
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent



Faculté des Sciences

Département de Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme en Sciences Biologiques

Option Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Melle: SI ABDELKADER BEN MOUSSA Nadia

Mm : SIDI YAKOUB Ikram

Etude de Quelques Pouvoirs Enzymatiques des Microorganismes du Sol

Encadrant :

Mr. CHERIF NADJIB

Soutenu en 2019

Devant le jury composé de :

Président : Mr BENNABI F	MCB C.U.B.B.A.T
Examineur : Mm MADANI Kh	MAA C.U.B.B.A.T
Encadrant : Mr. CHERIF N	MCB C.U.B.B.A.T

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université BELHADJ BOUCHAIB Ain-TEMOUCHENT.

Nous tenons à remercier très profondément Mr. CHERIF NADJIB (MCB) de nous avoir encadré, conseillé et encouragé et de nous avoir permis de travailler dans un cadre très agréable, nous vous somme infiniment reconnaissantes.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr : BENNABI FARID (MCB) et Mm : MADANI Khadidja (MAA) pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous attache une importance particulière à remercier les personnes du laboratoire de Microbiologie pour leur aide et l'ambiance amicale qu'ils ont su créer.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance...

Ainsi, Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert que je dédie mon travail à mes très chers et magnifiques parents qui m'ont soutenu tout au long de ma vie ;

Veillez trouver ici, le témoignage de mon amour éternel. Que dieu vous procure santé, prospérité et bonheur...

À mes deux chers frères Fayçal et MOHAMMED, que dieu vous garde et vous protège, que votre chemin soit plein succès.

À ma belle-famille et à tous mes cousins et cousines.

À ma collègue IKRAM, une copine avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, ainsi qu'à sa famille.

À mes très chères amies : AMINA – NASSIMA – FATIMA ZOHRA pour leur aide et leur soutien que dieu vous protège et vous préserve

À tous les étudiants de la promotion Microbiologie

NADIA

Dédicace

Je remercie ALLAH le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui.

*Le plus Grand merci Dédicace à une personne Chère à mon cœur mon mari
AMIR*

Merci et mille Merci.

*A mes belles sœurs : HANANE, WAFAA, CHAIMAA, ISRAA, DJAMILA, MIA,
NAIMA et FATIMA.*

A mes chers frères : KAMEL, FATHI et SID AHMED.

A mon oncle : ABD EL MADJID

A toutes ma famille en entière (SIDI YAKOUB, DERBAL et BENANI).

*À ma collègue NADIA pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons
passé ensemble.*

Et à toutes mes amies

IKRAM

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....01

Etude bibliographique

I. Le sol.....02

I.1.Définition.....02

I.2.Les bactéries du sol.....02

II. Généralité sur les enzymes.....03

II.1.Définition.....03

II.2.Source d'enzymes.....04

II.2.1.Source microbienne.....04

II.2.2.Source végétal.....04

II.2.3.Source animal.....04

II.3.Marché des enzymes.....05

II.4.Classification des enzymes05

III. Les activités enzymatiques 06

III.1.Les enzymes protéolytiques.....06

III.1.1.Applications industrielles des protéases..... 06

III.1.1.1.Industrie alimentaire..... 06

III.1.1.1.1 Boulangeries.....06

III.1.1.1.2. Fromageries.....07

III.1.1.1.3.Synthèse de l'aspartam.....	07
III.1.1.1.4.Préparation de produits à base de soja.....	07
III.1.1.2.Domaine pharmaceutique et médical.....	07
III.1.1.3.Détergents.....	08
III.1.1.4.Tanneries.....	08
III.1.1.5.Autres applications.....	08
III.2.Les enzymes amylolytique.....	09
III.2.1.1.Utilisation des α - amylases dans les industries Agro-alimentaires.....	10
III.2.1.1.1.Glucoserie.....	10
III.2.1.1.2.La sucrerie.....	10
III.2.1.1.3.Panification et biscuiterie.....	10
III.2.1.1.4.Industrie des boissons.....	10
III.2.1.2.Domaine pharmaceutique et médical.....	10
III.2.1.3.Autres utilisation.....	11
III.3.Les enzymes lipolytiques.....	12
III.3.1.Applications dans l'industrie agro-alimentaire.....	12
III.3.2.Applications dans les détergents.....	13
III.3.3.Applications en bioremédiation.....	13
III.3.4.Applications en tannerie.....	13
III.3.5.Applications dans l'industrie du papier.....	14
III.4.Les enzymes cellulolytiques.....	14
III.4.1.Les applications des cellulases.....	14
III.4.1.1.Industrie alimentaire	14
III.4.1.2.Industrie des textiles et des détergents.....	15
III.4.1.3.Papeterie.....	15
III.4.1.4.Nutrition animale.....	15
III.4.1.5.Domaine thérapeutique.....	15
III.4.1.6. Autres applications.....	15
IV. Étude des paramètres qui influence l'activité enzymatique.....	16
IV.2.1. Facteurs physicochimique.....	16
IV.2.1.1.La température.....	16
IV.2.1.2.Le pH.....	16

IV.2.1.3.La concertation en substrat.....	17
IV.2.2.Facteurs chimiques.....	17
IV.2.2.1.Les inhibiteurs.....	17
V. Les antibiotiques.....	18
V.1.Production des antibiotiques.....	18
V.2.La lutte biologique.....	18

Matériels et méthodes

I. Zones de prélèvement et échantillonnage.....	19
II. Isolement et purification.....	21
II.1.Préparation des dilutions.....	21
II.2.Ensemencement et purification.....	22
III. Criblage des souches productrices d'enzymes.....	23
III.1.Détermination de l'activité amylolytique.....	23
III.2.Détermination de l'activité cellulolytique.....	23
III.3.Détermination de l'activité protéolytique.....	24
III.4.Détermination de l'activité lipolytique.....	25
III.5.Détermination de l'activité hémolytique.....	25
IV. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir enzymatique....	26
IV.1.Aspect macroscopique des colonies.....	26
IV.2.Aspect microscopique des souches.....	27
IV.3.Recherche de la catalase.....	27
IV.4.La galerie API® 20 E.....	27
IV.5.Effet antibiotique.....	28
IV.5.1.Préparation de l'inoculum.....	28
IV.5.2.Ensemencement des souches cibles.....	28
IV.5.3.Ensemencement des souches isolées.....	28

Résultats et discussion

I. Echantillonnage.....	30
II. Isolement des souches.....	32
III. Sélection des souches productrices d'enzymes.....	32
III.1.L'activité amylolytique.....	32
III.2.L'activité cellulolytique.....	34
III.3.L'activité protéolytique.....	35

III.4.L'activité lipolytique.....	36
III.5.L'activité hémolytique.....	37
IV. Identification des bactéries criblées qui ont un pouvoir enzymatique important...38	
IV.1.Aspect macroscopique.....	38
IV.2.Etude microscopique et biochimique.....	39
IV.2.1.La coloration de Gram	40
IV.2.2.La coloration en bleu de méthylène.....	40
IV.2.3.Test catalase.....	41
IV.2.4.Galerie Api.....	42
V. Recherche de l'effet antibiotique.....	43
Conclusion	51
Références bibliographiques.....	52
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 01: Différentes classes d'enzyme.....	05
Tableau 02: Différentes applications des alpha-amylases.....	11
Tableau 03: Codes des isolats et leur milieu gélosé (GN).....	32
Tableau 04: Présentation des souches qui ont un pouvoir enzymatique important.....	38
Tableau 05: Présentation de différents aspects macroscopiques des 4 colonies isolées.....	39
Tableau 06: Présentation des résultats de la recherche des spores par la coloration en bleu de méthylène.....	41
Tableau 07: Illustration des caractéristiques morphologiques et biochimiques des 4 souches isolées.....	42
Tableau 08: Illustration du profil biochimique des souches isolées, productrice d'enzymes, par l'utilisation de la galerie API® 20 E.....	43
Tableau 09: Illustration des résultats d'identification des 4 souches.....	43
Tableau 10: Illustration des résultats de l'effet antibiotique des souches isolées, productrice d'enzymes.....	44
Tableau 11: Illustration des pourcentages des activités enzymatiques des bacilles à Gram positive.....	46
Tableau 12: Le pourcentage des Caractères cultureux et morphologiques des isolats du sol.....	46
Tableau 13: Illustration des pourcentages des activités enzymatiques des isolats du sol....	49

Liste des tableaux dans l'annexe

Tableau 01: Résultats des différents tests appliqués sur les souches isolés à partir du sol.

Tableau 02: Caractères cultureux et morphologiques des isolats du sol.

Tableau 03: Présentation des différentes souches amylolytiques.

Tableau 04: Présentation des différentes souches cellulolytiques.

Tableau 05: Présentation des différentes souches protéolytiques.

Tableau 06: Présentation des différentes souches lipolytiques.

Tableau 07: Présentation des différentes souches hémolytiques.

Liste des figures

Figure 01: Mode d'action de l'alpha-amylase.....	09
Figure 02: Catabolisme des triglycérides.....	12
Figure 03: Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	17
Figure 04: Localisation de la wilaya d'Ain-Temouchent (Google Map, 2019).....	19
Figure 05: Localisation et sites de prélèvements (Google Map, 2019).....	20
Figure 06: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol.....	21
Figure 07: Préparation des dilutions décimales à partir du sol.....	22
Figure 08: Présentation des étapes d'isolement des souches (A) ensemencement des dilutions, (B) purification et isolement des souches.....	22
Figure 09: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité amylolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.....	23
Figure 10: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité cellulolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.....	24
Figure 11: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité protéolytique.....	24
Figure 12: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité lipolytique.....	25
Figure 13: Présentation du test d'hémolyse.....	26
Figure 14: Galerie API 20 E ensemencée.....	28
Figure 15: Schéma du protocole expérimental général.....	29
Figure 16: Aspect macroscopique des 4 prélèvements effectués, « A » sol de blé, « B » sol d'une forêt, « C » sol d'une vigne, « D » sol d'un jardin.....	30
Figure 17: Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués.....	31
Figure 18: Le criblage des souches amylolytiques.....	33
Figure 19: Présentation des pourcentages de l'activité amylolytique dans chaque type de sol.....	33
Figure 20: Le criblage des souches cellulolytiques.....	34
Figure 21: Présentation des pourcentages de l'activité cellulolytique dans chaque type de sol.....	34

Figure 22: Le criblage des souches protéolytiques.....	35
Figure 23: Présentation des pourcentages de l'activité protéolytique dans chaque type de sol.....	35
Figure 24: Le criblage des souches lipolytiques.....	36
Figure 25: Présentation des pourcentages de l'activité lipolytique dans chaque type de sol.....	36
Figure 26: Le criblage des souches hémolytiques.....	37
Figure 27: Présentation des pourcentages de l'activité hémolytique dans chaque type de sol.....	37
Figure 28: Observation microscopique des souches F1 (A), F3 (B), F5 (C), V3(D) après coloration de Gram (Gross 100x10).....	40
Figure 29: Observation microscopique des souches F3 (A), V3 (B) après coloration en bleu de méthylène (Gross 100x10).....	40
Figure 30: Présentation des résultats du test de catalase.....	41
Figure 31: Résultats de l'identification sur galerie API20E des quatre isolats.....	42
Figure 32: Résultat de l'effet antibiotique de F3 (A : contre klebsiella - B : contre Acinitobacter – C : contre Seratia – D : contre Bacillus).....	44

Liste des abréviations

kDa : Kilo daltons.

% : pour cent.

US\$: dollar des États-Unis.

E.C : Enzyme Commission.

pH: potentiel d'Hydrogène.

sp : espèce non précisée

OMS : Organisation Mondiale De La Santé

A.oryzae: *Aspergillus oryzae*

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

E. coli: *Escherichia coli*

TG : triglycérides.

g: gramme.

°C: degré Celsius

cm: centimètre

ml: millilitre.

h: heure.

GN: Gélose nutritive.

g/l: gramme par litre.

KH₂PO₄: dihydrogénophosphate de potassium.

MgSO₄: Sulfate de magnésium.

NaCl : chlorure de sodium.

CaCl₂ : chlorure de calcium.

Tween 80: polyoxyethylene sorbitane monooléate.

MH: mueller hinton.

API 20 E: Analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

H₂S: Thiosulfate de sodium.

nm: nanomètre.

mm: millimètre.

µm: micromètre.

ONPG: Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside.

ADH: Arginine Di hydrolase.

LDC: Lysine Décarboxylase.

O D C: Ornithine Décarboxylase.

C I T: Citrate.

TDA: Tryptophane Désaminase.

I N D: indole.

VP: Voges-Proskauer

GEL: Gélatinase.

GLU: glucose.

MAN: mannitol

I N O: inositol

SOR: sorbitol

RHA: rhamnose

SAC: saccharose

AMY: amygdaline

ARA: arabinose

AIA: acide indole-acétique

Introduction

Dans les sols, les organismes les plus abondants sont des micro-organismes composés des bactéries, champignons, algues et protozoaires. Ils ont un rôle central dans la formation des sols et leurs fonctionnements. Les nouvelles technologies permettent une meilleure connaissance de ces organismes, et particulièrement les bactéries avec un taux de 1 milliard d'individus par gramme de sol en moyenne. Les bactéries du sol dégradent des molécules organiques en sécrétant des enzymes dans l'espace extracellulaire permettant de les hydrolyser (découper) en molécules simples (**Virginie RIOU et al., 2018**).

Les enzymes produites par les micro-organismes sont des biocatalyseurs potentiels des réactions biochimiques. Généralement, les enzymes dérivées d'une source microbienne sont considérées comme des biocatalyseurs robustes, à haute spécificité et rendement économique important. (**Mukhtar et al., 2017**).

Les réactions métaboliques impliquant les enzymes permettent aux différentes cellules d'effectuer les fonctions pour lesquelles elles existent et ceci s'applique parfaitement bien aux bactéries et aux champignons. En effet, certains organismes, à l'aide d'enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement et ce caractère peut être utilisé par certaines industries de différents domaines (**Jean Philippe Chenel, 2005**).

La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croît d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier..), dépollution (attaque des substances phénoliques..), industrie alimentaire (boulangerie,...) (**Dvail et al., 2010**).

Ce travail il s'agit d'un isolement de bactéries du sol à partir de différentes régions de la wilaya d'Ain-Temouchent. Ces bactéries sont sélectionnées sur la base de la production d'enzymes (activité amylolytique, cellulolytique, protéolytique, lipolytique et hémolytique), identification phénotypique et biochimique des isolats et étude d'effet antibiotique de ces bactéries.

I. Le sol

I.1.Définition

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (**Atlas et al., 1992**)

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (**Quénéa, 2004**).

I.2.Les bactéries du sol

Le sol est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes, leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines : la population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre 10^6 et 10^9 bactéries par gramme de sol (**Paul E. et Clark, 1996**). Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations. La profondeur est une variable écologique qui affecte significativement la survie des microorganismes. Dans les zones tempérées, si une grande partie d'entre eux se concentre dans le premier mètre de la couche superficielle, ce sont en fait les premiers centimètres qui en contiennent le plus grand nombre (**Jenkinson et Powlison, 1976**).

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont

utilisés. Ce qui ne signifie pas que le sol soit le milieu naturel de toutes les bactéries. Par sa nature de milieu ouvert et sensible aux facteurs de l'environnement, le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. Les bactéries du sol sont à dominante GRAM positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus* (**Bousseboua, 2005**).

II. Généralité sur les enzymes

II.1. Définition

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique. Ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (**Bergmeyer et al., 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005**).

En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (**Patel et al., 2005**) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (**Leisola et al., 2001**).

Dans les procédés industriels, l'action très spécifique des enzymes permet d'obtenir des effets très particuliers avec très peu de sous-produits non-désirés (**Novo Norsdik, 1997**). En fait, les enzymes sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bio-industrie (**Arnaud et al., 1993**).

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés (**Sandhya et al., 2005a**).

Les micro-organismes qui vivent dans le sol ne peuvent pas transporter des molécules complexes à l'intérieur de leurs cytoplasmes. Ils synthétisent des enzymes extracellulaires pour décomposer ces molécules en nutriments utiles et essentiels.

II.2. Source d'enzymes

L'étape initiale de la production de toute enzyme concerne le choix de la source. Dans certains cas où l'activité catalytique souhaitée n'est disponible que dans une source unique, bien que dans la plupart des cas où l'activité souhaitée peut être obtenue à partir de plusieurs sources (**Walsh et Headon, 1994**).

II.2.1. Source microbienne

De nombreuses protéines sont obtenues à partir de microorganismes. Un nombre limité de microorganismes sont considérés comme des producteurs appropriés des protéines destinées à des fins appliquées. Les microorganismes les plus fréquemment utilisés comme producteurs d'enzyme comprennent des bactéries et des champignons, Les microorganismes représentent une source attrayante d'enzymes car ils peuvent être cultivés en grande quantité dans un délai relativement court selon les méthodes de fermentation (**Walsh et Headon, 1994**).

II.2.2. Source Végétal

Les plantes ne sont généralement pas considérées comme des sources attrayantes d'enzymes d'importance industrielle. La nature saisonnière et la géographie de la croissance des plantes et le fait que la plupart des protéines végétales sont intracellulaires milite également contre leur utilisation généralisée comme sources d'enzymes (**Walsh et Headon, 1994**).

II.2.3. Source Animal

Un nombre d'enzymes d'une importance considérable ont été traditionnellement obtenus à partir des tissus d'animaux ou de leurs substances sécrétées. L'une des enzymes dérivées d'animaux les plus importantes sur le plan industriel est rénine, également connu sous le nom de Chymosine Cette protéase aspartique trouve une application industrielle Principalement dans la production de fromages, bien qu'il ait également été utilisé thérapie en tant que aide digestive (**Walsh et Headon, 1994**).

II.3. Marché des enzymes

Grâce aux progrès importants qui ont jalonné les trente dernières années de son existence, L'industrie des enzymes est en pleine progression puisque son chiffre d'affaires global a connu une importante augmentation depuis le début des années 80. Ainsi, au cours de la dernière décennie, le marché des enzymes industrielles a connu un volume annuel de croissance de 10 à 15%. En effet, en 1982 le marché des enzymes industrielles était de 375 million de dollars canadiens alors qu'en 1990, il était de 720 millions et de 1 milliard en 1994. En fin, en 1996 il atteignait 1,92 milliards de dollars canadiens (**Arnaud et al., 1993; Aviron-Violet et al., 1982; Novo Norsdik, 1997**).

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Il est prévu qu'en 2011, il atteindra 6 milliards de dollars (**Kumar et al., 2008b**).

Actuellement, la compétition est très forte dans le monde des enzymes industrielles et les prix des enzymes sont en baisse entraînant des coupes majeures dans les coûts de production. La capacité de produire des enzymes a un faible coût est donc essentielle. Par ailleurs, dans la plupart des transformations où elles interviennent, les enzymes ne représentent guère que 0,5 à 5 % de la valeur du produit sur lequel elles agissent, lequel peut, à son tour, n'être qu'un intermédiaire ou un constituant ne représentant qu'une fraction limitée d'un produit fini (**Aviron-Violet et al., 1982**).

II.4. Classification des enzymes

Les enzymes sont classent en fonction des réactions qu'elles catalysent, on distingue six familles (**tab1**)

Tableau 01: Différentes classes d'enzyme (**Pierre Feillet, 2000**).

Classe	Réactions catalysées
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction (transfert d'oxygène)
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC 3 Hydrolases	Coupure une molécule avec fixation d'eau (hydrolyse)
EC 4 Lyases	Coupure autre que l'hydrolyse
EC 5 Isoméras	Remaniement interne d'une molécule
EC 6 Ligases	Synthèses de nouvelles molécules par addition d'éléments

III. Les activités enzymatiques

III.1. Les enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (**Kumar et al., 2008b**). Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux (**Pelmont, 1995**). Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulateurs plus spécifiques (**Kumar et al., 2008a**).

Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications industrielles (**Sandhya et al., 2005b**). Elles sont produites par une grande variété de bactéries dont, les actinomycètes, de moisissures et de levures (**Devi et al., 2008**). Elles représentent 40% des enzymes du marché mondial (**Sandhya et al., 2005b**).

III.1.1. Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Ces protéases produites à partir de différentes sources microbiennes sont commercialisées sous plusieurs noms par quelques compagnies hautement spécialisées.

III.1.1.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application (**Aviron-Violet et al., 1982**). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

III.1.1.1.1. Boulangeries

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Également, des

protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et al., 1998).

III.1.1.1.2.Fromageries

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (Rao et al., 1998). La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Aviron-Violet et al., 1982). Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei*, *Bacillus subtilis* et *Endothia parasitica*.

Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (Aguilar et al., 2008).

III.1.1.1.3.Synthèse de l'aspartam

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. La configuration en L de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est donc crucial, mais engendre des coûts très importants lorsque des méthodes de synthèse chimiques sont employées. La synthèse enzymatique de l'aspartame est donc préférable. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions bien précises. Une préparation immobilisée de thermolysin provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartame (Rao et al., 1998).

