



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

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**BAALI Djoumana**

Le : mardi 9 juillet 2019

### Thème

**Isolement et sélection d'une souche bactérienne productrice de cellulases à partir des excréments d'une chèvre (*capra hircus*) (Biskra).**

---

#### Jury :

Mme. MERZOUGUI Imane	MCB	Université de Biskra	Président
Dr. HEBAL Hakim	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. BENCHARIF Selma	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

## **Remerciement**

*Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant, le miséricordieux, de m'avoir appris ce que j'ignorais, de m'avoir donné la santé et tout dont je nécessitais pour l'accomplissement de ce mémoire.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements pour mon grand et respectueux,*

*A notre enseignant HAKIM HEBAL, d'avoir accepté de m'encadrer pour mon projet de fin d'études, ainsi que pour son soutien, ses remarques pertinentes et son encouragement, son indulgence, et sa sympathie tout au long de la réalisation de ce travail .....Merci beaucoup monsieur.*

*J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble de jury madame MERZOUGUI et madame BENCHARIF pour l'honneur qu'il mon fait d'avoir accepté d'être président, rapporteurs et membres de jury de ce mémoire.*

*A tous l'équipe de laboratoire de l'hadjeb*

*En fin à tout personne qui à participer de loin ou de près à l'élaboration de ce projet.*

*Merci*

*Djoumana BAALI*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui ma donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **Nassima**.*

*A L'homme de ma vie, mon père **Abdelaziz**, écolle de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

*Que dieu les gardes et les protège.*

*Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, mes très chers frères **Mohammed, Adam et Ilyas** et mes chères sœurs ; **Hadil et Oumaïma**.*

*Et à toute la famille **BAALI** et **OAUNES**.*

*Djoumana **BAALI***

# **Sommaire**

**Remerciement****Dédicace****Liste des figures****Liste des abréviations****Liste des tableaux****Introduction**..... 1**Première partie : Synthèse bibliographique****Chapitre 1. Matière lignocellulosique et enzyme cellulolytique**

## 1. Biomasse lignocellulosique..... 3

## 1.1. Structure de la matière lignocellulosique..... 3

## 1.2. La cellulose..... 3

## 1.2.1. Structure de la cellulose..... 3

## 1.2.2. Les dérivés de la cellulose ..... 4

## 1.2.2.1. La carboxyméthyl cellulose..... 4

## 1.2.2.2. La microcristaline cellulose..... 5

## 1.3. Hémicellulose ..... 5

## 1.4. Lignine ..... 5

## 1.5. Enzymes lignocellulolytiques..... 5

## 1.5.1. Cellulases ..... 5

## 1.5.1.1.Types de cellulases..... 6

## 1.5.1.2. Classification des cellulases..... 7

## 1.5.1.3.Applications industrielles des cellulases..... 8

## 1.5.1.4.Microorganismes cellulolytiques..... 9

**Deuxième partie : Partie expérimentale****Chapitre 2. Matériels et méthodes**

## 2.1.Echantillonnage ..... 11

## 2.2. Isolement et sélection des souches cellulolytiques..... 11

## 2.2.1. Enrichissement..... 11

## 2.2.2. Isolement et sélection sur milieu de culture solide..... 12

## 2.2.3. Sélection sur milieu de culture liquide..... 12

## 2.3. Mesure de l'activité enzymatique ..... 12

## 2.4. Identification de la souche ..... 13

---

2.4.1. Observation macroscopique.....	14
2.4.2. Observation microscopique.....	14
2.4.2.1. Coloration de Gram .....	14
2.4.2.2. Coloration des spores .....	15
2.4.2.3. Mobilité.....	15
2.4.3. Tests physiologique.....	15
2.4.3.1. Type respiratoire.....	15
2.4.3.2. Voie fermentaire.....	15
2.4.3.3. Production d'indol.....	16
2.4.3.4. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron).....	16
2.4.3.5. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	16
2.4.3.6. Production de sulfure d'hydrogène.....	17
2.4.3.7. Fermentation du glucose.....	17
2.4.3.8. Températures de croissance.....	17
2.4.3.9. pH de croissance.....	17
2.4.3.10. Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	17
2.4.4. Tests biochimique .....	17
2.4.4.1. Catalase.....	17
2.4.4.2. Oxydase .....	18
2.4.4.3. Réduction de nitrates en nitrites.....	18
2.4.4.4. Uréase .....	19
2.4.4.5. Gélatinase .....	19
2.4.4.6. Hydrolyse de l'amidon .....	19
2.4.4.7. Dégradation de la caséine .....	19
<b>Chapitre 3. Résultats et discussion</b>	
3. Isolement et sélection des souches cellulolytiques.....	20
3.1. L'enrichissement.....	20
3.2. Isolement des souches cellulolytiques dans le milieu solide.....	20
3.3. Sélection sur milieux de culture liquide.....	21
3.4. Identification de la souche sélectionnée .....	22
3.4.1. Observation macroscopique.....	22
3.4.2. Observation microscopique .....	23
3.4.2.1. Coloration de Gram.....	23

