



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Sciences biologique
Microbiologie Fondamentale et Appliquée
Réf. :

Présenté et soutenu par :
Meftah SELSABIL

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

Isolement et sélection d'une souche bactérienne
dégradant le son de blé à partir l'eau de Hamem El
Hajeb (Biskra)

Jury :

Mme. Wassila DENDOUGA	MCB	Université de Biskra	Président
M. Hakim HEBAL	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mlle. Hayat AOURAGH	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019



Remerciements

Au début, je remercie Dieu pour la bénédiction de la raison, La prière et la paix sur le Prophète Muhammad.

✚ Je remercie beaucoup, Je te respecte et mon honorable encadré sur la main du meilleur professeurs Monsieur Hakim Hebal je remercie pour ses conseils, ses orientations ,sa compétence , sa très gentillesse tout au long de mon travail.

✚ c'est un honneur mon travail fait d'avoir accepté et corriger sur les mains des milieus professeurs que j'ai connu au cours de mes études en université El hajeb_biskra, Je remercie Mme H.Aouragh et Mme W. Dendouga.

✚ Je remercie beaucoup tout les Assistantes de laboratoire : Mme Mefida , Saliha, Sarah, Alima et M. Walid, Oussama & Abdelkader, et Mohecen pour leur fournir tous les moyens d'aide au cours de mon travail.

✚ Je voudrais remercier les assistantes de la bibliothèque: Mlle Fatima, M.Walid et Mohamed pour leur très gentille tout au long de mes études .

✚ Les personnes les plus chères sur mon cœur, mon père et ma mère , merci pour les efforts que vous avez déployés pour me procurer tout le confort nécessaire pendant mes études. Je t'aime.

✚ Mes amis qui m'ont aidé et sont restés à mes côtés , Surtout les meilleurs amis et les plus chers : Oussama B; Amira ; Soundos ; Zainab; Rabia et Djoumana, Ahlem. Je vous remercie, Je ne t'oublierai jamais.

Merci Beaucoup



Dédicaces

Je veux dédier ce travail à :

❖ *Mon père Mohammed et ma mère, mon grand-père et ma grand-mère et ma soeur Abir et mon frère Yasin qui ont contribué à la réalisation de mon rêve , je t'aime.*

❖ *Ma famille Meftah et ma famille Bettan*

❖ *Les personnes les plus précieuses et je aime à mon coeur Madame Badi Nadia, je t'aime.*

❖ *Tous mes amis que j'ai rencontrés dans ma vie universitaire leur souhaitent du succès dans leurs vies .*

❖ *Aux étudiants de Master de microbiologie promotion 2018/2019.*

Avec toute ma reconnaissance

Salsabil_Meftah

sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
sommaire	
Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Matière lignocellulosique

1.1. généralités sur la matière lignocellulosique	3
1.2. Structure et composition de la biomasse	4
1.2.1. Cellulose	4
1.2.2. Hémicelluloses	5
1.2.3. Lignine.....	5

Chapitre 2 : Biodégradation de la biomasse lignocellulosique

2. 1. Enzymes lignocellulolytiques	7
2. 1. 1. Cellulases.....	7
2. 1. 2. Xylanases.....	8
2.2. Les bactéries lignocellulolytiques	8
2. 2.1. Les bactéries cellulolytiques.....	8
2.2.2. Les bactéries xylanolytique	8
2.3. Application des enzymes lignocellulolytique	8
2.4. Microorganismes thermophiles	9
2.4.1. Définition.....	9
2.4. 2. Les applications des souches thermophiles	9

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

3. 1. Echantillonnage.....	11
3. 2. Isolement et sélection des souches thermophiles	11
3.2.1. Enrichissement	11
3.2.2. Sélection sur milieu de culture solide.....	12
3. 2. 3. Purification des souches	13

3. 2. 4. Sélection des souches sur milieu liquide à base de son de blé	13
3. 3. Identification de la souche	14
3. 3.1. Examen macroscopique:.....	14
3. 3.2 Examen microscopique:	15
3. 3.3. Tests physiologique	15
3. 3.4. Tests biochimique.....	177

Chapitre 4 : Résultats et discussion

4.1. Isolement de souches dégradant le son de blé.....	20
4.2. Sélection des souches sur milieu de culture solide	20
4.3. Sélection des souches sur milieu de culture liquide.....	20
4.4. Identification phénotypique de la souche.....	21
4.1. Caractéristiques microscopiques et macroscopiques.....	21
4.4.2. Identification biochimiques de la souche	23
4.4.3. Identification physiologique de la souche	25
Discussion	28
Conclusion	30
La bibliographie	32
Annexes	38
Résumés	

Liste des tableaux

Tableau 1: Absorbance à 60°C, à pH 7,2	21
Tableau 2: Caractérisation biochimique de la souche 1.....	23
Tableau 3 : Caractéristique physiologique de la souche 1.....	25
Tableau 4 : Comparaison les caractéristique biochimique des souches.....	28

Liste des figures

Figure 1 : Représentation des biopolymères composant la matière lignocellulosique	3
Figure 2 : Structure de la paroi végétale	4
Figure 3 : Représentation schématique d'une chaîne de cellulose.....	4
Figure 4 : Structure moléculaire de cellulose.....	5
Figure 5 : Structure de la lignine.....	6
Figure 6 : Enzymes de la dégradation de la cellulose.....	7
Figure 7 : Photo original de Source thermale de Hammam Al Baraka El Hadjeb.....	11
Figure 8 : Enrichissement de l'échantillon de l'eau de hamamm El Hadjeb dans milieu à base son de blé.....	12
Figure 9 : Des dilution de la suspension d'enrichissement.....	12
Figure 10 : Isolement des souches du dilution sur les boites de Petri.....	13
Figure 11 : Les souches sélectionnées sur milieu de culture solide.....	20
Figure 12 : Aspect macroscopique de la première souche.....	22
Figure 13 : Aspect microscopique de souche sélectionnée et observée au microscope photonique et à l'immersion (x100).....	22

Liste des abréviations

AMY : Amylase

BN : Bouillon Nutritive

CIT : Citrate

DHA : DiHydroxyacétone

GEL : Gélatinase

GLUC : Glucide

GLU : Glucose

GN : Gélose Nutritive

H₂S : Sulfure d'Hydrogène

IND : Indol

MAN : Mannitole mobilité

MEVAG : Milieu pour l'Etude de Voie d'Attaque des Glucide

NIT : réduction Nitrate en Nitrite

OX : Oxydase

KIA : Hajna-Kligler

RM : réaction Rouge de Méthyle

TSI : Triple Sugar Iron

URE : Uréase

VF : Viand de Fois

VL : gélose Viand de Levure

VP : Voges- Proskawer

Introduction

La diminution des ressources fossiles et la pollution de l'environnement liée à l'exploitation du pétrole et du charbon obligent à envisager une transition progressive vers une bioéconomie. Bien que l'approvisionnement énergétique futur soit probablement basé sur un large éventail de plates-formes alternatives, telles que le vent, l'eau, les combustibles solaires et la biomasse, la production de produits chimiques dépendra de plus en plus de la biomasse végétale (Fitzpatrick *et al.*, 2010).

La production de « bioénergies » représente un défi important pour réduire les impacts environnementaux liés aux combustibles fossiles et accroître l'indépendance énergétique. Les biocarburants sont produits par des procédés biologiques ou thermiques au cours desquels la biomasse est convertie en carburants liquides (éthanol, lipides comme précurseurs) ou gazeux (syngas, isobutène ou hydrogène) et le recyclage des sous-produits contribueront à la viabilité économique et environnementale de la voie lignocellulosique de production d'agro-carburants (Alfenore *et al.*, 2016).

Le terme "biomasse" désigne la fraction biodégradable des produits, des déchets et des résidus de l'agriculture, ainsi que des déchets industriels. Au cours de la dernière décennie, trois générations de biocarburants ont été obtenues successivement eu égard à la nature de la ressource mobilisée: La première génération est obtenue à partir de saccharose et d'amidon ou de lipides issus de plantes oléagineuses en concurrence avec les usages alimentaires ; la deuxième génération est issue de ressources lignocellulosiques ; la troisième génération concerne la conversion du CO₂ par des bactéries photosynthétiques et des algues (Alfenore *et al.*, 2016)

La biomasse lignocellulosique est la ressource renouvelable la plus abondante qui pourrait répondre aux besoins énergétiques globaux annuels (Mckendry, 2002).

Les microorganismes sont des agents de dégradation. En effet, dans leur environnement naturel, ils sont responsables de la dégradation de la matière organique, même la plus complexe, comme la cellulose, la lignine, la chitine, l'amidon, la pectine et le xylan....etc, et ce par la production de divers enzymes extracellulaires (Perez *et al.*, 2002). Les microorganismes sont alors utilisés en bio remédiation afin de dépolluer l'environnement (Lu *et al.*, 2004).

Afin d'être utilisées en industrie, les matières lignocellulosiques nécessitent des prétraitements physicochimiques extrêmes (températures élevées, pH acide ou basique, pressions élevées), avant de subir un traitement enzymatique. Pour cette raison, les enzymes utilisées doivent être stables dans ces conditions extrêmes. La recherche de ces enzymes par l'isolement de microorganismes vivant dans des environnements extrêmes est l'un des axes de recherches pour l'obtention de ces enzymes.