III.1.1.1.4.Préparation de produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline alcalase à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Rao et al., 1998).

III.1.1.2.Domaine pharmaceutique et médical

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus

souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium* sp. ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (**Kudrya et Simonenko, 1994**). Enfin, une asparaginase provenant de *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (**Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002**).

III.1.1.3. Détergents

À l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (**Kumar et al., 2008b**).

Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) (**Rao et al., 1998**). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (**Hajji et al., 2007**), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (**Gupta et al., 2002**). Clear-lens Pro®, une marque de Novozyme Denmark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes (**Sumantha et al., 2006**).

III.1.1.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine (**Laxman et al., 2005**). Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confitage) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (**Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002**).

III.1.1.5. Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (**Dalev, 1994; Ichida et al., 2001**). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées

aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine (Sumantha *et al.*, 2006).

III.2. Les enzymes amylolytique

Les amylases sont des enzymes capable d'hydrolysées les molécules d'amidon en une variété de produits comprenant des dextrans et des polymères composés de plus petits d'unités de glucose qui donne un sirops riches en fructose, en glucose et en maltose (fig01).

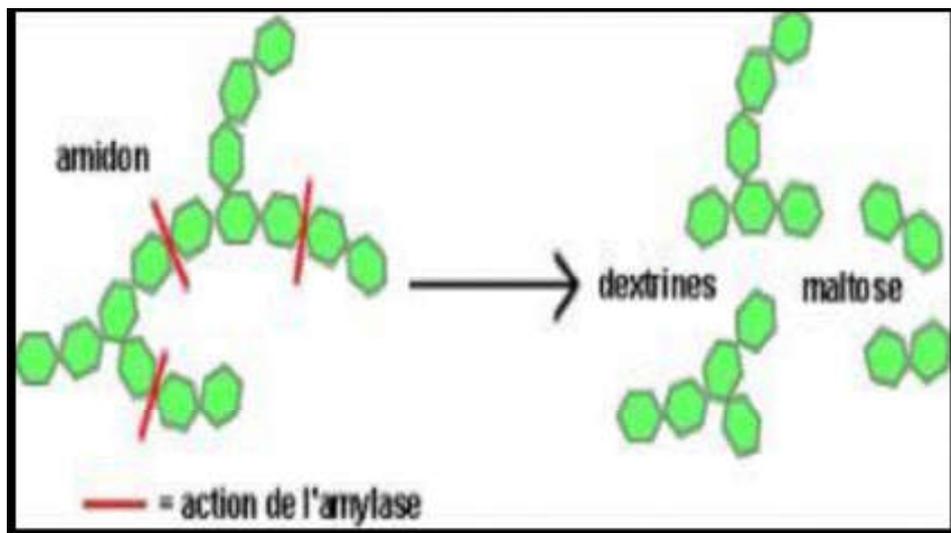


Figure 01 : Mode d'action de l'alpha-amylase (Florimont, 2013 in Meziani et Mahcene, 2017)

Ces enzymes amylolytiques sont capables d'hydrolysées l'amidon (amylose et amylopectine) et ses produits de dégradation sont dextrine, oligosaccharides. Les amylases jouent un rôle majeur dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et le textile. Dans l'industrie papetière environ 25% des amylases sont demandées sur le marché mondial des enzymes. Les amylases peuvent provenir de plantes, d'animaux et de microbes. Les enzymes d'origine microbienne répondent généralement à une forte demande dans les industries (Janaki, 2017).

III.2.1. Les applications de l' α - amylase

Les α - amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisées dans les procédés industriels:

III.2.1.1. Utilisation des α - amylases dans les industries Agro-alimentaires

III.2.1.1.1. Glucoserie

La principale industrie utilisant de l' α - amylase est la glucoserie qui, à partir d'un substrat complexe, l'amidon, développe un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes, parmi lesquelles les α - amylases bactériennes ou fongiques qui sont utilisées pour la dégradation de l'amidon (**Martin et al., 2003**).

III.2.1.1.2. La sucrerie

L' α - amylase est utilisée pour faciliter les opérations d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre pour éliminer des traces d'amidon gênant la purification. De plus, des α - amylases fongiques sont très utilisées pour la préparation des sirops sucrés à base d'amidon de maïs et de sirops de chocolats (**Martin et al., 2003**).

III.2.1.1.3. Panification et biscuiterie

L'usage de l'alpha amylase « améliorant de panification » est devenue une pratique de fabrication machinal dans l'industrie panaire, non seulement pour améliorer la qualité du pain mais aussi pour contrôler le processus, de fabrication ce qui conduit à un gain en temps et en énergie. Cette industrie emploie les α - amylases fongiques d'*A.oryzae* pour la régulation des activités diastasiques des farines en dégradant l'amidon en maltose. Cette opération favorise la formation de la mie souple en boulangerie et améliore la texture des gâteaux pâtisseries et des biscuits (**Malhotra et al., 200**).

III.2.1.1.4. Industrie des boissons

Dans ce secteur l' α - amylase intervient essentiellement dans la fabrication d'alcool éthylique, de boissons sucrées non alcoolisées, de jus de fruits. En brasserie, elle permet d'obtenir des bières sans dextrines. (**Mamo et al., 1999**).

III.2.1.2. Domaine pharmaceutique et médical

Dans le domaine pharmaceutique, les α -amylases sont utilisées comme agent anti-inflammatoire en soutenant le traitement antibiotique et aussi comme aide digestif pour éviter

les dyspepsies et les fermentations intestinales par exemple : Danilase (Merabti, 2006 ; Yihan et al., 2010 ; Lo et al., 2001).

Dans le domaine médical, le taux de l'α-amylase dans les liquides biologiques peut être utilisé pour détecter certaines maladies : insuffisance cardiaque, oreillons, cancer du pancréas (Benaouida, 2008).

III.2.1.3. Autres utilisation

Les α-amylases sont aussi utilisées dans l'industrie textile pour le désencollage des tissus ainsi que dans les domaines de la tannerie, de la papeterie et des détergents pour les lessives où elles facilitent la disparition des tâches en dégradant les souillures, permettant ainsi l'augmentation du pouvoir blanchissant. Elles sont utilisées aussi dans le traitement des eaux résiduaires pour l'élimination de l'amidon (Benaouida, 2008 et Merabti., 2006).

Tableau02: Différentes applications des alpha-amylases

Industrie	Application
Glucoserie	Solubilisation de l'amidon, accompagné d'une importante de la viscosité (liquéfaction) (Alais et al., 2008).
Sucrierie	Réduction de la viscosité des sirops de canne a sucre, en hydrolysant les contaminants amylicé pour assuré le processus de cristallisation (van der et al., 2002).
Biscuiterie et panification	Amélioration des propriétés rhéologique et fermentaires de la pate, ainsi que le volume de la mie et la coloration de la croute (Pandey et al., 2000).
Papeterie	Liquéfaction de l'amidon pour préparer la sauce de couchage permettant d'éliminer les irrégularités superficielles de la feuille (Tolan, 1996).
Détergent	Dégradation des taches a base d'amidon, les oligosaccharides et les dextrans libérés de l'action hydrolytique sont soluble, ce qu'il facilite le découpage physique de la tâche (Kotwittz et al., 1994).
Industrie pharmaceutique	Traitement de diabète et de l'obésité (Niélson et al., 2001).

III.3. Les enzymes lipolytiques

Les triacylglycérol-hydrolases ou les lipases sont des enzymes atypiques vu leurs mécanismes d'action et leurs spécificités de substrats. Selon le milieu réactionnel de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique (fig02) (Mukhtar *et al.*, 2017).

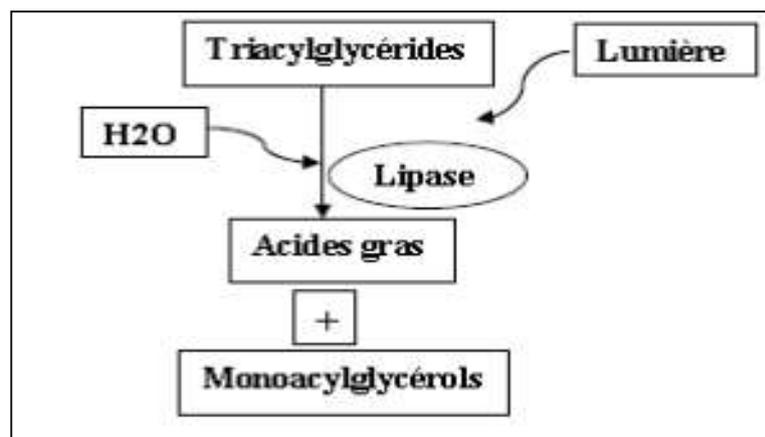


Figure 02 : Catabolisme des triglycérides (Mukhtar *et al.*, 2017).

Les lipases microbiennes présentent plus d'avantages comme les procédés de fabrication très simples et une grande stabilité vis-à-vis la température, les détergents et les enzymes protéolytiques comparés aux lipases d'origine animale. Les lipases peuvent être utilisées dans le traitement des huiles et des graisses, des cosmétiques, des diagnostics et des détergents. Ces caractéristiques ont permis le développement de nombreuses applications pour les lipases microbiennes qui ont abouti à de nombreux produits commerciaux dont elles présentent une classe importante d'enzymes industrielles d'intérêt récent dans la recherche fondamentale et appliquée (Patrick *et al.*, 2008; Geraldine *et al.*, 2009).

III.3.1. Applications dans l'industrie agro-alimentaire

Un grand nombre d'applications hydrolytiques additionnelles ont été décrites pour les lipases microbiennes, y compris le développement de saveur pour les produits laitiers (fromage, beurre, margarine, boissons alcooliques, chocolat du lait et bonbons), réalisé par l'hydrolyse sélective de gros triglycérides pour libérer des acides gras ; ceux-ci peuvent agir en tant que saveurs ou précurseurs de saveur (Najjar, 2010). Dans l'industrie agro-alimentaire, les lipases sont couramment utilisées en boulangerie, en biscuiterie, en chocolaterie et dans la fabrication de produits laitiers ou fermentés. Elles interviennent dans la

maturation des fromages et de certaines charcuteries (saucissons, salamis) (**Hasan et al., 2006**).

Un des domaines d'application concerne le développement des arômes par les lipases exogènes (lipase pré-gastrique ou microbienne) qui accélèrent le développement d'arômes lors de la maturation de fromages. L'hydrolyse de la matière grasse conduit, en fonction de la spécificité de l'enzyme utilisé, à la libération d'acides gras à courte chaîne (C4-C6) ou à plus longue chaîne (C12-C14), ce qui donne des arômes plus au moins forts au produit. Les lipases sont également utilisées dans l'inter-estérification d'huile et de graisses pour produire des acylglycérols modifiés, impossibles à obtenir par des procédés de synthèse chimique conventionnels (**Sharma et al., 2001; Fickers et al., 2008**).

III.3.2. Applications dans les détergents

Les taches d'huile et de graisse ont toujours été difficiles à enlever. Souvent, on n'y parvenait qu'en cuisant le linge. Mais bon nombre de textiles modernes doivent être lavés à températures modérées, ce qui rend la tâche plus ardue encore. Les lipases apportent une aide précieuse dans ce domaine. Leur utilisation dans les détergents (Lessives ménagères) est le champ d'applications le plus important des lipases (**Najjar, 2010**). Elles sont capables, en effet, de fragmenter en petites particules les taches de graisse, par exemple de rouge à lèvres, de beurre, d'huile et des produits de beauté. Le bain de lessive pourra ensuite évacuer ces particules (**Sharma et al., 2001; Fickers et al., 2008**).

III.3.3. Applications en bioremédiation

Les milieux aquatiques d'eau douce ou d'eau salée, ainsi que les sols, sont fréquemment contaminés par les huiles minérales. Ces contaminations constituent un problème environnemental et écologique majeur (**Najjar A., 2010**). Les lipases sont utilisées en environnement et en bioremédiation. Les effluents des industries agro-alimentaires sont souvent riches en lipides et en graisses, ce qui peut entraîner le colmatage des canalisations. L'addition de lipases ou la culture dans ces effluents, permet d'en réduire la charge en lipide. Les lipases sont également utilisées lors de traitement de sols contaminés par des hydrocarbures. La bioremédiation est devenue la méthode la plus utilisée pour restaurer des environnements pollués (**Gandhi, 1997 ; Hasan et al., 2006**).

III.3.4. Applications en tannerie

Les lipases sont également couramment utilisées en tannerie. Avant le tannage, les peaux sont lavées dans des bains alcalins (pH 8-13) en présence de lipases de façon à

pouvoir éliminer les graisses sous cutanées. L'utilisation de lipases permet de diminuer la quantité de surfactant et de détergent à utiliser dans les bains de lavage, ce qui contribue à l'obtention de peaux plus souples et plus élastiques (**Fickers et al., 2008**).

III.3.5. Applications dans l'industrie du papier

Actuellement, le premier ennemi dans l'industrie du papier est la poix. Ce mélange mou et collant, à base de résine et de goudrons végétaux, produit durant la fabrication de la pâte de bois, nuit à la qualité du papier. Ce sont en majorité les TG, le sitostérol et les esters de sitostérol qui posent des problèmes dans la fabrication mécanique de la pâte à papier à partir des résineux. L'entreprise japonaise a développé un procédé d'hydrolyse de ces esters par addition de lipases, ce qui constitue un moyen facile et efficace pour le contrôle de la poix et donc pour améliorer la qualité du papier. Ce procédé est utilisé à une échelle de plusieurs centaines de tonnes de bois par jour (**Sharma et al., 2001 ; Hasan et al., 2006 ; Singh et al., 2012**).

III.4. Les enzymes cellulolytiques

Les cellulases sont des enzymes qui convertissent la cellulose en glucose et d'autres produits chimiques de base. D'après (**Rajeeva et Sonitiwari, 2015 ; Tanveer et al., 2014 ; Hitesh et al., 2016**) 3 types d'enzymes de cellulase agissent en synergie.

Les cellulases sont des enzymes inductibles synthétisées par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons, les bactéries et les actinobactéries au cours de leur croissance sur la matière cellulosique (**Ramesh et al., 2015**). Actuellement, les cellulases sont utilisées dans l'industrie alimentaire, la brasserie, l'alimentation animale, le textile et la blanchisserie, les pâtes papiers, ainsi que dans l'agriculture et dans la recherche (**Bhat, 2000**).

III.4.1. Les applications des cellulases

L'intérêt que porte la biotechnologie aux cellulases s'explique par leurs vastes applications. En effet, leur utilisation permet la production de glucose, élément de base, d'où l'importance, écologique et industrielle, considérable des cellulases (**Receveur et al., 2002**).

III.4.1.1. Industrie alimentaire

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions riches en fibres cellulosiques. Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualités, où les cellulases sont utilisées sous forme de mélange d'enzymes, le plus souvent en association avec les pectinases pour la digestion qui précède les extractions (protéines de soja, amidon de

pomme de terre ou de maïs, jus de fruits, huiles végétales etc...). Elle améliore l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio et al., 1999).

III.4.1.2. Industrie des textiles et des détergents

Les cellulases sont utilisées dans le traitement des toiles de coton, en particulier pour la préparation de « stone washed jeans », pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov et al., 2000).

III.4.1.3. Papeterie

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, améliore significativement leur filtrabilité et conduit à des économies importantes de consommation d'eau (Scriban, 1993).

III.4.1.4. Nutrition animale

Utilisées comme additifs dans l'alimentation animale, les cellulases ajoutées aux aliments pour volailles ou porcins, améliorent leur digestibilité (Gusakov et al., 2000).

III.4.1.5. Domaine thérapeutique

Certaines cellulases sont utilisées dans des formules médicamenteuses comme aides digestives. Ainsi, des cellulases de *Trichoderma viridae* sont utilisées en association avec α -amylases fongiques, pour éviter les dyspepsies et fermentations intestinales (Odier et des Rouau, 1985 ; Scriban, 1993).

III.4.1.6. Autres applications

Les cellulases sont également utilisées dans différents domaines :

- La bioconversion de la cellulase des déchets de papeterie en source fermentescible par des cellulases de *Trichoderma viridae* (Van Wyk et Mohulatsi, 2001).
- L'utilisation de cellulases de *Trichoderma reesei* pour l'hydrolyse enzymatique de la pulpe de betterave en sucres fermentescibles (glucose, xylose, etc...) utilisés dans d'autres fermentations et processus biochimiques (Tangnu et al., 1981 ; Kubicek, 1993).
- La production de protéines d'organismes unicellulaires (POU) à partir de la paille qui constitue la majeure source de déchets cellulosiques (Peitersen et Andersen, 1978).

- L'utilisation de levures combinées possédant un système cellulasique pour la fermentation de matière cellulosique en éthanol ; la levure *Saccharomyces cerevisiae* fermente 45 g de cellulose par litre pour produire 16.5 litres d'éthanol au bout de 50 heures, où le bioéthanol peut substituer les carburants classiques entre autres le pétrole (**Fujita et al., 2002**).
- L'isolement de protéines végétales et la préparation de produits alimentaires (**Raimbault, 1983**).
- L'isolement de protoplastes végétales utilisées pour l'étude des virus végétaux destinés aux recherches métaboliques et génétiques (**Evans et Bravo, 1983 ; Tewes et al., 1984**).

IV. Étude des paramètres qui influence l'activité enzymatique

L'activité enzymatique et la stabilité de l'enzyme peuvent être affectées positivement ou négativement par différents facteurs externes présents dans l'environnement de l'enzyme.

IV.1. Facteurs physicochimique

IV.1.1. La température

Une augmentation trop importante de la température peut avoir un effet négatif sur la cinétique des réactions enzymatiques. En effet, du fait de l'importance de la structure tertiaire des enzymes dans leur activité catalytique, une température trop élevée pourrait dénaturer de façon irréversible cette structure (**Fig03**). (**Jarrar, 2011**).

IV.1.2. Le pH

Le pH a une influence sur la structure de l'enzyme. La modification des charges des chaînes latérales des acides aminés peut entraîner la dénaturation et donc la désactivation de la protéine enzymatique (**Wallach, 1997**).

La plupart des enzymes ne sont actives que dans un domaine de pH bien défini. L'évolution de l'activité enzymatique en fonction du pH courbe de gauss, ayant une évolution similaire à celle de la température (**Fig04**). (**Jarrar, 2011**).

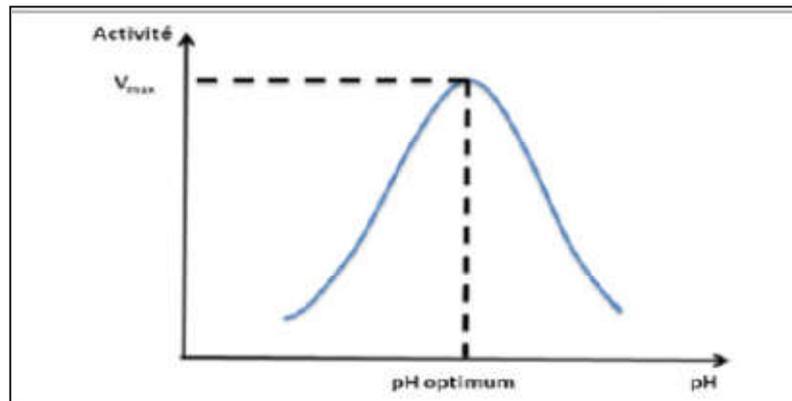


Figure 03: Effet du pH sur l'activité enzymatique (Jarrar, 2011).

IV.2.1.3. La concertation en substrat

Les réactions enzymatiques sont traitées comme s'il n'y avait qu'un seul substrat et un seul produit. Bien que cela soit le cas de quelque réaction catalysée par des enzymes, la plupart de ces réactions comportent deux substrats ou plus et deux produit ou plus. Cependant malgré cette considération la discussion reste valable.

Si on augmente la concentration du substrat $[S]$ en maintenant constante toutes les autres conditions, la vitesse initiale mesurée (V_i : vitesse mesurée quand une très petites quantité du substrat réagit) augmente jusqu'à une valeur maximale (V_{max}). Donc, la vitesse augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à un point où l'enzyme est dite «saturée» par le substrat, la vitesse (Benmedjahed et Bengrine, 2017).

IV.2.2. Facteurs chimiques

Indépendamment des facteurs physicochimiques liés au milieu réactionnel de nombreuses molécules peuvent modifier la réaction enzymatique. Les molécules chimiques peuvent réagir en formant des liaisons covalentes. Lorsque ces derniers se situent dans ou au voisinage du site actif, l'enzyme est généralement inactivée d'une manière irréversible, à moins d'éliminer l'effecteur par une autre réaction. (Benmedjahed et Bengrine, 2017).

IV.2.2.1. Les inhibiteurs

On appelle inhibiteur tout composé dont la fixation sur une enzyme engendre son inactivation partielle ou totale, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de la réaction (Benmedjahed et Bengrine, 2017).

V. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (Gogny et al., 2001).

