

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



Faculté des Sciences

Département de Biologie

**Mémoire**

Pour l'obtention du Diplôme de  
Master en Sciences Biologiques Option : Microbiologie Appliquée

**Présenté par :**

Melle. MAROC Soumia

Melle. MESSAOUDI Wafaa

Melle. MENADI Ryane

---

**Isolement et Identification des Souches Bactériennes  
Productrices des Enzymes à Intérêt Industriel**

---

Soutenu en 2022

Devant le jury composé de :

---

Président : Dr. BENNABI Farid (MCA C.U.B.B.A.T.)

Examineurs : Dr. KHOLKHAL (MAA C.U.B.B.A.T.)

Encadrant : Dr. CHERIF Nadjib (MCB C.U.B.B.A.T.)

---

**Année Universitaire : 2021 - 2022**

## **Remerciement**

Nous remercions tout d'abord Dieu de nous avoir accordé le courage pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons à remercier notre directeur de recherche : Docteur CHERIF Nadjib, qui nous a encadré et nous a beaucoup aidé et qui a été toujours disponible lors des différentes phases de préparation de notre mémoire.

Nos précieux remerciements vont aux membres du jury Mm Kholkhale, et Mr BENNABI, pour l'attention et le temps consacré à la lecture et le jugement de ce mémoire : isolement et identification des souches bactériennes productrice des enzymes à l'intérêt industriel.

Nous aimerions remercier notre pays, L'Algérie, de nous avoir toutes les possibilités d'étudier ; nos familles et toutes les personnes qui nous ont soutenu dans cette expérience.

## Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail :

A celui qui a été toujours Mon support dans cette vie, celui qui me donne le courage éclatant pour continuer à chaque fois que j'ai l'impression de reculer Mon cher Papa BOUMEDIENE que DIEU vous protège.

À ma plus chère du monde, à la femme dont je suis fière d'être sa fille et qui restera mon soutien dans cette vie qui m'a enseigné comment aimer DIEU; à vous maman ZAIA, que DIEU vous protège et vous donne la pleine santé et le plein bonheur du monde, de joie et d'attestations.

A ma chère sœur ILHEM.

A mes frères.

J'adresse aussi mes dédicaces A ma famille grande et petite, Et mes tantes SOUMIA et RAYEN, A meilleure amie NOURIA

A tous ceux que j'aime.

*Wafaa*

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail à l'âme de ma regrettée grand-mère.

A les deux êtres les plus chères de ma vie et la source de ma force, ma mère, mon père et je les remercie pour tout ce qui as fait pour moi, pour leurs sacrifices, leurs conseils leurs amour, leurs attentions et leurs temps.

A mes deux plus belles sœur IKRAM et CHIRAZ, mon plus beau neveu ADEM.

À mon frère ZOHEIR qui a toujours cru en moi et qui m'a toujours encouragé.

À mon homme qui m'a toujours soutenu.

À mes trinôme qui m'ont beaucoup aidé.

*Scumia*

## Dédicace

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien,

À ma grande mère pour leurs prières tout au long de mes études,

À mes chers frères Abdalilah et Mohamed pour leurs encouragements permanents leur soutien moral.

À tout ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,

À mon mari Pour leur appuie et encouragements,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

*Rayen.*

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد العزلات البكتيرية المنتجة للبروتياز ، الأميليز ، السليولاز ، الليباز من التربة يعزل . والدواجن ، وعزلت العزلات البكتيرية والتعرف عليها على مستويات مختبرات الأحياء الدقيقة بجامعة عين تموشنت استند التعرف على هذه amylolytic مع نشاط قوي حال للبروتين (كازينوليتيك) ، محلل للدهون ، سيليلوز ، نشاط العزلات إلى الصفات المورفولوجية (دراسة ميكروسكوبية ومايكروسكوبية) وعلى مختلف الاختبارات البيوكيميائية كانت درجة حرارة الحضانة المثلى ودرجة الأس الهيدروجيني لنمو العزلات 30 درجة مئوية و 7 . المتوفرة في المختبر على التوالي

## **Résumé**

Le but de ce travail était isoler et identifier des isolats bactériens , productrices des protéase , amylase ,cellulase ,lipase à partir des sols et de volailles, les isolats bactériens ont été isolés et identifiés aux niveaux de laboratoires de microbiologie de l'université d'Ain Témouchant .Les isolats ayant une forte activité protéolytique(casiénolytique), lipolytique, cellulosique, amylolytique .L'identification de ces isolats été basé sur les caractères morphologiques (étude microscopique et macroscopique) et sur les différentes tests biochimique disponible au laboratoire .La température d'incubation et le PH optimaux pour la croissance des isolats étaient 30°C et 7 respectivement.

## **Summary :**

The purpose of this work was to isolate and identify bacterial isolates, producers of protease, amylase, cellulase, lipase from soil and poultry, the bacterial isolates were isolated and identified at the levels of microbiology laboratories of the University of Ain Temouchant. Isolates with a strong proteolytic (caseinolytic), lipolytic, cellulosic, amylolytic activity. The identification of these isolates was based on the morphological characters (microscopic and macroscopic study) and on the various biochemical tests available in the laboratory. The temperature Optimal incubation times and pH for growth of the isolates were 30°C and 7 respectively.



## **Table de matière**

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Unités et dimension

Liste des tableaux

Liste des figures

## Liste d'abréviations

**GN:** gélose nutritive

**PBC :** en anglais ( bromocresol purple)

**LB:** Luria-Bertani

**Mga:** minimale glutamine agarre

**Lbm:** luria bertani modifié

**Ph:** potentiel hydrogène ou pondus Hydrogenium

**R1 :** Réactif 1

**R2 :** Réactif 2

**R3 :** Réactif 3

**S1 :** Sol 1

**V1 :** Volaille 1

**B:** bacillus

**G:** gram

**GM:** génétiquement modifié

**MM:** millimètre

**MI:** millilitre

**U:** unité

## Unités et dimension

**°C:** degré Celsius

**Min:** minute

**Sec:** second

**H:** heur

**g:** gramme

**mg:** milligrammes

**L:** litre

**m:** mètre

**M:** mole.L-1

**rpm:** rotation par minute

**x g :** force centabltrifuge relative (équivalent à rcf)

**µm :** micromètre

**UCC /ml :** Unité de changement de couleur par millilitre

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm.....	2
<b>Tableau 02</b> : exemples de quelques enzymes produites par les bactéries.....	7
<b>Tableau 03</b> : Classification des enzymes.....	9
<b>Tableau 04</b> : codes des isolats à partir de sol et intestin de volaille.....	28
<b>Tableau 05</b> : présentation de différent souches productrices des enzymes.....	28
<b>Tableau 06</b> : détermination des souches bactérienne productrices des enzymes.....	31

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : les différentes formes de bactéries.....	3
<b>Figure 02</b> : les bactéries thermophiles à partir d'une vision microscopique.....	5
<b>Figure 03</b> : application et intérêt d'amylase.....	11
<b>Figure 04</b> : application et l'intérêt de cellulase.....	12
<b>Figure 05</b> : application et intérêt de protéase.....	13
<b>Figure 06</b> : application et intérêt de lipase.....	14
<b>Figure 07</b> : Localisation de la wilaya d'Ain-Temouchent.....	16
<b>Figure 08</b> : présentation de site de prélèvement et localisation de site par satellite.....	16
<b>Figure 09</b> : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol.....	17
<b>Figure 10</b> : présentation de site de prélèvement et localisation de site par satellite (Google Map, 2022).	
<b>Figure 11</b> : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol et localisation de prélèvement.....	18
<b>Figure 12</b> : localisation de la ferme Si Sekrane Houari Chaabat El Leham.....	18
<b>Figure 13</b> : préparation des dilutions décimales à partir du sol.....	19
<b>Figure 14</b> : présentation des étapes d'isolement des souches.....	20
<b>Figure 15</b> : Description des étapes de la mise en évidence le l'activité amylolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.....	22
<b>Figure 16</b> : Description des étapes de la mise en évidence le l'activité cellulolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.....	23
<b>Figure 17</b> : Description des étapes de la mise en évidence le l'activité protéolytique.....	24
<b>Figure 18</b> : Description des étapes de la mise en évidence le l'activité lipolytique.....	25
<b>Figure 19</b> : des boites pétries ensemencé par l'échantillon pris par la boîte (a) après un traitement thermique.....	26
<b>Figure 20</b> : Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués.....	27
<b>Figure 21</b> : le criblage des souches amylolytiques.....	29
<b>Figure 22</b> : le criblage des souches cellulolytiques.....	29
<b>Figure 23</b> : criblage des souches protéolytique.....	30
<b>Figure 24</b> : criblage des souches lipolityques.....	31
<b>Figure 25</b> : coloration de gram et observation microscopique de bactéries Bacillus.....	32
<b>Figure 26</b> : coloration de gram et observation microscopique de bactéries Bacillus.....	33

# **Sommaires**

## Sommaires

Introduction :.....	1
---------------------	---

### Chapitre I : Etude Bibliographique

I.Le sol :.....	2
I.1. Définition :.....	2
I.2. Les bactéries:.....	2
I.2.1. La définition :.....	2
I.2.2. La classification des bactéries :.....	3
I.2.2.1. Selon le mode respiratoire :.....	3
I.2.2.2. Selon la forme :.....	3
I.2.2.3. Selon la structure de la paroi :.....	4
I.2.2.4. Selon leur optimum de croissance :.....	4
I.2.3. Les bactéries thermophiles :.....	5
I.2.3.1. Définition :.....	5
I.2.3.2. Les caractéristiques des bactéries thermophiles :.....	6
I.2.3.3. Les principales bactéries thermophiles :.....	6
I.2.3.4. Application des thermophiles :.....	6
I.2.4. Production des enzymes par les bactéries :.....	7
II. Les enzymes :.....	8
II.1. Définition :.....	8
II.2. la classification des enzymes :.....	8
II.3. L'origine des enzymes industriels :.....	9
II.4. Application des enzymes :.....	10
II.4.1. Amylase :.....	10
II.4.2. Cellulase :.....	11
II.4.3. Protéase :.....	12
II.4.4. Lipase :.....	12

### Chapitre II : Matériel et Méthodes

I.1. Présentation du site de prélèvement :.....	16
I.2. Isolement et purification :.....	19
I.2.1. Préparation des dilutions et isolement :.....	19

I.2.2. Ensemencement et purification :	19
I.2.3. Traitement thermique (l'effet de température) :	20
I.1. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir enzymatique:	20
I.1.1. Aspect macroscopique des colonies :	21
I.1.2. Aspect microscopique des colonies :	21
II. Criblage des souches productrices d'enzymes :	21
II.1. Criblage primaire :	21
II.1.1. Détermination de l'activité amylolytique:	21
II.1.2. Détermination de l'activité cellulolytique:	22
II.2. Criblage secondaire :	22
II.2.1. Détermination de l'activité protéolytique:	23
II.2.2. Détermination de l'activité lipolytique:	24

### **Chapitre III : Résultats et Discussion.**

#### Partie I : Résultats

I. Echantillonnage :	26
I.2. Isolement des souches :	27
I.3. Sélection des souches productrices d'enzymes :	28
I.3.1. L'activité amylolytique :	29
I.3.2 L'activité cellulolytique :	29
I.3.3. L'activité protéolytique :	30
I.3.4. Activités lipolytique :	30
I.4. Identification des bactéries criblées qui ont un pouvoir enzymatique important :	31
I.4.1. Aspect macroscopique :	32
I.4.2. Études microscopique et biochimique :	33
Partie II : La discussion.....	34
Conclusion.....	38
Annex.....	39
Références :	44

# Introduction



Le sol est considéré, par excellence, le support de toute la biosphère continentale. Il permet aux microorganismes d'effectuer toutes les formes métaboliques et physiologiques vitales afin de préserver, à la fin, une chaîne alimentaire équilibrée qui va du microorganisme au prédateur.

Entre les différentes communautés du sol, certaines interactions essentielles sont à noter, notamment les relations symbiotiques produites par les bactéries et les racines des plantes. La décomposition de la matière organique morte et le recyclage des éléments minéraux comme le phosphore et l'azote sont deux fonctions supplémentaires que le microbiote thermophile peut remplir.

Cet intérêt tourné vers l'agronomie est ce qui a poussé la communauté scientifique (en l'occurrence les microbiologistes) à isoler et caractériser le microbiote du sol afin de mieux exploiter ses capacités.

Les enzymes produits par les microorganismes sont des catalyseurs 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**).

Bien que les sources d'enzymes utilisées dans l'industrie varient, les enzymes microbiologiques sont souvent préférées aux enzymes dérivées de plantes ou d'animaux en raison du large éventail d'activités catalytiques potentielles, des rendements de production élevés dus à la facilité de manipulation génétique, de l'approvisionnement régulier en raison de l'absence de fluctuations saisonnières et de la croissance microbienne rapide sur des substrats pauvres en nutriments.

