



Université Université Mohamed Khider de 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
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2018

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
BELAROUCI Amatallah
NACER Ahlam

Le : dimanche 18 juin 2023

**Isolement et sélection de souches bactériennes thermophiles productrices de
glycoside hydrolases à partir de Hammam Elhajeb (Biskra)**

Jury :

Pr.	BELOUCIF Nacer	MCA	Biskra	Président
Dr.	HEBAL HAKIM	Pr	Biskra	Rapporteur
Mlle.	BENERAICHI FATIHA	MAA	Biskra	Examineur

Année universitaire : 2022-2023

Dédicace

Dédié à ma très chère mère, Daouia Nehdi, qui incarne l'espoir et qui n'a jamais cessé de prier pour moi. À mon très cher père, Mouhamed, pour ses encouragements, son soutien inconditionnel, et son amour sans limites qui a permis le bon déroulement de mes études. À mes frères Noufel, Sami, Abd Samed et Assoumi, qui sont une source constante de soutien et d'inspiration. À ma sœur Hadil et sa fille, pour leur présence chaleureuse et leur amour inconditionnel. À mes sœurs Hiba et Hihab, qui ont toujours été là pour moi avec leur amour et leur soutien. À mes meilleurs amis Manel Rabie , Nessrin Attia , Rania et Meriem, Nouha qui ont partagé des moments inoubliables avec moi et ont été des piliers dans ma vie. À , pour sa contribution et son aide précieuse tout au long de ce travail. Et à tous ceux qui m'ont aidé et soutenu, je vous suis reconnaissant du fond du cœur."

RAHMA

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail.

A ma très chère mère LAATRA , qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

A mon très cher père IBRAHIM , pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entraine le déroulement de mes études

À mon cher mari Salah qui m'a soutenu et m'a poussé à continuer et à inculquer patience et courage.

A ma fille Fatima Mon bonheur dans cette vie et ma dose d'espoir

A mes frères Farouk, Samir et leurs fils Adem et Iyad et Hatem

A ma sœur Salsabil

A mes meilleurs amis Salma, Maroua

Et tout ceux qui m'aident et complètent ce modeste travail

Ahlem

Remerciements

Au moment de conclure ce parcours académique, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Nous sommes conscients que cette réussite n'aurait pas été possible sans leur soutien inestimable.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements, au professeur

"HABEL Hakim"

Nous remercions nos proches, nos amis et nos familles de leur soutien indéfectible tout au long de ce processus. Leur encouragement, leur compréhension et leur patience étaient nécessaires pour surmonter les moments de suspicion et de tension. Leur présence a été une force motrice qui nous a poussés à donner le meilleur de nous-mêmes.

Enfin, nous souhaitons exprimer notre reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué indirectement à notre travail, que ce soit par leurs conseils, leurs lectures ou leurs discussions. Votre apport a enrichi nos réflexions et a contribué à la qualité de notre mémoire.

Avec nos plus sincères remerciements,

Liste de Figures

Figure 1:Structure de la paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique (Jensen et al., 2017)	13
Figure 2: Structure chimique de la cellulose (Kulkarni et al, 2012)	14
Figure 3 : Structure chimique de l'hémicellulose (Kulkarni et al., 2012).	15
Figure 4 : Structure chimique de la lignine (Lapierre, 2010).	15
Figure 5 :cycle de Enzyme lignocellulosique	16
Figure 6 : La pectine (Tilly 2010)	17
Figure 7 : la structure chimique de l'amidon.....	19
Figure 8 :Présentation de site d'échantillonnage	23
Figure 9: Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.....	29
Figure 10: Observation microscopique des cellules après coloration de Gram a immersion).....	30
Figure 11: test de catalase(+).	31
Figure 12: test de KIA(-).....	31

Liste des Tableau

Tableau 1: Activité cellulase à UI/ml à 70°C, à pH 728

Tableau 2: propriétés morphologiques et biochimiques de la souche.....32

Listes des abréviations

HG: homogalacturonan I

RG II: Rhamnogalacturonan II

XGA:Le xylogalacturonan

DNS :acide dinitrosalicylique

Tableau de matieres

Listes des Figures	
Listes des abréviations	
Listes des tableaux	
Introduction.....	1

Partie I Synthèse Bibliographique

1. La matière lignocellulosique.....	13
1.1 Définition de la matière lignocellulosique.....	13
1.2. La Cellulose	13
1.3. Hémicellulose.....	14
1.4. La Lignine.....	15
1.5. Enzyme lignocellulosique	16
2. La pectine	17
3. Amidon.....	18
4. Micro-organismes thermophiles	20
5. Sources des microorganismes glycolytiques thermophiles.....	20
6. Applications industrielles des enzymes glycolitiques thermophiles.....	20

partie I: Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude et échantillonnage	23
2. Isolement et sélection de souches cellulolytiques et pectinolytique et amylolytique	24
2.1 Enrichissement	24
2.2 Préparation de série des dilutions	24

2.3 isolement sur milieu de culture solide.....	24
2.4 purification des souches.....	24
2.5 sélection sur milieu de culture liquide.....	24
2.6 Détermination de l'activité enzymatique.....	24
3. Identification de la souche	26
3.1 Observation microscopique.....	26
3.1.1. Coloration de Gram.....	26
3.1.2 Mobilité.....	26
3.2 Tests biochimiques.....	26
3.2.1 Catalase.....	26
3.2.2 Production de H₂S.....	26

partieII:Résultats et discussion

1. Isolement des souches cellulolytiques thermophiles	28
2. Sélection des souches.....	28
2.1. Sélection sur milieu de culture solide.....	28
3. Identification des souches	30
3.1. Aspect microscopique.....	30
3.2. Tests biochimique.....	30
3.2.1. Test de catalase.....	30
3.2.2 test de KIA (kligler).....	31
Conclusion.....	33
Références.....	35
Bibliographiques.....	35
Annexe.....	38

Introduction

Introduction.

Hamam Elhajeb, une partie de la région de Biskra, est réputée pour son climat chaud et ses sources chaudes. Ces caractéristiques naturelles créent un environnement propice à la présence de souches bactériennes thermophiles adaptées aux températures élevées.

L'exploration de cette région offre donc une opportunité passionnante de découvrir de nouvelles souches bactériennes aux propriétés enzymatiques intéressantes.

Ce mémoire se concentre sur la production de trois types d'enzymes : les pectinolytiques et les cellulolytiques amyliolitique. Les enzymes pectinolytiques ont la capacité de dégrader la pectine, une substance présente dans les parois cellulaires des plantes, tandis que les enzymes cellulolytiques sont capables de décomposer la cellulose, un polymère complexe présent dans la biomasse végétale.

Ces enzymes ont de vastes applications industrielles, notamment dans les domaines de l'agroalimentaire, de la production de biocarburants et de la bioconversion des déchets agricoles. En isolant et en sélectionnant une souche bactérienne thermophile capable de produire efficacement ces enzymes, notre recherche contribuera à l'exploitation durable des ressources naturelles de la région de Hamam Elhajeb.

Ce travail de recherche comprendra vraisemblablement des méthodes d'isolement des souches bactériennes thermophiles à partir d'échantillons environnementaux, des techniques de culture et de sélection des souches les plus prometteuses, ainsi que des méthodes d'analyse de la production enzymatique.

En conclusion, notre mémoire se concentre sur l'isolement et la sélection d'une souche bactérienne thermophile dans la région de Hamam Elhajeb, à Biskra, pour la production de glycoside hydrolases thermophiles. Ce travail de recherche vise à exploiter les ressources naturelles de la région et à contribuer au développement de nouvelles applications biotechnologiques bénéfiques pour divers secteurs industriels.

Partie I

Synthèse Bibliographique

1. La matière lignocellulosique :

1.1 Définition de la matière lignocellulosique

La matière lignocellulosique est un constituant majeur de la paroi cellulaire des plantes. Elle se compose principalement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. La cellulose est un polymère de glucose qui confère résistance et structure aux parois cellulaires, tandis que l'hémicellulose est un mélange complexe de polysaccharides qui contribue à la flexibilité et à l'interaction avec d'autres composants de la paroi cellulaire. La lignine, quant à elle, est un polymère complexe qui fournit une résistance mécanique et une imperméabilité aux tissus végétaux. (O'donohue et Debeire, 2006). Elle représente une grande source pour la production biocarburants la cellulose, l'hémicellulose et la lignine et d'autres composants comme la pectine, les protéines, les extractives et des composés minéraux qui sont également présentent avec des quantités faibles. La cellulose et l'hémicellulose représentent 70 à 80 % du poids sec, alors que la lignine représente environ 10 à 25 % (Devi et *al.*, 2022).

