

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mohamed Khider Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Réf:.....

Filière : Biologie
Spécialité : **Biochimie fondamentale et appliquée**
Mémoire de Fin d'Etudes
En vue de l'obtention du diplôme:
Master
Thème

**Isolement et sélection d'une souche bactérienne
thermophile productrice de cellulase à partir
de sédiments Hammam El Hadjeb (Biskra)**

Présenté par :

AZZI Sana

Devant le jury:

Président: KRIKER Soulef

Promoteur: HEBAL Hakim

Examineur : AMIRI Toufik

Promotion : 2016

Remerciement

*Avant tout nous remercions notre « **Dieu** » tout puissant à la réalisation, nous avoir donné le courage et la patience*

Pour achever ce travail.

*Tout d'abord je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements **Mr HAKIM HEBAL**, enseignant à l'Université de Biskra, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordée m'ont permis de réaliser ce travail.*

Je remercie les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous remercions tous les enseignants du département de biologie de l'université Mohamed Kheider qui ont participé à notre formation de diplôme de Master 2015-2016.

DEDICACE

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus
profonde gratitude et tout mon amour*

Pour leur soutien tout au long de mes études

Mes sœurs Amina, Abla et frères, Fathi, Necer, Salim, Aymen ,Amar

Et à toute la famille.

*A tous mes amies Siham, Hassiba, Warda, Lewiza, Houda, Soumia
Hadia, Imen .Saida*

AZZI SANA

Sommaire

- Liste des abréviations
- Liste des tableaux
- Liste des figures

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1- Définition les matières lignocellulosiques.....	3
1-1- Composition de la matière lignocellulosique	3
1-2- Utilisation des matières lignocellulosiques en industrie.....	4
2- La cellulose.....	5
3- Les cellulases.....	6
3-1- Les types de cellulases.....	7
3-2- Classification des enzymes cellulolytiques.....	8
3-3- Le mode d'action des cellulases.....	8
3-4- Les stratégies de dégradation de la cellulose	9
4- Les microorganismes thermophiles.....	9
5- Les enzymes thermophiles.....	10
6- Les avantages de l'utilisation des enzymes thermophiles.....	10
7- Les cellulases thermophiles.....	10
7-1 Microorganismes producteurs de cellulases thermophiles.....	10
7-2 Source des microorganismes thermophiles producteurs de cellulases.....	11

7-3 Caractéristiques physico-chimiques des cellulases thermophiles.....	12
7-4 Mécanisme thermostabilité des cellulases.....	13
7-5 Applications industrielles des cellulases thermophiles.....	13

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1-Site d'échantillonnage.....	15
1-2- Echantillonnage.....	15
2- Isolement et sélection des souches cellulolytiques	16
2-1- Enrichissement	16
2-2- Préparation des dilutions successives.....	16
2-3- Sélection sur milieu de culture solide	16
2-4- Purification des souches.....	16
2-5- Révélation des zones claires	16
2-6- Conservation des souches isolées	17
2-7- Sélection sur milieu de culture liquide	17
2-8 - Mesure de l'activité enzymatique.....	17
3 - Identification de la souche	18
3-1- Observations microscopiques	18
3-1-1- Mobilité.....	18
3-1-2- Coloration des spores.....	18
3-2- Tests physiologiques.....	19
3-2-1 Type respiratoire.....	19
3-2-2- Voies fermentaires.....	19

3-2-2-1- Réaction de Voges-Proskauer	19
3-2-2-2- Réaction au rouge de méthyle.....	19
3-2-3- Production d'indole.....	20
3-2-4- Utilisation du citrate.....	20
3-2-5- Production de H ₂ S.....	20
3-2-6- Fermentation du glucose.....	20
3-2-7- Oxydation du galactose.....	20
3-3- Tests biochimiques.....	21
3-3-1- Catalase	21
3-3-2 - Oxydase	21
3-3-3 - Réduction des nitrates en nitrites.....	21

Chapitre 3 : Résultats et discussions

1- Isolement et sélection de souches cellulolytiques	22
1-1 Sélection sur milieu de culture solide.....	22
1-2 Sélection sur milieu de culture liquide.....	23
2 - Identification de souche.....	25
2- 1 Tests biochimiques	26
2-2 Tests physiologiques	27

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des enzymes cellulolytique	8
Tableau 2 : Source des microorganismes thermophiles producteurs de cellulases.....	12
Tableau 3 : Les activités cellulase des souches sélectionnées à 70°C, à pH 7.....	23
Tableau 4 : Propriété morphologique et biochimique de la souche As5 et du genre Geobacillus	30

Liste des Figures

Figure 1 : Présentation de la structure lignocellulolytique montrant la cellulose, hémicellulose et lignine.....	4
Figure 2 : Structure de la cellulose.....	6
Figure 3 : Les enzymes cellulolytiques qui dégrade de la cellulose.....	7
Figure 4 : Présentation de site étudié échantillonnage Hammam El Hadjeb Biskra.....	15
Figure 5 : Formation de zones claires autour des souches isolées sur milieu solide.....	22
Figure 6 : Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.....	25
Figure 7 : Observation microscopique de souche après coloration de Gram.....	25
Figure 8 : Formation de spore après coloration en 48h.....	26
Figure 9 : Test de catalase positive.....	26
Figure 10 : Test oxydase positive.....	26
Figure 11 : Test nitrate réductase négative.....	27
Figure 12 : Test de vinde levure positive.....	27
Figure 13 : La réaction de Voges Proskauer et rouge de méthyle.....	28
Figure 14 : Test de mannitol mobilité est positive.....	28
Figure 15 : Test urée indole positive.....	29
Figure 16 : Test citrate de Simmens négative.....	29
Figure 17 : Test de kligler négative.....	30

Liste des abréviations

CMC :Carboxyméthylecellulose

DNS : Acide 3,5 dinitrosalicylique

CBD : Cellulose Binding Domain

KIA : kligler Iron Agar

CMCase : Carboxyméthylcellulase

Introduction

La biomasse lignocellulosique est considérée comme sources pour la production de bioénergie renouvelable des produits de haute valeur. L'abondance des déchets celluloses tels que les déchets agricoles, industriels et de la forêt, et leur prix bas, ont stimulés les recherche pour la découverte d'enzymes pouvant les dégradés efficacement (khelil et cheba, 2014).

La cellulose est le constituant majeur des matériaux lignocellulosique et la molécule organique plus abondante sur terre. Sa structure et sa composition dépendent des conditions de cultures et de l'espèce végétale considérée.

La cellulose se trouve principalement en tant que structure constituant des parois des cellules végétales et d'algues. Elle est un polymère de chaîne linéaire de résidus D- glucose liés par des liaisons β -1,4-glycosidiques (Brown *et al.*, 1996).

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose sont appelées cellulases ou glycoside hydrolases (Nemeth *et al.*, 2002).

Les cellulases sont largement répandues dans la nature principalement produit par les micro-organismes (moisissures, des champignons et des bactéries) (Acharya et Chaudhary, 2012).

Les applications industrielles des cellulases sont les textiles, détergents, la fabrication d'aliments pour animaux et pour la production de biocarburants.

La plupart des processus de transformation des matières lignocellulosiques en produits utiles, impliquent des traitements à haute chaleur. Toutefois la plupart des cellulase isolées sont mésophiles. Ainsi, il ya nécessité de la recherche de cellulases thermophiles active et stables aux températures élevée de l'industrie (Vieille et Zeikus, 2001).

- L'isolement des souches productrices de cellulases à partir du sol et des sédiments d'une source thermale Hammam El Hadjeb.
- Sélectionner une souche productrice de cellulases thermophile.
- L'identification de la souche isolée.

Notre travail est divisé en trois parties :

Chapitre 1 : généralité sur la matière lignocellulosique, la cellulose, les cellulases thermophiles.

Chapitre 2 : Isolement et Sélection de souches productrices de cellulases thermophiles et identification de la souche sélectionnée.

Chapitre 3 : Résultats et discussions.

1- Les matières lignocellulosiques

La biomasse lignocellulosique est l'une des principales ressources renouvelables présentes sur terre. Elle est composée essentiellement de trois polymères la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (figure 1). Les teneurs de ces différents constituants sont variables d'une espèce végétale à une autre.

1-1- Composition de la matière lignocellulosique

a) La cellulose

C'est le constituant principal de la biomasse lignocellulosique représentant selon les espèces entre 35 et 50 % de la paroi végétale. Il s'agit d'un homopolymère linéaire d'unité de D-glucose liées entre elles par des liaisons β -1, 4 et présente une structure cristalline. C'est à partir de cette fraction de la biomasse qu'est issu le glucose métabolisé au cours de la fermentation éthanolique (O'Donohue, 2013).

b) L'hémicellulose

Deuxième composant glucidique majeur de la biomasse lignocellulosique, c'est un groupe hétérogène de polysaccharides tels les xylanes, les mannanes. Le xylane est le polysaccharide le plus abondant parmi l'hémicellulose. C'est un polymère qui présente une chaîne principale composée de D-xylose sur laquelle sont fixées des chaînes latérales composées de combinaisons multiples de xylose, de galactose, d'arabinose et d'acide ferulique et d'acide glucuronique (O'Donohue, 2013).

c) La lignine

Le troisième composant majeur de la biomasse lignocellulosique, la lignine est un polymère aromatique hétérogène à longue chaîne composée en grande partie des unités phénylpropanes le plus souvent liés par des liaisons éther. Il est plus résistant à la dégradation biologique que la cellulose (Laurent et *al.*, 2011).