V.1. Production des antibiotiques

Face au problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes, les chercheurs se sont orientés vers l'exploitation de nouvelles niches écologiques notamment les milieux hypersalins dans le but de trouver de nouvelles souches productrices de ces substances. Diverses bactéries halotolérantes et halophiles se sont révélées une source précieuse pour la découverte de composés bioactifs ayant des structures uniques (Blunt et al., 2006).

Les bactéries qui offrent une grande production de ces molécules sont celles qui appartiennent au genre *Bacillus*. En effet, ce genre est réputé par la production des antibiotiques contre les bactéries, les champignons et les levures (Pinchuk et al., 2001).

V.2. La lutte biologique

L'intérêt pour la lutte biologique contre les agents pathogènes pour les plantes a augmenté au cours de cette dernière décennie dû à l'importance à utiliser des alternatives respectueuses pour l'environnement d'une part et éviter l'utilisation intensive des pesticides chimiques d'une autre part (Ongena et Jacques, 2008).

Les bactéries de ce genre bacillus possèdent des capacités remarquables à synthétiser de nombreuses substances par le biais de divers mécanismes et qui ont été utilisées avec succès dans l'agriculture et pour l'industrie fine (Stein, 2005).

I. Zones de prélèvement et échantillonnage

Les échantillons ont été prélevés à partir du sol de quatre sites différents. Les zones d'étude ont été choisies sur la base de son degré de richesse en microorganismes.

Des prélèvements ont été effectués à partir de deux types de sol, le premier est un sol de blé et le deuxième est un sol d'une vigne située au niveau de la route qui relie la commune de Chaabat el leham et la wilaya d'Ain-Temouchent.

Le 3^{ème} site choisi pour faire des prélèvements est situé au niveau d'un sol d'une forêt à la commune d'Ain-Kihal, wilaya d'Ain-Temouchent.

Le dernier site de prélèvement est situé au niveau d'un sol d'un jardin au centre universitaire *Belhadj Bouchaib* Ain-Temouchent (**Figure 04,05**).



Figure 04: Localisation de la wilaya d'Ain-Temouchent (Google Map, 2019).

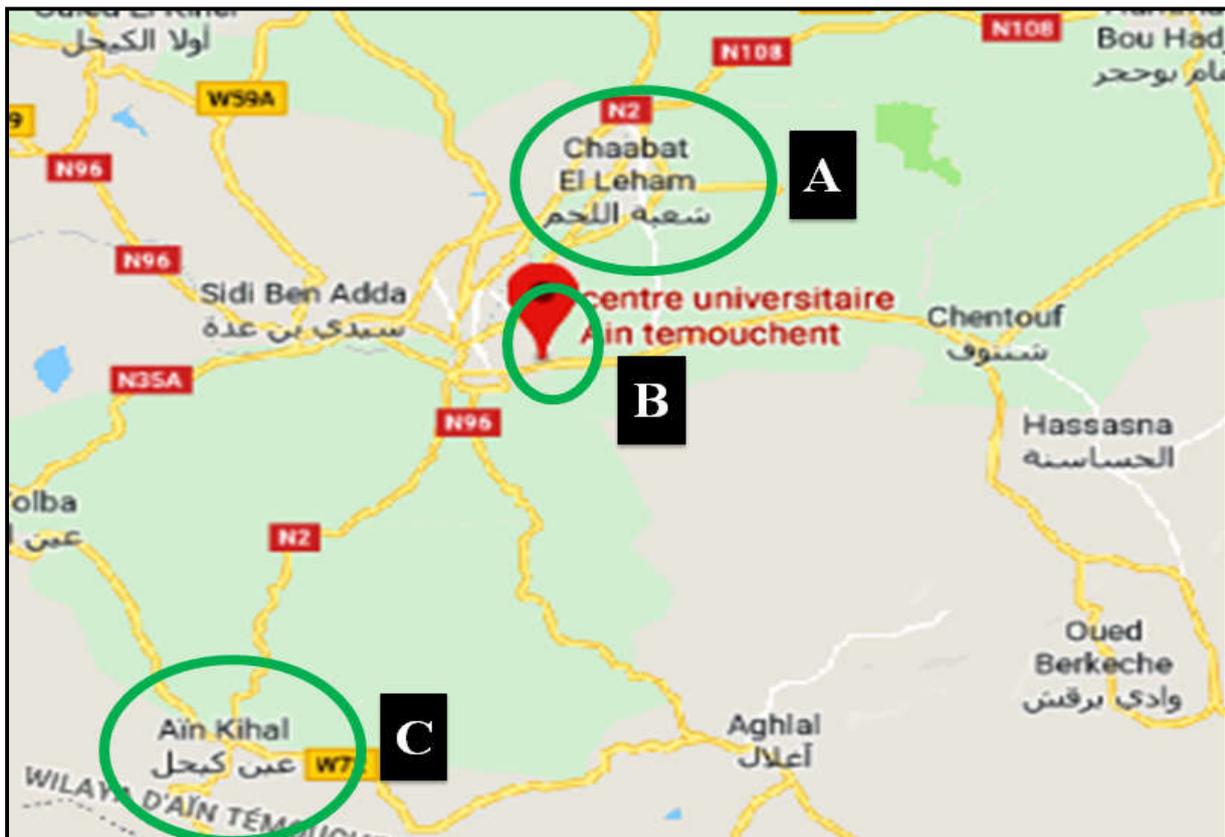


Figure 05: Localisation et sites de prélèvements (Google Map, 2019).

A : sol de blé et sol de vigne

B : sol d'un jardin.

C : sol d'un foret.

À l'aide d'une spatule stérile environ 50g de sol sont prélevés à une profondeur de 10cm de la surface des sols, les échantillons prélevés sont mis dans des enveloppes en papier aluminium stériles puis transportés au laboratoire de microbiologie du centre universitaire *Belhadj Bouchaib* Ain Témouchent (**Figure 06**).



Figure 06: Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol.

II. Isolement et purification

II.1. Préparation des dilutions

Dans un flacon stérile de 200 ml, une pesée de 10 g de sol est diluée dans un volume de 90 ml d'eau physiologique stérile, homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 10 minutes. Ensuite, un volume de 1 ml du surnageant récupéré après précipitation pendant 30 minutes est ajouté à 9 ml d'eau physiologique stérile afin d'obtenir une dilution décimale de 10^{-1} . Des dilutions successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) ont été préparées par la suite (**Figure 07**).

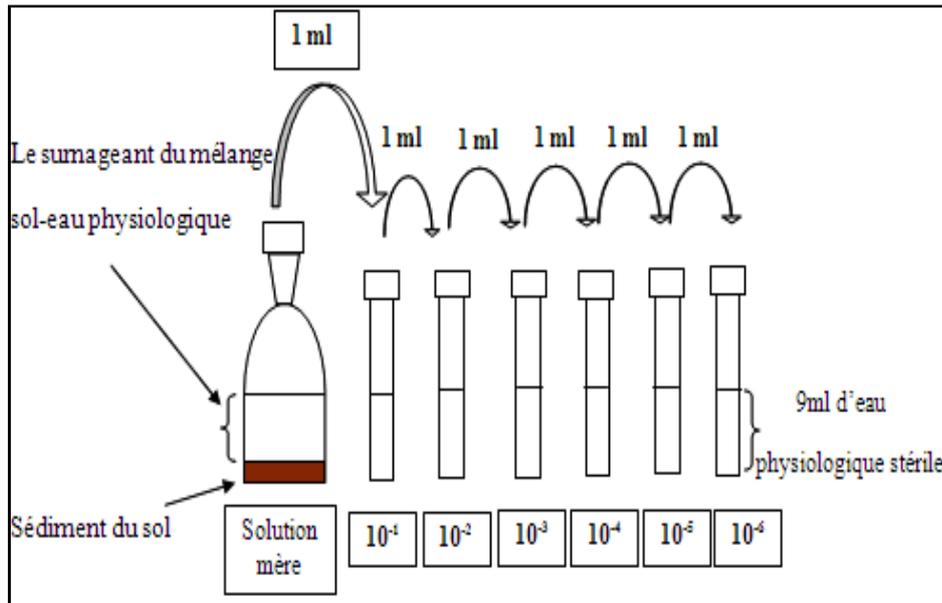


Figure 07: Préparation des dilutions décimales à partir du sol.

II.2. Ensemencement et purification

L'ensemencement est réalisé par l'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive à l'aide d'un râteau stérile en verre. Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures (Figure 08).

Les observations macroscopiques des colonies obtenues ont été effectuées afin de déterminer leurs formes, couleur et d'autres caractéristiques. Ensuite, les colonies sont purifiées par des repiquages successifs sur la gélose nutritive, incubées à une température 30°C pendant 24 heures.

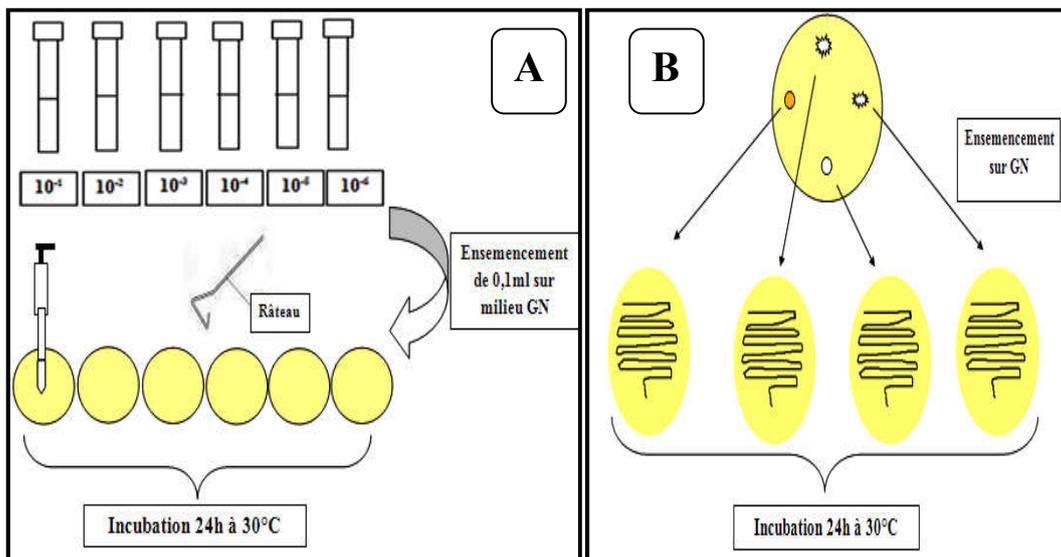


Figure 08: Présentation des étapes d'isolement des souches (A) ensemencement des dilutions, (B) purification et isolement des souches.

III. Criblage des souches productrices d'enzymes

III.1. Détermination de l'activité amylolytique

Un ensemencement en spots des souches isolées sur la surface de la gélose à amidon préparé (100 ml de la gélose nutritive additionnée par 1 g d'amidon) a été réalisé afin de déterminer l'activité amylolytique (**annexe 01**). Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures, ensuite recouvertes avec une solution de Lugol. Une réaction positive de l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (**Figure 09**).

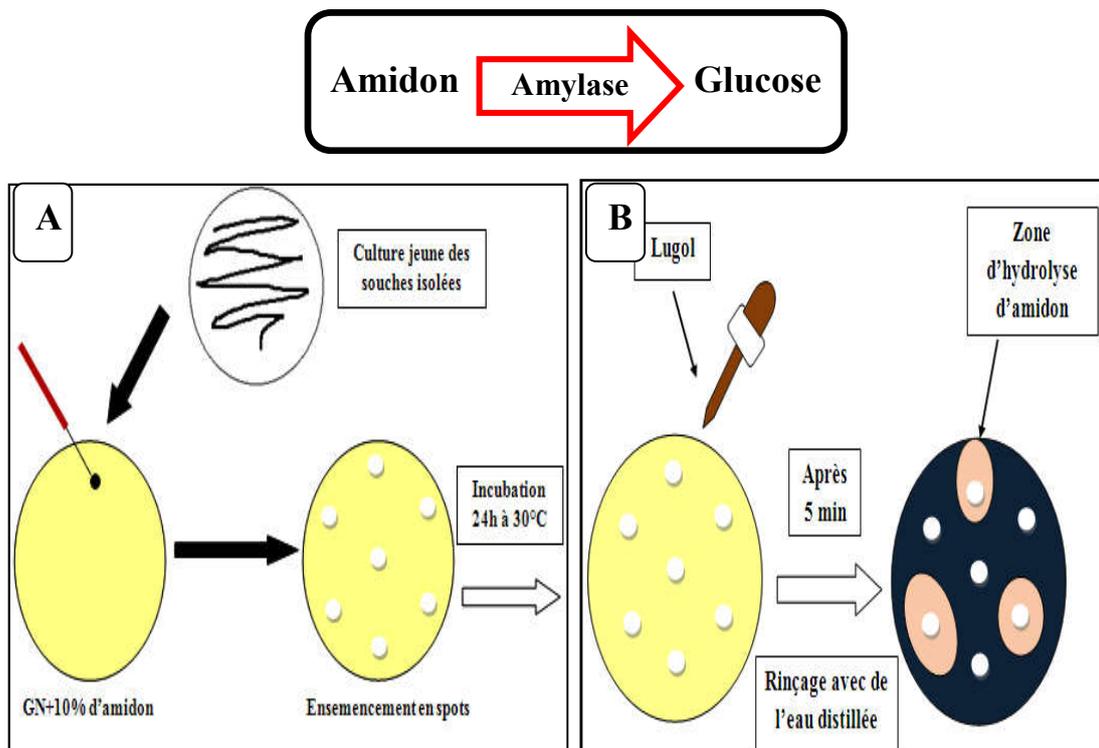
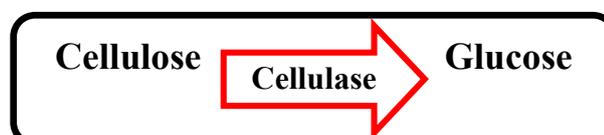


Figure 09: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité amylolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.

III.2. Détermination de l'activité cellulolytique

Un ensemencement en spots des souches isolées sur la surface de la gélose à la cellulose préparé a été réalisé pour la détection de l'activité cellulolytique (**annexe 01**). Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures, ensuite recouvertes avec une solution de Lugol afin de détecter les zones claires (**Figure 10**).



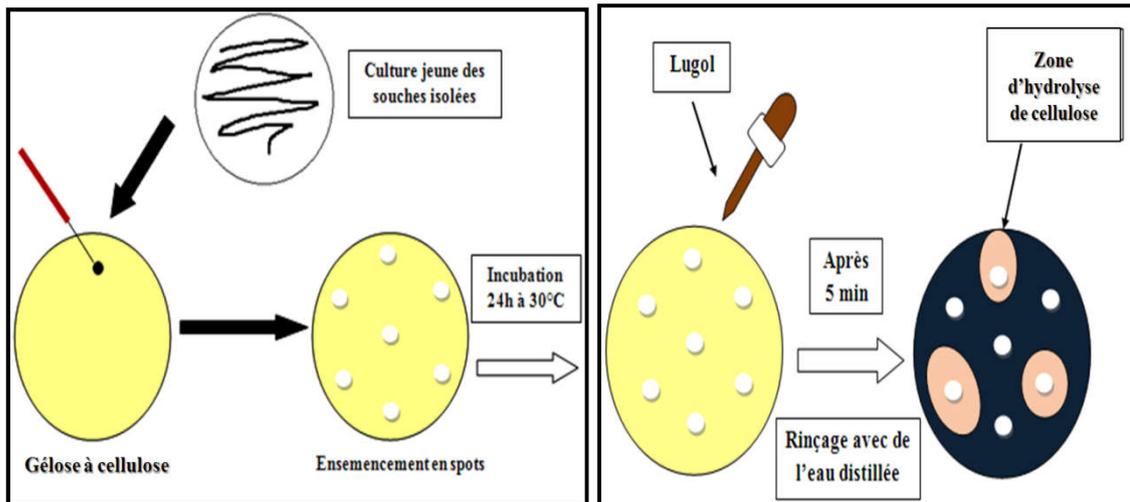


Figure 10: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité cellulolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.

III.3. Détermination de l'activité protéolytique

Un ensemencement en stries des souches isolées sur la surface de la gélose au lait préparé (100ml de la gélose nutritive additionnée par 5ml de lait écrémé stérile) a été réalisé afin de déterminer l'activité protéolytique (annexe 01). Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Une réaction positive de l'hydrolyse de la protéine se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (Figure 11).

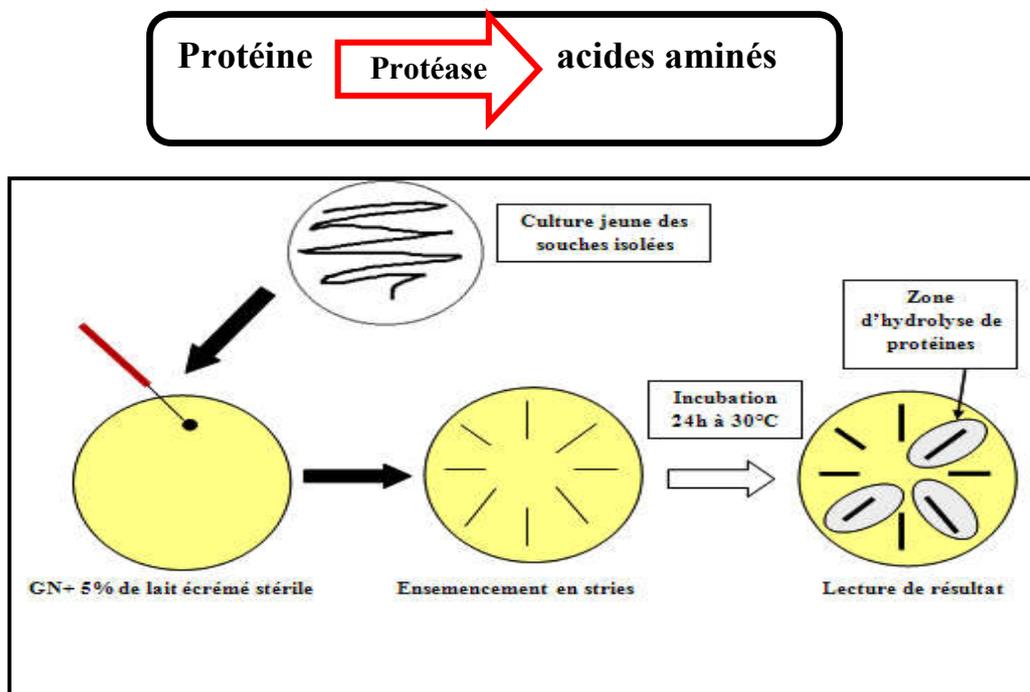


Figure 11: Description des étapes de la mise en évidence de l'activité protéolytique.

III.4. Détermination de l'activité lipolytique

Un ensemencement en spots des souches isolées sur la surface de la gélose préparé qui contient en g/l : peptone (10) – NaCl (5) – CaCl₂ (0.1) – agar (18) – tween80 (10) pour la détection de l'activité lipolytique (**annexe 01**). Les cultures sont incubées à une température de 30°C pendant 3-5 jours, Une réaction positive de l'hydrolyse de lipide se manifeste par l'apparition une zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour de la colonie (**Figure 12**).

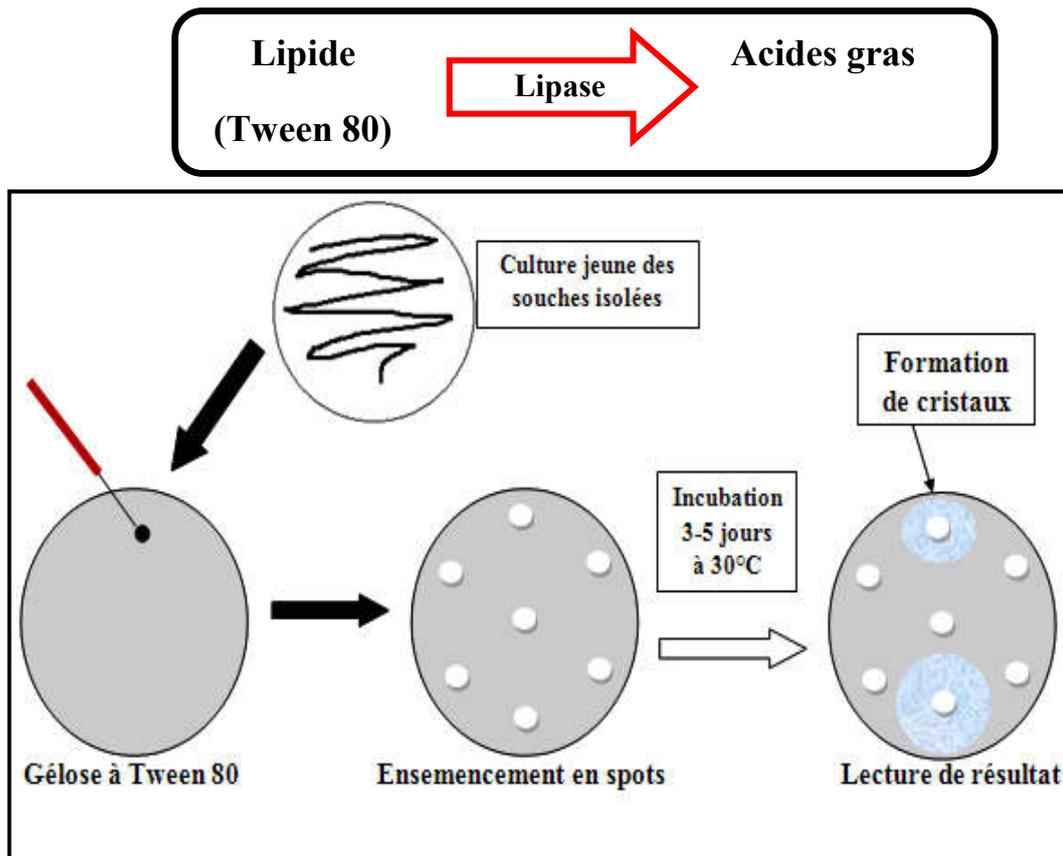


Figure 12: Description des étapes de la mise en évidence le l'activité lipolytique.