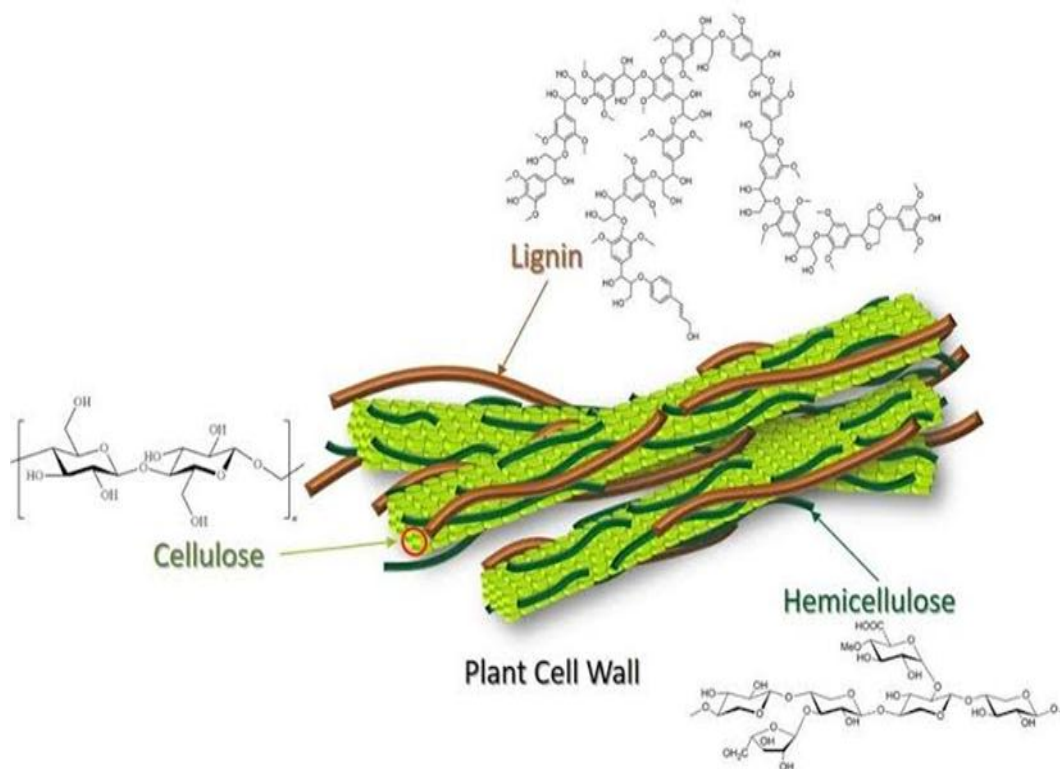


Figure 1: Structure de la paroi cellulaire de la biomasse lignocellulosique (Jensen et al., 2017)

1.2. La Cellulose :

La cellulose est le principal composant de la biomasse lignocellulosique. Cela représente Environ 30 à 50 % de la matière sèche totale de lignocellulose. Est un composant composés

linéaires de monomères glucose- β -D-glucopyranose à longue chaîne liés par liaison β -(1,4)-glycosidique, l'unité répétitive de la cellulose est le cellobiose. Les disaccharides sont composés de deux molécules de glucose (Devi et al., 2022). La cellulose se produit naturellement en association avec d'autres plantes et cette association peut affecter la biodégradation de la cellulose (Pérez,2002).

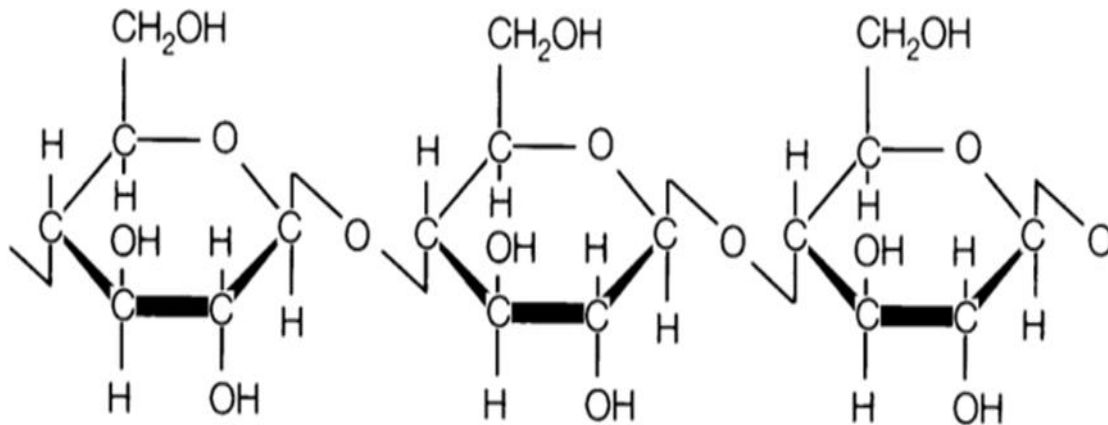


Figure 2: Structure chimique de la cellulose (Kulkarni et al, 2012)

1.3.Hémicellulose

L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide ramifié et mal polymérisé. Diverses unités monosaccharidiques telles que le glucose, le mannose, le galactose, l'arabinose et xylose

(Figure 3). Il a des branches courtes (environ 50-200) de forme irrégulière, ce qui le rend spécial. Il devient partiellement soluble dans l'eau (Demirbas ; 2008). L'hémicellulose peut se lier à la cellulose par de multiples liaisons hydrogène et à la lignine par des liaisons hydrogène covalente. Étant donné que ces polymères ne sont pas cristallins, ils sont plus sensibles à l'hydrolyse que leurs homologues cristallins. Cellulose. L'hémicellulose a une structure ramifiée en forme de tige. Les chaînes latérales sont repliées sur la chaîne principale par liaison hydrogène.

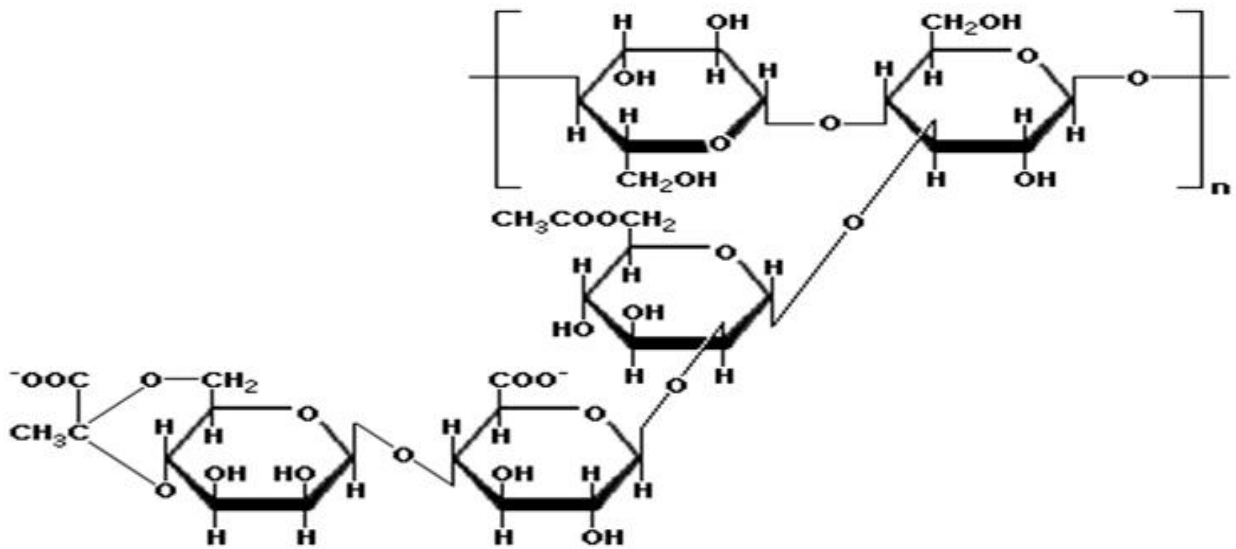


Figure 3 : Structure chimique de l'hémicellulose (Kulkarni et al., 2012).