Les enzymes lignocellulolytiques thermostable sont parmi les enzymes recherchés pour cette industrie. L'Algérie est un pays riche sources chaudes. La wilaya Biskra est le meilleur exemple.

Le but de ce travail est l'isolement et l'identification de microorganismes thermophiles producteurs d'enzymes lignocellulosiques à partir des eaux de Hemmam El hajeb. Il est divisé en deux parties : la première partie donne des généralités sur la matière lignocellulosique et les enzymes lignocellulolytiques ; la deuxième partie concerne le matériel et les méthodes utilisés ; les résultats et discussion.

1. Matière lignocellulosique

1.1. généralités sur la matière lignocellulosique

la biomasse lignocellulosique offre un grand potentiel d'utilisation en tant que matière première renouvelable en abondance et facilement disponible sur notre planète pour la production de molécules d'intérêt de carburants et de matériaux (Habibi *et al.*, 2010). Composée de trois principaux biopolymères entremêlés (cellulose, hémicellulose et lignine) et formant une structure tridimensionnelle complexe et très résistante, la matière lignocellulosique est le constituant principal de la paroi cellulaires des plantes et de certaines algues (Lebo *et al.*, 2001) et d'après Figure 1 montre que la structure de cellule végétale .

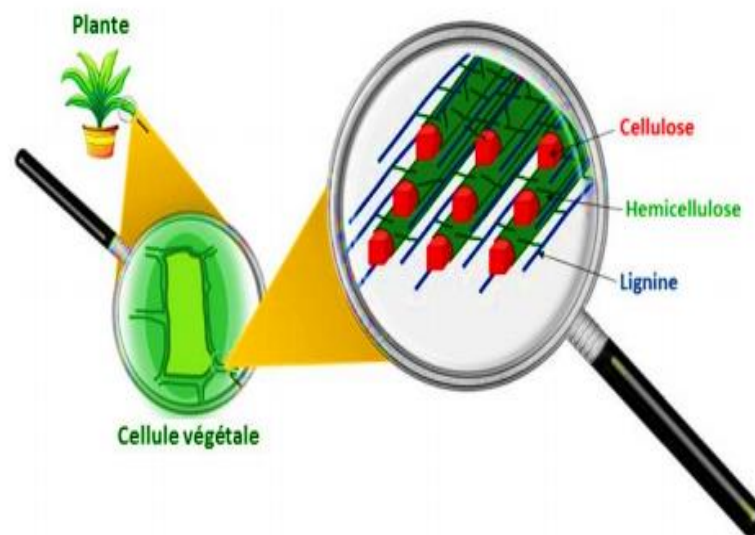


Figure 1. Représentation des biopolymères composant la matière lignocellulosique (Chatel et Roger, 2013).

Les ressources de biomasse lignocellulosique proviennent des résidus agricoles et forestiers ou des sous-produits de transformation du bois et des cultures (plantes ligneuses ou plantes herbacées) qui présente dans la figure 2 de la structure de paroi végétale. la majeure partie de la biomasse lignocellulosique contient de 30 à 50% cellulose, 25 à 45% d'hémicellulose et 10 à 25% de lignine (Taarning *et al.*, 2011).

Selon sa composition, la biomasse lignocellulosique peut être convertie en produits à valeur ajoutée, idéalement avec des propriétés similaires ou améliorées par rapport aux produits issus du pétrole (Clark et Deswarte, 2015) .

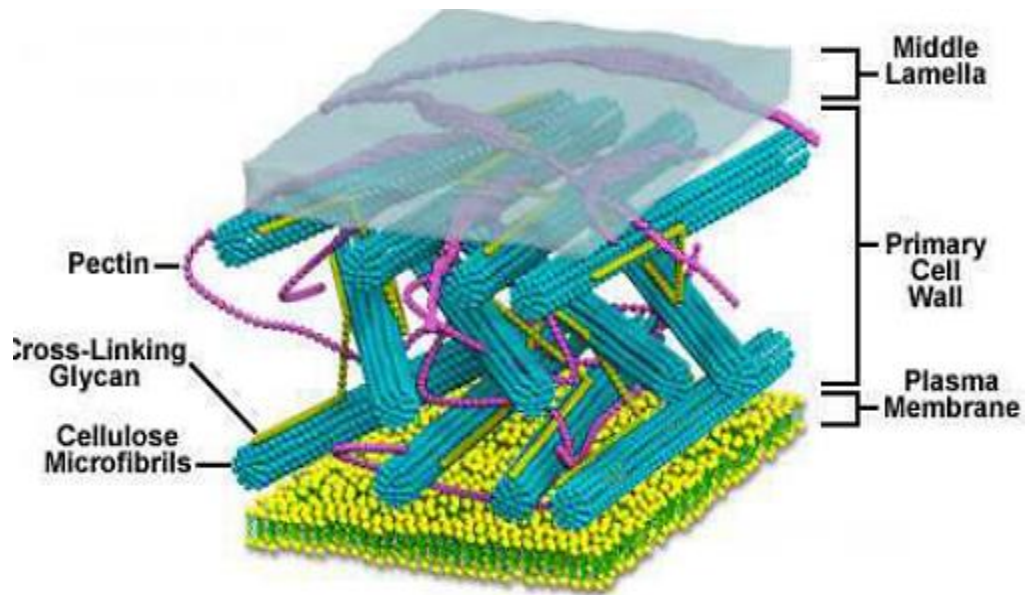


Figure 2. Structure de la paroi végétale (Nammori *et al.*, 1990)

1.2. Structure et composition de la biomasse

1.2.1. Cellulose

La cellulose est le composé majeur des parois végétales (40% en moyenne) et constitue le biopolymère le plus abondant sur terre (Schwarz, 2001 ; Nishino *et al.*, 2004).

Le rôle de la cellulose est essentiellement structural en assurant une partie de la rigidité de la plante et en contribuant à la taille et à la forme des végétaux présente dans la Figure 3 (Mirande, 2009).

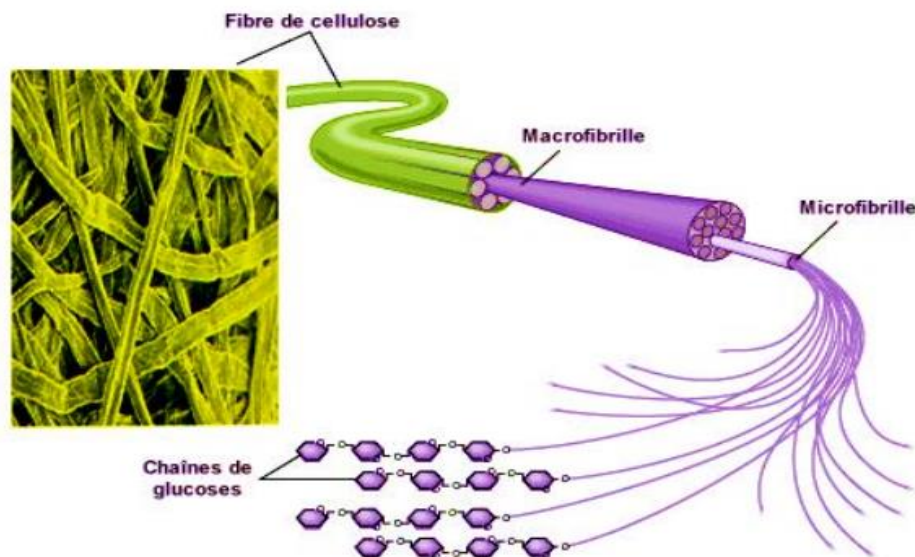


Figure 3. Représentation schématique d'une chaîne de cellulose (Mirande, 2009 ;Wertz, 2009)

1.2.1.1. Structure de la cellulose

La cellulose est un homopolymère insoluble relativement stable, composé d'unités glucose (D-glucopyranose) liées par des liaisons β ,1-4 (Moon et *al.*, 2011). Le cellobiose est l'unité structurale de base de la cellulose montrée dans la figure 4 (Brown et *al.*, 2000).

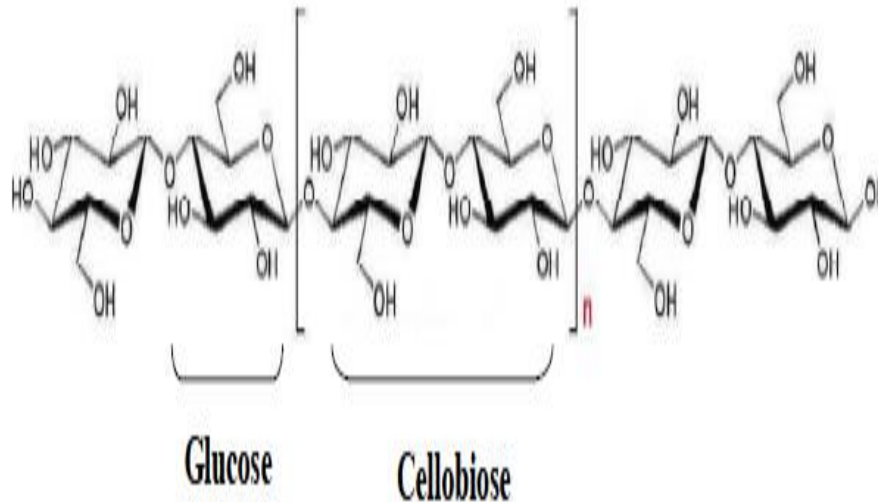


Figure 4. Structure moléculaire de cellulose (Mohan et *al.*, 2006)

1.2.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses ont un rôle structural dans la flexibilité et la plasticité des parois cellulaires. Leurs concentrations varient de 15 à 40% de la matière sèche chez les graminées et de 8 à 15% chez les légumineuses. (Mirande, 2009).