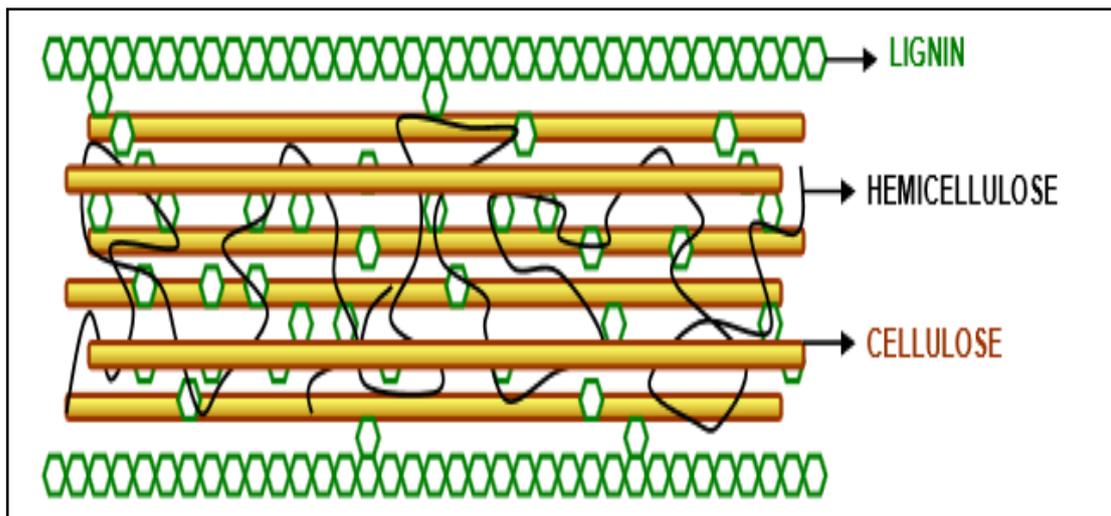


Figure.1.1. Présentation de la structure lignocellulosique montrant la cellulose, hémicellulose et la lignine (Mussatto et Teixeira, 2010).

.1-2- Utilisation des matières lignocellulosiques en industrie

L'étude des différentes voies de valorisations des biomasses lignocellulosique a fait l'objet de nombreux travaux. Outre la fabrication de la pâte à papier, les matières lignocellulosiques présentent un intérêt dans l'alimentation humaine et animale ainsi qu'en tant que précurseurs pour la production de produits chimiques organiques et d'énergie.

- **L'alimentation humaine**

Des sous-produits agro-industriels sont utilisés dans l'alimentation humaine grâce à leurs teneurs élevées en fibres alimentaires (Dreher et Padmanaban, 1983).

- **L'alimentation animale**

La fraction polysidique, qui constitue une part importante du matériau lignocellulosique, peut être assimilée par les ruminants (Czerkowski, 1986). Les micro-organismes en utilisent la cellulose et d'autres hydrates de carbone végétaux comme source de carbone et d'énergie. Ainsi, certains transforment les glucides acide acétique, propionique et butyrique, que l'animal supérieur peut utiliser comme des sources d'énergie et de carbone (Colberg, 1988).

- **L'industrie du bioéthanol**

La bioconversion industrielle de la matière lignocellulosique en éthanol se produit en plusieurs étapes. Après des prétraitement physicochimiques, les enzymes sont ajoutés pour hydrolyser les polysaccharides en sucres simples (saccharification), puis, dans une étape supplémentaire, des micro-organismes capables de fermentation sont ajoutés pour fermenter les sucres en bioéthanol (Maki et *al.*, 2009).

- **L'industrie du papier**

Le bois et la canne à sucres sont utilisés comme matière première pour la fabrication des pâtes à papier (Breen et Singleton, 1999 ; Scott et *al.*, 1998).

- **Autres bioproduits à valeur élevée**

Actuellement, un certain nombre de produits tels que des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et un certain nombre de bactéries et de polysaccharides sont produites par fermentation en utilisant le glucose comme substrat de base, mais théoriquement ces mêmes produits peuvent être fabriqués à partir de déchets lignocellulosiques (Howard et *al.*, 2003).

2- La Cellulose

La cellulose est la biomasse le plus abondant sur terre (Basavaraj et *al.*, 2014). Elle représente environ 50% de la biomasse lignocellulosique et les végétaux en produisent jusqu'à 50 à 100 milliards de tonnes par an. Elle est le principal constituant de la paroi cellulaire des plantes et du bois (jusqu'à 95% dans les fibres de coton et 40 à 55% dans le bois (Kaniz et Manchur, 2015).

C'est un polymère linéaire de molécules de D-glucose reliées par des liaisons β -1,4-glycosidiques (figure2). Le degré de polymérisation varie entre 200 et 25000 unités glucose (Brown et *al.*, 1996). Elle est composée de régions cristallines et de régions amorphes.

Il existe cinq types de cellulose, les types I, II, III, IV et V, qui diffèrent dans l'agencement des chaînes de cellulose dans la molécule. La cellulose I est la forme native de la cellulose (Delmer, 1999). La cellulose II est une autre forme cristalline de cellulose, dite allomorphe, qui est caractérisée par une orientation antiparallèle de chaînes de cellulose (Brown et *al.*, 1996). Le grand nombre de groupements hydroxyyles permet l'établissement de

liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires formant ainsi un réseau tridimensionnel rigide et insoluble (Gandini et Pasquini, 2012).

La cellulose est le produit de l'utilisation de l'énergie solaire et du dioxyde de carbone par les végétaux via la photosynthèse (Wahlström, 2014). Elle est dégradée par des microorganismes tels que les protozoaires, les mycètes et les bactéries.

Sa biodégradation est l'un des paramètres majeurs contrôlant le cycle du carbone sur terre, et y' est assurée par des microorganismes cellulolytiques sécrétant des cellulases (Perez et *al.*, 2002).

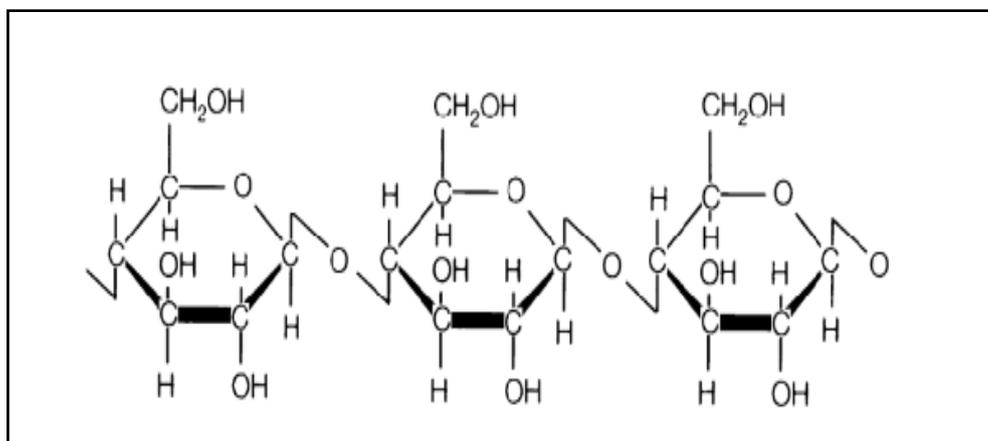


Figure.1.2. Structure de la cellulose (Acharya et Chaudhary, 2012).

3- Les cellulases

Ce sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons β -1,4-glycosidiques dans le polymère de cellulose pour libérer les unités de glucose (Acharya et Chaudhary, 2011). Elles sont les principaux membres de la famille des glycosides hydrolases.

Une cellulase de type est composée d'un domaine de liaison à l'hydrate de carbone (CDB) à l'extrémité C-terminale reliées par une région courte au domaine catalytique à l'extrémité N-terminale (Maki et *al.*, 2009).

3-1 Les types des cellulases

L'hydrolyse enzymatique complète de matière cellulosique requière différents types de cellulases à savoir : les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les β -glucosidases (Acharya et Chaudhary., 2012).

a) Les endo- β -1-4-glucanase (E.C.3.2.1.4)

Elles coupent au hasard les liaisons glycosidiques internes de la chaîne de cellulose et libèrent des oligosaccharides (figure 3). Elles attaquent la région amorphe de la cellulose (Bronnenmeier et *al.*, 1995).

b) Les cellobiohydrolase ou Exo- β -1-4-glucanases (E.C.3.2.1.91)

Elles attaquent les polymères de cellulose par les extrémités non réductrices et libèrent des résidus cellobiose (figure 3). Elles sont également pensé pour de perturber la liaison hydrogène dans la cellulose cristalline. Elles peuvent avoir une activité endoglucanase mais elle est faible (Stuart, 2004).

c) Les β -glucosidases (EC 3.2.1.21)

Elles sont impliquées dans l'hydrolyse des oligosaccharides courts, du cellobiose et du glucose, ce qui diminue l'inhibition de la production des cellobiohydrolases (figure 3). Le taux d'hydrolyse par les β Gs diminue nettement avec l'augmentation du degré de polymérisation (DP) du substrat (Stuart, 2004).