1.4. La Lignine:

C'est un polymère aromatique phénolique tridimensionnel composé d'unités phénylpropanoïdes. Il représente environ 15 à 20 ingrédients et est présent dans la paroi cellulaire. Il est secondaire et agit comme un adhésif cellulaire. Les polymères de lignine sont composés de : Trois sous-unités phénylpropanoïdes monomères : gaiacyle (G), syringyle (S) et féhydroxyphényle (H) (Figure 4) (Devi et al., 2021).

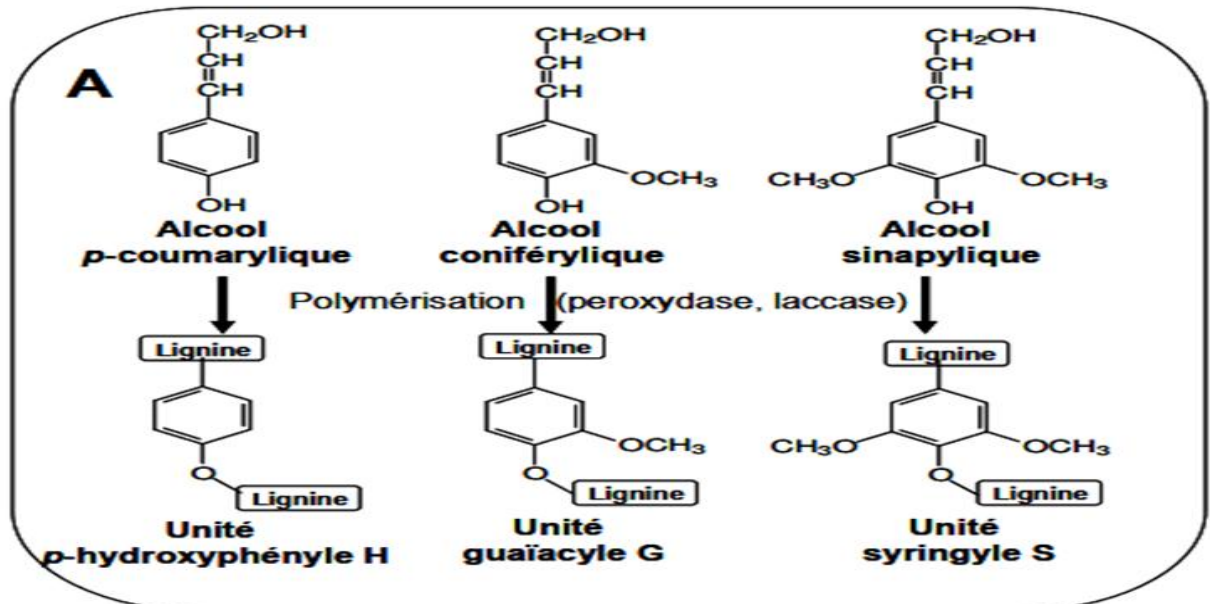


Figure 4 : Structure chimique de la lignine (Lapierre, 2010).

1.5.Enzyme lignocellulosique :

L'hydrolyse des substrats lignocellulosiques nécessite principalement plusieurs enzymes Diverses particularités pour déconstruire des structures complexes (Boyce et Walsh, 2015),. La résistance à l'hydrolyse enzymatique peut être attribuée à des facteurs morphologiques physico-chimiques tels que la teneur en lignine, la cristallinité, le degré de polymérisation, l'enrobage d'hémicellulose, l'accessibilité des microfibrilles internes, la porosité du substrat, la teneur en eau et la taille des particules sont également prises en compte (Obeng et al., 2017)

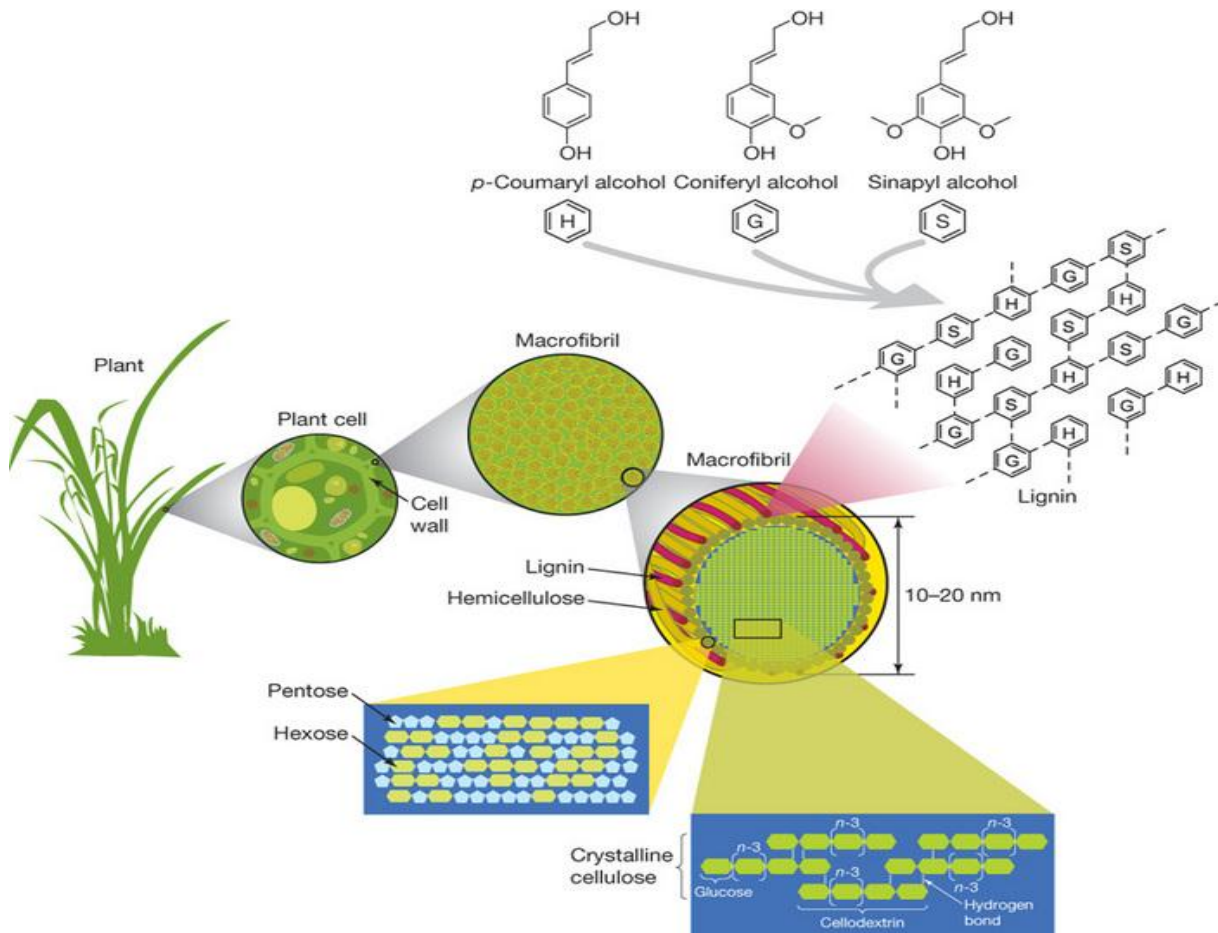


Figure 5 : La matière lignocellulosique

2.La pectine :

La pectine (Figure 5) a été le premier polysaccharide découvert. Formulé dans du jus de pomme par Vauquelin en 1790 (Chan 2017). Son nom vient du grec "Pektikos" signifie "geler" ou "geler". Dans le monde végétal, la pectine est biopolymères essentiels. Présent dans toutes les plantes, localisé au niveau des murs cellulaires, ces dernières apportent cohésion et rigidité et agissent comme du ciment. Intercellulaire.