III.5. Détermination de l'activité hémolytique

Dans le but d'explorer le pouvoir hémolytique des souches isolées, un test d'hémolyse est effectué par un ensemencement sur la surface de la gélose au sang.

Une concentration de 5% du sang d'homme est ajoutée à la gélose Mueller Hinton préalablement liquéfiée et maintenue à 45°C (en surfusion), suivi d'une homogénéisation douce pour l'élimination de la formation de toutes éventuelles bulles d'airs. Le sang est préchauffé préalablement à une température de 37°C dans un bain marie, afin d'empêcher la formation des grumeaux dans la gélose préparée (**annexe 01**).

Une colonie pure isolée est ensemencée sur la surface de la gélose par spots à l'aide d'une anse de platine, puis incubée à une température de 30°C pendant 24-72 heures. Une lecture positive se traduit par l'apparition :

- D'une zone parfaitement transparente autour des spots; elle traduit une lyse totale des hématies par les bactéries (Hémolyse β).
- D'un aspect verdâtre de la gélose; elle traduit une lyse partiel des hématies par les bactéries (Hémolyse α) (**Figure 13**).

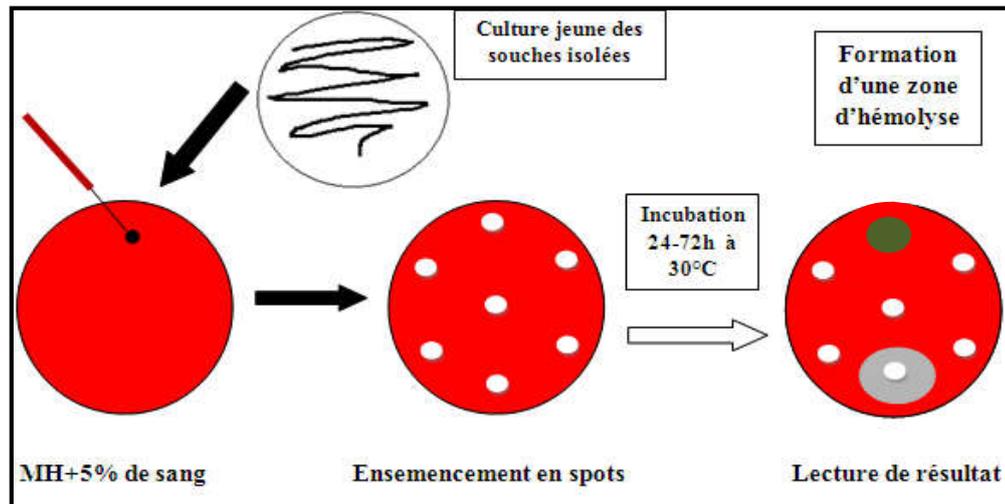


Figure 13: Présentation du test d'hémolyse.

■ Hémolyse α □ Hémolyse β

IV. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir enzymatique

Les souches isolées, dotées d'un pouvoir enzymatique sont sélectionnées comme étant bactéries productrices d'enzymes. L'identification préliminaire des souches se repose sur l'examen macroscopique, l'observation microscopique et l'étude de quelques caractéristiques enzymatiques et biochimiques.

IV.1.Aspect macroscopique des colonies

Le diagnostic bactérien primaire est basé sur la description macroscopique des souches isolées sélectionnées productrices d'enzymes qui permet la détermination des principaux caractères tels que la forme, la taille, la couleur et la consistance des colonies.

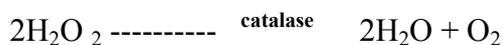
IV.2.Aspect microscopique des souches

La purification des souches isolées sélectionnées productrices d'enzymes est précédée par des repiquages successifs. La coloration de Gram et l'observation microscopique permet de distinguer deux grands groupes bactériens ; des bactéries à Gram positifs et à Gram négatifs avec la détermination de la forme, la taille, et le mode de regroupement.

La coloration de gram est réalisée selon la méthode classique (**annexe 05**).

IV.3.Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui intervient dans la décomposition de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



Après l'étalement d'une colonie bactérienne sur une lame propre, une goutte de peroxyde d'hydrogène est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Une lecture positive de la présence du catalase se manifeste par l'apparition de bulles d'air, due principalement à la décomposition de peroxyde d'hydrogène et la production d'oxygène.

IV.4.La galerie API[®] 20 E

L'utilisation de la galerie API[®] 20 E permet la mise en évidence de quelques tests biochimiques tels que la β -galactosidase (ONPG), l'Ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), production d'H₂S, utilisation du citrate, production d'indole et réaction de Voges-Proskauer, liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres.

La galerie API[®] 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes de la galerie API[®] 20 E sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. Les réactions positives des tests effectués sont traduites par les virages de couleur spontanés ou par l'addition des réactifs. Une lecture est effectuée à l'aide du tableau (**Biomérieux., 2006**).



Figure 14 : Galerie API 20 E ensemencée.

IV.5. Effet Antibiotique

Les tests d'évaluation des activités antimicrobiennes ont été réalisés contre 5 microorganismes pathogènes : *Acinetobacter* - *klebsiella* - *Bacillus* - *Serratia* et *Staphylococcus*.

IV.5.1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18h sur le milieu gélosé, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées de : *Acinetobacter* - *klebsiella* - *bacillus* - *seratia* et *staphylococcus* ont été prélevé puis décharger dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, après homogénéisation, la densité optique de la suspension doit être comprise entre 0.8 à 0.9 à 600nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

IV.5.2. Ensemencement des souches ciblent

un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension bactérienne et a été essoré en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum puis l'écouvillon a été frotté sur la totalité de la surface de la gélose Mueller Hinton sèche, de haut en bas, en stries serrées, l'opération a été répété deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement a été fini par le passage de l'écouvillon sur la périphérie de la gélose, en rechargeant l'écouvillon à chaque fois.

IV.5.3. Ensemencement des souches isolées

Un ensemencement en spots des souches isolées sur la surface de la gélose MH a été réalisé pour la détection de l'activité antibactérienne. Les cultures sont incubées à une température de 37°C pendant 24 heures.

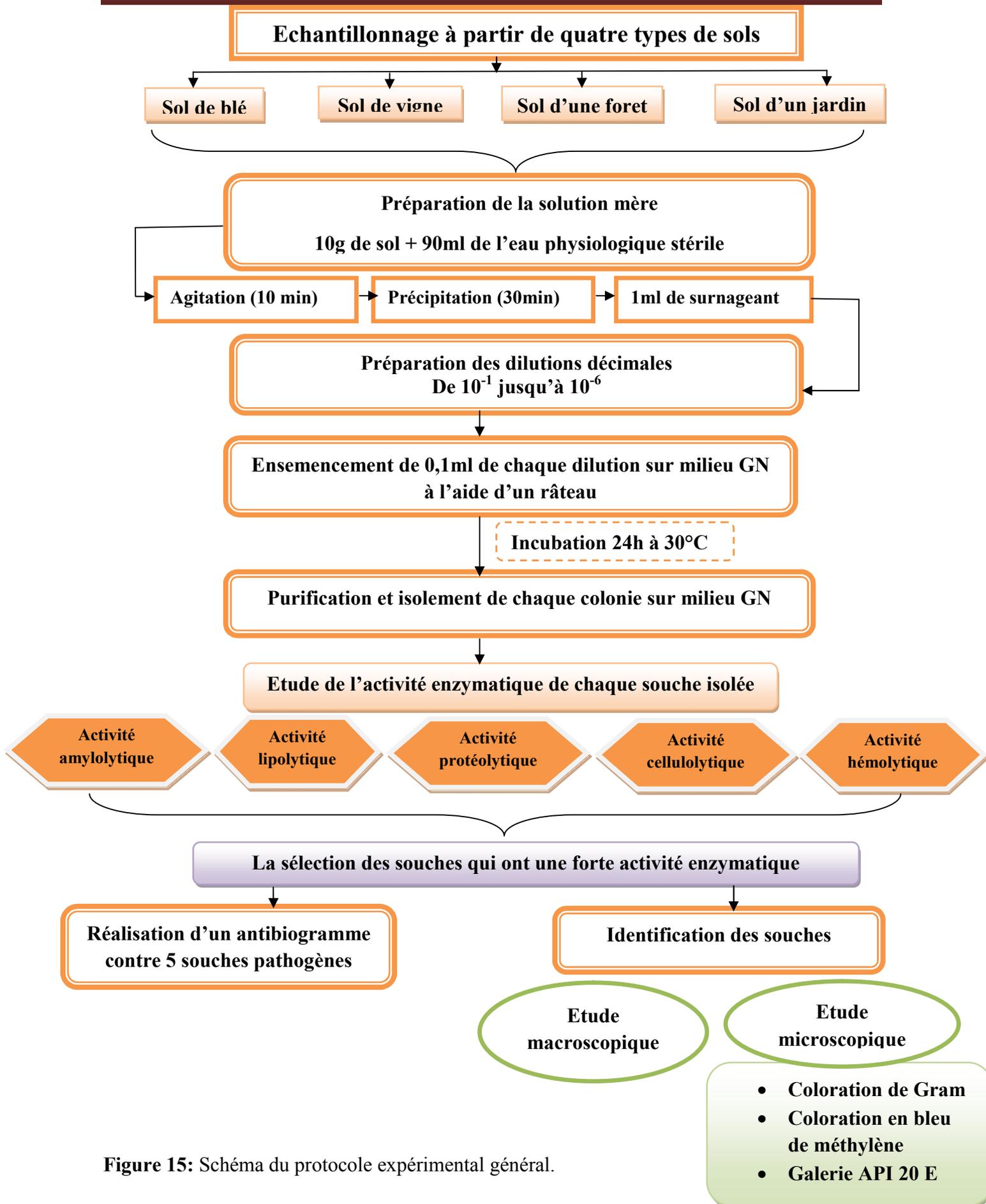


Figure 15: Schéma du protocole expérimental général.

I. Echantillonnage

Les prélèvements effectués dans ce présent travail sont choisis sur la base du degré de la charge en microorganismes. A cet effet, les échantillons sont collectés à partir d'un sol de blé, d'un forêt, d'une vigne et d'un jardin.

La couleur des échantillons est l'un des paramètres indicateurs de la charge microbienne, Les sols de couleur noire ou marrons foncés sont riche en microorganismes (**Figure 16**). Les prélèvements effectués sont ensuite transportés au laboratoire de microbiologie du centre universitaire d'Ain-Temouchent afin de procéder les analyses microbiologiques.

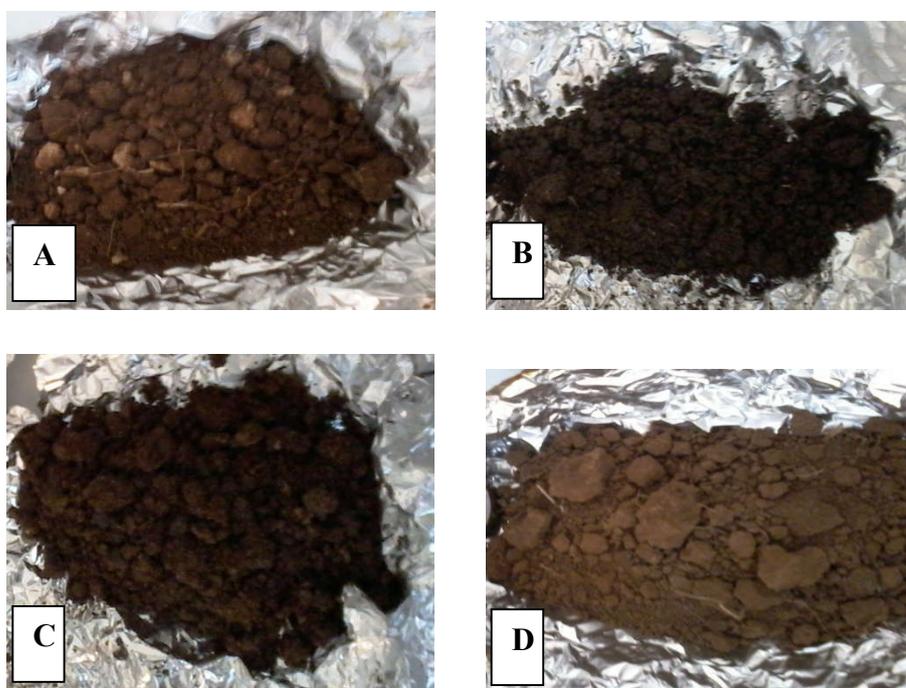


Figure 16 : Aspect macroscopique des 4 prélèvements effectués, « A » sol de blé, « B » sol d'une forêt, « C » sol d'une vigne, « D » sol d'un jardin.

Une pesée de 1 gamme des sols prélevés et des dilutions décimales (10^{-1} - 10^{-6}) à partir de la solution mère ont été préparées. L'étalement d'un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur la surface de gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'isolement de 42 différentes souches (**Figure 17**), répartis sur les sites de prélèvements effectués.

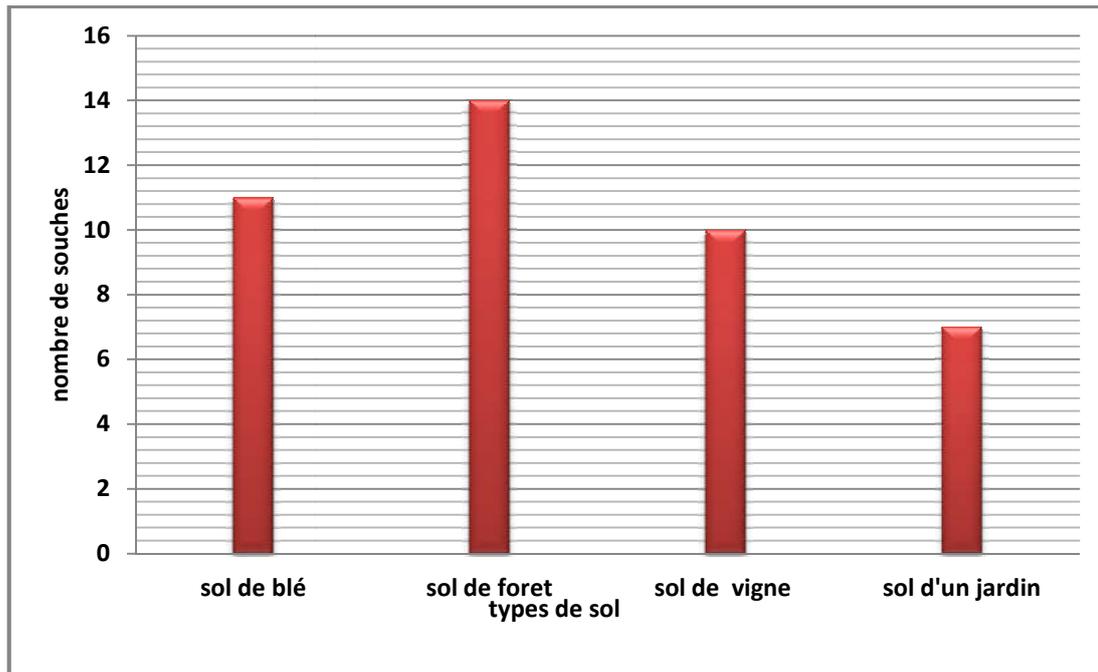


Figure 17 : Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués.

D'après l'histogramme, il en ressort qu'il y a présence d'une microflore dans les quatre sites de prélèvements effectués. La comparaison de la charge microbienne totale présente dans les quatre sites a permis de déduire que le sol du foret contient une microflore assez importante par rapport au sol de blé et de vignes. Cependant, le sol du jardin a montré la présence d'une faible diversité microbienne.

II. Isolement des souches

Un total de 42 souches ont été isolées et purifiées sur milieu gélose nutritive (GN) (Tableau 03).

Tableau 03 : Codes des isolats et leur milieu gélosé (GN)

Code des isolats			
Sol de blé	Sol de foret	Sol de vigne	Sol d'un jardin
B1-B2-B3-B4-B5-	F1-F2-F3-F4-F5-F6-	V1-V2-V3-V4-	J1-J2-J3-J4-
B6-B7-B8-B9-B10-	F7-F8-F9-F10-F11-	V5-V6-V7-V8-	J5-J6-J7.
B11.	F12-F13-F14.	V9-V10.	

B : blé

V: vigne

F : foret

J : jardin

III. Sélection des souches productrices d'enzymes :

La sélection des souches productrices d'enzymes est basée sur la présence du pouvoir amylolytique, cellulolytique, protéolytique, lipolytique et hémolytique.

III.1.L'activité amylolytique :

Le criblage est réalisé par l'ensemencement sur la surface de la gélose nutritive additionnée d'une concentration de 10% d'amidon, le protocole a permis l'isolement de 33 souches distinctes, caractérisées par la formation d'une zone clair autour des colonies obtenues à partir des quatre prélèvements effectués .

Les zones formées sont visibles, avec des diamètres généralement semblables.

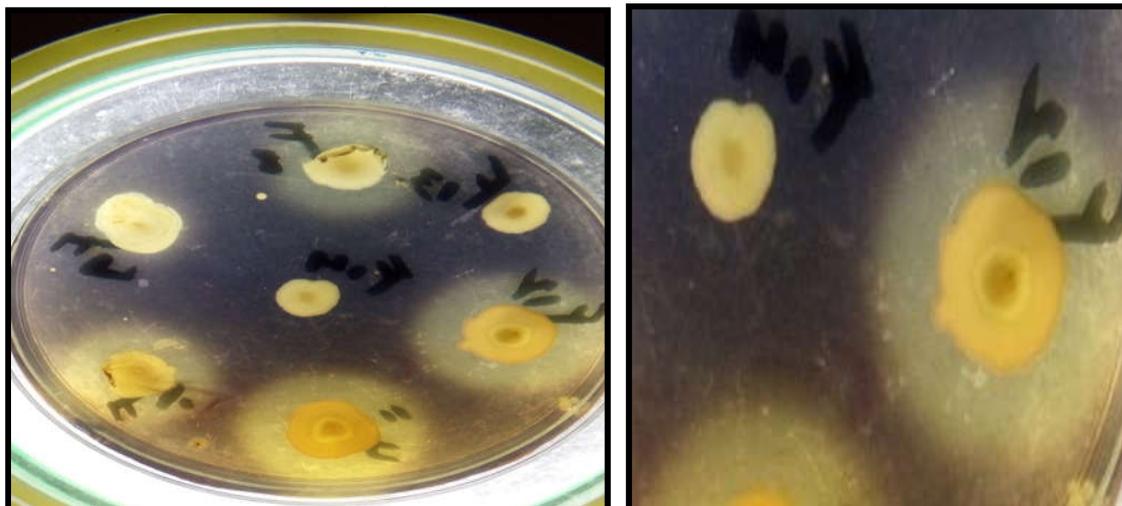


Figure 18: Le criblage des souches amylolytiques.