---

3.4.2.2. Coloration des spores .....	23
3.4.2.3. L'état frais.....	23
3.4.3. Résultats des tests physiologiques.....	24
3.4.3.1.Type respiratoire.....	24
3.4.3.2.Voies fermentaires.....	25
3.4.3.3. Production d'indole.....	26
3.4.3.4.Le milieu TSI (Triple Sugar Iron).....	26
3.4.3.5.Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons.....	27
3.4.3.6.Production de sulfure d'hydrogène.....	27
3.4.3.7.Fermentation du glucose.....	28
3.4.3.8.Températures de croissance.....	28
3.4.3.9.pH de croissance.....	28
3.4.3.10. Croissance à différentes concentrations de NaCl.....	28
3.4.4. Résultats des tests biochimiques.....	28
3.4.4.1.Test de catalase.....	28
3.4.4.2.Test de l'oxydase.....	29
3.4.4.3.Réduction des nitrates.....	30
3.4.4.4.Uréase .....	30
3.4.4.5.Gélatinase .....	31
3.4.4.6.Hydrolyse de l'amidon .....	31
3.4.4.7.Dégradation de la caséine.....	31

## **Conclusion**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Résumé**

## Liste des figures

<b>Figure I:</b> Constituants de la matière lignocellulosique (Eloutassi <i>et al.</i> , 2014).....	3
<b>Figure II:</b> Structure moléculaire de la cellulose (Brown, 2004).....	4
<b>Figure III:</b> Les Classes d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose....	7
<b>Figure IV:</b> L'échantillon des excréments de chèvre ( <i>Capra hircus</i> ).....	11
<b>Figure V:</b> Les colonies de la souche S10 sur le milieu synthétique à base de carboxymethyl cellulose.....	21
<b>Figure VI:</b> Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.....	23
<b>Figure VII:</b> Observation microscopique de la souche S10 après la coloration de Gram a grossissement 100x.....	24
<b>Figure VIII:</b> Examen de mobilité (résultats positive).....	25
<b>Figure IX:</b> Test respiratoire (bactérie aéro-anaérobie facultative).....	25
<b>Figure X:</b> Résultat de Vosges Proskauer (résultat négative).....	26
<b>Figure XI:</b> Test de rouge de méthyle (résultat négative).....	26
<b>Figure XII:</b> Production d'indol (résultat négative).....	27
<b>Figure XIII:</b> Résultat positive de test TSI+production de gaz.....	27
<b>Figure XIV:</b> Citrate de simmons (résultat positive).....	28
<b>Figure XV:</b> milieu Hajna-Kligler (résultat négative).....	28
<b>Figure XVI:</b> Melieu MEVAG additioné le glucose (résultat positive).....	29
<b>Figure XVII:</b> Test de catalase (résultat positive).....	30
<b>Figure XVIII:</b> Résultat oxydases (oxydase positive).....	30
<b>Figure XIX:</b> Test du nitrate réductase après l'ajout de NR1 et NR2.....	31
<b>Figure XX:</b> Test uréase (résultat positive).....	31
<b>Figure XXI :</b> Résultat de l'hydrolyse de l'amidon (résultat négative).....	32
<b>Figure XXII :</b> Dégradation de la caséine (résultat positive).....	33

### Liste des abréviations

**CMC:** Carboxyméthyl cellulose.

**p /v :** masse par volume.

**DNS:** 3,5- acide dinitrosalicylique.

**rpm :** Rotation par minute.

**T (°C) :** Température en degré Celsius.

**EC :** Enzyme commission.

**NaCl :** Chlorure de potassium.

**NaHPO<sub>4</sub> :** Sodium hydrogénophosphate.

**NaOH :** hydroxyde de sodium.

**NH<sub>4</sub>Cl :** Chlorure d'ammomium.

**NR :** Réactif nitrate.

**TSI :** Triple Sugar Iron.

**Liste des tableaux**

<b>Tableau I:</b> Classification des enzymes cellulolytiques et leur système d'action (Sadhu <i>et al.</i> , 2013).....	7
<b>Tableau II:</b> l'activité enzymatique CMCCase des souches isolée dans le milieu CMC à pH 7 et 50°C.....	22
<b>Tableau III:</b> Comparaison des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques entre la souche S10 et la bactérie <i>Cellulomonas flavigena</i> (Field <i>et al.</i> , 2008).....	33