Cet essai est divisé en trois chapitres qui permettent une compréhension claire des objectifs des expériences et une présentation claire des résultats. Une brève introduction est fournie au début. Le deuxième chapitre est consacré à des explications sur le fonctionnement des enzymes et démontre la valeur des enzymes en décrivant plusieurs utilisations et applications industrielles. Dans le troisième chapitre, un isolement des bactéries du sol de différentes zones de la Wilaya d'Ain Temouchant est discuté. Ces bactéries ont été choisies en fonction de leur capacité à produire plusieurs enzymes, notamment la lipase, la cellulase, l'amylase et la cellulase, ainsi que leurs capacités d'isolation phénotypique et biochimique.

# **Etudes Bibliographiques**

## I. Le sol :

### I.1. Définition :

Le sol composant l'élément essentiel des biotopes, ces derniers sont dénommés la pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. 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 Bartha, 1992). les altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol.

Le sol a de plusieurs fonction, c'est un milieu biologique dans lequel et sur lequel se développent les organismes vivants. Cette croissance est déterminée par la qualité du sol ou de l'engrais (teneur en carbone, teneur en azote, capacité d'échange d'ions, etc.). C'est aussi un facteur déterminant du cycle de l'eau ( stockage et régulation) et de la qualité de cette eau ( source de pollution, capacité de rétention des polluant et biodégradation). Cependant, le sol joue un rôle important dans tous les cycles biogéochimiques.

### I.2. Les bactéries:

#### I.2.1. La définition :

La microflore du sol est principalement dominée par les bactéries qui sont métaboliquement actifs, les champignons, les algues et les protozoaires. Les bactéries et les champignons sont les organismes dominants (Tableau 1) (Hoorman et Islam, 2010).

**Tableau 01 :** Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 15cm. (Hoorman et Islam, 2010).

Microorganismes	Nombre (g/sol)	Biomasse (g/m <sup>2</sup> )
Bactéries	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	40-500
Champignons	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	100-1500
Algue	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	1-50
Protozoaires	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Variée

Les bactéries sont des micro-organismes vivants procaryotes unicellulaires qui mesurent 0.5 à 15 µm de long. Elles ont été découvertes à la fin du 17ème siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais, qui inventa la microscopie. Elles sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes ; sol, eau, air, sur les végétaux et les animaux. (Perry et al., 2004)

### I.2.2. La classification des bactéries :

Selon Gaillard (1998), les bactéries sont classées selon un certain nombre de critères.

#### I.2.2.1. Selon le mode respiratoire :

- **Aérobic stricte** : ce sont les bactéries qui ne se développent qu'en présence d'air et la respiration est leur principale source d'énergie.
- **Micro-aérophiles** : elles se prospèrent dans un environnement où la pression partielle d'oxygène est inférieure à la pression atmosphérique.
- **Aéro-anaérobic facultatifs** : Elles se développent avec ou sans air.
- **Anaérobic stricte**: Elles se développent en absence de l'air (Bernard ; 2004).

#### I.2.2.2. Selon la forme :

Il existe trois formes de base permettant de classifier les bactéries :

- **Bâtonnet.**
- **Sphérique (cocci).**
- **Courbée (spiralée).**

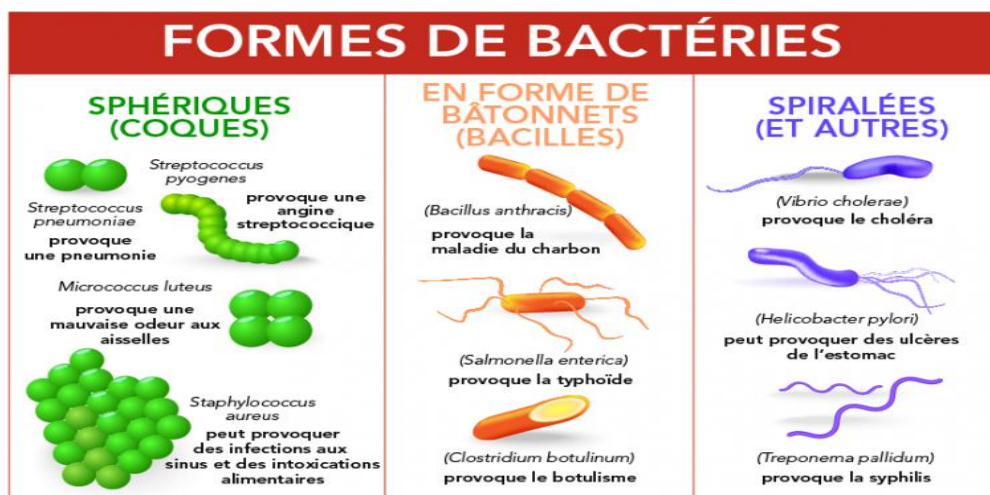


Figure 01 : les différentes formes de bactéries.

### I.2.2.3. Selon la structure de la paroi :

- **Gram+** : possède une paroi épaisse, d'une structure simple et relativement sensible aux antibiotiques. Elle donne une coloration violette.
- **Gram -** : possède une paroi moins rigide et d'une structure plus complexe, toujours pourvues de pilis. Elle donne une coloration rose de paroi (Perry et al., 2004).

### I.2.2.4. Selon leur optimum de croissance :

- **L'effet de la température** : Les bactéries peuvent être classées en quatre groupes, selon leurs température optimales de croissance :  
**les psychrophiles** (-5 à 20°C), **les mésophiles** (15 à 45°C), **les thermophiles** (45 à 80°C) et les hyperthermophiles ( $\geq 80^\circ\text{C}$ ) (Vieille et Zeikus, 2001). Certains subdivisent même les thermophiles en deux avec les thermophiles modérés (45 à 65°C) et les thermophiles à proprement dit (65 à 85°C) (Demirjian et al., 2001). Et aussi il y'a des bactéries **psychrophiles** (température proches de 0°C optimum à 10-15°C), des bactéries **psychotropes** (températures de croissance proches de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles).
- **Effet de PH** : le pH (concentration en ion hydrogène  $[\text{H}^+]$ ) de l'environnement varie entre 0.5 (sols acides) et 10.5 (eaux alcalines des lacs). On distingue :  
Les bactéries **neutrophiles** se développent pour des pH sont compris entre 5.5 et 8.5 avec un optimum voisin de 7. Les bactéries **acidophiles** préfèrent les pH alcalins. Les bactéries **acidophiles** se multiplient mieux dans des milieux acides.
- **Effet de la pression osmotique** : les bactéries sont relativement tolérantes aux changements de concentration ionique. Certaines espèces sont osmotolérantes.
- **Effet de l'eau libre (l'activité de l'eau  $A_w$ )** : La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. **L'activité de l'eau ( $A_w$ )** est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

### Présence de sels :

- **Les bactéries halophiles** nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles jusque 15-30% pour les bactéries halophiles extrêmes (Halobacterium). Dans ce cas, la bactérie accumule des quantités importantes de potassium pour rester hypertonique par rapport à son environnement.
- **Les bactéries halotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sels mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : Staphylococcus aureus).

### Présence de sucres :

- **Les bactéries osmophiles** nécessitent des sucres pour leur croissance.
- **Les bactéries osmotolérantes** acceptent des concentrations modérées de sucres mais non obligatoires pour leur croissance.
- **Les bactéries xérophiles** peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

### I.2.3. Les bactéries thermophiles :



**Figure 02** : les bactéries thermophiles à partir d'une vision microscopique.

#### I.2.3.1. Définition :

Il s'agit de micro - organismes capables de survivre et de prospérer à des températures extrêmes. (Fandi et al ., 2012). Leur température de croissance idéale se situe entre 50 et 80 degrés Celsius. (Holden, 2009).

### **I.2.3.2. Les caractéristiques des bactéries thermophiles :**

La température est une caractéristique cruciale dans chaque écosystème. Par conséquent, l'un des aspects les plus importants de la microbiologie est la catégorisation des organismes vivants en fonction de leur température de croissance idéale. **(Wiegel et Canganella, 2001).**

Les thermophiles sont des organismes qui se développent à des températures comprises entre 50 et 80 degrés Celsius, tandis que les hyperthermophiles se développent à des températures supérieures à 80 degrés Celsius. La limite inférieure de thermophile se trouve dans un petit nombre d'environnements naturels et est considérée comme la température à laquelle les eucaryotes sont extrêmement rares. La frontière hyperthermophile est arbitraire, mais elle sépare les organismes qui se développent à des températures élevées. La présence de gyrase reverse, une enzyme responsable de la stabilisation de l'ADN à haute température, est une autre caractéristique des hyperthermophiles. **(Holden, 2009).**

### **I.2.3.3. Les principales bactéries thermophiles :**

Bacillus (Bacillus stearothermophilus, Geobacillus stearothermophilus, Bacillus coagulans), Thermus, Thermomicrobium, symbiobacterium, Clostridium (Clostridium thermocellum) **(Patrick, 2007).**

### **I.2.3.4. Application des thermophiles :**

Les procédés biotechnologiques et industriels nécessitent une thermostabilité des enzymes utilisés. Un grand nombre d'enzymes de bactéries thermophiles ont été caractérisés, comme les cellulases, les amylases, les pullulanases, les xylanases, mannanase, pectinases, chitinases, protéases, lipases, les estérases et les phytases **(Sunna et Bergquist, 2003).** L'utilisation des enzymes thermostables comprend la possibilité de réduire le risque de contamination **(Raddadi et al., 2015).** Ces enzymes possèdent la propriété physique et les interactions électrostatiques pour garder l'activité à de grandes températures. Ils possèdent différentes adaptations, telles que la capacité de garder leur configuration et leur fonction dans les extrêmes de température en présence des solvants organiques (jusqu'à 99%), résistance aux agents protéolytiques et aux valeurs extrêmes de pH **(Egorova et Antranikian, 2005 ; Mayer et al., 2012).**

### I.2.4. Production des enzymes par les bactéries :

Le tableau résume quelques enzymes industrielles produites par les bactéries.

**Tableau 02** : exemples de quelques enzymes produites par les bactéries.

Enzymes	Espèces	Références
<b>Protéase</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Ferrero <i>et al.</i> , 1996).
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(George <i>et al.</i> , 1995)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(Soares <i>et al.</i> , 2005).
	<i>Bacillus</i> sp	(Patel <i>et al.</i> , 2005)
	<i>Virgibacillus</i> sp. SK33	(Sinsuwan <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Synergistes</i> sp	(Kumar <i>et al.</i> , 2008a)
<b>Amylase</b> ( $\alpha$ -amylase)	<i>Bacillus licheniformis</i>	(Tamura, 1993)
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Lanuginosusthermomyces</i>	(Liese <i>et al.</i> , 2000).
	<i>Lactobacillus casei</i>	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(Liese <i>et al.</i> , 2000 ; uiger et çurakoglu, 2001).
	<i>Bacillus steorothermophilus</i>	(Dauter <i>et al.</i> , 1999)
	<i>Bacillscirculans</i>	(Dey <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Bacillscoagulans</i>	(Babu et Satyanaray, 1993).
	<i>Alteromonashaloplanktis</i>	(Feller <i>et al.</i> , 1992).
<i>Termusfiliformis</i>	(Egas <i>et al.</i> , 1998).	
<i>Streptomycesrimosus</i>	(Vukelić <i>et al.</i> , 1992).	
<b>Cellulase</b>	<b>Aérobies :</b> <i>Sporocytophaga</i> , <i>Myxococcoides</i> , <i>Baccillussubtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> et <i>Pseudomonas</i> . <b>Anaérobiesstrictes :</b> <i>Clastriduim</i> <i>Thermocellum</i> , <i>C. Stercorarium</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>R.flavefasciens</i> et <i>Bactéroï des succinogenes</i> <b>Anaérobiesfacultatives :</b> <i>Erwiniachrysantharum</i> .	(Béguin et Aubert, 1992).



<b>Pectinase</b>	<i>Bacillus</i> sp <i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<b>(Djouldé Darman <i>et al.</i>, 2005)</b>
------------------	--	---

## II. 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 **cellulaire (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)**. Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 106 fois, par rapport à la réaction en leur absence **(Granner, 2008)**. 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)**.

### II.2. la classification des enzymes :

la nomenclature et la classification des enzymes ont été normalisées par la Commission sur les Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie, créée en 1955, afin de remédier à la confusion qui régnait alors dans ce domaine et risquait de s'aggraver avec les progrès rapides des connaissances sur les enzymes **(Arnaud et al., 1993)**. Une classification des enzymes en six groupes a donc été établie selon leur action spécifique (Tableau 2). Ces principaux groupes sont ensuite redivisés en plus petits ensembles encore plus spécifiques quant aux réactions biochimiques catalysées.

