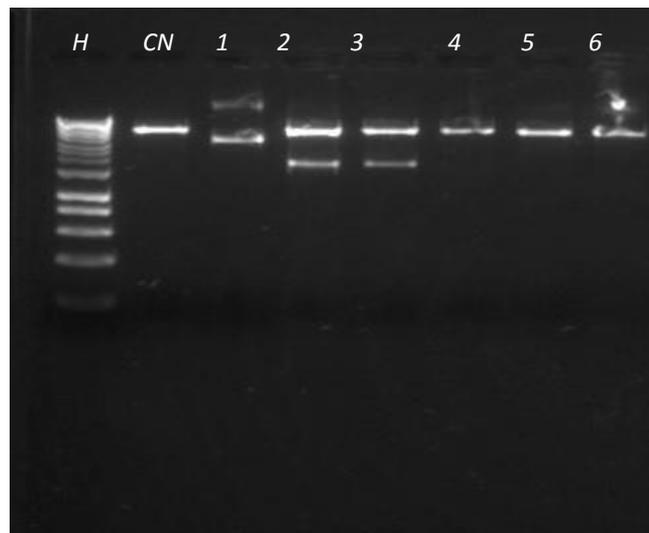


Figure 10: Electrophorèse de plasmide après digestion sur gel d'agarose à 1%. H : marqueur de taille ; 2, 3: les clones contenant l'insert ; 1, 4, 5, 6 : échec de clonage, CN : contrôle négatif.

Les vecteurs contenant l'insert de taille correcte (1500 bp) ont été soumis à des réactions de séquençage ciblant la séquence de l'insert (ADNr 16S). Les inserts ont été séquencés en utilisant le système Big Dye v3.1 (Applied Biosystems, USA). Les composants pour le mélange de réaction Big Dye peuvent représenter dans le tableau 8 et le programme de la PCR dans le tableau 9.

Tableau 8: Composants et volumes requis pour la réaction du séquençage de BigDye v3.1.

Les Composants	Volume
Amorce Weisburg (10 pM/μL)	1 μL
Tampon 5X BigDye 3.1	1 μL
ADN plasmidique (~400 ng)	x μL
L'eau sans nucléase	x μL (up to 19) μL)
BigDye v3.1	1 μL
Volume totale	20 μL

Tableau 9: Condition de la PCR de BigDye.

étapes	Température	Temps (BigDye v3.1)	Cycle
Pré-dénaturation	96°C	5 minutes	1
Dénaturation	96°C	10 seconds	35
Hybridation	53°C	5 seconds	
Elongation	60°C	4 minutes	

Après thermocyclage, l'ADN a été précipité à partir du mélange réactionnel en utilisant une précipitation à l'éthanol. Les mélanges réactionnels ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml puis ajouter les réactifs suivants: 2 μl d'acétate de sodium (3 M, pH 4,5), 50 μl d'éthanol 96% et 1 μl de Glycoblu (Ambion, USA). Les solutions ont été agitées brièvement au vortex et incubées à température ambiante pendant 10 minutes, suivie d'une centrifugation à 16 000 x g pendant 30 minutes pour sédimenter l'ADN précipité. Le surnageant a été ensuite aspiré en laissant derrière une petite pastille bleue. Pour laver le culot, 100 μl d'éthanol à 70% ont été ajoutés à chaque tube, mélangés par inversion et mis en incubation pendant 2 minutes à température ambiante. Les solutions ont été centrifugées à 16.000 x g pendant 10 minutes et le

surnageant est aspiré. Les tubes ont été ensuite laissés ouverts pendant environ 20 minutes pour permettre au culot d'ADN de sécher en laissant une pastille bleue au fond de chaque tube.

Les tubes ont été ensuite stockés à température ambiante pour les envoyer à séquencer (Manchester, GB) et lus à l'aide d'un analyseur génétique ABI 3730 (Applied Biosystems Inc, USA). Les séquences d'ADN obtenues ont été extraites à partir des chromatogrammes et utilisées comme une requête dans une recherche d'alignement.

8.6. Séquençage d'ADNr 16S en utilisant les tubes « smartseq »

Afin de réduire les coûts ainsi que la simplification de la technique du séquençage et le temps de la manipulation par rapport à la précédente, les produits de la PCR sont séquencés en utilisant les tubes « smartseq ». 15 µl du chaque produit de PCR pur ont été chargé dans les smart tubes avec 2 µl de l'une des deux amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S. Les réactions de séquençage dans les tubes « smartseq » sont ensuite envoyés à séquencer dans une société privée (Eurofins Genomique GmbH, Allemagne). Les séquences sont ensuite récupérées dans la boîte e-mail.

8.7. Comparaison des séquences de l'ADNr 16S

Les séquences de l'ADNr 16S des isolats sont comparées avec les séquences de l'ADNr 16S des bactéries disponibles sur la base de données « GenBank » par l'utilisation du programme de comparaison des séquences de nucléotides « BLAST », disponible sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, qui est un outil de recherche de régions de ressemblances. Les séquences ont été interrogées contre la base de données des "séquence d'ARNr 16S " en utilisant l'algorithme megablast afin de prédire la taxonomie des isolats bactériens du palmier dattier. Lorsque les séquences sont totalement identiques, l'identification de l'espèce est clairement établie. Lorsque ce n'est pas le cas, la séquence référencée qui présente le pourcentage de similitude le plus élevé avec la séquence étudiée est retenue pour une comparaison phylogénétique.

8.8. Analyse phylogénique

L'alignement multiple des séquences est réalisé par l'utilisation du programme Clustal W (Thompson et al., 1994). Les arbres phylogéniques sont construits par la méthode de Neighbour-Joining (Saitou et Nei, 1987). La topologie des arbres est évaluée par l'analyse des « bootstrap »

de Felsenstein (1985) avec 1000 répliques qui permet de connaître la solidité des branches d'un arbre phylogénétique. Toutes ces analyses phylogéniques sont réalisées par le programme MEGA version 5.2.2. (Tamura *et al.*, 2011).

9. Analyse statistique

L'analyse de variance (ou ANOVA) par le logiciel Graph-pad a été utilisée pour comparer les niveaux des populations cultivables (U.F.C.) issus de différents prélèvements. L'ANOVA à un facteur qui s'applique lorsque l'on souhaite prendre en compte un seul facteur de variabilité (saison de prélèvement, conditions climatique).

1. Flore bactérienne du palmier dattier, diversité et distribution temporelle des espèces bactériennes

1.1. Diversité bactérienne à la surface du palmier dattier

La compilation de la totalité des souches obtenues lors des analyses directes (après isolement) de l'ensemble des échantillons du palmier dattier permet d'obtenir une vision relativement exhaustive de la diversité bactérienne présente sur la surface du palmier dattier. Plus de 200 isolats de différentes parties (feuilles, fruits, troncs) du palmier dattier sur les quatre saisons de l'année 2012 sont isolées sur des milieux de cultures correspondant aux séries non diluées. Les colonies sont purifiées et conservées en suivant la procédure détaillée dans la partie matérielle et méthodes. Les isolats sont ensuite identifiés par des méthodes phénotypiques et moléculaires précédemment décrites.

Afin d'identifier les espèces présentes dans les différents prélèvements, les souches purifiées et conservées préalablement sur le milieu GN, ont été revérifiées puis analysées. Pour des raisons de logistique, il n'a pas été possible d'analyser la totalité des souches isolées au cours des différentes saisons. Pour cela, entre 15 à 20 isolats de chaque saison sont sélectionnées aléatoirement, tout en s'assurant que cet échantillonnage inclue les différents morphotypes existants. Ce choix a été effectué aussi sur la base d'un ensemble de critères tel que le type de Gram et quelques caractères biochimique et physiologiques. Ainsi 78 isolats bactériens repartis sur les quatre saisons ont été choisies. Ce choix a été effectué pour l'étude de la distribution temporelle, mais également pour analyser l'influence du climat sur l'évolution de la flore bactérienne.

Les souches bactériennes ont été finalement regroupées en 4 groupes selon les critères suivants : Groupe 1 : bacilles mobile, Gram positif, catalase positive et aérobie productrice de spore présumés des *Bacillus sp* ; Groupe 2 : bacilles Gram négatif et oxydase positive présumés des *Pseudomonas sp* ; Groupe 3 : bacilles Gram négatif et oxydase négatif, présumés des *Enterobactéries* ; Groupe 4 : Autres isolats.

1.1.1. Identification des bactéries par approche phénotypique

L'identification bactérienne est essentielle pour confirmer l'espèce et orienter sa classification. Dans cette partie on va exposer les résultats de l'isolement et l'identification phénotypique. Cela inclue l'isolement des bactéries de différente partie de la plante et caractérisation des isolats en utilisant une gamme de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques.

L'identification phénotypique des bactéries repose dans un premier temps sur des tests d'orientation simples comme l'aspect des colonies, le type cellulaire et le type de Gram, qui permet d'adapter dans un second temps le choix des tests biochimiques à réaliser.

Les caractéristiques morphologiques des isolats bactériens sont très variées selon des différents aspects : couleur, taille, opacité, forme et consistance des colonies. La figure 11 représente les différents morphotypes des souches isolées avec une couleur allant du blanc au jaune, à l'orange et au rougeâtre. Tous les isolats produisaient des colonies à forme ronde et élevée ou convexe, avec un contour lisse ou ondulé et de consistance sèche à crémeuse, visqueuse et de transparent à opaque. Des observations microscopiques ont été effectuées pour étudier certains caractères des isolats tels que la forme de la cellule, la réaction au Gram et la motilité. Les différents morphotypes des souches représentent les deux types de Gram (positif et négatif) et la forme de la cellule était pour la majorité de forme bacillaire (Figure 12).

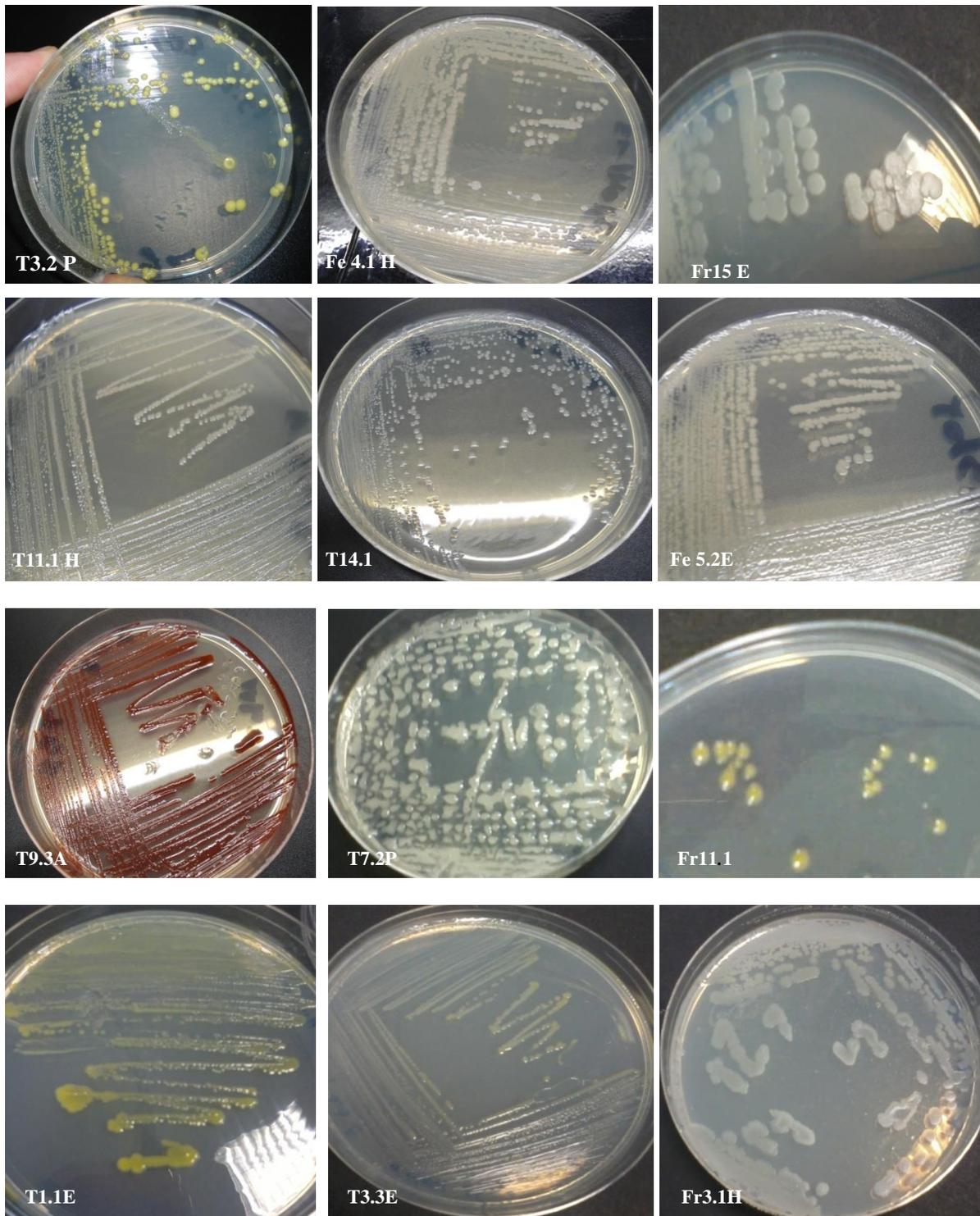


Figure 11: Aspect macroscopique de quelques isolats bactériens isolés sur gélose nutritive. (T : Tronc, Fe : Feuille, Fr : Fruit, H : hiver, P : Printemps, A : Automne, E : Été) (Exemple : T 1.1E : souche (1) isolée de l'arbre numéro (1) pendant la saison d'été).

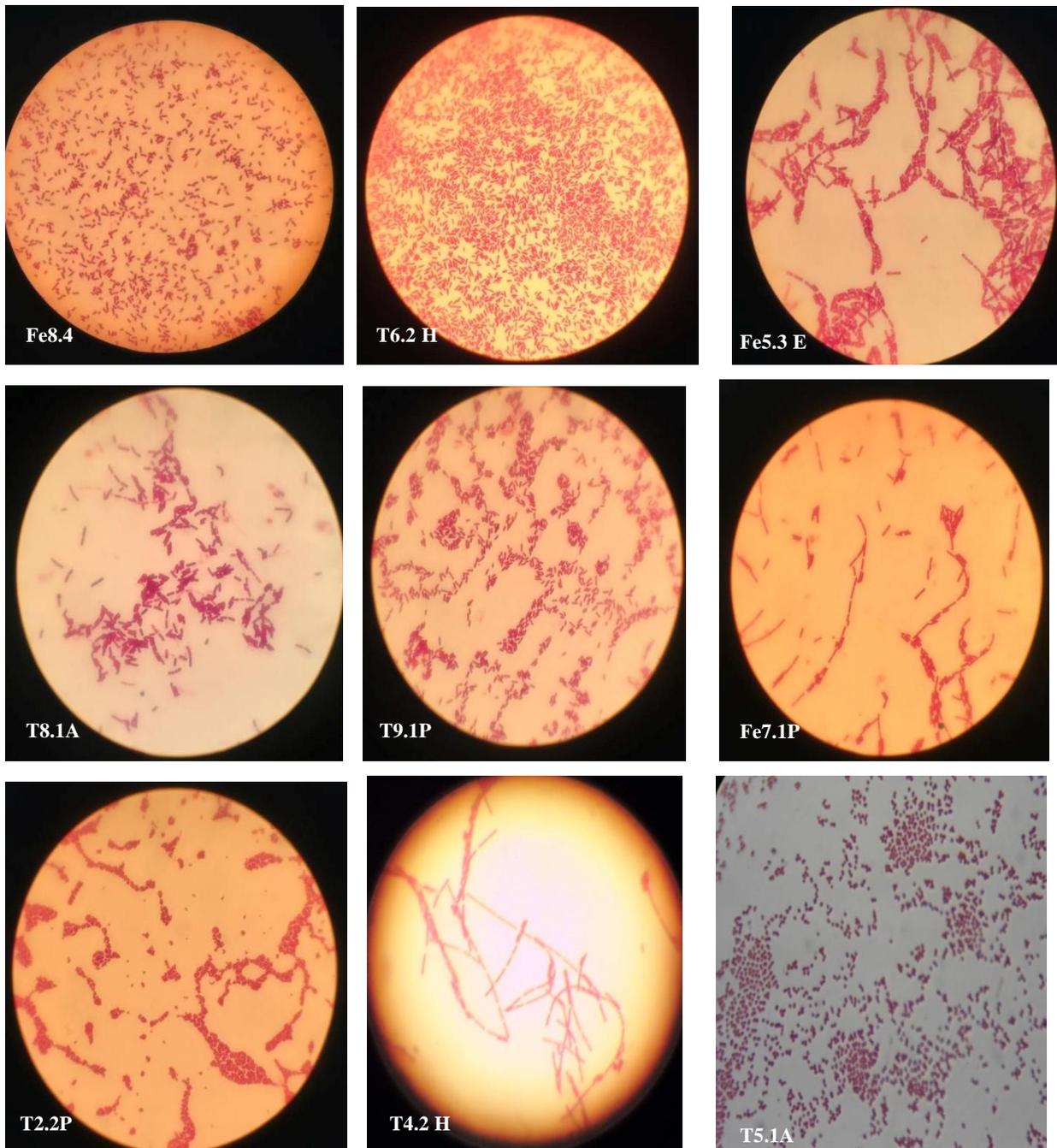


Figure 12: Formes cellulaires et type de Gram de quelques souches identifiées.

En confrontant les premiers résultats morphologiques aux principaux caractères physiologiques, ainsi qu'aux caractères biochimiques que nous avons obtenu, une première identification est obtenue (Tableau 10).

L'ensemble des souches identifiées ont un profil métabolique peu diversifié vis-à-vis de la majorité des substrats testés. Les souches assimilent la majorité des sucres testés même dans un milieu pauvre contenant le sucre comme seule source de carbone et d'énergie. Exception fait pour quelques souches vis-à-vis d'un nombre des sucres (tableau 10). Les isolats présentent le même comportement vis-à-vis de l'utilisation des acides aminés comme seule source d'azote. L'ensemble des acides aminés rajoutés au milieu de culture de base a été assimilé par les bactéries mais à différente affinité (Annexe 2). Certaines souches tel que T3.1 E, T3.3 E, T6 E, T10.1 E, T14.1 E ont la même affinité vis à vis des acides aminées suivant : proline, tyrosine, asparagine, alanine, méthionine ; caractérisé par la production d'une couleur verdâtre sur le milieu et la production d'une fluorescence sous UV caractéristique du genre *Pseudomonas*. La totalité des souches possèdent une carboxyméthyl cellulase et la majorité ont la capacité de dégrader l'urease.

Tableau 10: Caractéristiques phénotypiques des isolats.

Isolats	Gram	Forme	Oxydae	Catalase	Urease	Indole	VP	RM	Cit.Sim	Mannitol	Mobilité	NR	ODC	ADH	LDC	Glucose	Lactose	Galactose	Fructose	Ribose	Sucrose	Maltose	Xylose	Arabinos _e	Sorbitole	Identification présumptive
Fr 1 E	+	B	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr11.1 E	-	B	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fr13.1 E	-	B	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI
Fr15.1 E	+	B	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe5.3E	+	B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe 14 E	+	B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe 4.1 E	+	B	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe 5.2 E	+	B	-	+	+	+	nd	nd	nd	±	-	+	nd	±	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	NI.
Fe 2.1 E	+	B	+	+	+	-	-	-	-	±	±	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T1.1 E	+	B	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-		-		+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Microbacterium</i>
T5.2 E	+	B	-	-	+	-	-	+	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T3.3 E	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T 6 E	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T9.1 E	-	B	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T12.1 E	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T14.1E	-	B	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T14.2 E	-	B	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T13.1 E	+	B	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T10.2 E	-	B	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Kluyvera spp.</i>
T4.4 E	-	B	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>

(+): caractère positif; (-):caractère négatif ; (+/-) : Réaction variable, (B) : Bacille, (C) : Cocci, (CB) : coccobacille, (nd) : non déterminer, (NI) : Non Identifié, (Cit.Sim) : citrate de simons.

(Suite 1 tableau 10)

Isolats	Gram	Forme	Oxydase	Catalase	Urease	Indole	VP	RM	Cit.Sim	Mannitol	Mobilité	NR	ODC	ADH	LDC	Glucose	Lactose	Galactose	Fructose	Ribose	Sucrose	Maltose	Xylose	arabinose	Sorbitole	Identification présumptive
Fr 5.1H	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr9.2 H	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fr9.1H	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fr2.2 H	-	B	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
Fr4.1H	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr3.1 H	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe9.2H	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fe5.2H	+	B	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe8.4 H	+	B	+	+	±	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus spp.</i>
Fe 4.1H	+	B	+	+	±	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus spp.</i>
T1.1 H	-	B	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NI
T6.2 H	+	B	+	+	±	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus.spp</i>
T7.1 H	+	B	-	+	+	-	-	+	-	-	±	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Exiguobacterium sp</i>
T4.2 H	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T9.1 H	-	B	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Klebsiella spp.</i>
T11.1 H	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T 7.3 H	+	B	+	+	-	-	-	+	±	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus spp.</i>
T 7.4 H	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>

(Suite 2 tableau 10)

Isolats	Gram	Forme	Oxydae	Catalase	Urease	Indole	VP	RM	Cit.sim	Mannitol	Mobilité	NR	ODC	ADH	LDC	Glucose	Lactose	Galactose	Fructose	Ribose	Sucroe	Maltose	Xylose	arabinose	sorbitole	Identification présumptive
T 2.1 P	+	B	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T 2.2 P	+	C	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	<i>Staphylococcus spp.</i>
T9.1 P	+	B	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus spp.</i>
T7.2 P	+	B	+	+	+											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T1.1 P	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T1.3 P	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T3.2 P	+	C B	-	+	-	nd	nd	nd	+	-	+	+	+	-	nd	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	NI
T7.3 P	-	B	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T4.2 P	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Stenotrophomonas spp</i>
T10.2 P	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Stenotrophomonas spp</i>
T8.1 P	+	B	+	+												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T11.1 P	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T11.3 P	-	B	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
T13.1 P	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T13.2 P	+	B	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Lysinibacillus spp.</i>
T15.2 P	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
Fe7.1 P	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe8.1 P	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe9.2 P	-	B	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	NI
Fe 9.3 P	-	B	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fe10.1P	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe1.2 P	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe15.2 P	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>

(Suite 3 tableau10)

Isolats	Gram	Forme	Oxydae	Catalase	Urease	Indole	VP	RM	Cit.sim	Mannitole	Mobilité	NR	ODC	ADH	LDC	Glucose	Lactose	Galactose	Fructose	Ribose	Sucrose	Maltose	Xylose	arabinose	sorbitole	Identification présumptive
T 7.1 A	+	C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Micrococcus spp.</i>
T14.3 A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T13.2 A	+	B	+	+	+	-	+	-	nd	nd	-	+	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>NI</i>
T15.2 A	+	B	+	+	+	-	-	+	nd	+	-	+	-	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>NI</i>
T10.1A	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T9.3A	-	B	-	+												+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Serratia spp.</i>
T8.1A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
T9.1A	-	B	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Pseudomonas spp.</i>
T7.2A	+	B	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>NI</i>
Fe14.1 A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe 6.1A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe9.1 A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fe 8.1A	+	C B	+	+	+	-	+	-	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>NI.</i>
Fr8.1A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr9.1A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr12.1A	+	B	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>
Fr14.1 A	+	B	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Bacillus spp.</i>
Fr 6.1A	+	B	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterobacter spp.</i>

1.1.1.1. Effet des facteurs abiotique sur la croissance des isolats

Les facteurs abiotiques sont parmi les facteurs environnementaux qui influencent directement la croissance bactérienne et par conséquent ils peuvent inhiber ou stimuler ces microorganismes.

Pour cela, la plus-part des souches testées poussent à 45 °C sauf les souches appartenant au groupe des *Pseudomonas* (T3.1 E, T.3.3 E, T10.1E, T 12.1E, T4.1E, T4.4, T7.1 E, T14.1 E, T15.1). D'autres souches poussent à 4°C après 24h, après 72h et après 10 jours d'incubation. D'autres isolats n'ont pas poussées à 4°C, même après 10 jours d'incubation (Fr 11.1 E, T10.2 E, T2.1E, T5.2E, T5.1E). À la température 52°C, la moitié des souches testées ont la capacité de résister avec une différence au niveau de la consistance des colonies et leurs temps d'apparition. Cependant la totalité pousse à 37°C (annexe 2).

Toutes les souches poussent en présence des concentrations de NaCl variant de 0.01% à 12%. Cependant, à une concentration de 12%, la croissance est presque nulle pour la majorité des souches (figure 13). L'effet des différentes concentrations de NaCl sur la croissance des souches est très variable mais la meilleure croissance est observé entre 0.1% et 3%. Il faut ajouter que il y'avait une diversité entre les isolats dans la croissance, soit ces souches provenant de la même niche, soit de différent écosystème.

Aussi, les souches peuvent survivre dans l'intervalle de pH 4.0 à pH 11, cependant la croissance à pH 4.0 est très réduite. Les isolats issus de différents compartiments de l'arbre présents un optimum de croissance situe entre pH 5.5 et pH 8.6 (Figure 14) et parfois dépasse le pH 9.

Suite à ces résultats, il montre que nos isolats tolèrent et survivent dans des conditions environnementales sévères telles que le stress salin, l'acidité, l'alcalinité et même des hautes températures.

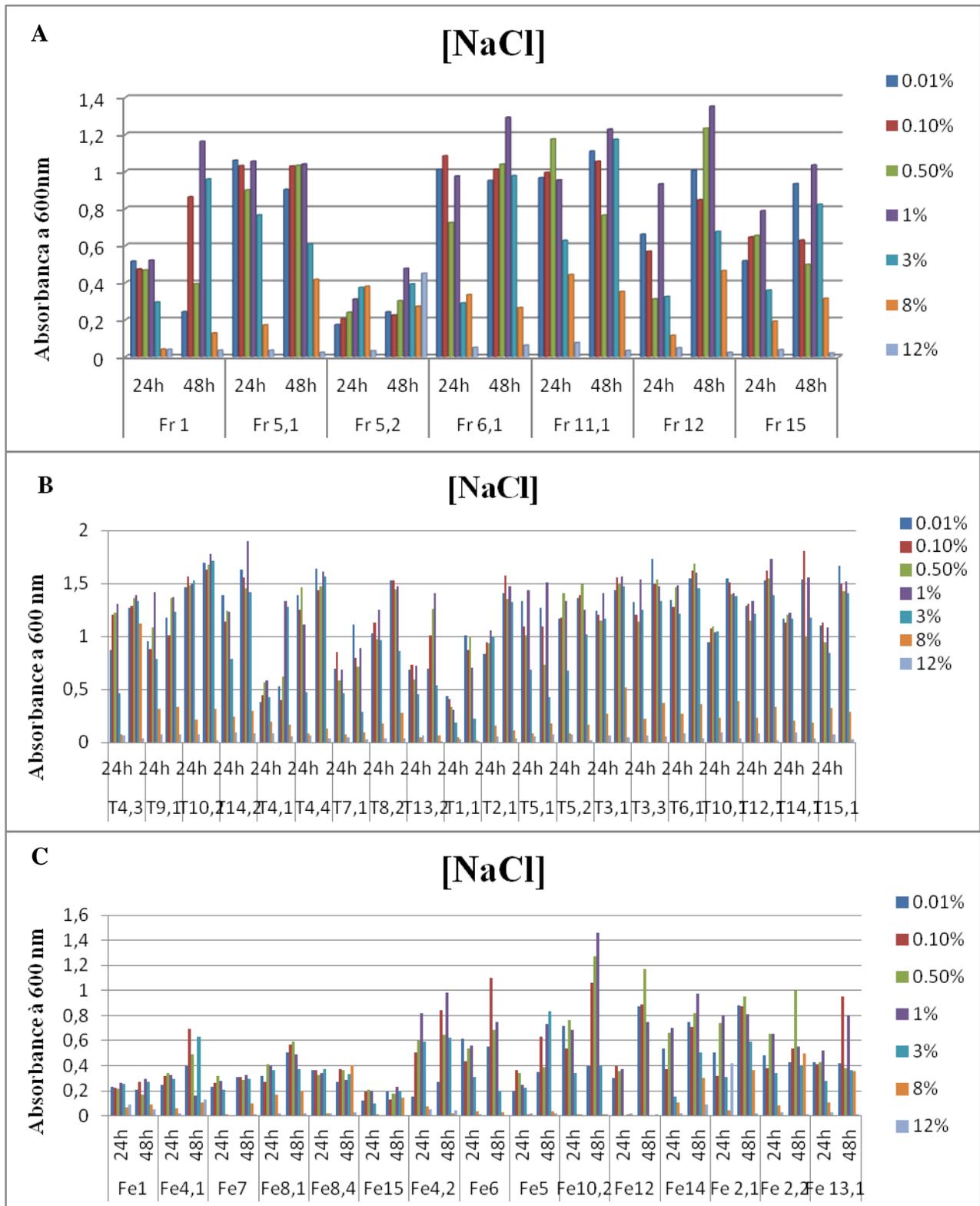


Figure13 : Effet du NaCl sur la croissance des isolats testés. A : Souches Fr, B : Souches T et C : Souches Fe.