1.2.2.1 Composition et structure de l'hémicellulose

Les hémicelluloses comprennent un ensemble de polyosides, le plus souvent hétérogène, formés par des résidus glucose, xylose, mannose, galactose, arabinose, fucose, acides glucuronique et galacturonique. Quatre groupes sont définis en fonction de leur structure primaire : les xyloglycanes (xylanes), les mannoglycanes (mannanes), les β -glucanes, et les xyloglucanes (Mirande, 2009).

1.2.3. Lignine

La lignine est le constituant le plus abondant dans la biomasse végétale. Elle a une nature aromatique et amorphe et sa structure présente dans la figure 5, varie selon l'espèce végétale dont elle est issue (Duval et Lawoko, 2014).

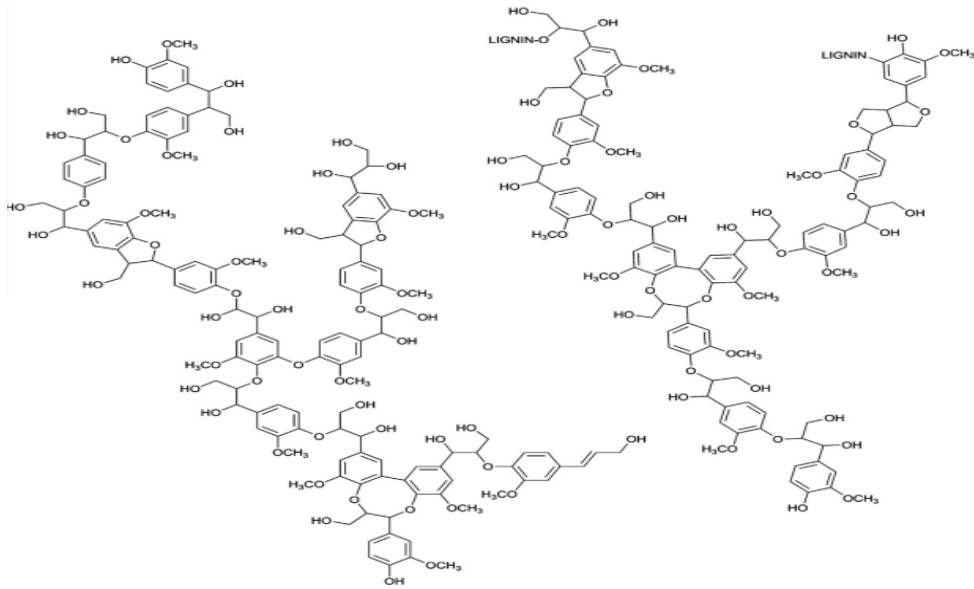


Figure 5. Structure de la lignine (Crestini *et al.*, 2010)

Autres constituants de paroi végétale

Les pectines

Les pectines constituent le troisième type de polysaccharides des parois végétales. Elles forment un gel qui joue un rôle dans la porosité et la densité des parois (Collins *et al.*, 2005).

2. Biodégradation de la biomasse lignocellulosique

2. 1. Enzymes lignocellulolytiques

2. 1. 1. Cellulases

Nom codifié de la Cellulase EC : 3.2.1.4 ; Nom systématique : 1,4 - (1,3 ; 1,4) - beta-D - Glucan4 –glucanohydrolase ; Nom recommandé : cellulase

Les cellulases sont largement répandues dans la nature. Elles sont recensées chez des organismes très divers : bactéries, champignons, plantes, protozoaires, vers, mollusques, insectes etc.. De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale ou microbienne (Xu *et al.*, 2000).

La plupart des préparations cellulolytiques étudiées ont un pH optimum variant de 3 à 7 et température optimale des cellulases des bactéries varie entre 50 et 100°C, ce qui explique leur utilisation en industrie du textile (Ando *et al.*, 2002).

L'hydrolyse complète de la cellulose nécessite l'action synergique de trois types de cellulases (endoglucanase, exoglucanase , B-glycosidase) pour libérer enfin des monomères de glucose qui présentés dans la figure 6 montré que la dégradation de la cellulose (Lynd *et al.*, 2002).

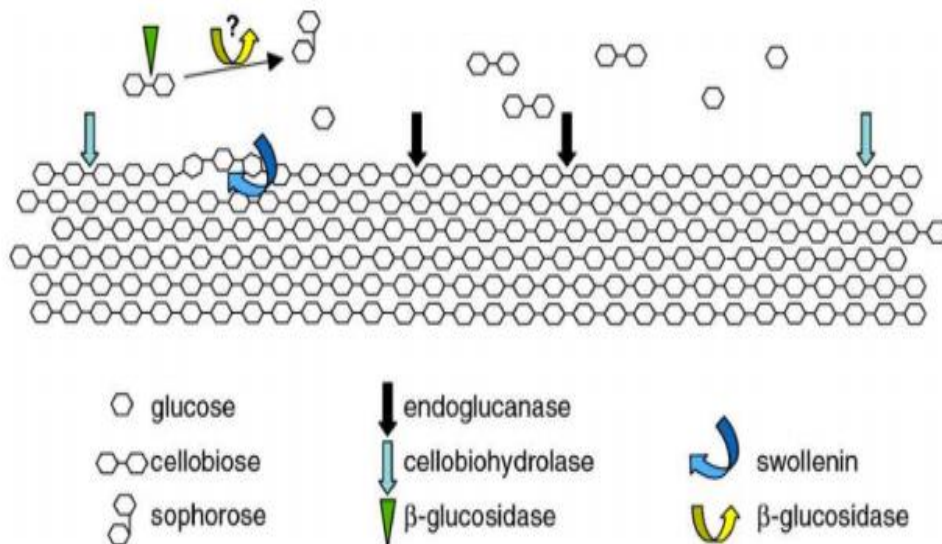


Figure 6. Enzymes de la dégradation de la cellulose (Alarcón, 2007).

2. 1. 2. Xylanases

Les xylanases sont des principales hémicellulases qui hydrolysent la liaison β -1,4 dans le squelette du xylane, donnant des xylooligomères courts qui sont ensuite hydrolysés en unités xylose simples par la β -xylosidase (Lee *et al.*,2003).

2.2. Les bactéries lignocellulolytiques

2. 2.1. Les bactéries cellulolytiques

De nombreuses bactéries sont capables de se développer sur un substrat cellulosique dans la nature ou en symbiose. Le système cellulasique des bactéries est plus simple que celui des champignons ; il se compose uniquement des activités endo-glucanase et β -glucosidase (Bekhouche *et al.*,1991). Parmi les bactéries cellulolytiques, certaines sont aérobies (*Myxococcoides*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas* et *Pseudomonas*) d'autres sont anaérobies strictes (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Bacteroides succinogenes*) ou encore des anaérobies facultatives (*Erwinia chrysantharum*) qui possèdent un seul complexe multienzymatique extracellulaire appelé cellulosome (Schwarz, 2001).

2.2.2. Les bactéries xylanolytique

Une grande variété des enzymes xylanolytiques sont produites par les microorganismes (Braun et Rodrigues,1993), Ces enzymes catalysent la rupture de la liaison glycosidique reliant deux résidus xyloses de la chaîne principale des xylanes (Li *et al.*,2000).

En 1977 et 1979, deux études du groupe Salyers ont montré que plusieurs espèces de *Bacteroides* étaient capables de dégrader les xylanes. Ainsi, *B. Ovatus*, *B. Eggerthii*, *B. Vulgatus* et *B. Fragilis* présentaient des activités xylanolytiques importantes (Salyers *et al.*, 1977,1979).

2.3. Application des enzymes lignocellulolytique

Les enzymes jouent un rôle de plus en plus important. Ces procédés mettent souvent en jeu des conditions physico-chimiques (température, pression, pH, etc.), surtout Les enzymes des bactéries vivant au contact des sources aux hautes températures et à la pression, présentent un intérêt potentiel pour les usages industriels (Minic *et al.*, 2006).

a. Industries alimentaires

Les cellulases sont utilisées pour faciliter la filtration de diverses suspensions, riches en fibres cellulosiques (Scriban, 1999) . Des traitements de différents produits pour améliorer leurs qualité et améliore l'arôme des jus de fruits et du vin (Riccio *et al.*, 1999).

b. Industrie des textiles et des détergents

Elles sont utilisées au cours de la finition, pour donner l'aspect aux vêtements en jean après lavage et améliorer l'apparence des tissus par élimination des tâches (Gusakov *et al.*,2000).

c. Papeterie

Dans la fabrication des pâtes à papier, l'addition de cellulases, aux suspensions de pâtes en cours de lavage et surtout aux suspensions de pâtes de papier de recyclage, La bioconversion de la cellulase des déchets de papeterie en source fermentescible par des cellulases de *Trichoderma viridae* (Vanwyk et Mohulatsi, 2003).