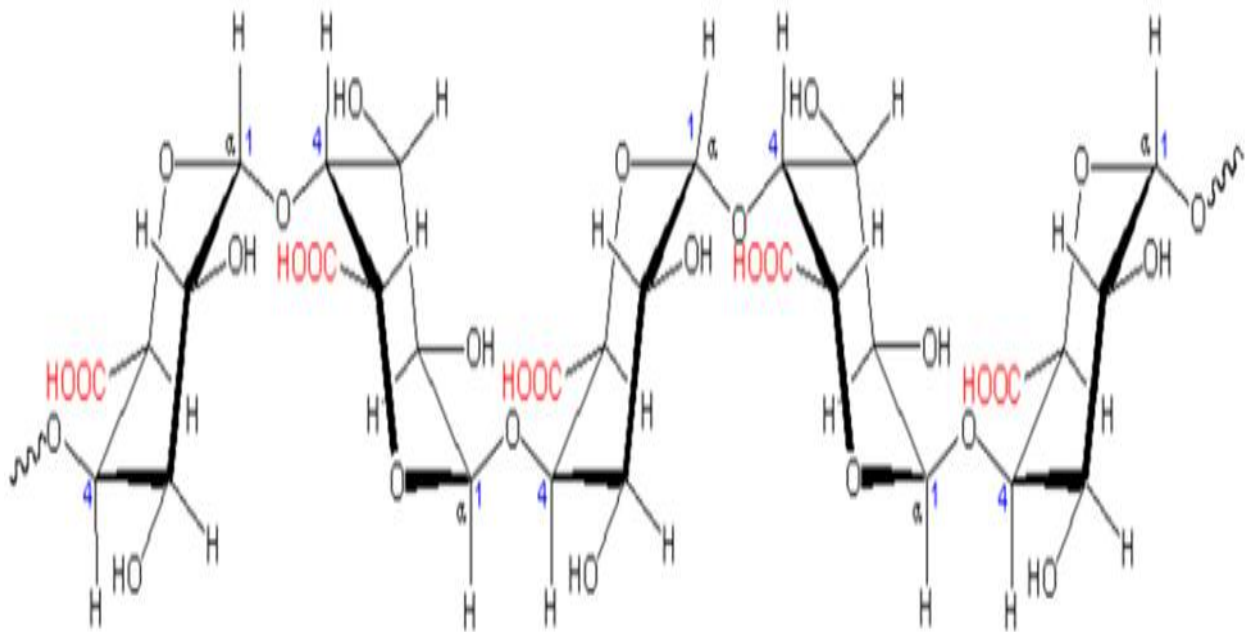


Figure 6 :structure de La pectine (Tilly 2010)

2.1 structure de la pectine :

Les pectines sont une classe complexe de polysaccharides présents dans la composition. paroi cellulaire végétale. Le squelette de la pectine est principalement composé d'unités il est constitué d'acide D-galacturonique lié par des liaisons glycosidiques est faible vis-à-vis de α -(1 \rightarrow 4). Quantité d' α -L-rhamnose plus ou moins ramifiée (Fishman et Jen, 1986). La microstructure de la pectine varie selon le type et le stade développement, localisation pariétale ou tissulaire et méthode d'extraction (Ridley et al., 2001 ; Thakur et al., 1997). L'homogalacturonan I (HG) se trouve normalement dans la paroi végétale dans les tissus indifférenciés. Plus communément, il représente 65% de pectine, le rhamnogalacturonan I (RG I). Se situe entre 30 % et 35 % (Mohnen., 2008). rhamnogalacturonan II (RG II) et le xylogalacturonan (XGA) est un composé minoritaire, représentant moins de 10 % Pectine (O'Neill et al., 2004; Zandleven et al., 2007; Mohnen, 2008).

2.2 Enzymes pectinolytiques :

Le groupe d'enzymes hétérogènes appelées pectinases ou pectinolytiques hydrolysent les composés contenant de la pectine (Lamrini, 2012). Diverses espèces de dactinomycètes , notamment *Micromonospora*, *Microbispora*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium* et *Streptomyces*, produisent des pectinases. Les substances pectiques sont de grosses macromolécules chargées négativement qui sont largement distribués dans le règne végétal ou qui se combinent avec la cellulose et l'hémicellulose pour former l'un des principaux constituants de la paroi des cellules végétales (Haberra, 2014). Ils contiennent des acides galacturoniques qui sont polymérisés et ont un poids moléculaire élevé. Par définition, les pectinases sont une classe d'enzymes qui décomposent les liaisons glycosidiques qui retiennent les résidus galacturoniques dans les matériaux pectiques (polygalacturonases, , pectine lyases, et pectate lyases) (Kheder, 2007).

3.Amidon

3.1. Définition de L'amidon :

L'amidon est le polysaccharide de stockage le plus abondant dans les plantes. Aujourd'hui Les principales sources de production d'amidon sont les tubercules, les racines et les graines de, tapioca, pommes de terre, blé, riz. Amidon facile à extraire on obtient une poudre très pure, blanche, insipide et inodore [1]. Il existe contenus dans divers produits agricoles tels que les céréales (30-70%), légumineuses (25-50%), tubercules (60-90%) et quelques fruits [2]. Eux ses excellentes propriétés sensorielles en font une ressource intéressante pour les applications ainsi que l'alimentation humaine et la nutrition animale. Il est également utilisé comme matière première pour les industries non alimentaires telles que la pâte. Papier, colle. L'amidon est également biodégradable et peut se comporter. Thermoplastiques [1]. En 2010, l'amidon représentait 22,2 % du marché mondial de l'emballage. Recherche en bioplastiques (Pierce, 2011).

- L'amidon est un glucide complexe composé de longues chaînes de glucose. C'est la principale forme de réserve énergétique chez les plantes. Il se trouve principalement dans les graines, les tubercules et les racines des plantes. L'amidon est également utilisé comme additif alimentaire et dans de nombreuses applications industrielles en raison de ses propriétés gélifiantes et épaississantes.

3.2. Structure de L'amidon :

L'amidon est un homopolymère de D-glucose. Unité D-glucosyle (stéréostructure) selles) sont majoritairement liées par des liaisons de type $\alpha(1,4)$ (95–96%), Dans une moindre mesure, par des liaisons de type $\alpha 1,6$ (4–5 %). Deux points forts polymères avec différentes structures primaires : les molécules linéaires amylose est une , molécules ramifiées [5].

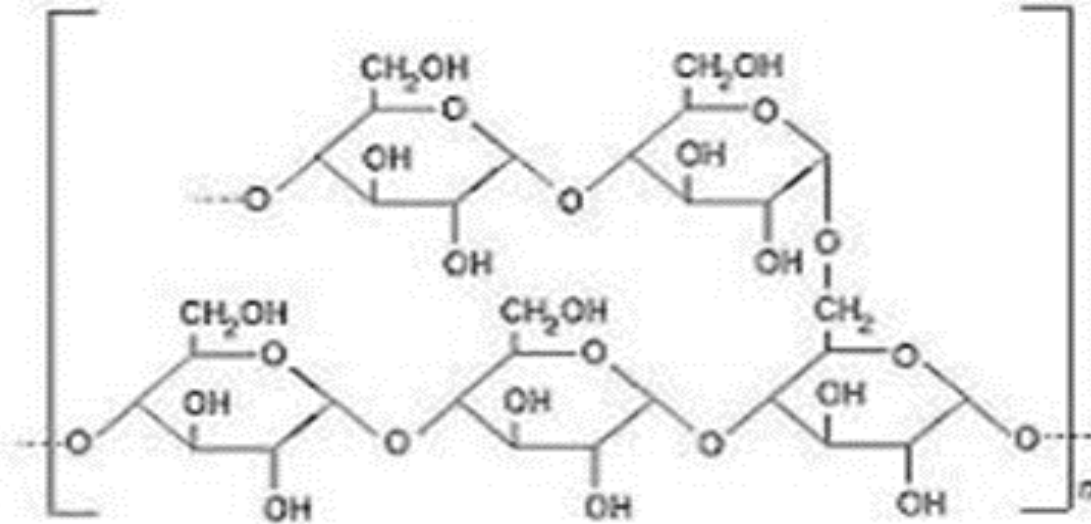


Figure 7 : la structure chimique de l'amidon.

3.3 Enzymes amyolytique :

Les enzymes amyolytiques sont couramment utilisées dans l'industrie papetière les industries alimentaires, pharmaceutiques et sucrières nécessitant des profils d'hydrolyse spécifiques, et Il est utilisé comme substrat de fermentation dans l'industrie agricole (Gandgadhan, 2009). Le Le substrat classique de l' α -amylase est l'amidon. Depuis lors, c'est la molécule la plus utilisée surtout dans l'industrie depuis des milliers d'années. Trouve couramment dans les plantes Blé, fruits (bananes), riz, etc. Composé d'amylose et d'amylopectine - L'amylose est un polymère linéaire composé de jusqu'à 6000 unités de glucose. Il possède une liaison α -1,4-glycosidique. - L'amylopectine est composée de courtes chaînes linéaires de 10 à 60 unités de glucose. Liaisons α -1,4 et α -1,6 avec des chaînes latérales de 15 à 45 unités de glucose. (Copeland et al., 2009). Enzymes amyolytiques telles que l' α -amylase, la β -amylase et la pullulanase il dégrade spécifiquement le substrat lors de la réaction. BL' α -amylase hydrolyse l'amidon pour former du maltose (Marc et al., 2009).