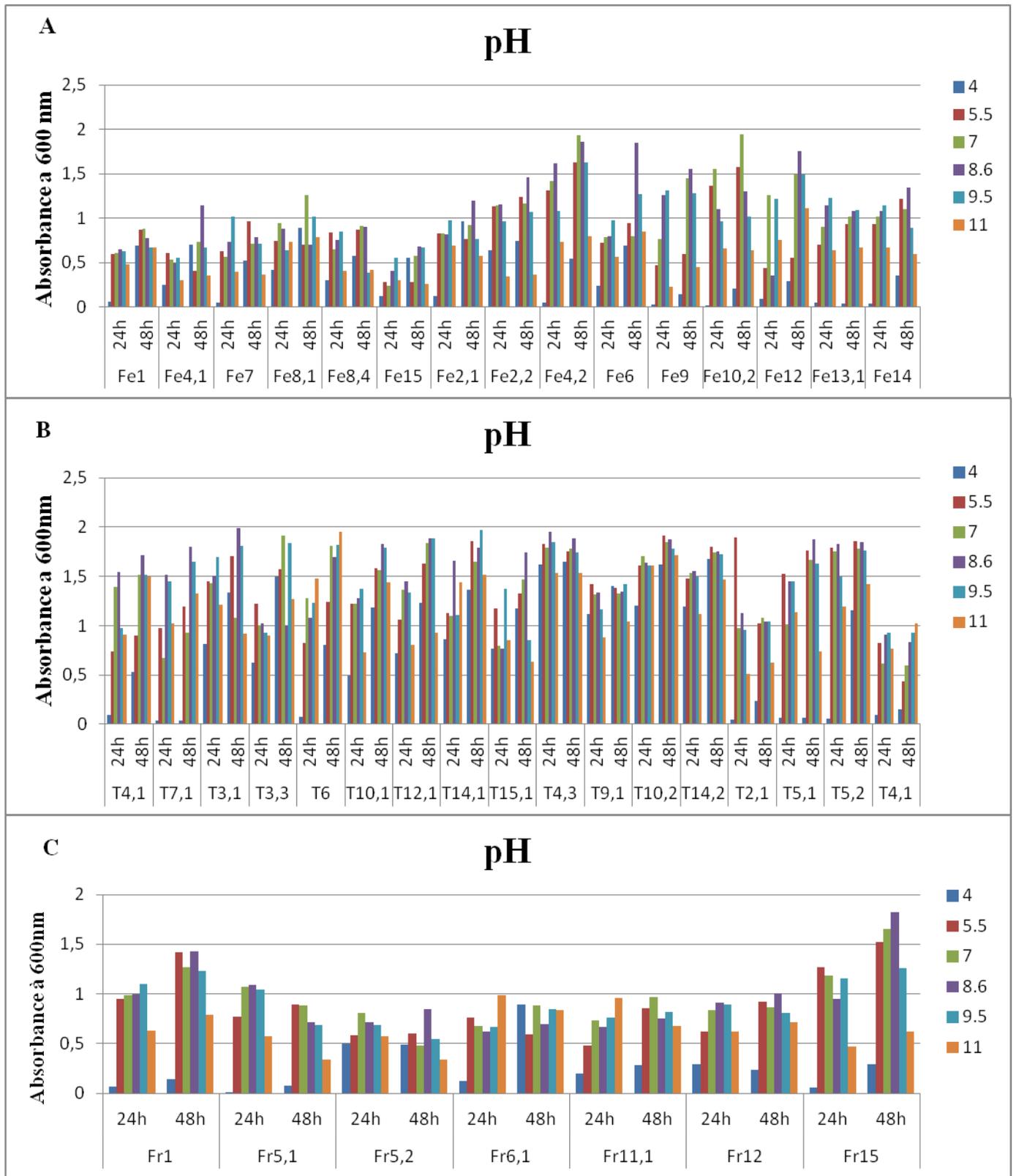


Figure 14 : Influence du pH sur la croissance des souches testées. A : Souches (Fe), B : souches T et C : Souches Fr.

En effet, la détermination des caractères phénotypiques a été utilisée pour identifier et classer les isolats selon certains critères, morphologiques, physiologiques et nutritionnels. Cependant ces propriétés n'ont pas permis de réaliser une identification taxonomique complète et précise. Car les morphologies cellulaires des microorganismes et les aspects des colonies ne sont pas suffisamment discriminants. D'autre part, les caractères métaboliques et physiologiques sont largement employés or on sait que des souches appartenant à la même espèce n'ont pas forcément le même métabolisme ni la même physiologie (Karine, 2003). Cette méthode classique est encore admise comme étape primordiale pour l'identification présomptive des isolats bactériens (Carroll et Weinstein, 2007). Il ressort du (tableau 10) que la majorité des isolats bactériens sont identifiés au niveau du genre seulement, ce qui n'est pas suffisant pour les mettre dans un rang taxonomique plus bas. Pour d'autres, on n'a pas pu les classer même au niveau du genre. Par conséquent, nous avons utilisé des méthodes moléculaires pour compléter l'identification (au niveau de l'espèce).

Malgré que les techniques phénotypiques classiques sont parmi les plus anciennes méthodes utilisées pour l'identification bactérienne (Dauga *et al.*, 2005), elles ont montré plusieurs limites dont les principales sont : la sélection d'un milieu de croissance approprié, le respect de conditions de croissance spécifiques (température, pH, lumière), le potentiel d'inhibition de la propagation de colonies autres que celles d'intérêt et surtout l'incapacité de cultiver un grand nombre d'espèces bactériennes en utilisant les techniques disponibles à l'heure actuelle (Trevors, 1998) ce qui conduit à la description d'une très faible partie de la diversité et à la sous-estimation de la richesse du monde bactérien.

Cependant les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques ne doivent pas être sous-évalués; ils ont encore un rôle irremplaçable dans l'obtention et la caractérisation de nouvelles souches. Leurs avantages résident dans leurs faibles coûts et la performance vis-à-vis des résultats.

1.1.2. Identification moléculaire par amplification et séquençage de l'ADNr 16S

Dans un premier temps, le gène de l'ADNr 16S des 78 isolats bactériens a été amplifié par PCR classique en utilisant le couple d'amorce universelle FD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) et rp2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg *et al.*, 1991). Les amorces utilisées ont été capables d'engendrer des amplifiants pour tous les isolats. Le résultat de chaque amplification a été observé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % et l'apparition d'une bande unique à 1500 pb indique la réussite de l'amplification (figure 15).

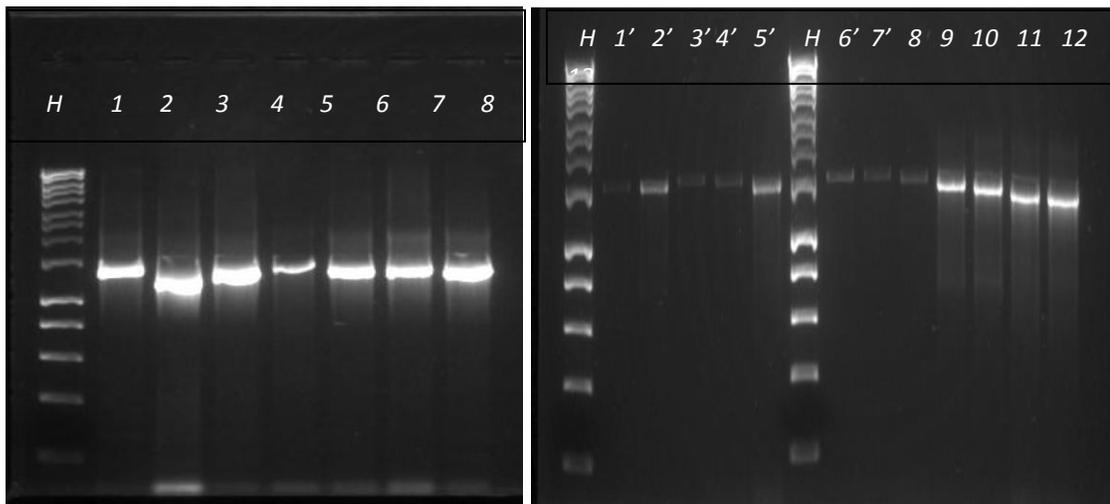


Figure 15: Electrophorèse sur gel d'agarose pour les produits de la PCR de l'ADNr 16S, H: marqueur de taille (HyperLadder) ; 1→7, 1'→7', 8→12: bands d'ADNr 16S de quelques souches étudiées.

La figure ci-dessus représente les résultats d'amplification après électrophorèse au gel d'agarose pour certaines souches isolées et comme montrées sur le gel présenté dans la figure 18, le gène d'ADNr 16S a été amplifié avec succès.

Les séquences obtenues par amplification de l'ADNr 16S des différents isolats sont ensuite purifiées, séquencées et comparées à des séquences au niveau dans des banques de données (GenBank) sur le site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). GenBank, via l'outil bio-informatique et le programme Blastn, qui réalise un alignement et propose une séquence qui présente les meilleurs scores et pourcentage d'identité avec nos séquences. Les valeurs du score déterminent l'identité entre les deux séquences alignées. Les valeurs de E-value (ou Expect

value) indiquent la probabilité de tomber sur une séquence autre que celle proposée par GenBank (tableau 11).

Dans notre cas, l'utilisation de deux amorces a permis d'amplifier les séquences d'ADNr 16S partiellement (la longueur des séquences obtenue allant de 700 pb à 1111 pb). Pour cela, deux séquences correspondent parfaitement aux séquences disponibles dans les banques de données, ce qui permet une identification de 100% au niveau des espèces. Certaines séquences ont été identifiées entre 97% à 99% de similarité avec le gène de l'ARNr 16S dans GenBank. Alors que, d'autres isolats ne peuvent être identifiés qu'entre 96% et 78%. Ces séquences vont servir pour les comparaisons phylogénétiques aux séquences les plus proches et cela permet alors d'avoir une idée du groupe bactérien dans lequel se situe les bactéries nouvellement identifiées en les positionnant parmi l'ensemble des séquences d'ADNr 16S disponibles sous forme d'arbres phylogénétiques (Staden, 1979).

Les séquences obtenues ont été déposées dans la base de données EMBL, leur numéro d'accès est de LN995728 à LN995802 (tableau 11).

Tableau 11: Pourcentages d'homologie des séquences d'ADNr 16S des isolats avec celles déposées au Genbank.

Isolates	Partie de la plante hôte	N° d'Accession des séquences dans EMBL	Nom proposé par Genbank avec les pourcentages de similarité
Fr 2.2 H	Fruits	LN995746	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain SNP0614 (NR 118644.1), 93%
Fe15.2 P	Feuille	LN995778	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 strain KT2440(NR_074596.1), 99%
T 7.4H	Tronc	LN995744	<i>Pseudomonas putida</i> F1 strain F1 (NR_074739.1), 92%
T9.1 A	Tronc	LN995792	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> strain IH5ID (NR_029063.1), 90%
T10.1 A	Tronc	LN995789	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164(NR-1135611), 92%
T 3.3 E	Tronc	LN995731	<i>Pseudomonas putida</i> F1 strain F1(NR_074739.1), 99%
T 6 E	Tronc	LN995732	<i>Pseudomonas monteilii</i> (NR_121767.1), 96%.
T9.1E	Tronc	LN995733	<i>Enterobacter cloacae</i> strain ATCC 13047(NR_118568.1), 99%
T12.1 E	Tronc	LN995734	<i>Pseudomonas putida</i> F1 strain F1(NR_074739.1), 97%
T14.1 E	Tronc	LN995735	<i>Pseudomonas monteilii</i> (NR_121767.1), 97%
T14.2 E	Tronc	LN995736	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain LMG 2693(NR_116756.1), 99%
T4.4 E	Tronc	LN995738	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> strain NBRC 102199(NR_114041.1), 95%
T1.3 P	Tronc	LN995757	<i>Pseudomonas monteilii</i> (NR_121767.1), 99%
T7.3 P	Tronc	LN995765	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 strain KT2440 (NR_074596.1), 99%
T 15.2 P	Tronc	LN995769	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 strain KT2440 (NR_074596.1), 99%

Fr 11 E	Fruits	LN995755	<i>Enterobacter kobei</i> strain CIP 105566 (NR_028993.1), 99%
Fr 9.1 H	Fruits	LN995752	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 99%
Fr 9.2 H	Fruits	LN995753	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 96%
Fr 12.1 A	Fruits	LN995786	<i>Enterobacter mori</i> strain R18-2 (NR_116430.1), 91%
Fe 9.3 P	Feuilles	LN995777	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain EN-119 (NR_042349.1), 99%
Fe 9.2 H	Feuilles	LN995754	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 91%
T1.1 P	Troncs	LN995756	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 99%
T11.1 P	Troncs	LN995770	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 100%
T11.3 P	Troncs	LN995771	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 99%
T11.1 H	Tronc	LN995766	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain 10-17 (NR_126208.1), 99%
Fr 1 E	Fruits	LN9955800	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(NR_074540.1), 85%
Fr 15.1 E	Fruits	LN995802	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 16S (NR_121761.1), 95%
Fr 8.1 A	Fruits	LN995784	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168, (90%)
Fr 9.1 A	Fruits	LN995783	<i>Bacillus subtilis</i> strain 168, (90%)
Fr 14.1 A	Fruits	LN995787	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 (99%)
Fr 5.1 H	Fruits	LN995747	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1), 93 %
Fr 4.1 H	Fruits	LN995746	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b (NR_104919.1), 92%
Fr 3.1 H	Fruits	LN995748	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1), 85%
Fe 5.2 H	Feuille	LN995749	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1), 92%
Fe1.2 P	Feuille	LN995775	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 (NR_102506.1), 96%
Fe 7.1 P	Feuille	LN995772	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain (NR_074453.1), 86%
Fe 8.1 P	Feuille	LN995773	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain (NR_074453.1), 91%
Fe10.1 P	Feuille	LN995774	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820 (NR_113945.1), 100%
Fe5.3E	Feuille	LN995795	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1), 88%
Fe 14 E	Feuille	LN995799	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1),93%
Fe 4.1 E	Feuille	LN995798	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. spizizenii strain NBRC 101239(NR_112686.1),92%
Fe14.1A	Feuille	LN995780	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 (NR_102506.1), 94%
Fe 6.1 A	Feuille	LN995779	<i>Bacillus mojavenis</i> strain NBRC 15718, 92%
Fe 9.1 A	Feuille	LN995781	<i>Bacillus mojavenis</i> strain NBRC 15718 (NR_112725.1), 96%
Fe 8.1 A	Feuille	LN995782	<i>Bacillus mojavenis</i> strain NBRC 15718 (NR_112725.1), 95%
T4.2 H	Tronc	LN995743	<i>Bacillus mojavenis</i> strain NBRC 15718 (NR_112725.1) , 78%
T8.1 A	Tronc	LN995791	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 (NR_121761.1) 99%
T14.3 A	Tronc	LN995788	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (NR_074540.1), 91%
T5.2 E	Tronc	LN995728	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407 (NR_102506.1), 99%
T8.1 P	Tronc	LN995766	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 (NR_121761.1), 95%
T13.1 P	Tronc	LN995764	<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames strain Ames(NR_074453.1), 90%
T7.2 P	Tronc	LN995761	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13 (NR_118996.1), 88%
T2.1 P	Tronc	LN995758	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13 (NR_118996.1), 98%
Fe 4.1 H	Feuille	LN995750	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> C3-41 (NR_074883.1), 91%
Fe 8.4 H	Feuille	LN995751	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474 (NR_114920.1), 93%

Fe 2.1 E	Feuille	LN995796	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i> strain NBRC 103108(NR_114207.1),86%
T6.2 H	Tronc	LN995739	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i> strain M-GX18 (NR_118146.1), 96%
T7.3 H	Tronc	LN995741	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain NBRC15717 (NR_112569.1), 97%
T 13.1 E	Tronc	LN995729	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> strain NBRC103144(NR_114213.1), 94%
T13.2P	Tronc	LN995763	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain NBRC15717 (NR_112569.1), 99%
T9.1P	Tronc	LN995762	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474 16S (NR_114920.1), 91%
Fr 13.1 E	Fruit	LN995801	<i>Massilia suwonensis</i> strain 5414S-25 (NR_116872.1), 85%
Fr 6.1 A	Fruit	LN995785	<i>Enterobacter mori</i> strain R18-2 (NR_116430.1), 88%
Fe9.2 P	Feuille	LN995776	<i>Erwinia uezensis</i> strain YPPS951 (NR_113061.1), 99%
Fe 5.2 E	Feuille	LN995797	<i>Brevibacterium halotolerans</i> strain DSM 8802 (NR_115063.1), 93%
T7.1H	Tronc	LN995744	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain DSM 20416 (NR_043479.1), 83%
T9.1 H	Tronc	LN995740	<i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 1686 strain KCTC 1686 (NR_102982.1), 83%
T7.1 A	Tronc	LN995793	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004 (NR_116578.1), 94%
T7.2 A	Tronc	LN995794	<i>Exiguobacterium acetylicum</i> strain NBRC 12146 (NR_113585.1), 93%
T9.3 A	Tronc	LN995790	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC 102204 (NR_114043.1), 81%
T1.1 E	Tronc	LN995730	<i>Microbacterium foliorum</i> strain P 333/02 (NR_025368.1), 89%
T 10.2 E	Tronc	LN995737	<i>Kluyvera cryocrescens</i> strain NBRC 102467 (NR_114108.1), 99%
T2.2 P	Tronc	LN995759	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. urealyticus strain CK27 (NR_037046.1),94%
T3.2 P	Tronc	LN995760	<i>Arthrobacter luteolus</i> strain CF-25 16S (NR_025362.1), 99%
T4.2 P	Tronc	LN995767	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 strain R551-3 (NR_074875.1), 99%
T 10.2 P	Tronc	LN995768	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3 strain R551-3 (NR_074875.1), 99%

Les résultats de l'identification moléculaire des isolats provenant de la parcelle d'étude de Tolga, montrent que parmi les 78 souches identifiées, 40 appartiennent au phylum firmicutes dont la majorité (28 isolats) au genre *Bacillus*, 8 isolats au genre *Lysinibacillus* et en totalité à la classe des Bacilli. Le phylum des Proteobacteria est le deuxième phylum le plus abondant avec 33 isolats, dont 32 isolats appartenant à la classe des Gammaproteobacteria. Puis vient le phylum des Actinobacteria, représenté par 3 isolats appartenant à l'ordre des Actinomycetales. Au total, 33 espèces appartenant à 16 genres ont été identifiées. Les genres les plus présents dans toutes les parties de l'arbre sont *Bacillus* (36,84%), *Pseudomonas* et *Enterobacter* 17,1 % pour chacun des genres identifiés. *Lysinibacillus* est le troisième genre le plus identifié avec 10,52%.

D'autres genres sont également identifiés tels que : *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, et *Brevibacterium*.

1.1.2.1. Discussion taxonomique

Comme il a été indiqué dans le tableau 11 que le seuil d'identification de nos souches est de l'ordre 78% à 100%. Ce qui nous donne une identification incertaine au niveau de l'espèce pour la majorité des cas.

Lors de l'alignement des séquences, se pose un autre problème : c'est que le Blastn met en évidence plusieurs identités relatives aux isolats, avec le même score et le même pourcentage de similarité. Ce qui rend le choix de la meilleure identification difficile. Dans ce cas là, on a tenu en compte les caractères phénotypiques correspondants à chaque isolats comme il a été suggéré par plusieurs auteurs (Woo *et al.*, 2008). Par exemple, le cas de la souche (T9.3 A), après avoir douté de leur identification par l'ARNr 16S, les caractères phénotypiques nous ont permis de choisir la deuxième souche proposée par Genbank. Mais, ce n'est pas le cas avec de nombreux isolats dont les caractéristiques phénotypiques et le gène ARNr 16S n'ont pas permis une identification précise.

En effet, l'identification des espèces bactériennes par le séquençage de l'ADNr 16S est couramment utilisé, mais le taux de réussite de l'identification par ce biais est varié. Pour des genres bactériens, l'utilisation du séquençage de l'ADNr 16S a permis d'identifier plus de 90% des cas étudiés (Lamoril *et al.*, 2008). De même pour des espèces bactériennes, de 62% à 92% (Hall *et al.*, 2003, Bosshard *et al.*, 2006) . Dans une autre étude, entre 65-85% (Lamoril *et al.*, 2008). Selon certaines études, de 1 à 14 % des isolats étudiés demeurent non identifiés après l'application de cette méthode (Lamoril *et al.*, 2008).

En effet, l'utilisation de la méthode moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16S comme outil d'identification reste peu performante pour certains genres et certaines espèces au sein desquels les variations de séquences sont trop minimes pour permettre de les distinguer. C'est le cas par exemple du *Bacillus* spp. (*Bacillus cereus* et *B. anthracis*), (Janda et Abbott, 2007), les entérobactéries et *Staphylococcus* spp. (Heikens, 2005). Dans ce cas là, d'autres gènes ont alors été proposés pour distinguer ces espèces ; par exemple le gène *rpoB* qui code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase, est présent en une seule copie dans les génomes bactériens et a démontré son utilité chez de nombreuses espèces (Kwok *et al.*, 2003).

L'identification finale des espèces est basée sur les résultats de recherche des similarités entre les séquences d'ADNr 16S. Pour cela, l'interprétation des données de séquence implique des exigences concernant la longueur et la qualité des séquences et le choix des programmes

appropriés pour l'analyse. Plusieurs recommandations ont été suggérées afin d'utiliser le séquençage de l'ADNr 16S en tant que méthode de référence pour l'identification bactérienne (Drancourt *et al.*, 2000 ; Janda et Abbott, 2007). Drancourt et al. (2000) ont proposé que des séquences complètes d'ADNr 16S avec plus de 99% de similarité soient utilisées. Selon, Janda et Abbott, l'utilisation de séquences complètes d'ADNr 16S, et en particulier pour des groupes bactériens a été confirmée comme une technique valable (Janda et Abbott, 2007). Alors que plusieurs études ont montré qu'un minimum de 500-525 pb incluant la région 5' puisse être adéquat pour l'identification de certains groupes de bactéries (Tang *et al.*, 1998 ; Woo *et al.*, 2003).

L'une des principales difficultés dans l'interprétation des données de séquence est l'attribution d'espèces bactériennes en fonction des résultats de recherche de similarité, car aucune valeur de seuil n'est disponible. Bien qu'un niveau de similarité de 97% ait été proposé pour la spéciation bactérienne en utilisant les séquences d'ADNr16S (Stackebrandt et Goebel, 1994), une différence de plus de 0,5% peut indiquer une nouvelle espèce (Palys *et al.*, 1997). En effet, comme différentes espèces bactériennes sont susceptibles d'évoluer différemment, il est impossible de déterminer un seuil universel pour délimiter le genre et l'espèce bactériens. Cependant, lors d'une étude, des similarités de séquences de plus de 99% et de plus de 97% ont été utilisées comme seuils pour l'identification des espèces et du genre respectif (Drancourt *et al.*, 2000). D'autre part, Janda et Abbott (2007), suggèrent d'utiliser un seuil plus de 99%, et idéalement plus de 99,5%, comme un critère d'identification des espèces.

Par ailleurs, les bases de données auxquelles on compare la séquence de la souche à identifier ont chacune leurs qualités et leurs défauts (Janda and Abbott, 2007; Kiratisin *et al.*, 2003) et peuvent être « polluées » par des séquences peu ou mal identifiées ce qui peut entraîner des erreurs d'interprétation (Woo *et al.*, 2008). Par exemple, la qualité des séquences déposées dans Genbank, base de données publique qui réunit un très grand nombre de séquences, n'est pas contrôlée (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Beaucoup de séquences proviennent de microorganismes nouveaux et inhabituels, isolés de l'environnement ; on y retrouve aussi beaucoup de séquences provenant de microorganismes n'ayant jamais été cultivés.

L'utilité de l'ADNr 16S est encore limitée par le choix des espèces bactériennes dans la base de données. Si cette dernière comprend des espèces bactériennes avec un minimum de différences dans leurs séquences d'ADNr 16S et qui, parfois, ne peuvent pas être identifiées avec certitude, ceci peut également donner lieu à une identification incorrecte.

En fin, parfois le manque d'expérience des utilisateurs de cette technique rend souvent l'interprétation des résultats difficile en raison du grand nombre de séquences d'ADNr 16S non validées dans GenBank, ce qui rend la tâche de l'alignement compliquée pour les utilisateurs inexpérimentés de décider si le «rapprochement le plus proche» représente l'identité réelle d'un isolat bactérien.

Dans la présente étude, on a essayé de caractériser les souches isolées du palmier dattier en utilisant le gène d'ARNr 16S. Il s'agit ici d'une méthode universelle précise et objective, comme il a été démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne et la découverte de nouvelles espèces ou de nouveaux genres bactériens. Dans certaines situations, l'amplification et le séquençage du gène d'ARNr 16S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leurs limites dans la discrimination entre la souche à identifier et les espèces décrites.

En conclusion, il faut noter que l'interprétation finale d'un résultat d'identification bactérienne basé sur l'ARNr 16S, doit impérativement prendre en compte les caractères phénotypiques.

1.1.2.2. Phylogénie

Les séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S nous ont permis de dresser les liens phylogénétiques entre les isolats, sous forme d'arbres phylogénétiques en utilisant le logiciel MEGA 5.2.2 (Figures 16 et 17).

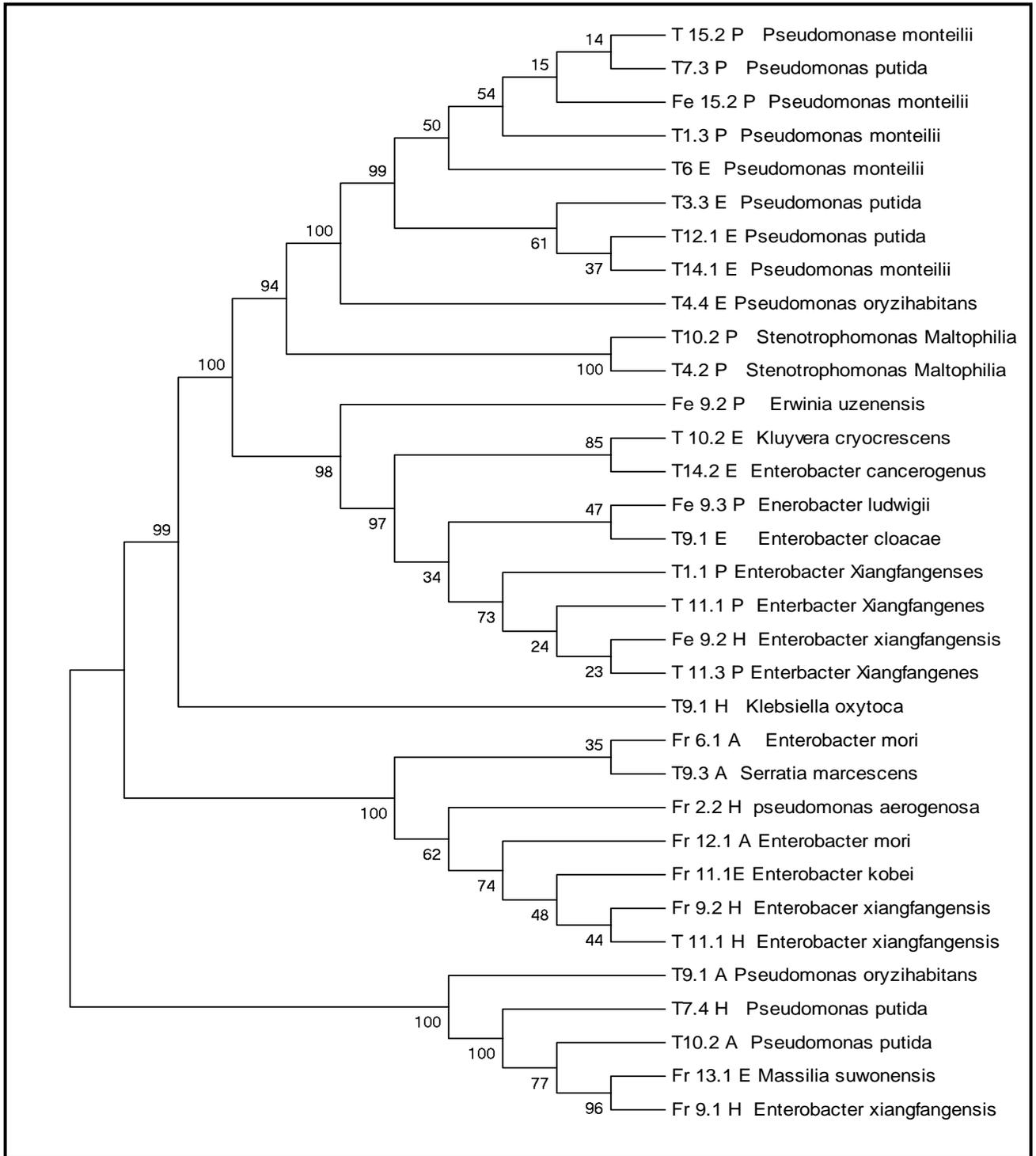


Figure 16 : Arbre phylogénétique basé sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16S des souches bactériennes Gram négative. Arbre établi par la méthode Neighbor- Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-paramètre (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

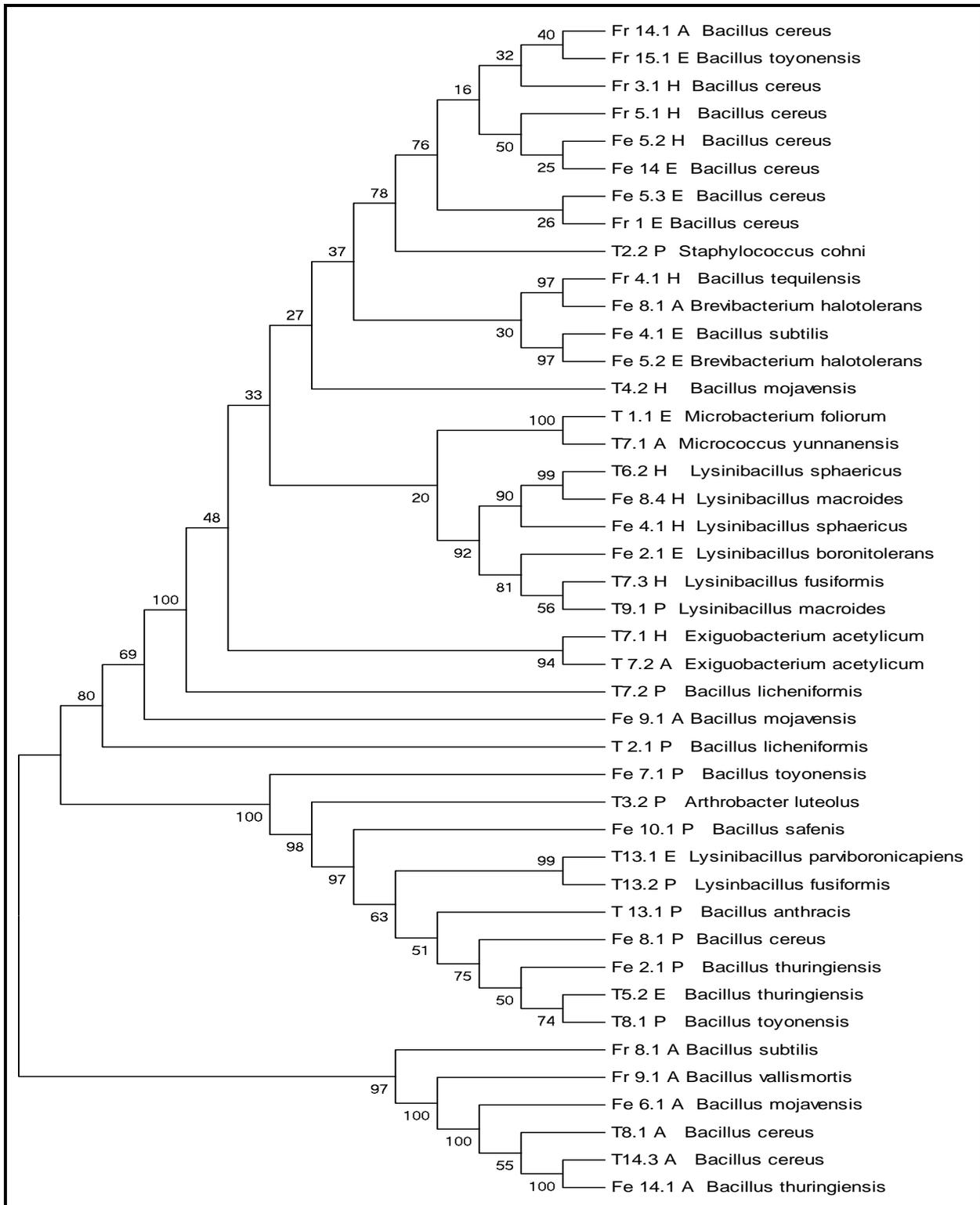


Figure 17: Arbre phylogénétique basé sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16S des souches bactériennes Gram positive. Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-paramètre (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

Ces arbres phylogénétiques illustrent remarquablement la diversité des espèces bactériennes présentes à la surface de la baie de dattes, les feuilles et le tronc du palmier dattier (le nombre des clades). Nous constatons que les arbres phylogénétiques ont regroupé les espèces bactériennes dans plusieurs clades et chaque clade en sous clade. Sur l'arbre phylogénétique des bactéries Gram négatif (Figure 16), la distinction entre les genres est observable. De plus, dans la plupart des cas, les espèces du même genre sont regroupées sur les mêmes clusters, C'est le cas des espèces des genres *Pseudomonas*, *Enterobacter*. C'est également pour l'arbre phylogénétique des Gram positif, dans la plus part des cas, les espèces appartenant au même genre sont regroupées dans les mêmes clades (Figure 17). C'est notamment le cas des genres *Bacillus* et *Lysinibacillus*.