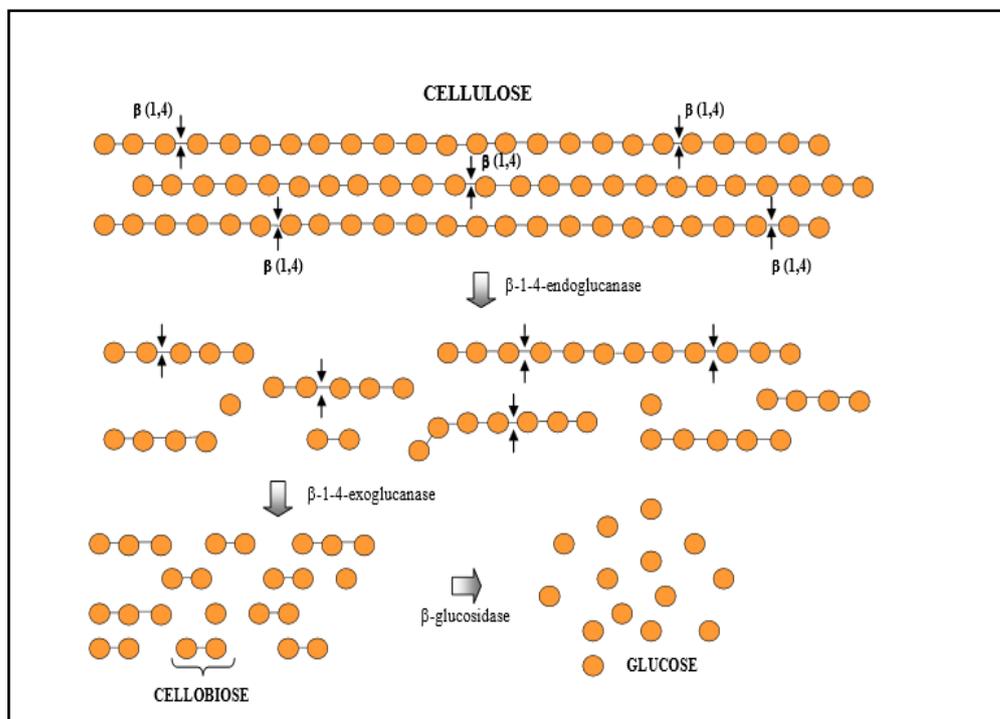


Figure.1.3. Les enzymes cellulolytiques qui dégrade de la cellulose (Mussatto et Teixeira, 2010).

3-2- Classification des enzymes cellulolytiques

Les cellulases ont été classées dans de nombreuses familles en fonction de leurs séquences d'acides aminés et structures cristallines (tableau 1) (Henrissat, 1991).

Tableau. 1.1. Classification des enzymes cellulolytique (Sadhu et Maiti, 2013).

Enzyme	E.C .nombre	Réaction	Autre nom	Famille
Endo -1,4 β -D-glucanglucanohyd-rose	E. C. 3. 2. 1.4	Casse la liaison interne de cellulose amorphe et libérant les oligosaccharides	Endoglucanase, Endo-1,4- β – glucanase, Carboxymethyl cellulase, β -1,4-endoglucon hydrolase, Endocellulase	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74
Exoglucanase ou 1,4- β -Dglucanase cellobiohydrolases (cellobiohydrolases)	E.C.3.2.1.91	Hydrolyse la liaison 1,4-bêta-D glucosidique cellulose et libérant de cellobiose	Exoglucanase, Exocellobiohydro lase, 1,4- β - cellobiohydrolas- e	5, 6, 7, 9, 10, 48
β - Glucosidases ou β -Dglucoside gluco-hydrolases	E.C.3.2.1.21	Hydrolyse la cellobiose et libérant le glucose	Gentobiase, Cellobiase, Amygdalase.	1, 3, 9

3-3 Le mode d'action des cellulases

Il y a deux modes d'action pour l'hydrolyse de la cellulose par des cellulases, soit par l'inversion soit par la rétention de la configuration de l'atome de carbone anomère. Au moins deux acides aminés avec des groupes carboxyle situés à l'intérieur du site actif catalysent la réaction acide-base (Maki et *al.*, 2009).

Le mode couramment décrit pour l'action les cellulases sur les polymères est soit exo ou endo-clivage, et toutes les cellulases ciblent le clivage spécifique de liaisons β -1,4-glycosidique. Grâce à ce système de classification, les cellobiohydrolases (exoglucanases) ont été classés comme à exo-action basée sur l'hypothèse qu'elles clivent toutes les liaisons β -1,4-glycosidiques aux extrémités de la chaîne. Ceci empêche leur ré-adhésion à la cellulose cristalline. Alors que les endoglucanases d'autre part, sont souvent classés comme des

cellulases endo-action parce qu'elles clivent les liaisons β -1,4-glycosidiques à l'intérieur de la chaîne. Les endoglucanases sont actifs sur les régions amorphes de la cellulose et donc leur activité peut être testée en utilisant des substrats de cellulose solubles ; à savoir, le dosage de la carboxyméthylcellulase (CMCase). Cependant, il existe des preuves maintenant qui soutiennent que certaines cellulases présentent deux modes d'action, endo et exo. Ainsi le classement a changé ; les cellobiohydrolases (exoglucanases) sont décrits comme étant actives sur les régions cristallines de la cellulose ; alors que les endoglucanases sont typiquement actives sur la région amorphe plus soluble de la cellulose cristalline. Il existe un haut degré de synergie observée entre cellobiohydrolases et les endoglucanases, et cette synergie est nécessaire pour l'hydrolyse efficace de cristaux de cellulose (Maki et *al.*, 2009).

3-4- Les stratégies de dégradation de la cellulose

L'organisme produit un ensemble d'enzymes libres qui agissent synergique pour dégrader les parois cellulaires des plantes. Les cellulases bactériennes sont produites constitutivement par des bactéries, tandis que les cellulases fongiques sont produits seulement en présence d'un substrat de cellulose. Les bactéries anaérobies et aérobies ont des stratégies différentes pour dégrader des substrats cellulolytiques.

Alors que les bactéries anaérobies dégradent la cellulose en utilisant des cellulosomes, les bactéries aérobies sécrètent des enzymes capables de dégrader la cellulose (Doi, 2008).

4- Les microorganismes thermophiles

Selon l'intervalle de température de croissance, les microorganismes thermophiles peuvent être divisés en trois classes : les thermophiles modérés ont une température optimale de croissance entre 45-65°C. Les thermophiles extrêmes ont un optimum entre 65-90°C et les hyperthermophiles un optimum supérieur à 90°C (Brock, 1985). Dans une autre classification, les microorganismes thermophiles se développent à une température optimale entre 50 et 80°C, avec les thermophiles modérés entre 50 et 60°C, et les thermophiles extrêmes entre 60 et 80°C. Les hyperthermophiles ont la température optimale entre 80 et 110°C (Stetter, 1996; Kristjansson et Hreggvidsson, 1995).

5- Les enzymes thermophiles

Les enzymes thermophiles ont souvent une température optimale entre 60 et 80°C et celle des enzymes hyperthermophiles une des températures au dessus de 70°C. Les deux types d'enzymes ne fonctionnent pas bien au dessous de 40°C (Vieille et Zeikus, 2001).

6- Les avantages de l'utilisation des enzymes thermophiles

les enzymes thermophiles et hyperthermophiles offrent des avantages biotechnologiques quand à leur utilisation comparées aux enzymes mésophiles (température optimale d'activité entre 25 à 50°C) ou des enzymes psychrophiles (température optimale entre 5 et 25°C) : (i) une fois exprimées dans des microorganismes mésophiliques, elles sont facilement purifiées par traitement thermiques, (ii) leur thermostabilité est associée à une résistance aux dénaturant chimiques (tels les solvants ou l'hydrochloride de guanidinium), et (iii) performant des réactions enzymatiques aux températures élevées, permet des concentration élevée en substrat, une faible viscosité, des risques mineurs de contaminations microbiennes et offre des vitesses de réaction élevées (Vieille et Zeikus, 2001).

7- Les cellulases thermophiles

Ce sont des enzymes actives et stables aux températures élevées avec un optimum d'activité située entre 60 et 80°C (Vieille et Zeikus, 2001).

7-1 Microorganismes producteurs de cellulases thermophiles

Les enzymes cellulolytiques thermophiles sont produites par une diverses bactéries et mycètes, aérobies ou anaérobies, mésophiles et thermophiles. Cependant, quelques mycètes et bactéries seulement produisent un taux élevé de cellulases capable de solubiliser la cellulose cristalline.

De nombreux micro-organismes, y compris les champignons et les bactéries étaient trouvés pour dégrader la cellulose et d'autres fibres de la paroi cellulaire végétale .Dans la nature, la dégradation de la biomasse cellulosique est effectuée par des mélanges d'enzymes hydrolytiques collectivement connus comme cellulases (Dashtban et *al.*, 2010).

a) Les mycètes cellulolytiques

Certaines espèces de champignons thermophiles dégradent rapidement la cellulose tel *Sporotrichum*, *Talaromyces emersonii* et *Chaetomium*, *Sporotrichum*, *Thermoascus aurantiacus* et *Trichoderma viridae* (Acharya et Chaudhary, 2012).

b) Les bactéries cellulolytiques

Les cellulases bactériennes ont une forte activité contre les celluloses cristallines et sont également plus thermostables et plus alcalines par rapport aux cellulases fongiques. La propriété cellulolytique a été rapportée dans les souches de *Bacillus*, *Clostridium thermocellum*, *Thermonospora fusca*, *Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium Thermophile* et *Humicola insolens* (Acharya et Chaudhary, 2012). Des cellulases thermostables d'origine archéenne montrant une activité optimale à 102-105 ° C ont été isolés à partir de *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii* *Sulfolobus* de MT4, *Sulfolobus acidocaldarius* et *Sulfolobus shibatae* (Acharya et Chaudhary, 2012).