2.4. Microorganismes thermophiles**2.4.1. Définition**

Les organismes thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein = aimer) sont des organismes ayant besoin d'une température élevée pour se développer, le microbiologiste à l'origine de la découverte des microorganismes thermophiles. Selon cette définition, la vie aux températures élevées est classée en forme thermophile ou hyperthermophile. Les thermophiles, sont des organismes vivants à des températures optimales de croissance comprises entre 50 et 80°C, les hyperthermophiles ont des optima au-dessus de 80 °C (Holden, 2009). Par cette dernière les températures optimales de croissance de ces organismes se situent alors respectivement entre 40 et 60°C, entre 60 et 85°C et au-delà de 85°C (hyperthermophile) (Satyanarayana *et al.*, 2013).

2.4. 2. Les applications des souches thermophiles

Les microorganismes thermophiles sont des éléments très importants et très utilisés dans plusieurs applications biotechnologiques. Il s'agit d'applications qui requièrent l'action directe d'une population microbienne, comme :

a. Agents de minéralisation

Dans les traitements industriels de minéraux, des microorganismes oxydant le soufre et le fer sont employés pour libérer l'or inclus dans les minéraux sulfurés et dans la concentration des métaux, lorsque les procédés chimiques conventionnels ne sont pas rentables (Bredberg *et al.*, 2001).

b. Production d'hydrogène

La recherche sur la production biologique d'hydrogène est devenue attrayante pour des utilisations possibles du bio hydrogène comme source d'énergie propre (Antranikian *et al.*, 2008 ; Ponzano *et al.*, 2011).

c. Piles à combustible microbiennes

Une étude réalisée a démontré qu'une communauté microbienne thermophile isolée des sédiments marins était capable de produire un courant électrique dans une pile à combustible fonctionnant à 60°C en utilisant de l'acétate comme carburant (Mathis *et al.*, 2008) .

Les Enzymes de dégradation et de modification des polysaccharides :

d. Dégradation de la pectine

La dégradation enzymatique de la pectine est largement appliquée dans des processus de technologie alimentaire, comme dans l'extraction des jus de fruit et la fabrication de vin, afin d'augmenter le rendement en jus, de réduire sa viscosité, d'éclaircir sa couleur (Antranikian, 2008).

3. Matériel et Méthodes

3. 1. Echantillonnage

Le prélèvement d'échantillon a été réalisé à partir d'une source thermale Hammam Al baraka El Hajeb qui présenté dans la figure 7.



Figure 7. Photo Original de Source thermale de Hammam Al Baraka El Hajeb (Biskra)

L'eau de hammam El Hajeb est caractérisée par un pH égale 7,12 et une température élevée entre 52 – 55°C qui favorise la croissance des microorganismes thermophile.

L'échantillon d'eau a été prélevé le 10 Février 2019 à partir d'un tuyau d'écoulement de la source, dans flacons en verre de 250 ml stérile. Le flacon à été conduit immédiatement au laboratoire et conservé à 4°C.

3. 2. Isolement et sélection des souches thermophiles

3.2.1. Enrichissement

10 ml de l'eau de hamamm El Hajeb ont été pesés et introduit stérilement dans un 90 ml de milieu d'enrichissement à base de son de blé contenant en g/l : 1g de son de blé ; 0,5g de NH₄Cl ; 0,25g de NaCl ; 0,5 g de NaHPO₄ ; 0,02g MgSO₄ à pH 7 (Hebal.,2019).

Le milieu est incubé à 50°C jusqu'à l'apparition d'un trouble montré dans la figure 8.

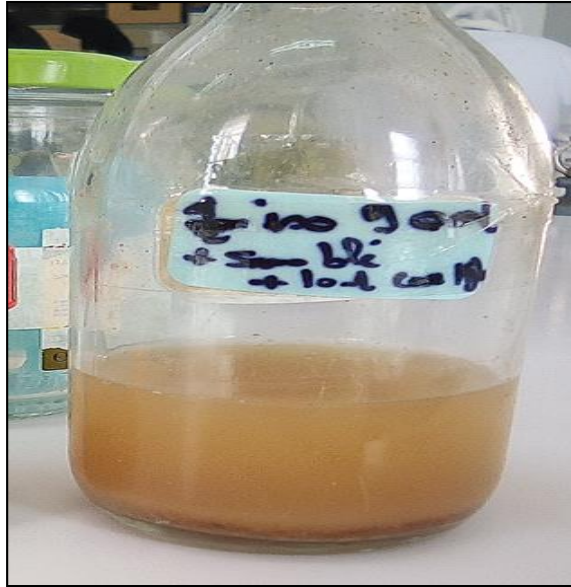


Figure 8. Enrichissement de l'échantillon de l'eau de hammam El Hajeb dans milieu à base son de blé

3.2.2. Sélection sur milieu de culture solide

Après enrichissement, une série de dilutions ont été effectuées en prélevant 1ml de suspension d'enrichissement d'eau hadjeb, avec laquelle des séries de dilution ont été préparées jusqu'à 10^{-7} (figure 9).



Figure 9. Des dilution de la suspension d'enrichissement

0.1 ml des différentes dilutions sont par la suite étalées à surface des boîtes de Pétri contenant le milieu solide à base de son de blé . Les boîtes sont incubées à 50°C pendant 2 jours (figure 10). Cette sélection est basée sur la formation de zone claire autour des colonies poussant sur un milieu solide.

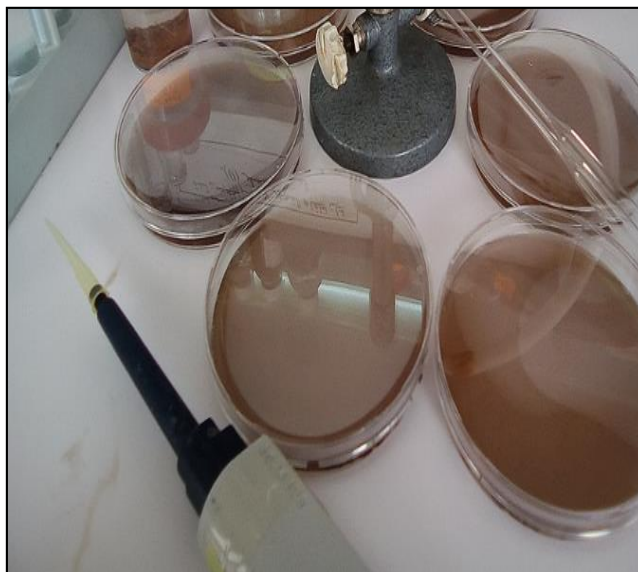


Figure 10. Isolement des souches du dilution sur les boîtes de Petri

3. 2. 3. Purification des souches

Après incubation, les colonies apparues sur le milieu solide du dilution 10^{-7} sont purifiées par transfert des dix colonies sur le même milieu solide à base de son de blé avec ajout de l'extrait de levure, puis incubées à 50 C° pendant 48h .

Conservation des souches

Les souches purifiées ensemencées sur une gélose nutritive inclinée puis conservées à 4°C.

3. 2. 4. Sélection des souches sur milieu liquide à base de son de blé

Les souches isolées sont cultivées dans 5ml du même milieu de son de blé et incubées à 50°C pendant 48h. Les surnageants des cultures sont récupérés par centrifugation (10000 rpm pendant 10 min, 4°C). L'activité enzymatique dans les surnageants a été mesurée à 60°C dans un mélange réactionnel à pH 7,20.

Mesure de l'activité enzymatique

L'activité lignocellulolytique a été déterminée par mesurant la quantité de sucre réducteur libéré à partir de solutions 1% (p/v) de son de blé suivant la méthode au DNS (annexe) (Miller, 1959).

La solution 1% de son de blé est préparée en dissolvant 1g de ce substrat dans 90 ml de tampon phosphate de sodium (50mM) à pH 7.

Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9 ml de la solution son de blé (1%). Il est incubé à 60°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 1,5 ml de DNS.

le mélange est porté à ébullition à 100 °C pendant 5 minutes, par la suite refroidie dans l'eau glacée.

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

La lecture des absorbances est effectuée à 540 nm, au spectrophotomètre SHIMADZU UVmin-1240V.

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

3. 3. Identification de la souche

A partir des résultats d'absorbance obtenues sur chaque extrait, la souche donnant une grande absorbance a été sélectionnée pour son identification par des méthodes conventionnelles. La souche a subit caractérisation morphologique, physiologique et biochimique.

3. 3.1. Examen macroscopique:

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer Une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après Thomas *et al.* (1970) ont montré que les éléments d'identification macroscopiques sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc.
- La taille des colonies
- couleur de la colonie.

- L'élévation : convexe, concave, plate.
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, ...etc.

3. 3.2 Examen microscopique:

a. Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mes au point le protocole en 1884. Les bactéries présentent toutes une paroi constituée d'une substance, la muréine qui est un peptidoglycane. Celle-ci est recouverte par une membrane externe chez les bactéries Gram - tandis que les bactéries à Gram+ en sont dépourvues.

b. Mobilité

Déterminée par examen microscopique de la souche à état frais entre lame et lamelle et par observation de l'aspect de la croissance dans milieu de mannitol-mobilité.

c. Coloration des spores

Les spores des souches isolées sont recherchées par observation microscopique à l'immersion après la coloration de Gram permet de visualiser les spores, les endospores apparaissent rosées violet ou non colorées. D'après Delarras (2014) les colorants de la coloration de Gram ne peuvent pas pénétrer dans les spores, protégées par leurs enveloppes . Nous pouvons également utiliser du vert de malachite sur la souche fixée sur lame pendant 10 min.