Le palmier dattier se révèle donc être colonisé par des bactéries très diverses. La figure 18 peut résumer cette diversité.

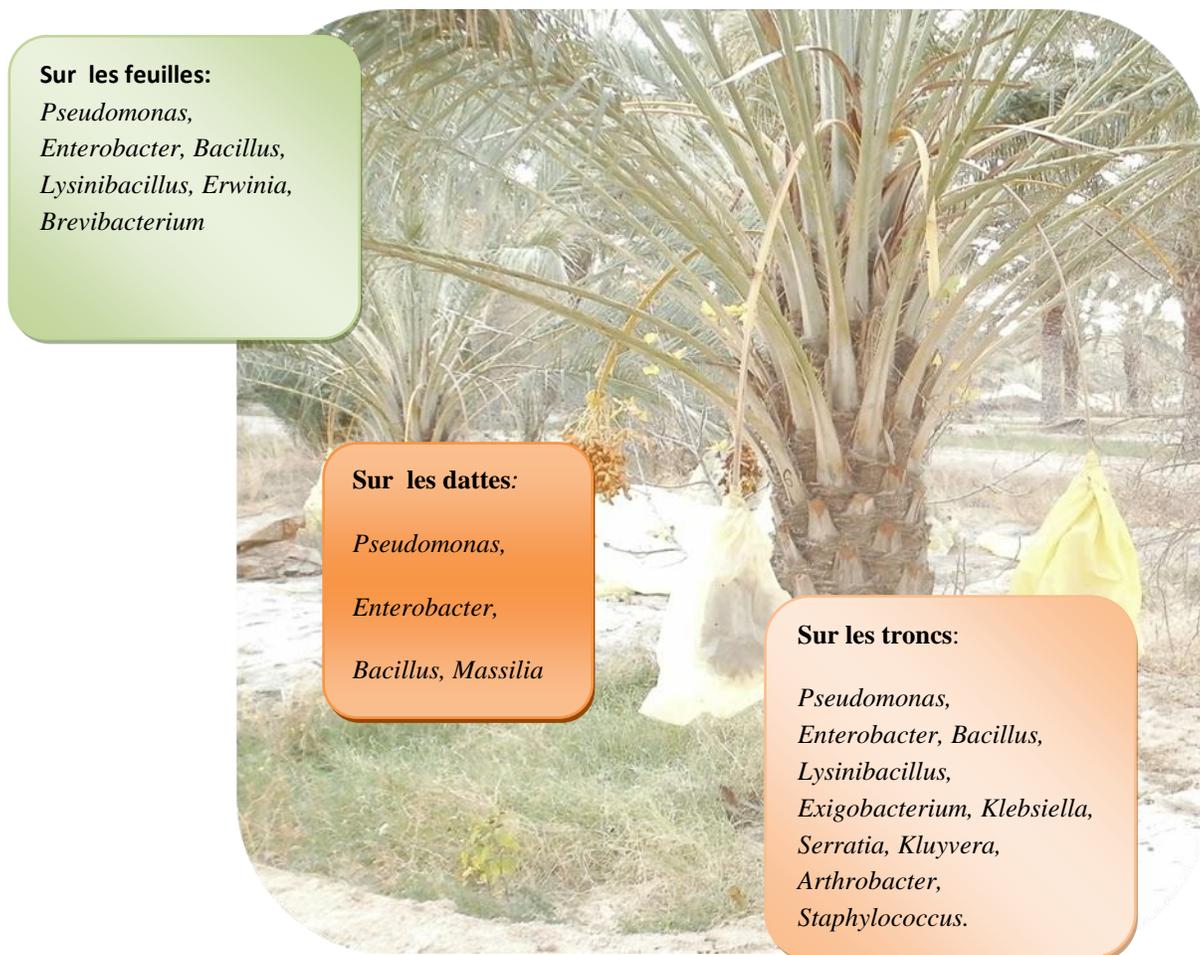


Figure 18: Bilan de la répartition des genres bactériens à la surface du palmier dattier.

1.2. Distribution des isolats sur l'arbre à travers les saisons

La variation de la proportion des espèces et genres pendant les différentes saisons a été hétérogène (tableau 12). Certains genres sont constamment présents sur l'arbre et sur tous les compartiments. C'est notamment le cas des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, et *Enterobacter*. Les uns ne sont détectés que sur les troncs et ils peuvent être considérés comme transitoires si on observe la proportion d'apparition pour chaque genre (*Stenotrophomonas*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*). D'autres n'apparaissent que sur les feuilles (*Brevibacterium*, *Erwinia*). Le genre *Lysinibacillus* a été identifié uniquement sur les feuilles et les troncs. On constate alors que l'espèce *Exiguobacterium acetylicum* est présente sur le tronc pendant la saison hivernale, puis elle disparaîtra à l'arrivée du printemps et l'été pour réapparaître à l'automne.

Tableau 12: Diversité en genres bactériens pendant les différentes saisons sur les différents compartiments du palmier dattier.

Genres bactériens	Hiver			Printemps		Ete			Automne			Totale	
	Source d'isolement												
	Feuilles	Fruits	Troncs	Feuilles	Troncs	Feuilles	Fruits	Troncs	Feuilles	Fruits	Troncs		
<i>Bacillus</i>	1	3	1	4	4	3	2	1	4	3	2	28	
<i>Pseudomonas</i>	0	1	1	1	3	0	0	5	0	0	2	13	
<i>Lysinibacillus</i>	2	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	8	
<i>Enterobacter</i>	1	2	1	1	3	0	1	2	0	1	0	13	
<i>Kluyvera</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Arthrobacter</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	
<i>serratia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
<i>klebsiella</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Exiguobacterium</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
<i>Micrococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Erwinia</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Brevibacterium</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	
<i>Massilia</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
<i>Microbacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
<i>Nombre de genre</i>	3	3	6	4	7	3	3	6	2	2	5		

En plus, le tronc a accueilli une plus grande diversité en espèces que les dattes et les feuilles (tableau 12). Le tronc contient la grande diversité en genre pendant les différentes

saisons (6, 7, 6, 5 pendant l'hiver, printemps, été et automne successivement). Puis, viennent les feuilles (3,4, 3, 2) et les fruits (3, 3, 2 pendant l'hiver, l'été et automne successivement).

De nombreux facteurs sont susceptibles d'être impliqués dans la détermination de la composition en espèces des communautés bactériennes sur les plantes. Ils peuvent comprendre entre autres : la disponibilité de l'inoculum (Kinkel *et al.*, 1987 ; Lindemann et Upper, 1985), la phénologie des plantes hôtes (Blakeman, 1985; Martins *et al.*, 2013), les conditions physico-chimiques environnementales (O'Brien et Lindow, 1989; Berg et Smalla, 2009) et les caractéristiques nutritionnelles de la phyllosphère (Compant *et al.*, 2005). La variabilité de l'approvisionnement en nutriments entre ces niches peut expliquer en partie les différences dans la structure de la population bactérienne observée, ainsi que la diversité des genres cultivables entre les différentes parties de la plante (Martins *et al.*, 2013).

En effet, le tronc d'un palmier dattier est recouvert d'une écorce. Cette dernière n'est qu'une expansion de la base de pétioles des anciennes feuilles (figure 1). Le tronc est composé donc par des fibres pétiolaires superposées les unes au-dessus des autres de l'intérieur vers l'extérieur et d'une bourre fibreuse que l'on appelle le liffe (entre les Kornafs). Ces fibres sont constituées de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines (Abdelhak, 2014) formant ainsi un écosystème riche en éléments nutritifs favorables à un plus grand nombre de bactéries.

Par ailleurs, le microenvironnement associé aux feuilles est considéré comme pauvre en nutriments (Andrews, 1992 ; Compant *et al.*, 2005). Les dattes sont aussi (surtout dans le dernier stade de maturation) une niche défavorable pour maintenir la croissance bactérienne grâce à sa teneur en eau de surface (AW) très réduite et les concentrations élevées en sucres (Hasnaoui *et al.*, 2010; Shenasi *et al.*, 2002). En outre, la surface des feuilles et des fruits contient des éléments qui interviennent dans la défense de la plante et du fruit contre les activités microbiennes (Al-daihan et Bhat, 2012; Al Qroom et Al Momani, 2014). Dans une étude récente, en utilisant l'analyse de la séquence de gène de l'ARNr 16S, Leveau et Tech (2011) on a noté que la communauté microbienne sur les feuilles diffère considérablement de celle des fruits aussi bien que dans la taille et la structure. Ils ont aussi montré, la présence d'un très grand nombre de bactéries associées aux feuilles et aux fruits connues pour leur rôle inhibiteur des pathogènes (Leveau et Tech, 2011). Parfois, l'identification des mêmes espèces isolées de tronc, de feuilles et de fruits a suggéré l'importance de l'écorce du tronc comme source potentielle

d'inoculum pour les feuilles et les dattes. En outre, les microorganismes du sol sont capables de coloniser les parties aériennes de la plante et surtout le tronc (Martins *et al.*, 2013) ce qu'explique en partie la richesse de cette partie en genres bactériens.

Dans notre étude, les genres les plus abondants sont *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, et *Lysinibacillus* (figure 19).

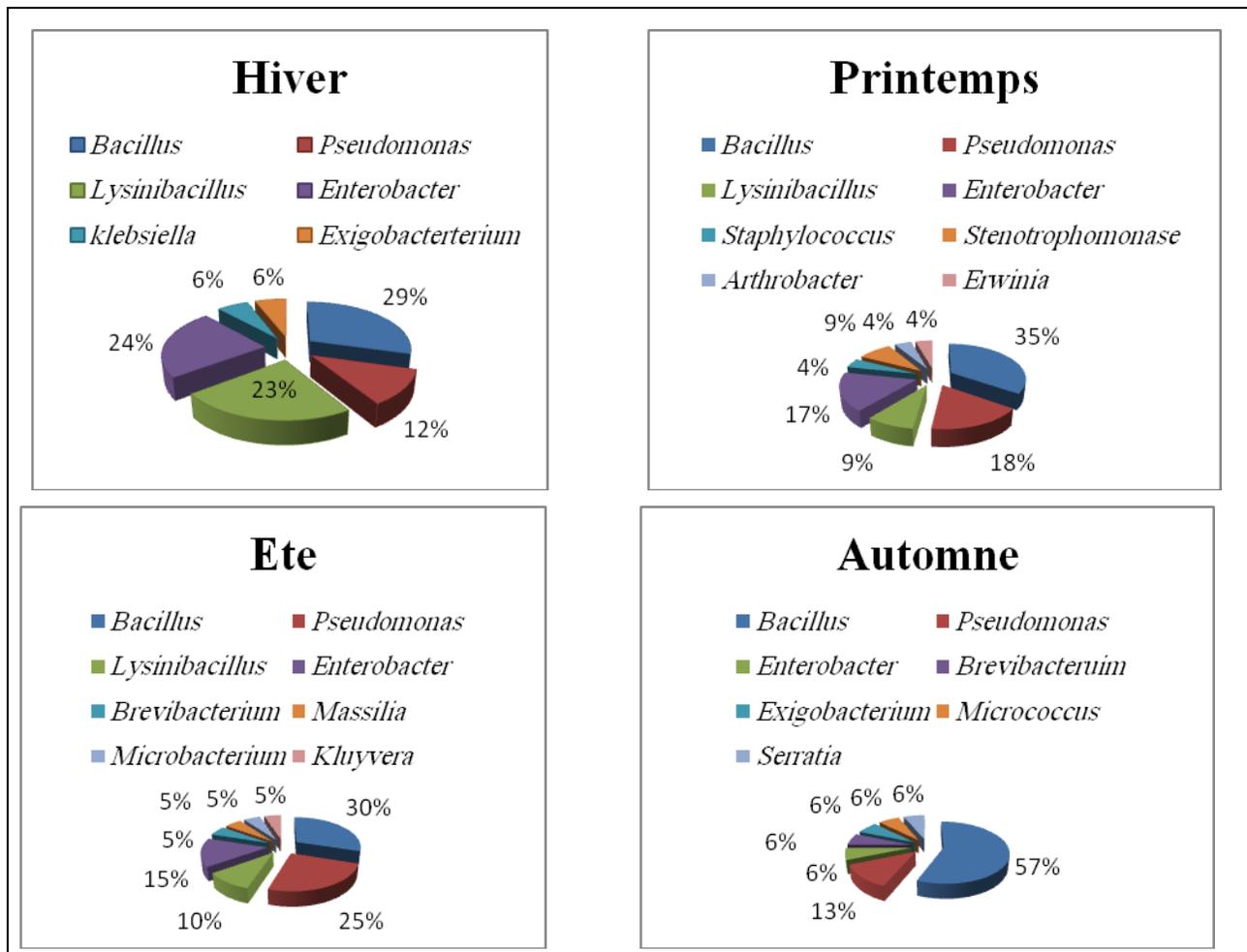


Figure 19 : Proportions des genres bactériens identifiés pendant chaque saison.

Les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont des genres ubiquitaires très reconnus pour leur capacité de vivre sous des conditions nutritionnelles difficiles (Hirano et Upper, 2000 ; Park *et al.*, 2011) et sont naturellement présents dans le sol et sur les plantes. Les espèces du genre *Bacillus* offrent plusieurs avantages plus que les autres bactéries à cause de leur activité anti microbienne comme a été montré dans plusieurs études (Compant *et al.*, 2005; El Hassni *et al.*, 2006 ; Dihazi *et al.*, 2012). La capacité du genre *Bacillus* à former des endospores sous

conditions défavorables peut être jouée un rôle dans l'existence de ce germe au cours des différentes saisons. En outre, la caractérisation de quelques espèces appartenant au genre *Bacillus* telque : *Bacillus pumilus*, *B. cereus* et *B. subtilis* qu'ont été déterminé précédemment parmi l'ensemble des microorganismes endogènes de la datte par (Al.Shaickly *et al.*, 1986). En plus, la présence des germes communément connus comme des pathogènes, peut être due à la contamination par les mains sales des travailleurs pendant la récolte du fruits (Hamad *et al.*, 2012). La présence de certains genres sur le tronc, feuilles, et datte peuvent indiquer que la flore bactérienne du tronc peut influencer la structure de la communauté bactérienne des autres compartiments.

Plus encore, la variabilité de la population bactérienne sur la même plante (palmier dattier) à travers les différentes saisons peut être influencée aussi par les conditions climatiques environnementales locales comme a été montré dans des études précédentes. Plusieurs études ont montré l'effet des conditions climatiques sur la diversité de la macrobiote dans la phyllosphère (Renouf, 2006 ; Finkel *et al.*, 2011; Rastogi *et al.*, 2012 ; Penuelas *et al.*, 2012 ; Medina-Martíneza *et al.*, 2015). La variation du taux des microorganismes sur les raisins en fonction des facteurs climatiques tel que les précipitations et de la température a été prouvée dans l'étude de Renouf (2006). Il a été remarqué que le nombre de levures sur la baie de raisin réduit immédiatement après une précipitation qui peut être expliquer par un processus de dilution et de lavage de la baie du raisin (Renouf, 2006). Par ailleurs, Finkel *et al.* (2011) ont conclu à partir de leur étude sur la population microbienne (bactéries et champignons) colonisatrice des feuilles de l'arbre Tamarix dans la région du Sahara où les conditions climatiques sont les facteurs les plus agissantes sur la variabilité bactérienne, que les bactéries sont en dynamique saisonnière. Cette dynamique a été démontrée encore dans l'étude de Penuelas *et al.* (2012) portée sur les feuilles de Chêne vert (*Quercus ilex*). Ils ont confirmé ainsi la grande influence de la saison sur la diversité des microorganismes dans la phyllosphère.

Les résultats obtenus dans l'étude de la biodiversité de la flore bactérienne phyllosphérique du palmier dattier à travers les saisons, nous laissent suggérées que parmi les facteurs qui peuvent influencer la composition de cette flore, sont les facteurs climatiques.

2. Effet des conditions climatiques sur les taux de la population bactérienne du palmier dattier

Différentes études rapportent que les conditions climatologiques constituent un élément pouvant influencer les populations microbiennes. Les facteurs tels que l'humidité et la température sont reconnus parmi les plus importants pour le développement des microorganismes. Ainsi, l'analyse de nos données sous l'angle des facteurs climatologiques est essentielle pour comprendre l'influence des conditions environnementales sur les communautés microbiennes, voir bactériennes.

L'impact des conditions climatologiques associées à un territoire ou à une région phénécicol sur les populations bactériennes du palmier dattier n'a été jamais constaté dans des travaux précédents. C'est la première étude qui s'intéresse à l'étude de la flore bactérienne du palmier dattier à partir des trois compartiments aériens. La majorité des travaux ont été consacrés à l'étude des dattes grâce à sa grande importance nutritionnelle et économique. Les études ont été portées sur l'identification des caractéristiques physicochimiques de la datte. Dans la majorité des cas, l'étude de la microflore de ce fruit affecte surtout la qualité des dattes après leur stockage, provoquant des détériorations considérables, ce qui engendre des pertes économiques énormes pour les pays producteurs de dattes. On ne néglige pas certaine étude sérieuse sur la fameuse maladie du « elbayoud » (la maladie des feuilles cassante) due à un champignon *Fusarium oxysporum albidinis* spp. qui contamine le palmier dattier et cause directement la mort de 15 millions d'arbres en Algérie et au Maroc (Djerbi, 1991). Cette partie de notre étude est assujettie à la détermination des taux de la population bactérienne cultivable pendant différentes saisons.

Pendant l'hiver, la population bactérienne dénombrée sur le milieu PCA est de l'ordre de 10^6 UFC/g pour les feuilles, 10^7 UFC/g pour les dattes, et 10^8 UFC/g pour les troncs. La flore bactérienne totale pendant le printemps est la même sur les feuilles que sur les troncs (10^7 UFC/g). Les échantillons d'été comptent les unités formant colonies par gramme de l'ordre de $10^4, 10^5, 10^6$ pour les fruits, les feuilles et les troncs respectivement. Pendant l'automne le comptage était $10^6, 10^6, 10^7$ pour les fruits, les feuilles et les troncs successivement (tableau 13).

Tableau 13: Evolution des populations bactériennes dénombrées sur le milieu PCA de différents prélèvements en fonction des saisons.

	Hiver	printemps	Eté	Automne
Fruit	$2.09 \times 10^7 \pm 0.06 \times 10^7$	NF	$7.49 \times 10^4 \pm 0.51 \times 10^4$	$1.30 \times 10^6 \pm 0.09 \times 10^6$
Feuilles	$2.35 \times 10^6 \pm 0.11 \times 10^6$	$2.61 \times 10^7 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.18 \times 10^5 \pm 0.17 \times 10^5$	$2.16 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$
Tronc	$1.95 \times 10^8 \pm 0.06 \times 10^8$	$1.6 \times 10^7 \pm 0.03 \times 10^7$	$1.71 \times 10^6 \pm 0.12 \times 10^6$	$2.85 \times 10^7 \pm 0.23 \times 10^7$

(Les valeurs représentent les moyennes de trois répétitions (n=3) \pm Standard Erreur Moyenne (SEM), NF: non fait).

Le suivi des niveaux de population bactérienne du palmier dattier, pendant les différentes saisons, révèle des différences significatives et non significatives sur la population bactérienne.

- **Les dattes :**

Le dénombrement des microorganismes sur la baie de datte au niveau des différents stades de maturation ou sur les différentes variétés du fruit du palmier dattier a été constaté dans plusieurs études. Cependant, l'étude de l'impact du climat sur la dynamique de ces populations tout au long des saisons de l'année est relativement inconnue. Par conséquent nous avons analysé l'évolution des taux de la population bactérienne au cours les différentes saisons, et qui correspond en parallèle aux différents stades de la maturation.

Les données recueillies lors des comptages sur les dattes du palmier dattier durant les trois saisons étudiés (été, automne, hiver) témoignent des différences significatives sur le niveau de la population bactérienne ($p < 0,05$) (Figure 20). Les résultats de ces dénombrements en été montrent une population initiale de $4,87 \log_{10}$ UFC/g de dattes. L'évolution des niveaux de populations montre une augmentation progressive au cours de l'automne ($6,11 \log_{10}$ UFC/g de dattes) pour atteindre des valeurs maximales en hiver ($7,32 \log_{10}$ UFC/g de datte). Malgré que le taux des bactéries en hiver est supérieure à celui dénombré en automne reste sans aucune différence significative enregistrée ($p > 0,05$) (Figure 20).

Les fortes valeurs enregistrées en hiver et en automne correspondent aux derniers stades de maturation. C'est à dire, au moment de la récolte (mois de novembre pour Deglet-Nour, variété tardive), les dattes supportent une population dénombrable significativement ($p < 0,05$) plus importante.

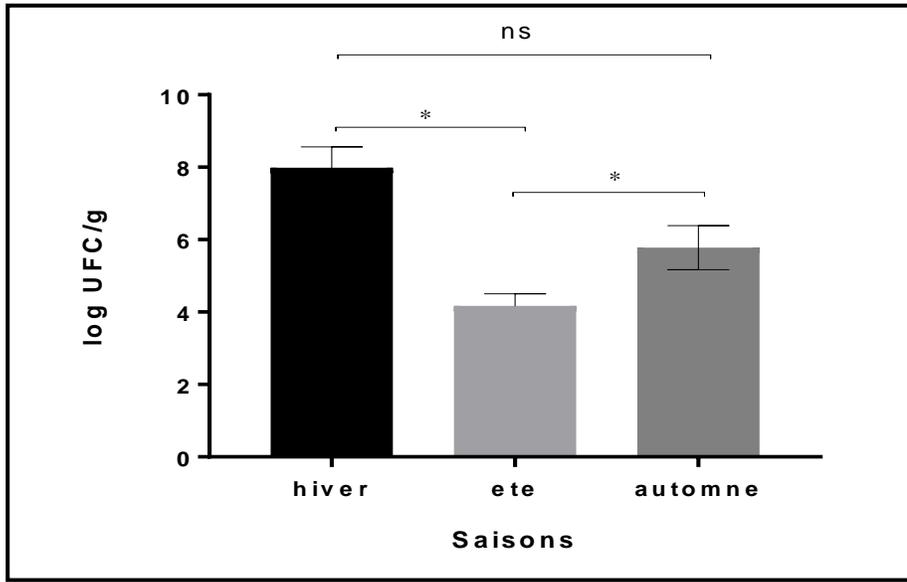


Figure 20: Population bactérienne dénombrée sur les dattes ((ns) : non significatif ($p>0.05$), (*): significatif ($p<0.05$)).

Il devient difficile de mettre en valeur ces constatations vu le manque d'informations sur la qualité microbiologique des dattes qui sont très limitées et plus particulièrement dans les pays producteurs de dattes comme l'Algérie. Le peu des rapports trouvés sur la microbiologie des dattes ont été axés sur la charge microbienne aux différents stades de maturation, ou sur la qualité microbiologique des dattes après une période de stockage sous des conditions stimulées (Al-Shaickly *et al.*, 1986 ; Aidoo *et al.*, 1996; Aljasser, 2010; Hamad *et al.*, 2012; Shenasi *et al.*, 2002 ; Hasnaoui *et al.*, 2010; Umar *et al.*, 2014).

Hamad *et al.* (2012) ont étudié plusieurs variétés de dattes au stade «Rutab » (troisième stade de maturation) pour ses charges microbiennes. Ils ont attribué la différence dans le niveau de la contamination par les bactéries aérobies mésophiles à la différence de la température environnementale. La charge bactérienne a été limitée pendant l'été où la température est très élevée. Cependant elle a été plus importante dans le mois d'octobre où les températures commencent à baisser aidant ainsi la flore mésophile à s'installer en dominant le micro-environnement lié à la surface des dattes (Hamad *et al.*, 2012). De la même manière, Shenasi *et al.* (2002) se sont intéressés au suivi de l'évolution de la microflore des dattes au cours de la maturation. Pour cela, ils ont analysé vingt cinq variétés de dattes durant différents stades de maturation. Ces analyses ont été portées sur la détermination du nombre total des bactéries mésophiles, et d'autres microorganismes. Les prélèvements ont été réalisés aussi bien sur les

dattes fraîches que sur des dattes stockées en conditions d'humidité élevée. Les résultats obtenus montrèrent que le taux de microorganismes était très élevé durant le premier stade de maturation « Kimiri » pour atteindre des valeurs maximales durant le stade de maturation suivant " Rutab " et à décroître à la fin du dernier stade de maturation "Tamar" qu'a le maximum taux en sucre et le minimum d'activité d'eau (AW) et cela indiqua que les caractéristiques physico-chimiques des dattes ont un effet déterminatif sur l'évolution de taux de la flore bactérienne. Selon la même étude, le stockage des dattes sous une humidité relative à 98% a provoqué une augmentation dans la charge microbienne ce qui montre que l'humidité a un effet néfaste sur les dattes en augmentant cette charge. En plus, l'activité de l'eau (Aw) sur la pellicule de datte peut être influencer le développement des bactéries (Hasnaoui *et al.*, 2010). Dans une autre étude Al-Shaickly *et al.* (1980) ont déterminé l'ampleur de la contamination des dattes durant la maturation, ils ont suivi l'apparition de la flore bactérienne sur 4 variétés de dattes irakiennes, ceci leur a permis de constater que la contamination par les bactéries n'étaient pas régulière durant tous les stades de maturation.

Selon ces observations, il semble que les variations dans la population bactérienne des dattes reflètent probablement des changements en caractéristiques physico-chimiques de la datte d'une part et des conditions environnementales d'autre part.