# **Introduction**

Des millions de tonnes de biomasse lignocellulosiques sont rejetés chaque année sous forme de déchets solides agro-industriels et forestiers sans traitements appropriés. Parmi les conséquences de ces rejets; la prolifération des parasites et la pollution de l'environnement en général (Ang *et al.*, 2015 ; Zha *et al.*, 2012 ; Dar *et al.*, 2013). Aussi, l'augmentation du prix du pétrole et l'aggravation des émissions des gaz à effet de serre, justifient la recherche de matières premières et de technologies alternatives capables de réduire la dépendance en ces combustibles fossiles et de protéger l'environnement (Eloutassin *et al.*, 2014).

La biomasse lignocellulosique (toutes les plantes et les matériaux d'origine végétale) est la matière organique la plus abondante et renouvelable sur la terre. Elle représente une grande ressource potentielle pour la production de biocarburant, parce qu'elle est largement abondante et bon marché et sa production est écologiquement rationnelle. Les composants majeurs des matériaux lignocellulosiques sont la cellulose, l'hémicellulose ainsi que la lignine (Maki *et al.*, 2009). Cependant, la biomasse lignocellulosique n'est pas directement accessible aux enzymes, elle doit subir au préalable une phase de prétraitement dont l'objectif est d'améliorer la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Kuhad *et al.*, 2011).

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur terre, vu qu'elle représente environ la moitié de toute la biomasse, avec une production annuelle estimée entre 1011-1012 tonnes par an (Varshney *et al.*, 2011).

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose sont appelées cellulases ou glycoside hydrolases (Nemeth *et al.*, 2002). En raison de la complexité structurale des celluloses, leur dégradation complète implique tout un système comprenant une variété d'enzymes dont les endoglucanases qui hydrolysent au hasard les liaisons internes  $\beta$  (1-4) de la chaîne cellulosique, les exoglucanases attaquent les deux extrémités de la chaîne cellulosique, et les  $\beta$ -glucosidases hydrolysent la liaison  $\beta$ -glucosidique du cellobiose (Mc Carthy *et al.*, 1992).

Les cellulases montrent une large gamme d'applications dans plusieurs secteurs tels que la chimie, l'alimentation humaine et animale, les pâtes et papiers, le textile, l'automobile, l'électronique et, surtout, l'énergie (Zhang *et al.*, 2012).

Le développement de ces applications dépend en grande partie de la performance des cellulases dans les conditions industrielles. Peu de cellulase isolée jusqu'à présent sont performantes, d'où la nécessité de rechercher de nouvelles enzyme cellulolytiques. Les microorganismes restent la meilleure source pour l'isolement de ces enzymes, et d'autres environnements ne sont pas encore exploités (Leghlimi, 2013).

L'objectif de ce travaille est l'exploitation d'une nouvelle source d'isolement de microorganismes producteur de cellulases, à savoir, les excréments de chèvre (*Capra hircus*).

Ce document s'articule de la façon suivante :

Le premier chapitre présente les données de la littérature concernant la biomasse lignocellulosique, sa structure et ses composants, ainsi que les cellulases et ses applications. Le deuxième chapitre est consacré aux matériel et méthodes. Le troisième chapitre rapporte les résultats et leur discussion. A la fin une conclusion et des perspectives sont retirées de ce travail.