7-2 Source des microorganismes thermophiles producteurs de cellulases

Les microorganismes thermophiles cellulolytiques sont d'un intérêt particulier, en raison de leur capacité à produire des cellulases thermostables qui sont généralement stables sous une variété de conditions sévères, y compris les pHs fortement acides ou alcalines et une température jusqu'à 90 ° C (Phat et Phat, 1997).

Les cellulase ont été isolées à partir de divers environnements tels que les mines d'or, les plantes marines, les profondeurs marines, les usines de compostage (Menendez et al., 2015). Les sources chaudes acides (Mohagheghi et al., 1986).

Tableau.1.2. Source des microorganismes thermophiles producteurs de cellulases.

Enzyme	Microorganisme	Lieu d'isolement	Gram	T optimale	PH	Nacl	Référence
Endoglu- canase et exoglu- canase	Thermotoga maritima	Eau de mer	G+	95°C	6 à 7,5	2,5	(Bronnme- ir et <i>al.</i> , 1994)
CMcase	Bacillus sp	Sol de brazil	G+	70°C	7	/	(Padilha et <i>al.</i> , 2015)
Thermos- table, haloalkaline cellulase	Bacillus halodurans CAS 1	Marine sédiment	G+	60°C à 80°C	9 à 12	30% 35%	(Annamal- ai et <i>al.</i> , 2005)
Endoglu- canase	Bacillus agaradhaerens JAM-KU023	/	G+	60°C à 70°C	7 à 9.4 6,5 à 7	0,2 à 2	(Kazumic- hi et <i>al.</i> , 2006)
Cellulase CelB	Bacillus sp. BG- CS10	Zabuye Salt Lake, Tibet	G+	55°C		2.5	(Zhang et <i>al.</i> , 2011)
Cellulase	Brevibacills borstelensis	Hot spring	G+	55-60°C	7.5 à 8.5	10	(khalil, 2011)
Endogluc- anase	Geobacillus Streaothermoph- -ilus	Sol d'Egypt	G+	50°C	7	/	(Makky, 2009)
Cellulase	Bacillus Flexus	Ula lacuca	G+	75°C	10 à 12	5 à 11	(Trivedi et <i>al.</i> , 2011)

7-3- Caractéristiques physico-chimiques des cellulases thermophiles

Les microorganismes thermophiles cellulolytiques sont d'un intérêt particulier en raison de leur capacité à produire des cellulases thermophiles qui sont caractérisées par leur grande thermostabilité, leur stabilité sous une variété de conditions sévères, y compris les environnements fortement acides ou alcalines, et leurs résistances aux dénaturants chimiques tels les solvants ou l'hydrochloride de guanidinium (Bhat et Bhat, 1997).

7-4- Mécanisme thermostabilité des cellulases

La stabilité thermique renforcée pourrait être due à une série de modifications mineures, comme une augmentation du nombre de ponts salins et des liaisons hydrogène, l'amélioration du repliement interne (Hakulinen et *al.*, 2003). l'augmentation du nombre de résidus chargés de surface, la présence de domaines thermo –stabilisants (Turunen et *al.*, 2002). et ou l'introduction de ponts disulfures, en particulier à l'extrémité N- ou C- terminales ou dans les régions d'une hélice (Kumar et *al.*, 2000 ; Turunen et *al.*, 2001).

7-5- Applications industrielles des cellulases thermophiles

Enzymes thermophiles sont des biocatalyseurs idéales pour la biotechnologie moderne en raison de leur thermostabilité. Elles ont de nombreuses applications potentielles.

- **Industrie agro-alimentaire**

Les cellulases sont employées avec d'autres enzymes dégradant la paroi végétale dans le traitement des fruits et de légumes et dans l'industrie des boissons. En industrie agro-alimentaire, les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration des diverses suspensions riches en fibres cellulosiques. Les cellulases et les hémicellulases peuvent également être utilisés pour l'amélioration de l'extraction de l'huile d'olive (Acharya et Chaudhary, 2012).

- **Industrie du papier**

Les cellulases thermophiles ont été également montrées appliquées dans le blanchiment de la pâte de papier. Les endoglucanases ont la capacité de diminuer la viscosité de la pâte avec une hydrolyse faible (Père et *al.*, 1995). Elles peuvent également être utilisées dans la préparation des cartons facilement biodégradables et la fabrication des serviettes et papiers hygiéniques (Acharya et Chaudhary, 2012).

- **Industrie animale**

Elles sont utilisées dans l'industrie de l'alimentation animale comme additifs dans les fourrages des ruminants et des volailles. Ces enzymes hydrolysent efficacement le facteur antinutritionnels comme cellulose dans les matières d'alimentation pour faciliter l'absorption et améliore la valeur nutritive de l'aliment (Kuhad et Singht, 2011).

- **Industries agricoles**

Les cellulases ont également été utilisées pour l'amélioration de la qualité du sol ou elles favorisent la croissance des cultures et contrôlent les maladies des plantes. (kuhad et *al.*, 2011).

- **Industrie du textile et des détergents**

Les cellulases sont employées dans l'industrie du textile pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage, pour ramollir les tissus, enlever les nœuds (constituent des défauts de colorant), et dans les poudres de lavage et les détergents (Sukumaran et *al.*, 2005).

1-Site d'échantillonnage

Le prélèvement d'échantillon a été réalisé à partir d'une source thermale Hammam Al baraka El Hadjeb. Il est basé sur l'état du capital, à 12 Km. qu'il est un endroit spécial pour le traitement des maladies rhumatismales dans les décombres dans le sable. Le sédiment est caractérisé par pH égale 7.16 et haute température 52°C qui favorise la croissance des organismes thermophile.



Figure.2. 4. Présentation de site étudié échantillonnage Hammam El Hadjeb Biskra.

1-2- Echantillonnage

L'échantillon a été prélevé au 11 Octobre 2016 à partir des sédiments des eaux de la station thermale El Hadjeb, Biskra. un seul prélèvement Ces eau ont été caractérisée par une haute température ce qui favorise la croissance des organismes thermophile. Le surgissement des eaux chaudes à la surface du sol a abouti à la formation d'un lac d'eau chaude. Les bords de ce lac ont été entourés d'une végétation importante et ces dépôts représentent une source de matières lignocellulosiques pour la croissance des microorganismes thermophiles.

Les sédiments ont été prélevés de plusieurs points espacés du lac à l'aide d'une spatule stérile et introduit dans un flacon stérile. Le flacon à été conduit immédiatement au laboratoire et conservé à 4°C.

2- Isolement et sélection des souches cellulolytiques

2 -1- Enrichissement

Devant un bec benzène, les sédiments dans le flacon a été bien mélangés. 20g de sédiments ont été pesés et introduit stérilement dans un 100 ml de milieu d'enrichissement contenant en g/l : CMC : 7g, Extrait de levure : 2g, NaCl : 5g, NH₄Cl :2,5g ; NaHPO₄ :5 g, MgSO₄H₂ :0,2g.

La suspension de sédiments a été bien mélangée puis incubée à 50 °C pendant 8 jours

2-2- Préparation des dilutions successives

Après 8 jours d'incubation, une série de dilutions ont été effectuées en prélevant 1ml de solution d'enrichissement, avec laquelle des séries de dilution ont été préparées jusqu'à 10⁻⁶

2-3- Sélection sur milieu de culture solide

Cette sélection est basée sur la formation de zone claire autour des colonies poussant sur un milieu solide à base de CMC. En effet, les souches sécrètent dans le milieu solide des cellulases qui dégrade la CMC ce qui aboutie à la formation de zone claires autour de la colonie.

Des boites de Pétri contenant le milieu solide à base de CMC ont étéensemencés en surface par 0,1 ml des différentes dilutions, puis incubés à 50°C pendant 2 jours.

2-4- Purification des souches

Les colonies obtenues sur le milieu solide ont été repiquées sur le même milieu et incubées à 50 °C pendant 48 h.

2-5- Révélation des zones claires

Les boites de Pétri d'isolement ont été inondées par une solution de lugol pendant 10min, puis l'excès de lugol est versé et les boites ont été inondées par une solution de NaCl (1%). Le lugol réagit avec la CMC et lui donne une couleur bleu violet, mais ne réagit pas avec le glucose formé suite à l'hydrolyse de ce polymère. Ces zones d'hydrolyse sans couleur et apparaissent ainsi claire dans le milieu.

2-6- Conservation des souches isolées

Les souches entourées de zones claires ont été ensuite transférées dans des géloses nutritives inclinées pour être conservées à 4°C.

2-7- Sélection sur milieu de culture liquide

Cette sélection a été basée sur la mesure de l'activité cellulase du surnageant d'une culture sur milieu liquide.

Les souches montrant des zones claires sur le milieu solide ont été ensemencées dans des tubes contenant 7mL de milieu liquide à base de CMC, puis incubées à 65°C pendant 48h.

Après deux jours de croissance, la culture du milieu liquide a été centrifugée à 10000 rpm et 4 ° C pendant 10 minutes, afin de récupérer le surnageant de la culture.

2-8- Mesure de l'activité enzymatique

L'activité cellulase a été déterminée en mesurant la quantité de sucre réducteur libéré à partir d'une solution 1% (p/v) de CMC suivant la méthode au DNS (Miller, 1959).

La solution 1% de CMC est préparée en dissolvant 1g de CMC dans 100 ml de tampon phosphate de sodium (50mM) à pH 7(voir Annexe).

Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9 ml de la solution CMC (1%). Il est incubé à 70° C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml de DNS et le mélange a été porté à ébullition à 100 ° C pendant 5 minutes. Le mélange a été par la suite refroidi dans une eau glacée.

Le mélange témoin correspond à la solution de CMC incubée sans le surnageant, celui-ci étant ajouté après le DNS.