La charge bactérienne des dattes au cours des saisons mentionnées dans le tableau 13, est de l'ordre de $4 \log_{10}$ à $7 \log_{10}$ UFC/g et qui ne sont pas en adéquation avec celle rapportée par Aidoo *et al.* (1996) à Greater Glasgow ($4 \log_{10}$ UFC/g), Aljasser (2010) ($3,69 \log_{10}$ UFC/g), Hamad (2012) ($5 \log_{10}$ UFC/g) en Arabie saoudite et Hasnaoui *et al.* (2010) au Maroc ($2 \log_{10}$ UFC/g). Mais, elle peut être considérée statistiquement proche et satisfaisante en comparaison aux autres fruits analysés pour ses charges bactériennes tels que les raisins (10^7 UFC/g) (Renouf, 2006), les fraises, les framboises et les mûres avec une charge allant de 10^5 à 10^6 (Lund and Snowdon, 2000).

En revanche, les résultats obtenus dans notre recherche ne peuvent être corroborés par la littérature en relation avec le dattier, puisque cette dernière ne concerne que la datte emballée et stockée. La différence variétale des dattes dans les compositions physico-chimiques peut influencer les taux des bactéries à la surface des dattes, comme il a été démontré dans les études précédentes. En outre, la surface des fruits à l'état naturel fournit généralement une très bonne base en nutriments pour les bactéries grâce à leurs dépôts de pollen et des débris organiques. Ces

constituants peuvent être une source additionnelle pour la nourriture des microorganismes ce qui peut être éliminé en post récolte.

Bacillus, *Pseudomonas* et *Enterobacter* constituent les genres les plus identifiés sur les dattes. Beaucoup d'espèces dans ces genres sont considérées comme des vrais résidents car ils sont constamment isolés. Alors que d'autres genres ont été isolés qu'à un temps bien précis de l'année, considérés comme des habitants occasionnels. Selon Blakeman (1985), Cette accession peut être attribué à des conditions climatiques telles que la température, l'humidité et la précipitation ou au changement dans les nutriments disponibles à la surface du fruit indispensable pour le développement des microorganismes. Les paramètres climatiques (température, pluviométrie et humidité) (annexe 2) enregistrées près de la région de prélèvement sont extraits de l'office national de la météorologie (ONM), ont permis de tracer les courbes suivantes :

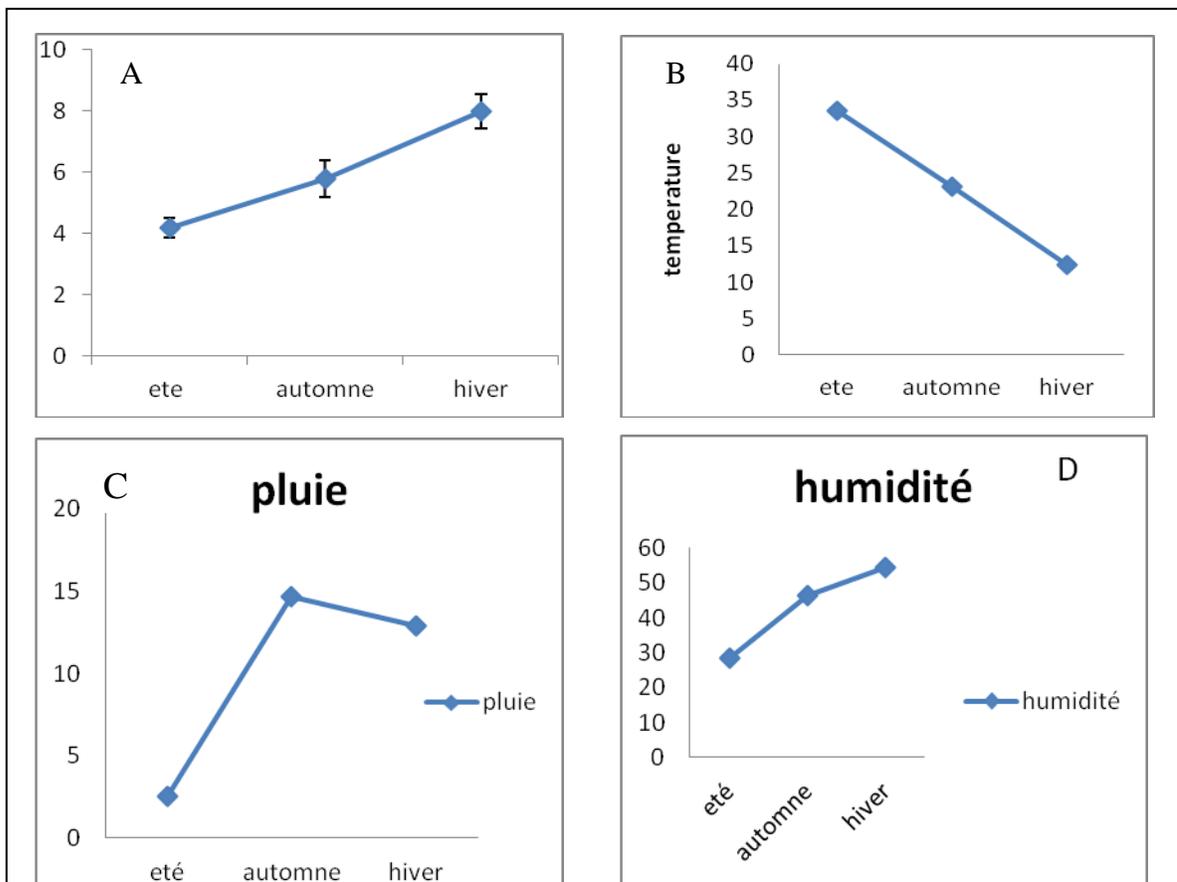


Figure 21: A : Evolution de la charge de la population bactérienne sur les dattes ; B,C,D : Les moyennes de la température, la pluie et l'humidité saisonnières enregistrées dans la région du tolga en 2012.

En comparant le comportement de l'évolution du nombre des bactéries avec ces paramètres climatiques, on peut ressortir les points suivants :

- Plus la température est élevée plus le nombre des bactéries est réduit.
- Plus le taux de l'humidité augmente, plus le nombre de bactéries augmente.
- La quantité de la pluie en automne a été maximale, le taux des bactéries a été très élevé en l'hiver (maximum), Cependant la différence enregistrée entre le taux de bactéries pendant les deux saisons n'a aucune signification.

Selon ces observations, il semble que les facteurs climatiques ont un effet sur la dynamique de la population bactérienne du palmier dattier. Pour cela, on a constaté que la saison fraîche et humide favorise le développement des microorganismes par rapport à la saison chaude et sèche. La pluie et l'humidité ont un effet promoteur sur le développement des bactéries, cependant la température à un effet néfaste en inhibant la croissance des bactéries lorsqu'elle est assez élevée.

L'effet de la saison ou des facteurs météorologiques sur la diversité et la dynamique de la flore bactérienne phyllosphérique a été décrit précédemment par plusieurs auteurs qu'ont étudiés d'autres fruits (Horz *et al.* , 2004, Renouf, 2006 ; Martins *et al.*, 2012, 2013). Plusieurs constatations ont montré que la présence d'eau à la surface des fruits lors de pluies, favorise la prolifération des microorganismes épiphytiques, alors que les mêmes baies soumises à des périodes de sécheresse montrent une diminution de la microflore épiphytique (Martins *et al.*, 2013). Cependant la pluie agit parfois comme un facteur limitant dans les régions pluviométriques (Renouf, 2006).

- **Les feuilles :**

L'analyse des feuilles du palmier dattier a révélé un effet significatif du climat sur la population bactérienne des feuilles ($p < 0.001$). L'augmentation a été hautement significative durant le printemps par rapport à l'hiver ($p < 0.001$), et qui est diminuée significativement pendant l'été ($p < 0.001$). Au cours de l'automne, elle a commencé à augmenter significativement ($p < 0.001$), cependant aucune différence palpable n'a été enregistré entre l'hiver et l'automne ($p > 0.05$) (Figure 22). Elle atteint la valeur maximale pendant le printemps et la valeur minimale a été enregistrée en été.

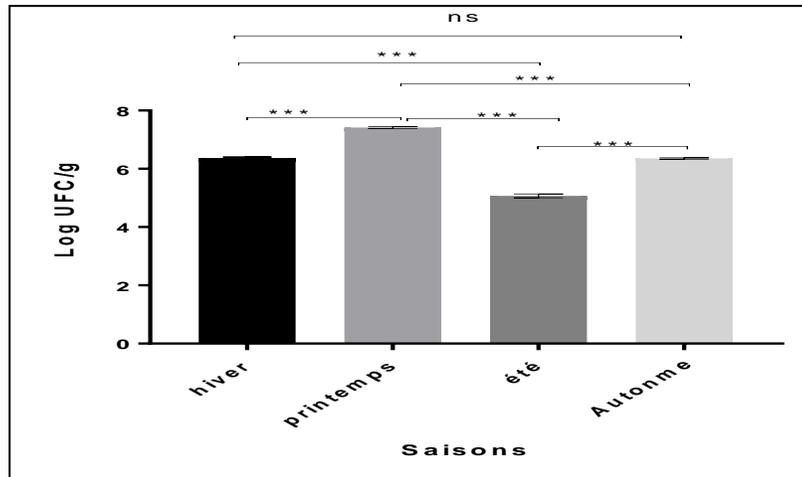


Figure 22: Population bactériennes dénombrées sur les feuilles (ns : non significative ; *** : hautement significative (p<0.001)).

La charge bactérienne de la phyllosphère de feuilles évaluées dans notre étude est de $1,18 \times 10^5$ à $2,61 \times 10^7$ UCF/g, qui est comparable à celle du niveau de colonisation de la phyllosphère de la laitue (4×10^5 à 5×10^6 UCF/g) (Hunter *et al.*, 2010). D'autres études ont révélé un taux de population inférieure à nos résultats et qui était de $1,7 \times 10^4$ CFU/g à $3,4 \times 10^5$ UCF/g (Ercolani, 1991). La densité de la population bactérienne épiphyte reportée dans d'autre étude sur une gamme de plantes a été évaluée entre 10^4 à 10^8 UCF/g (Morris et Kinkel, 2002) et entre 10^6 à 10^8 UCF/g (Beattie et Lindow, 1995; Andrews et Harris, 2000; Hirano et Upper, 2000), jusqu'à un niveau non détectable à $1,4 \times 10^7$ UFC/g (Yadav *et al.*, 2004).

En outre, la faible valeur du taux de la population bactérienne a été enregistrée en Été. Les résultats de nombreuses études portées sur des plantes sauvages et cultivées ont montré les mêmes observations (Daniel et Boher, 1978; Lindow, 1986 ; Yadav *et al.*, 2004 ; Penuelas *et al.*, 2012). Sauf pour quelques études qui ont révélé des fluctuations saisonnières dans le taux de bactéries (de 10^7 à 10^9 UFC/g) mais un maximum du nombre dans les mois d'été (Dickinson *et al.*, 1975). Cependant, l'étude portée sur la population bactérienne phyllosphérique de Mango au sud d'Afrique ne montre pas de différences significatives dans le taux des bactéries à travers les différentes saisons (de Jager *et al.*, 2001).

On constate que nos résultats sont statistiquement proches de celles des études mentionnées au-dessus et les variations entre les résultats peuvent être attribuées à la différence entre les plantes et les arbres étudiés. En outre, la prédiction de la biodiversité d'un écosystème

donné est basée sur les méthodes et les moyens mises à disposition afin de bien déterminer et quantifier cette diversité.

Les résultats de plusieurs études basées sur des méthodes traditionnelles et moléculaires, ont montré que plusieurs facteurs peuvent influencer la taille et la nature de la communauté bactérienne de la phyllosphère. Les caractéristiques de l'espèce de la plante hôte (Redford *et al.*, 2010; Vokou *et al.*, 2012 ; Ding *et al.*, 2013), l'âge et les conditions physiologiques des feuilles (Dickinson, 1986 ; McBride et Hayes, 1977 ; Yadav *et al.*, 2011), l'ensemble des conditions climatiques (Crosse, 1965; Last et Deighton, 1965; Jensen, 1971; Dickinson, 1975 ; Ercoloni, 1991 ; Thompson *et al.*, 1993 ; Legard *et al.*, 1994; Yadav *et al.*, 2004) et la région géographique (Finkel *et al.*, 2011; Rastogi *et al.*, 2012; Qvit-Raz *et al.*, 2012) ont été identifiés comme des facteurs agissant directement sur la colonisation de la phyllosphère par les microorganismes.

Les évolutions saisonniers enregistrées dans notre étude semble être agréée avec les résultats de nombreuses études effectuées sur les populations microbiennes des parties aériennes de plusieurs plants. Ils a été conclu que les communautés bactériennes sont en dynamique saisonnier (Dickinson *et al.*, 1975 ; Ercoloni, 1991 ; Thompson *et al.*, 1993). Dickinson (en étudiant la population bactérienne de ray-grass « *Lolium perenne* »), Ercoloni (en étudiant les feuilles d'olivier « *Olea europaea L.*») et Thompson et al. (En étudiant les feuilles de betterave à sucre « *Beta vulgaris* ») ont attribué les majeurs fluctuations dans la population bactérienne aux données météorologiques telles que la température et la précipitation.

En plus, l'étude de la microflore des feuilles de l'arbre "Tamarix" dans la région du Sahara ou conditions climatiques dans les différentes régions géographiques sont les facteurs les plus importants, agissent sur la variabilité en microorganismes que d'autres paramètres (Finkel *et al.*, 2011). Ils ont trouvé que les communautés microbiennes sur les feuilles de différentes espèces de l'arbre Tamarix ont été hautement similaires dans le même étage bioclimatique, cependant des arbres appartenant à la même espèce cultivée dans différent étage bioclimatiques ont été colonisée par des communautés microbiennes distinctes (Finkel *et al.*, 2011). Ces résultats ont été valorisés par Qvit-Raz *et al.* en 2012 qui ont confirmé le rôle principale de la localisation géographique de la plante hôte dans la détermination de la composition des populations microbiennes.

Selon ces résultats et les résultats obtenus dans notre étude, il apparaît que les paramètres climatiques sont parmi les facteurs qui agissent sur la structure et la dynamiques des

communautés microbiennes et on peut conclure que la population bactérienne de la phyllosphère du palmier dattier diffère remarquablement dans la taille et la composition temporairement sur la même plante, et se distingue entre différentes parties du plant dans le même espace.

- **Le tronc :**

L'analyse de l'évolution de la population bactérienne sur le tronc du palmier dattier révèle une variabilité généralement significative des populations bactériennes en fonction des saisons de prélèvement ($p < 0.001$, $p < 0.01$) (Figure 23). Les troncs en hiver supportent une population significativement plus importante que les autres saisons. En été, le taux de bactéries a plus faible valeur. La variabilité enregistrée entre le printemps et l'automne ne permet pas d'attribuer un poids statistique à cette évolution ($p > 0.05$).

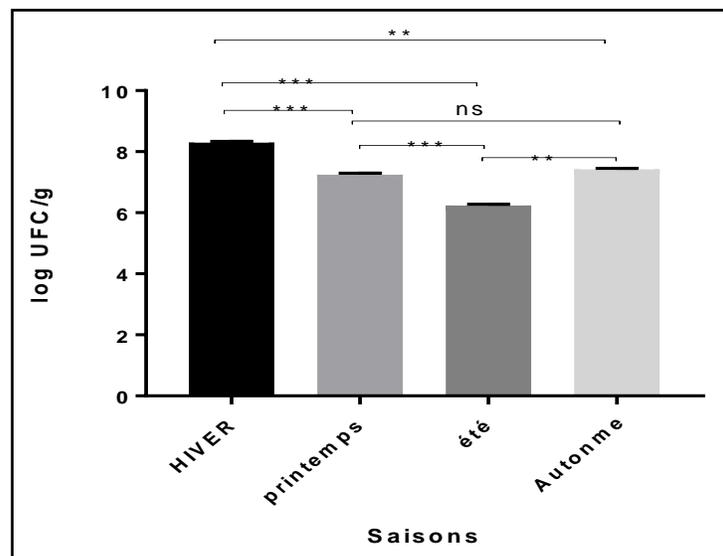


Figure 23: Population bactérienne dénombrée sur les troncs (ns : non significative ($p > 0.05$); ** : très significative ($p < 0.01$); *** : hautement significative ($p < 0.001$)).

En comparant les résultats des dénombrements sur les trois compartiments du palmier dattier on trouve que le taux des bactéries était en plus grand en hiver et plus faible en été. A cet effet, on peut dire que le comportement (structure, densité) de ces bactéries était significativement différent d'une saison à l'autre malgré les différences physicochimiques entre les trois parties du palmier dattier.

Sur les trois parties du palmier et à travers la même saison de prélèvement, de différences significatives et non significatives dans les niveaux de populations bactériennes ont été

enregistrées ($p>0.05$, $p<0.05$, $p<0.001$). Le taux de la flore bactérienne totale sur les différents compartiments pendant l'hiver a été en plus grand quantité sur le tronc avec une différence hautement significative ($p<0.001$) entre le tronc et les feuilles et aucune différence significative ($p>0.05$) a été enregistrée entre les dattes et les troncs (Figure 24). Pendant le printemps aucune différence significative ($p>0.05$) a été enregistrée entre les troncs et les feuilles (Figure 25). Le niveau de la population bactérienne sur les troncs pendant l'été a été significativement supérieure à celles des feuilles ($p<0.001$) et des dattes ($p<0.05$) (Figure 26). De même en automne, une différence hautement significative a été observé entre les feuilles et les troncs du dattier ($p<0.001$), cependant aucune différence significative a été enregistrée entre les troncs et les dattes d'une part, et entre les dattes et les feuilles d'autre part ($p>0.05$) (Figure 27).

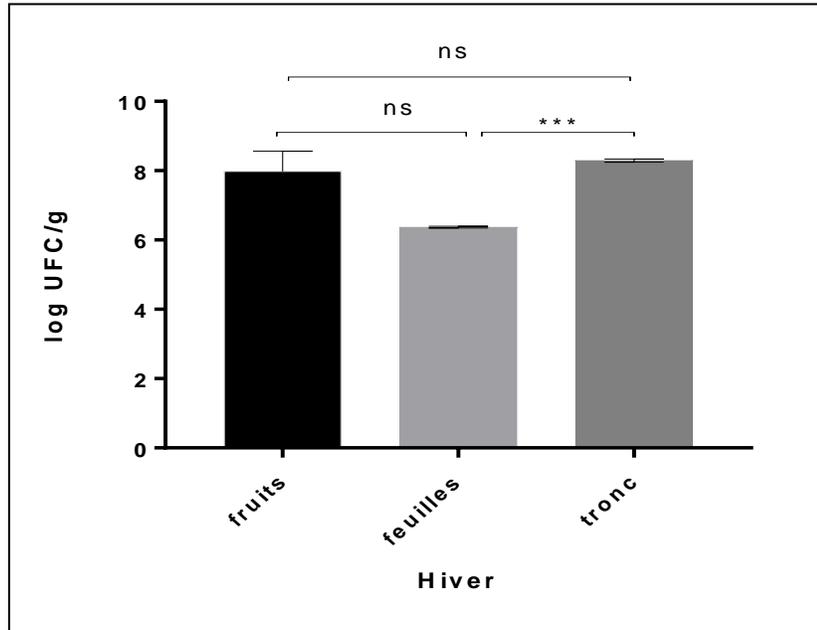


Figure 24: Flore bactérienne dénombrée pendant l'hiver sur les différents compartiments.

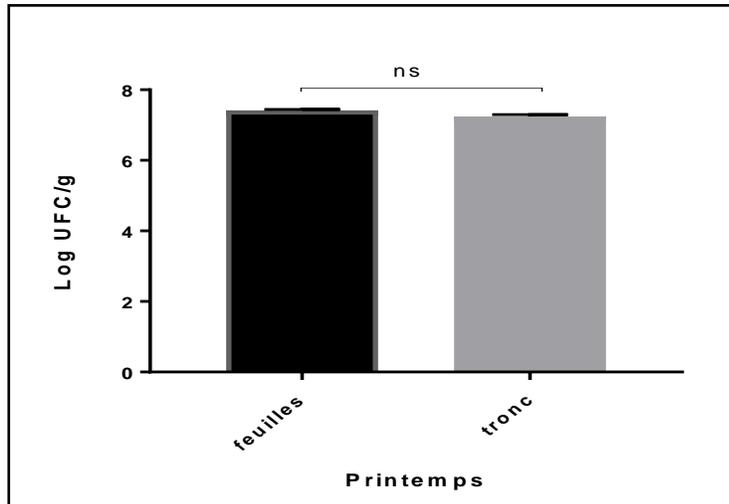


Figure 25: Flore bactérienne dénombrée pendant le printemps sur les différents compartiments.

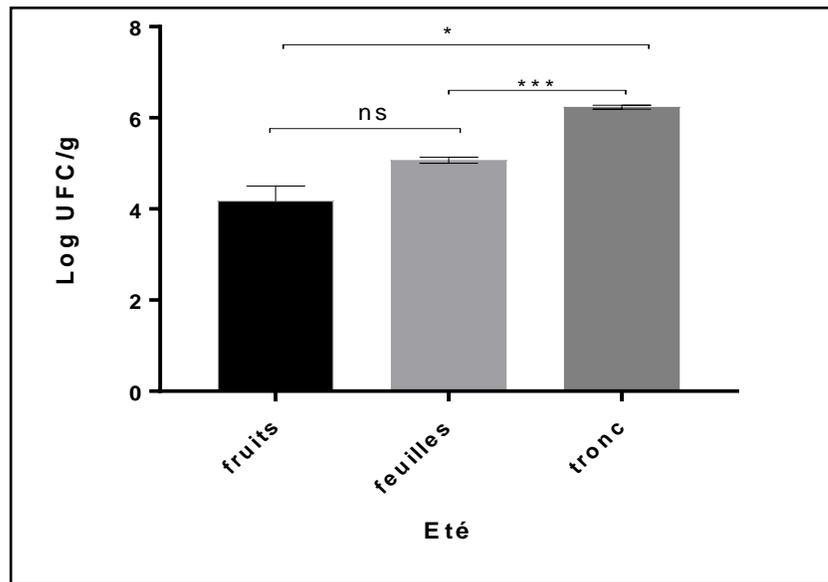


Figure 26: Flore bactérienne dénombrée pendant l'été sur les différents compartiments.

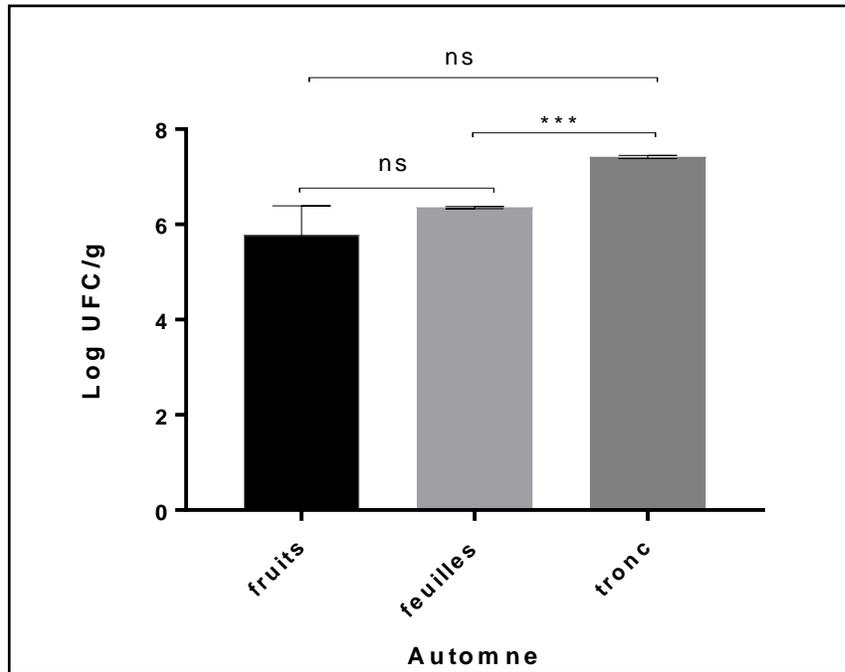


Figure 27 : Flore bactérienne dénombrée pendant l'automne sur les différents compartiments.

Conclusion générale

L'objectif principal de cette étude est de décrire relativement la biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier et d'étudier l'évolution de cette flore à travers les différentes saisons. Cette présente étude est menée dans un site représente l'étage bioclimatique saharien du Sud-Est algérien.

Une population bactérienne diverse tapisse la surface des troncs, des dattes, et des feuilles du palmier dattier. Elle varie selon les saisons et les différents compartiments de l'arbre. Au totale, 33 espèces appartenant à 16 genres ont été identifiées.

L'identification des espèces par les méthodes phénotypiques et moléculaires (l'amplification de gène d'ARNr 16S), révèle que les genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* dominant nettement les différents prélèvements. D'autres genres sont également présents mais ils sont moins nombreux.

La détermination des taux des bactéries montre des variations saisonnières. La population bactérienne du palmier dattier est estimée par une valeur maximale pendant la saison hivernale sur les trois compartiments de l'arbre (environ 10^6 - 10^8 UFC/g du matériel végétale) et elle est de l'ordre de 10^4 - 10^6 UFC/g pendant la saison d'été, qui nous laisse suggérer que les facteurs climatiques ont un rôle principal dans l'obtention de ces résultats. L'évolution de la population sur les dattes peut être influencée aussi par les modifications de la composition physico-chimique au cours du développement du fruit.

Les présents résultats mettent en évidence aussi la possibilité de l'existence d'une interaction entre les populations bactériennes au niveau des différents compartiments du palmier dattier.

Cependant, cette étude permettrait mieux l'approfondissement de nos connaissances dans le domaine de l'écologie microbienne. D'abord ces résultats doivent être confirmés par des investigations sur d'autres champs et d'autres régions géographiques du grand Algérie. Ensuite, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour étendre ces observations et explorer l'interaction écologique entre ces différents écosystèmes.

Encore, l'utilisation de la PCR du gène d'ARNr 16S pour la caractérisation des isolats ait des limitations et qui doivent souvent être associées à d'autres techniques moléculaires comme l'hybridation ADN-ADN pour mieux caractériser les isolats nouvellement identifiées.

Enfin, le travail présenté dans cette thèse, a donné et pour la première fois en Algérie une idée globale sur la diversité bactérienne du palmier dattier accessible par les méthodes utilisées et mise en évidence de l'impacte du climat sur la dynamique de cette flore. Mais, il est à signalé que les résultats obtenus dépend de la méthode utilisée et les paramètres à étudier. Pour cela, nous suggérons d'utiliser dans les prochains travaux d'autres approches moléculaires indépendantes de la culture de type métagénomique qui permettrait de présenter une étude complète sur l'écologie bactérienne cet arbre et dépasser certaines limites inhérentes à la description de la biodiversité dans sa globalité.

Abekhti, A., Zarour, K., Boulal, A., Benmechernene, Z., et Kihal, M. (2013). Evaluation of Microbiological Quality of the Date Fruit Product “ Btana ” Produced in Adrar South Algeria, *Journal of Microbiology Research*; **3**(5): 163–170.

Agoudjil, B., Benchabane, A., Boudenne, A., Laurent Ibos, M. F. (2011). Renewable materials to reduce building heat loss: Characterization of date palm wood. *Energy and Buildings* ; **43**(2-3): 49–497.

Alain, K. (2003). Approches culturelles et moléculaires des assemblages microbiens associés aux polychètes hydrothermaux de la famille alvinellidae. Thèse de doctorat, pp 249.

Al-daihan, S., Bhat, R. S. (2012). Antibacterial activities of extracts of leaf , fruit , seed and bark of Phoenix dactylifera. *African Journal of Biotechnology*; **11**(42): 10021–10025.

Al-Hooti, S., Quabazard, H. (1998). Chemical composition of seeds date fruit cultivars of United Arab Emirates. *Tech*; **35**:44-46.

Al jasser, M. S. (2010). Effect of storage temperatures on microbial load of some dates palm fruit sold in Saudi Arabia market. *African Journal of Food Science*; **4**(6): 359–363.

Al Qroom, R., Al Momani, W.M. (2014). A comparative study of the in vitro antibacterial activity of endocarp, date palm tissue and date palm. *International journal of pharmaceutical sciences and research*; **5**(7): 2900-2903.

Al -Shaikly, M. A. S., Al Dulaimi, A. (1986). Types of extent of microbial contamination in fresh iraqi dates during maturation. *The date palm*; **4**(2): 205-220. In : Arfa, D.(2008). Suivi des Caractéristiques Microbiologiques et Physico-chimiques des Jus des Dattes Conservés par Irradiation Gamma. Rapport de projet de fin d'études.

Al-sheikh, H. (2009). Date-Palm Fruit Spoilage and Seed-Borne Fungi of Saudi Arabia. *Research Journal of Microbiology*; **4**(5): 208-213.

Amann, R. I., Ludwig, W., et Schleifer, K. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological reviews*; **59**(1): 143–169.

Anderson, I. C., Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities : increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*; **6**(8): 769–779.

Andrews, J. H. (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathol*; **30**:603-635.

Andrews, J.H., Harris, R.F. (2000). The ecology and biogeography of micro-organisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*; **38**: 145–180. In: Newton, A.C., Gravouil, C., Fountaine, J.M. (2010). Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. *Annals of Applied Biology*.

Aspasia, A., Nisiotou, A., Kalliopi Rantsiou, B., Vassilios Iliopoulos, A., Luca Cocolin, B.(2011). Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *International Journal of Food Microbiology*; **145**: 432-436.

Atlas, RM, Sayler, G., Burlage, RS., Bej, A.K. (1992). Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *BioTechniques*; **12**: 706–717.

Ausubel, F.M., Brent R., Kingston, R.E., Moor, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A et al. (1987). Current protocols in molecular biology. *Wiley Inter Science*, **1**: chapitre 1.2.1.