**Première partie**  
**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 1**

**Matière lignocellulosique**

**et**

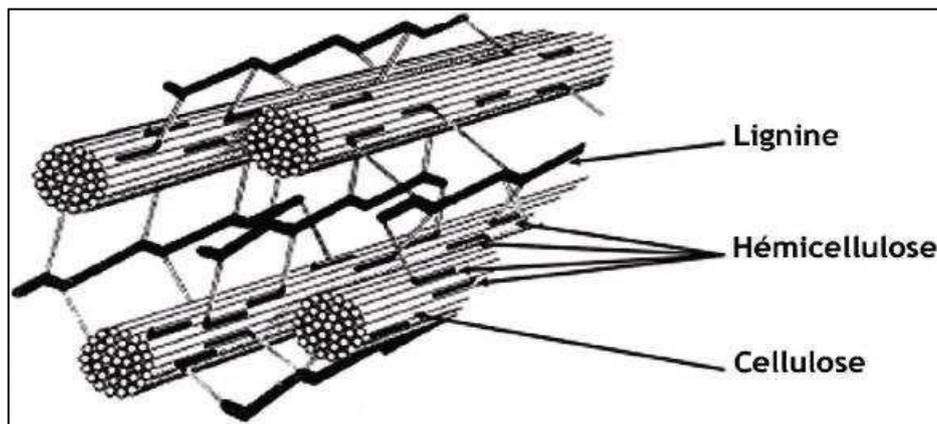
**Enzymes cellulolytique**

## 1. Biomasse lignocellulosique

La biomasse lignocellulosique représente la ressource renouvelable la plus importante et la plus abondante dans le monde. Elle représente une alternative au pétrole pour produire de l'énergie (biocarburants) et des matériaux. La bioraffinerie actuellement en plein essor est basée sur la valorisation totale des plantes. Environ 200 milliards de tonnes sont produites chaque année (Zhang, 2008).

### 1.1. Structure de la matière lignocellulosique

La matière ligno-cellulosique est constituée de trois composants majeurs : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (fig.1). Elle représente la plus grande majorité de la biomasse. En moyenne, la matière lignocellulosique contient 40-60 % de cellulose, 20-40 % d'hémicelluloses et 10-25 % de lignine (Privas, 2013).



**Figure 1.** Constituants de la matière lignocellulosique (Eloutassi *et al.*, 2014).

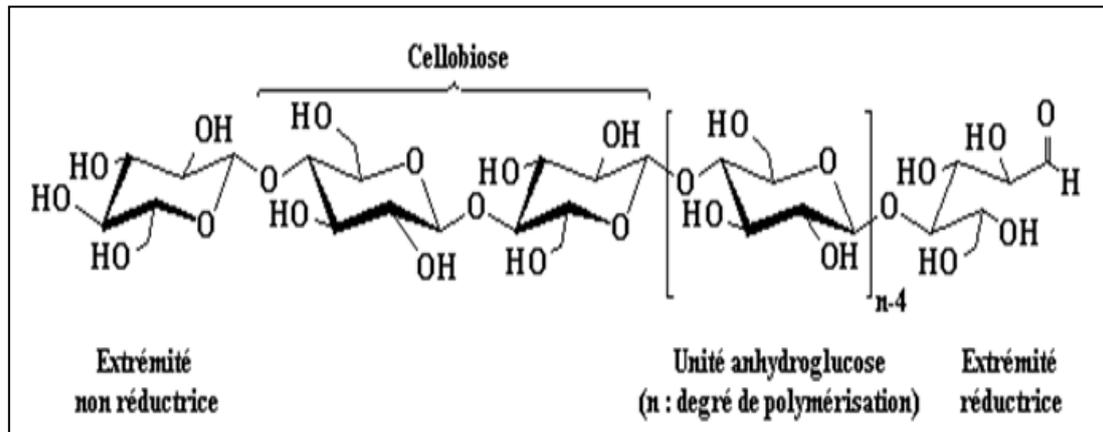
### 1.2. Cellulose

La cellulose est le plus important polysaccharide de la planète. Elle représente entre 20 et 50% de la matière sèche des parois cellulaires végétales. La quantité de cellulose produite par la biomasse par an est de l'ordre de 1500 milliards de tonnes (Liu *et al.*, 2010). Elle se trouve en majorité dans les parois cellulaires des végétaux supérieurs et des algues et forme des fibres qui constituent le squelette des parois primaires et secondaires des cellules végétales (Reece *et al.*, 2012).

#### 1.2.1. Structure de la cellulose

La cellulose est un homopolymère constitué de longues chaînes linéaires d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison glycosidique β-1,4 (Bledzki *et al.*, 1999).

L'unité qui se répète dans les fibrilles de cellulose est la cellobiose, qui est un dimère de cellulose (fig.2).



**Figure 2.** Structure moléculaire de la cellulose (Brown, 2004).

Les molécules de cellulose forment une hélice à deux résidus par tour, stabilisées par des liaisons hydrogène (Zhbankov, 1992). Ensuite, ces polymères forment des rubans parallèles à l'aide de liaisons inter et intramoléculaires correspondant à des micelles cristallines très rigides. Ensuite, ces micelles vont s'organiser en micro-fibrilles de cellulose qui font environ 25 à 30 nm de diamètre (Sun, 2010). Les micro-fibrilles de cellulose vont ensuite s'organiser en macro-fibrilles de 15 à 20 nm de diamètre (Zeitoun, 2011).