**Tableau 03 : Classification des enzymes (Vincent, 1996).**

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction.
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels.
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse (coupe les liens chimiques par addition d'une molécule d'eau).
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles liaisons.
E.C.5	Isomérases	Isomérisation.
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP.

Comme toutes les autres protéines, les enzymes sont dénaturées par la chaleur, elles précipitent en présence d'éthanol ou de fortes concentrations de sels comme le sulfate d'ammonium et elles ne diffusent pas à travers des membranes sélectives ou semi-perméables

### II.3. L'origine des enzymes industriels :

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes (**Amaud et al., 1993 ; Scriban, 1993 ; Rao et al., 1998 ; Meunier, 1999**).

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale (**Barnabé et al., 2003**). L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Les principaux avantages des enzymes d'origine microbienne sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;

- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production (**Amaud et al., 1993 ; Scriban, 1993**).

Thermophiles et hyperthermophiles (bactéries, champignons) sont généralement stables à la chaleur, c'est-à-dire qu'ils résistent à la désactivation irréversible à haute température. On les appelle thermoenzymes ou Enzymes thermiques (**Li et al., 2005**). Les enzymes produites par les bactéries mésophiles sont appelées enzymes intermédiaires. Ceux-ci ne conviennent généralement pas pour Certains procédés industriels nécessitent des conditions de réaction parfois sévères et Notamment (température, pH, présence de solvants). Les enzymes thermiques ont Avantages biotechnologiques par rapport aux enzymes intermédiaires. ils valent mieux que Effets des enzymes intermédiaires sur la dénaturation thermique et chimique (**Zrikus et al., 1998**). ils sont plus Facile à purifier par traitement thermique (**Li et al., 2005**). à cause de leur chaleur Stabilité, les réactions catalysées par les enzymes thermiques sont peu probables Contaminé par des micro-organismes et a généralement une vitesse de réaction plus élevée que la même réaction catalysée par une enzyme intermédiaire. et les faits de l'opération De plus, la température élevée entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel Augmenter la solubilité du substrat (**Bruins et al., 2001**).

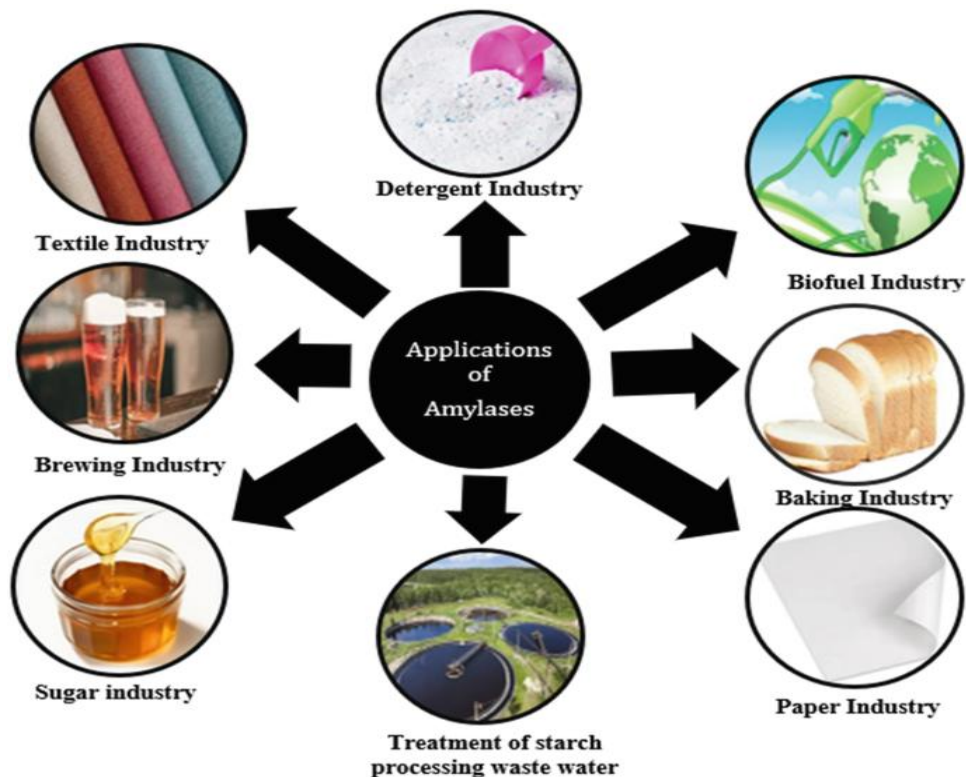
Parmi les enzymes actives à haute température d'intérêt industriel figurent les protéases, les lipases et autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases, sans oublier les taq polymérases (**Van den burg, 2003**). En effet, une des bactéries thermophiles L'enzyme la plus célèbre qui a trouvé une application industrielle est Thermus Bactéries aquatiques, bactéries hétérotrophes thermophiles aérobies, isolées dans une source chaude en 1969 **Thomas Brock**, un microbiologiste américain du parc national de Yellowstone.

## II.4. Application des enzymes :

### II.4.1. Amylase :

L'histoire de la production industrielle d'enzymes remonte à l'époque où le Dr Jhokichi Takamine a commencé la production d'une préparation d'enzymes digestives par

culture de koji de son de blé d'*Aspergillus oryzae* en 1894. Production industrielle de poudre de dextrose et de cristaux de dextrose de amidon utilisant l' $\alpha$ -amylase et la glucoamylase a commencé en 1959. Depuis puis , les amylases sont utilisé pour divers fins . Conversion de l'amidon dans sucre , sirops et dextrines forme la majeure partie de l' amidon En traitement l'industrie (**Marshall, 1975**). Les hydrolysats sont utilisés comme sources de carbone dans la fermentation ainsi que comme sources de douceur dans une gamme de produits manufacturés . aliments produits et boissons . Hydrolyse de l'amidon en produits contenant du glucose, du maltose, etc. est provoquée par le contrôle dégradation (**Norman, 1978 ; Barfoed , 1976 ; Hurst, 1975 ; Slott et Madser , 1975**). Certaines des applications de l'amylase sont : Autres applications Amylases, en particulier les amylases alcalines sont utilisées dans les détergents . à certains mesure les amylases sont également utilisé comme auxiliaire digestif ( **Bezell , 1942**) pour compléter le diastasique l'activité de la farine et d' améliorer digestibilité de certains aliments pour animaux ingrédients .

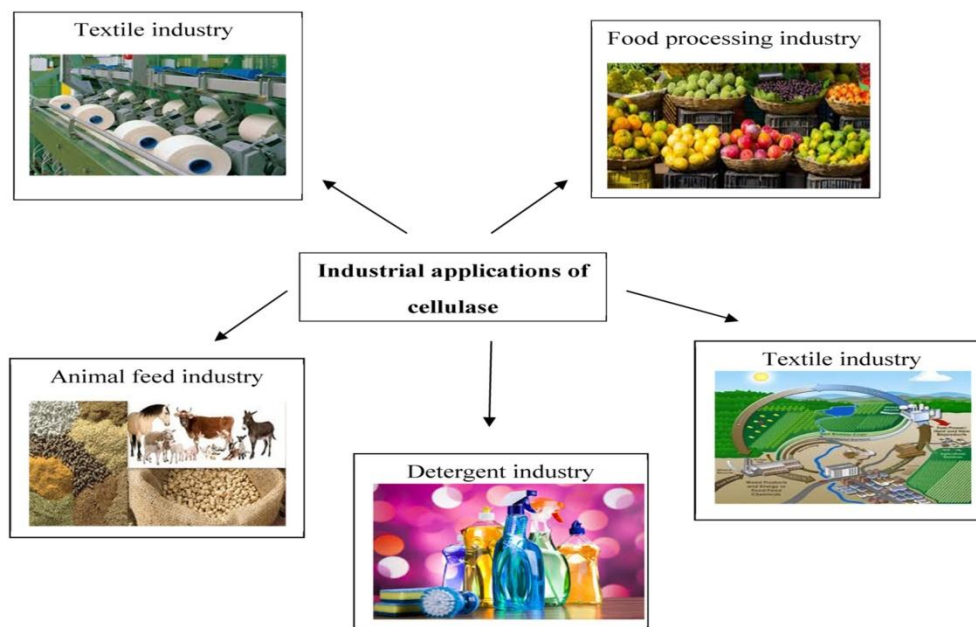


**Figure 03 :** application et intérêt d'amylase.

## II.4.2. Cellulase :

La cellulase est une enzyme clé pour diverses applications industrielles.

L'enzyme cellulase est un consortium de trois enzymes exo-glucanase, endo-glucanase et  $\beta$ -glucosidase, qui peuvent être produites naturellement par divers micro-organismes et sont écologiquement importantes car elles recyclent la cellulose dans la biosphère. La cellulase est un candidat potentiel dans de nombreuses industries telles que le textile, les détergents, les pâtes et papiers, les composés bioactifs, l'alimentation, l'alimentation animale, les biocarburants, etc. En raison de ses immenses applications dans différents domaines, la cellulase fait l'objet de recherches intensives tant par les universitaires que par les industries. La force motrice de la recherche sur la cellulase est son potentiel commercial et ses énormes applications dans diverses industries. De sa production et de son application industrielle. Il est également tenu compte des processus de production récents tels que la fermentation immergée et à l'état solide y compris différents types de réacteurs utilisés pour la production de cellulase. Les stratégies de réduction des coûts et de production d'hyper cellulase comme la culture mixte et la manipulation génétique sont également discutées avec les acteurs mondiaux des producteurs/fournisseurs de cellulase.



**Figure 04 :** application et l'intérêt de cellulase.

### II.4.3. Protéase :

Les enzymes protéases représentent près de 60 % du marché industriel dans le monde. Ils ont des applications dans un certain nombre de processus biotechnologiques, dans la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques et de nombreuses industries, notamment le cuir, la soie, la boulangerie, le soja, la viande et les brasseries. Le large éventail d'applications de protéases peut vous faire apprécier l'impact que les micro-organismes contribuent à notre vie quotidienne !

Lié: Inhibiteurs de la protéase combattant le VIH  
 Inhibiteurs de la protéase : tuer la réplication virale  
 Atteindre un rendement élevé en ADN à partir de spermatozoïdes à l'aide de la protéinase K  
 Résoudre des mystères avec la trypsine et la protéinase K : Partie 1  
 Résoudre des mystères avec la trypsine et la protéinase K : partie 2  
 Top 4 des articles scientifiques sur l'activité des protéases. **novembre 2018.**



Figure 05 : application et intérêt de protéase.

### II.4.4. Lipase :

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) font partie de la famille des hydrolases qui agissent sur les liaisons esters carboxyliques. Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides, monoglycérides, acides gras et glycérol. Ces enzymes sont largement présentes dans les règnes animal et végétal, ainsi que dans les

moisissures et les bactéries. De toutes les enzymes connues, les lipases ont attiré l'attention la plus scientifique. En plus de leur fonction naturelle d'hydrolyse des liaisons esters carboxyliques, les lipases peuvent catalyser des réactions d'estérification, d'interestérification et de transestérification dans des milieux non aqueux. Cette polyvalence fait des lipases les enzymes de choix pour des applications potentielles dans les industries alimentaires, détergentes, pharmaceutiques, du cuir, du textile, des cosmétiques et du papier. Les applications industrielles les plus importantes des lipases ont été principalement trouvées dans les secteurs alimentaire, détergent et pharmaceutique. Les limites de l'utilisation industrielle de ces enzymes sont principalement dues à leurs coûts de production élevés, qui peuvent être surmontés par des technologies moléculaires, permettant la production de ces enzymes à des niveaux élevés et sous une forme pratiquement purifiée (Alain Houde et al. *Appl Biochem Biotechnol* . juillet-septembre 2004).



**Figure 06** : application et intérêt de lipase.

# **Matériel et Méthodes**



Ce présent travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie et de Biochimie, département des Sciences biologiques à l'université de Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent, sous la direction de l'encadreur Dr.CHERIF Nadjib.

### I.1. Présentation du site de prélèvement :



**Figure 07:** Localisation de la wilaya d'Ain-Témouchent (Google Maps, 2022).

Les échantillons utilisés au cours de notre étude a été prélevés le 18 février 2022 à partir du sol de cinq sites différent son degré de richesse au microorganisme est très élevé.

L'échantillonnage est accomplir par une spatule stérile à partir d'un sol de ferme, d'une bosquet, d'un jardin.