Barreveld, W. H., (1993). Date palm products. Agricultural Services Bulletin. N° 101. FAO, Rome, Italy. In Gourchala, F. (2015). Caractérisation physicochimique, phytochimique et biochimique de cinq variétés de dattes d’Algérie, Phoenix dactylifera L. (Deglet noor, Ghars, H’mira, Tamesrit et Tinissine). Effets de leur ingestion sur certains paramètres biologiques (Glycémie, profil lipidique, index glycémique et pression artérielle).

Beattie, G. A., Lindow, S. E. (1995). The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annals.Rev.phytopathol*; **33**: 145-172.

Bell, C. W., Acosta-martinez, V., Mcintyre, N. E., Cox, S., Tissue, D. T., et Zak, J. C. (2009). Linking Microbial Community Structure and Function to Seasonal Differences in Soil Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. *Microb Ecol*; 827–842.

Bent, S. J., et Forney, L. J. (2008). The tragedy of the uncommon : understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology*; 1-7.

Benziouche, S.E., Chehat, F. (2010). La Conduite du Palmier Dattier Dans les Palmeraies des Zibans (Algérie) Quelques éléments d'analyse. *European Journal of Scientific Research*,**42**(4) : pp.644-660.

Berg, G., Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*; **68**: 1–13.

Bertilsson, S., Eiler, A., Nordqvist, A., Ole, N., Jørgensen, G. (2007). Links between bacterial production, amino-acid utilization and community composition in productive lakes. *International Society for Microbial Ecology*; 1: 532–544.

Blakeman, J.P. (1985). Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: Whipps, J.M., Hand, P., Pink, D., Bending, G.D.(2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*; **105**:1744-1755.

Bosshard,P.P., Zbinden, R, Abels, S., Boddingtonhaus, B., Altwegg, M., Bottger, E.C.(2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*; 4134- 4140.

Bougeudoura, N., Bennaceur, M., Benkhalifa, A. (2008). Biotechnologies du palmier dattier. IRD Éditions ; **1**: 1689-1699.

Bruns, A., Cypionka, H. (2002). Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Applied and environmental microbiology*; **68**(8): 3978–3987.

Butenschoen, O., Scheu, S., Eisenhauer, N. (2011). Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*; **43**(9): 1902-1907.

Carroll, K., Weinstein, M. (2007). Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: Murray, P.R. Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. eds. Manual of clinical microbiology 9th ed. Washington, DC. *American Soc. Microbiol*; 192-217.

Chamier, A. C. (1987). Effect of pH on microbial degradation of leaf litter in seven streams of the English Lake District; **71**(4): 491–500.

Christian, J. (1980). Reduced water activity. Microbial ecology of foods. *Academic Press, London*.

Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K. (2003). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **167**(1): 29-43.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. E. A. B. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. **71**(9): 4951–4959.

Connon, S. A., Giovannoni, S. J. (2002). High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and environmental microbiology* ; **68**(8): 3878–3885.

Crosse, J. E. (1965). Bacterial canker of stone fruits. VI. Inhibition of leaf scar infection of cherry by a saprophytic bacterium from the leaf surfaces. *Annals of Applied Biology*, **56**: 149-160. In: Dickinson, C. H., Austin, B., Goodfellow, M. (1975). Quantitative and Qualitative Studies of Phylloplane Bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*; **91**: 157–166.

Dahllof, B., Ingela, H., Kjelleberg, S. (2000). rpoB -Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and environmental microbiology* ; **66**(8): 3376–3380.

Dakkiche, S. (2017). Diversité taxonomique et moléculaire des rhizobiums nodulant le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), dans l'Est Algérien. Thèse de doctorat.

- Daniel, J., Boher, B. (1978).** Ecology of cassava bacterial blight epiphytic survival of *Xanthomonas manihotis* on aerial parts of the cassava plant. In station de pathologie Végétale et Phytobactériologie, Proceedings of the International Conference on Plant Pathology and Bacteria, fourth ed. *Institute of National Research on Agriculture*; 763–771. In: Yadav, R. K. P., Halley, J. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I., Vokou, D. (2004). Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany*, **52**(1): 63–77.
- Dauga, C., Doré, J., Sghir, A. (2005).** La diversité insoupçonnée du monde microbien. *Medecine/sciences* ; **21**(3): 290-296.
- Davis, K. E. R., Joseph, S. J., Janssen, P. H. (2005).** Effects of Growth Medium , Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteri. *Applied and environmental microbiology* ; **71**(2): 826–834.
- De Jager, E.S., Wehner, F. C., Korsten, L. (2001).** Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microb.Ecol*; **42**: 201-207.
- Dickinson, C. H., Austin, B., Goodfellow, M. (1975).** Quantitative and Qualitative Studies of Phylloplane Bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*; **91**: 157–166.
- Ding, T., Palmer, M. W., Melcher, U. (2013).** Community terminal restriction fragment length polymorphisms reveal insights into the diversity and dynamics of leaf endophytic bacteria. *Bmc microbiology*; **13**(1): 1–11.
- Dellinger, B., Graça, M. S., Casal, M., Schuller, D. (2006).** Identification of wine related yeast species by capillary electrophoresis single- strand conformation polymorphism Analysis (CE-SSCP) of the 26s rRNA Gene.
- Djerbi, M. (1991).** Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Voies de propagation des clones résistants au bayoud et de haute qualité dattière. *CIHEAM - Optione Mediterraneennes*; **14**: 31–38.

DeLong, E. F., Preston, C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Karl, D. M. (2006). Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Research articles*; **311**: 496-503.

De Vos, C. R., LUBBERDING, H. J., BIENFAIT, H. F. (1986). Rhizosphere Acidification as a Response to Iron Deficiency in Bean Plants. *Plant Physiol*; **81**:842-846.

Dihazi, A., Jaiti, F., Jaoua, S., Driouich, A. (2012). Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology et Biochemistry* ; **55**:7–15.

Doare´-Lebrun E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L. , Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M. (2006). Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology*; **101**: 1340-1350.

Dorigo, U.,Volatier, L., Humbert, J.F. (2005). Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research*; **39**: 2207–2218.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral. J.P., Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*; **38**: 3623–3630.

Dunbar, J., Ticknor, L. O., Kuske, C. R.(2001). Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. *Applied and environmental microbiology*; **67**(1): 190–197.

El Hadrami, A., Al-Khayri, J. M. (2012). Socioeconomic and traditional importance of date palm. *Emirates Journal of Food and Agriculture*; **24**(5): 371–385.

El Hadrami, I., El Hadrami, A.(2009). Breeding date palm. 191-121.

El Hassni, M., El Hadrami, A., Daayf, F., Cherif, M., Ait Barka, E., El Hadrami, I. (2006). Biological control of bayoud disease in date palm : Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and experimental botany*.

- Ellis, R. J., Thompson, I. P., Bailey, M. J. (1999).** Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microbiology Ecology*; **28**(4): 345–356.
- Ercolani, G. L. (1991).** Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microbial Ecology*; **21**(1): 35–48.
- Felsenstein J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*; **39**: 783–791.
- Finkel, O. M., Burch, A. Y., Lindow, S. E., Post, A. F., Belkin, S. (2011).** Geographical Location Determines the Population Structure in Phyllosphere Microbial Communities of a Salt-Excreting Desert Tree. *Applied and environmental microbiology*; **77**(21): 7647–7655.
- Flemming, C. A., Ferris, F. G., Beveridge, T. J., Bailey, G. W. (1990).** Remobilization of Toxic Heavy Metals Adsorbed to Bacterial Wall-Clay Composites; **56**(10): 3191–3203.
- Fox, G. E., Pechman, K. R., Woese, C. R. (1977).** Comparative Cataloging of 16s Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics. *International journal of systematic bacteriol*; **27**(1):44-57.
- Freya, J.C., Angertb, E. R., Pell, A. N. (2006).** Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of microbiological methods*; **67**(1): 9-19.
- Friedrich v. Aintzingerode, UIF B. Gobel, E. S. (1997).** Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology*; **21**:213-229.
- Garland, J. A. Y. L., Mills, A. L. (1991).** Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Applied and environmental microbiology* ; **57**(8): 2351–2359.
- Gauzere, C. (2012).** Caractéristation de la diversite microbienne de l’air des espaces clos. These de doctorat. Universite Montpellier ii.

- Gelsomino, A., Keijzer-wolters, A. C., Cacco, G., Elsas, J. D. V. (1999).** Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of microbiological methods*; **38**:1-15.
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Peter, J., Samuel, B. S., Nelson, K. E. (2011).** Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *NIH Public Access*; **312**(5778):1355–1359.
- Giller, P. S., Hillebrand, H., Berninger, U., Gessner, M. O., Hawkins, S., Inchausti, P., et al. (2004).** Biodiversity effects on ecosystem functioning : emerging issues and their experimental test in aquatic environments, **104**:423-436.
- Giovannoni, S.J, Britschgi, T. B., Moyer, C. L., Field, K. G. (1990).** Genitic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Letters to nature*; **345**:60-63.
- Glick, B. R. (2003).** Phytoremediation : synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* :**21**;383-393.
- Grayston, S.J.,Wang, S., Campbell, C. D., Edwards, A. C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere.*Soil Biol.Biochemi*; **30**(3): 369-378.
- Grube, M., Schmid, F., Berg, G. (2011).** Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*: **115**(10);978–986.
- Guerrero, R., Alex, M.(2002).** Microbial ecology comes of age. *Int Microbiol*; 157-159.
- Gutell, R. R., Larsen, I. N., Woese, C. R. (1994).** Lessons from an Evolving rRNA : 16S and 23S rRNA Structures from a Comparative Perspective. *Microbiological reviews*; **58**(1):10-26.
- Hall, E. K., Neuhauser, C., Cotner, J. B. (2008).** Toward a mechanistic understanding of how natural bacterial communities respond to changes in temperature in aquatic ecosystems. *The ISME journal*; 1–11.
- Hall, L., Doerr, K.A., Wohlfiel, S.L., Roberts, G.D. (2003).** Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol*; **41**: 1447–1453.

- Hamad, S. H., Saleh, F. A., Al-Otaibi, M. M. (2012).** Microbial Contamination of Date Rutab Collected from the Markets of Al-Hofuf City in Saudi Arabia. *The Scientific World Journal*, 1–4.
- Handelsmanl, J., Rondon, M. R., Goodman, R. M., Brady, S. F., Clardy, J. (1998).** Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *chemistry and biology*; **5**(10):245-249.
- Hasnaoui, A., Elhoumaizi, M. A., Asehraou, A., Sindic, M., Deroanne, C., Hakkou, A. (2010).** Chemical composition and microbial quality of dates grown in Figuig oasis of Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*; **12**(2): 311–314.
- Hayashi, K. (1991).** PCR-SSCP : A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the genomic DNA. *Genome Res*; **1**:34-38.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. (1998).** Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol*; **35**:1–21.
- Hernan-Gomez, H., Espinosa, J.C. , Ubeda, J. F. (2000).** Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS microbiology letters*; **193**:45-50.
- Hildebrand, D.C.(1988).** Pectate and pectin gel for differentiation of Pseudomonas sp. And other bacterial plant pathogens. *Phytopathol*; **61**: 1430-1439.
- Hill, G. T., Mitkowski, N. A., Aldrich-wolfe, L., Emele, L. R., Jurkonie, D. D., Ficke, A. (2000).** Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities, *Applied Soil Ecology*; **15**: 25-36.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (2000).** Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on Pseudomonas syringae a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*; **64**(3): 624–653.
- Hojati, M., Azizi, M. H. (2005).** Microflora of important date palm fruits varieties in khuzestan. *Iranian journal of food science and technology*; **2**(2): 29-37.

Horz, H., Barbrook, A., Field, C. B., Bohannon, B. J. M. (2004). Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *PNAS*; **102**(42): 15136–15141.

Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*; **3**(2): 1-8.

Hunter, P. J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J. M., Bending, G. D. (2010). Both Leaf Properties and Microbe-Microbe Interactions Influence Within-Species Variation in Bacterial Population Diversity and Structure in the Lettuce (*Lactuca* Species) Phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*; **76**(24): 8117–8125.

I.A., Ahmed, R.K., Robinson, (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, **66**(3): 307–312.

Idris, R., Trifonova, R., Puschenreiter, M., Wenzel, W. W., Sessitsch, A. (2004). Bacterial Communities Associated with Flowering Plants of the Ni Hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*, *Applied and environmental microbiology*; **70**(5): 2667–2677.

Insam, H. (1997). A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insam, H, and Ragger A. (eds.) *Microbial communities: functional versus structural approache*, pp 259-260.

Jackson, C. R., Denney, W. C. (2011). Annual and Seasonal Variation in the Phyllosphere Bacterial Community Associated with Leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microb Ecol*; **61**: 113–122.

Janda, J.M., Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*; **45**: 2761– 2764.

Jensen, V. (1971). The bacterial flora of beech leaves. In Ecology of Leaf Surface Microorganisms, pp. 463-469. Preece, T. F., Dickinson C. H.. *London and New York: Academic Press*.

In **Dickinson, C. H., Austin, B., Goodfellow, M. (1975).** Quantitative and Qualitative Studies of Phylloplane Bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*; **91**: 157–166.

Joynson, R., Swamy, A, Aranega Bou, P., Chapuis, A., Ferry, N. (2014). Characterization of cellulolytic activity in the gut of the terrestrial land slug *Arion ater*: Biochemical identification of targets for intensive study. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*; **177–178**: 29–35.

Kadivar, H., Stapleton, A. E. (2003). Ultraviolet Radiation Alters Maize Phyllosphere Bacterial Diversity. *Microbial Ecology* ; **45**(4): 353-361.

Kareche, A. (2014). Étude des matériaux à base de bois de palmier dattier : durabilité, dégradation et propriétés structurales et de transfert. Mémoire de magister.

Kerstiens, G. (1996). Cuticular water permeability and its physiological significance. *Journal of experimental botany*; **47**(305), 1813–1832.

Kinkel, L.L., Andrews, J.H., Berbee, F.M., Nordheim, E.V. (1987). Leaves as islands for microbes. *Oecologia*; **71**: 405–408. In Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations.

Kiratisin, P., Li, L., Murray, P. R. et Fischer, S. H. (2003). Identification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; **22**: 628-631.

Kofi, E. A. ,Tester R.F., Morrison J.E., MacFarlane D. (1996). The composition and microbial quality of pre-packed dates purchased in Grater Glasgow. *International Journal of Food Science and Technology* ; **31**(1): 433–438.

Kopke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H., et Sass, H. (2005). Microbial Diversity in Coastal Subsurface Sediments : A Cultivation Approach Using Various Electron Acceptors and Substrate Gradients. *Applied and Environmental Microbiology*; **7**(12): 7819–7830.

Kurokawa, k.,Takehiko, I., kurokawa, T., Oshima, K.,Toh, H., Toyoda, A. et al. (2007). Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. *DNA research*; **14**: 169-181.

Kwok, A.Y., Chow, A.W. (2003). Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*; **53**: 87–92.

Kwok, A.Y., Su, S.C., Reynolds, R.P. et al. (1999). Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int J Syst Bacteriol*; **49** (3): 1181–1192.

Laforgue, R., Guerin, L., Pernelle, J.J., Monnet, C., Dupont, J. , Bouix, M. (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of applied microbiology*; **107**: 1208–1218.

Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Rodrigues, R. R. (2006). Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. *Science AAAS*; 6-16.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J.-C., Bouizegarène P. et M. Bogard (2008). Immuno-analyse et biologie spécialisée. *Elsevier Masson* ; **23**: 260-279.

Landa, B. B. (2004). Influence of temperature on plant rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea. *Plant pathology*; **53**: 341–352.

Larpent, J.P., Sanglier, J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris.

Last, F. T., Deighton, F. C. (1965). The non-parasitic microflora on the surface of living leaves leaves. *Transactions of the British Mycological Society* 49, 83-99. In Dickinson, C. H., Austin, B., Goodfellow, M. (1975). Quantitative and qualitative studies of phylloplane bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*; **91**: 157–166.

Lee, D., Zo, Y.J., Kim, S.J. (1996). Nonradioactive Method To Study Genetic Profiles of Natural Bacterial Communities by PCR – Single-Strand-Conformation Polymorphism. *Applied and environmental microbiology*; **62**(9), 3112–3120.

Legard, D. E., McQuilken, M. P., Whipps, J. M., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Thompson, I. P., Lynch, J. M. (1994). Studies of seasonal changes in the microbial populations on the phyllosphere of spring wheat as a prelude to the release of a genetically modified microorganism. *Agriculture, Ecosystems & Environment*; **50**(2): 87–101.

Lehmana, R. M., Colwell, F. S., Ringelberg, D. B., White, D. C. (1995). Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *Journal of microbiological methods*; **22**:263-281.

Leistner, L., Rodel, W.(1975). The significance of water activity for microorganisms in meats. In: Duckworth, R.B. (ed.), *Water Relations in Foods. Academic Press, New York* ; pp: 309–323.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*; **55**:181-186.

Leveau, J. H. J., Tech, J. J. (2011). Grapevine Microbiomics : Bacterial Diversity on Grape Leaves and Berries Revealed by High-Throughput Sequence Analysis of 16S rRNA Amplicons. *Biological Control of Postharvest Diseases*; 31–42.

Levy. E., Eyal. Z., Chet. I., Hochman, A., (1992). Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*; **40**:163-71.

Lindemann, J., Upper, A. C. (1985). Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *Applied and environmental microbiology*; **50**(5): 1229–1232.

Lindow, S.E., Andersen, G.L. (1996) Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves. *Appl Environ Microbiol*; **62**: 2978–2987.

Lindow, S. E., Brandl, M. T.(2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*; **69**(4):1875-1883.

Linn, D. M., Doran, J. W. (1984). Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils, **48**: 1267–1272.

Liu, W., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997). Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*; **63**(11): 4516–4522.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*; **35**(18):1-10.

Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J., Godon, J. (2006). Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single- strand conformation polymorphism (

SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*; **8**(4):720-731.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J. et al. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**:554-56.

Ludwig, W., KH Schleifer. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev*; **15**:155-173.

Lund, B. M., Snowdon, A. L.(2000). Fresh and processed fruits. In *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Lund, B.M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W., Eds., vol. 1, Aspen, Gaithersburg, Md, USA. In Hamad, S. H., Saleh, F. A., Al-Otaibi, M. M. (2012). Microbial Contamination of Date Rutab Collected from the Markets of Al-Hofuf City in Saudi Arabia. *The Scientific World Journal*; 1–4.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*; **437**: 376-381.

Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M.-L., Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *Plos ONE*; **8**(8):1-9.

Martins, G., Miot-sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-funel, A., Soulas, G., (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*; **158**(2): 93–100.

McBride, R. P., Hayes, A. (1977). Phylloplane of European larch. *Trans. Brit. Mycol. Soc*, **58**: 329-331. In: Thompson, I. P., Bailey, M. J., Fenlon, J. S., Fermor, T. R., Lilley, A. K. (1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*), 177–191.

Mead D.A., N.K. Pey, C. Herrnstadt, R.A. Marcil, L.M. Smith. (1991). A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/ Technology*; **9**: 657-663.

- Medina-Martínez, M.S., Allende, A., Gonzalo, G. Barberá, M. I. G. (2015).** Climatic variations influence the dynamic of epiphyte bacteria of baby lettuce. **68**.
- Mercier, J., Lindow, S. E. (2000).** Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*; **66**(1): 369–374.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J. M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G. J. (1999).** Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*; **65**(8): 3518–3525.
- Moore, J.E., Cherie Millar, J., Xu, B., Elshibly, S. (2001).** Edible dates (*Phoenix dactylifera* L.), a potential source of *Cladosporium cladosporioides* and *Sporobolomyces roseus*: implication for public health. *Mycopathologica* ; **154**: 25–28. In
- Mossel, D.A.A. (1975).** In: Duckworth, R.B. (ed.), *Water and Microorganisms in Foods—a Synthesis—in Water Relations of Foods*. Academic Press, New York, pp: 347–361. In
- Morris, C., Kinkel, L. (2002).** Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields, p. 365–375. In: Lindow, S. E., Brandl, M. T. *Microbiology of the Phyllosphere. Applied and environmental microbiology*, **69**(4): 1875–1883.
- Mukherjee, P.K., Raghu, K.(1997).** Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. On *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia*; **139**: 151-155.
- Munier, P. (1973).** *Le Palmier Dattier*, p: 220. G-P. Maisonneuve et Larose, Paris, France. In...
- Murphy, C. D. (2010).** Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds, **32**(3): 351–359.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE / TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in microbiology*; **2**: 317–322.
- Muyzer, G., Waal, E. C. D. E., Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain

Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*; **59**(3): 695–700.

Myhara, R. M., Al-alawi, A., Karkalas, J., Taylor, M. S. (2000). Sensory and textural changes in maturing Omani dates. *Energy and Buildings*; **80**(15): 2181–2185.

Nedwell, D. B. (1999). Effect of low temperature on microbial growth : lowered a α nity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS microbiology Ecology*; **30**: 101–111.

Nehl, D. B., Allen, S. J., Brown, J. F. (1996). Deleterious rhizosphere bacteria : an integrating perspective. *Applied soil ecology*; **5**: 1-20.

Nichols, D. (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS microbiology Ecology*; **60**:351-357.

Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., Nychas, G. E. (2007). Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Applied and environmental microbiologie*; **73**(21): 6705–6713.

O'Brien, R. D., Lindow, S. E. (1989). Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology*; **79**(5): 619-627.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **86**: 2766-2770.

Ovreas, L., Torsvik, V. (1998). Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microb Ecol*; **36**:303–315.

Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., Olsen, G.J. (1985). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Am.Soc. Microbiol. News*; **51**: 4-12.

Park, J. Y., Han, S. H., Lee, J. H., Han, Y. S., Lee, Y. S., Rong, X. (2011). Draft Genome Sequence of the Biocontrol Bacterium *Pseudomonas putida* B001, an Oligotrophic Bacterium

That Induces Systemic Resistance to Plant Diseases. *Journal of bacteriology*, **193**(23): 6795–6796.

Penuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A. S., Terradas, J. (2011). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean. *Plant Biology*; **14**: 565–575.

Pettersson, M., Baath, E. (2003). Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS microbiology ecology*; **45**:13-21.

Pitt, J.I. (1975). In: Duckworth, R.B. (ed.), *Xerophilic Fungi and the Spoilage of Foods of Plant Origin: Water Relations of Foods*. Academic Press, New York, pp: 273–307.

Plante, D., Belanger, G., Leblanc, D., Ward, P. (2011). The use of bovine serum albumin to improve the RT-qPCR detection of foodborne viruses rinsed from vegetable surfaces, *Letters in Applied Microbiologie*; **52**: 239-244.

Polz, M. F., Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and environmental microbiology*; **64**(10): 3724–3730.

Pomeroy, L. R., Wiebe, W. J. (2001). Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol*; **23**:187-204.

Pommier, T., Pinhassi, J., Hagström, Å. (2005). Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton. *Aquat Microb Ecol*; **41**:79-89.

Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS yeast research*; **4**:865-877.

Pringault, O., Viret, H., Duran, R. (2010). Influence of microorganisms on the removal of nickel in tropical marine sediments (New Caledonia). *Marine pollution bulletin*; **61**(7-12): 530–541.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Dore, J. et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Natures*; **464**:59-67.

Qvit-Raz, N., Finkel, O. M., Al-Deeb, T. M., Malkawi, H. I., Hindiyeh, M. Y., Jurkevitch, E. et al. (2012). Biogeographical diversity of leaf-associated microbial communities from salt-secreting Tamarix trees of the Dead Sea region. *Research in Microbiology*; **163**(2): 142–150.

Ragab, W.S.M., Ramadan, B.R., Abdel-Sater, M.A. (2001). Mycoflora and Aflatoxins Associated with Saïdy Dates as Affected by Technological processes. *The Second International Conference on Date Palms*, pp. 409-421.

Rasche, F, Marco-Noales, E., Velvis, H., van Overbeek, L.S., Lopez, M.M., van Elsas, J.D. and Sessitsch, A. (2006). Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4-lysozyme producing potatoes. *Plant Soil*; **289**: 123–140.

Rastogi, G., Sbodio, A., Tech, J. J., Suslow, T. V, Coaker, G. L., Leveau, J. H. J. (2012). Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*; **6**(10): 1812–1822.

Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*; **12**(11): 2885–2893.

Redford, A. J., Fierer, N. (2009). Bacterial Succession on the Leaf Surface: A Novel System for Studying Successional Dynamics. *Microbial Ecology* ; **58**(1): 189–198.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to detect Dekkera / Brettanomyces bruxellensis , a spoilage wine yeast , on the surface of grape berries. *Microbiological research*; **162**: 154–167.

Renouf, V. (2006). Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres relation avec la qualité du vin. Thèse du doctorat.

Ritz, K. (2007). The Plate Debate : Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS microbiol ecol*; **60**:358-362.

Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., Bernard, C., Cedex, V. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and environmental microbiology*; **61**(2): 610–616.

Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Gregory, C. J. et al.(2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*; 1–12.

Saitou, N., Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*; **4**: 406–425.

Schmid, F., Moser, G., Muller, H., Berg, G. (2011). Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture : Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents . *Applied and environmental microbiology*; **77**(6): 2188–2191.

Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**:365-380.

Schwieger, F.,Tebbe, C. C. (1998). A New Approach To Utilize PCR – Single-Strand-conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Applied and environmental microbiology*; **64**(12), 4870–4876.

Scott, W. J. (1953). Water relations of staphylococcus aureus at 30 ° C. *Australian Journal of Biological Sciences*; **6**(4):549-564.

Sebihi, Z., Benguedouar, A., Benhizia, Y. (2016). Evaluation of multi-trait plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* isolated from rhizosphere Soil (Algeria) and screening there antifungal activity against two species of *Fusarium*. *Advances in Environmental Biology*; **10**(5): 102-115.

Selvakumar, N., Ding, B.,Wilson,S.M. (1997). Separation of DNA Strands Facilitates Detection of Point Mutations by PCR-SSCP. *Bio techniques*; **22**(4): 604-606.

- Shenasi, M., Aidoo, K.E., Candlish, A.A.G. (2002).** Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *Int. J. Food Microbiol*; **79**: 113–119.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk, J. A. N. (1999).** Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*; **65**(6), 2614–2621.
- Spiegelman, D., Whissell, G., Greer, C. W. (2005).** A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol*; **51**:355-386.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, A. D., Ka, P., Maiden, M. C.J. et al.(2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; **52**: 1043–1047.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. (1994).** Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*; **44**: 846–849.
- Staden, R. (1979).** A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acides Res*; **6**(7):2601-10.
- Taha, M.P.M, Drew, G.H., Vestlund, A.T., Aldred, D., Longhurst, P.J., Pollard, S.J.T. (2007).** Enumerating actinomycetes in compost bioerosols at source-Use of soil compost agar to address plate ‘masking’. *Atm environ*; **41**: 4759- 4765.
- Taouda, H., Errachidi, F., Aarab, L., Chabir, R. (2013).** Microbiological Quality of dates in the Nourth Center Region of Morocco. *J. Life Sci*; **7**(12): 1278-1283.
- Terzieva, S., Donnelly, J., Ulevicius, V., grinshpun, S.A., Willeke, K., Stelma, G.N., Berenner, K.P. (1996).** Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *App Environ Microbiol*; **62**(7): 2264-2272.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994).** Clustal W-improving the sensitivity of

progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*; **22**: 4673–4680.

Thompson, I.P., Bailey, M.J., Fenlon, J.S., Fermor, T.R., Lilley, A.K., Lynch, J. M. et al.(1993). Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant and Soil*; **150**:177–191.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Øvrea, L. (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biochemistry*; **64**: 53–62.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M, Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*; **28**: 2731-2739.

Tang, Y.W., Ellis, N.M., Hopkins, M.K., Smith, D.H., Dodge, D.E, Persing, D.H. (1998). Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol*; **36**: 3674–3679.

Trevors, J.T.(1998). Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically contaminated soils. *Water, Air, Soil Pollut*; **101**:45-67.

Umar, Z.D., Bilkisu, A. and Bashir, A. (2014). Bacteriological analysis of date palm fruits sold in Katsina metropolis. *International journal of environment (IJE)*; **3**(2): 205–215.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J.A. et al. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science mag*; **304**: 66-74.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I. et al. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial systematics. *International journal of systematic bacteriology*; **37**(4): 463-464.

Wauters G., Avesani V., Charlier J., Janssens M., Vaneechoutte M. et Delmée M. (2005). The Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. *J. Clin. Microbiol*; **43**(6): 2624–2628.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol*; **173**(2): 697–703.

Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology*; **105**(6):1744–1755.

Wilson, M., Lindow, S. E. (1994). Coexistence among Epiphytic Bacterial Populations Mediated through Nutritional Resource Partitioning. *Applied and environmental microbiology*, **60**(12):4468–4477.

Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological reviews* ; **51**(2): 221–271.

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **87**: 4576-4579.

Woo, P. C. Y., Ng, K. H. L., Lau, S. K. P., Yip, K. T., Fung, A. M. Y., Leung, K. W., et al. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol*; **41**: 1996-2001.

Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H. et Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect*; **14**: 908-934.

Yadav, R. K. P., Halley, J. M., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I., Vokou, D. (2004). Bacterial populations on the leaves of Mediterranean plants: quantitative features and testing of distribution models. *Environmental and Experimental Botany*; **52**(1): 63–77.

Yadav, R. K. P., Karamanoli, K., Vokou, D. (2011). Bacterial populations on the phyllosphere of Mediterranean plants: Influence of leaf age and leaf surface. *Frontiers of Agriculture in China*; **5**(1): 60–63.

Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **98**(7), 3889–3894.

Yang, C., Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Applied and environmental microbiology*, **66**(1): 345–351

Yannarell, A. C., Triplett, E. W. (2005). Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. *Applied and environmental microbiology*, **71**(1): 227–239.