La lecture des absorbances a été effectuée à 540 nm, au spectrophotomètre JENWAY 6310.

La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de glucose de 0,05 à 0,6 mg /ml.

La concentration des sucres réducteurs a été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage, et l'activité CMCase a été calculée d'après la relation suivante (Bailey et *al.*, 1992) :

$$\text{Activité enzymatique (UI/ml)} = (C_x - C_{tb}) \times D/t$$

Cx : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel ($\mu\text{mole/ml}$).

Ctb : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin ($\mu\text{mole/ml}$).

D : facteur de dilution

t : temps d'incubation (minutes)

Une unité (U ou $\mu\text{mol} / \text{min}$) de l'activité CMC_{ase} est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une $1 \mu\text{mole}$ d'équivalente glucose par minute dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus.

La mesure d'activité sur chaque souche a été réalisée en triplicata.

3- Identification de la souche

La caractérisation morphologique, biochimique et physiologique de la souche sélectionnée est effectuée selon les méthodes d'identification conventionnelles (Renaud, 2000). Tous les tests ont été réalisés en triplicata

3-1- Observations microscopiques

La souche âgée de 24h fait l'objet d'une coloration de Gram, afin de déterminer le Gram et la forme de cellule.

3-1-1- Mobilité

Cette propriété a été déterminée par examen microscopique de la souche à l'état frais entre lame et lamelle et par observation de l'aspect de la croissance dans le milieu mannitol - mobilité. Dans ce dernier cas, la souche a été ensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette boutonnée. Les tubes ont été incubés à 50°C pendant 48 heures (Renaud, 2000).

3-1-2- Coloration des spores

Dans le procédé de Schaeffer-Fulton, d'abord le frottis a été préparé puis coloré sur papier filtre avec de vert de malachite jusqu'à l'évaporation, un colorant très puissant qui pénètre dans les endospores. Ensuite les cellules ont été lavées à l'eau et contre coloré à la fushine pendant 1 min. Grâce à cette technique les endospores apparaissent en vert ou rouge (Prescott et *al.*, 2003).

3-2- Tests physiologiques

3-2-1- Type respiratoire

Le comportement des souches vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans la gélose viande -levure. La souche a été ensemencée, dans la gélose maintenue en surfusion, par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette boulée. Celle-ci est remontée, par la suite, dans un mouvement en spirale, jusqu'à 1 cm de la surface du milieu. La croissance a été observée après 24, 48 ou 72 h d'incubation à 50°C (Renaud, 2000).

3-2-2- Voies fermentaires

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

3-2-2-1- Réaction de Voges-Proskauer

Elle met en évidence les produits de la fermentation butanediolique. Le milieu Clark et Lubs a été ensemencé par la souche puis incubé à 50 °C pendant 48 h. Par la suite, dans un tube à hémolyse stérile, 1 ml de la culture a été additionné, dans l'ordre, de 0,5 ml d' α -naphthol (6%) et de 0,5 ml de KOH (4M). Après une légère agitation pendant 30 secondes à une minute, le tube est maintenu en position inclinée pendant 10 à 15 minutes. La présence de l'acétoïne (réaction positive) se traduit par l'apparition, dans 2 à 5 min, d'une coloration rouge en surface pouvant diffuser dans le milieu (Renaud, 2000).

3-2-2-2- Réaction au rouge de méthyle

Le rouge de méthyle révèle l'acidification qui résulte des fermentations acides mixtes. Le milieu Clark et Lubs a été ensemencé par la souche puis incubé à 50 °C pendant 4 jours. Par la suite, 2 ml de la culture ont été transvasés dans un tube à hémolyse stérile, suivi de deux gouttes de l'indicateur. Une teinte rouge franche indique une réaction positive, une teinte jaune, une réaction négative (Renaud, 2000).

3-2-3- Production d'indole

Elle a été mise en évidence dans 1 ml de milieu urée-indol et dans 5 ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les milieux ont étéensemencés abondamment par la souche et incubés à 50°C pendant 24 h.

Par la suite, cinq gouttes du réactif de Kovacs ont été ajoutées à la culture, suivi d'une agitation. Au repos, la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge à la surface des milieux (Renaud, 2000).

3-2-4- Utilisation du citrate

La gélose inclinée de Citrate de Simmens a étéensemencée abondamment par la souche, puis incubée à 50°C pendant 48 h. L'utilisation du citrate se traduit par un virage de la couleur du milieu en bleu (Renaud, 2000).

3-2-5- Production de H₂S

La souche a étéensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu KIA. Après 24 h d'incubation à 50°C, La production de sulfure d'hydrogène se traduit par la formation d'un précipité noir dans le culot (Renaud, 2000).

3-2-6- Fermentation du glucose

La souche a étéensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu KIA. Après 24 h d'incubation à 50°C, La fermentation du glucose se traduit par le virage de la couleur du milieu au jaune (Renaud, 2000).

3-2-7- Oxydation du galactose

La souche a étéensemencée abondamment à la surface du milieu KIA. Après 24 h d'incubation à 50°C, l'oxydation du galactose se traduit par le virage de la couleur de la surface du milieu au jaune (Renaud ,2000).

3-3- Tests biochimiques

3-3-1- Catalase

La souche a été dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (v/v), sur une lame d'observation macroscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène (Renaud, 2000).

3-3-2- Oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques «Ox» dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N- diméthyl -1,4-phénylène diamine-déchlorure. Une partie de la colonie a été prélevée à l'aide de l'effilure d'une pipette pasteur et dissociée sur le papier filtre imbibé d'eau distillée.

La présence d'une cytochrome -oxydase se traduit, en 30 à 60 secondes par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Prescott et *al.*, 2003).

3-3-3- Réduction des nitrates en nitrites

Le bouillon nitrate a étéensemencé par une demi öse de la culture solide. Après 24 h d'incubation à 50°C, 5 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 ont été ajoutées avec agitation. L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique une réduction des nitrates en nitrites. Dans le cas contraire, le test est complété par l'épreuve de Zobell. Dans cette dernière, une pincée de poudre de Zinc est ajoutée au milieu, suivie d'une agitation pendant 5 min. L'apparition d'une couleur rouge brin indique la présence des nitrates, et la souche est nitrate réductase négative (Renaud, 2000).

1- Isolement et sélection de souches cellulolytiques

Les sédiments des eaux chaudes de hammam El Hadjeb sont la source choisie pour l'isolement de microorganismes thermophiles producteur de cellulases. La température élevée de ces eaux (50°C) et la présence de la végétation sont des conditions qui favoriseraient la sélection de souches cellulolytiques.

Une autre étude a également utilisée les eaux chaudes d'un hammam pour l'isolement de souche cellulolytiques thermophiles. Il s'agit de l'eau et du sol d'une source chaude égyptienne, Hammam pharaon. (Abdelnasser et El-diwany, 2007).

1-1 Sélection sur milieu de culture solide

Après enrichissement des échantillons de sédiments des eaux thermales et ensemencement de différentes dilutions, plusieurs souches ont été isolées sur milieu à base de CMC. La dilution 10^{-2} à donner lieu à quelques colonies bien espacées les unes des autres et a été choisie donc pour sélectionner des souches cellulotiques thermophiles.

La sélection est basée sur la formation de zones claires autour des colonies suite à l'addition d'une solution de lugol suivie d'une solution de NaCl.

Cette méthode a permis l'isolement de 24 souches entourées de zones claires (figure 5). Ces zones traduisent le fait que ces bactéries on secrétées dans le milieu solide des cellulases (CMCases), qui ont dégradées la CMC.

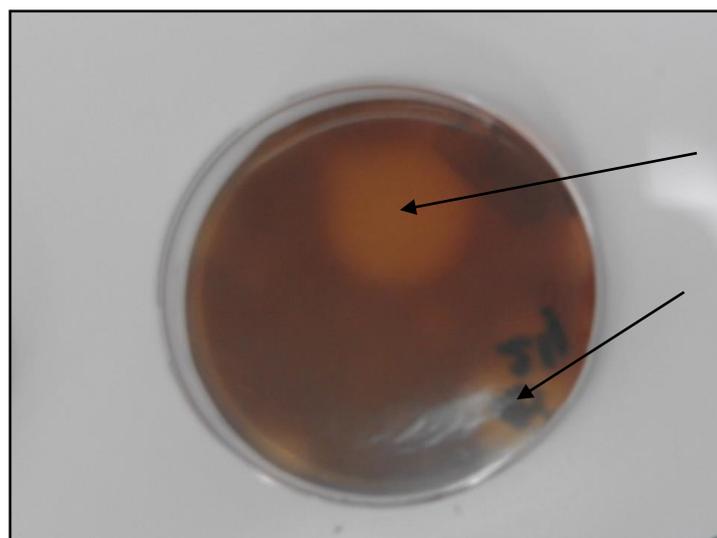


Figure.3.5. Formation de zones claires autour des souches isolées sur milieu solide.

Ce résultat indique l'efficacité de l'étape d'enrichissement pour isoler ce type de souche. En effet, pendant cette étape, la présence du CMC a favorisé le développement des souches productrices de CMCase, ce qui a augmenté leur nombre, et la disparition des autres souches incapable d'utiliser ce substrat.

1-2 Sélection sur milieu de culture liquide

Afin de sélectionner parmi ces 22 souches celles produisant une grande quantité de CMCase ou des CMCase très actives, les souches ont été cultivées sur un milieu liquide à base de CMC et incubées à 65°C, puis leur activité CMCase a été mesurée dans le surnageant à 70°C.