4. Micro-organismes thermophiles

Micro-organismes thermophiles sont Ils peuvent être classés en trois classes : Les thermophiles modérés ont une température optimale Il pousse à 45-65°C. La température optimale pour les thermophiles extrêmes est de 65 à 90°C. La température optimale pour les hyper thermophiles est supérieure à 90°C (Brock, 1985). Dans un autre classement Les micro-organismes thermophiles se développent à des températures optimales entre 50°C et 50°C. 80°C, 50-60°C pour les thermophiles modérés, 60°C pour les thermophiles extrêmes et 80°C. La température optimale pour les hyper thermophiles est de 80 à 110 °C (Stetter, 1996 ;Chris Jannan et Freg Wisson, 1995).

5. Sources des microorganismes glycolytiques thermophiles

Les microorganismes glycolytiques sont présents dans une variété de sources, allant des environnements naturels aux applications industrielles. Dans les milieux naturels, les sources principales de microorganismes glycolytiques incluent les sols, les eaux douces et salées, ainsi que les habitats microbiens complexes tels que les marécages et les composts. Ces microorganismes jouent un rôle crucial dans le cycle du carbone en dégradant les composés organiques, notamment les sucres et les polysaccharides, par le biais de la glycolyse. De plus, les sources industrielles fournissent également des environnements propices à la prolifération de microorganismes glycolytiques, tels que les bioprocédés de production d'éthanol à partir de la fermentation de la biomasse lignocellulosique. En somme, les sources des microorganismes glycolytiques sont variées, allant des habitats naturels aux applications industrielles.

6. Applications industrielles des enzymes glycolitiques thermophiles

Les enzymes glycolytiques thermophiles jouent un rôle essentiel dans les applications industrielles en raison de leur stabilité et de leur activité à des températures élevées. Les enzymes glycolytiques thermophiles, telles que la cellulase, sont capables de dégrader les polysaccharides complexes présents dans la biomasse en sucres fermentescibles, qui sont

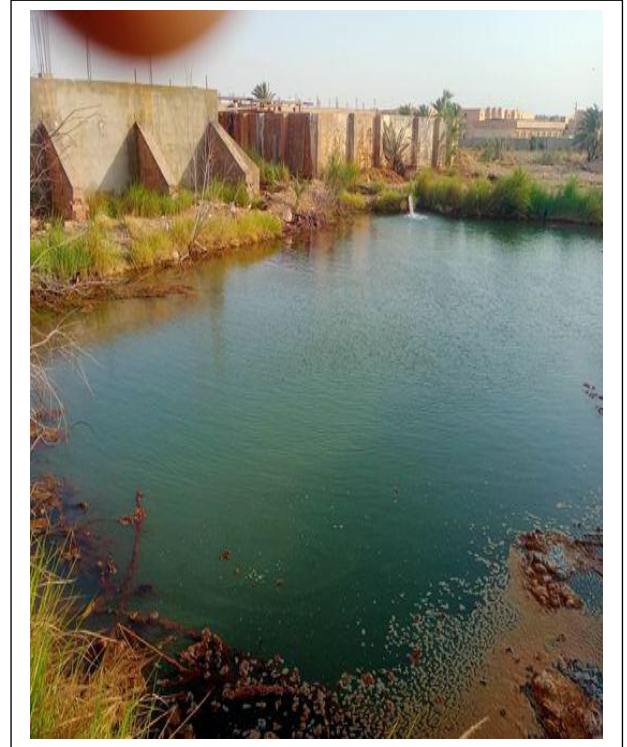
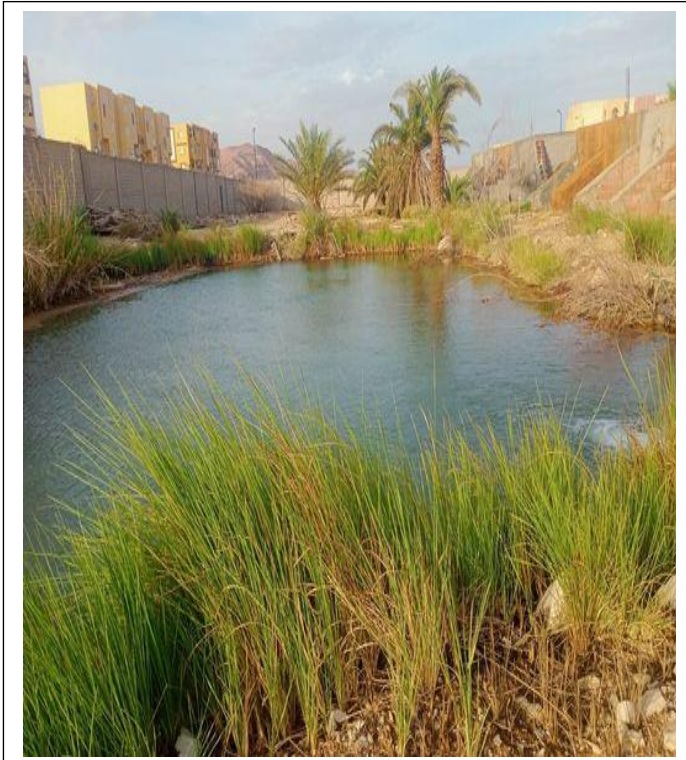
ensuite convertis en éthanol par des levures. Cette approche offre une alternative durable et renouvelable aux carburants fossiles, contribuant ainsi à la réduction des émissions de gaz à effet de serre. De plus, ces enzymes sont également utilisées dans l'industrie alimentaire pour la production d'ingrédients tels que le sirop de glucose et le fructose, ainsi que dans la fabrication de produits chimiques et pharmaceutiques. Leur activité à des températures élevées permet d'optimiser les processus industriels, réduisant les coûts et les besoins en énergie. L'utilisation d'enzymes glycolytiques thermophiles dans ces domaines ouvre de nouvelles perspectives pour une production durable et respectueuse de l'environnement.

partie I:

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude et échantillonnage :

Des échantillons ont été prélevés dans les sources chaudes de Hamam al Baraka El-Hadjeb : et se trouve à 12 kilomètres est il présente un pH égal de 7,16 et une température élevée de 52°C, ce qui est favorable à la croissance. Organisme thermophile



site d'échantillonnage

Des échantillons ont été prélevés de e L'eau chaude à la surface a conduit à la formation de lacs d'eau chaude au Hammam el-Hajeb à Biskra Le Un échantillon a été prélevé dans les sédiments du lac en octobre 2023. Des échantillons de sédiments ont été prélevés à différents endroits du lac Égoutter avec une spatule stérile et verser dans des flacons en verre stériles. Le flacon a été immédiatement transporté au laboratoire et y a été stocké à 4C°.

2. Isolement et sélection de souches cellulolytiques

2.1 Enrichissement

20g de sédiment a été pesé et placé dans 100 ml de milieu d'enrichissement dans des conditions stériles.

Polysaccharide (Avicel, , amidon, pectine) :7g, extrait de levure :2g, NaCl :5g, NH₄Cl :2,5 g, NaHPO₄ :5g, MgSO₄H₂ :0.2g. La suspension de sédiment a été bien mélangée puis incubée à 50°C pendant 8 jours.

2.2 Préparation de série des dilutions

Après 8 jours d'incubation, une aliquote de 1 ml de chaque solution a été prélevée et des dilutions en série ont été effectuées jusqu'à 10⁻⁶ dans des tubes contenant 9 ml de l'eau distillée stérile.

2.3 Isolement sur milieu de culture solide

Des boîtes de Pétri ont été inoculées avec du milieu solide à base d'Avicel ou d'amidon ou de pectine. Ajouter 0,1 ml de diverses dilutions à la surface et incubé à 60°C pendant plusieurs jours.

2.4 Purification des souches

Les colonies obtenues sur milieu solide ont été repiquées sur le même milieu jusqu'à obtention de souche pures.