3. 3.3. Tests physiologique

a. Type respiratoire

D'après Guiraud (1998), Le comportement des souches vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans gélose viande de fois (VF) ou la viande de levure (VL) et ensemence par piqûre central , la croissance est observé après 24 - 72 h d'incubation à 37°C .

b. Réaction de voges-Proskauer

Elle met en évidence les produits de la fermentation butanediolique. D'après Parija (2009) le milieu clark et lubs est ensemence par la souche puis incubé à 37°C pendant 84h. Dans un tube à hémolyse stérile, 1ml de la culture est additionné et de 0,5 ml d'a- naphtol

et de 0,5ml de KOH (4M) agitation pendant 1min et inclinée tube pendant 15min, la présence de l'acétoïne (réaction positive) par coloration rouge en surface .

c. Réaction au rouge de méthyle

Le rouge de méthyle révèle l'acidification qui résulte des fermentations des acides mixtes. D'après Winn et al. (2006) le milieu Clark et Lubs ensemence par souche puis incubé à 37°C pendant 4jours , par la suite, 2ml de culture sont transvasés dans tube stérile ajoutée deux gottes d'indicateur (rouge de méthyle) . teinte rouge franche c'est une réaction positive ou jaune une réaction négative.

d. Production d'indole

Dans deux milieu 1ml de milieu urée-indol et 5ml d'eau peptonée exempte d'indol , ont ensemencés par souche et incubé à 37°C pendant 24h , par suite 5 gouttes de Kovacs sont ajoutés à la culture et par agitation en traduit la formation d'un anneau rouge à la surface des milieux alors l'indole positive(Lansing et *al.*, 2003) .

e. Production de sulfure d'hydrogène

La souche est ensemencée par piqûre central jusqu'au fond du milieu KIA , après 24h d'incubation à 37°. La production de sulfure d'hydrogène par formation de précipité noir dans culot.

f. Utilisation du citrate

La gélose de citrate de Simmons incline et ensemencée par la souche puis incubé à 37°C pendant 48h . utilisation du citrate se traduit par virage de couleur du milieu en bleu (Maria et Macwilliams, 2013).

g. Fermentation du glucose

Dans milieu MEVAG contenant à une concentration finale de 0,5% de glucose (annex). La souche est ensemencée par piqure centrale , puis le milieu recouvert par une couche de paraffine, incubé à 37°C pendant 48h. la fermentation du glucose se traduit par un jaunissement de milieu .

h. Oxydation des glucides

Le milieu MEVAG sont ensemencée et incubé à 37°C pendant 48h . l'oxydation de glucide traduit par jaunissement du milieu.

i. Production de dihydroxyacétone

La souche est ensemencée à la surface de la gélose au glycérol (annex) . après 10 jours d'incubation à 30°C. les boîtes sont inondées par mélange des solutions suivantes : solution A : 34,66g de sulfate de cuivre dans 500ml d'eau distillée ; solution B : 173g de tartrate de sodium potassium et 50 g d'hydroxyde de sodium dans 500ml d'eau distillée. les deux solutions mélangées et appliquées. L'observation après 2h d'un halo rouge autour de la croissance indique une production de dihydroxyacétone (Hu et *al.*,2011).

j. Températures de croissance

Déterminée dans cinq tubes de gélose nutritive inclinée ensemencée la souche, incubé dans cinq différentes températures (20°C ; 30°C ; 40°C ; 50°C ; 60°C). L'observation après 5 -14 jours de la croissance.

k. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Dans des tubes différents 3ml de BN contenant 0 , 2 , 5 , 7 , 15 , 20 g/l de NaCl sont ensemencées par la souche . les tubes incubés à 30°C pendant 14jours.

3. 3.4. Tests biochimiques

L'identification biochimique est un examen qui permet d'identifier une bactérie en s'appuyant sur ces caractères biochimiques.

a. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène.

Lecture: Catalase positive : dégagement immédiat de bulles de gaz.

Catalase négative : absence de dégagement de bulles de gaz.

b. Oxydase

L'action de l'oxydase sur disque de oxydase . les colonies sont ensemencées à la surface de disque. La production de l'oxydase se traduit par une coloration violette intervenant dans 1min .

c. Mannitol mobilité

Le mannitol mobilité est un milieu semi-solide contenant entre autre le mannitol, du rouge de phénol comme un indicateur de pH.

Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité de la souche et la recherche de la nitrate réductase (Harley et Prescott, 2002).

Technique : Ensemencer le milieu mannitol-Mobilité par piqure central à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. Incuber à 37°C pendant 24h.

d. Réduction des nitrates en nitrites

La bouillon nitrate est ensemencé par une demi ose de la culture. Après 24h d'incubation à 37°C. 5 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 sont ajoutées avec agitation, l'apparition d'une couleur rose ou rouge indique une réduction des nitrates en nitrites (Denis, 2007).

e. Uréase

La recherche de l'uréase s'effectue sur milieu urée-indole selon la méthode de Bergey's Manual of Determinative Bacteriology par 1 ml de milieu urée-indol est ensemencée par culture puis incubé à 37°C pendant 48h. la variation de la couleur du milieu de rose au rouge indique uréase positif.

f. Gélatinase

Test a été réalise sur le milieu de gélose nutritive contenant 0,4 % gélatine (annex) selon la méthode de Williams et Corss (1971) , coulé le milieu dans des boites de péri puis ensemencé la souche et incubé à 30°C après 3 ou 5 jours . Les boites a été inondées par 10ml d'une solution d'acide sulfurique 1N (annex) saturée par sulfate de sodium. Après 1heure un éclaircissement autour de la croissance indique hydrolyse de la gélatine (Balan et al.,2012).

g. Hydrolyse de l'amidon

La présence de l'activité amylolytique est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose à amidon (annexe). Après incubation à 30°C pendant 3jours, les colonies sont recouvertes par éthanol (90%) . L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour des colonies, par contre les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (Delarras., 2014 ; Pandey et al.,2000).

h. Dégradation de la caséine

La dégradation de caséine est déterminée par l'ensemencement des souches sur gélose contenant 5 % de lait (annex).après L'incubation 14 jours à 30 °C. La présence de

cette activité est détectée par la formation d'un halo clair autour des colonies (Delarras., 2014).

I. TSI

Cette méthode permet de mettre en évidence d'une part, la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement de gaz dans le culot) et production H₂S par un noircissement du culot. A partir des cultures pures, ensemercer dans milieu TSI (annex) la pent du milieu par des stries et le culot par picure à l'aide d'une pipette pasteur. Incubée à 37°C pendant 24h, apres l'incubation milieu rouge (fermentation négative des sucres) jaune (fermentation positive).

4. Résultats et discussion

4.1. Isolement de souches dégradant le son de blé

Le site d'isolement est une eau chaude, Le site est pauvre en végétation justifiant une étape d'enrichissement sur un milieu contenant le son de blé.

Après une semaine d'incubation à 50 C°, plusieurs colonies sont obtenues sur les milieux solides à base de son de blé à pH 7.2.

4.2. Sélection des souches sur milieu de culture solide

Les 10 souches en été sélectionnée sur la base de la formation de zone claire autours de la colonie qui présentés dans la figure 11. Elles ont été purifiées et conservées à 4°C .

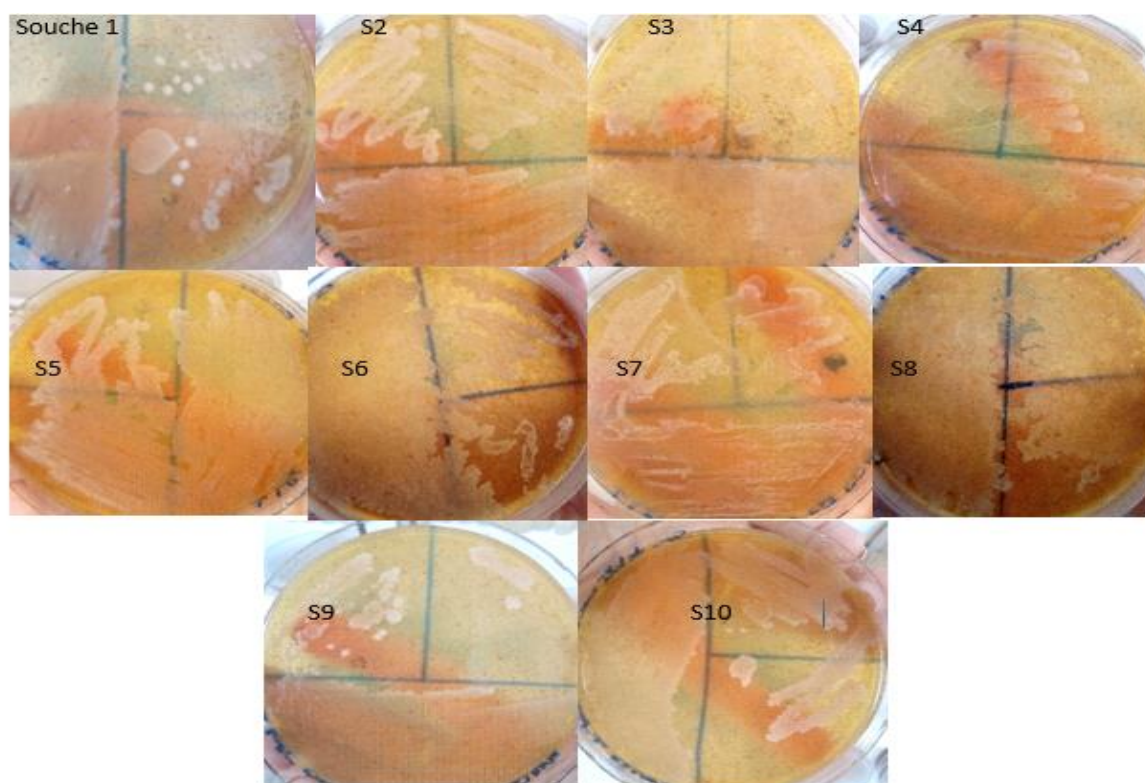


Figure 11. Les souches sélectionnées sur milieu de culture solide

4.3. Sélection des souches sur milieu de culture liquide

Cette sélection est basée sur la mesure de l'activité enzymatique dans le surnageant a 540 nm par la méthode de DNS avec le son de blé comme substrat.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 1. Absorbance à 60°C, à pH 7,2