Les différentes souches ont donné lieu aux activités enzymatiques rapportées dans le (tableau 3)

Tableau.3.3. Les activités cellulase des souches sélectionnées à 70°C, à pH 7

Souche	pH	Activité (UI/ml)	Ecartype
As1	7	0.1	0.02
As2	7	0,09	0,015
As5	7	0.17	0,007
As6	7	0,09	0,005
As7	7	0,09	0,005
As8	7	0,06	0,023
As9	7	0,08	0,023
As10	7	0,09	0,007
As11	7	0,09	0,02
As12	7	0,09	0,005
As13	7	0,09	0,005
As14	7	0,09	0,011
As15	7	0,09	0,005
As16	7	0.09	0

As17	7	0,09	0,011
As18	7	0,11	0,020
As19	7	0,10	0,007
As20	7	0,11	0,02
As21	7	0,12	0,017
As22	7	0,10	0,015
As23	7	0,09	0,017
As24	7	0,13	0,0057

Les différentes souches ont des activités CMCases faibles, ce qui peut être expliqué par les hypothèses suivantes. Il est probable que ces cellulases ne sont pas spécifique pour un substrat synthétique tel que CMC. En effet la présence des groupements carboxyméthyl sur la cellulose empêcherait les endoglucanases de couper la chaîne de cellulose. Ainsi ces enzymes attaque uniquement les régions où il y a absence de ces groupements. Il est probable que ces souches préfèrent la cellulose naturelle caractérisée par l'absence de ramification et exclusivement formée de cellulose.

Il est possible également que les conditions de mesure d'activité ne soient pas celles favorables à l'activité des CMCases sécrétées. Il s'agit de la température, du pH, de l'aération des cultures (les activités sont mesurées sans agitation). Des études d'optimisation seront entreprises ultérieurement.

La souche a donné l'activité la plus élevée. Elle a fait l'objet d'une caractérisation physiologique et biochimique.

La courbe étalonnage réalisée avec du glucose

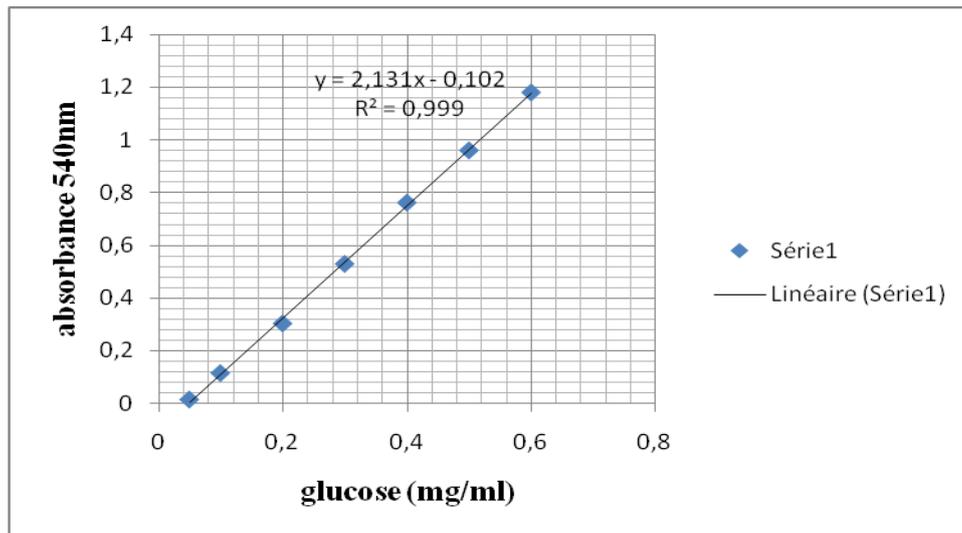


Figure.3.6. Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.

2 - Identification de souche

L'étude microscopique de la souche a révélé une forme bacille à Gram positif. Après examen microscopique de la souche à l'état frais elle s'est révélée immobile.

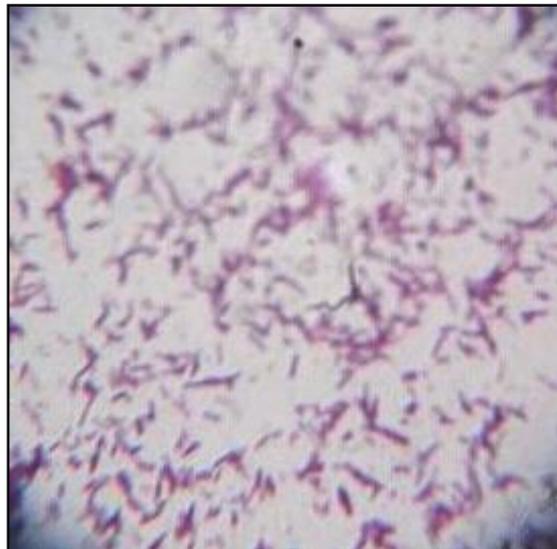


Figure.3.7. Observation microscopique de souche après coloration de Gram. (Observation par microscope optique G×100 a immersion)

Les spores on été observées après 48h d'incubation. Ils ont une localisation centrale et provoquent la déformation du corps de la souche.

Les bactéries sporulées les plus rencontrées dans les conserves appartiennent aux genres *Clostridium* et *Bacillus*

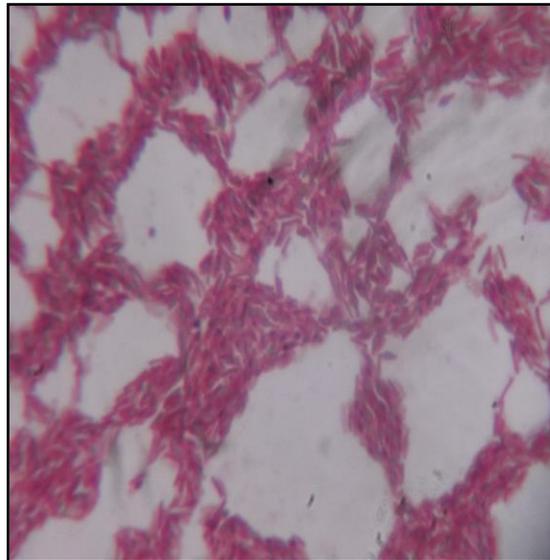


Figure.3.8. Formation de spore après coloration en 48h.

2- 1 Tests biochimiques

La formation immédiate de bulles d'oxygène indique la présence de la catalase

L'apparition d'une coloration violette sur le disque oxydase montre la présence de cette enzyme.



Figure.3.9. Test de catalase positive

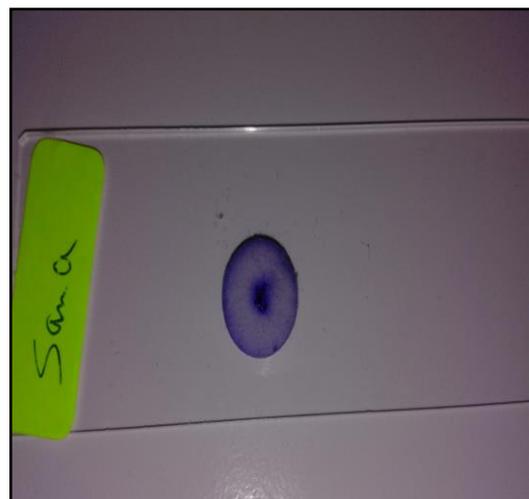


Figure .3.10. Test oxydase positive

L'ajout des réactif NR1 et NR2 à la culture ne donne aucune couleur. Ceci indique que la souche ne transforme pas les nitrates en nitrites. L'ajout de la poudre de Zinc a donné lieu à une couleur rouge, ce qui est révélateur de la présence des nitrates dans le milieu. Ainsi la bactérie n'utilise pas les nitrates et elle est nitrate-réductase négative.



Figure.3.11. Test nitrate de réductase négative

2-2 Tests physiologiques

2-2-1 Type respiratoire : L'observation du trouble dans le milieu de viande - levure au fond et en surface indique que le type respiratoire de cette bactérie est aéro-anérobie facultatif.



Figure.3.12. Test de viande - levure positive.

2-2-2 - Voies fermentaires

Absence de coloration rouge dans le milieu la bactérie ne fermente pas le glucose et dans le milieu rouge de méthyle absence virage de couleur en rouge indique absence fermentation des acides mixtes.



(A) Test Voges Proskauer est négative



(B) Test rouge méthyle négative

Figure.3.13. La réaction de Voges Proskauer et rouge de méthyle

2-2-3- Test de mannitol mobilité : Le virage de la couleur du milieu mannitol du rouge à l'orange, indique la fermentation du mannitol. En plus, la souche ne diffuse pas dans le milieu ce qui montre qu'elle est immobile.



Figure .3.14. Test de mannitol mobilité positive.

2-2-4- Production d'indole : Après addition du réactif de Kovacs au milieu indol, il y a formation d'un anneau rouge à la surface de milieu, ce qui indique la présence de l'indole.



Figure.3.15. Test urée indole positive

2-2-5- Utilisation du citrate : L'absence de virage de la couleur du milieu citrate de Simmens du vert au bleu, indique la souche n'utilise pas le citrate.