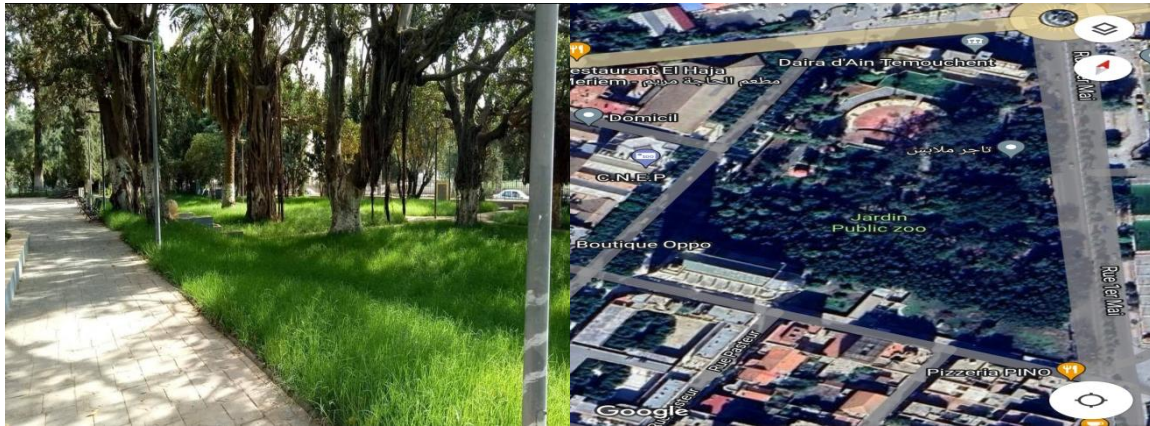
Des prélèvements a été accomplir à partir cinq types de sol, le premier est un sol de bosquet située à Sidi Said, Wilaya d'Ain Témouchent





**Figure 08** : présentation de site de prélèvement et localisation de site par satellite (Google Map, 2022).

Le deuxième site de prélèvement est situé au niveau d'un jardin public zoo de la wilaya d'Ain Témouchent.



**Figure 09** : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol.

Le 3eme échantillon est prélevé d'après du jardin de complexe de Hammam Bouhdjar, wilaya d'Ain Témouchent.



**Figure 10** : présentation de site de prélèvement et localisation de site par satellite (Google Map, 2022).

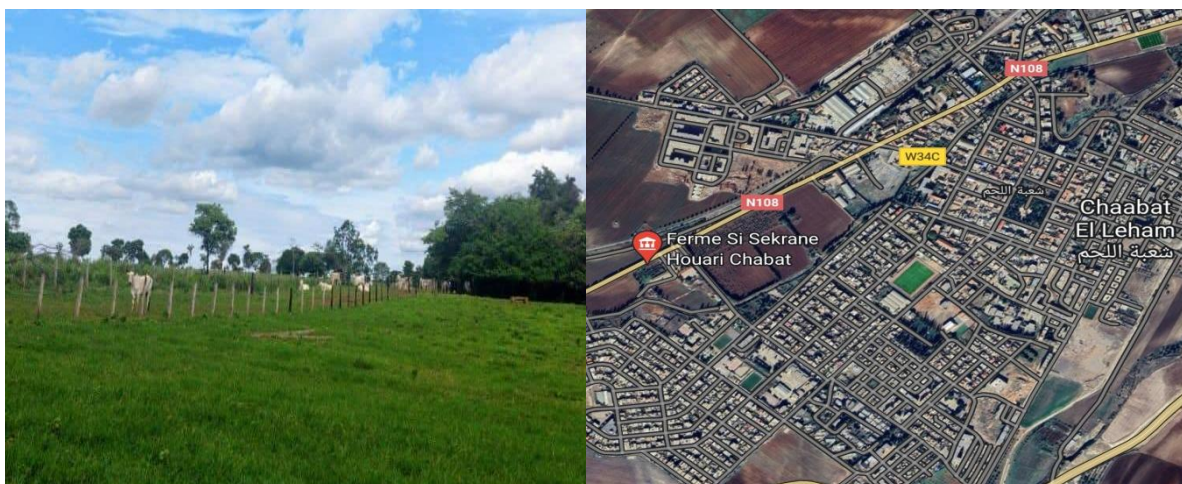


Le 4eme prélèvement a été accomplir du jardin de centre universitaire Belhadj Bouchaib, Wilaya d'Ain Témouchent.



**Figure 11** : Présentation de l'origine des prélèvements effectués à partir du sol et localisation de prélèvement (Google Map, 2022).

Et le dernier échantillon est effectuer d'après de la ferme Si Sekrane Houari situé à la périphérie de la commune de Chabaat El Leham , wilaya d'Ain Témouchent.



**Figure 12**: localisation de la ferme Si Sekrane Houari Chaabat El Leham (Google map,2022).

## I.2. Isolement et purification :

### I.2.1. Préparation des dilutions et isolement :

Dans un flacon stérile de 200 ml, une pesée de 9g du sol a été diluer avec 90ml de l'eau physiologie stérile, à l'aide d'un agitateur magnétique a été homogénéiser la pendant 10minutes, après de laisser la solution précipitée, un surnageant de volume 1 ml a été prendre et le ajouter à 9ml de l'eau physiologie stérile afin d'obtenir une solution décimale de  $10^{-1}$ . une série de dilution ( $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ ) a été préparées comme suite.

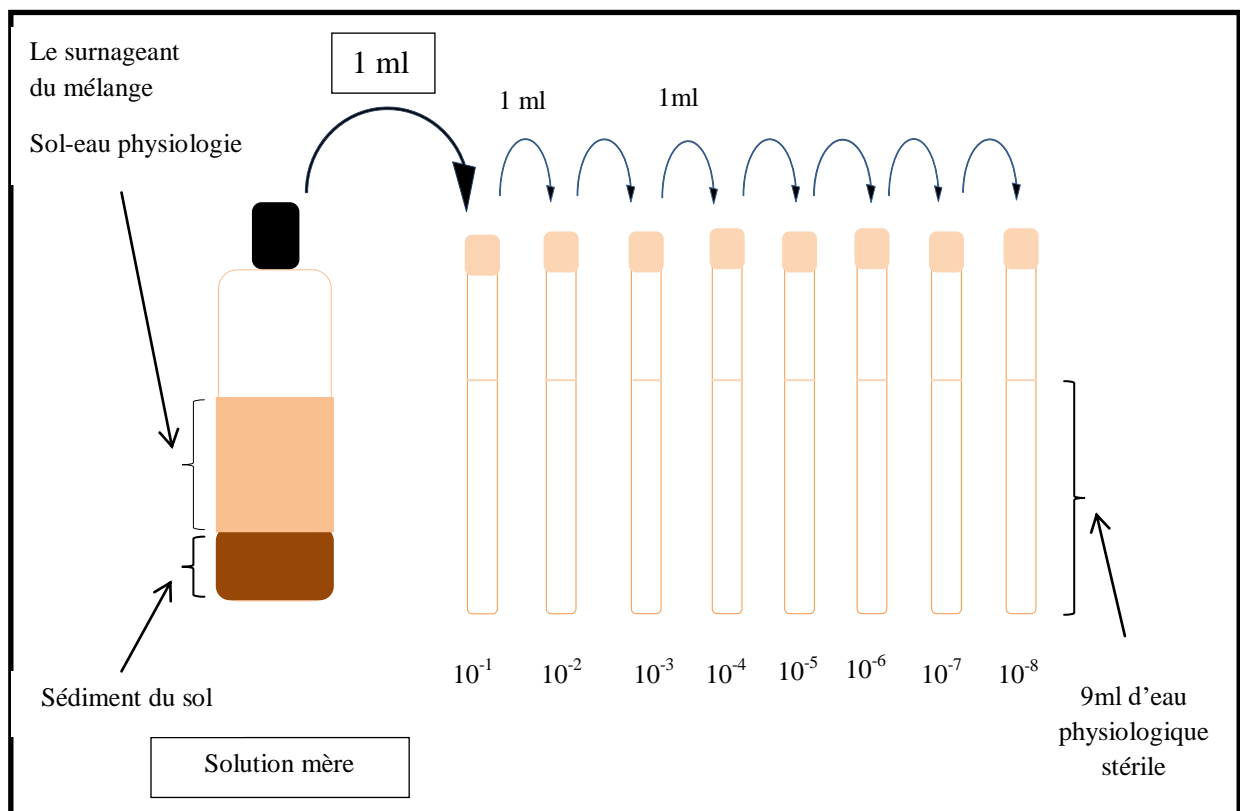


Figure 13 : préparation des dilutions décimales à partir du sol.

### I.2.2. Ensemencement et purification :

Sur une chaque boite pétri contient de gélose nutritive, un volume de 01 ml de chaque solution a été mettre à l'aide de la micropipette et a été étaler avec un râteau stérile en verre pour réaliser l'ensemencement, cette opération a été passer sur une zone stérile( entre deux bec bensen). Ensuite, l'étape de l'incubation des boites à une température  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 24heures-48heures. Les observations macroscopiques des colonies obtenues a été effectuées afin de déterminer leurs formes, couleur et d'autres caractéristiques. Puis, le repiquage

purifier les colonies successivement sur la gélose nutritive, incubées pendant 24heures sur une température de 30°C.

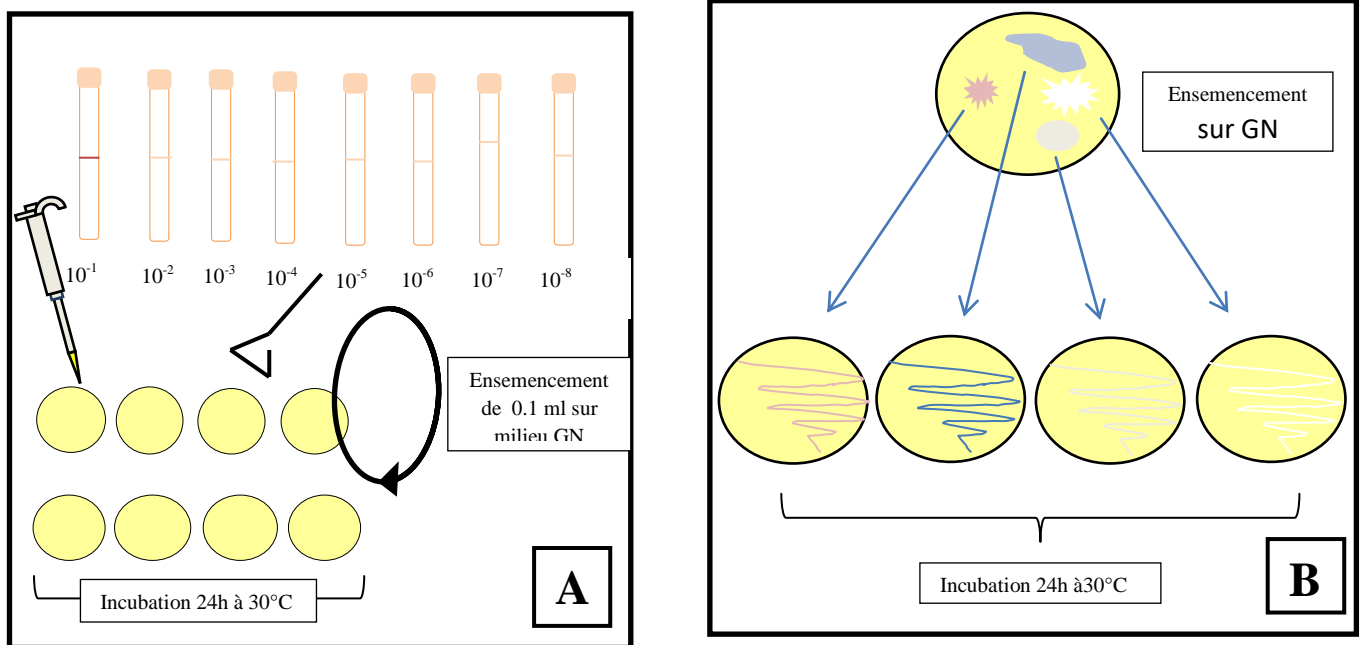


Figure 14 : présentation des étapes d'isolement des souches.

### I.2.3. Traitement thermique (l'effet de température) :

Dans le but de déterminer les souches résistance à la température après l'ensemencement des sols sur les boîtes pétri, le reste des tubes d'essai a été mettre à bain marie sur température de 80°C pendant un intervalle de temps de 10 min.

Après le traitement thermique les échantillons a été ensemençer sur la gélose nutritive coulé sur les boîtes pétris stériles, ainsi que les boîtes a été incubé sur 30°C pendant 24h à 48h.

### I.3. Identification préliminaire des souches qui présentent le pouvoir enzymatique:

La souche isolée à capacité enzymatique a été sélectionnée comme bactérie productrice d'enzymes. L'identification initiale des souches est basée sur l'observation

macroscopique, l'observation microscopique et quelques études de propriétés enzymatiques et biochimiques.

### **II.3.1. Aspect macroscopique des colonies :**

Afin d'identifier une souche microbienne, la première étape du diagnostic microbien et du biotypage d'une souche est la description macroscopique des colonies bien isolées sélectionnées productrices d'enzymes; parfois cette seule étude permet de connaître le germe qu'on a en présence car les colonies sont typiques. Les principaux caractères à étudier sont : la forme, la taille, la couleur, la surface, l'odeur et d'autres caractéristiques.