2.5 Sélection sur milieu de culture liquide

Cette sélection était basée sur la mesure de l'activité enzymatique (cellulase ou amylase ou pectinase) dans les surnageants des échantillons.

➤ Culture en milieu liquide.

Les souches ont été inoculées dans des tubes contenant 7 ml de milieu liquide à base de polysaccharide approprié, puis incubées à 65°C pendant 48 heures. Après 2 jours de croissance, les cultures en milieu liquide ont été centrifugées à 10 000 rpm. Recueillir le surnageant de culture pendant 10 min à rpm, 4 ° C.

2.6 Détermination de l'activité enzymatique

- L'activité glycosidase peut être évaluée en mesurant la quantité de sucres réducteurs libérés à partir d'une solution de polysaccharide (avicel, amidon ou pectine) à une

concentration de 1% (p/v) en utilisant la méthode DNS (acide dinitrosalicylique) (Miller, 1959).

- ✓ La solution de polysaccharide (1 %) a été préparée en dissolvant 1 g d'e polysaccharide dans 100 ml.
- ✓ Tampon phosphate de sodium (pH 7) (voir annexe).
- ✓ Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9 ml de la solution d'avicel .
- ✓ Une solution de polysaccharide (1%) a été ajoutée et incubée à 70°C pendant 30 minutes. réaction
- ✓ L'activité enzymatique a été arrêtée en ajoutant 1,5 ml d'DNS (voir annexe)
- ✓ Cuire à 100°C pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite refroidi dans de l'eau glacé. Le mélange contrôle correspond à la solution polysaccharide incubée sans surnageant.
- ✓ Ceci est ajouté après DNS.
- ✓ Les tubes témoin et les tubes étudié ont ensuite été centrifugés à 10 000 tr/min pendant 10 minutes.. L'absorbance a été lue à 540 nm au **spectrophotomètre JENWAY 6310**.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des solutions de glucose 0,01 à 0,6 mg/ml.

La concentration en sucres réducteurs a été déterminée à partir de la courbe étalon et l'activité enzymatique a été calculée selon l'équation suivante :

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

- C_x : Concentration de sucres réducteurs dans le mélange réactionnel ($\mu\text{mol/mL}$).
- C_{tb} : Concentration de sucres réducteurs dans le mélange témoin ($\mu\text{mol/mL}$) .
- D: Taux de dilution
- T : Temps d'incubation (min)

Produit 1 μmol de glucose par minute a été définie comme une unité (U ou $\mu\text{mol /min}$) de l'activité enzymatique.

3. Identification de la souche

La caractérisation morphologique, biochimique et physiologique des souches est effectuée selon les méthodes traditionnelles d'identification (Renaud, 2000).

3.1 Observation microscopique

3.1.1. Coloration de Gram

Coloration de Gram des souches âgées de 24 heures pour détermination. Gram et forme cellulaires.

3.1.2 Mobilité

Le test a été déterminée par examen microscopique de la souche à l'état frais entre lame et lamelle et par observation la mobilité de bactéries et leur morphologie et L'observation microscopique si :

- Les bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions).
- Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité.

3.2 Tests biochimiques

3.2.1 Catalase

La souche a été dissociée en ajoutant goutte à goutte du peroxyde d'hydrogène à 30 % (v/v). Une lame d'observation macroscopique. La présence de catalase est caractérisée par sa formation bulles d'oxygène immédiates (Renaud, 2000).

3.2.2 Production de H₂S

Cette souche a été inoculée en piquant le centre du fond du milieu KIA. En suite Incuber à 50°C pendant 24 heures., Un précipité noir dans le culot signifiée la formation de sulfure d'hydrogène (Renaud, 2000).

partieII:

Résultats et discussion

1. Isolement des souches cellulolytiques thermophiles :

Voici ce que le monde a à dire sur les souches glycolytiques thermophiles : mines d'or, plantes marines, mer profonde, usines de compostage (Menendez et al., 2015), en particulier les sources chaudes (Mohagheghi et al., 1986). *Géobacillus stearothermophilus* (Makky, 2009). Hammam El Hajeb et isolé. 14 souche glycolitiques thermophiles sont isolé sur milieu solide à base d'e polysaccharides à pH 7 et 60°C du sol et des sédiments. 2 souches pectinolytique, une souche cellulolytiques et 11 souches amylolytiques. Conditions sur ce site (température élevée et végétation) Favorise l'activité microbienne, dans ce cas l'activité cellulolytique thermophile.

2. Sélection des souches

2.1. Sélection sur milieu de culture solide

Les souches sont sélectionnées sur la base de la formation de zone claire autours des colonies. Les 14 souches isolées présentent des zones claires après application du rouge de congo puis une solution de NaCL sur la colonie.

Sélection sur milieu de culture liquide :

La sélection des souches bactériennes thermophiles est réalisée en se basant sur la mesure de l'activité glycolytique sécrétée dans le milieu. Une culture liquide contenant le polysaccharide, est réalisée à une température de 65 °C et un pH de 7. Ensuite, l'activité de est mesurée en chauffant le surnageant à 70 °C. L'activité glycolytique de 14 souches sélectionnées est enregistrée. (Tableau 3)

Tableau 1: Activité cellulase en UI/ml et 70°C, à pH 7

<i>souche</i>	<i>pH</i>	<i>Activité UI/ml</i>	<i>Ecart de type</i>
<i>s.1</i>	7	0,30	0,11
<i>s.2</i>	7	0,09	0,02
<i>s.3</i>	7	0,23	0,31
<i>s.4</i>	7	0,75	0,19
<i>s.5</i>	7	0,27	0,09
<i>s.6</i>	7	0,33	0,01

<i>s.7</i>	7	0,23	0,06
<i>s.8</i>	7	0,16	0,12
<i>s.9</i>	7	0,23	0,19
<i>s.10</i>	7	0,14	0,11
<i>s.11</i>	7	0,88	0,10
<i>s.12</i>	7	/	/
<i>s.13</i>	7	0,98	0,26
<i>s.14</i>	7	0,24	0,07

La courbe d'étalonnage réalisée avec le glucose a été montrée sur

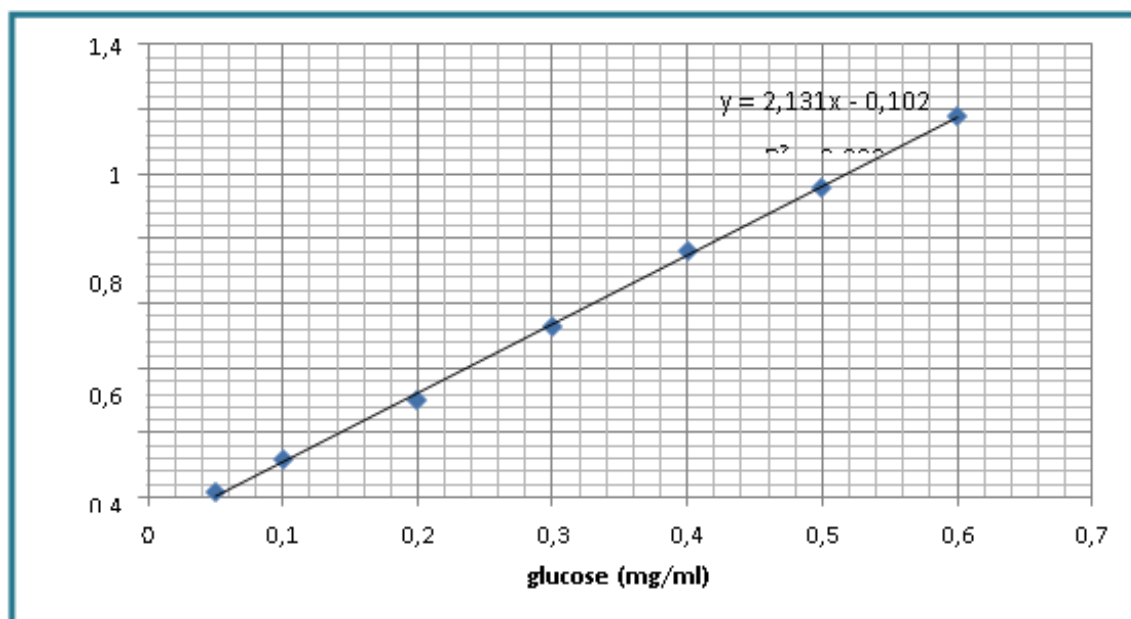


Figure 9: Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.