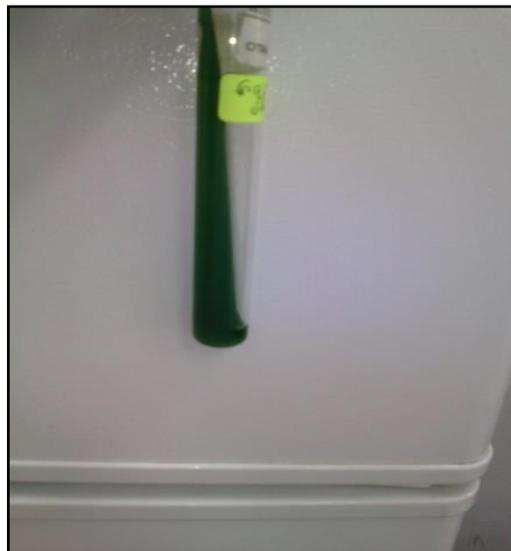


Figure.3.16. Test citrate de Simmens négative.

2-2-6- Test de KIA (Kligler) : L'absence de virage de la couleur du culot du milieu KIA au jaune, indique que la souche ne fermente pas le glucose, et de la pente au jaune, qu'elle n'oxyde pas le lactose, et l'absence d'un culot noir, qu'elle ne produit pas de H₂S.



Figure.3.17. Test de kligler négative.

Les résultats des différents tests d'identification sont rapportés dans le (tableau 4)

Tableau.3.4. Propriété morphologique, et biochimique de la souche **As5** et du genre *Geobacillus* (Nasina et *al.*, 2001).

Test	Souche As5	<i>Geobacillus</i>
Morphologie	Bacille	Bacille
Coloration de Gram	+	+
Mobilité	Immobile	Immobile ou mobile
Spore	Formation spore	Formation spore (endospore)
Type respiratoire	Aerobie- anaérobie facultatif	Aerobie- anaérobie facultatif

Réaction de V-P.	-	-
Réaction au rouge de méthyle	-	-
Production de H ₂ S	-	-
Urée indole	+	-
Catalase	+	+
Oxydase	+	+/-
Nitrate réductase	-	+
Citrate Simmens	-	+
Mannitol	+	+

La souche montre plusieurs caractéristiques du genre *Geobacillus*. La température optimale pour la croissance est 55 à 65 avec un optimum à pH de 6,2 à 7,5.

Les espèces *Geobacillus spp.* Sont d'un intérêt pour la biotechnologie comme source d'enzyme thermostables hydrolyser la cellulose représentent une classe, b glucosidase, et la digestion de la matière lignocellulose, pour producteurs de biocarburant (Studholme, 2015).

Le genre *Geobacillus* comprend des thermophiles à Gram positif en formant des spores au sein de la famille Bacillaceae. Ces thermophiles semblent être omniprésents. Ils peuvent être isolés en grandes quantités non seulement des environnements chauds tels que les sources hydrothermales, mais aussi, paradoxalement de sols frais et océan froid sédiments (Studholme, 2015).

Les souches de *Geobacillus* sont précédemment décrits comme appartenant à une espèce *Bacillus stearotherophilus* (Nasina et al., 2001).

Les résultats indiquent que les sédiments de Hammam El Hadjeb sont une source riche de nombreuses bactéries thermophiles qui pourrait être une bonne source d'enzymes thermophile intéressantes pour l'industrie.

Les sédiments de Hammam El Hadjeb ont été une source d'isolement de souches *Geobacillus* productrices d'enzymes cellulolytiques thermophiles.

Conclusion générale

L'objectif de notre travail consiste en l'isolement des souches cellulolytiques thermophiles provenant des sédiments de Hammam El Hadjeb, une source thermale, et la sélection d'une souche thermophile ayant un potentiel de production d'enzyme thermostable.

24 souches cellulolytiques thermophiles ont été sélectionnées sur la base de la formation de zones claires autour des colonies.

Les souches sont cultivées sur un milieu liquide à base de CMC et incubées à 65°C, puis leur activité CMCcase est mesurée dans le surnageant. L'activité la plus élevée est montrée par la souche As5.

L'identification phénotypique de la souche As5 montre qu'elle a plusieurs caractéristiques du genre *Geobacillus* et plus particulièrement de l'espèce *Geobacillus stearothermophilus*.

Les enzymes thermophiles résistantes aux températures élevées sont d'un grand intérêt pour les applications industrielles.

L'isolement et la sélection de souches productrices de cellulases hautement actives dans les conditions de haute température des industries, sont des étapes qui peuvent constituer un point de départ pour d'autres recherches.

Perspective

- Identification moléculaire de la souche sélectionnée.
- Optimiser les conditions de la culture de la bactérie sélectionnée.
- La purification de ses cellulases
- La détermination des propriétés physicochimiques de ses cellulases, à savoir son activité et sa stabilité à différents pH, aux différentes températures et aux ions, le poids moléculaire et l'activité vis-à-vis de la cellulose.

Référence bibliographique

- Abdelnasser S. S. I., El-diwany B. 2007. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1(4) : 473-478.
- Acharya S., Chaudhary A. 2011. Effect of nutritional and environmental factors on cellulases activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. *Journal of Scientific & Industrial Research* 70 :142-148.
- Acharya S., Chaudhary A. 2012. Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurinibacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring India. *African Journal of Microbiology Research* 6 (26) : 5453-5458.
- Acharya S., Chaudhary A. 2012. Bioprospection thermophiles pour la production de cellulases: une revue. *Braz J Microbiol* 43 (3) : 844-856.
- Annamalai N., Rajeswari M. V., Elayaraja S., Balasubramanian T. 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes, *Carbohydrate Polymers* 94: 409- 415.
- Bailey M. J., Biely P., Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Biotechnol* 23 : 257-270.
- Basavaraj I., Patagundi, C. T. S., Hivasharan Kaliwal. B. B. 2014. Isolation and Characterization of Cellulase producing bacteria from Soil. *Int. J. Curr .Microbiol .App .Sci* 3(5) : 59-69.
- Bhat M. K., Bhat S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnologie advances* 15(3/4): 583-620.
- Breen A., Singleton F. L. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr. Opin. Biotechnol* 10: 252- 258.
- Bronnenmeier K., Keren A., Liebl W., Staudenbauer A. L. 1995. Purification of thermogota *maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Applied and environmental microbiology* 61(4):1399-1407.

Brown R. M., Saxena L. M., Kudlicka S. M. 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci* 1:149-156.

Brock T. D. 1985. Life at high temperatures. *Science* 230 :132-138.

Colberg P. J. 1988. Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. In: Zehnder AJB(Ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms* John Wiley & Sons, New York USA. pp 333–372.

Czerkowski J. W. 1986. *An Introduction to Rumen Studies*. Pergamon Press, Oxford, UK pp. 9-10.

Dashtban M., Maki M., Leung k. T., Mao C., Qin W. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical reviews in biotechnology* :1-8.

Delmer D. P. 1999. Cellulose biosynthesis exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 50 : 245-276.

Doi R. 2008. Cellulases of mesophilic microorganisms: cellulosome & non-cellulosome producers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 79-267.

Dreher M. L., Padmanaban G. 1983. Sunflower hull flour as a potential dietary fiber supplement. *Journal of Food Science* 48(5) :1463-1465.

Gandini A., Pasquini D. 2012. The impact of cellulose fibre surface modification on some physicochemical properties of the ensuing papers. *Industrial Crops and Products* 35 : 15-21.

Hakulinen N., Turunen O., Janis J., Leisola M., Rouvinen J. 2003. Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability. *Eur J Biochem* 270: 1399-1412.

Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (2) : 309 - 316.

Howard R. L., Abotsi E., Rensburg J. V. E. L., Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2(12) : 602-619.

Kaniz F., Manchur M. A. 2015. Isolation, identification et Cellulase production par *Bacillus Brevis* du sol Acacia Forêt. *Journal international de recherche en agriculture et des forêts* 2(9) : 14-22.

Kazumichi H., Kohsuke U., Masami K., Grant D. W., S. I., Ito S., Kobayashi T., Horikoshi k. 2006. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie van Leeuwenhoek* 89 : 211-219.

Khalil A. 2011. Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulose and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* 10(44): 8834-8839.

Khelil O., Cheba B. 2014 . Thermophilic Cellulolytic Microorganisms from Western Algerian Sources Promising Isolates for Cellulosic biomass. *Procedia Technologie* 12:519-528.

Kristjansson J. K., Hreggvidsson G. O. 1995. Ecology and habitats of extremophiles. *World J Microbiol Biotechnol* 11:17-25.

Kuhad R. C., Gupta R., Singh A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. SAGE-Hindawi access to research.10.

Kumar P. R., Eswaramoorthy S., Vithayathil P. J., Viswamitra M. A. 2000. The tertiary structure at 1.59 Å resolution and the proposed amino acid sequence of a family-11 xylanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier. *J Mol Biol* 295: 58-593.

Laurent P., Rioz J., Luc Wertz J., Richel A., Paquot M. 2011. Le bioraffinage une alternative prometteuse à la pétrochimie. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 15 (4) : 597-610.

Maki M., Leung k .T., Qin W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sc* 5(5) : 500-516.

Makky E. A. 2009. Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 57:487-491.

Menendez E., Fraile P. G., Rivas R. 2015. Biotechnological application of bacterial cellulases 2:163-183.

Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem 31 : 426 -428.

Mohagheghi A., Grohmann K., Himmel M., Leighton L., Updegraff D. M. 1986. Isolation and characterization of *Acidothermus Cellolyticus* gem nov.,sp.nov.,a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. International journal of systematic bacteriology 36(3): 435-443.

Mussatto S. I., Teixeira J. A. 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. Vilas (ed). Portugal.pp.897-907.

Nazina T. N., Tourova T. P., Poltarau A. B., Novikova E.V., Grigoryan A. A., Ivanova A. E., Lysenko A. M., Petrunyaka V.V., Osipov G. A., Belyaev S. S and Ivanov M. V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus* *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G.* Int J Syst Evol Microbiol 51(2) : 433-446.