Les souches	Blanc	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Moyenne
Souche1	1.280	1.350	0.980	0.575	0,968
S1 diluée	0,991	0,153	0,066	0,011	0,076
Souche2	1.260	0.919	0.615	0.676	0,736
Souche3	0.705	0.166	0.159	0.279	0,201
Souche4	0.657	0.233	0.245	0.128	0,046
Souche5	0.715	0.223	0.085	0.212	0,173
Souche6	0.654	0.290	0.282	0.317	0,296
Souche7	0.852	0.038	0.002	0.010	0,015
Souche8	0.513	0.144	0.225	0.196	0,188
Souche9	0.775	0.162	0.321	0.209	0,094
Souche10	0.738	0.067	0.069	0.209	0,115

A partir de ces résultats, la souche 1 présente la plus grande absorbance. Elle est sélectionnée pour être identifiée.

4.4. Identification phénotypique de la souche

4.4.1. Caractéristiques microscopiques et macroscopiques

a. Aspects macroscopique de la souche :

L'observation macroscopique de souche 1 après 3 jours sur le milieu enrichissement à base son de blé cultivée à 50°C (figure 12).

Il ya 2 type de colonie : des grandes colonies bombé lisse et de borde irrégulier de couleur crème. des petites colonies lisse de couleur crème (figure 12).

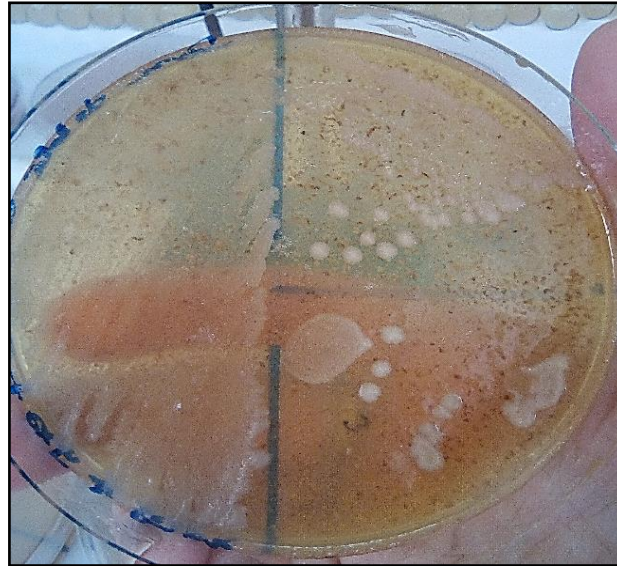


Figure 12. Aspect macroscopique de la première souche.

b. Aspects microscopique de la souche

Se sont des bâtonnets sporulés en central et leur couleur violet donc Gram positive, nous permettent de déduire la présence de *Bacillus* sporulés (endospore), présentés dans la figure 13.

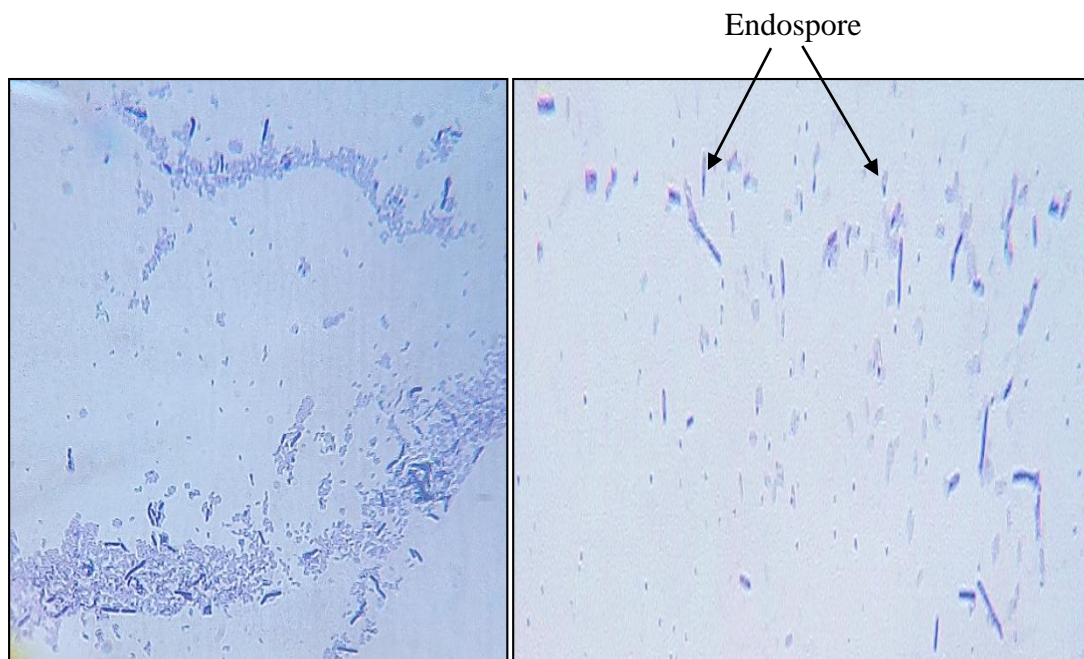


Figure 13. Aspect microscopique de souche sélectionnée et observée au microscope photonique à l'immersion (x100).

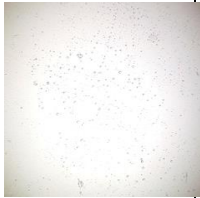


c . Mobilité






Déterminée par examen microscopique (x40) de la souche thermophile à l'état frais entre lame et lamelle : en observée la mobilité bactérienne et confirmé par test mannitol mobilité (mobile).

4.4.2. Identification biochimiques de la souche

La présence de ces activités hydrolytiques à été réalisée en utilisant les substrats, amidon, caséine, gélatine qui permet mise en évidence des enzymes extracellulaires (amylolytique, protéolytique, collagénolytique) a été observée dans la souche, les résultats que nous avons obtenus dans tableau 2.

Tableau 2 . Caractérisation biochimique de la souche 1





Les tests	Résultats (- / +)	Explication	Les photos
Catalase	+	Observation microscopique du bulles d'oxygène	
OX	+	Coloration violette surface de disque montre que l'isolat possède l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).	
MAN	+	Coloration jaune orangée c'est une dégradation du mannitol produit par réduction du mannose	




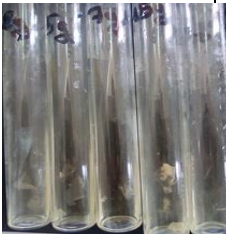

NIT	—	Ne possède pas une nitrate-réductase	
URE	+	hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate.	
GEL	+	Bactérie possède enzyme collagénase qui hydrolyse le collagène (gélatine) en acides aminés ou en peptides	
AMY	+	Bactérie possède enzyme amylase qui hydrolyse l'amidon	
Protéase	+	Bactérie possède enzyme caséinase qui hydrolyse la caséine dans lait	
TSI H2S Gaz	— — —	pas de fermentation des sucres (glucose, lactose , saccharose) ,Sans production de gaz , pas production de sulfure d'hydrogène donc pas réduction du thiosulfate	

4.4.3. Identification physiologique de la souche

Les tests physiologiques ont été réalisés par l'utilisation des méthodes classiques sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristique physiologique de la souche 1

Les tests	Résultats (- / +)	Explication	Les photos
VL (VF)	AO	Culture seulement en haut montre quel'isolats est aérobie stricte	
VP	+	Montre que la production du acétoïne par présence d'oxygène alcalin, oxydé en diacétyle qui réagit avec l'alpha- naphthol pour produire la couleur rouge	
RM	-	Pas de fermentation du glucose donc pas de formation d'acide formique et d'acide acétique	
IND	-	Pas d'enzyme tryptophanase	
H2S	-	pas de précipité noir donc pas de production de sulfure d'hydrogène	
CIT	-	Ne utilise pas le citrate comme un seule source de carbone	VERT

GLU	-	Pas de fermentation de glucose	
GLUC	+	Les bactéries utilisent les glucides par voie oxydative (bactérie oxydative)	
DHA	+	Halo rouge autour de la croissance indique la bactérie produit dihydroxyacétone	
NaCl	Tout C (g/l) : 2g-20g sont positive	Trouble bactérienne	
T°	20°C – 50°C (+) / 60°C (-)	Montre quel bactérie thermophile	
PH	Tout les PH entre 4 - 12 sont positive	Trouble bactérienne	

(+) Test positive (-) Test négative (AO) Aérobie (C) Concentration

Cette étude réalisée sur des échantillons d'eau prélevés à partir de source thermale de Hemmam Al Hadjeb (Biskra) avait pour objectif d'isoler et de sélectionner une souche thermophile dégradant le son de blé.