Zamora, M.C., Chirife, J., Roldán, D. (2006). On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. *Food control*, **17**.

Annexe 1 : Composition des milieux et des tampons utilisées

A. Gélose nutritive (g/L)

Extrait de levure	2,5
Extrait de viande.....	1
Peptone.....	5
Nacl.....	5
<u>Agar</u>	<u>20</u>

pH= 7± 0,2

B. Milieu pour l'indication d'uréase

La gélose nutritive préparé comme indique au-dessus et on ajoute 0.012 g/l de rouge de phénol comme indicateur de pH, puis stérilisé dans l'autoclave. Lorsque la GN est refroidi jusqu'à environ 45°C, la solution d'urée est stérilisée par filtration (0.22µm) et rajoutée au milieu en phase liquide sous la hotte à flux laminaire.

C. Milieu pour le test CMC

La GN ordinaire additionnée 0.25% de CMC.

D. Milieu pour l'assimilation des sucres

Le milieu proposé par Larpent (1970) qui contient le glucose comme seul source de carbone a été choisi pour ce test. La composition du milieu est come suit :

KH ₂ PO ₄	3 g/L,
Na ₂ Hpo ₄	6 g/L,
Na Cl.....	5 g/L,
NH ₄ cl.....	2g/L,
MgSO ₄	0,1 g/L,
Glucose.....	8g/L,
<u>Agar</u>	<u>15 g/L.</u>

Ph=6,8±0,2

E. Milieu pour l'assimilation des acides aminés

La composition de milieu de base pour les acides aminés (g/L)

KH₂PO₄ 0,5

MgSO₄..... 0,5

Agar 20

pH=7, avec KOH 10%

Après la stérilisation du milieu par l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, les acides aminés à une concentration désirée (1%) ont été rajoutés au milieu, puis autoclavé pendant 15 minutes à 100°C

F. Composition du tampon TBE (10X concentrée)

La solution est préparée en mélangeant :

- 109g de Tris
- 55,7g d'acide borique
- 9,3g d'EDTA

Mélanger les constituants dans un litre de l'eau distillée, puis conserver a température ambiante.

Annexe 2 : Résultats de quelques tests nutritionnels et physiologiques

Tableau 1: Résultats du test de la température

Isolats	4°C	37°C	45°C	52 °C	Isolats	4°C	37°C	45°C	52°C
Fr 1 E	+	+	+	+	T 14.2 E	+	+	+	+
Fr 5.1 E	-	+	+	-	T 9.1 E	+	+	+	-
Fr 5.2 E	+	+	+	+	T 10.2 E	-	+	+	±
Fr 11.1 E	+	+	+	-	T 4.3 E	-	+	-	-
Fr 12 E	-	+	±	±	T 2.1 E	-	+	+	+
Fr 15 E	+	+	+	-	T 5.1 E	-	+	+	+
Fe 2.1 E	±	+	+	±	T 5.2 E	-	+	+	+
Fe 2.2 E	+	+	+	+	T 3.1 E	+	+	-	-
Fe 4.2 E	-	+	+	-	T 3.3 E	+	+	-	-
Fe 6 E	-	+	+	-	T 6 E	+	+	+	-
Fe 9 E	+	+	+	±	T 10.1 E	+	+	-	-
Fe 10.2 E	+	+	+	-	T 12.1 E	+	+	-	-
Fe 13.1 E	-	+	+	-	T 4.1 E	+	+	-	-
Fe 12 E	+	+	+	+	T 4.4 E	+	+	-	-
Fe 1 E	+	+	+	+	T 7.1 E	+	+	-	-
Fe 4.1 E	+	+	+	+	T 14.1E	+	+	-	-
Fe 7 E	-	+	+	+	T 15.1 E	+	+	-	-
Fe 8.1 E	+	+	+	-	Fe 15 E	±	+	+	+
Fe 8.4 E	+	+	+	+	T 1.1 E	-	+	+	-
Fe 14 E	-	+	+	-	T 8.2 E	-	+	+	+

(+) : pousse, (-) : pas de pousse, (±) : faible pousse

Tableau 2: Assimilation des acides aminés par les isolats.

Isolats	Tyrosine	Leucine	Méthionine	I-Proline	Asparagine	Valine	Alanine	Glycine	Cystéine	Serine	Arginine	Threonine	Ph. alanine	Iso-leucine	Tryptophane	Lysine	Histidine	Glutamate de sodium
Fr 1 E	+	+	+	++	++	++	++	±	+	++	+	+	+	±	±	+	+	++
Fr 5.1 E	+	+	+	++	++	++	++	-	±	++	+	+	+	±	±	+	+	++
Fr 5.2 E	+	+	+	++	++	++	++	±	±	±	-	+	+	±	±	+	+	++
Fr11.1 E	+	±	-	++	+	+	-	-	±	+	±	±	±	±	±	±	±	±
Fr 12 E	+	+	+	++	++	++	+	±	±	+	+	+	±	±	±	+	+	+
Fr 15 E	+	+	+	++	++	++	+	±	±	±	±	+	±	±	±	+	+	+
Fe 2.1 E	+	+	±	++	++	+	+	±	+	±	++	+	+	+	±	+	++	+
Fe 2.2 E	+	+	+	++	++	++	±	±	+	±	++	+	+	+	±	+	++	+
Fe 4.2 E	+	+	±	++	++	++	±	±	+	±	++	+	+	+	+	+	++	+
Fe 6 E	±	±	±	+	+	±	±	±	±	±	±	+	±	±	±	±	±	±
Fe 9 E	+	++	+	++	++	++	++	±	++	++	±	+	±	++	+	±	+	+
Fe10.2 E	+	+	+	++	++	++	++	±	+	+	++	+	++	++	++	+	+	
Fe13.1 E	+	+	+	++	++	++	++	±	++	+	+	+	±	±	±	+	±	+
Fe 12 E	++	±	+	+	+	±	++	+	+	-	++	+	±	++	+	+	-	+
Fe 1 E	+	+	+	++	++	++	++	±	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 4.1 E	+	+	+	++	++	++	++	±	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 7 E	+	+	+	++	++	++	++	-	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 8.1 E	+	+	+	++	++	++	±	±	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 8.4 E	+	+	±	++	++	++	-	-	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 14 E	+	+	+	++	++	++	++	±	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
Fe 15	+	+	±	++	++	±	±	-	++	±	±	+	++	+	+	+	++	+
T 2.1 E	++	+	+	++	+	+	±	+	±	++	+	+	+	±	±	++	+	++
T 5.1 E	++	++	+	++	+	+	±	+	±	+	+	±	+	±	±	±	++	++
T 5.2 E	++	++	+	++	+	+	±	+	±	++	+	±	++	±	±	±	++	++
T 4.3 E	++	++	±	++	++	++	++	++	±	++	++	±	±	++	++	++	++	++
T14.2 E	++	±	±	++	++	++	++	+	±	++	±	±	±	±	±	±	++	++
T.9.1 E	++	±	±	++	++	±	++	+	±	++	±	±	±	±	±	±	++	++
T10.2 E	++	±	±	++	++	±	±	±	±	++	++	+	++	±	+	±	++	++
T 4.1 E	±	±	±	++	++	±	±	±	++	+	-	±	±	±	±	±	±	+
T 4.4 E	±	-	-	++	++	+	±	-	±	++	-	±	+	+	±	++	++	+
T 7.1 E	±	-	-	++	++	+	±	-	±	++	-	±	+	+	±	++	±	+
T 1.1 E	±	±	±	±	±	±	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
T3.1 E	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	++	±	±	++	±	++	++	++
T3.3 E	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	++	±	±	++	±	++	++	++
T 6 E	++	±	±	++	++	++	++	±	±	++	±	±	±	++	±	++	++	++

(++) : Bonne pousse ; (+) : Pousse ;(±) : Faible pousse ; (-) : pas de pousse.

(Suite au tableau 2)

Isolats	Tyrosine	Leucine	Méthionine	L-Proline	Asparagine	Valine	Alanine	Glycine	Cystéine	Serine	Arginine	Threonine	Ph. alanine	Iso-leucine	Tryptophan	Lysine	Histidine	Glutamate de sodium
T 2.1 E	++	+	+	++	+	+	±	+	±	++	+	+	+	±	±	++	+	++
T 5.1 E	++	++	+	++	+	+	±	+	±	+	+	±	+	±	±	±	++	++
T 5.2 E	++	++	+	++	+	+	±	+	±	++	+	±	+	±	±	±	++	++
T 4.3 E	++	++	±	++	++	++	++	++	±	++	++	±	±	++	++	++	++	++
T14.2 E	++	±	±	++	++	++	++	+	±	++	±	±	±	±	±	±	++	++
T.9.1 E	++	±	±	++	++	±	++	+	±	++	±	±	±	±	±	±	++	++
T10.2 E	++	±	±	++	++	±	±	±	±	++	++	+	+	±	+	±	++	++
T 4.1 E	±	±	±	++	++	±	±	±	++	+	-	±	±	±	±	±	±	+
T 4.4 E	±	-	-	++	++	+	±	-	±	++	-	±	+	+	±	++	++	+
T 7.1 E	±	-	-	++	++	+	±	-	±	++	-	±	+	+	±	++	±	+
T 1.1 E	±	±	±	±	±	±	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±
T3.1 E	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	++	±	±	±	±	++	++	++
T3.3 E	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	++	±	±	±	±	++	++	++
T 6 E	++	±	±	++	++	++	++	±	±	++	±	±	±	±	±	++	++	++
T10.1 E	++	±	±	++	++	+	++	±	±	++	±	±	±	±	±	++	++	++
T12.1 E	++	+	±	++	++	+	++	±	±	++	++	±	±	±	±	++	++	++
T14.1 E	++	±	±	++	++	+	++	+	±	++	++	±	±	±	±	++	++	++
T15.1 E	++	+	±	++	++	+	++	±	±	++	+	±	±	±	±	++	++	++
T13.2	±	±	-	++	+	±	±	-	±	+	-	±	+	±	+	±	++	+
T8.2 E	±	±	-	++	+	±	±	+	±	++	±	±	±	±	+	±	+	+
M	++	++		±	++	++	++	+	±	++	++	±	±	±	±	++	++	++

Tableau 3: Mesure de l'absorbance a différent pH

pH	Fr 1		Fr 5,1		Fr 5,2		Fr6,1		Fr 11,1		Fr 12		Fr15	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	48h	24h
4	0,066	0,146	0,012	0,08	0,499	0,493	0,127	0,89	0,197	0,284	0,29	0,236	0,059	0,293
5,5	0,949	1,415	0,774	0,89	0,583	0,602	0,767	0,594	0,48	0,86	0,624	0,924	1,271	1,52
7	0,99	1,265	1,074	0,884	0,812	0,479	0,682	0,887	0,733	0,97	0,841	0,864	1,184	1,653
8,6	0,993	1,424	1,088	0,715	0,715	0,846	0,62	0,701	0,673	0,751	0,917	1,005	0,949	1,822
9,5	1,103	1,229	1,046	0,685	0,685	0,545	0,664	0,849	0,759	0,823	0,892	0,805	1,157	1,262
11	0,629	0,793	0,577	0,339	0,577	0,339	0,987	0,834	0,962	0,68	0,626	1,617	0,47	0,62

pH	Fe1		Fe4,1		Fe7		Fe8,1		Fe8,4		Fe15		Fe2,1	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
4	0,06	0,69	0,251	0,698	0,05	0,525	0,418	0,89	0,304	0,58	0,124	0,55	0,124	0,968
5,5	0,6	0,875	0,61	0,41	0,63	0,969	0,745	0,707	0,839	0,867	0,28	0,281	0,833	0,767
7	0,609	0,876	0,537	0,739	0,569	0,71	0,947	1,257	0,649	0,915	0,243	0,572	0,829	0,923
8,6	0,653	0,779	0,49	1,141	0,73	0,783	0,882	0,704	0,756	0,901	0,412	0,681	0,822	1,199
9,5	0,624	0,672	0,555	0,67	1,014	0,717	0,637	1,0165	0,854	0,383	0,555	0,67	0,973	0,766
11	0,482	0,67	0,303	0,36	0,401	0,366	0,733	0,784	0,411	0,422	0,305	0,264	0,689	0,573

pH	Fe2,2		Fe4,2		Fe6		Fe9		Fe10,2		Fe12		Fe13,1		Fe14	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
4	0,636	0,74	0,052	0,549	0,241	0,69	0,034	0,15	0,014	0,212	0,094	0,288	0,055	0,038	0,038	0,352
5,5	1,13	1,237	1,317	1,631	0,722	0,948	0,474	0,594	1,363	1,58	0,444	0,553	0,707	0,936	0,936	1,217
7	1,146	1,16	1,415	1,929	0,791	0,801	0,762	1,447	1,549	1,947	1,262	1,495	0,905	1,019	1,019	1,097
8,6	1,153	1,462	1,612	1,86	0,793	1,848	1,262	1,559	1,103	1,299	0,355	1,752	1,148	1,079	1,079	1,347
9,5	0,966	1,073	1,084	1,625	0,98	1,268	1,314	1,28	0,968	1,02	1,222	1,491	1,225	1,095	1,148	0,896
11	0,343	0,367	0,734	0,802	0,561	0,849	0,228	0,449	0,656	0,637	0,754	1,117	0,635	0,666	0,669	0,593

pH	T4,1		T7,1		T3,1		T3,3		T6		T10,1		T12,1		T5,1		T5,2	
	24h	48h																
4	0,092	0,53	0,041	0,034	0,817	1,332	0,623	1,494	0,08	0,809	0,488	1,181	0,719	1,229	0,062	0,067	0,053	1,157
5,5	0,739	0,9	0,974	1,195	1,448	1,7	1,217	1,569	0,825	1,242	1,222	1,584	1,058	1,633	1,522	1,757	1,786	1,856
7	1,396	1,511	0,675	0,925	1,432	1,084	1,008	1,909	1,282	1,811	1,225	1,56	1,361	1,833	1,014	1,671	1,751	1,778
8,6	1,54	1,712	1,519	1,802	1,503	1,989	1,025	1	1,084	1,692	1,282	1,825	1,453	1,885	1,449	1,877	1,829	1,846
9,5	0,972	1,514	1,448	1,646	1,698	1,81	0,927	1,841	1,23	1,815	1,371	1,787	1,333	1,887	1,447	1,626	1,496	1,763
11	0,912	1,494	1,021	1,321	1,21	0,917	0,904	1,268	1,475	1,952	0,728	1,439	0,8	0,925	1,14	0,737	1,19	1,425

Annexes

pH	T14,1		T15,1		T4,3		T9,1		T10,2		T14,2		T2,1		T4,1	
	24h	48h														
4	0,861	1,367	0,763	1,178	1,617	1,645	1,115	1,4	1,206	1,62	1,19	1,672	0,047	0,235	0,091	0,149
5,5	1,123	1,852	1,173	1,325	1,825	1,748	1,418	1,38	1,613	1,91	1,476	1,8	1,893	1,026	0,819	0,434
7	1,1	1,65	0,791	1,472	1,79	1,777	1,316	1,329	1,703	1,849	1,531	1,738	0,971	1,077	0,612	0,599
8,6	1,658	1,789	0,771	1,74	1,953	1,887	1,333	1,346	1,637	1,872	1,553	1,756	1,127	1,045	0,907	0,836
9,5	1,104	1,971	1,369	0,852	1,843	1,743	1,169	1,417	1,611	1,782	1,496	1,725	0,956	1,038	0,925	0,926
11	1,443	1,511	0,85	0,631	1,536	1,532	0,879	1,042	1,611	1,716	1,121	1,465	0,514	0,623	0,77	1,019

Tableau 4: Mesure de l'absorbance des souches a différents concentration de NaCl.

NaCl	Fr 1		Fr 5,1		Fr 5,2		Fr 6,1		Fr 11,1		Fr 12		Fr 15	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0,01%	0,516	0,243	1,06	0,903	0,173	0,242	1,01	0,951	0,966	1,11	0,661	1,007	0,518	0,934
0,10%	0,473	0,863	1,031	1,029	0,205	0,225	1,084	1,012	0,995	1,055	0,569	0,847	0,646	0,629
0,50%	0,468	0,394	0,9	1,033	0,24	0,303	0,724	1,039	1,175	0,764	0,312	1,233	0,654	0,498
1%	0,521	1,163	1,055	1,04	0,311	0,476	0,975	1,292	0,954	1,228	0,933	1,352	0,788	1,035
3%	0,295	0,959	0,765	0,608	0,374	0,393	0,29	0,977	0,628	1,173	0,325	0,676	0,359	0,823
8%	0,041	0,128	0,172	0,417	0,38	0,272	0,335	0,265	0,443	0,352	0,115	0,464	0,192	0,315
12%	0,04	0,035	0,035	0,024	0,032	0,45	0,05	0,062	0,076	0,034	0,048	0,024	0,038	0,02

NaCl	T4,3		T9,1		T10,2		T14,2		T4,1		T4,4		T7,1	
	24h	48h												
0,01%	0,875	1,271	0,955	1,173	1,462	1,7	1,387	1,632	0,377	0,53	1,388	1,636	0,692	1,109
0,10%	1,206	1,29	0,883	1,011	1,566	1,634	1,14	1,556	0,444	0,395	1,249	1,438	0,854	0,802
0,50%	1,227	1,36	1,089	1,366	1,487	1,675	1,244	1,455	0,57	0,626	1,469	1,472	0,584	0,716
1%	1,311	1,39	1,417	1,373	1,504	1,78	1,233	1,9	0,586	1,332	1,117	1,613	0,684	0,888
3%	0,467	1,339	0,79	1,237	1,529	1,718	0,786	1,416	0,424	1,276	0,477	1,57	0,46	0,287
8%	0,071	1,123	0,313	0,332	0,212	0,315	0,245	0,294	0,195	0,165	0,086	0,129	0,078	0,097
12%	0,061	0,037	0,071	0,076	0,079	0,019	0,091	0,08	0,083	0,053	0,067	0,035	0,05	0,028

NaCl	T8,2		T13,2		T1,1		T2,1		T5,1		T5,2		T3,1	
	24h	48h												
0,01%	1,032	1,531	0,684	0,692	0,435	1,011	0,837	1,409	1,335	1,268	1,166	1,366	1,246	1,441
0,1%	1,134	1,533	0,737	1,01	0,404	0,869	0,945	1,573	1,091	1,09	1,18	1,386	1,204	1,555
0,5%	0,978	1,449	0,592	1,261	0,333	1,001	0,936	1,354	1,014	0,729	1,41	1,488	1,154	1,495
1%	1,25	1,471	0,724	1,408	0,31	0,707	1,053	1,47	1,435	1,51	1,334	1,255	1,412	1,569
3%	0,96	0,86	0,453	0,538	0,186	0,222	0,99	1,325	0,689	0,43	0,681	1,02	1,17	1,478
8%	0,181	0,283	0,046	0,061	0,045	0,019	0,156	0,112	0,081	0,181	0,086	0,171	0,266	0,516
12%	0,035	0,036	0,062	0,006	0,029	0,004	0,058	0,036	0,06	0,073	0,072	0,022	0,069	0,046

Annexes

NaCl	T3,3		T6,1		T10,1		T12,1		T14,1		T15,1	
	24h	48h										
0.01%	1,328	1,732	1,347	1,544	0,949	1,546	1,289	1,53	1,165	1,539	1,101	1,67
0.1%	1,204	1,488	1,277	1,625	1,075	1,509	1,308	1,625	1,128	1,811	1,129	1,499
0.5%	1,137	1,537	1,468	1,691	1,095	1,396	1,145	1,546	1,201	1	0,945	1,428
1%	1,54	1,478	1,483	1,6	1,038	1,408	1,337	1,733	1,22	1,56	1,083	1,519
3%	1,253	1,338	1,219	1,453	1,048	1,383	1,212	1,393	1,168	1,174	0,848	1,408
8%	0,222	0,374	0,266	0,358	0,236	0,387	0,23	0,332	0,208	0,186	0,326	0,29
12%	0,068	0,057	0,084	0,034	0,096	0,042	0,083	0,019	0,089	0,038	0,076	0,029

NaCl	Fe1		Fe4,1		Fe7		Fe8,1		Fe8,4		Fe15		Fe4,2	
	24h	48h												
0.01%	0,23	0,211	0,249	0,398	0,232	0,312	0,32	0,502	0,369	0,273	0,124	0,193	0,157	0,27
0.10%	0,225	0,272	0,318	0,692	0,264	0,311	0,274	0,568	0,364	0,374	0,192	0,13	0,502	0,839
0.50%	0,215	0,17	0,344	0,494	0,322	0,29	0,414	0,589	0,323	0,369	0,205	0,176	0,603	0,645
1%	0,263	0,297	0,327	0,163	0,277	0,323	0,408	0,489	0,34	0,285	0,199	0,233	0,815	0,98
3%	0,259	0,273	0,292	0,63	0,209	0,295	0,369	0,374	0,373	0,335	0,103	0,2	0,593	0,622
8%	0,067	0,089	0,058	0,105	0,012	0,101	0,169	0,202	0,019	0,404	0,017	0,145	0,077	0,023
12%	0,09	0,053	0,023	0,128	0,004	0,01	0,023	0,023	0,021	0,029	0,005	0,008	0,053	0,048

NaCl	Fe6		Fe5		Fe10,2		Fe12		Fe14		Fe 2,1		Fe 2,2		Fe 13,1	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0.01%	0,619	0,554	0,198	0,352	0,719	0,394	0,304	0,87	0,539	0,748	0,508	0,881	0,479	0,424	0,428	0,42
0.1%	0,439	1,1	0,368	0,634	0,54	1,059	0,394	0,887	0,371	0,709	0,316	0,874	0,383	0,535	0,416	0,955
0.5%	0,536	0,682	0,34	0,389	0,766	1,269	0,359	1,169	0,665	0,818	0,739	0,953	0,651	1,002	0,424	0,379
1%	0,564	0,748	0,246	0,736	0,683	1,458	0,374	0,748	0,702	0,975	0,8	0,81	0,651	0,555	0,518	0,806
3%	0,31	0,204	0,223	0,834	0,338	0,399	0,005	0,001	0,156	0,508	0,314	0,588	0,343	0,407	0,278	0,367
8%	0,036	0,032	0,01	0,038	0,016	0,015	0,012	0,002	0,109	0,302	0,041	0,369	0,083	0,5	0,104	0,36
12%	0,011	0,004	0,025	0,018	0,012	0,011	0,022	0,014	0,02	0,09	0,42	0,022	0,028	0,017	0,027	0,013

Tableau 5: Paramètre climatique de la région de Tolga de l'année 2012

	T.moy.	Humidité	pluie	tmin	tmax
Janvier	11,8	55.9	20.4	06,9	17,3
Février	13,2	49.1	7.6	07,8	18,9
Mars	17,3	43.2	15.0	11,3	23,3
Avril	21,2	38.9	20.6	15,2	27,2
Mai	26,5	34.1	10.3	20,0	32,5
Juin	31,5	29.3	4.5	24,7	37,8
Juillet	34,8	27.0	0.6	27,9	41,2
Août	34,2	29.4	2.6	27,8	40,4
Septembre	29,0	39.1	13.7	23,3	34,6
Octobre	23,5	45.9	16.0	18,1	29,3
Novembre	16,8	53.9	14.4	12,0	22,2
Décembre	12,3	58.6	10.7	07,8	17,8

Annexe 3 : Quelques séquences d'ADNr 16S des différents groupes bactériens identifiés et quelques alignements

> T4.4 E

```
GGGGGTGTATCGCCGGTTCTCAGTCTCTCCCGAGATTAAGATTAACACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTG
TGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTGACGTTCTGATTACAGATTACTAGCGATTCCGAC
TTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGG
CAACCCTTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGCCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTT
TGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGT
TCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGA
ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCCGTACTCCC
CAGGCGGTCAACTTAATGCGTTACGTGGCGGCCACTAAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTGTAGTCCAG
GTAGTGCCTTCGCACTGGTGTTCCTTTCCATATCTACGCATTTACGCTACACTGGAATTCACTACCCTCTACAC
ACTCTAGCAGACAGTTTGGATGCAGGTCCCAAGTGAGCCGGGATTCACATCCAATATCAGCACTACGCGCGCTT
ACGCCAGTAATCGATTACGCTTGCAGCGTCGTATTACGCGCTGCAG.
```

(T 4.4.E: Pseudomonas oryzihabitans strain NBRC 102199 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [NR_114041.1](#) Length: 1463 Number of Matches: 1

Range 1: 489 to 1429 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1471 bits(796)	0.0	902/947(95%)	31/947(3%)	Plus/Plus
Query 3		GCAG-CGC-GTAATACG-ACGCTGCAAGCGT-AATC-G-ATTACT-GGCGT-AAGCGCGC		54
Sbjct 489		GCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGC		548
Query 55		GTA-GT-GC-TGAT-AGTTGGATGTG-AAT-CCC-GGCTC-ACTGGGACCTGCATCCAA		106
Sbjct 549		GTAGGTGGCTTGATAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAA		608
Query 107		A-CTGTCT-GCTAGAGTG-TGTAGAGGGTAGTG-AA-TTCCAGTGTAGC-GTGAAATGCG		160
Sbjct 609		AACTGTCTGGCTAGAGTGCAGGTAGAGGGTAGTGAAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCG		668
Query 161		TAGATATGGAAAGGAACACCAGTG-CGAA-GCGACTACCTGGACTAACACTGACACTGAG		218
Sbjct 669		TAGATATTGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGACACTGACACTGAG		728
Query 219		GTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT		278
Sbjct 729		GTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT		788
Query 279		GTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTTAGTGGCCGCCACGTAACGCATTAAGTTG		338
Sbjct 789		GTCAACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTT-AGTGG-CG-CAGCTAACGCATTAAGTTG		845
Query 339		ACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACA		398
Sbjct 846		ACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACA		905

Annexes

Query	399	AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACAT	458
Sbjct	906	AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACAT	965
Query	459	GCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATG	518
Sbjct	966	GCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATG	1025
Query	519	GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAACCCCTT	578
Sbjct	1026	GCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGC-AACCCCTT	1084
Query	579	GTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG	638
Sbjct	1085	GTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG	1144
Query	639	AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCT	698
Sbjct	1145	AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCT	1204
Query	699	ACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGAT	758
Sbjct	1205	ACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGAT	1264
Query	759	CGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG	818
Sbjct	1265	CGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG	1324
Query	819	AATCAGAACGTACCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG	878
Sbjct	1325	AATCAGAACGTACCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG	1384
Query	879	GGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGTTAATCTTAATC-TCGGGAGAGAC	924
Sbjct	1385	GGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCT-AACCNTCGGGAG-GAC	1429

>T11.1H

TATATACTTCTTTTGCACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGG
 CATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCA
 CTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACT
 CGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCG
 GCCTAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGCCACAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAA
 GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCA
 TTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAG
 GGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTT
 CGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTAC
 CGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCC
 CGGGGATTTACATCCAACCTTGACAGACCGCCTGCG

(T 11.1 H:Enterobacter xiangfangensis strain 10-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)

Sequence ID: [ref|NR_126208.1|](#) Length: 1429 Number of Matches: 1

Range 1: 520 to 1377 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
-------	--------	------------	------	--------

Annexes

1567 bits(848) 0.0 855/858(99%) 1/858(0%) Plus/Plus

Query	1	CGCAGGCGGTCTGTCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCG	60
Sbjct	520	CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCG	579
Query	61	AAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC	120
Sbjct	580	AAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC	639
Query	121	GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA	180
Sbjct	640	GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA	699
Query	181	GGTGCAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA	240
Sbjct	700	GGTGCAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA	759
Query	241	TGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGAC	300
Sbjct	760	TGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGAC	819
Query	301	CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAG	360
Sbjct	820	CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAG	879
Query	361	CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCC	420
Sbjct	880	CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCC	939
Query	421	AGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGGCTTCGGGAACCTTGAGACAGGTGCTGCATGGC	480
Sbjct	940	AGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGGCTTCGGGAACCTTGAGACAGGTGCTGCATGGC	999
Query	481	TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATC	540
Sbjct	1000	TGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATC	1059
Query	541	CTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	600
Sbjct	1060	CTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA	1119
Query	601	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA	660
Sbjct	1120	AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAA	1179
Query	661	TGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTA	720
Sbjct	1180	TGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTA	1239
Query	721	GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATC	780
Sbjct	1240	GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATC	1299
Query	781	AGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG	840
Sbjct	1300	AGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAG	1359
Query	841	TGGG-TGCAAAGAAGTA 857	
Sbjct	1360	TGGGTGCAAAGAAGTA 1377	

>T3.2 P

CGGCTCTCTCCCCACAAGGGGTTTCATGGCCACCGCGTTTCCGGGTGTTACCAACTTTCGTGACTTGACGGGGCGGT
 GTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCAACCTTCATGAGGT
 CGAGTTGCAGACCTCAATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCGCAACCCTTTG
 TACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCC
 GAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTCCCCGGCATAACCCGCTGGCAACATAGAACGAGGTTGCGCTCGTTG
 CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTAAACCGGCCACAAGTGGGG
 GACCTGTTTCCAGGCCTTTCCGGTTCATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCAT
 GCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCAC
 TTAATGCGTTAGCTACGGCGCGAAAACTGGAATGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTA
 CCAGGGTATCTAATCTGTTGCTCCCCATGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCG
 CCATCGGTGTTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCCGCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCCTACTGCACCTTAG
 TCTGCCCCGTACCCACTGCAGACCCGGGGTTGAGCCCCGGGCTTTCACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCT
 CTTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGC.