Nemeth A., Kamondi S., Szilagyi A., Magyar C., Kovari Z., Zavodszky P. 2002. Increasing the thermal stability of cellulase C using rules learned from thermophilic proteins: a pilot study. Biophysical Chemistry 96 :229-241.

O'Donohue M. J. 2013. La biomasse, simple source d'énergie ou source de matières premières renouvelables. Innovations Agronomiques 26 :41-50.

Padilha I. Q. M., Carvalho L. C. T., Dias P.V. S., Grisi T. C. S., Honorato D. S. F .L, Santos S. F. M., Araújo D. A. M. 2015. Production and Characterization of Synthesized By *Bacillus* sp. Growing on Sugarcane Bagasse In Submerged Fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering 32 :35-42.

Pere J., Siika-aho M., Buchert J., Viikari L. 1995. Effects of purified *T. reesei* cellulases on the fiber properties of kraft pulp," Tappi Journal 78 (6) : 71-78.

Perez J., Dorado M. J., Rubia T., Martinez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview .Int Microbiol 5 : 53-63.

Prescott L. M, Harley J. P., Kelelin D. A., 2003. Microbiologie. Bibliothèque nationale, 2ème édition, p.30, Paris.

Renaud F. N. R. 2000. Précis de bactériologie clinique. ESKA.

Sadhu S., Maiti M. T. 2013. Cellulase Production by Bacteria: A Review. British Microbiology Research Journal 3(3) : 235-258.

Scott G. M., Akhtar M., Lentz M. J., Kirk T. K., Swaney R. 1998. New technology for papermaking: commercializing biopulping. Tappi J 81 : 220-225.

Stetter K. O. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. FEMS Microbiol Rev 18 149-158.

Stuart M., Linton., Peter G. 2004. Presence and properties of cellulase and hemicellulase enzymes of the gecarcinid land crabs *Gecarcoidea natalis* and *Discoplax hirtipes*. The Journal of Experimental Biology 207: 4095-4104.

Studholme D. J. 2015. Some (bacilli) like it hot genomics of *Geobacillus* species. Microbial Biotechnology 8(1) : 40-48.

Sukumaran R. K., Singhania R.R., Pandey A. 2005. Microbial cellulases/Production, applications and challenges. African Journal of Biotechnology 2(12): 602-619.

Trivedi N., Gupta V., Kumar M., Kumari P., Reddy C. R. K., Jha B. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. Carbohydrate Polymers 83: 891-897.

Turunen O., Etuaho K., Fenel F., Vehmaanpera J., Wu X., Rouvinen J., Leisola M . 2001. A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the alpha-helix region of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase II increases the thermal stability through synergism. J Biotechnol 88: 37-46.

Turunen O., Vuorio M., Fenel F., Leisola M. 2002. Engineering of multiple arginines into the Ser/Thr surface of *Trichoderma reesei* endo-1, 4-beta-xylanase II increases the thermotolerance and shifts the pH optimum towards alkaline pH. Protein Eng 15:141-145.

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

Wahlström R. 2014. Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous ionic liquids. VTT Science pp.52-102 .

Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y. 2011. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10, *Extremophiles* 16: 35-43.

Préparation de tampon**Préparation solution (Acide)**

Eau distillé	100 ml
Na H ₂ PO ₄ (0.2M)	2,76 g

Préparation Solution (Basique)

Eau distillé	100 ml
Na ₂ HPO ₄ (0,2 M)	3,56 g

Préparation de tampon (Acide-base)

Solution acide	39ml
Solution basique	61ml

Dilution de tampon

Tampon (Acide-base)	50 ml
Eau distillé	150ml

Le tampon est ajusté à pH 7. Ce dernier est stérilisé à l'autoclave

Préparation DNS

Eau distillé	1000 ml
DNS	10g
NaOH	16g
KNa tartrate	300g

Tableau.1. Les activités cellulase des souches sélectionnées à 70°C, à pH 7.

Souche	Absorbance1	Absorbance2	Absorbance3	Moyenne	Ecartype
As1	0,002	0,046	0,021	0.023	0,02206808
As2	0,027	0,003	0,011	0.013	0,0122202
As5	0,118	0,102	0 ,130	0.116	0.01131171
As6	0,011	0,025	0,024	0.02	0,00781025
As7	0,019	0,022	0,011	0.017	0,00568624
As8	0,004	0,007	0,004	0.005	0,00173205
As9	0,006	0,004	0,002	0.004	0,002
As10	0 ,017	0,013	0,015	0.015	0,00141421
As11	0,003	0,020	0,001	0.008	0,01044031
As12	0,043	0,045	0,006	0.031	0,02196209
As13	0,014	0,015	0,009	0.012	0,00321455
As14	0,028	0,013	0,012	0.017	0,00896289
As15	0,006	0,008	0,016	0.01	0,0052915
As16	0,002	0,012	0,011	0.008	0,00550757
As17	0,013	0,032	0,012	0.019	0,01126943
As18	0,028	0,024	0,061	0.037	0,02030599
As19	0,028	0,017	/	0,022	0,00777817
As20	0,022	0,028	0,043	0,031	0,01081665
As21	0,054	0,023	0,048	0,041	0,01644182
As22	0,002	0,047	0,021	0,023	0,02259056
As23	0,001	0,025	0,001	0,009	0,01385641
As24	0,066	0,048	0,051	0.055	0,00964365

Tableau.2. Les activités cellulase en UI/ml des souches sélectionnées à 70°C, à pH 7.

Souche	Absorbance1	Absorbance2	Absorbance3	Moyenne	Ecartype
As1	0,08	0,12	0,1	0. 1	0.02
As2	0,11	0,08	0,09	0, 09	0,015
As5	0,18	0,17	0 ,19	0.17	0,007
As6	0,09	0,1	0,1	0,09	0,005
As7	0,09	0,1	0,09	0,09	0,005
As8	0,08	0,04	0,08	0,06	0,023
As9	0,08	0,08	0,08	0,08	0,023
As10	0 ,09	0,09	0,1	0,09	0,007
As11	0,09	0,1	0,08	0,09	0,02
As12	0,1	0,1	0,09	0,09	0,005
As13	0,1	0,1	0,09	0,09	0,005
As14	0,11	0,09	0,09	0,09	0,011
As15	0,09	0,09	0,10	0,09	0,005
As16	0,09	0,09	0,09	0.09	0
As17	0,09	0,11	0,09	0,09	0,011
As18	0,11	0,10	0,14	0,11	0,020
As19	0,11	0,10	/	0,10	0,007
As20	0,10	0,11	0,12	0.11	0,02
As21	0,13	0,10	0,13	0,12	0,017
As22	0,09	0,12	0,10	0,10	0,015
As23	0,08	0,11	0,08	0,09	0,017
As24	0,14	0,13	0,13	0,13	0,0057

Le courbe étalonnage

Prépare de solution mère 1g de glucose dans un 100 ml l'eau distillé

apre réalise dilution a différent concentration qui ajoute DNS 1,5 ml

lecture spectrophotomètre .

Tableau.3. La gamme de courbe étalonnage.

Concentration	Absorbance
0,05	0,015
0,1	0,115
0,2	0,3035
0,3	0,5295
0,4	0,762
0,5	0,96
0,6	1,18

ملخص

لقد تم عزل 22 سلالة للسليلاز على وسط غذائي صلب CMC من عينة حمام الحاجب. والتي تمت على اساس تقدير النشاطية الانزيمية في وسط سائل. تم انتخاب سلالة ذات نشاطية إنزيمية سليلاز عالية (0,17 UI/ml) سلالة As5 ذات درجة مئوية 50 وكمون هيدروجين يساوي 7 وتنتمي إلى الجنس *Bacillus* والنوع *Bacillus stearothermophilus*. سلالة تنتج سليلاز ذات نشاطية إنزيمية قصوى في 50 او 60 درجة مئوية. لها أهمية في صناعة الورق أو تخليق البيوايثانول.

الكلمات المفتاحية : سلالة سليلاز , CMC , CMCases , *Bacillus* , *Bacillus stearothermophilus* , cellulases.

Résumé

22 souches cellulolytique thermophiles sont isolées sur milieu solide à base de CMC à partir de Hammam El Hadjeb. La mesure de l'activité CMCases dans les surnageants des cultures liquides des ses souche à permis de sélectionner la souche As5 qui a montré la meilleur activité cellulase (0,17 UI/ml) à 50° C et pH7. Cette souche appartiendrait au genre *Bacillus* et peut être à l'espèce *Geobacillus stearothermophilus*. Les cellulases produites par cette bactérie a été active à des températures de 50°C et 60°C, elles pourraient ainsi être intéressantes pour une application dans l'industrie de bioéthanol et de papier.

Mots clé : souche cellulolytique, CMC, CMCCase, *bacillus*, *Geobacillus stearothermophilus*, cellulase.

Abstract

22 thermophilic cellulolytic strains were isolated on solid media based CMC from Hammam El Hadjeb. The measure of activity in supernatants CMCCase liquid cultures of its strain used to select the As5 strain which showed the best cellulase activity (IU /ml) at 50°C and pH 7. This strain belongs to the genus *Bacillus* and may be the species *Bacillus stearothermophilus*.. Cellulases produced by this bacteria was active at temperatures of 50°C and 60°C, which could thus be interesting for application in the bioethanol industry and paper.

Key words: strains cellulolytic, CMC, CMCCase, *Bacillus*, *Bacillus stearothermophilus*. Cellulases.