### **II.3.2. Aspect microscopique des colonies :**

La purification de producteurs d'Enzymes isolés sélectionnés est accomplie par une série de repiquages. La coloration Gram et la microscopie permettent la différenciation de deux grands groupes bactériens : les bactéries Gram positives et Gram négatives, ainsi que la détermination de la forme, de la taille et du mode de regroupement.

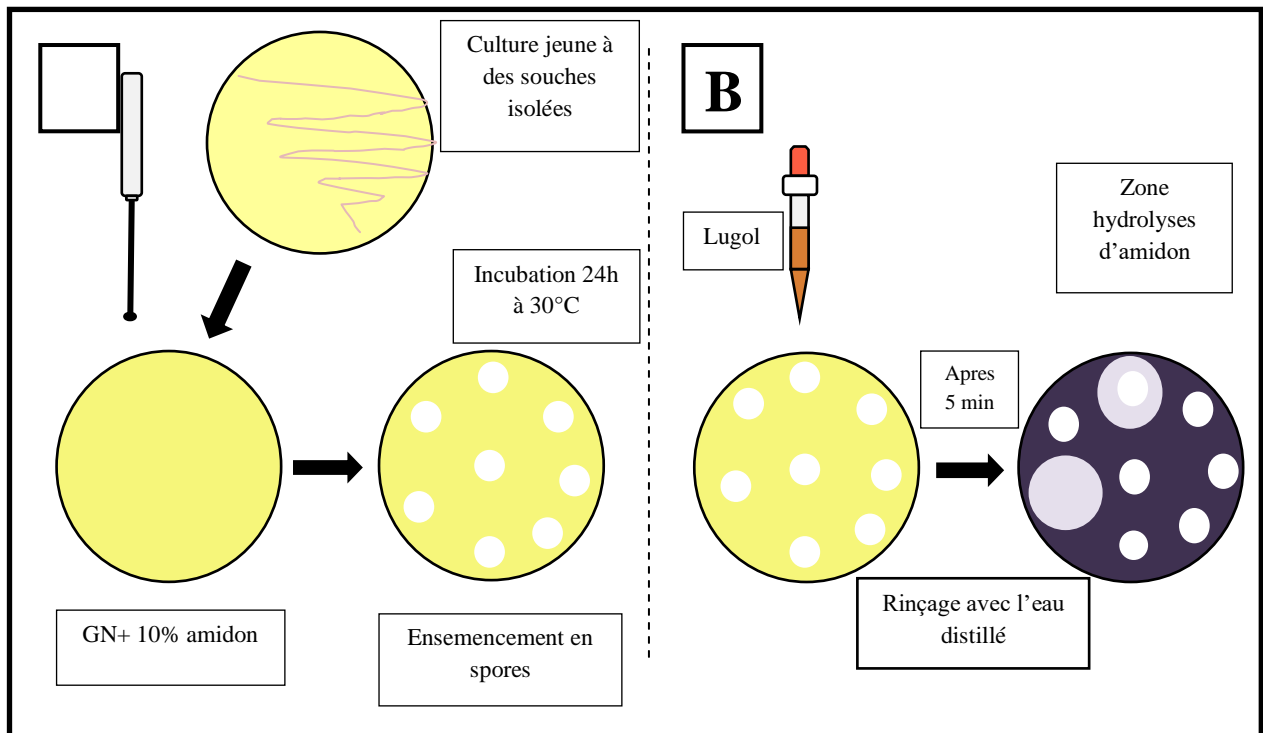
La coloration de Gram se fait selon la méthode traditionnelle (annexe).

## **II. Criblage des souches productrices d'enzymes :**

### **II.1. Criblage primaire :**

#### **II.1.1. Détermination de l'activité amylolytique:**

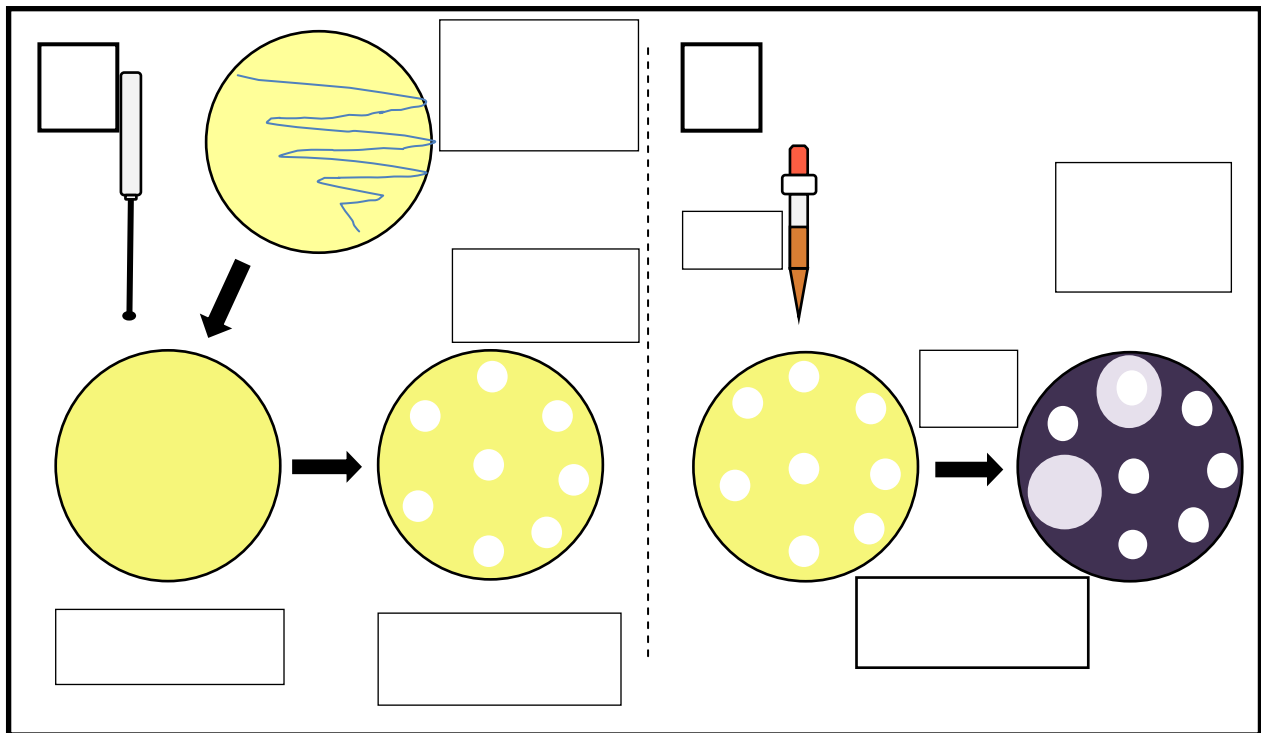
Pour déterminer l'activité amylolytique, un ensemencement en taches de souches isolées à la surface d'une gélose à l'amidon préparée (100 ml de gélose nutritive plus 1 g d'amidon) a été réalisé. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 heures avant d'être récupérées à l'aide d'une solution de Lugol. L'apparition d'une zone claire autour de la colonie indique une réaction favorable à l'hydrolyse de l'ammoniaque.



**Figure 15 :** Description des étapes de la mise en évidence de l'activité amylolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.

### II.1.2. Détermination de l'activité cellulolytique:

Un ensemencement en taches de souches isolées à la surface de cellulose préparée qui contient en g/l : MgSO<sub>4</sub> – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5) (0,25) cellulose - (2) - gélatine (2) - gélose (18) Elle a été réalisée afin de détecter une activité cellulolytique. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 24 heures avant d'être examinées avec une solution de Lugol pour détecter les zones claires.



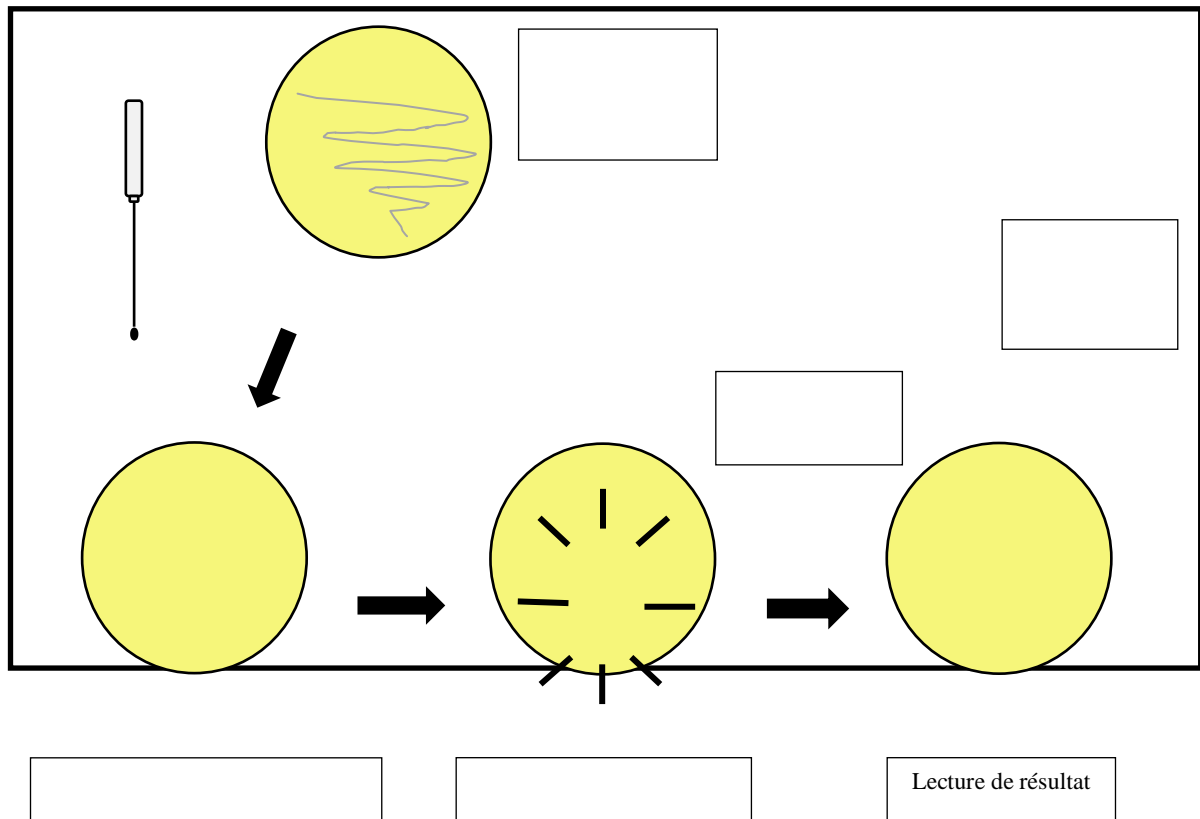
**Figure 16:** Description des étapes de la mise en évidence de l'activité cellulolytique, (A) ensemencement des souches isolées, (B) lecture de résultat.

## II.2. Criblage secondaire :

### II.2.1. Détermination de l'activité protéolytique:

Pour déterminer l'activité protéolytique, un ensemencement en stries de souches isolées à la surface de la gélose préparée avec du lait (100 ml de gélose nutritive plus 5 ml de lait stérile) a été réalisé. Une réaction positive de l'hydrolyse de la protéine se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie. Pendant 24 heures, les cultures sont maintenues à une température de 30°C. Une bonne réaction à l'hydrolyse des protéines est mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie.