D'après les résultats, la souche sélectionnée est une bactérie du genre *Bacillus* sporulée thermophile aérobie (catalase positive) et mobile, utilise la voie oxydative pour oxydation des glucides et n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone, produit dihydroxyacétone et acétone par voie fermentative du glucose, produit pas l'hydrogène sulfureux H₂S et ne fermente pas les sucres (lactose ; saccharose ; glucose).

Possède des activités hydrolytiques (amylase, protéase, gélatinase, uréase), capable dégradé mannitol par réduction du mannose , possède l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

Discussion

Les caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche ont été comparées avec les caractéristiques de d'autres souche Bacillus. Elle est comparée au Bacillus dans la classification de Goldon et *al.*(1973) et aux souche étudiées par Zettam (2013) qui a déterminé les caractéristiques biochimiques de Bacillus thermophile isolé à partir de la source thermale de hammam debagh (guelma) (Zettam, 2013)

Tableau 4 : Comparaison les caractéristique biochimique des souches

C.B	Auteur	Souche 1	M. Zettam	R.E.Goldon	
			B. cereuse	B.cereuse	B. megaterium
Gram (+/-)		+	+	+	+
Endospore		+	+	+	+
Mobility		+	+	+	+
Catalase		+	+	+	+
Oxydase		+	/	/	/
Amylase		+	+	+	+
Gélatinase		+	+	/	/
Protéase		+	+	+	+
Glucose		-	-	+	+
Mannitol		+	+	-	+
Uréase		+	-	/	/
Indole		-	-	/	/
Nitrate		-	/	-	+

VP	+	-	+	-
RM	-	/	/	/
Citrate	-	-	+	+
Glucide	+	-	/	/
H ₂ S	-	-	-	+
A/F	A	A	F	A
DHA	+	+	-	+
T° (20-50C°)	20-50C° (+)	30-55C° (+)	20-45°C (+)	20-45°C (+)
pH 4-12	+	5 - 9 (+)	4 -7 (+)	4-6 (+)

(C.B) : caractéristique biochimique. (A/F) : aérobie aérobie facultative.

(/) : caractéristique ne existe pas.

D'après la comparaison rapportée dans le tableau 4, on remarque que le pourcentage de similarité des caractéristiques biochimiques de la souche 1 avec l'espèce *Bacillus cereus* dans l'article de M. Zettam est égale 78%. Par rapport aux souches de Goldon le pourcentage de similarité est égale à 66,66% pour *B. cereus* et 66,66% pour *B. megaterium*.

Par conséquent, l'isolat est une souche du Phylum Firmicutes , Class Bacili , Order Bacillaceae , Genre Bacillus, espèce *Bacillus cereuse* .

Conclusion

Plusieurs études ont montré que les eaux thermales sont une source importantes de microorganismes dégradant la matière lignocellulosique. Cette dégradation est assurée par un arsenal enzymatique d'enzymes lignocellulosiques caractérisées par une grande activité et stabilité aux températures élevées.

Dans le même contexte cette étude a entrepris, d'un côté, d'exploiter une source termale située dans la commune d'el hadjeb, à la wilaya de biskra, pour l'isolement et la sélection d'une souche productrice d'enzymes lignocellulosique thermophile. De l'autre côté, une matière lignocellulosique sous forme d'un déchet agricole, à savoir, l son de blé est utilisé comme substrat pour l'enrichissement, l'isolement et la sélection de cette souche.

Cette étude a aboutie à l'isolement et la sélection d'une souche thermophile capable de croître sur le son de blé comme seule source de carbone à 50°C. Cette souche produit des enzymes lignocellulolytiques active à 60°C. L'activité à cette température élevée permet à ces enzymes de résister les température élevée utilisées dans les différents processus industriels de traitement des matières lignocellulosiques. Elle a également comme avantage d'éviter les contaminations au cours du traitement et évite de refroidir cette matière, ce qui réduirait le coût de la production.

Les résultats indiquent que les eaux chaudes 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.

La souche présente également des activités protéolytiques (protéase) et amylolytique (amylase) et gélatinase, ce qui la rend très intéressante en industrie agroalimentaire.

Les tests morphologique, physiologiques et biochimiques on aboutis à identifier la souche comme appartenant au genre *Bacillus*. Cette souche présente d'une grande similarité avec une souche de l'espèce *Bacillus cereus* isolée elle-même d'eaux chaude d'un hamem. Le genre *Bacillus* est connu par sa production prolifique d'enzymes extracellulaires, ce qui est un avantage d'un points de vue industriel.

Perspectives

- ❖ Identification moléculaire de la souche sélectionnée.
- ❖ Optimiser, les conditions de la culture de la bactérie sélectionnée.
- ❖ L'identification des enzymes sécrétées par cette souche
- ❖ La détermination des propriétés physicochimique de ses enzymes, à savoir leurs activités et leurs stabilités aux différents pH, aux différentes températures et aux ions, le poids moléculaire.
- ❖ Valorisation du son de blé.

La bibliographie

Alfenore., Sandrine., Molina J., Carole.2016. La conversion microbienne des ressources lignocellulosiques pour la production de molécules énergétiques: verrous et perspectives. Innovations Agronomiques, vol (54), pp. 89-104.

Alarcón-Gutiérrez E. 2007. Influence de facteurs abiotiques sur la régulation des paramètres microbiens impliqués dans la dégradation de la matière organique d'une litière forestière méditerranéenne. Thèse de Doctorat , université Paul Cézanne, Aix-marseille III,France, p.241.

Ando., Susumu., Ishida., Hiroyasu., Kosugi., Yoshitsugu.2002. Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. Vol. 68, no 1, Appl Environ Microbiol. pp. 430-433.

Antranikian G., Robb F., Grogan D., Driessen A.2008. Industrial relevance of thermophiles and their enzymes in Thermophiles. Biology and Technology at high temperatures. New York .CRC Press 8:114-147.

Balan., Shanmugasundaram S., Nethaji., Rajendiran., Sankar., Sudalayandi. 2012. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus spp* isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites, vol. 2, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Asian, pp. S1811-S1816.

Bekhouche F.1991. Recherche de champignons cellulolytiques du sol des zone arides du Sahara algérien. Etude comparée des cellulases de *Lasiobolidium Orbiculoides* et *Aspergillus Terreus*. Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire . Costantine.

Bredberg K., Persson J., Christiansson M., Stenberg B., Holst O. 2001. Anaerobic desulfurization of ground rubber with the thermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* a new method for rubber recycling. Appl Microbiol Biotechnol 55:43-48.

Brown J.R., Malcolm R., Saxena., Inder M. 2000. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers, vol. 38, no1-2, Plant Physiology and Biochemistry, pp. 57-67.

Collins T, Gerday C, Feller G . 2005. Xylanases:xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol 29: 3-23.

Chatel G., Rogers R. D. 2013. Oxidation of Lignin Using Ionic Liquids An Innovative Strategy To Produce Renewable Chemicals. ACS Sustainable Chemistry and Engineering 2(3):322–339.

Clark J. H., Deswarte F. 2015. Introduction to chemicals from biomass, , 2nd-Ed, Wiley ,UK, p.344.

Crestini., Claudia., Crucianelli., Marcello., Orlandi., Marco. 2010. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers, vol. 156, no 1-2, Catalysis today, pp. 8-22.

Delerras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire, recherche de bactéries et de levures-moisissures. Edition Lavoisier , p. 31-70-126-143-145.

Denis F. 2007. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Éditeur :Elsevier Masson , p. 22, 23, 24, 26.

Duval A., Lawoko M. 2014. A review on lignin-based polymeric micro-and nanostructured materials. React. Funct. Polym 85:78–96.

Fitzpatrick., Michael., Champagne., Pascale., Cunningham., Michael F. 2010. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. vol. 101, no 23,Bioresource technology, pp. 8915-8922.

Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Skomarovsky A. A., Sinitsyna O. A., Berlin A. G., Ankudimova N. V. 2000. Indigo-binding domain in cellulase molecule. Biocatalysis fundamantals and applications, p.77-80.

Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. N. 1973. The genus bacillus. US Department of Agriculture handbook. Tab(01), pp. 117-119.

Guiraud J. P. 1998. Techniques d'analyses microbiologiques : microbiologie alimentaire. Dunod, paris, pp. 168-333.

Habibi., Youssef., Lucian A., Rojas., Orlando J. 2010. Cellulose nanocrystals: chemistry self-assembly and applications, vol. 110, Chemical reviews, pp. 3479-3500.

Harley J. P., Prescott L. M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edn, p.449.

Holden J. F. 2009. Extremophiles Hot Environments in Encyclopedia of microbiology, 3rd Ed, Schaechter, Elsevier, pp. 127-146.