(T 3.2 P: *Arthrobacter luteolus* strain CF-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)

Sequence ID: [NR_025362.1](#) Length: 1499 Number of Matches: 1

Range 1: 511 to 1433 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1659 bits (898)	0.0	919/928 (99%)	5/928 (0%)	Plus/Plus	
Query	1		GCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGA			60
Sbjct	511					570
Query	61		AAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGG			120
Sbjct	571					630
Query	121		AGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCG			180
Sbjct	631					690
Query	181		AAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGA			240
Sbjct	691					750
Query	241		TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCAC			300
Sbjct	751					810
Query	301		GTTTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCT			360
Sbjct	811					870
Query	361		AAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGAT			420
Sbjct	871					930
Query	421		GCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGAAAGGCCGTAAGGCTCC			480
Sbjct	931					990
Query	481		CCACTTGTGGCCGTTTACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT			540

Sbjct	991	 CCACTTGTGGCCGGTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTT	1050
Query	541	GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGG 	600
Sbjct	1051	GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCGGGTTATGGCGGGG	1110
Query	601	ACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCAT 	660
Sbjct	1111	ACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCAT	1170
Query	661	GCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACT 	720
Sbjct	1171	GCCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACT	1230
Query	721	GTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGAC 	780
Sbjct	1231	GTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGAC	1290
Query	781	CTCATGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCC 	840
Sbjct	1291	CTCATGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCC	1350
Query	841	GGGCCTTGTACACACCCGCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAACGCGGTGG 	900
Sbjct	1351	GGGCCTTGTACACACCCGCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCG-AAGC-CGGTGG	1408
Query	901	CCATGAACCCCTTGTGGGGAGAGAGCCG 928 	
Sbjct	1409	CC-T-AACCCCTTGTGGG-AGGGAGCCG 1433	

> Fr 14.1 A

GGGCCGCGCAGCGCAATACTGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTCTCTCATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTG
AGTACATGTGGGTACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAAAATTTGAACC
GCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTGACTTATGGATGGACCCGCGTCGCACTCGCCAGTTGGTGAG
GAACGGCTCTCAAGGCAACGTTTCGTAGCGGATCTGAGAGGGTTCATCGGCCGCACTAGACTGAGACACGATCCAGA
CTTATACGGGAGGAGCTGTTCGGGAATCTTCCGCAATGTACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAGTATGAGG
CTTTCGGGTCGTAATAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGGTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTC
ATCAGATAGCCACGGCTAACTACGTGCCATCAGCTGCGGTGATGCGTAGGTCGCAAGCGTTATCCCGTATTATTC
GGGCGCAAGCGCTCGCAGTTTGTTCCTAAGTCTCATGTGACAGCCACGCTCATCCGTGAGCGTCATTTGAACT
GGAGACTTGAGTACAGAAGAGAAAGTATTCCATGTGTGCGTGAATGCGTGAGATATGGAGGACACAGTTGCGAT
GCGACTTTCTGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAACGCTGTGGAGCAACGGATAGATACCCGTAGTACACGCCG
TAAACATAGTCTACGTTTAGAGGGTTCCGCCCTTAGGCTGAGTACGCATTAGCACTCCGCCCTGGGGTACGGCGCA
GTTAAACTCAAGGATGACGGGGCCCGACAGCGTGGAGCATGGTATTCGAAGCACCGAGACTTACAGGCTGGATCT
CTGAACCTAGAGAAGCTCTCCTCGGACGAGTCAGGTGCATGTTTGTGCGCTGTTCTGAGAATTGGTAGTCTCTCA
CAGCCACTGTACTTGTCCACTATAAGTGGACCTTAGGGAGTCCGTGACTCCG.

(Fr 14.1 A: *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rrnA), partial sequence)

Sequence ID: [NR_074540.1](#) Length: 1512 Number of Matches: 1

Range 1: 50 to 961 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1026 bits (555)	0.0	804/913 (88%)	62/913 (6%)	Plus/Plus

Annexes

Query	15	AATAC-TGC-AGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTT-CTCTCATGAAGTTAGCGGCGGACG 	71
Sbjct	50	AATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACG	109
Query	72	GGTGAGTA-CATGTGGGT-ACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC-GGGCT 	128
Sbjct	110	GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCAGGGGCT	169
Query	129	AATACCGGATAA-ATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATGAAAGGCGGCTTCGGCTGTGAC 	187
Sbjct	170	AATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATGAAAGGCGGCTTCGGCTGTGAC	229
Query	188	TTATGGATGGACCCGCGTCGCACTCGCCAGTTGGTGAGG-AACGGCTC-TCAAGGCAACG 	245
Sbjct	230	TTATGGATGGACCCGCGTCGCACTTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACG	289
Query	246	-TTCGTAGCGGATCTGAGAGGGTCATCGGCCGCACT-AGACTGAGACACGATCCAGACTT 	303
Sbjct	290	ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	349
Query	304	ATACGGGAGG-AGCTGTGCGGAATCTTCCGCAATGTACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC- 	361
Sbjct	350	CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC	409
Query	362	GCGTGAGT-ATG-AGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA 	419
Sbjct	410	GCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA	469
Query	420	GGTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTCATCAGATAGCCACGGCTAACTACGTGCCA 	479
Sbjct	470	GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA	529
Query	480	TCAGCTGCGGTGATGCGTAGGTGCGCAAGCGTTATCCCGTATTATTCGGGGCGC-AAGCGCT 	538
Sbjct	530	GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT-GGGCGTAAAGCGCG	588
Query	539	CGCAGTTTGTTCCTTAAGTCTCATGTGACAGCCCACG-CTCATCCGT-GAGCGTCATTTG 	596
Sbjct	589	CGCAGTGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGG	648
Query	597	AA-CT-GGAGACTTGAGTACAGAAGAG-AAAGTG-A-TTCCATGTGT-GCG-TGAA-TGC 	648
Sbjct	649	AAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGC	708
Query	649	GT-GAGATATGGAGGA-CAC-AGTTGCGATG-CGACTTCT-GTCTGTAAGTACTGACTGA 	703
Sbjct	709	GTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGA	768
Query	704	GGCGCGAACGC-TGTGGAGCAA-C-GGAT-AGATACCCTG-TAGTC-ACGCCGTAAAC-A 	756
Sbjct	769	GGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA	828
Query	757	T-AGT-CTACGT-TTAGAGGGTT-CCGCCCTT-AG-GCTGA-GT-A-CGCATT-AGCACT 	806
Sbjct	829	TGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTCCGCCCTTATAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT	888
Query	807	CCGCCTGGGG--TACGGC-GCA-GT-T-AAACTCAA-GGA-T-GACGGGG-CCCG-ACA- 	854
Sbjct	889	CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA	948
Query	855	GCG-TGGAGCATG 866 	
Sbjct	949	GCGGTGGAGCATG 961	

Query	474	GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGGAAGCGTTGTCCGGGAATTATTGGGCGTAAAG	533
Sbjct	497	GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC-GGAATTATTGGGCGTAAAG	555
Query	534	GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTTC AACCGGGGAGGGTCA	593
Sbjct	556	GGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGTTC AACCGGGGAGGGTCA	615
Query	594	TTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG-ATTCCACGTGTAGCGGTGAA	652
Sbjct	616	TTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAA	675
Query	653	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG-CGAA-GCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACG	710
Sbjct	676	ATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA ACTGACG	735
Query	711	CTGAGGAGCGAAA-CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT-A	768
Sbjct	736	CTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA	795
Query	769	ACGATGAGTGCTA-GTGT-AGGGG-TTTCG-CCCTTAGTGCTGCAGCTA-CGCATT-AG	822
Sbjct	796	ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAG	855
Query	823	CACTCCGCTGGG-AGTACG-TCGC-AGACTGAAACTCAAAG-A-T-GACGGGG-CCC GC	875
Sbjct	856	CACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC	915
Query	876	ACA-G-GGTGGAGCATGTG-T--A-T-CGA-GCA-CG-GA-GA-C-T-AC-AG-TCT-GA	918
Sbjct	916	ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTGA	975
Query	919	CATC-TCTGACA-TC-TAG-GA-AG-ACGTCCC	945
Sbjct	976	CATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCC	1008

> T 6 E

GAGGGGTTCGGCTGGCTCTCCAGTCCCTCCGAATTAGACTATGACTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTG
ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCA
ACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCAC
CTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTTG
CGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTC
CCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAG
GCGGTCAACTTAATGCGTTAGTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTC AACCGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGT
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTTGTGCGC
CTTCGCACTGTGTTCTTACTATATCTACGCATTTACGCTACACAGAAATTC AACCAACCTCTACGTACTCTAGC
TGCAGTTTGAATTGCAGTTCCAGTTTGTAGCCCTGGACTTTCACATCGGAGCTAGCGATCAGCTACGCGCGTGC
GTCAGGTAGTCGATGATGCATGCACCTCGTCAT

(T 6: Pseudomonas monteilii 16S ribosomal RNA, complete sequence)

Sequence ID: [ref|NR_121767.1](#) Length: 1539 Number of Matches: 1

Range 1: 568 to 1455 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1430 bits (774)	0.0	856/892 (96%)	20/892 (2%)	Plus/Plus

Annexes

Query	22	GTCCTCCCGAA--TTAGACTATGACTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGG	79
Sbjct	1455	GTCCTCCCGAAGGTTAGACTA-G-CTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGG	1398
Query	80	GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGC	139
Sbjct	1397	GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGACATTCTGATTGCGGATTACTAGC	1338
Query	140	GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGA	199
Sbjct	1337	GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGA	1278
Query	200	GATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAG	259
Sbjct	1277	GATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAG	1218
Query	260	CCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACC	319
Sbjct	1217	CCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACC	1158
Query	320	GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTTGCCT	379
Sbjct	1157	GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTT-GCGCT	1099
Query	380	CGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG	439
Sbjct	1098	CGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG	1039
Query	440	TGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTG	499
Sbjct	1038	TGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCCTG	979
Query	500	GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG-CCCC	558
Sbjct	978	GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCC	919
Query	559	GTC AATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGT	618
Sbjct	918	GTC AATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGT	859
Query	619	TAG-TGCGCCACTAAAATCTCAAGGATCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGG	677
Sbjct	858	TAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGG	799
Query	678	ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCC-ACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCA	736
Sbjct	798	ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCA	739
Query	737	GTCCAGGTTGTGCGCTTCGC-ACTG-TGTT-CCTACTATATCTACGCATTTAC-GCTAC	792
Sbjct	738	GTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTAC	679
Query	793	ACA-GAAATTCAACCAACCTCTAC-GTACTCTAGCT-GC-AGTTT-GAATTGCAGTT-CC	846
Sbjct	678	ACAGGAAATTCCACCACCTCTACCGTACTCTAGCTGCCAGTTTTGGAT-GCAGTTCCC	620
Query	847	AGTTTGAGCCCTGGACTTTCACATCGGAGCTAGCGAT-CAGCTACGCGCGCT	897
Sbjct	619	AGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACGAACCACCTACGCGCGCT	568

> T7.1 H

TCGATTACCGCTCGCACTGTAGTCGTACGAGGTAGCCTAGTAAGACTCTTCGGAGGGAAGGCAGTGAATGAGCG
 GCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGGAACCTGCCTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGG
 ATAGTTCAACGGACCGCATGTTCCGTTGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGTCATTAG
 CTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGCGCAAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGTGCAC

TGCCTGGTGAGTGATGAAGGTCTTCTCATCATAAGAGTCTATTGTAACCGAGGACCACGTATCAGCGTTAATGCT
 CGAGCATAGACTTGACCTCACGAGCGAGCAACGGCTTATTACGAGTCAGCAGCGGCGTTCGTGCTTATTCGAATT
 GCATTGCATGGTATTATGCTTGGGCGAGCGCGGTAGACTGCCTTTTAGAGTCTGATGTGAGAGCGGCCGTGCTCA
 GCGGGGAGGTCCATTGGGATACTTGCAGGCCTTGAGTGCCGAGACACGACTAGCACTCAGACGTGTAGCGGTGAG
 ACGCTGTAGAGATGTGGAGTACATCAGTGTGATGCCCCGACTCTTTCGCCTGTCACCTGACGTGACGCAGCGAA
 AGGGGTGGCGCATGCCACACATGAATTGGCTCTCCAGTAGTCCACCCTTGTAACCGGATGACGTGCTAGTGCTA
 GGCGTGTCTTTCCGTCACTCAGTGTGCTGCACTACGAATTGAGGCTCCTCCCGCTGGGGCGGAGGTGCGTCTGACAA
 GTCTGAAATACTCAAAGGCCACTGACGGGAGCTTTTCGACACCCGGATTGTATGCCGTAGTCCTTATGTTTCATCA
 GCGTTTAGCGAGCCT
 TCACGAACT

(T 7.1 H: Exiguobacterium acetylicum strain DSM 20416 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)

Sequence ID: [ref|NR_043479.1](#)|Length: 1550Number of Matches: 1

Range 1: 75 to 868[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
693 bits (375)	0.0	677/819 (83%)	36/819 (4%)	Plus/Plus
Query 45	ACTCTTCGGAGGGAAGGCAGTGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGGAACC	104		
Sbjct 75	ACTCTTCGGAGGGAAGGCAGTGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAAGGAACC	134		
Query 105	TGCCTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGTTCAACGGAC	164		
Sbjct 135	TGCCTCAAGGATTGGGATAACTCCGAGAAATCGGAGCTAATACCGGATAGTTCAACGGAC	194		
Query 165	CGCATGTTCCGTTGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGT-CATT	223		
Sbjct 195	CGCATGTTCCGCTGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTTGAGATGGCCTTGCGGTGCATT	254		
Query 224	AGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG	283		
Sbjct 255	AGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTG	314		
Query 284	ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGCGCAA	343		
Sbjct 315	ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG-AA	373		
Query 344	TCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGT-GCACTGCCTGGTGAAGGTCTTCTC	402		
Sbjct 374	TCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGGTTTTCCG	433		
Query 403	ATCATAAGAGTCTATTGTAACCGAGGACCACGTATCAGCGTTAATGCTCGAGCATAGACT	462		
Sbjct 434	ATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACACGTACGAGAGGTAATGCTCGTACCTTGACG	493		
Query 463	TGACCTCACGAGCGAGCAACGGCTTATTACGAGTCAGCAGCGGCGTTCGTGCTTAT-TCG	521		
Sbjct 494	GTACCTTACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG	553		
Query 522	AATTGCATTGCATGGTATTATGCTTGGGCG---AGCGCGGTAGACTGCCTTTTAGAGTC	578		
Sbjct 554	CAA-GCGTTGTCCGGAATTAT--T-GGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGCTTTTA-AGTC	608		
Query 579	TGATGTGAGAGCGGCCTGCTCAG-CGGGAGGTCCATTGGGATACTTGACGGCCTTGAGT	637		
Sbjct 609	TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAA-ACTGGAAGGC-TTGA	666		

Query	323	GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCAGAGATGGATCTGGTGGCTTC	382
Sbjct	918	GAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCAGAGATGGAT-TGGTGCCTTC	976
Query	383	GGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT	442
Sbjct	977	GGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG-T	1035
Query	443	TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCT	502
Sbjct	1036	TAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCT	1095
Query	503	AAGGAGACTGCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC	562
Sbjct	1096	AAGGAGACTG-CCGGTACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCC	1154
Query	563	CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGA	622
Sbjct	1155	CTTACGGCCAGGGCTACACACGTGTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGA	1214
Query	623	GGTGGAGCTAATACCATAAAAACCGATCGTAGTTCGGATTGCAGTCGGCAACTA-ACTTAG	681
Sbjct	1215	GGTGGAGCTAATCCCATATAAAAACCGATCGTAGTTCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCG	1274
Query	682	TGAAGTCGGAATTTTTAGTATTCTGAATCAGTATTACTCGGTGCAAT	729
Sbjct	1275	TGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTG-AAT	1321

>Fe 4.1 H

GTTAAAACCGAGTCGCACTACTGTATCCAGTATTACCTACATACGACGTTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTG
 TGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGAAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGC
 TTCATGTAGGGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGACTTTATCGGATTAGCTCCCTCTCGCGAGTTGG
 GAACCGTTTGTATCGCCATTGGAGAACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGACTTCCAC
 ACCTTCCTCAGGCTTGTGCGAGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCCACTAAGATCAAGGGTTGC
 GCTCGTTGGGGGGGCTTAACCCAACCTCTCACGACACGAGCTGACGAAAACCATGCACCACCTGTCGCCGTTGCC
 CCGGAGGGGCAAAACCTTATATCTACAGGGGGAAAACGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGGGGTTGCTT
 CGAATTAATAAATAATTGCTCCACCGCTTGTGCCGGGCCCTTTCTTTACCTTTGAGTTTAAGTCTGCGGCCCGT
 CCTCCCAAGGGCGGAGTGCTTAATGCAATACTTGCAGCACTAAGGGGCGGAAGCCCCCAAGTCTTAGCACTCA
 ACGCTTACAGGGTTGACAGCAAAGCCATCTACATCCTGTTTCGATTCCGTCGCTTTCGCGCCTCAGAGGCGCGTA
 AAGGGTCGAGATGGTAGCCGTTCTCAGATAGTGTGCCAGTCCAATCTCTTCGACGATCACTGCTTACGCTGTGAG
 AGTTCTATTCTGCCTCTTCAGGCCCTGCAGGTCTCCGCAGTTATCCACTCACCCCTCCAGAGTTAGAGCCCCGCA
 GCTTGCACACTTCAGACGTAATGAAGCGACCGTCCGCCAGCATTTGAGTGCCGACATGTGTGCTGGATCCGGAT
 GCAACGCTGACGTATCCTACCGAGGTCTGGACACTCTGTTGACCACGTTGCTCT.

(Fe 4.1 H: *Lysinibacillus mangiferihumi* strain M-GX18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence)

Sequence ID: [ref|NR_118146.1|](#) Length: 1452 Number of Matches: 1

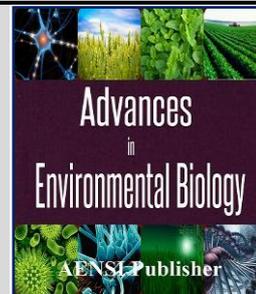
Range 1: 560 to 1419 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	859 bits (465)	0.0	757/894 (85%)	36/894 (4%)	Plus/Plus	
Query	108		TTCATTACGTCTGAAGTGTGCAAGCTCGCGGGCTCTAACTCTGGAGGGGTGAGTGGATAA			167
Sbjct	560		TTC-TTAAGTCTG-A-TGTGAAAGCCACGG-CTC-AACCGTGA-GGGTCATTGGA-AA			612
Query	168		CTGCGGAGACCTGCAGGGCCTGAAGAGGCAGAATAGAACTCTCACAGCGTAAGCAGTG-A			226
Sbjct	613		CTG-GGAGACTTG-AGTG-CAGAAGAGG-ATAGTGGAAATTC-CA-AGTGT-AGCGGTGAA			665

Annexes

Query	227	TCGTCGAAGAGA-TTGGACTGGCACACTATCTGAGAACGGCTACCATCTCGACCCTTTAC	285
Sbjct	666	ATG-CGTAGAGATTGGA--GGAACACCAGTGGCGAA-GGCGACTATCT-GGTCTGTAAC	720
Query	286	GCGCCTCTGAGGCGCGAAAGCGACGGAATCGAAACAGGATGTAGATGGCTTTGCTGTCAA	345
Sbjct	721	-TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC-AAACAGGAT-TAGATACCCTGGTAGTCCA	777
Query	346	CCCTGTAAGCGTTGAGTGCTAAGACTTgggggggCTCCGCCCTTAGTGCTGCAAGTAT	405
Sbjct	778	CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT-AGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAA	836
Query	406	TGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGAGGACGGGCCGAGGACTTAAACTCAAAGGTAAAGA	465
Sbjct	837	CGCATTAAGCACTCCGCC-TGGGGAGTAC-GGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA	894
Query	466	AAGGGCCCCGGCACAAGCGGTGGAGCAATTATTTTTAATTCGAAGCAACCCGAAGAACC	525
Sbjct	895	CGGGGGCCC-GCAC AAGCGGTGGAGCA-TGTGGTTTAAATTCGAAGCAA-CGCGAAGAACC	951
Query	526	TTACCAGGTCTTGACATCCCCTTTCCCCCTGTAGATATAAGTTTTGCCCTCGGGGGC	585
Sbjct	952	TTACCAGGTCTTGACATCCCCTTGACCCTGTAGAGATATGGTTTT-CCCTTCGGGGAC	1009
Query	586	AACGGCGACAGGTGGTGCATGGTTTTCGTCAGCTCGTGTGAGAGGTTGGGTTAAGcc	645
Sbjct	1010	AACGGTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG-T	1068
Query	646	ccccAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTG	705
Sbjct	1069	CCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTG	1128
Query	706	ACTGCCTGCGACAAGCCTGAGGAAGGTGTGGAAGTCGTCAAATCATCATGCCCTTATGA	765
Sbjct	1129	ACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA	1188
Query	766	CCTGGGCTACACACGTTCTCCAATGGGCGATACAAACGGTTCCCAACTCGCGAGAGGGAG	825
Sbjct	1189	CCTGGGCTACACACGTTCTACAATGGGCGATACAAACGGTTCCCAACTCGCGAGAGGGAG	1248
Query	826	CTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCCCCTACATGAAGCC	885
Sbjct	1249	CTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCC	1308
Query	886	GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTTCCGGGCCTTGTACA	945
Sbjct	1309	GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACA	1368
Query	946	CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAACGTCGTATGTAGGTAA	999
Sbjct	1369	CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAA-GTCGG-TG-AGGTAA	1419



Characterization of epiphytic bacterial communities from *Phoenix dactylifera* growth in South east of Algeria and the effect of climatic changes on their biodiversity.

¹Wissame Aimene, Ismail Bouden, Mohammed Bouzyani, ²Natalie Ferry, Arvind Swamy, ¹Yacine Benhizya.

¹Molecular and Cellular biology laboratory, University of Brother Mentouri Constantine, Route Ain el Bey, Constantine 25017, Algeria.

²School of Environment and Life Sciences, University of Salford, M5 4WT, United Kingdom.

Address For Correspondence:

Wissame Aimene, Molecular and Cellular biology laboratory, University of Brother Mentouri Constantine, Route Ain el Bey, Constantine 25017, Algeria.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 12 August 2016; Accepted 17 December 2016; Available online 22 December 2016

ABSTRACT

Because of the economic importance of plant health, most researches on date palm tree associated microorganisms have focused on pathogens, such as fungal pathogens. These pathogens cause the death of tree or cause particular symptoms with a decrease or complete loss of date production. No study addressed the diversity of epiphytic bacteria on date palm fruits and other plant parts, such as leaves and trunk of date palm tree. In the current study, different parts of *Phoenix dactylifera* in the south east of Algeria were investigated for their diversity in epiphytic bacteria. The quality and the quantity of bacterial community on leaves, as well as on date, and trunk were studied by using phenotypic (Gram staining, Sugar and amino acid assimilation tests, enzymatic tests such as carboxymethyl cellulose, API system) and molecular (16s rRNA gene sequencing) methods. 78 isolates obtained from different organs of palm trees were identified in their genera and species. Analyses of cultivable bacteria revealed differences in the populations in each ecosystem. The greatest diversity of genera was found in trunk samples, followed by leaves, and date palm fruit. The identification of isolates revealed that some genera like *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter*, were present in all ecosystems, but in different amounts, while others were ecosystem-specific.

KEYWORDS: *Phoenix dactylifera* L., Epiphytic bacteria, Biodiversity,

INTRODUCTION

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is one of the oldest trees in the world [4,19] and the major fruit trees in most Arabian countries like Iraq, Saudi Arabia, Egypt, Iran, Arabian Peninsula and Algeria [3]. The production of dates, according to Food and Agriculture Organization (FAO) statistics in 2006 in the Arab countries, was 71.69% of total world production. Algeria count 18.7 million palm trees scattered over 169361 ha which produce almost 690,000 metric tons [2]. Also, Algeria is a genetic centre of date-palm trees and there are about 1 miller different cultivars of fruiting date palm [8]. Like all other fruiting trees, date palm is infected by many pathogens and ravagers. So far studies of microorganisms associated with phyllosphere of date palm tree had mainly focused on pathogens responsible for plant diseases, for example, *Fusarium oxysporum albis* sp. caused bayoud disease which killed about 15 million trees in Algeria and Morocco [12]. The Agricultural industries sustained huge crop losses as a result of fungal diseases of fruits and plants [29]. More recent investigations have studied the microbial quality of the date palm fruit in sold [16, 17, 29], and have shown that

the date palm fruits are mostly loaded with a mixture of microbes; bacteria, molds and yeast. Others researchers have concentrated on microorganisms of date which can affect the microbiological quality of dates and doing spoilage during the period of storage [19, 2]. No information is available about the epiphytic bacteria on other plant parts, like leaves and trunk. Many bacteria within the phyllosphere are now being exploited as a source of biological agents for future biotechnological applications or the isolation of bioactive compounds [24]. Moreover, the understanding of epiphytic bacterial ecology and their mechanism of adaptation against climatic changes has a scientific importance [30]. This is the first study on date palm tree phyllospheric bacteria able to grow on this vegetal which can be offer a new perspective in the research of unexplored sources of strains. In the current study, phenotypic and molecular methods were used to characterize and compare the bacterial community size and structure on trunk of palm tree, leaves, and date fruits. Specific taxa from each ecosystem as well as taxa common to all ecosystems were identified. The results provide insights into the relations between epiphytic bacteria in different parts of tree.

MATERIAL AND METHODS

Sampling collection and isolation of bacteria:

This study was performed in Tolga region, Wilaya of Biskra, southeast of Algeria (34° 43' 15" N / 5° 23' 2" W, 128 m altitude), in 2011/2012. One field was selected and 15 trees were harvested during 4 seasons. The samples of date palm fruits, leaves, and trunks were collected aseptically and conserved in sterile bags and transported in an icebox to the laboratory where microbiological analysis was carried out. To obtain bacterial suspensions, 1 g of each sample was immersed in 9 ml of nutrient broth and incubated at 28 °C for 24 hours. Aliquots of 100µl of the suspensions were spread on nutrient agar supplemented with 30 µg.ml⁻¹ of fluconazole to prevent fungal growth. Bacterial populations were estimated after incubation at 28°C for 2–5 day. Every characteristic colony was picked off and purified. The purified isolated were re-streaked by triple on inclined nutrient agar tubes and preserved 4°C and some storied in 50 % glycerol/nutrient broth at -20°C.

Phenotypic Characterization:

A number of preliminary phenotypic tests were carried out as a step of screening. The colonies were observed and described for their colony characteristic, Gram staining. The isolates were tested for their ability to metabolize glucose and amino acid, their enzymatic activity such as oxidase, catalase, urease and their capacity of degrading carboxymethyl cellulose (CMC), for their resistance to increasing and decreasing pH, and the growth at different temperature. The physiological and biochemical tests were performed for the representative strains using the API 20NE, 20E, 50CHL, and API Staph system (BioMe'rieux, Marcy l'Etoile, France) following the manufacturer's instructions. The data obtained were coded in binary form and compared with those in bergay's manual to get the identity of these bacteria.

Molecular characterization by determination of 16s rRNA gene sequences:

For DNA extraction:

strains were grown in nutrient broth for 24 h. Cells were collected by centrifugation at 5000 g for 10 min and 300 µl of lysis buffer was added. Series of thermal shock was carried out and 5 µl of proteinase K was added to each microtube and followed by incubation of samples for 30 min at 37°C. After incubation, 500µl of phenol chloroform isoamyl alcohol was added and mixed. A centrifugation at 10,000 rpm for 10 min was carried out and the top (aqueous) phase containing DNA was carefully removed and transformed to a new microtube. 50 µl of 3M sodium acetate was added and mixed briefly and followed by addition of 500µl of 100% ethanol. After centrifugation, the supernatant was removed carefully leaving the DNA on the tube wall and 70% ethanol was added followed by centrifugation. The pellet obtained was dissolved in 50 µl AE buffer and stored in -20 until use.

Amplification by PCR:

DNA extracted from the isolates was used as template for PCR amplification. PCR was performed using a MyTaq™ Red Mix reagent kit following the manufacturer's instructions (Bioline, UK). For 16S rRNA gene amplification, the following primers were used: Forward fd1 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' and reverse rP2 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT -3' [32] at a final concentration of 0.2 µl.mol. PCR conditions were as follow: preheating at 94 °C for 1 min; 30 cycles of denaturing at 94 °C for 30 s; annealing at 53 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 2 min. The PCR product was electrophoresed on 1% agarose gel and observed using the GBOX. Each amplified PCR product was sequenced using smartseq kit sequencing system (Eurofin.). The sequences obtained were aligned and compared with references in the GenBank, using the NCBI Basic Local Alignment Search Tools (BLASTn) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) in order to identify each microbe. The Sequences were aligned using the Clustal W and phylogenetic trees of the three most abundant genera were constructed using the neighbour-

joining (NJ) algorithms in Mega 5 software. The distances were calculated according to Kimura's two-parameter model and the confidence of the tree topology was tested by 1000 bootstrap replicates.