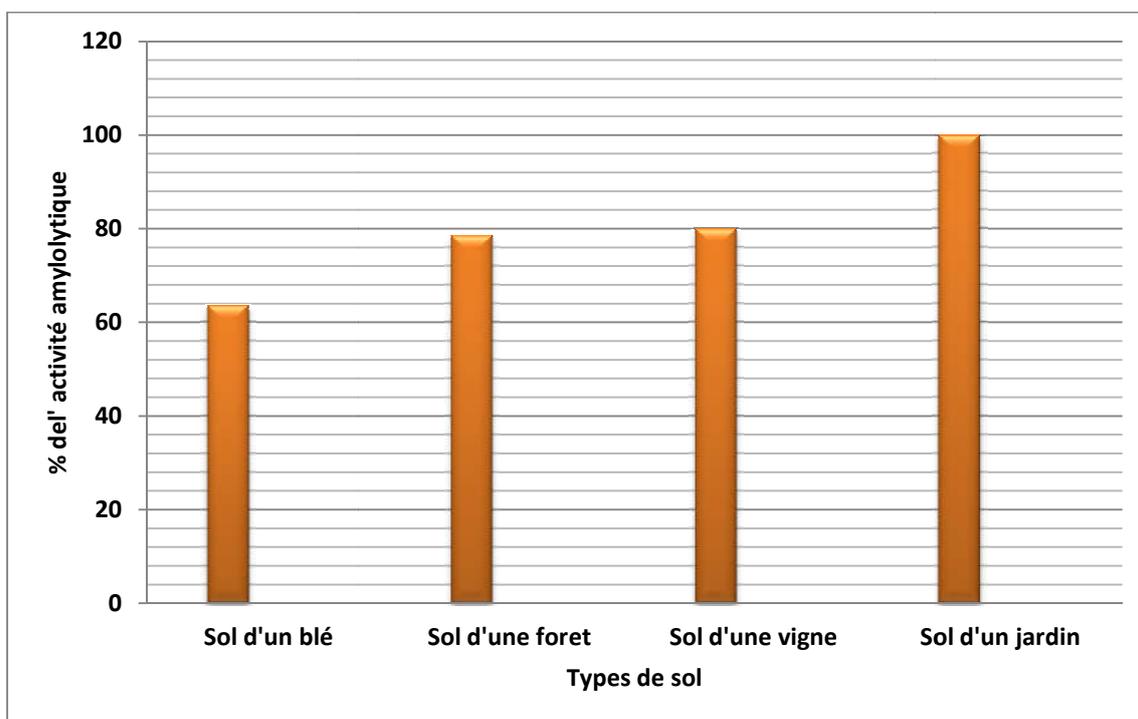


Figure 19: Présentation des pourcentages de l'activité amylolytique dans chaque type de sol.

D'après l'histogramme, le pourcentage de l'activité amylolytique change d'un sol à un autre. Le pourcentage le plus élevé est observé dans le sol d'un jardin (100%), suivi d'un pourcentage de (80%) dans le sol d'une vigne, (78,57%) dans le sol d'une forêt et (63,63%) dans le sol de blé.

III.2.L'activité cellulolytique

Le criblage est réalisé par ensemencement sur la surface de la gélose préparé pour la détection de l'activité cellulolytique a permis l'isolement de 35 souches distinctes, caractérisées par la formation d'une zone clair autour des colonies obtenues à partir des quatre prélèvements effectués (annexe 07).

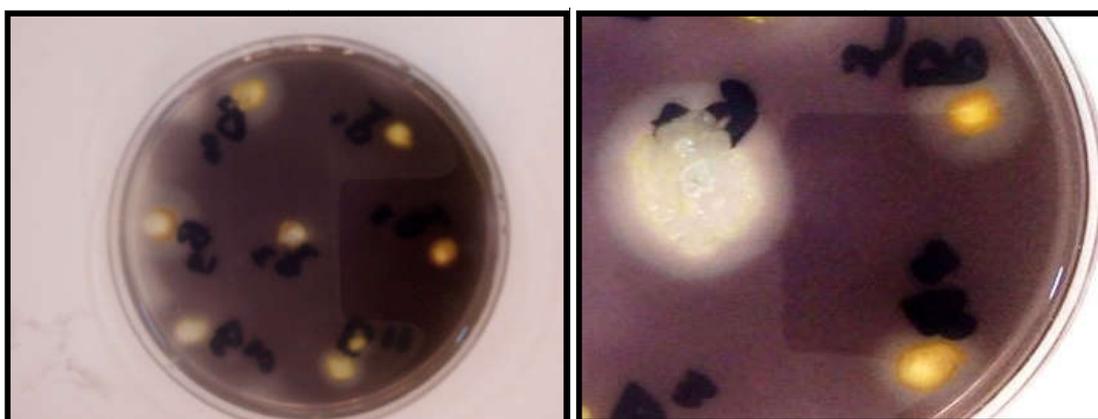


Figure 20: Le criblage des souches cellulolytiques.

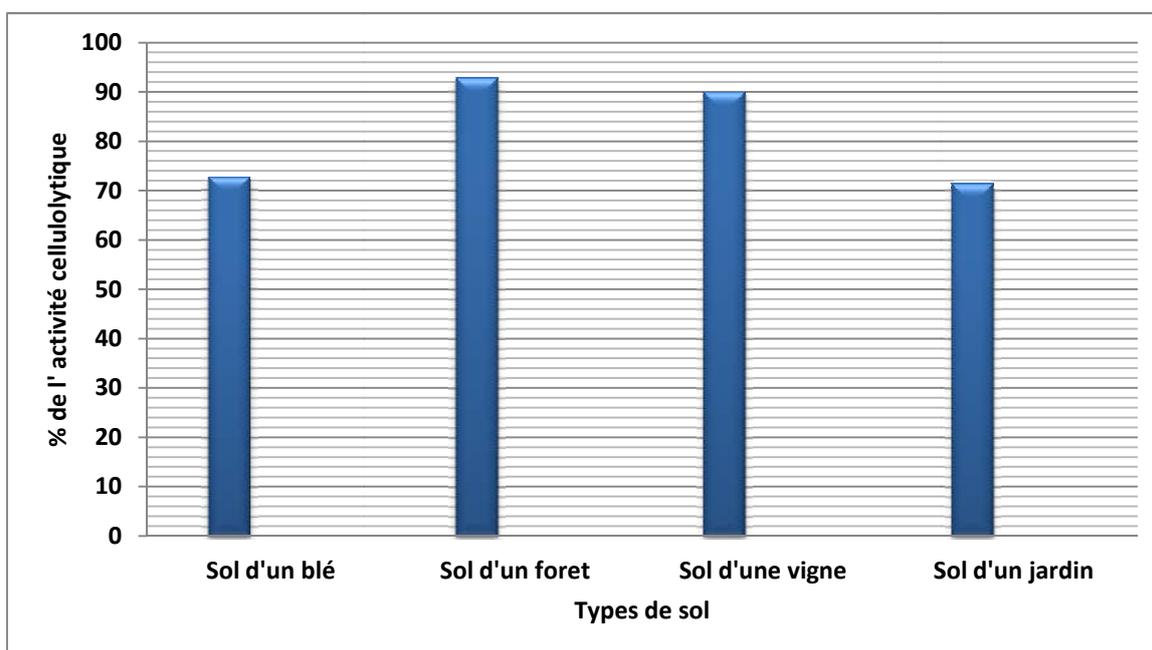


Figure 21: Présentation des pourcentages de l'activité cellulolytique dans chaque type de sol.

D'après l'histogramme du pourcentage de l'activité cellulolytique, le pourcentage le plus élevé est observé dans le sol d'une foret (92,85%), suivi d'un pourcentage de (90%) dans le sol d'une vigne, (72,72%) dans le sol de blé et (71,42%) dans le sol d'un jardin.

III.3.L'activité protéolytique

Le criblage est réalisé par ensemencement sur la surface de la gélose nutritive additionnée d'une concentration de 10% de lait et qui a permis l'isolement de 34 souches distinctes, caractérisées par la formation d'une zone d'hydrolyse autour des stries de colonies obtenues à partir des quatre prélèvements effectués (annexe 07).

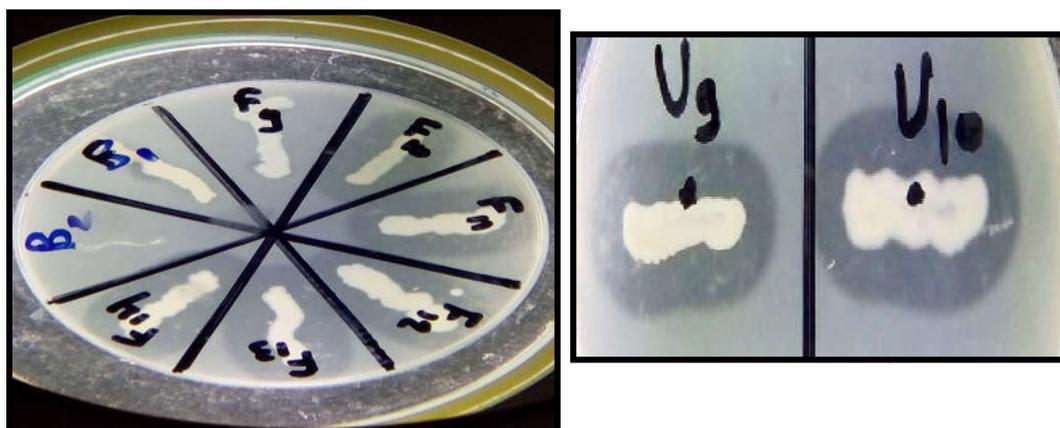


Figure 22 : Le criblage des souches protéolytiques.

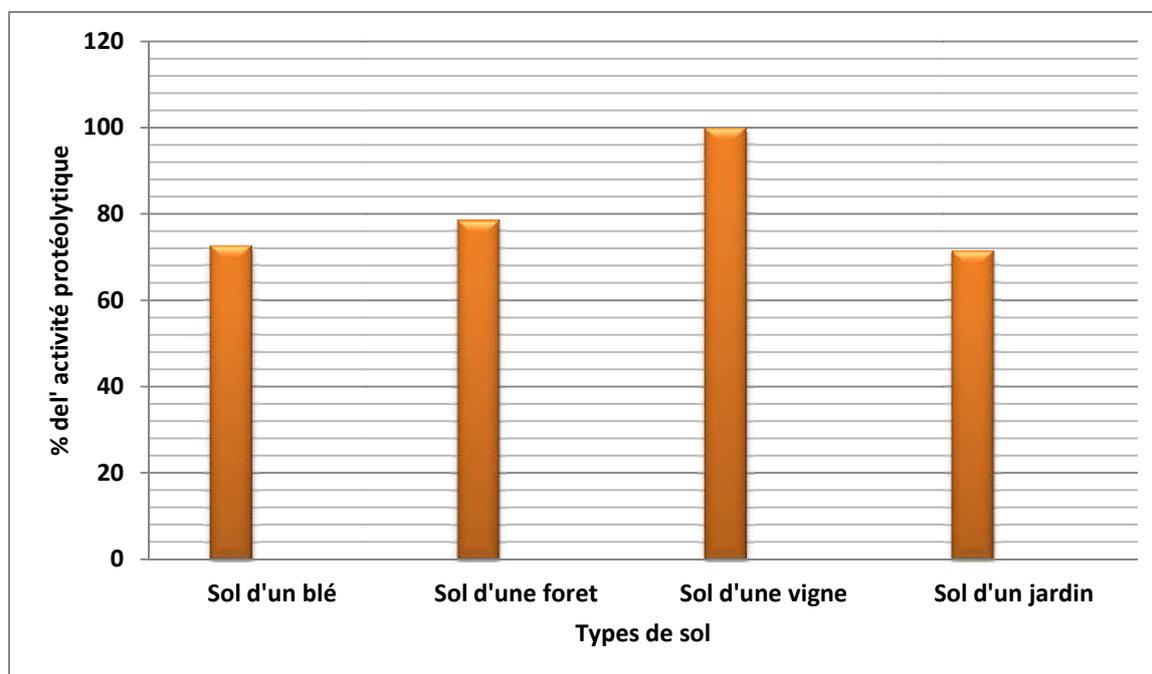


Figure 23: Présentation des pourcentages de l'activité protéolytique dans chaque type de sol.

D'après l'histogramme du pourcentage de l'activité protéolytique, un pourcentage de (100%) est observé dans le sol d'une vigne, suivi d'un pourcentage de (78,57%) dans le sol d'une foret, (72,72%) dans le sol de blé et (71,42%) dans le sol d'un jardin.

III.4. L'activité lipolytique

Le criblage est réalisé par ensemencement sur la surface de la gélose préparé pour la détection de l'activité lipolytique. 37 souches distinctes ont été isolées, caractérisées par la formation de la zone d'éclaircissement entourée d'un dépôt autour des colonies obtenues à partir des prélèvements effectués dû à la formation de cristaux de sel de calcium (**annexe 07**).

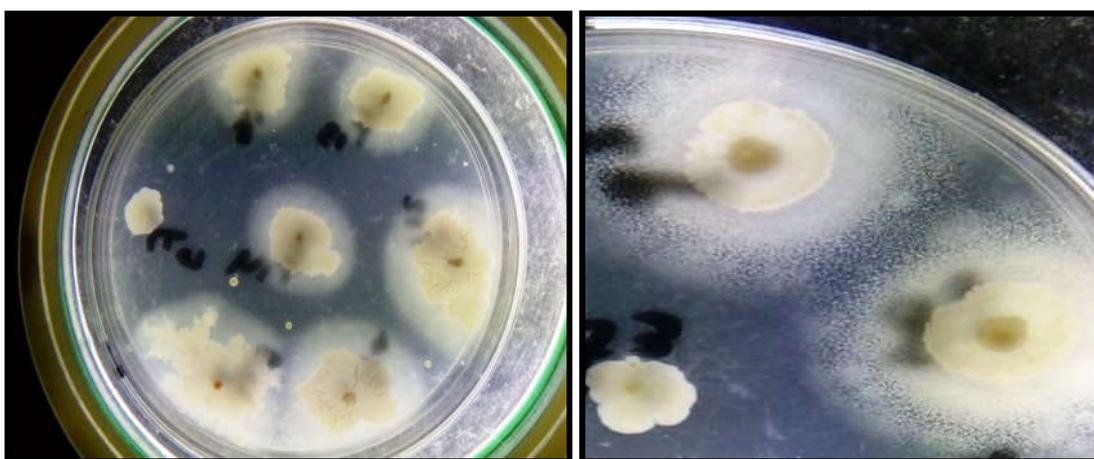


Figure 24: Le criblage des souches lipolytiques.

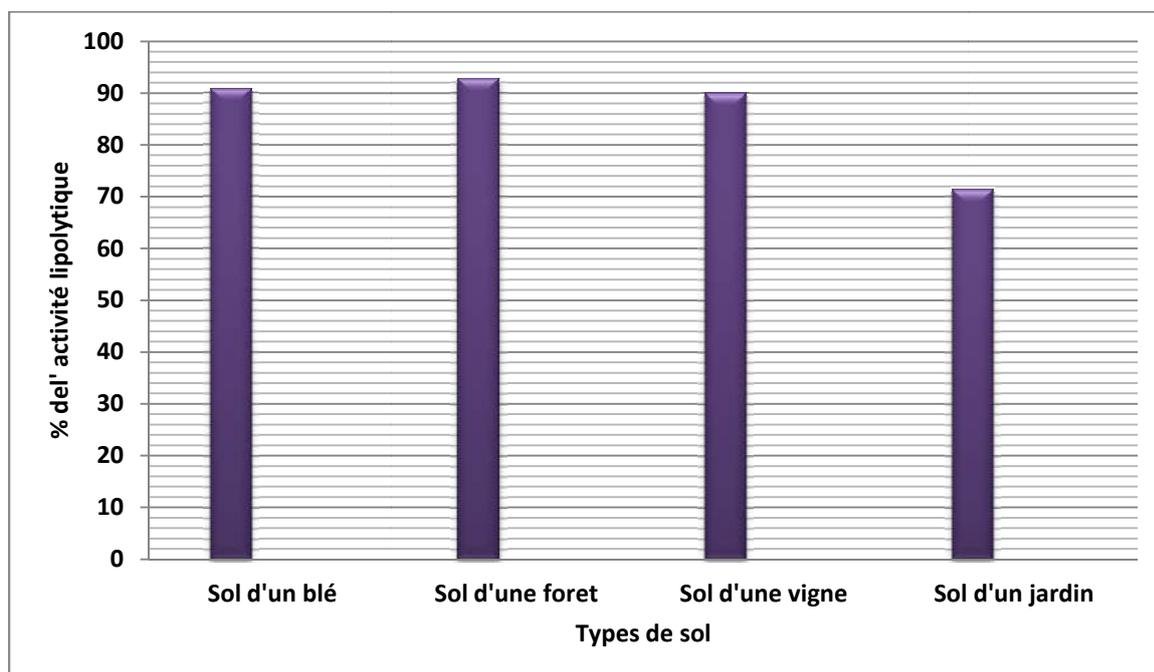


Figure 25: Présentation des pourcentages de l'activité lipolytique dans chaque type de sol.

D'après l'histogramme du pourcentage de l'activité lipolytique, le pourcentage le plus élevé est observé dans le sol d'une foret (92,85%), suivi d'un pourcentage de (90,90%) dans le sol de blé, (90%) dans le sol d'une vigne et (71,42%) dans le sol d'un jardin.

III.5.L'activité hémolytique

Le criblage est réalisé par ensemencement sur la surface de gélose au sang a permis l'isolement de 23 souches distinctes, caractérisées par la formation de la zone d'hémolyse autour des colonies obtenues à partir des trois prélèvements effectués. Les zones d'hémolyses formées sont généralement visibles, avec des différents diamètres (**annexe 07**).

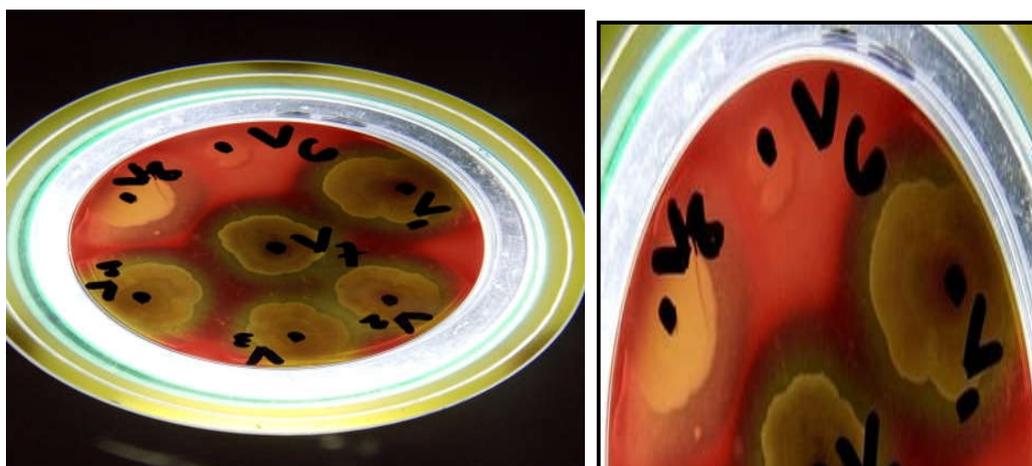


Figure 26: Le criblage des souches hémolytiques.

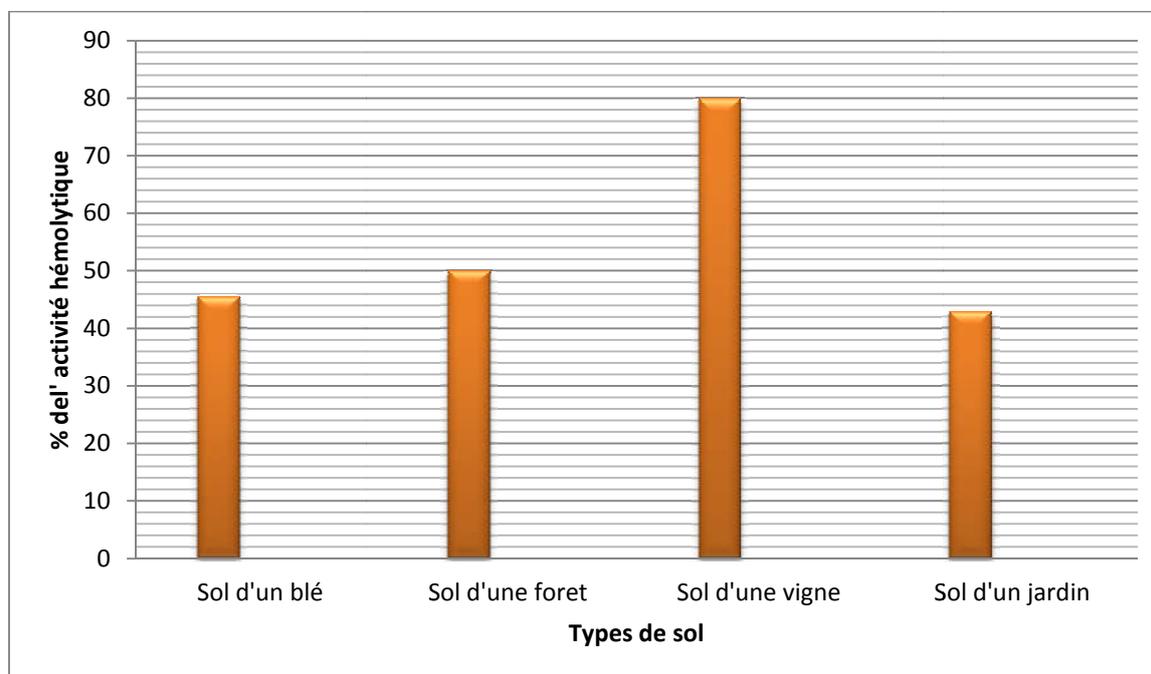


Figure 27: Présentation des pourcentages de l'activité hémolytique dans chaque type de sol.