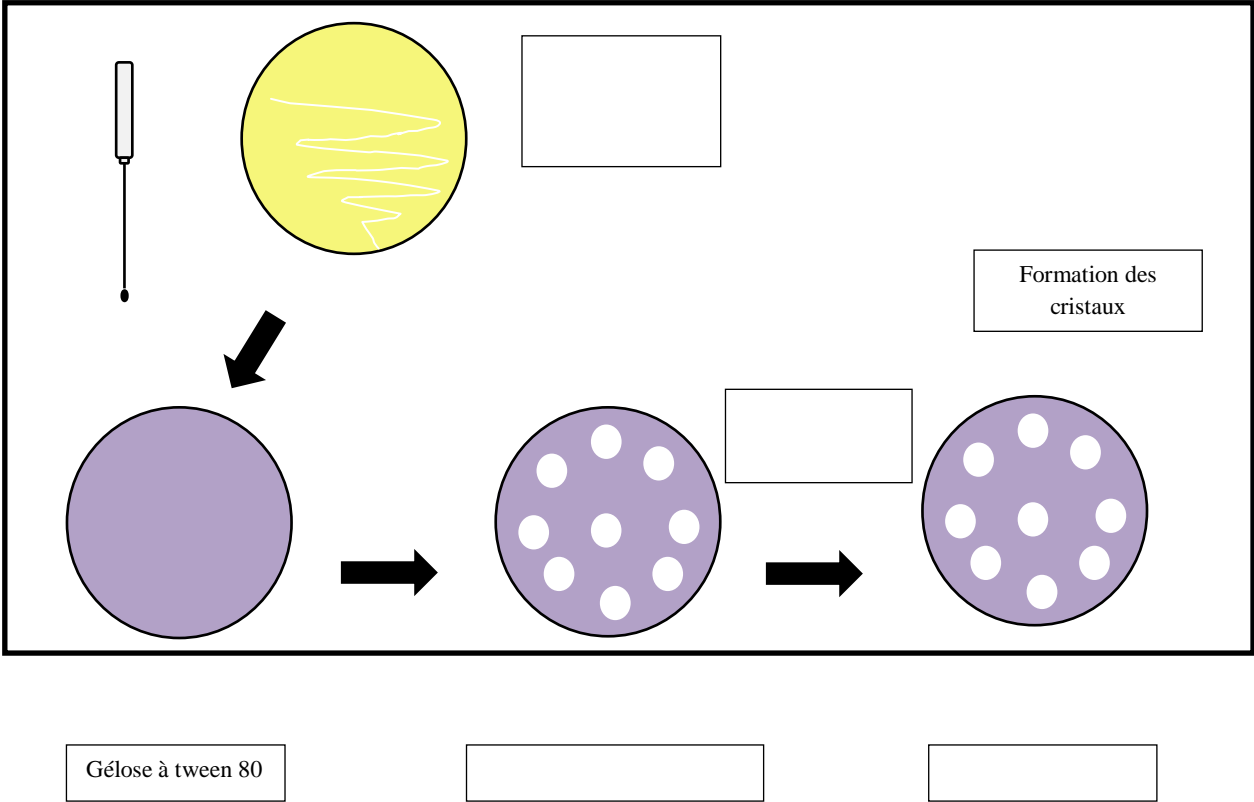




**Figure 17:** Description des étapes de la mise en évidence de l'activité protéolytique.

### II.2.2. Détermination de l'activité lipolytique:

Ensemencer un point de l'isolat à la surface d'une gélose préparée contenant en g/l : peptone (10) – NaCl (5) – CaCl<sub>2</sub> (0,1) – agar (18) – tween80 (10) pour la détection des lipides. Incuber la culture à 30°C pendant 3 à 5 jours. Une réaction positive pour l'hydrolyse des lipides est l'apparition d'une zone claire entourée de sédiments autour de la colonie.



**Figure 18:** Description des étapes de la mise en évidence le l'activité lipolytique.

# **Résultats et Discussion**

## Partie I : Résultats

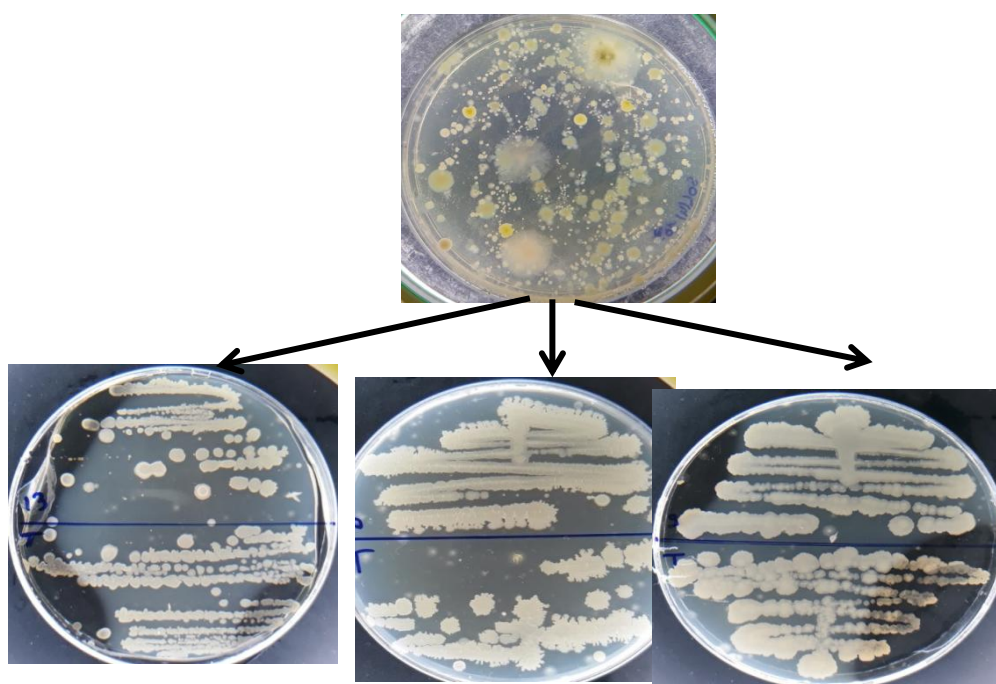
### I.1. L'échantillonnage :

Les expériences réalisées dans cette étude ont été choisies en fonction du degré de contamination microbienne. Pour cela, des échantillons sont prélevés sur un sol de ferme, d'une bosquet, d'un jardin.

La couleur des échantillons est l'un des indicateurs de la charge microbienne. Les sols noirs ou de couleur foncée sont densément peuplés de micro-organismes (Figure 1). Les résultats des tests sont ensuite envoyés au laboratoire de microbiologie de l'Université d'Ain-Temouchent, où des études microbiologiques sont réalisées.

Une pesée de 1 gramme de sols pré-pesés a été préparée, ainsi que des dilutions décimales ( $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ) par rapport à la solution mère. L'isolement de 42 souches différentes (Figure 2) a été rendu possible en étalant un volume de 0,1 ml de chaque dilution sur une surface de gélose nutritive et en incubant à 30°C pendant 24-48 heures.

Après l'incubation des souches traitées thermiques, les Bacillus a été trouvé seulement dans les boîtes.

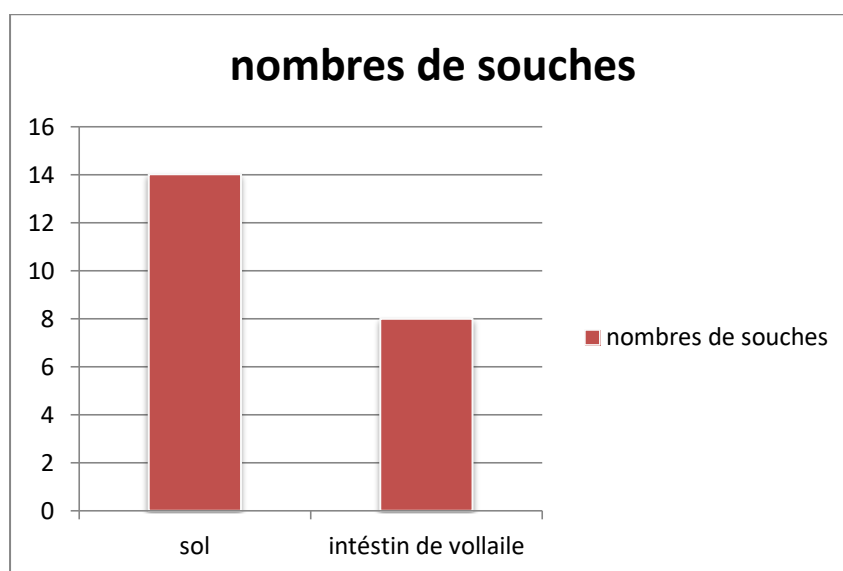


**Figure 19** : des boîtes pétries ensemencé par l'échantillon pris par la boîte (a) après un traitement thermique.

Une incision de l'extrémité après grattage la partie intérieure a été effectuée pour obtenir le contenu intestinal des volailles puis les mettre dans deux flacons stériles contenant 90ml d'eau physiologique pour avoir une solution mère, puis 1ml de cette dernière est prélevé à l'aide d'une micropipette puis transféré dans 9 ml d'eau physiologique pour avoir une dilution de  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  pour chaque flacon.

Les géloses LB et GN sont coulées en surfusion dans des boîtes de pétri devant le bec bunsen puis laisser à se gélifier pour les ensemercer.

Selon l'histogramme, une microflore a été trouvée dans chacun des quatre endroits où les mesures ont été prises. La charge microbienne totale trouvée dans chacun des quatre sites a été comparée, révélant que le sol de la forêt contient une quantité importante de microflores par rapport au sol de blé et de vignes. Cependant, le sol du jardin a révélé une faible diversité microbiologique.



**Figure 20** : Répartition des souches isolées à partir des prélèvements effectués.

### I.2. Isolement des souches :

Un total de 22 isolats ont été isolés et purifiés sur milieu gélose (GN pour sol LB Pour volaille (Tableau4 ).

Tableau 4 : codes des isolats à partir de sol et intestin de volaille.

Milieu	Code des isolats	
GN/LB	Sol	Intestin de volaille
	S(1) – S(2) – S(3) – S(4) – S(5) – S(6) – S(7) – S(8) – S(9) – S(10) – S(11) – S(12) – S(13) – S(14).	V(1) – V(2) – V(3) – V(4) – V(5) – V(6) – V(7) – V(8).

S : Sol ; V : intestin de volaille

### I.3. Sélection des souches productrices d'enzymes :

La présence de capacités amylolytiques, cellulolytiques, protéolytiques, lipolytiques et hémolytiques permet de sélectionner les champignons producteurs d'enzymes.


Tableau (5) : présentation de différent souches productrices des enzymes.

	Amylase			Cellulose			Protéase			lipase	
	Les souches distinctes	S(1)	S(2)	S(3)	S(1)	S(2)	S(4)	S(1)	S(2)	S(3)	
S(4)		S(7)	S(9)	S(10)	S(12)	S(13)	S(4)	S(7)	S(9)		
S(10)		S(12)	S(13)	S(14)			S(10)	S(12)	S(14)		

 Forte production d'amidon       Très forte production d'amidon

 Forte production de cellulase.       Très forte production de cellulase.

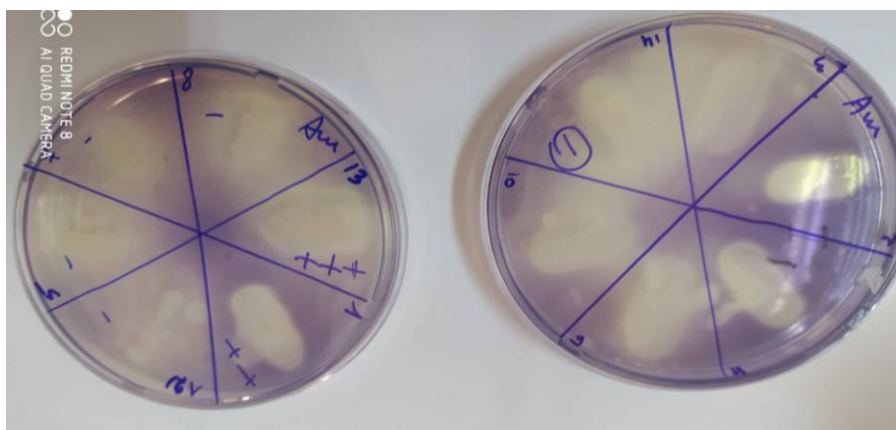
 Forte production de protéase.       Très forte production de protéase.

 Faible production d'enzymes.

### I.3.1. L'activité amylolytique :

Le criblage est réalisé par ensemencement en surface de gélose nutritive additionnée d'une concentration de 10% d'amidon, aboutissant à l'isolement de 3 souches distinctes, chacune caractérisée par la formation d'une zone claire autour des colonies obtenues par cinq prélèvements distincts.

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



**Figure 21** : le criblage des souches amylolytiques

### I.3.2 L'activité cellulolytique :

Le criblage a été réalisé par ensemencement à la surface de la gélose préparée pour la détection de l'activité cellulolytique, ce qui a permis d'isoler de 7 souches uniques caractérisée par la création d'une zone claire autour des colonies obtenue par cinq prélèvements distincts.