Nucleotide sequence accession numbers:

All 16S rDNA sequences determined in this study have been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers LN995728 to LN995802

Results:

The first step in the process was to screen and identify bacteria using a combination of macroscopic and microscopic characteristics. The use of all this information allowed classifying bacterial isolates obtained from leaves, trunk, and fruits of date palm tree into different groups: Bacilli Gram positive, Bacilli Gram negative, cocci Gram negative, and cocci-bacilli. Bacterial isolates were also evaluated for their growth at different pH and temperature. They were also evaluated for their ability to metabolize glucose and amino acid and their enzymatic activity such as urease, oxidase, catalase, and carboxymethyl cellulase. At the end of the screening step, representative bacterial isolates of each group were selected for phenotypic identification using API system. 36 isolates were identified as *Bacillus sp.* 25 isolates rods Gram negative were differentiated by oxidase test and identified as *Pseudomonas sp.* for 12 isolates and 13 strains were identified as *Enterobacter sp.* One isolate was identified as *Staphylococcus*, while we couldn't identify many others bacteria by using API system. Most of these strains were found degrading carboxymethyl cellulose, producing urease. The use of molecular biology was obligatory to confirm the identity of these strains into genus and species levels using 16s rRNA gene sequence. In this study, we used 16S rRNA sequencing to confirm the identity of presumptive bacterial isolates. Figure 1 shows the analysis of some PCR products by electrophoresis on agarose gel compared to the Hyper Ladder I which is a molecular marker. It shows that the right band existed and the 16s RNA gene sequence is amplified (figure 1).

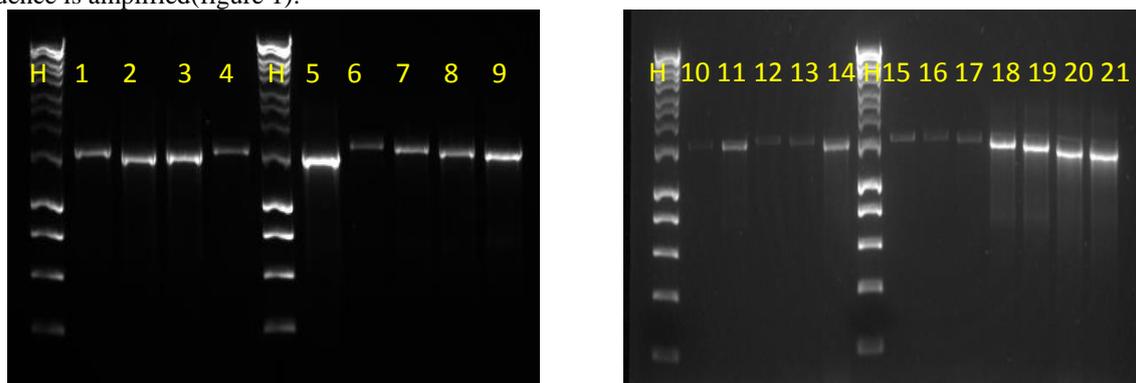


Fig. 1: 1% agarose gel electrophoresis of PCR products result of amplification of 16s rDNA of our strains. H: Hyper Ladder I. 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14, 15, 16,17,18 19,20,21:bands of 16s rDNA of some strains isolated in our study.

The universal primers (Fd1 and RP2) used in this study were able to generate amplicons for all isolates (78 isolates) but five of them couldn't be identified when compared with those held in NCBI database. Comparisons of 16S rDNA sequences with those held in NCBI revealed that twenty eight isolates, distributed in different parts of plant, belong to the *Bacillus* genus, twelve isolates belong to the *Pseudomonas* genus and thirteen isolates belong to the *Enterobacter* genus. The Comparisons of 16S rDNA sequences revealed also that seven isolates belong to the *Lysinibacillus* genus which was classified according to phenotypic characteristic as *Bacillus spp.* The analysis of 16S rRNA gene sequence of fifteen isolates revealed the presence of other bacterial genera such as *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, *Brevibacterium halotolerans*, and *Uncultured bacterium* (table 1). Twenty eight of these isolates could be identified to within 97% similarity of bacterial 16S rDNA genes in the NCBI 16S rDNA, while the remaining 45 sequences were seen to have between 96 and 78% similarity to database entries.

Table 1: Percentages of homology of the 16S rDNA sequences obtained from our isolates to 16S rDNA of reference strains held in GenBank

Isolats	Description	% similarity	Accession number
Fr 2.2 H	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	LN995746
Fe15.2 P	<i>Pseudomonas putida</i>	99	LN995778
T 7.4H	<i>Pseudomonas putida</i>	92	LN995744
T9.1 A	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	90	LN995792
T10.1 A	<i>Pseudomonas putida</i>	92	LN995789

T 3.3 E	<i>Pseudomonas putida</i>	99	LN995731
T 6 E	<i>Pseudomonas monteilii</i>	96	LN995732
T9.1E	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	LN995733
T12.1 E	<i>Pseudomonas putida</i>	97	LN995734
T14.1 E	<i>Pseudomonas monteilii</i>	97	LN995735
T14.2 E	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99	LN995736
T4.4 E	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	95	LN995738
T1.3 P	<i>Pseudomonas monteilii</i>	99	LN995757
T7.3 P	<i>Pseudomonas putida</i>	99	LN995765
T 15.2 P	<i>Pseudomonas putida</i>	99	LN995769
Fr 11 E	<i>Enterobacter kobei</i>	99	LN995755
Fr 9.1 H	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99	LN995752
Fr 9.2 H	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	96	LN995753
Fr 12.1 A	<i>Enterobacter mori</i>	91	LN995786
Fe9.3 P	<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	LN995777
Fe 9.2 H	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	91	LN995754
T1.1 P	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99	LN995756
T11.1 P	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	100	LN995770
T11.3P	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99	LN995771
T11.1 H	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	99	LN995766
Fr 1 E	<i>Bacillus cereus</i>	85	LN9955800
Fr 15.1 E	<i>Bacillus toyonensis</i>	95	LN995802
Fr 8.1 A	<i>Bacillus subtilis</i>	90	LN995784
Fr 9.1 A	<i>Bacillus subtilis</i>	90	LN995783
Fr 14.1 A	<i>Bacillus toyonensis</i>	99	LN995787
Fr 5.1 H	<i>Bacillus cereus</i>	93	LN995747
Fr 4.1 H	<i>Bacillus tequilensis</i>	92	LN995746
Fr 3.1 H	<i>Bacillus cereus</i>	85	LN995748
Fe 5.2 H	<i>Bacillus cereus</i>	92	LN995749
Fe1.2 P	<i>Bacillus thuringiensis</i>	96	LN995775
Fe 7.1 P	<i>Bacillus cereus</i>	86	LN995772
Fe 8.1 P	<i>Bacillus cereus</i>	91	LN995773
Fe10.1 P	<i>Bacillus safensis</i>	100	LN995774
Fe5.3E	<i>Bacillus cereus</i>	88	LN995795
Fe 14 E	<i>Bacillus cereus</i>	93	LN995799
Fe 4.1 E	<i>Bacillus subtilis</i>	92	LN995798
Fe14.1A	<i>Bacillus thuringiensis</i>	94	LN995780
Fe 6.1A	<i>Bacillus mojaviensis</i>	91	LN995779
Fe9.1 A	<i>Bacillus mojaviensis</i>	96	LN995781
Fe 8.1A	<i>Bacillus mojaviensis</i>	95	LN995782
T4.2 H	<i>Bacillus mojaviensis</i>	78	LN995743
T8.1 A	<i>Bacillus toyonensis</i>	99	LN995791
T14.3 A	<i>Bacillus cereus</i>	91	LN995788
T5.2 E	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99	LN995728
T8.1 P	<i>Bacillus toyonensis</i>	95	LN995766
T13.1 P	<i>Bacillus anthracis</i>	90	LN995764
T7.2 P	<i>Bacillus licheniformis</i>	88	LN995761
T2.1 P	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	LN995758
Fe 4.1 H	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	91	LN995750
Fe 8.4 H	<i>Lysinibacillus macroides</i>	93	LN995751
Fe 2.1 E	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	86	LN995796
T6.2 H	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	96	LN995739
T7.3 H	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	97	LN995741
T 13.1 E	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i>	94	LN995729
T13.2P	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	99	LN995763
T9.1P	<i>Lysinibacillus macroides</i>	91	LN995762
Fr 13.1 E	<i>Massilia suwonensis</i>	85	LN995801
Fr 6.1 A	Uncultured bacterium	88	LN995785
Fe9.2 P	<i>Erwinia uzenensis</i>	99	LN995776
Fe 5.2 E	[<i>Brevibacterium</i>] <i>halotolerans</i>	93	LN995797
T7.1H	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	83	LN995744
T9.1 H	<i>Klebsiella oxytoca</i>	83	LN995740
T7.1 A	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	94	LN995793
T7.2 A	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	93	LN995794
T9.3 A	<i>Serratia marcescens</i>	81	LN995790
T1.1 E	<i>Microbacterium foliorum</i>	89	LN995730
T 10.2 E	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	99	LN995737
T2.2 P	<i>Staphylococcus cohnii</i>	94	LN995759
T3.2 P	<i>Arthrobacter luteolus</i>	99	LN995760
T4.2 P	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	LN995767
T 10.2 P	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	LN995768

From 16S rDNA sequence analysis, 73 remaining isolates were assigned to 16 different genera representing 33 species; and 5 isolates couldn't be identified. The distribution of each genus varied according to the type of sample (Table 2).

Table 2: Diversity of bacteria within different samples among different seasons

Bacterial genera	Winter			Spring		Summer			Automme			Total	
	Source of isolation									Leaves	Fruit s		Trunk
	Leaves	Fruits	Trunk	Leaves	Trunk	Leaves	Fruits	Trunk					
Bacillus	1	3	1	4	4	3	2	1	4	3	2	28	
Pseudomonas	0	1	1	1	3	0	0	5	0	0	2	13	
Lysinibacillus	2	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	8	
Enterobacter	1	2	1	1	3	0	1	2	0	1	0	12	
Kluyvera	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
Arthrobacter	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
Stenotrophomonas	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	
serratia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
klebsiella	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Exiguobacterium	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	
Micrococcus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Staphylococcus	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
Erwinia	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
Brevibacterium	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	
Massilia	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
Microbacterium	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
Total of genera	3	3	6	4	7	3	3	6	5	2	4		

The strains belonged to five different bacterial classes (Beta and gamma Proteobacteria, actinomycetia, and Bacilli). Trunk samples contained 6, 7, 6, and 4 genera, in winter, spring, summer, and autumn, respectively. The genus *Pseudomonas* was the most abundant in this part, followed by *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Lysinibacillus*. In addition, trunk samples were covered by 8 other genera of bacteria considered as occasional occupier (1, 63% - 2, 73%). Leaves samples contained 3, 4, 3, and 5 genera, in winter, spring, summer, and autumn, respectively. The most abundant genera in this part were *Bacillus*, followed by *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, and *Erwinia*. Fruit samples contained 3, 3, and 2 genera in winter, summer, and autumn, respectively and the predominant genus was *Bacillus*, followed by *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Masillia*. Some of the genera - *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Bacillus*- were present in all ecosystems, although with varying abundance. Some other genera (*Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *serratia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Exiguobacterium*, *klebsiella*) were found in trunk samples among different seasons, but were absent from leaves and fruits. *Lysinibacillus* was found in leaves and trunks, *Brevibacterium* was present only in leaves in two seasons and *Masillia* was only present on fruit in one season.

The phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining (NJ) algorithms in Mega 5 software. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that the isolates were diverse phylogenetically and this diversity allowed constructing different trees with variances in the distance of divergence.

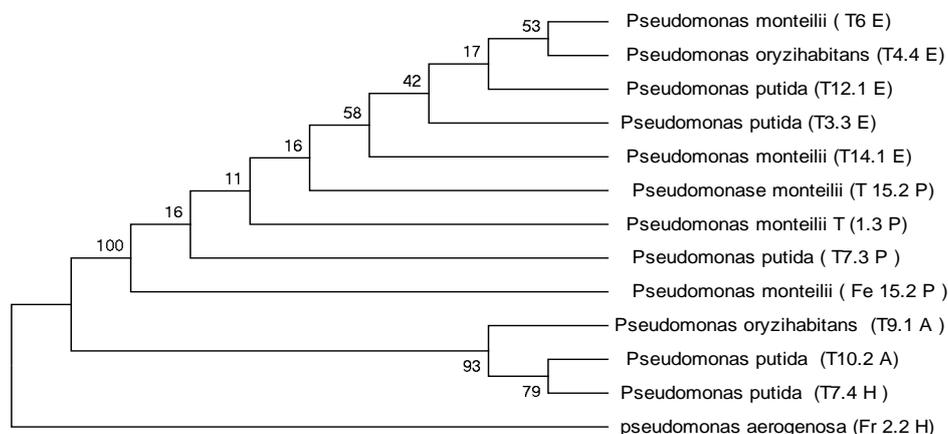


Fig. 2: Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of *Pseudomonas* strains isolated in this study. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 replicates.

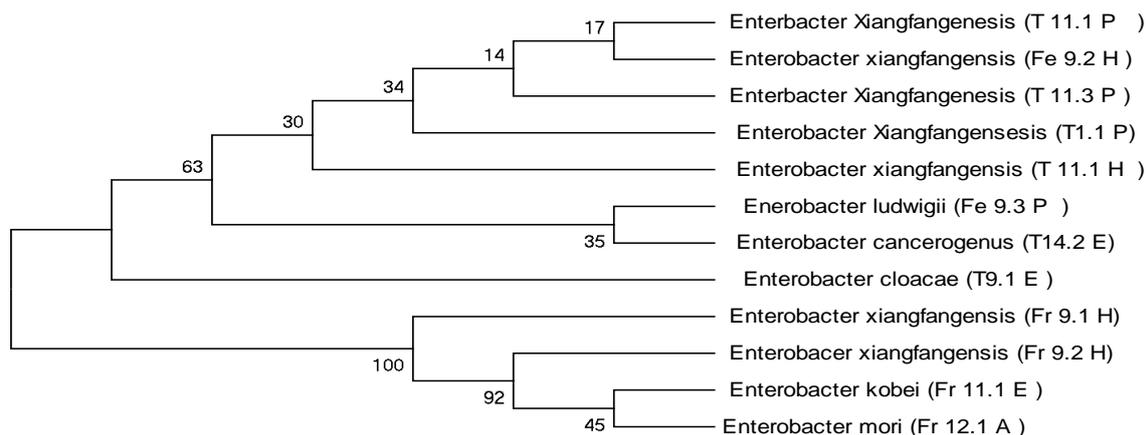


Fig. 3: Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of *Enterobacter* strains isolated in this study. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 replicates.

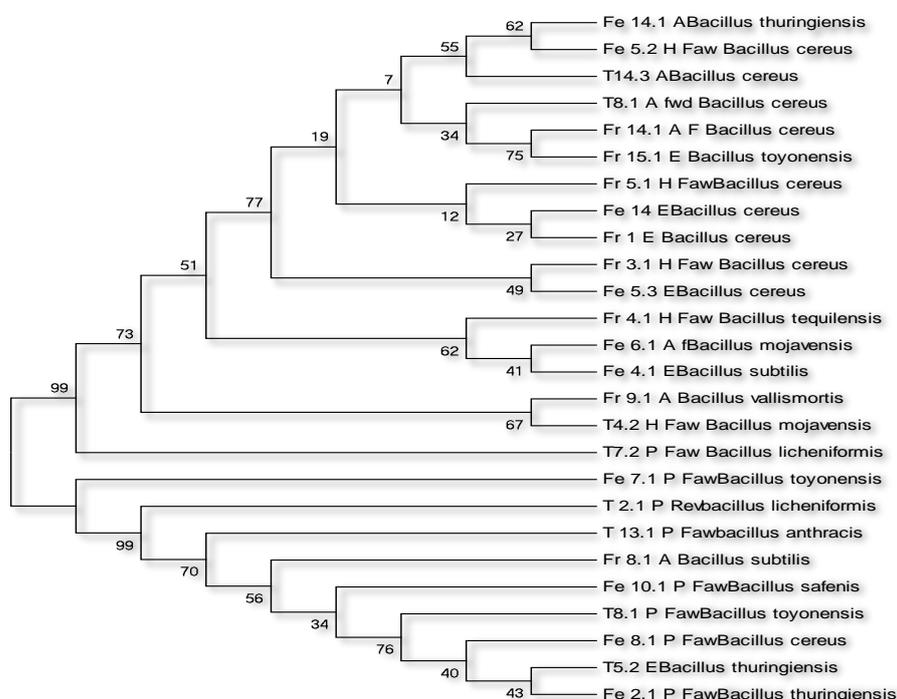


Fig. 4: Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences of *Bacillus* strains isolated in this study. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value calculated for 1000 replicates.

Discussion:

Since this is the first study on the bacterial ecology of date palm tree, no published work was found in the literature cited and the microbiological information is limited, no information known about the diversity of the epiphytic bacteria associated with different parts of date palm tree growth in east Algeria, such as leaves and trunk, as well as bacteria living on fruits surfaces. In this work, phenotypic and molecular culture dependent methods were combined to identify and compare the composition of epiphytic bacterial communities present on different plant parts. The 16S rRNA gene is the part of bacterial DNA most commonly used to differentiate various bacterial species. The 16S rRNA gene sequence is approximately 1500 base pairs (bp) long and is composed of hyper variable regions which are specific for each bacterial species [32]. PCR amplification of the 16S rRNA gene fragment is an effective technique that provides a rapid tool for the identification of bacterial isolates [33].

This study revealed differences in population diversity among different samples. Many factors are likely to be involved in determining the species composition of bacterial communities on plants. They include the availability of immigrant inoculum [20, 21], host plant phenology [25], nutritional characteristics of the phyllosphere of plants [24], and physico-chemical environmental conditions and climatic conditions [6,9,11,14].

Trunk samples hosted the greater diversity on genera and species richness, than leaves and fruits. Four major genera were the most abundant and present in all samples. The trunk contains high concentrations of cellulose, hemicellulose, lignin, and xylan [1, 23] explains the abundance of bacteria degrading cellulose found in this part. Trunk contains starch, sugars [27]. These two nutrients are favorable to a greater number and more diverse range of bacteria.

Date palm fruits, especially in the last stages of ripening, provide a high level of sugars and low activity water which inhibit bacterial growth [17, 28] because most of bacteria cannot grow when activity water is reduced below 0.90.

Leaf surface has long been considered a hostile environment for bacterial colonists and it is exposed rapidly to fluctuating temperature and relative humidity, as well as repeated alternation between presence and absence of free moisture due to rain and dew. The leaf also provides limited nutrient resources to bacterial colonists [22] and contains compounds which are involved in plant defenses against microbial activity [5]. The variability in nutriment between these niches may partly explain the differences in bacterial diversity of cultivable bacteria among different plant parts.

In our study, the most abundant genera were *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter*. *Bacillus* and *pseudomonas* are considered two of the most important ubiquities genera of bacteria which are naturally present in soil and surfaces of plants. *Bacillus* species offer several advantages over other bacteria for protection against plant pathogens because of their ability to form endospores and the broad-spectrum activity of their antibiotics and there are numerous reports of *Bacillus* spp. which repress pathogens [10,13]. The capacity of *Bacillus* of forming endospores under defavorable conditions plays a role of the existing of this genus all the seasons. Moreover, the presence of numerous *Bacillus* species studied for their ability against fungal diseases may be a natural selection by the plant. Aidoo *and al.* (1996), found bacterial strains belonging to the *Bacillus* genus on date pre-packed purchaser in Greater Glasgow [17]. Our study confirmed the presence of this genus on dates, suggesting that the date fruit contains naturally these bacteria which may influence the hygienic quality of date fruit. The presence of bacterial species, commonly known as pathogens, could be due contact with contaminated hand during harvesting of fruits [16]. The presence of some genus on trunks, leaves, and date fruit, suggesting that the trunk bark community may influence leaf and date fruit population structure. So, trunk bark is a potential source of inoculums for leaves and fruits.

The variability of bacterial community among different seasons is affected by climatic conditions as well as determined in previous studies [9,11,14]. Finkel and al. (2011) concluded from their study on bacteria and fungi colonizing the leaves of *Tamarix* trees in desert regions where the climatic conditions in different geographic regions are more important factors driving variability of bacteria [15]. Bacteria are subject to seasonal dynamics [11,14,18,26,30]. Penuelas and al. (2012) assessed T-RFLP profiles from bacteria and fungi on the surface and in the interior of leaves of *Q. ilex* in Mediterranean forests from the wet spring to the dry summer season. They confirmed a strong seasonal influence on the richness and diversity of the microbial phyllosphere community but the identification of the important drivers of microbial community structure has not yet been completed [31].

The present results highlight the interaction between bacterial populations in the phyllosphere of palm tree suggesting that the bacterial population structure of the vegetative (leaf), reproductive (fruit), and trunk bark of date palm tree may be affected by each other. In addition, the identification of certain strains isolated for the first time from the phyllosphere of the date palm, gives an overview of the composition of the bacterial flora and consequently to address the bacterial ecology of this tree which has a both science and economic importance. Further research is required to extend these observations and explore the ecological interaction between these different ecosystems. The use of other culture-independent approaches, like next generation sequencing methods, will make it possible to present a complete survey of the bacterial communities on dates, leaves, and trunk bark. Comparing the microbial succession on plants under controlled environmental conditions with those being grown under field conditions could be the key to determine factors affecting bacterial succession. Further, the isolation of several undescribed bacterial species from the same ecosystem confirms the complexity of phyllospheric ecosystems [34] and support the hypothesis that only a very small proportion of the bacterial species existent in the world is known.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out at school of environment and life sciences, university of Salford, United Kingdom. We are thankful for the laboratory's members for their great help given for us.

REFERENCES

- [1] Abdul Khalila, H.P.S., M. Siti Alwania, R. Ridzuanb, H. Kamarudinb and A. Khairulc, 2008. Chemical Composition, Morphological Characteristics, and Cell Wall Structure of Malaysian Oil Palm Fiber. *Polymer Plastics Technology and Engineering*, 47(3): 273-280.
- [2] Abekhti, A., K. Zarour, A. Boulal, Z. Benmechernene, M. and Kihal, 2013. Evaluation of Microbiological Quality of the Date Fruit Product “ Btana ” Produced in Adrar South Algeria, *Journal Of Microbiology Research*, 3(5): 163-170.
- [3] Ahmed, I. and R. Robinson, 1999. The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66(3): 307-312.
- [4] Amer, W.M., 1994. Taxonomic and documentary study of food plants in Ancient Egypt. Ph.D. Thesis, Cairo University Egypt.
- [5] Andreas, H., H.H. Kassemeyer, T. Seibicke, and F. Regner, 2011. Evaluation of chemical and Natural Resistance against Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) in Grapevine. *Am.J. Enol.Vitic*, 62(2): 184-192.
- [6] Berg, G., K. Smalla, 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol*, 68: 1-13.
- [7] Blakeman, J.B., 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. in Martins, G., B. Lauga, C. Miot-Sertier, A. Mercier, A. Lonvaud, M. L. Soulas, and I. Masneuf-Pomarède, 2013. Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE*, 8(8): e73013.
- [8] Bouguedoura, N., 1996. Rapport de synthèse de l’atelier “ Fusariose du Palmier dattier Maladie de la feuille cassante.”
- [9] Brien, R.D. and S.E. Lindow, 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology*, 79(5): 619-629.
- [10] Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E.A. Baraka, 2005. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects, 71(9): 4951-4959.
- [11] Dickinson, C.H., B. Austin, M. Goodfellow, 1975. Quantitative and Qualitative Studies of Phylloplane Bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*, 91(1): 157-166.
- [12] Djerbi, M., 1991. Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.): Voies de propagation des clone résistants au bayoud et de haute qualité dattière. *CIHEAM - Optione Mediterraneennes*, pp: 31-38.
- [13] El Hassni, M., A. El Hadrami, F. Daayf, M. Cherif and E.I.E.H. Ait Barka, 2004. Biological control of bayoud disease in date palm : Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions.
- [14] Ercolani, G.L., 1991. Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. *Microb. Ecol.*, 21: 35-48.
- [15] Finkel, O.M., A.Y. Burch, S.E. Lindow, A.F. Post and S. Belkin, 2011. Geographical Location Determines the Population Structure in Phyllosphere Microbial Communities of a Salt-Excreting Desert Tree. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(21): 7647-7655.
- [16] Hamad, S.H., F.A. Saleh and M.M. Al-Otaibi, 2012. Microbial Contamination of Date Rutab Collected from the Markets of Al-Hofuf City in Saudi Arabia. *The Scientific World Journal*, pp: 1-4.
- [17] Hasnaoui, A.M., A. Elhoumaizi, A. Asehrou, M. Sindic, C. Deroanne and A. Hakkou, 2010. Chemical composition and microbial quality of dates grown in Figuig oasis of Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(2): 311-314.
- [18] Jackson, C.R. and W.C. Denney, 2011. Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the southern magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microb Ecol.*, 61: 113-122.
- [19] Jasser, M.S., 2010. Effect of storage temperatures on microbial load of some dates palm fruit sold in Saudi Arabia market. *African Journal of Food Science*, 4(6): 359-363.
- [20] Kinkel, L.L., J.H. Andrews, F.M. Berbee and E.V. Nordheim, 1987. Leaves as islands for microbes. *Oecologia* 71: 405-408. In Martins, G., B. Lauga, C. Miot-Sertier, A. Mercier, A. Lonvaud, M. L. Soulas and I. Masneuf-Pomarède, 2013. Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE*, 8(8): e73013.
- [21] Lindemann, J. and C.D. Upper, 1985. Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pp: 1229-1232.
- [22] Lindow, S.E. and M.T. Brandl, 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 1875-1883.
- [23] Mahdavi, S. and H. Kermanian, 2010. Comparison of mechanical properties of date palm fiber-polyethylene composite., 5: 2391-2403.

- [24] Martins, G., B. Lauga, C. Miot-Sertier, A. Mercier, A.L onvaud, M.L. Soulas and I. Masneuf-Pomarède, 2013. Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE*, 8(8): e73013.
- [25] Martins, G., C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse and A. Lonvaud-Funel, 2012. Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *Int J Food Microbiol.*, 158: 93-100.
- [26] Rastogi, G., A. Sbodio, J.J. Tech, T.V. Suslow, G.L. Coaker and J.H.J. Leveau, 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem : spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*, 6(10): 1812-1822.
- [27] Schmidt, O., E. Magel, A. Frühwald, L. Glukhykh and K. Erdt, 2016. Influence of sugar and starch content of palm wood on fungal development and prevention of fungal colonization by acid treatment. 5.
- [28] Shenasi, M., K.E. Aidoo and A.A.G. Candlishm, 2002. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. *Int. J. Food. Microbiol*, 79(1-2):113-119.
- [29] Umar, Z.D., A. Bilkisu and A. Bashir, 2014. Bacteriological Analysis Of Date Palm Fruits Sold in Katsina Metropolis. *International journal of environment (IJE)*, 3(2): 205-215.
- [30] Vasantharajan, V.N. and J.V. BHAT, 1968. Inter-relations of micro-organisms and mulberry. Phyllosphere microflora and nitrogen fixation in leaf and root surfaces. *Plant and Soil*, 28: 258-267 in Dickinson, C. H., B. Austin and M. Goodfellow, 1975. Quantitative and Qualitative Studies of Phylloplane Bacteria from *Lolium perenne*. *Journal of General Microbiology*, 91(1): 157-166.
- [31] Vorholt, J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Microbiol* 10: 828–840. In Muller, T. and S. Ruppel, 2013. Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiol Ecol.*, 87(1): 2–17.
- [32] Weisberg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane, 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, 173(2): 697-703.
- [33] Woo, P.C.Y., S.K.P. Lau, J.L.L. Teng, H. Tse and K.Y. Yuen, 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 14: 908-934.
- [34] Yang, C.-H., D.E. Crowley, J. Borneman and N.T. Keen, 2001. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3889-3894.

Nom : AIMENE
Prénom : Wissame

Diplôme : Doctorat 3^{ème} cycle

Titre : **Biodiversité de la flore bactérienne du palmier dattier poussant au sud-est Algérien. Effet du climat sur le comportement de cette flore.**

Résumé :

La flore bactérienne des trois parties du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) (feuilles, fruits et tronc) a fait l'objet d'un isolement, puis identification suite aux tests phénotypiques et moléculaire (par le biais de l'ADNr 16S). L'évaluation de la population bactérienne à travers les différentes saisons (en 2012) a été effectuée pour démontrer la dynamique temporelle de la population cultivable.

L'analyse statistique a révélé des différences significatives dans la distribution des souches bactériennes qui se traduit par une baisse ou une augmentation des niveaux de population pendant les différentes saisons.

Les caractères morphologiques et les tests d'orientations simples ont permis de sélectionner 78 isolats représentatifs parmi plus de 200. Les résultats de l'identification phénotypique ont permis de classer, la majorité des isolats au niveau de genre. Ainsi que, l'étude de l'effet des facteurs abiotiques sur la croissance des isolats a révélé que les isolats testés tolèrent et survivent dans des conditions abiotiques sévères.

D'après l'analyse partielle du gène codant pour l'ARNr 16S, 2 isolats ont été identifiés parfaitement avec 100% de similarité, des isolats ont été identifiés entre 97% à 99% de similarité avec celle des souches conservées dans Genbank, alors que d'autres souches ont été identifiées entre 78% à 96%. Globalement, on a recensé 33 espèces bactériennes appartenant à 16 genres. Les genres les plus présentés dans toutes les parties de l'arbre sont *Bacillus* (36,84 %), *Pseudomonas* et *Enterobacter* représentant 17,1 % pour chacun, mais toutefois ces distributions sont hétérogènes. *Lysinibacillus* est le troisième genre le plus isolé avec 10,52%. Contrairement aux autres genres qui restent minoritaires tel que *Staphylococcus*, *Serratia*, *Microbacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Massilia*, *Erwinia*, et *Brevibacterium*.

Ce travail de recherche a donné et pour la première fois en Algérie une idée globale sur la diversité de la flore bactérienne du palmier dattier et mise en évidence de l'impact du climat sur la dynamique de cette flore.

Mots clés : *Phoenix dactylifera*, Phyllosphère, ADNr 16S, diversité bactérienne, variation saisonnière.