D'après l'histogramme du pourcentage de l'activité hémolytique, un pourcentage de (80%) est observé dans le sol d'une vigne, suivi d'un pourcentage de (50%) dans le sol d'une foret, (45,45%) dans le sol de blé et (42,85%) dans le sol d'un jardin.

IV. Identification des bactéries criblées qui ont un pouvoir enzymatique

Parmi les 42 isolats testés, 04 isolats sont sélectionnés comme des souches qui ont un pouvoir enzymatique important (**annexe 03**)

L'étude de ces souches sélectionnées a nécessité plusieurs étapes, permettant leur identification et leur caractérisation physicochimique et métabolique.

Tableau 04: Présentation des souches qui ont un pouvoir enzymatique important.

Souche	Activité amylolytique	Activité cellulolytique	Activité protéolytique	Activité lipolytique	Activité hémolytique
F1	-	++	++	++	-
F3	+	++	++	+	-
F5	+	++	++	+	+
V3	+	++	++	+	+

+ : Production d'enzymes.

- : Pas de production d'enzymes.

IV.1.Aspect macroscopique

L'observation macroscopique et l'aspect des colonies isolées ont permis d'effectuer une caractérisation phénotypique primaire (**annexe 02**). De plus, l'ensemencement des souches isolées, sélectionnées productrices des enzymes sur la surface de la gélose nutritive et l'incubation à une température de 30°C pendant 24-48 heures a permis l'observation des quatre types de colonies, distinctes par leur forme, leur taille et leur aspect (**Tableau 05**).

Tableau 05: Présentation de différents aspects macroscopiques des 4 colonies isolées.

Critère Souche	Diamètre	Couleur	Forme	Surface	Consistance
F1	<3mm	Translucide	Ronde	Lisse et brillante	Crémeuse
F3	4mm	Jaunâtre	Irrégulière	Lisse et brillante	Crémeuse
F5	<3mm	Translucide	Ronde	Lisse et brillante	Crémeuse
V3	>3 mm	Blanchâtre	Ronde à bordure régulière	rugueuse	Crouteuse

IV.2. Etude microscopique et biochimique

L'observation microscopique est réalisée après la coloration de Gram. Les résultats illustrés dans l'**annexe 04** ont montré une variété de types bactériens. Les bactéries observées présentent différentes formes bacillaires et coccolaires. Elles sont assemblées en amas, en chainettes, ou même isolées. Elles présentent une paroi à Gram positive ou négative. Des spores sont observées dans les bactéries de formes bacillaires à Gram positive.

IV.2.1.La coloration de Gram

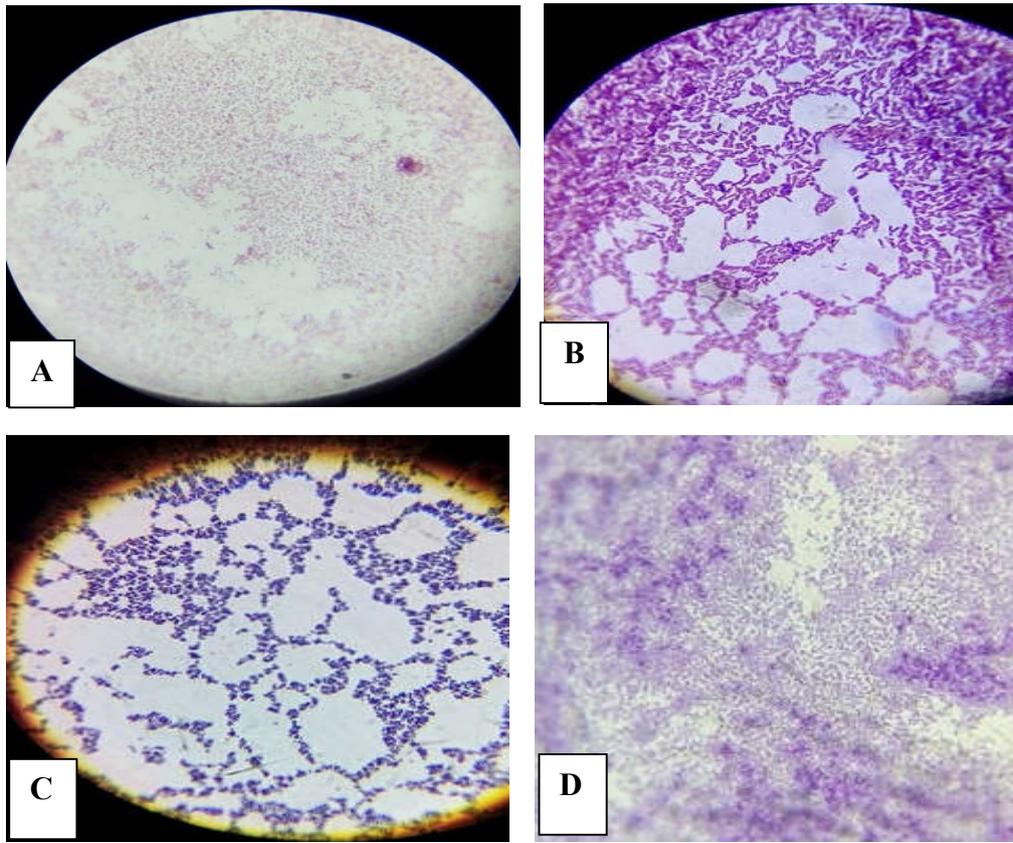


Figure 28: Observation microscopique des souches F1 (A), F3 (B), F5 (C), V3(D) après coloration de Gram (Gross 100x10).

IV.2.2.La coloration en bleu de méthylène

Les résultats de la coloration en bleu de méthylène (annexe 06) montrent que les souches F3 et V3 produisent des spores (Tableau 06).

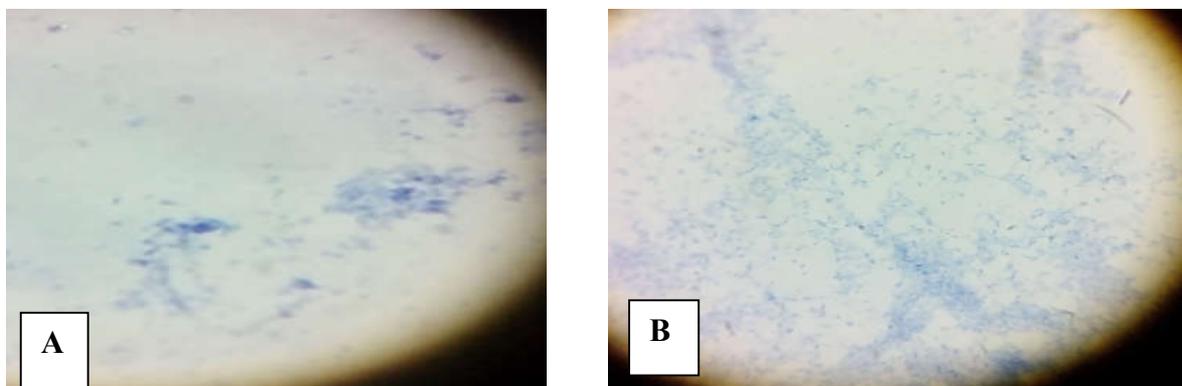


Figure 29: Observation microscopique des souches F3 (A), V3 (B) après coloration en bleu de méthylène (Gross 100x10).

Tableau 06: Présentation des résultats de la recherche des spores par la coloration en bleu de méthylène.

Souches	La présence des spores
F1	-
F3	+
F5	-
V3	+

IV.2.3. Test catalase

Les souches F3 et V3 ont manifesté une réaction positive du test catalase, traduite par une effervescence lors du contact des souches testées avec le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 30).



Figure 30: Présentation des résultats du test de catalase

Tableau 07: Illustration des caractéristiques morphologiques et biochimiques des 4 souches isolées.

Souche Caractère	F1	F3	F5	V3
Coloration de Gram	+	+	+	+
Taille de la cellule	<1 µm	0.9 × 4µm	<1 µm	06 × 3µm
Forme	Cocci	Bacille	Cocci	Bacille
Présence de spores	-	+	-	+
Mode regroupement	En chainettes	Isolés	En chainettes	Isolés
Mobilité	immobile	Mobile	Immobile	Mobile
Catalase	-	+	-	+

+ : résultat positif

- : résultat négatif

IV.2.4. Galerie Api

L'identification biochimique de F1, F3, F5 et V3 est effectuée sur galerie API 20E. Après 24 h d'incubation à 37C, le changement de couleur dans chaque cupule est noté (**Figure 31**) et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau.



Figure 31: Résultats de l'identification sur galerie API20E des quatre isolats.

Tableau 08: Illustration du profil biochimique des souches isolées, productrice d'enzymes, par l'utilisation de la galerie API®20 E.

Test Isolat	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H ₂ S	Urée	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A
F1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
F3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
V3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

+ La couleur du milieu a complètement changé

- La couleur du milieu n'a pas changé

Après l'ensemencement de la galerie API20E avec une suspension de chaque souche isolée et une incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture des résultats s'est effectuée par l'observation du changement de couleur des tests, l'utilisation du logiciel d'identification ABIS online a permis l'orientation de l'identification des souches isolées (**Tableau**).

Tableau 09: Illustration des résultats d'identification des 4 souches.

Isolats	Taxon
F1	<u><i>Streptococcus sp.</i></u>
F3	<u><i>Bacillus tequilensis</i> (84.9%)</u>
F5	<u><i>Streptococcus sp.</i></u>
V3	<u><i>Bacillus licheniformis</i> (82.9%)</u>

V. Recherche de l'effet antibiotique

Le choix des souches de test dépend du but spécifique de la recherche .Les souches de référence sensibles aux antibiotiques sont de préférence employées.

Des souches du genre *Acinetobacter*, *klebsiella*, *Bacillus*, *Serratia* et *Staphylococcus* ont été utilisées afin d'apprécier l'effet antagoniste des souches isolés vis-à-vis de ces bactéries de référence.

Cette technique est une méthode de diffusion sur le milieu gélosé MH qui permet de détecter l'effet inhibiteur des souches isolés envers des bactéries test. Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion du composé antimicrobien, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Tableau 10: Illustration des résultats de l'effet antibiotique des souches isolées, productrice d'enzymes.

	<i>Acinetobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Serratia</i>	<i>Staphylococcus</i>
F1	-	-	-	-	-
F3	+	+	+	+	-
F5	-	+	-	-	-
V3	-	+	+	+	-

+ : présence d'une zone d'inhibition

- : absence d'une zone d'inhibition

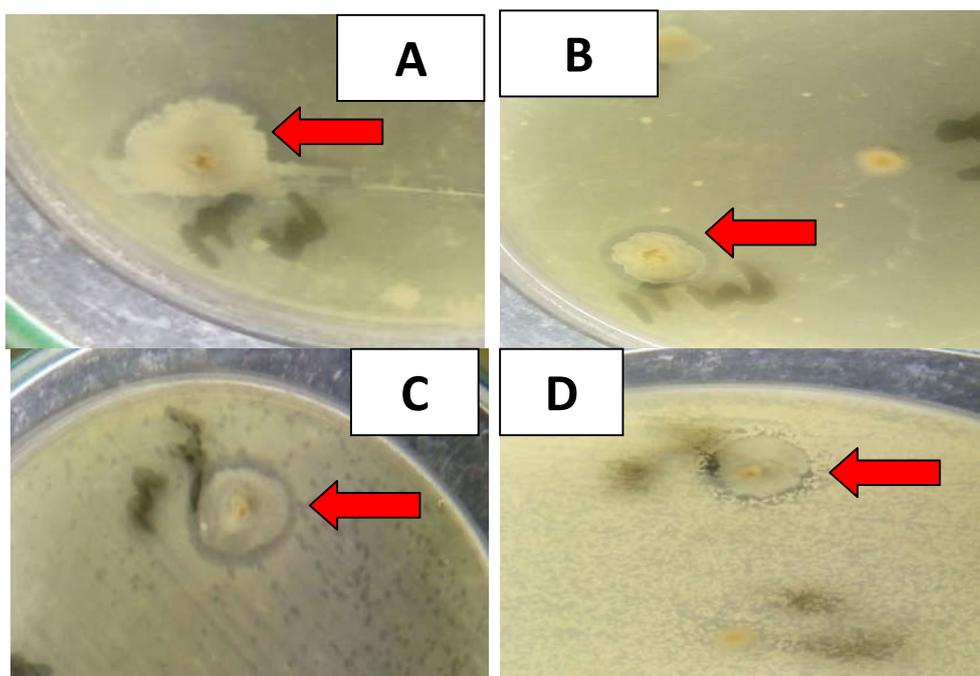


Figure 32: Résultat de l'effet antibiotique de F3 (A : contre *klebsiella* - B : contre *Acinetobacter* – C : contre *Serratia* – D : contre *Bacillus*)

Discussion

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan et al., 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith et al., 2000).

D'après notre résultat, on peut déterminer que le nombre (Figure 18) et l'activité enzymatique changent d'un sol à un autre.

L'utilisation des bactéries pour la production d'enzyme dans le sol, pour améliorer la biodisponibilité des nutriments pour la plante, ou pour la production des hormones afin d'améliorer la croissance des plantes, a été étudiée par plusieurs auteurs et présente beaucoup d'avantages (Belhadi et Ait Meddour, 2013).

Les enzymes extracellulaires peuvent dégrader les nutriments insolubles présents dans le sol comme les protéines, l'amidon et la cellulose (Burns et Wallenstein, 2010).

L'exploration des échantillons du sol d'Ain-Temouchent a abouti à l'isolement de 42 isolats. Ce nombre reste très négligeable par rapport à l'énorme diversité en souches bactériennes d'un écosystème où les conditions climatiques et physicochimiques sont optimales.

Notre échantillon présente une vaste diversité microbiologique qui regroupe des bacilles à Gram positive et à Gram négative, des cocci à Gram positive et à Gram négative (Tableau 12).

Concernant l'aspect des colonies isolées, on a trouvé des colonies crouteuse à bord régulier ou irrégulier, sèche ou très muqueuse ; petites colonies sphérique crémeuse; colonies jaunâtre, circulaire et de grandes colonies blanchâtre, ronde.

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif sporulés, beaucoup ne sont pas pathogènes (Tony et Paul, 1996).

Notre résultat montre que 61,90% des isolats sont des bacilles à Gram positive (Tableau 12) et que la majorité de ces bactéries possèdent des spores, donc on peut déterminer que le genre le plus répondeu dans notre échantillon et le genre *Bacillus*.

D'après les résultats obtenus, ces bacilles à Gram positives présentent une forte activité enzymatique (Tableau 11).

Ces résultats sont proches à ceux obtenus par (Hellio, 1993), Les tests effectués sur les isolats montrent la présence d'une importante diversité microbiologique dans l'échantillon de Sétif (Maabouda), et que le genre *Bacillus* qui possèdent une très bonne activité protéasique est le plus dominants par rapport aux autres genres dans les isolats du sol.

Tableau 11: Illustration des pourcentages des activités enzymatiques des bacilles à Gram positive.

Activité enzymatique	Pourcentage
Amylolytique	69,23%
Cellulolytique	92,30%
Protéolytique	88,46%
Lipolytique	92,30%
Hémolytique	50%

Tableau 12: le pourcentage des Caractères cultureux et morphologiques des isolats du sol.

Bactéries	Pourcentage de la présence dans le sol
Bacille à Gram positive	61,90%
Cocci à Gram positive	26,19%
Bacille à Gram négative	07,14%
Cocci à Gram négative	04,76%

L'activité amylytique est observée chez 78.57 % des isolats obtenus à partir du sol (Tableau 13).

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Elles peuvent dériver de plusieurs sources comme les plantes, les animaux et les microorganismes. Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (Vidyalakshmi et al., 2009).

Shonkor et al., (2011) ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à

activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases ...etc.).

La synthèse d'enzymes amylolytiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique et fournit les éléments minéraux nécessaires pour la croissance des autres organismes.

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone, elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (**Lee et al., 2007**).

Pendant de nombreuses années, les bactéries dégradant la cellulose ont été ciblées et caractérisées pour l'obtention de cellulases plus efficaces (**Otajewwo et Aluyi, 2011**).

Dans ce travail, la production de la cellulase est observée chez **83.33%** des isolats obtenus à partir du sol (**Tableau 13**), Cette enzyme leurs permet de bien résister dans le sol, car la cellulose est le nutriment le plus abondant.

Selon **Lu et al., (2005)**, les espèces de *Bacillus* jouent un rôle important dans la biodégradation et la bioconversion des composés de haut poids moléculaires, *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* sont fréquemment signalées parmi les espèces cellulolytiques.

Notre résultat est similaire à celui trouvé par **Lu et al., (2005)**, La souche *Bacillus licheniformis* codée V3 présente une forte activité enzymatique (**Tableau 09**).

Environ 80% des bactéries cellulolytiques isolées jusqu'à présent sont des Gram positives et sont réparties en seulement deux phylum (**Schwarz, 2001**).

Les protéases sont les enzymes les plus importantes en industrie avec 60% du total des enzymes vendues (**Ningthoujamet al., 2009**). La dégradation des protéines par les protéases microbiennes est importante dans le cycle d'azote au niveau du sol, en le rendant disponible pour les plantes et les micro-organismes (**Petit et Jobin, 2005**).

80.95% représentent le pourcentage de l'activité protéolytique des isolats du sol dans notre étude (**Tableau 13**).

Elles sont utilisées dans le domaine alimentaire, l'industrie fromagère, les détergents, l'industrie de soie, domaine de la pharmacologie et la production de médicaments et dans l'agriculture (**El-Safey et Abdul-Raouf, 2004**).

L'activité protéasique peut avoir un effet plus poussé, elle influence indirectement la synthèse des auxines en libérant les acides aminés comme le tryptophane qui est le précurseur de la synthèse de l'AIA et d'autres substances appariées (**Mansour et al., 1994**).

Les protéinases de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées (**Sinsuwan et al., 2008**), et d'après notre résultat la souche *Bacillus licheniformis* codée V3 présente une très bonne activité protéolytique (**Tableau 04**).

L'intérêt des lipases microbiennes n'a cessé d'augmenter au cours des 25 dernières années, principalement en raison du grand nombre d'applications qu'elles offrent dans différents domaines. Les lipases microbiennes présentent comme avantages d'une part, les procédés de fabrication sont relativement simples comparés aux lipases d'origine animale, et d'autre part, elles montrent une grande stabilité vis-à-vis de la température, des détergents et des enzymes protéolytiques (**Sharma et al., 2001**).

Dans ce travail, l'activité lipolytique est observée chez **88.09%** des isolats du sol. Les lipases sont largement répandues chez les bactéries du sol (**Tableau 13**).

D'après Sharma et al., (2001) ; Gupta (2004) ; Fickers et al., (2007), Les lipases sont largement répandues chez les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. Elles sont aussi bien produites chez les bactéries Gram + (*Bacillus* et *Staphylococcus*) que les bactéries Gram⁻.

D'après Ji et al., (2014), les bactéries du genre *Bacillus* produisent des lipases.

El-Safey et Abdul-Raouf, (2004) rapportent que les souches de *Bacillus* sont productrices de grandes quantités de lipase, et d'autres types d'exo-enzymes à la fin de la phase exponentielle de leur croissance.

Dans ce travail, l'activité hémolytique est observée chez **54.76 %** des isolats du sol (**Tableau 13**).

Les bactéries *Streptococcus sp.* codée F5 et *Bacillus licheniformis* codée V3 sont hémolytique, capables de détruire incomplètement les globules rouges (hémolyse alpha), la zone d'hémolyse est moins claire et verdâtre. Par contre les bactéries *Streptococcus sp.* codée F1 et *Bacillus tequilensis* codée F3 ne possèdent pas une activité hémolytique.

L'hémolyse est reconnue comme un facteur majeur de virulence (**Vazquez Boland et al., 2001**).

L'hémolyse est très variable et dépend de la souche, de la technique employée et de l'expérience du manipulateur (**Fujisawa et Mori, 1994**).

Tableau 13: Illustration des pourcentages des activités enzymatiques des isolats du sol.

Activité enzymatique	Pourcentage
Amylolytique	78,57%
Cellulolytique	83,33%
Protéolytique	80,95%
Lipolytique	88,09%
Hémolytique	54,76%

De nombreuses souches de *Bacillus* sont aujourd'hui utilisées dans la lutte biologique grâce à leurs substances antimicrobiennes et leurs enzymes (**Killani et al., 2011**).

La lutte biologique consiste dans l'utilisation de micro-organismes pour détruire ou diminuer les populations d'animaux nuisibles, rongeurs ou insectes en général. Il s'agit d'une pratique ancienne, appliquée essentiellement en agriculture et en médecine (**Jean-Pierre Dedet, 2007**).

Les espèces du genre *Bacillus* fournissent une des vastes gammes de molécules ayant une activité antibiotique, avec 167 molécules différentes en structures et mode d'action (**Tony et Paul, 1996**).