La souche S.13 a montré la plus grande activité pectinase, à pH 7 et à 70°C. De ce fait, elle est sélectionnée pour une étude plus approfondie. Cette souche a été soumise à une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique afin de mieux comprendre ses propriétés et son potentiel dans la production d'enzymes pectinolytique thermophiles. Cette caractérisation permettra d'obtenir des informations détaillées sur les caractéristiques de croissance, la forme cellulaire, les exigences nutritionnelles, ainsi que les enzymes spécifiques produites

3. Identification de la souches

3.1. Aspect microscopique

La souche présente des aspects microscopiques variés, se présentant sous forme de sphères (coques), de bâtonnets (bacilles) et de spirales ou hélices, se trouvant séparément ou en courtes chaînes de deux à quatre cellules. La coloration de Gram de cette souche est positive, ce qui indique la présence d'une paroi cellulaire épaisse. À l'état frais, l'observation microscopique révèle qu'elle est immobile, c'est-à-dire qu'elle ne présente pas de mobilité flagellaire ou ciliaire.

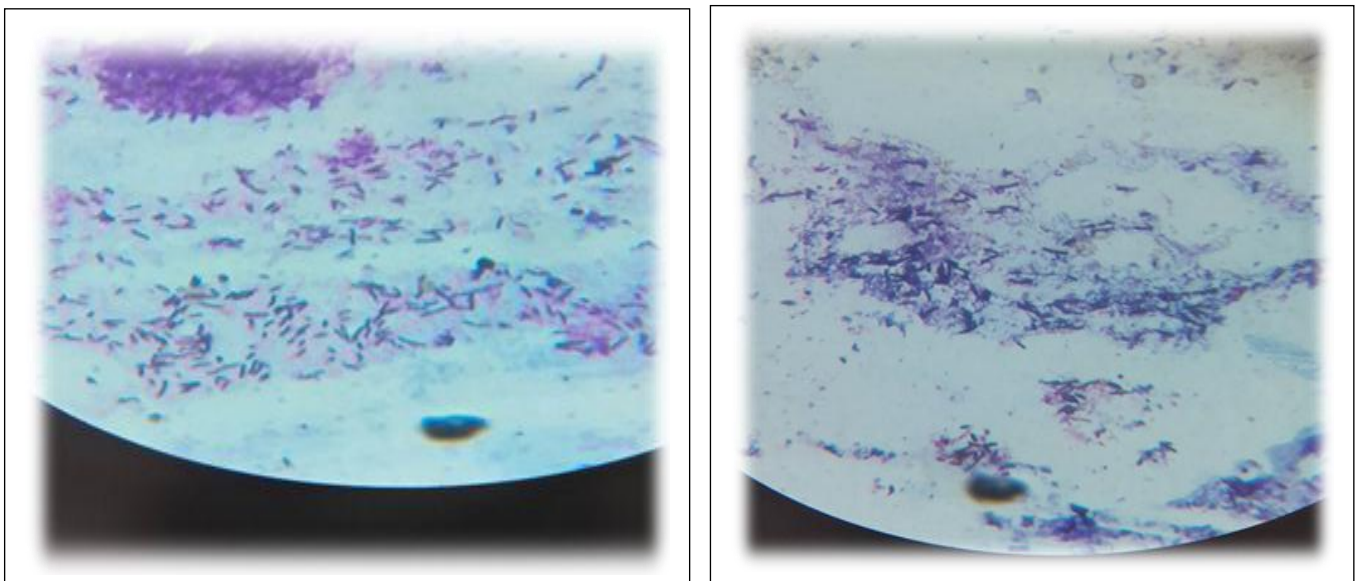


Figure 10: Observation microscopique des cellules après coloration de Gram (observation par microscope optique G×100 a immersion)

3.2. Tests biochimique

3.2.1. Test de catalase:

La souche présente une réaction positive à la formation de bulles d'air lorsqu'elle est exposée à l'enzyme catalase, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Cette réaction positive indique la présence de l'enzyme catalase dans la souche, ce qui lui confère la capacité de décomposer le peroxyde d'hydrogène en produisant de l'oxygène gazeux.



Figure 11: test de catalase(+).

2.2.2 test de KIA (kligler) :

L'absence de changement de couleur du milieu indique que la souche ne fermente pas le glucose, n'oxyde pas le lactose et ne produit pas de sulfure d'hydrogène (H_2S), ce qui conduit à un résultat négatif pour ces tests. Cela signifie que la souche ne possède pas les capacités métaboliques pour fermenter le glucose, oxyder le lactose ou produire du H_2S dans le milieu de culture utilisé pour les tests.

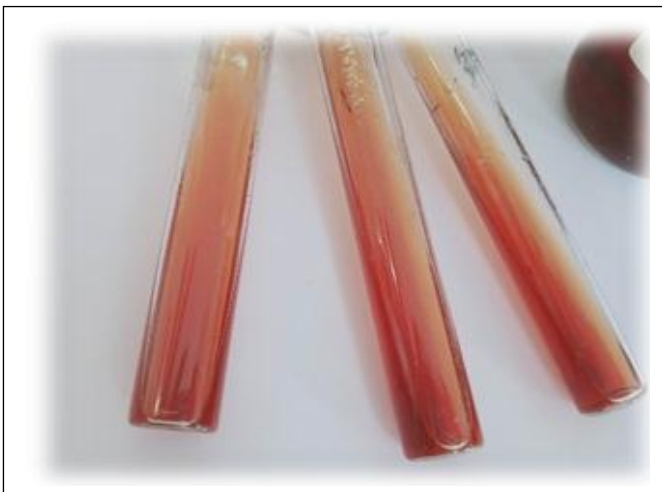


Figure 12: test de KIA(-)

La souche est caractérisée par de nombreuses caractéristiques en particulier les espèces qui n'ont pas été identifiées. Pour déterminer avec précision les types de souches, des analyses supplémentaires telles que des tests biochimiques, le séquençage génétique ou d'autres méthodes de caractérisation sont nécessaires. Ces analyses permettront de comparer les caractéristiques de la souche avec celles des espèces connues du *Bacillus* et de déterminer l'espèce spécifique à laquelle elles appartiennent. Le tableau suivant montre la comparaison entre les deux souches.

Tableau 2: propriété morphologique et biochimique de la souche

Test	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> sp	Souche
Morphologie	Bacille	Bacille
Gram	+	+
Mobilité	Peu mobile	Immobile
Oxydase	-	-
Catalase	+	+
Test de kIA	-	-

- Morphologie : Les deux souches présentent une morphologie de bacille, c'est-à-dire une forme en bâtonnet.
- Gram : Les deux souches sont Gram-positives, ce qui signifie qu'elles prennent la coloration violette lors de la coloration de Gram.
- Mobilité : La première souche est peu mobile, ce qui indique une faible capacité de déplacement, tandis que la deuxième souche est immobile.
- Oxydase : Les deux souches sont négatives pour le test d'oxydase, ce qui signifie qu'elles ne produisent pas l'enzyme oxydase.
- Catalase : Les deux souches sont positives pour le test de catalase, ce qui indique qu'elles produisent l'enzyme catalase capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.
- Test de kIA : La souche 13 est négative pour le test de kIA, mais il n'est pas précisé si la deuxième souche a été testée pour ce paramètre

Conclusion

Conclusion

En conclusion, ce mémoire portant sur l'isolement et la sélection de souches microbiennes thermophiles productrices de glycoside hydrolases dans la région de Hammam Elhajib (Biskra) a permis de mettre en évidence plusieurs résultats significatifs.

Tout d'abord, nous avons identifié une partie de la région de Hammam Elhajib comme un environnement propice au développement de micro-organismes thermophiles en raison de son climat chaud et de ses sources chaudes. Ces micro-organismes thermophiles présentent un grand intérêt en biotechnologie en raison de leur capacité à prospérer à des températures élevées.

En utilisant une approche de culture sur milieu solide et liquide à base de différents polysaccharides (cellulose, xylane, amidon et pectine) nous avons réussi à isoler 14 souches microbiennes thermophiles, une souche cellulolytique, deux pectinolytiques et 11 amylolytiques. Parmi ces souches, la souche S.13 s'est avérée être la plus prometteuse en termes d'activité pectinolytique, montrant une activité élevée à une température de 70°C et à un pH de 7.