Hu., Zhong-Ce ., Zheng., Yu-Guo., SHEN., Yin-Chu. 2011. Use of glycerol for producing 1, 3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor, vol. 102, Bioresource technology, pp. 7177-7182.

Lansing M., Prescott, John P., Harley., Donald A., Klein. 2003. Microbiologie. Editeur: De Boeck Supérieur, pp.142-836.

Lebo S. E., Gargulak J. D., McNally T. J., Wiley J., Sons., Hoboken N. J. 2001. Lignin In KirkOthmer Encyclopedia of Chemical Technology, pp 1–32.

Lee R. C., Hrmova M., Burton R. A. 2003. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from Barley with alpha-L-Arabinofuranosidase and beta-D-Xylosidase activity characterisation, primary structure and COOH-terminal processing. J Biol Chem 278:5377-5388.

Li K. C., Azadi P., Collins R., Tolan J ., Kim J. S., Eriksson K. E. L. 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. Enzyme Microb Technol 27(2):89-94.

Lu W. J., Wang H. T., Nie Y. F. 2004. "Effect of inoculating flower stalks and vegetablewaste with ligno-cellulolytic microorganisms on the composting process," Vol. 39, No. 5-6, Journal of Environmental Science and Health (Part B), pp. 871– 887.

Lynd., Lee R., Weimer., Paul J., Vanzyl., Willem H. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, vol. 66, no 3, Microbiol. Mol. Biol, pp. 506-577.

Mathis B. J., Marshall C. W., Milliken C. E., Makkar R. S., Creager S. E., MAY H. D. 2008. Electricity generation by thermophilic microorganisms from marine sediment. Appl Microbiol Biotechnol 78(1):147-155.

Maria P., Macwilliams. 2009. Citrate Test Protocol-Microbe Library

Mckendry P. 2002. Energy production from biomass (part 1), vol. 83, no 1, overview of biomass. Bioresource technology, p. 37-46.

Miller G. L. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Anal Chem 31(3):426-428.

Mirande C. 2009. Dégradation des fibres pariétales et système xylanolytique de Bacteroides xylanisolvens XB1AT et Roseburia intestinalis XB6B4, espèces bactériennes du microbiote intestinal humain. Thèse de doctorat. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Minic Z., Serre V., Hervé G. 2006. Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. C. R. Biologies 329: 527- 540.

Mohan D., Pittman C. U., Steele P. H. 2006. Pyrolysis of wood biomass for bio-oil: A critical review, Energy Fuels 20(3):848–889.

Moon R. J., Martini A., Nairn J., Simonsen J., Youngblood J. 2011. Cellulose Nanomaterials : Structure, Properties and Nanocomposites, Chem. Soc. Rev. 40 :3941-3994.

- Nanmori T., Watanabe T., Shinke R., Kohno A., Kawamura Y. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *Bacteriol*, 172:6669-72.
- Nishino T., Matsuda I., Hirao K. 2004. All-Cellulose Composite, *Macromolecules* 37:7683-7687.
- Perez J., Munoz-Dorado J., Rubia T., Martinez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose and hemicellulose. *Int Microbiol* 5:53–63.
- Ponzano B. C., Rossi M., Moracci M. 2011. Carbohydrate-Active Enzymes from Hyperthermophiles: Biochemistry and Applications. *Extremophiles Handbook*. Ed. Horikoshi K. Springer 4:430-440.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. Y., Singh D., Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem* 31:135–152.
- Parija S. C. 2009. *Textbook of Microbiology and Immunology*. Edition Elsevier, India, p. 47.
- Riccio P., Rossano R., Vinella M., Domizio P., Zito F., Sansevrino F., Delis A., Rosi I. 1999. Extraction and immobilisation in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbiol Technology* 24:123-129.
- Satyanarayana., Tulasi., Littlechild J., Kawarabayasi Y. 2013. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology* 35:156-162.
- Salyers A., Vercellotti J. R., West S. E., Wilkins T. D. 1977. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 33: 319-322.

Salyers A. A. 1979. Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. *Am J Clin Nutr.* 32(1):158-63.

Schwarz W. 2001. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria , vol. 56, no 5-6, *Applied microbiology and biotechnology*, pp. 634-649.

Scriban R. 1999. *Biotechnologie : Technique et documentation-Lavoisier* 5^{ème} édition. p.149-156-157.

Taarning., Esben., Osmundsen., Christian M., YANG., Xiaobo. 2011. Zeolite-catalyzed biomass conversion to fuels and chemicals, vol. 4, *Energy & Environmental Science*, pp. 793-804.

Vanwyk J. P. H., Mohulatsi M. 2003. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*, vol. 86, *Bioresource Technology*, pp. 21-23.

Winn J., Stephen A., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Edition Lippincott Williams and Wilkins. p.1453.

Wertz J. 2009. Valbiom 6^{èmes} Rencontres de la Biomasse Gembloux, p.

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J. C. 2000. Purification characterisation and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- β -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Euro. Biochem* 267:4970-4977

Zettam M. R. 2013. Contribution à l'étude de la biodiversité des bacillus extremophiles isolés de la source thermale de hammam debagh (guelma) et screening d'activités antimicrobienne. Thèse de doctorat, Université Aboubekr Belkaw, Tlemcen, pp. 29-32.

Annexes

Solution du substrat

1g de son de blé 90 mL Tampon phosphate .

Concentration du glucose dans milieu MEVAG

0.5 g de glucose100 ml de MEVAG .

Milieu glycérol

Glycérol10g

Caséine (ou peptone)0,3g

KNO₃2g

NaCl.....2g

K₂HPO₄2g

Oligo-éléments1ml

Agar18g

Solution d'oligo-éléments (1L)

Sulfate de magnésium5g

Carbonate de calcium2g

Milieu gélatine

0,4g de gélatine100 ml de gélose nutritive .

Indicature du milieu gélatine

Acide sulfurique (1N) : 28 ml AS1L eau distille .

Milieu amidon

Eau distillée.....90ml

Amidon1g

NH₄Cl.....0,5g

NaCl..... 0,25g

NaHPO₄..... 0,5 g

MgSO₄ 0,02g

Agar2,3g

à pH 7

Milieu de lait

5g de lait poudre100 ml de gélose nutritive.

Milieu TSI

Composition en g/l eau distillée

Peptone.....20g

Agar.....12g

Lactose.....10g

Sucrose.....10g

NaCl..... .5g

Extrait de levure.....3g

Extrait de viande.....3g

Glucose.....1g

Citrate de fer.....3g

Na₂S₂O₃.....0,3g

Rouge de phénol0,025g

pH 7

Tampon Phosphate

Solution NaHPO₄ (0,2M).....39 ml

Solution Na₂HPO₄ (0,2M).....61ml

L'eau distillée150ml

Solution liquide de NaOH jusqu' à PH = 7

DNS (Acide 3,5 DiNitroSalicylique)

Eau distillée1000ml

NaOH	16g
KNa tartrate	300g
DNS.....	10g

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى عزل واختيار سلالة محبة للحرارة المنتجة للإنزيمات المحللة للخلايا النباتية. حيث تم عزل 10 سلالات من المياه الدافئة في حمام الحاجب بعد النمو على نخالة القمح كمصدر وحيد للكربون. أظهر قياس نشاط التحلل الأنزيمي لركيزة خلايا نخالة القمح أن السلالة 1 تفرز إنزيمات خارجية محللة للخلايا الخلوية النباتية التي يكون مستوى نشاطها أعلى مقارنة بالسلالات الأخرى

تم كشف و تحديد النمط السلالة أنها تنتمي إلى جنس العصوية (باسيلوس) ونوعها العصوية العصوية (باسيلوس سيروس) كما ان إنزيمات هذه السلالة قابلة للتطبيق في قطاع الأغذية الزراعية

الكلمات المفتاحية: إنزيمات المحللة للخلايا الخلوية ، المحبة للحرارة ، العصوية العصوية ، نخالة القمح

Résumés

Cette étude a pour objectif l'isolement et la sélection d'une souche thermophiles productrice d'enzymes lignocellulolytiques. 10 souches sont isolées des eaux chaudes de hemamm El Hajeb après croissance sur milieu à base de son de blé comme seule source de carbone. La mesure de l'activité enzymatique de dégradation du substrat son de blé a montré que la souche 1 secrète des enzymes lignocellulolytiques extracellulaires dont le niveau d'activité est plus élevé comparé aux autres souches.

L'identification phénotipyque de la souche a révélée qu'elle appartiendrait au genre Bacillus et l'espèce Bacillus cereus.

Les enzymes de cette souche serait applicables dans le secteur agro-alimentaire.

Mots clés : Enzymes lignocellulolytiques, Thermophile, Bacillus cereus, son de blé.

Abstract

This study aims to isolate and select a thermophilic strain producing lignocellulolytic enzymes. 10 strains are isolated from warm waters of El Hadjeb hemamm after growth on wheat bran medium as the sole source of carbon. The measurement of the enzymatic degradation activity of the wheat bran substrate has shown that the strain 1 secretes extracellular lignocellulolytic enzymes whose level of activity is higher compared to the other strains.

The phenotypic identification of the strain revealed that it belongs to the genus Bacillus and the species Bacillus cereus.

The enzymes of this strain would be applicable in the agri-food sector.

Key words: Lignocellulolytic enzymes, Thermophilus, Bacillus cereus, wheat bran.