D'après notre résultat, les deux souches identifiées *Bacillus tequilensis* et *Bacillus licheniformis* codées respectivement F3 et V3 présentent une activité antibactérienne contre la majorité des souches pathogènes testées, les deux souches sont capables d'inhiber *Klebsiella*, *bacillus* et *seratia*. En plus de ces trois souches pathogènes la souche *Bacillus tequilensis* est

capable d'inhiber *Acinetobacter*. Par contre les deux souches sont incapables d'inhiber *staphylococcus*.

Aujourd'hui, le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques (**Calgagno et Lacroix, 2011**). Donc La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable.

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à des nouvelles molécules antibactériennes. Bien que son rendement se soit réduit au cours des dernières années, néanmoins, il est pratiqué jusqu'à ce jour par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus exotiques et en mettant au point des méthodes de sélection qui favorisent des espèces rares (**Abdelaziz, 2006**).

Les enzymes réveillent une grande importance biotechnologique dans de nombreuses industries tels que : l'agroalimentaire, pharmaceutique, chimie industrielle, l'écologie etc grâce à leur utilisation potentielle et leurs diverses exploitations comme biocatalyseurs.

Ce travail, réalisé dans la période de Février - juin de l'année 2019 avait pour objectif de déterminer l'activité enzymatique et de définir le profil de sensibilité de quelques souches pathogènes contre les souches isolées des échantillons de quatre sol différents.

Alors, dans cette étude 42 souches bactériennes ont été isolées et les quatre qui présentent une forte production d'enzymes ont été identifiées au laboratoire de microbiologie sur la base des tests d'identifications morphologiques, physiologiques et biochimiques.

Toutes les souches étudiées ont montré au moins une activité enzymatique, ce qui démontre leur importance.

La lipase est l'enzyme, la plus produite par nos souches (88,09%) ; suivie par la cellulase (83,33%) ; puis la protéase (80,95%) et l'amylase (78,57%).

En plus de leurs richesses en différents métabolites, ces bactéries se sont révélées inhibitrices de la croissance de certaines bactéries pathogènes tels que : *Klebsiella*, *Bacillus* et *Serratia*.

En perspective, des études approfondies doivent compléter ce travail tel que :

- D'identifier avec exactitude les souches, jusqu'au niveau de l'espèce par les caractéristiques physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires plus approfondies.
- Purification des enzymes par méthodes chromatographiques
- Caractérisation des gènes impliqués dans la production des enzymes.
- La production industrielle de ces enzymes.

A

1. **Abdelaziz W. (2006).** Isolement des mycètes producteurs des substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magistère En Microbiologie et Biochimie Appliquées .Université
2. **Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C., 2008.** Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American J.Biochem.Biotechnol.*, 4 (4);354-366.
3. **Alais C., Linden G. et Miclo L. (2008).** Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris, pp.67-71.
4. **Arnaud, A., C. Berset, J. Bocquet, M. Bouix, Y. Cerisier E G.F. Cuvelier, D. De Nettancourt, J.M. Engasser, P. GaW, J. Goursaud, M. Cnrenini, J.P. Guiraud, A. Iwen4 C. JupiqJ.-M. Lebeault, J.-Y. Leveau, J. Martial, C. Mawas, F. Normand-Plessieq S. Pierrard,J. Pourq P.-J. Raugel, H. Richard, H. Steenbrugge, E. Teoule, D. Thomas et J.-P.Vandecasteele (1993).** Biotechnologies. 4ième ed, Scriban R. (éd), Technique et Documentation La voisie E Paris, France, 904 pages.
5. **Atlas R. M. & Bartha R. (1992).** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
6. **Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F. (1982).** Les enzymes: Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp.23;123;140–153.
7. **Aviron-Violet, P., J.L. Baret, C. Bertrand,B.Blazy, F. Bouvier, M. Comtat, P.R. Coulet P.Dupuy, J.F. Hervagault, A. Joyeau4 J. Laurent, P. Monsaq D. Thomas, P. Sicard etG.M.A. Van Beynum (1982).** Les enzymes. Prurction et utilistion inùstrielles. Durand G. et P. Monsan (eds), Bordas, Paris, France, 349 page.

B

8. **Belhadi F. et Ait Meddour K. (2013).** Isolement et caractérisation des bactéries productrices d'enzymes à intérêt agricole à partir du sol et d'algues marines. *Ecologie Microbienne et Environnement*.
9. **Benaouida K. (2008).** Étude de l'alpha amylase de levure isolées d'un écosystème extrême (sol environnant des sources thermales) et cultivées sur un milieu à base de lactosérum. Thèse magister. Biotechnologie microbiennes. Constantine. UM. 104p.
10. **Benmedjahed L. et Bengrine K. (2017).** Etude des paramètres cinétiques de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse magister. Biologie. Tlemcen.
11. **Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 17.
12. **Bhat M.K. (2000).** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Journal of biotechnology Advances*. Volume 18, Pp 355-383.
13. **Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. and Prinsep M.R. (2006).** Marine natural products. *Natural Products Reports*; 23:26–78.
14. **Bousseboua H. (2005).** « Le sol et les éléments de microbiologie». Campus-Club, Algérie, (2ème Edition) ,179-199.
15. **Burns R.G. and Wallenstein M. (2010).** Microbial extracellular enzymes and natural and synthetic polymer degradation in soil: current research and future prospects .A School of Land, Crops and Food Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072.

C

16. **Calgagno F., Lacroix R. (2011).** Pharma-memo Infectiologie. Paris, France: Editions Vernazobres-Greco. 246 p.

D

17. **Dalev P.G. (1994).** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresour. Technol.*, 48; 265–267.
18. **Devi M.K., Banu A.R., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V., Palaniswamy M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J.Sci. Technol.*, 1(7); 1–6.
19. **Drouin M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maître Des sciences (MSc.). Canada.
20. **Duchaufour P. (1965).** Précis de pédologie. Paris: 2ème édition, 481 p. **Dvail, S., Grety, J. et Lenzini, M. (2010).** Les actinomycètes, source de biomolécules d'intérêt industriel. Haute école de la province de liège.

E

21. **El-Safey EM et Abdul-Raouf UM. (2004).** Production, purification and characterization of protease enzyme From *bacillus subtilis*. International Conferences For Development And The Environment In The Arab World, Assiut Univ. , p14.
22. **Evans D.A., Bravo J.E. (1983).** Plant protoplast isolation and culture. *Int.Rev.Cyt.Supl.No 16*, pp 33-53.

F

23. **Fickers P., Destain J. & Thonart P. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : Principales caractéristiques et application. *Biotechnol.Agron. Soc. Environ.*12: 119-130.
24. **Fujisawa T., Mori M. (1994).** Evaluation of media for determining hemolytic activity and that for transmission by food. *New Engl. J. Med.* , 308,203-206.

25. **Fujita Y., Takashashi S., Ueda M., Tanaka A., Okada H., Morikawa Y., Kawaguchi T., Arai M., Fukuda H., Kondo A. (2002).** Direct and efficient production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 68 No10, pp : 5136-5141.

G

26. **Gandhi N.N. (1997).** Applications of lipase. *Review.* 74:621-634.

27. **Geraldine S., MalaJ., Satoru T. (2009).** Perspectives on Lipase Enzyme Technology .Pp 147.

28. **Gogny, M et al., (2001).** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. Edition le point vétérinaire. pp. 165-168.

29. **Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 59; 15–32.

30. **Gupta R., Gupta N et Rathi P. (2004).** Bacterial lipases: an over view of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*64, 763–781.

31. **Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A.A., Sinitsyna O.A., BerlinA.G., Ankudimova N.V. (2000).** Indigo-binding domain in cellulase molecule. *Biocatalysis Fundamentals and applications.* pp: 340-348.

H

32. **Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N., 2007.** Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc.Biochem.*, 42; 791–797.

33. **Hasan F., Ali Shah A. & Hameed A. (2006).** Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology.* 39: 235251.

34. **Headon, D., & Walsh, G. (1994).** The industrial production of enzymes. *Biotechnology advances*, (1994);12(4), 635-646.

35. **Hellio F.C., Orange N. and Guespin-Michel J.F. (1993).** Growth temperature controls the production of a single extracellular protease by *Pseudomonas fluorescens* MFO, in the presence of various inducers. Res. Microbiol.144: 617-625.

36. **Hitesh J., Nimita U., Darshan D., Manthan K., Shilpa S., and Jagdish P. (2016).** Isolation, Optimization and Production of Cellulase by *Aspergillus niger* from Agricultural Waste. Journal of pure and applied microbiology. Vol. 10(2), Pp. 1159-1166.

I

37. **Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., Burt Jr E.H. (2001).** Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. J. Microbiol. Methods., 47; 199–208.

J

38. **Janaki T. (2017).** Enzymes From Actinomycetes. International Journal of Chem Tech Researc.10(2): 176-182.

39. **Jarrar, H. (2011).** Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles. école nationale supérieure de chimie de montpellier.

40. **Jean Philippe Chenel. (2005).** Production d'enzymes protéolytiques par des bactéries non conventionnelles isolées de boues d'épuration municipales. Fédération d'agriculture biologique du Québec.

41. **Jenkinson D.S. & Powlson D.S. (1976).** The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. In "Ecosystèmes et changements globaux". Les dossiers de l'Environnement de l'INRA, 8 : 81-85.

42. **Ji S.H., Gururani M.A. et Chul C.S. (2014).** Isolation and characterization of plant growth promoting end ophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiological Research.169, 83– 98.

43. **Jean-Pierre Dedet. (2007).** Livre La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. p 13.

K

44. **Killani A.S., Abaidoo R.C., Akintokun A.K. et Abiala M.A. (2011).** Antagonistic Effect of Indigenous *Bacillus subtilis* on Root-/Soil-borne Fungal Pathogens of Cowpea.3(3):11- 18.
45. **Kottwitz B., Upadek H.et Carrer G. (1994).** Applications and benefits of enzymes in detergent. Chim Oggi, 12, pp.21-4.
46. **Kubicek C.P., Messner R., Gruber F., Mach R.L. Kubicek Pranz E.M. (1993).** The Trichodermacellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. Enzyme Micro. Technol. No 15. pp: 90-99.
47. **Kudrya V.A. et Simonenko I.A. (1994).** Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology 41: 505-509.
48. **Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a).** Purification of extracellular acid protease and analysis offermentation metabolites by Synergistessp. Utilizing protein aceoussolid waste from tanneries. Bioresour. Technol., 99; 2364–2372.
49. **Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R., Bhalla T.C. (2008b).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Res.J.Microbiol., 3(12); 661–672.

L

50. **Laxman R.S., Sonawane A.P., More S.V., Rao B.S., Rele M.V., Jogdand V.V., DeshpandeV.V., Rao M.B. (2005).** Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. Proc.Biochem., 40; 3152–3158.
51. **Lee, Y., Kim B., Lee B., Jo K., Lee N., Chung C. and Lee J. (2007).** Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3, utilizing rice hull Bioresour Technol, 98(2):288-297.
52. **Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001).** Industrial use of enzymes. Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

53. **Lo H.F., Lin L.L., Chen H.L., Hsu H.H., Chang C.T. (2001).** Enzymatic properties of a SDS resistant *Bacillus* sp. TS-23 Alpha-amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*. (36):743-750.
54. **Lu WJ, Wang HT, Yang SJ, Wang ZC et Yong FN. (2005).** Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51, 353–360.

M

55. **Madigan M.T., Matinoko J.M & Parker J. (1997).** *Brok biology of microorganisms*, 8thedn. USA.
56. **Malhotra, R., Noorwez, S. M., & Satyanarayana, T. (2000).** Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 31(5) ,378-384.
57. **Mamo G., Gessesse A., (1999).** Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable a-amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*. (25): 433-438.
58. **Mansour F.A., Aldesuquy H.S. et Hamedo H.A. (1994).** Studies on Plant Growth Regulators and Enzymes Production by Some Bacterie. *Qatar Univ. Sci. J.* 14(2):281-288.39p.
59. **Martin, M.T., Plou, F.J., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2003).** Immobilization on Eupergit C of cyclodextrin glucosyltransferase (CGTase) and properties of the immobilized biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(4-6), 299-308.
60. **Merabti R., (2006).** Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. Diplôme de magistère. Université Mentouri, Constantine.
61. **Meziani A. et Mahcene H. (2017).** Activités hydrolases des souches fongiques : Production par fermentation de cellulase et d' α -amylase par *Penicillium*. sp sur substrat solide. Thèse de Master Biotechnologie des Mycètes. Université de Mentouri Constantine.

62. **Mukhtar S., Ahmad Zaheer., Dalaq Aiysha., Kauser Abdulla Malik., and Samina Mehnaz. (2017).** Actinomycetes: A Source of Industrially Important Enzymes. Journal of Proteomics & Bioinformatics. Vol, 10: 316-319

N

63. **Najjar A. (2010).** Etude quantitative de la sécrétion de lipase, de la lipolyse et du stockage de lipides chez *Yarrowia lipolytica* lors de sa croissance en présence d'huile d'olive. Thèse. Microbiologie et Biotechnologies.

64. **Nielson J.E., Borchert T.V et Vriend G. (2001).** The determinant of α -amylase pH-activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press. 14(7), p: 505-512.

65. **Ningthoujam D.S., Kshetri P., Sanasam S. and Nimaichand S. (2009).** Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. World Applied Sciences Journal 7:907-916.

66. **Novo Nordisk. (1997).** Novo Nordisk Annual Report 1996 : .Enzyme Business.31 page.

O

67. **Odier E., Rouau X. (1985).** Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de l'aligine. Edition : Gauthier-Villards. Paris, pp : 198-237.

68. **Ongena M. and Jacques P. (2008).** Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology; 16 :115–125.

69. **Otajevwo F. D. and Aluyi H.S.A. (2011).** Cultural Conditions Necessary for Optimal Cellulase Yield by Cellulolytic Bacterial Organisms as They Relate to Residual Sugars Released in Broth Medium. Modern Applied Science. 5 (3):141-151.

P

70. **Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V. T., Singh D. et Mohan R. (2000).** Advances In. Microbial amylases. Biotechnology. Appl. Biochem. (31), pp.135-152.

71. **Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp: Production and optimization. *Proc.Biochem.*, 40; 3569–3575.
72. **Patrick F., Jacqueline D. & Philippe T. (2008).** Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. Vol 2.
73. **Paul E.A., & Clark F.E. (1996).** Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.
74. **Peiterson N., Anderson B. (1978).** Fermentation of barley straw by *Trichoderma viride*:Recovery and nutritive value of the fermentation product. *Aiche. Symposium. Series.* Vol 74 No 172. pp:100-104
75. **Pelmont J. (1995).** Enzymes: catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire de Grenoble. pp.7; 621; 652–654.
76. **Petit J. et Jobin P. (2005).** La fertilisation organique des cultures Les bases. Fédération d’agriculture biologique du Québec. Bibliothèque national de Canada, 48p.
77. **Peuk A.D. (2000).** The chemical composition of xylem sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer.*Am. Enol. Viticult.* 51 :329-339.
78. **Pierre F. (2000).** Livre le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. Pp123,
79. **Pinchuk I.V., Bressollier P., Verneuil B., Fenet B., Sorokulova I.B., Graud F. and Urdaci M.C. (2001).** In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45: 3156–3161.

Q

80. **Quénéa K. (2004).** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d’une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

R

- 81. Raimbault M. (1983).** Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Paris, pp:1-42.
- 82. Rajeeva G., Soni T. (2015).** Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *Journal of BMC Biotechnology*. Vol15:19.
- 83. Ramesh C., Rishi G., and Ajay S. (2011).** Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Journal of SAGE-Hindawi*. 10 pages. vol 10.4061.
- 84. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 62; 597–635.
- 85. Receveur V., Czjek M., Schulein M., Panine P., Henrissat B. (2002).** Dimension, shape and conformational flexibility of two domaine fungal cellulases in solution probed by small angle X-ray scattering. *The journal of Biological Chemistry*. Vol 277, No 43. pp: 40887-40892.
- 86. Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., D'elis A., Rosi I. (1999).** Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released from
- 87. Ruark G.H., Zarnoch S. J. (1992).** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.J.* 56 :1945-1950.

S

- 88. Sandhya C., Nampoothiri K.M., Pandey A. (2005a).** Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17; 165–179.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G., Pandey A. (2005b).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* submerged and solid-state fermentation. *Proc.Biochem.*, 40; 2689–2694.
- 89. Schwarz W.H. (2001).** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:634-649.

90. **Scriban R., (1993).** Biotechnologie. 4eme édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. pp. 396-356.
91. **Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. (2001).** Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances.* 19:627-662.
92. **Shonkor K.D et Ajit V. (2011).** Role of Enzymes in Maintaining Soil Health.*soilenzymology.*2, 25-45
93. **Singh A. K., Mukhopadhyay M. (2012).** Over view of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166:486520.
94. **Sinsuwan S., Rodtong S et Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation.*Process Biochemistry,* 43. p. 185-192.
95. **Smith C.K., Coyea M.R., Munson A.D. (2000).** Soil carbon , nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. *Ecol. App.* 10 :75-78.
96. **Stein T. (2005).** *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology;* 56: 845-57.
97. **Subler S.,Kirsh K.S. (1998).** Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. *Bio. Fert. Soils.* 26 :243-249.
98. **Sumantha A., Larroche C., Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol.Biotechnol.,* 244; 211–220.

T

100. **Tangnu S.K., Blanche H.W., Wilke C.R. (1981).** Enhanced production of cellulase,hemicellulase and beta- glucosidase by *Trichoderma reesei*Rut c-30. *Biotechnol. Bioeng.* No 23. pp 1849-1873.
101. **Tanveer Pirzadah., Shashank Garg., Joginder Singh., AshishVyas., Manish Kumar., Naseem Gaur., MadhuBala., Reiaz Rehman., Ajit Varma., Vivek Kumar., and Manoj Kumar., 2014.** Characterization of Actinomycetes and *Trichoderma* spp. for cellulase

production utilizing crude substrates by response surface methodology. Journal of Spirnger.Vol 3:622

102. Tewes A., Glund K., Walther R., Reinbothe H. (1984). High yeild isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*lycopersicon esculentum*).Z.Pflanzenphysiol. No 113. pp :141-150

103. Tolan J-S. (1996). Pulp and paper. In: Godfrey T,West S., editors. Industrial enzymology, 2nd ed. New York: Stockton Press, pp.327-38.

104. Tony Hart., Paul Shears. (1996). Livre d'Atlas de poche de microbiologie 1^{ère} édition. p100 ; 455

V

105. Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. (2002). Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family.Biotechnol; 94, pp.137-55.

106. Van Wyk G.P.H., Mogale A.M., Seseng T.A. (2001). Bioconversion of waste paper to sugars by cellulase from *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*and *Penicillium funiculosum*. The journal of Solid Waste Technology and Management. Vol 27, No 2, pp : 1-5.

107. Vazquez Boland J.A., Dominguez Bernal G., Gonzalez Zorn B., Kreft J., Goebel W. (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.*, 3,571-84.

108. Vidyalakshmi R., Paranthaman R. and Indhumathi. J. (2009). Amylase Production on Submerged Fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*4 (1):89-91.

109. Virginie Riou, Nicolas Chemidlin. (2018). Bulletin Sol et Agronomie des Chambres d'agriculture des Pays de la Loire N°3

W

110. **Wallach, J. (1997).** Les enzymes. Nathan, Paris, pp 4, 6-8.

Y

111. **Yihan L., Fyping L., Guanqun C., Crystal L., Snyder J., Sunyu L., Jianling W., Jing X., (2010).** High-level expression, purification and characterization of a recombinant medium temperature α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Lett.* (32):119–124.