De plus, nous avons effectué une caractérisation morphologique, physiologique et biochimique de la souche sélectionnée. Cette caractérisation a confirmé que la souche appartenait au genre *Bacillus* et à l'espèce *Bacillus thermoamylovorans*. Les genres *Bacillus* sont largement utilisés dans divers processus de fermentation et dans l'industrie pour leur production enzymatique.

Les propriétés thermophiles de la souche sélectionnée lui confèrent un avantage significatif, notamment en termes de réduction du risque de contamination par des micro-organismes mésophiles communs lors de procédés biotechnologiques à des températures élevées.

Notre étude ouvre des perspectives intéressantes pour des recherches ultérieures. Il serait bénéfique de déterminer les conditions de culture optimales, telles que la composition du milieu, le pH et la température, afin d'optimiser la production de pectinolytiques par la souche sélectionnée. De plus, une étude approfondie des propriétés physico-chimiques et moléculaires de ces enzymes serait nécessaire pour mieux comprendre leur fonctionnement et leur potentiel d'application industrielle.

Références

Bibliographiques

- ✓ Adrio, J.L., & Demain, A.L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- ✓ Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K.M., & Sani, R.K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751-759.
- ✓ Boyce A, Walsh G. (2015). Caractérisation d'une nouvelle endoglucanase thermostable d'*Alicyclobacillus vulcanalis* pouvant être utilisée dans la production de bioéthanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 7515–7525. DOI: 10.1007/s00253-015-6474-8.
- ✓ Brock T. D. (1985). Life at high temperature. *Science*, 230, 132-138.
- ✓ Chan S-Y., Choo W.S., Young D-J. et al. (2017). "Pectin as a Rheology Modifier: Origin, Structure, Commercial Production and Rheology". *Carbohydrate Polymers*, 161, 118-139.
- ✓ Copeland L, Blazek J., Salman H., Chiming M, T. (2009). Form and functionality of starch *Food Hydrocolloids*, Vol. 23, p. 1527–1534.
- ✓ Devi A., Bajar S., Kour H., Kothari R., Pant D., Singh A. (2022). Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a Circular Bioeconomy Approach. Pp: 1-22. [https:// doi-org/10.1007/s12155-022-10401-9](https://doi-org/10.1007/s12155-022-10401-9).
- ✓ Díaz, G.C., Zúñiga, C., & Sánchez, S. (2018). *Microbial and Enzymatic Bioproducts*. Springer.
- ✓ Gangadharan D., Sivaramakrishnan S. (2009). Amylolytic Enzymes. In: Singh nee, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. pp. 359-369.
- ✓ Gupta, N., Rathi, M., Gupta, R., & Gupta, N. (2019). Microbial Cellulases and their Industrial Applications. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*, 135-162.
- ✓ Hidalgo-Cantabrana, C., Sanozky-Dawes, R., Barrangou, R., & Reich, N.C. (2021). Global distribution and diversity of bacteriophages and their hosts. *Nature Microbiology*, 6(4), 423-430.
- ✓ Jensen C.U., Rodrigury J.K., Guero R., Karatzos S., Olofson G., Iversen S.B. (2017). *Fundamentals of Hydrofaction: pétrole brut renouvelable issu de la biomasse ligneuse*.
- ✓ Kulkarni V.S., Kishor.D.B., Sudha R. (2012). Natural Polymers: A comprehensive review. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical science*, Pp: 1597-1613.

- ✓ Kristjanan J K., Hreggvidsson

- ✓ . (1995). *Ecologie and habitats of extremophiles*. *World J Microbial biotechnol*, 11, 17-25.
- ✓ Makky E. A. (2009). *Avicel2ase Production by a Thermophilic Geobacillus stearothermophilus Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, p.57.
- ✓ Marc J.,E.,C., Maarel, V, D., Leemhuis, H. (2013). *Starch modification with microbial alpha-glucano transferase enzymes*. *Carbohydrate Polymers*, 93, 116–121.
- ✓ 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.
- ✓ O'donohue M.J. (2008). *La production de carburants à partir de biomasse lignocellulosique par voie biologique: état de l'art et perspectives*, Vol. 15, N° 3, Pp: 172–177.
- ✓ Obeng, E. M., Adam, S.N.N., Budiman, C., Ongkudon, C.M., Maas, R., et Jose, J. (2017). *Lignocellulases: un examen des enzymes, des systèmes et des pratiques émergents et en développement*. *Bioressources et biotraitement*, 4 (1). DOI: 10.1186 / s40643-017-0146-8.
- ✓ Pérez J., Dorado M. J., Rubia T., Martinez J. (2002). *Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview*. *Int Microbiol*, 5, 53–63.
- ✓ Prescott L. M., Harley J. P., Kelein D. A. (2003). *Microbiologie*, 2ème édition, Paris, p.30.
- ✓ Renaud F. N. R. (2000). *Précis de bactériologie clinique*. ESKA.
- ✓ Stetter k. o. (1996). *Hyperthermophilic procaryotes*. *FEMS Microbial Rev*, 18, 149-158.

Annexe

➤ **Préparation solution d'Avicel (1 %)**

Avicel.....1G
Pectine1G
Amidon.....1G

Tampon phosphate de sodium.....100 ml.

➤ **Lecourbeétalonnage**

Préparer de solution mère 1g de glucose et dans un 100 ml de l'eau distillé. Après réalise dilution a différent concentration et ajouté 1.5 ml de DNS. Lecture au spectrophotomètre à 540 nm

Tableau3: la gamme de courbe d'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

➤ **Préparation DNS**

Eau distillé.....1000 ml

DNS.....10g

NaOH.....16g

KNa tartrate.....300g

➤ **Solutions de glucose**

0,010,6 Mg/ml →

ملخص

الهدف من هذا العمل هو عزل واختيار سلالات بكتيرية محبة للحرارة تنتج هيدرولازات الغليكوزيد المحبة للحرارة. تم عزل 14 سلالة ميكروبية من الماء الساخن في حمام الحاجب على وسط صلب قائم على عديد السكاريد وهي السليلوز والنشا والبكتين. من بين هذه السلالات ، اثنتان منها تحلل البكتين ، وواحدة تحلل النسيج الخلوي ، و 11 حالة للميلوليت. أتاح الاختيار بناءً على قياس النشاط الأنزيمي على الوسط السائل الحصول على سلالة تُظهر أعلى نشاط. هذه السلالة تحلل البكتين وبعد التوصيف يتم تحديدها على أنها تنتمي إلى الأنواع *Bacillus thermoamylovorans*. الكلمات الدالة: الكائنات الحية الدقيقة المحبة للحرارة ، المناخ الحار ، السلالات البكتيرية المحبة للحرارة ، البكتين ، الكتلة الحيوية النباتية.

كلمات مفتاحية:

الكائنات الدقيقة الحرارية، المناخ الحار، سلالات بكتيرية حرارية، البكتين، الكتلة النباتية.

Résumé

Le but de ce travail est d'isoler et de sélectionner des souches bactériennes thermophiles productrices de glycoside hydrolases thermophiles. A partir de l'eau chaude de Hamam El Hajeb 14 souches microbiennes ont été isolées sur milieux solides à base de polysaccharide, la cellulose, l'amidon et la pectine. Parmi ces souches, deux sont pectinolytiques, une cellulolytiques et 11 amylolytiques. La sélection basée sur la mesure de l'activité enzymatiques sur milieu liquide a permis d'obtenir une souche montrant l'activité la plus élevée. Cette souche dégrade la pectine et après caractérisation elle est identifiée comme appartenant à l'espèce *Bacillus thermoamylovorans*.

Mots clés:

Micro-organismes thermophiles ,Climat chaud,Souches bactériennes thermophiles,Pectine, Biomasse

Abstract

The aim of this work is to isolate and select thermophilic bacterial strains producing thermophilic glycoside hydrolases. From the hot water of Hamam El Hadjeb, 14 microbial strains were isolated on solid polysaccharide-based media, namely cellulose, starch and pectin. Among these strains, two are pectinolytic, one cellulolytic and 11 amylolytic. The selection based on the measurement of the enzymatic activity on liquid medium made it possible to obtain a strain showing the highest activity. This strain degrades pectin and after characterization it is identified as belonging to the species *Bacillus thermoamylovorans*.

Key words: Thermophilic micro-organisms, Hot climate, Thermophilic bacterial strains, Pectin, Plant biomass.

Key words:

Thermophilic microorganisms, Hot climate, Thermophilic bacterial strains, Pectin, Plant biomass