Les fibres de cellulose sont le squelette des parois primaire et secondaire des cellules végétales. La longueur de la chaîne de cellulose et donc le degré de polymérisation varient selon les végétaux. Le degré de polymérisation de la cellulose, c'est-à-dire le nombre d'unités de glucose par molécule, est différent selon le végétal étudié et peut aller jusqu'à 16000 unités (Sun, 2010).

## 1.2.2. Les dérivés de cellulose

### 1.2.2.1. La carboxyméthyl cellulose

La carboxyméthylcellulose (CMC) est un dérivé de cellulose hydrosoluble avec des groupes carboxyméthyle (-CH<sub>2</sub>-COOH) lié à certains des groupes hydroxyle des monomères de glucopyranose qui forment le squelette de la cellulose par réaction avec l'acide alcalin et l'acide chloracétique. La structure du CMC est basée sur le polymère β-(1-4) Dglucopyranose de la cellulose (Miyamoto *et al.*, 1989).

### **1.2.2.2. Microcristalline cellulose**

La cellulose microcristalline (MCC) est commercialisée sous la marque Avicel (Fmc, 2013). La MCC est une cellulose purifiée partiellement dépolymérisée préparée en traitant l' $\alpha$  cellulose (type I $\beta$ ), obtenue sous forme de pulpe à partir de matière végétales fibreuses, avec des acides minéraux (Thoorens *et al.*, 2014).

### **1.3. Hémicellulose**

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

### **1.4. Lignine**

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

### **1.5. Enzymes lignocellulolytiques**

Les enzymes lignocellulolytiques, parmi les puissantes enzymes produites par les microorganismes, peuvent être largement exploitées dans diverses industries à base de lignocelluloses (Prakash *et al.*, 2013). Les lignocellulases sont des enzymes hydrolytiques capables de dégrader la lignocellulose résistante dans la biomasse végétale et comprennent les cellulases, les hémicellulases et les enzymes lignolytiques (Mtui, 2012).

#### **1.5.1. Cellulases**

Les cellulases sont un groupe d'enzymes responsables de dégrader de la cellulose dans la nature. Les cellulases sont produites principalement par des microorganismes (bactéries et champignons) (Lynd *et al.*, 2002), mais aussi par des organismes représentant le règne animal, y compris des insectes, des mollusques, des nématodes et des protozoaires (Watanabe, 2001).

Les cellulases sont des hydrolases qui catalysent le clivage de liaisons  $\beta$ -1,4glycosidiques de la cellulose avec addition concomitante de l'eau au point de clivage. Même si un seul type de liaison chimique est présent dans la cellulose, des enzymes avec différents modes d'action sont nécessaires pour une dégradation complète du polymère récalcitrant et insoluble. Dans la nature, un organisme peut produire les enzymes nécessaires à la dégradation complète de la cellulose, bien que l'action synergique de nombreux organismes ait également été suggérée (Wilson, 2011).

#### **1.5.1.1. Types de cellulases**

L'hydrolyse enzymatique complète de la matière cellulosique requière différents types de cellulases à savoir : les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les  $\beta$ -glucosidases (Acharya *et al.*, 2012), (fig.3).