Annexe 01: Préparation des milieux de cultures utilisés

Gélose nutritive

Peptone	15g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	02g
Chlorure de sodium	05g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH = 6,8-7,4

Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de bœuf	300g
Hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon	01.5g
Agar	17g
Eau distillée	1000ml

pH =7,4

Gélose à amidon

Gélose nutritive	100ml
Amidon	01g

PH = 7

Gélose au lait

Lait écrémé stérile	05g
Agar	01g

PH = 7

Gélose à la cellulose

KH₂PO₄	0.5g
MgSO₄	0.25g
Cellulose	2g
Gélatine	2g
Agar	18g
Eau distillée	1000ml

PH = 7

Gélose au tween 80

Peptone	10g
NaCL	5g
CaCl₂	0.1g
Agar	18g
Tween 80	10ml
Eau distillée	1000ml

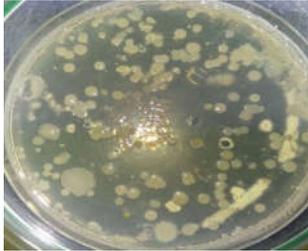
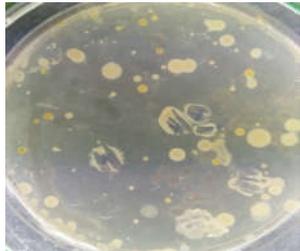
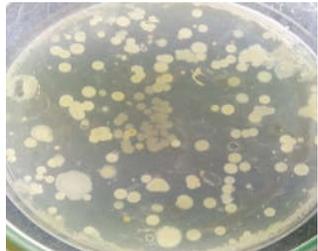
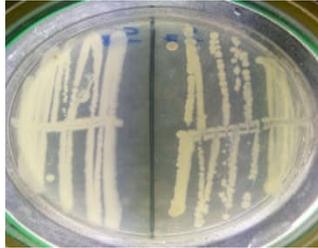
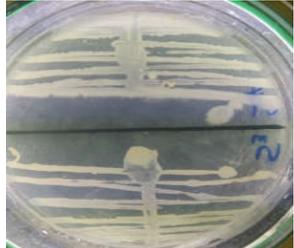
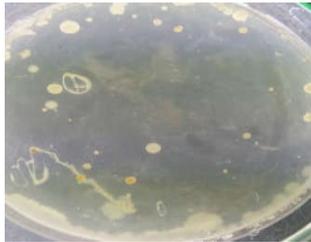
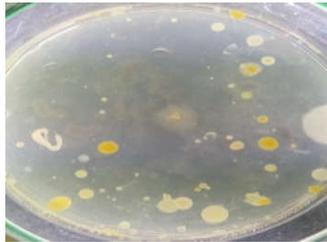
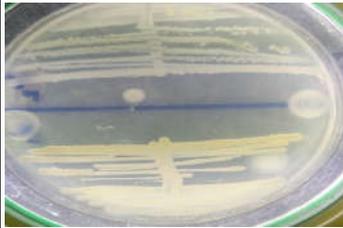
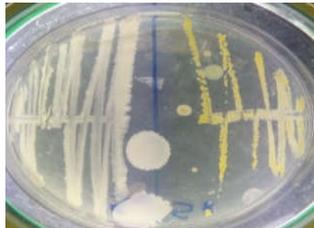
PH = 7

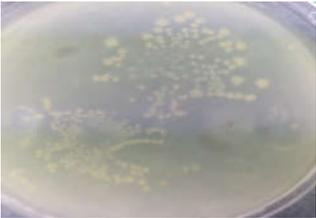
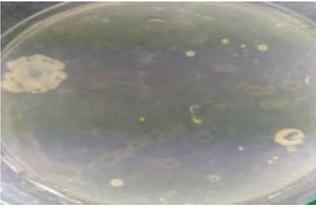
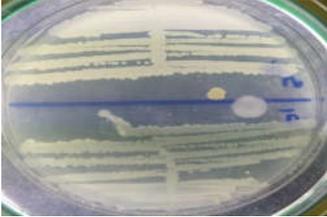
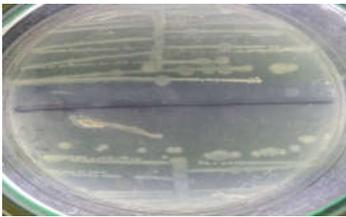
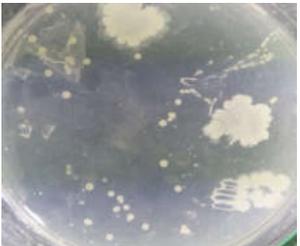
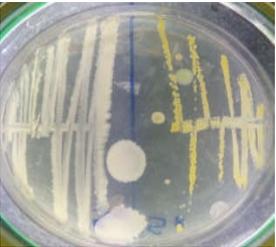
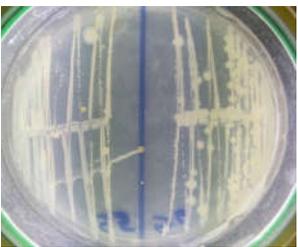
Gélose au sang

Muller Hinton	100 ml
Sang frais tiède	5 ml

Annexe 02

Tableau 01 : Quelques aspects des colonies isolées à partir des échantillons du sol sur GN

Forêt	Ensemencement sur GN			
	Isolement sur GN			
Jardin	Ensemencement sur GN			
	Isolement sur GN			

Vigne	Ensemencement sur GN			
	Isolement sur GN			
Blé	Ensemencement sur GN			
	Isolement sur GN			

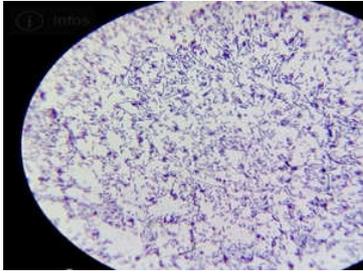
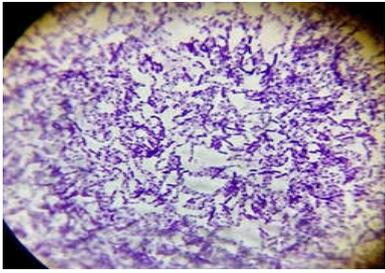
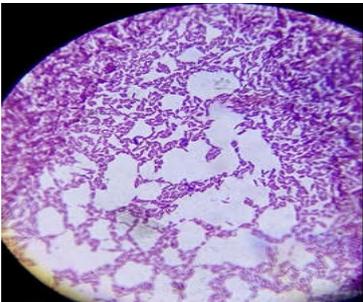
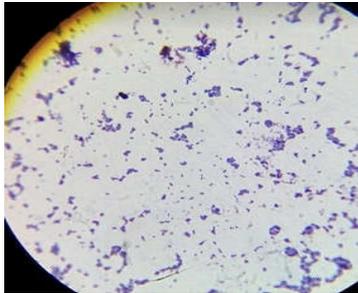
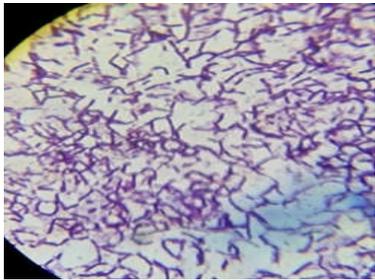
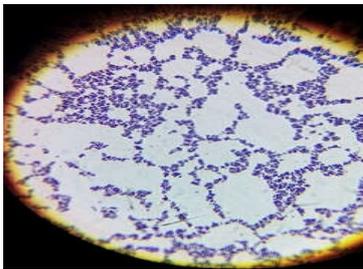
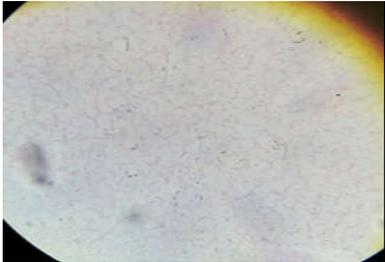
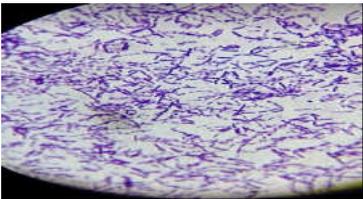
Annexe 03

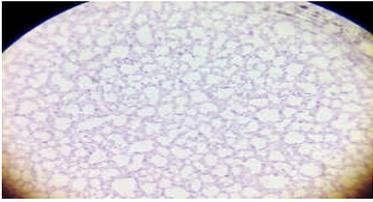
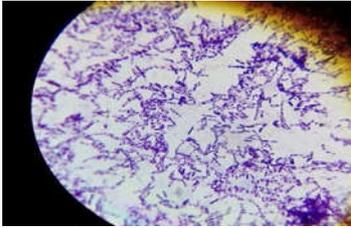
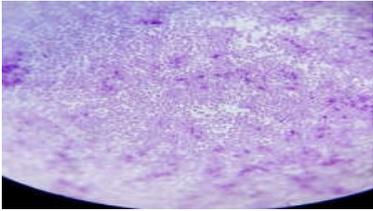
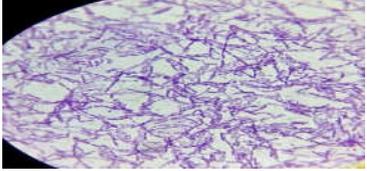
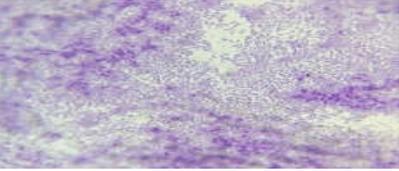
Tableau 02: Résultats des différents tests appliqués sur les souches isolés à partir du sol.

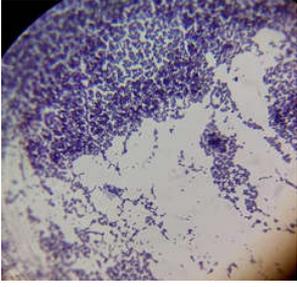
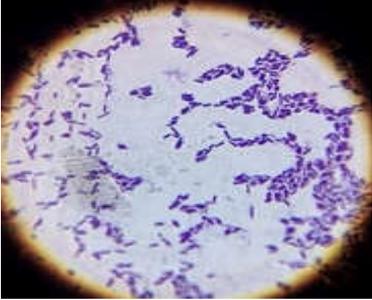
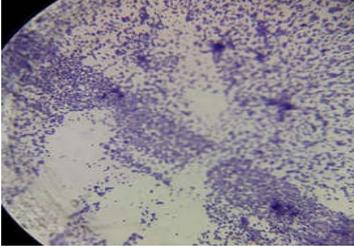
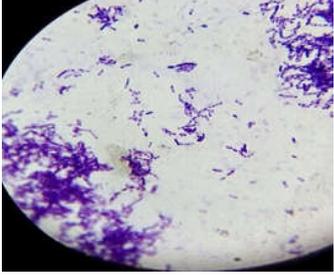
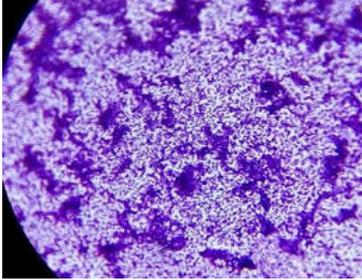
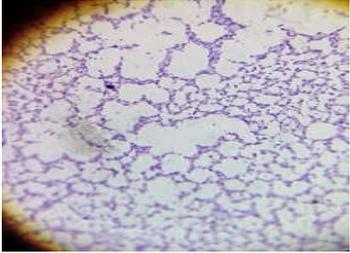
Souche	Activité amylolytique	Activité cellulolytique	Activité protéolytique	Activité lipolytique	Activité hémolytique
F1	-	+	+	+	-
F2	+	+	+	+	-
F3	+	+	+	+	-
F4	+	-	-	+	-
F5	+	+	+	+	+ Vert
F6	+	+	+	+	+ vert
F7	+	+	-	+	-
F8	+	+	+	+	+
F9	+	+	-	-	+
F10	+	+	+	+	-
F11	+	+	+	+	+
F12	+	+	+	+	+
F13	-	+	+	+	+
F14	-	+	+	+	-
B1	-	-	-	+	-
B2	-	-	-	+	-
B3	+	-	-	+	-
B4	+	+	+	+	-
B5	+	+	+	+	-
B6	-	+	+	+	-
B7	-	+	+	-	+
B8	+	+	+	+	+
B9	+	+	+	+	+
B10	+	+	+	+	+
B11	+	+	+	+	+
J1	+	+	+	+	+
J2	+	+	+	+	+
J3	+	+	-	-	-
J4	+	+	+	+	-
J5	+	+	+	+	-
J6	+	+	+	+	-
J7	+	-	-	-	+ vert
V1	+	+	+	+	+ vert
V2	+	+	+	+	+ vert
V3	+	+	+	+	+ vert
V4	+	+	+	+	+ vert
V5	+	+	+	-	-
V6	-	+	+	+	-
V7	-	+	+	+	+ vert
V8	+	+	+	+	+
V9	+	-	+	+	+
V10	+	+	+	+	+

Annexe 04

Tableau 03: Caractères cultureux et morphologiques des isolats du sol

Souches	Coloration de Gram	Souches	Coloration de Gram
F1	cocci G+	B8	Bacille G+
F2	 Bacille G+	B9	 Bacille G+
F3	 Bacille G+	B10	bacille G+
F4	 Cocci G+	B11	 bacille G+
F5	 Cocci G+	J1	 Cocci G-
F6	 Bacille G+	J2	Cocci G-

F7	Bacille G+	J3	Cocci G+
F8	 Bacille G-	J4	 Cocci G+
F9	Cocci G+	J5	Bacille G-
F10	Bacille G+	J6	 Bacille G+
F11	 Bacille G+	J7	Cocci G+
F12	 Bacille G+	V1	 Bacille G+
F13	 Bacille G+	V2	Bacille G+
F14	 Bacille G+	V3	 Bacille G+

<p>B1</p>  <p>Cocci G+</p>		<p>V4</p>	<p>Cocci G+</p>
<p>B2</p>	<p>Bacille G+</p>	<p>V5</p>	 <p>Bacille G+</p>
<p>B3</p>	<p>Bacille G+</p>	<p>V6</p>	<p>Bacille G+</p>
<p>B4</p>  <p>Cocci G+</p>		<p>V7</p>	 <p>Bacille G+</p>
<p>B5</p>	<p>Bacille G+</p>	<p>V8</p>	<p>Cocci G+</p>
<p>B6</p>  <p>Bacille G+</p>		<p>V9</p>	 <p>Cocci G+</p>
<p>B7</p>  <p>Bacille G+</p>		<p>V10</p>	 <p>Bacille G+</p>

Annexe 05: coloration de Gram

1. Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
2. Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.
3. Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
4. Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.
5. Couvrir de lugol pendant 30 secondes.
6. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
7. Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool - acétone en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu'à disparition complète de la coloration violette.
8. Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
9. Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.
10. Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.
11. Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement (objectif à immersion x100).

Les bactéries ayant une réaction négative à la coloration de Gram apparaissent roses (Les Gram-), les bactéries ayant une réaction positive à la coloration de Gram qui n'ont pas été décolorées restent violettes (Les Gram+).

Annexe 06: coloration en bleu de méthylène

1. Réaliser un frottis et le fixer
2. Le recouvrir de bleu de méthylène et laisser agir 3 min
3. Rincer à l'eau distillée
4. Sécher entre 2 feuilles de papier Joseph.
5. Examiner à l'objectif x100 à immersion avec un éclairage important.

Annexe 07:

Tableau 04: Présentation des différentes souches amylolytiques.

Différents sols	Sol de blé			Sol de foret					Sol de vigne			Sol d'un jardin	
	B 3	B4	B5	F2	F 3	F4	F5	F6	V1	V2	V3	J1	J2
Codification	B8	B9	B10	F7	F8	F9	F10	F11	V4	V5	V8	J3	J4
	B11			F12					V9	V10		J5	J6

Tableau 05: Présentation des différentes souches cellulolytiques.

Différents sols	Sol de blé			Sol de foret					Sol de vigne			Sol d'un jardin	
	B4	B5	B6	F1	F2	F3	F5	F6	V1	V2	V3	J1	J2
Codification	B7	B8	B9	F7	F8	F9	F10	F11	V4	V5	V6	J3	J4
	B10	B11		F12	F13	F14			V7	V8	V10	J5	J6

Tableau 06: Présentation des différentes souches protéolytiques.

Différents sols	Sol de blé			Sol de foret				Sol de vigne				Sol d'un jardin	
	B4	B5	B6	F1	F2	F3	F5	V1	V2	V3	V4	J1	J2
Codification	B7	B8	B9	F6	F8	F10	F11	V5	V6	V7	V8	J4	J5
	B10	B11		F12				V9	V10			J6	

Tableau 07: Présentation des différentes souches lipolytiques.

Différents sols	Sol de blé			Sol de foret					Sol de vigne			Sol d'un jardin	
	B1	B2	B3	F1	F2	F3	F4	F5	V1	V2	V3	J1	J2
Codification	B4	B5	B6	F6	F7	F8	F10	F11	V4	V6	V7	J4	J5
	B8	B10	B11	F12	F13	F14			V8	V9	V10	J6	

Tableau 08: Présentation des différentes souches hémolytiques.

Différents sols	Sol de blé			Sol de foret				Sol de vigne				Sol d'un jardin	
	B7	B8	B9	F5	F6	F8	F9	V1	V2	V3	V4	J1	J2
Codification	B10	B11		F11	F12	F13		V7	V8	V9	V10	J7	

الملخص

04 عينات من التربة من مناطق مختلفة من ولاية عين تموشنت تم أخذها في ظروف معقمة، بعد القيام بسلسلة من التخفيف والزرع، تم عزل 42 مستعمرة مختلفة وتنقيتها على أساس الملاحظة العيانية للمستعمرات : تم عزل 14 مستعمرة من تربة غابة، 11 من تربة القمح، 10 من تربة كرمة العنب و 07 من تربة حديقة.

أسفر البحث عن القدرة على إنتاج أنزيمات : السيلولاز، الأميلاز، البروتياز، الليباز و النشاط المحلل للدم، على تحديد 33 عزلة بكتيرية (78.57%) لديها إنزيم الأميلاز، الأكثر ملاحظة هو إنزيم الليباز الذي سجل عند 37 عزلة بكتيرية (88.09%) و إنزيم السلولاز عند 35 عزلة بكتيرية (83.33%). على عكس إنزيم البروتياز الذي سجل عند 34 عزلة بكتيرية (80.95%) و النشاط المحلل للدم عند 23 عزلة بكتيرية (54.76%).

تم التعرف على 4 أنواع من البكتيريا التي لها نشاط إنزيمي (F1, F3, F5, V3) باستخدام (GALERIE API 20E) و تلوين غرام و (état frais) و قد سمحت لنا هذه الاختبارات بتصنيف هذه البكتيريا إلى أجناس : *Bacillus* و *Streptococcus sp* و *Bacillus tequilensis* و *Streptococcus sp* و *Bacillus tequilensis* و *Bacillus licheniformis*

تم إجراء اختبار النشاط المضاد للميكروبات ضد البكتيريا المسببة للأمراض التالية: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *klebsiella* و *Serratia*.

أظهر الجنس *Bacillus tequilensis* و *Bacillus licheniformis* المشفرة ب : F3 و V3 على التوالي ، نشاطاً مضاداً ضد غالبية السلالات الممرضة التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية : التربة ، بكتيريا التربة، النشاط الأنزيمي، التحلل الدهني ، التحلل الدموي ، التحلل البروتيني، *Bacillus* *Bacillus tequilensis* و *Streptococcus sp*، نشاط المضاد للميكروبات.

Abstract

04 soil samples from different regions of Ain Témouchent are taken under sterile conditions. After a series of dilution and seeding, 42 different colonies are isolated and purified on the basis of macroscopic observation: 14 from the forest soil, 11 from a wheat soil, 10 from vineyard and 07 from a garden.

The search for enzymatic activity: cellulolytic, amylolytic, proteolytic, haemolytic and lipolytic allowed to select 33 strains (78.57%) possess amylolytic activity, the most remarkable is the lipolytic activity with 37 strains (88.09%) and the cellulolytic activity with 35 strains (83.33%), proteolytic activity is presented by 34 strains (80.95%) and haemolytic activity by 23 strains (54.76%).

The identification of the four enzyme-producing bacteria (F1, F3, F5, V3) on an API 20E gallery; Gram coloration and fresh observation, allowed to classify these isolates as: *Streptococcus sp*, *Bacillus tequilensis*, *Streptococcus sp* and *Bacillus licheniformis*.

The antimicrobial activity test is carried out against the following pathogenic bacteria: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *klebsiella* and *Serratia*, *Bacillus tequilensis* and *Bacillus licheniformis* encoded respectively F3 and V3 exhibit antibacterial activity against the majority of pathogenic strains tested.

Key words: soil, soil bacteria, enzymatic activity, amylolytic, lipolytic, cellulolytic,

Résumé

04 échantillons du sol de différentes régions de la wilaya d'Ain Témouchent sont prélevés dans des conditions stériles. Après une série de dilution et ensemencement, 42 colonies différentes sont isolées et purifiées sur la base d'une observation macroscopique : 14 à partir d'une forêt, 11 à partir d'un sol de blé, 10 d'une vigne et 07 d'un jardin

La recherche de l'activité enzymatique : cellulolytiques, amylolytiques, protéolytiques, hémolytiques et lipolytiques ont permis de sélectionner 33 souches (78.57%) possèdent une activité amylolytique, la plus remarquable est l'activité lipolytique avec 37 souches (88.09%) et l'activité cellulolytique avec 35 souches (83.33%). Tandis que l'activité protéolytique est présentée par 34 souches (80.95%) et l'activité hémolytique par 23 souches (54.76%)

L'identification des quatre bactéries productrices d'enzymes (F1, F3, F5, V3) sur une galerie API 20E ; coloration de Gram et observation à l'état frais, a permis d'affiler ces isolats aux classes : *Streptococcus sp*, *Bacillus tequilensis*, *Streptococcus sp* et *Bacillus licheniformis*.

Le test d'activité antimicrobienne est effectué contre les bactéries pathogènes suivantes du genre: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *klebsiella* et *Serratia*

Bacillus tequilensis et *Bacillus licheniformis* codées respectivement F3 et V3 présentent une activité antibactérienne contre la majorité des souches pathogènes testées.

Mots clés : sol, bactéries du sol, Activité enzymatique, amylolytique, lipolytique, cellulolytique, protéolytique, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus sp* , activité antimicrobien