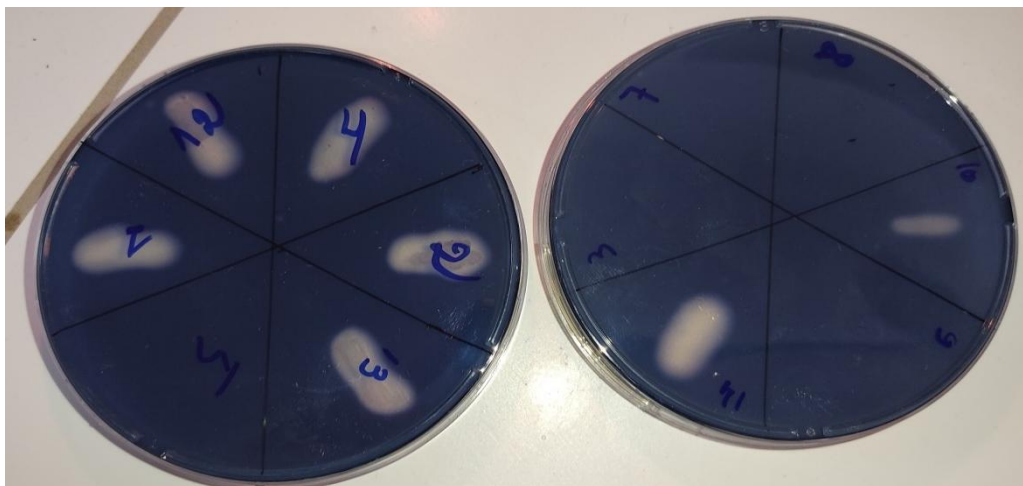


Figure 22: le criblage des souches cellulolytiques

### I.3.3. L'activité protéolytique :

Le criblage est réalisé en imposant une concentration de 10 % de lait à la surface de la gélose nutritive, permettant l'isolement de 9 souches différentes.

Caractérisé par la création d'une zone d'hydrolyse autour des colonies obtenues par cinq prélèvements distincts.

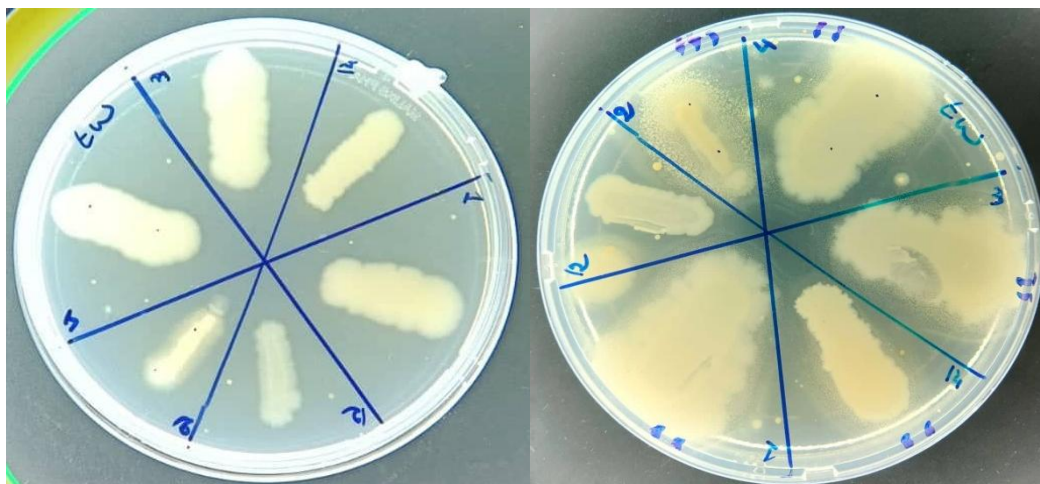


Figure 23: criblage des souches protéolytique.

### I.3.4. Activités lipolytique :



Le criblage est réalisé par ensemencement à la surface de la gélose de tween 80 préparée pour la détection de l'activité lipolytique, permettant l'isolement de 7 souches distinctes, chacune se distinguant par la formation d'une zone d'éclaircissement assurée par un dépôt autour de colonies à la suite de prélèvements effectués grâce à l'utilisation de cristaux de calcium.



**Figure 24 :** criblage des souches lipolytiques.

### I.4. Identification des bactéries criblées qui ont un pouvoir enzymatique important :


Parmi les 22 isolats testés, 09 isolats sont sélectionnées comme des souches qui ont un pouvoir enzymatique important.


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


**Tableau 6 :** les souches bactérienne productrices des enzymes.


	amylase	cellulase	Protéase	Lipase
S1				
S2	+			
S3	+	-		-
S4	+			
S9	+	-		

S10				
S12	+			
S13			-	-
S14	-			-
V1	-	-	-	
V4	-	-	-	
V5	-	-		-

 Forte production d'amylase.

 Forte production de cellulase.

 Forte production de protéase.

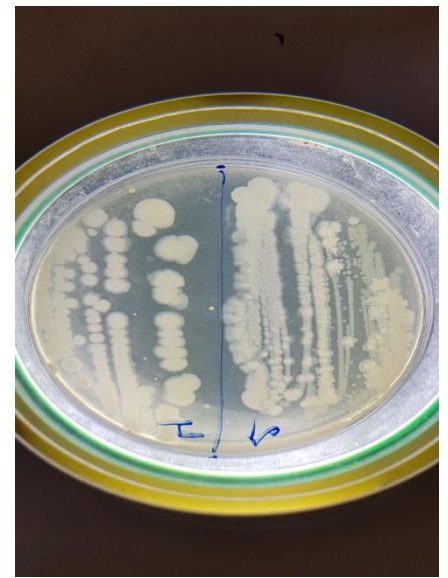
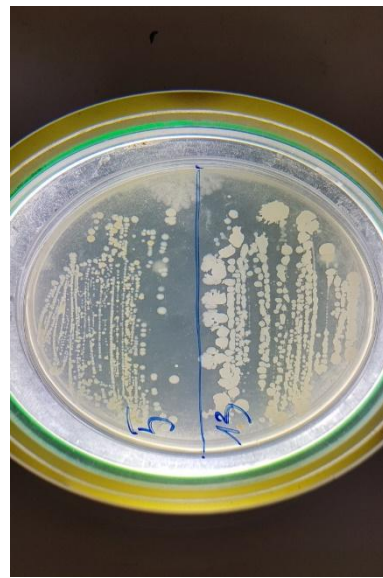
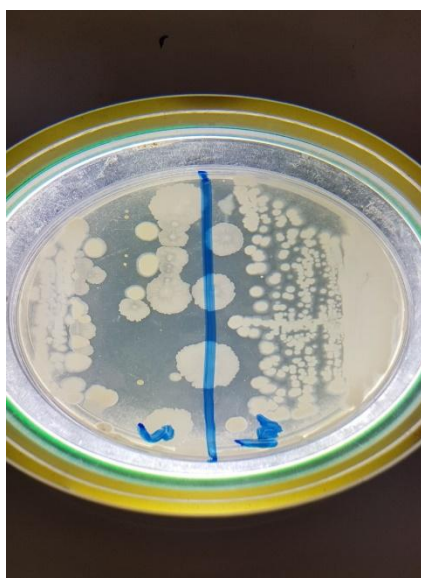
 Forte production de lipase.

(+) : production d'enzymes.

(-) : pas de production d'enzymes.

### I.4.1. Aspect macroscopique :

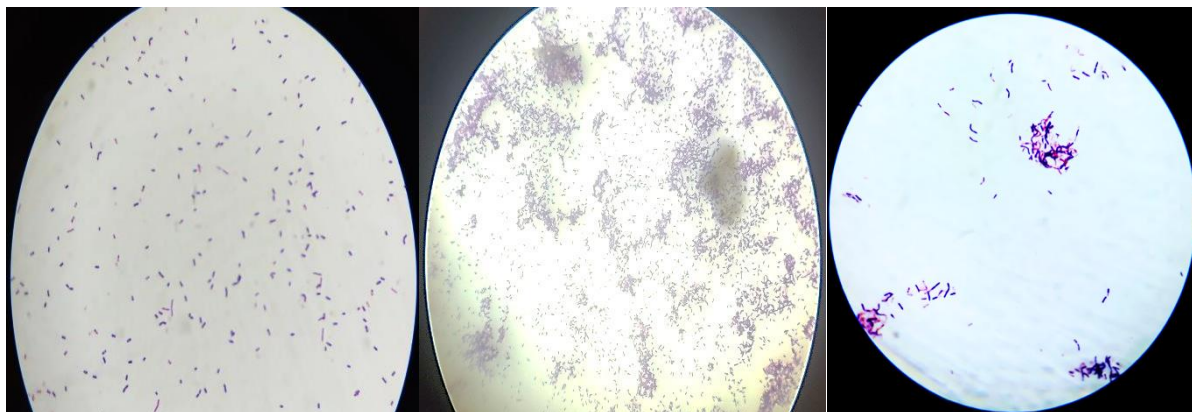
Une première caractérisation phénotypique a été rendue possible par l'observation macroscopique et l'aspect de colonie isolée. De plus, en démarrant des souches isolées spécifiquement choisies pour produire des enzymes à la surface du gel nutritif et en les incubant à 30 ° C pendant 24 à 48 heures, il a été possible d'observer quatre types différents de colonies distinctes les unes des autres en termes de forme, de taille et d'apparence.



**Figure 25 :** l'aspect de colonie macroscopique de colonie isolée.

#### I.4.2. Études microscopique et biochimique :

Après la coloration de Gram , un examen microscopique est effectué. Les résultats présentés dans le tableau 3 ont mis en évidence une variété d' espèces bactériennes .Différentes formes bacillaires et cocciques sont présentes chez les bactéries observées . \_Ils peuvent être assemblés en amas, en chainettes, voire en groupes isolés .Ils présentent un Gram-score positif ou négatif .Dans les cultures bacillaires avec des bactéries Gram positives , des spores ont été trouvées.



(A)

(B)

(C)

**Figure 26:** coloration de gram et observation microscopique de bactéries Bacillus.

((A), (C) grossissement×100) / ((B) grossissement ×40)

### II. DISCUSSION :

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 F et Ait Meddour K, 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 de sol d'Ain-Temouchent a permis d'isoler 14 isolats. Ce nombre est encore très faible par rapport à l'énorme diversité des souches bactériennes dans les écosystèmes aux meilleures conditions climatiques et physico-chimiques.

Nos échantillons présentaient une large diversité microbienne, y compris des bacilles Gram-positifs et Gram-négatifs, et des cocci Gram-positifs et Gram-négatifs. Négatif (tableau).

Concernant l'aspect des colonies isolées, des colonies croûteuses à bords réguliers ou irréguliers, sèches ou très muqueuses ; de petites colonies sphériques crémeuses ; des colonies rondes jaunes et de grosses colonies rondes blanches ont été retrouvées.

Les espèces de *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif sporulés. Beaucoup ne sont pas pathogènes (livre Atlas de poche de microbiologie p100).

Nos résultats ont montré que 61,90 % des isolats étaient des bacilles à Gram positif (tableau) et que la plupart de ces bactéries avaient des spores, nous avons donc pu déterminer que le genre le plus réactif dans notre échantillon était *Bacillus*.

D'après les résultats obtenus, ces bacilles à Gram positif ont montré une activité enzymatique élevée (tableau).

Ces résultats sont proches à ceux obtenus par (**Hellio, 1993**), L'analyse des isolats a montré qu'une importante diversité microbienne était présente dans les échantillons d'Ain-Temouchent et que *Bacillus* spp avait une très bonne activité enzymatique.

### II.1. Mise en évidences des activités enzymatiques :

#### II.1.1. Activité Amylolytique :

L'activité de l'amylase a été observée dans 78,57 % des isolats de sol (tableau).

Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon ou le glycogène. Ils peuvent provenir de diverses sources, comme les plantes, les animaux et les micro-organismes.

Ces derniers sont plus favorisés grâce à leur large disponibilité et leur production volumineuse à l'échelle industrielle (**Vidyalakshmi et al., 2009**).

Les bactéries du sol synthétisent des enzymes amylolytiques permettant Dégrade la matière organique et apporte des éléments minéraux nécessaire à la croissance d'autres organismes.

#### II.1.2. Activité cellulolytique :

La dégradation de la cellulose joue un rôle clé dans le cycle de carbone (**Lee et al., 2007**), elle est essentiellement convertie par les microorganismes en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies et en méthane en anaérobiose (**Eriksson, 1985**).

D'après les résultats rapportés dans le tableau 11 et la figure 6, nous avons remarqué qu'il ya cinq souches (S4, S5, S7, S10, S11) possédant une activité cellulolytique. Le reste des souches ne présentent aucune activité cellulolytique notée sur le milieu de culture.

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 (**Lu et al. 2005**).

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

#### II.1.3. Activité protéolytique :

Les tableaux 12 et 13 montrent que toutes les souches possèdent la protéase. Cette enzyme est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies.

Les membres thermophiles tel que les Bacillaceae fournissent d'importantes protéases thermostables à l'industrie, cas de la thermolysine, une métalloprotéase produite par *Geobacillus stearothermophilus* avec une demi-vie d'une heure à 80°C (**Rao et al., 1998 ; Haaki et Rakshit, 2003**).

### II.1.4. Activité lipolytique :

L'intérêt pour les lipases microbiennes n'a cessé de croître au cours des 25 dernières années, Principalement parce qu'ils fournissent un grand nombre d'applications dans différents domaines champ. D'une part, les avantages de la lipase microbienne sont que, Relativement simple à fabriquer par rapport aux lipases d'origine animale, en revanche, Ils présentent une grande stabilité à la température, aux détergents et aux enzymes Agents protéolytiques (**Sharma et al., 2001**).

Dans ce travail, une activité lipolytique a été observée dans 88,09% des isolats du sol.

Lipase Largement distribué dans les bactéries du sol (tableau).Selon **Sharma et al. (2001); Gupta (2004); Fix et al. (2007)**, la lipase est Largement distribuée dans les bactéries, les levures et les champignons filamenteux. elles sont Les deux sont produits dans les bactéries Gram+ (*Bacillus* et *Staphylococcus*) et les bactéries gram-.

Selon **Ji et al. (2014)**, les bactéries *Bacillus* produisent de la lipase **El-Safey et Abdul-Raouf (2004)**. ont rapporté que les souches de *Bacillus* produisent un grand nombre de lipases et d'autres types d'exo nucléases sont à la fin de la phase exponentielle de leur croissance.

# Conclusion

Au cours des dernières décennies, les enzymes sont devenues une star des paillasses en biotechnologies. Il convient de souligner que la forte présence de ces biocatalyseurs résulte de l'intérêt économique qu'elles présentent dans les différents secteurs de bioindustries.

Aujourd'hui, près de 4000 enzymes sont caractérisées, et parmi celles-ci presque 200 sont commercialisées pour usage industriel. Jusqu'aux années 60 du siècle dernier, le marché global des enzymes a été seulement de 6.30 Billion USD by 2022.

A l'heure actuelle, seulement quelques 2% environ des microorganismes dans le monde ont été testés comme sources d'enzymes et des taux de manipulation génétique ou environnementales sont continuellement menés avec les souches microbiennes déjà répertoriées et classées GRAS (Generally Reconized As Safe) afin d'augmenter le rendement des cellules ou la qualité des enzymes produites. Cependant, le monde microbien regorge de potentialités catalytique et les travaux de criblage (screening) de nouvelles activités n'en demeure pas moins une alternative valable, et certainement plus accessible, de recherche de nouvelles enzymes, en particulier au niveau de niches écologiques exotiques et de souches microbiennes non encore explorées.

Il ya un regain d'intérêt dans l'étude des enzymes protéolytiques, principalement en raison de la reconnaissance du fait que ces enzymes jouent non seulement un rôle important dans les processus cellulaires métaboliques, mais ont également gagné une attention considérable dans la communauté industrielle. Les bactéries sont le groupe le plus dominant de producteurs des enzymes, Pour tous ces arguments on a essayé à travers cet étude d'isoler quelques bactéries ayant une capacité protéolytique , lipolytique ,cellulolytique , amylolytique, a partir des volailles et des sols.

Dans cette étude, deux principaux sont : Le premier consiste en l'obtention des isolats protéolytique, lipolytique, cellulolytique , amylolytique ,à partir de sols et de volailles et le second a pour intérêt les identifies.On a isolé durant la première quelques souches de bactéries protéolytique, lipolytique , cellulolytique , amylolytique , à partir de sols et de volailles .La deuxième étape consiste à identifier ces isolats de l'étape précédente. L'identification, basé sur les caractères morphologiques .Au cour de la dernière étape, les facteurs températures et pH optimaux pour la croissance de chaque souche des isolats sont déterminés.



# **Annexes**

## MATERIEL

### Annexe 01 : APPAREILLAGE

- Etuve ( incubateur)
- Autoclave
- Centrifugeuse réfrigérées
- Bain marie
- Agitateurs magnétique à plaque chauffante
- Balance électronique
- Balance de précision
- Balance électronique de précision
- Ph mètre électronique
- Bec bunsen
- Réfrigérateur domestique
- Microscope
- Conteur de colonie Verrerie
- Fiole graduée de 250 ml
- Flacons ECBU
- Béchers
- Erlen-Meyer
- Eprouvette de 100ml
- Les tubes stériles
- Boîtes de pétris stériles
- Flacon de verre de 200 ml
- Tube à essai en verre

Autre matériels :

- Pince
- Spatules
- Pipette pasteur
- Micro pipette a 1000ml / 100ml / 10ml
- Le râteau
- Anse de platine

**Annexe 02 : Réactif**

- Eau distillée stérile
- Rouge de phénol
- Solution de HCL
- Solution de NAOH
- KCL
- MgSO4
- KH2PO4
- Glucose
- Acide Nalidixique.
- Gélatine
- Agar

**Annexe 03: Colorant****Fuschine**

- Fuchsine basique.....0.2g
- Alcool éthylique à 90°.....10g
- Phénol.....5g
- Eau distillée..... 100l

**Lugol :**

- Iode.....1g
- Iodure de potassium.....10g
- Eau distillée .....300l

**Violet de gentiane**

- Violet de gentiane.....1g
- Ethanol à 90° .....10g
- Phénol..... 2g
- Eau distillée.....100ml

## Annexe 04 : Composition des réactifs

### Solution d'HCL (1N)

- 8ml HCL
- 92 ml d'eau distillée pour ajuster jusqu'à 100 ml.

### Solution de NaOH (1N)

- 4 g de NaOH
- 100 ml d'eau distillée

### Solution de PBS (01X/1000 m/L)

- 137 Mm Nacl ..... 8,0 g/L.
- 10 Mm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1,42 g/L.
- 1,6 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 0,24 g/L.
- 2,7 Mm KCL ..... 0,2 g / L.

## Annexe 05 : Composition des milieux de culture utilisés.

### Gélose nutritive :

Composition par litre :

- Extrait de viande 1g
- Extrait de levure 2g
- Peptone 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Agar 15g
- pH = 7,4

### Gélose au lait :

- 100 ml de GN
- Lait 5ml

**Milieu LB :**

- Peptone 10g
- Extrait de levure 5g
- 10g Nacl

**Milieu PBS (250ml)**

- Nacl ..... 2g /l
- Kcl ..... 0 ,05g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 0, 355g/l
- Kh<sub>2</sub>po<sub>4</sub> ..... 0 ,06g /l

**Annexe 06 : la coloration de gramme**

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne.
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant 1 min.
- Ajouter du lugol pendant 1 min.
- Décolorer avec de l'alcool pendant 8 secondes, puis rincer à l'eau.
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 1 min.
- Laver à l'eau.
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).
- Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.

# Références Bibliographique

**Atlas et Bartha, (1992).** Microbial ecology. Fundamentals and applications. The Benjamin / Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA) : 3ème édition, 563

**Hoorman et Islam, (2010).** Understanding soil microbes and nutrient recycling. FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, 1-5.

**Perry et al., (2004).** microbiologie cours et question de révision.

**(Vieille C., Zeikus G.J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:1-43.

**Holden, (2009).** Extremophiles: Hot Environments in *Encyclopedia of microbiology*, 3rd Ed., Schaechter M. P: 127-146. Elsevier.

**Wiegel et J., Canganella F. (2001).** Extreme Thermophiles in; *Encyclopedia of life sciences*. Wiley Ed. 12P.

**Sunna A, Bergquist PL. (2003).** A gene encoding a novel extremely thermostable 1,4-beta-xylanase isolated directly from an environmental DNA sample. *Extremophiles* 7: 63-70.

**Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Mohamed N, Fava F. (2015).** Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 7907-7913.

**(Ferrero M.A., Castro G.R., Abate C.M., Baigori M.D., Sineriz F. (1996).** Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45; 327–32.

**George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K. (1995).** Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem.*, 30; 457–462.

**Soares V.F., Castilho L.R., Bon E.P.S., Freire D.M.G. (2005).** High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, Vol. 121– 124

**Patel et al., (2005).** Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. : Production and optimization. *Proc. Biochem.*, 40; 3569– 3575.

**Sinsuwan n S., Rodtong S., Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Proc. Biochem.*, 43; 185–192.

**(Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a).** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresour. Technol.*, 99; 2364–2372.

- Liese A., Seelbach S., Wandrey C. et Wileyu V C H. (2000).** Industrial biotransformations.
- Dauter Z., Dauter M., Brzozowski A.M., Christensen S., Borchert T.V., Beier J., Wilson K.S. et Davies G.J. (1999).** X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alphaamylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution. *Biochem.* (38): 8385-8392.
- Dey G., Palit S., Banerjee R. et Maiti B. (2002).** Purification and characterization of maltooligosaccharides forming amylase from *Bacillus circulans* GR 9313. *Ind. Microbiol. biotechnol.* 4,193-200.
- Babu et Satyanaray, 1993** Extracellular calcium inhibited  $\alpha$ -amylase of *Bacilluscoagulans* B49. *Enzyme Microbiol. Technol.* 15,1066-1069.
- Feller G., Lonhienne T., Deroanne C., Libioulle C., Van beeumen J. et Gerday C. (1992).** Purification, Characterisation and nucleotide sequence of the thermolabile  $\alpha$ -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alternomonas haloplanctis* A23. *J. Biol. Chem.* 267(8) : 5217-5221.
- Egas M. C., Da Cota M. S., Cowman D. A. et Pieres E. M. (1998).** Extracellular  $\alpha$ -amylase from *Thermus Filiformis* ork A2 : purification and biochemical characterization. *Extremophiles.* 2(1) : 23-32.
- Vukelić et B., Ritonja A., Renko M., Pokorny M., Vitale L. J. (1992).** Extracellular  $\alpha$ amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37 : 202-204. Fiche technique sur la pomme de terre. Disponible en ligne sur : [www.inra.fr](http://www.inra.fr).
- Bèguin P., Aubert J P. (1994).** The biological degradation of cellulose, *fems, microbiol. Rev.* 13, P: 25-58.
- Djouldé Darman R. (2005).** Screening des microorganismes à potentialités fermentaires pour le manioc. Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France, P: 300.
- Bruins M. E., Janssen A. E. et Boom R. M. (2001).** Thermozyms and their application : A review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 90 (2), 155-186 p.
- Li et al, 2005.** *Pratacult. Sci.*, 22 (3): 84-86
- Barnabé S., Sasseville J. L., Tyagi R. D. et Valéro J. R. (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières ? *VECTEUR environnement.* 36 (2), 50-62 p.
- Amaud A., Berset C., Bocquet J., Bouix M., Cerisie Y., Cuvellier EG.F., De Nettancourt D., Engasser J.M., GaW P., Goursaud J., Cnrenini M., Guiraud J.P., Richard, H., Steenbrugge, H., Teoule, E., Thomas, D. et Vandecasteele, J.P. (1993).** *Biotechnologies.* ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisieE Paris, France, 904 p.



**Amaud et al. (1993) and Delville et al . ( this volume )** . Quoted Fission – track methodology uncertainties are #lo ; each step is given without error in the J - value ; however , the latter error is included in the plateau age .

**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.

**Sandhya, C., Nampoothiri, K.M et Pandey, A.** Microbial proteases. *Methods Biotechnology*, 2005a, 17.p. 165-179.

**Thomas Brock and Mercedes Edwards R. (1969)**. Fine Structure of *Thermus aquaticus*, an extreme thermophile, *J. Microbiol.* 104 (1) : 509-517.

**Vincent M. (1996)**. Blood glucose: Its measurement and clinical importance. *Clinica Chimica*.

**Van den Burg B. (2003)**. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in microbiology*. 6 : 213-218.

**Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008)**. *Biochimie de HARPER*. 3<sup>ème</sup> édition. De Boeck. Bruxelles., 47. pp. 49-51, 483.

**Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O et Turunen, O., 2001**. Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

**Lee, SH, Ng, AW et Zhang, K. (2007)**. "La quête pour améliorer les soins de santé chinois : certains enjeux fondamentaux », *International Journal of Health Care Quality Assurance*, Vol.20, No.5, pp.416-428.

**El-Safey, et Abdul-Raouf (2004)** Production, purification et caractérisation de l'enzyme protéase de *Bacillus subtilis*.

**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.

**Haki, GD et Rakshit, SK (2003)** Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review. *Technologie des bioressources*, 89, 17-34.

**Sharma R., Chisti Y. & Banerjee U. C. (2001)**. Production, purification, characterization, application of lipases. *Biotechnology advances*. 19: 627-662.

**Tamura, (1993)** Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective - Page 30

**Fandi et al. (2012)**, Application of Nanotechnology in Biomedical Sciences - Page 101

**Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Schallert, T., and Chopp, M. (2005)**. Erythropoietin enhances neurogenesis and ession. *J. Cardiovasc. Phar-* restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 22, 1011-1017.

**Schwarz W.H. (2001).** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 634-649.

**(Liese et al., 2000 ; uiger et çurakoglu, 2001).**

**(Egorova et Antranikian, 2005 ; Mayer et al., 2012).**

**Belhadi Fatma; Ait meddour Kahina;.(2013).** Isolement et caractérisation des bactéries productrices d'enzymes à intérêt agricole à partir du sol et d'algues marines

**Burns et Wallenstein, (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

**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.

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