##### **a. Endo $\beta$ (1-4)-glucanase ou endocellulase (EC 3.2.1.4)**

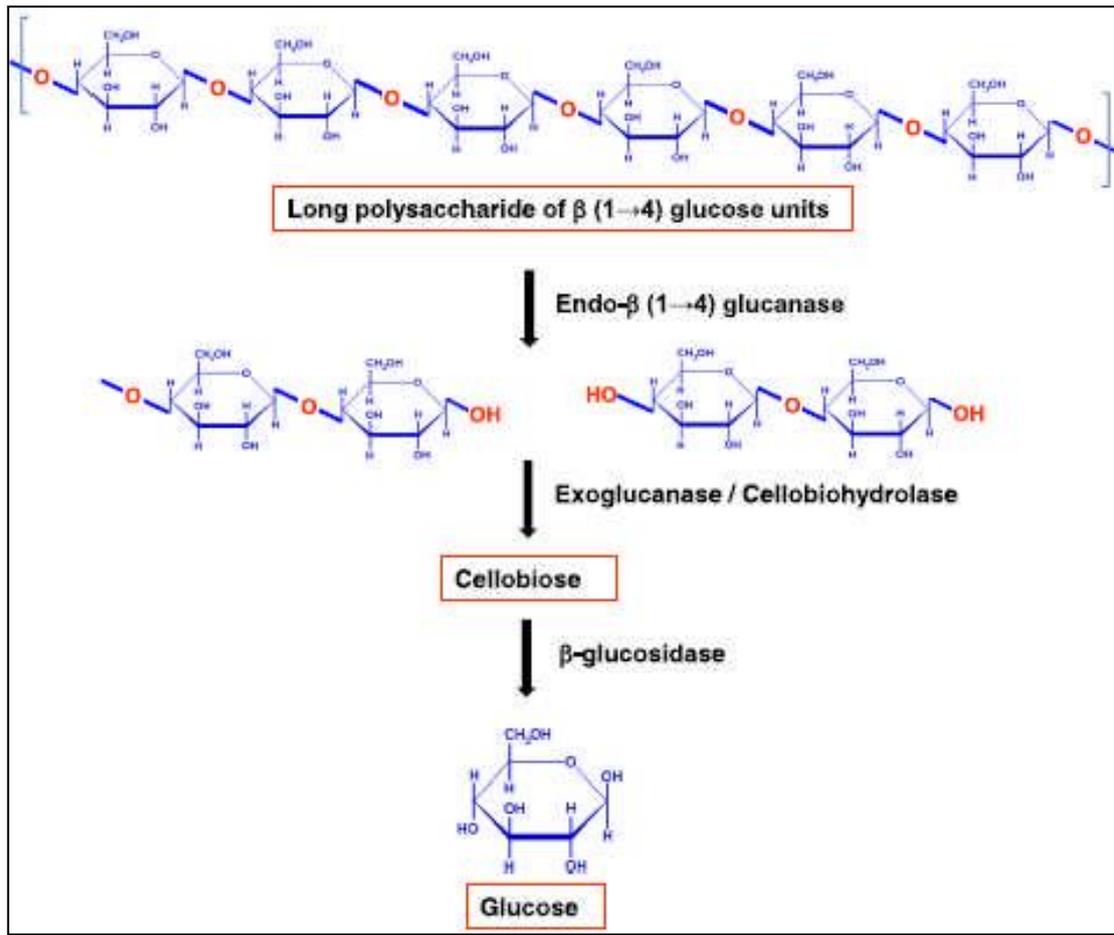
Elles coupent la cellulose aléatoirement à l'intérieure de la chaîne de cellulose et au niveau des zones amorphes, générant de nouvelles extrémités libres (Pérez *et al.*, 2002).

##### **b. Exo $\beta$ (1-4)- glucanase ou cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91)**

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

##### **c. Les $\beta$ -glucosidases ou cellobiase (EC 3.2.1.21)**

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



**Figure 3:** les classes d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose (Lakhundi *et al.*, 2015).

### 1.5.1.2. Classification des cellulases

Les cellulases sont classées en plusieurs familles de glucoside hydrolases sur la base de leur similarité de séquence (tab. 1) (Sadhu *et al.*, 2013).

**Tableau 1 :** Classification des enzymes cellulolytiques et leur système d'action (Sadhu *et al.*, 2013).

Enzyme	E.C .nombre	Réaction	Autre nom	Famille
Endo -1,4 $\beta$ -D-glucanglucanohydrose	E. C. 3. 2. 1.4	Casse la liaison interne de cellulose amorphe et libérant les oligosaccharides	Endoglucanase, Endo-1,4- $\beta$ -glucanase, Carboxymethyl cellulase, $\beta$ -1,4-endoglucohydrolase, Endocellulase	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74

$\beta$ - Glucosidases ou $\beta$ -D-glucoside gluco-hydrolases	E.C.3.2.1.21	Hydrolyse la cellobiose et libérant le glucose	Gentobiase, Cellobiase, Amygdalase.	1, 3, 9
Exoglucanase or 1,4- $\beta$ -D-glucan- cellobiohydrolas es (cellobiohydrolas es	E.C.3.2.1.91	Hydrolyse la liaison 1,4-bêta- D-glucosidique de cellulose et libérant de cellobiose	Exoglucanase, Exocellobiohydrolase, 1,4- $\beta$ - cellobiohydrolase	5, 6, 7, 9, 10, 48

### 1.5.1.3. Applications industrielles des cellulases

La biotechnologie des cellulases a débuté vers les années 1980 dans l'alimentation animale (Chesson, 1987) et en suite dans l'industrie du textile, de la lessive et du papier. Actuellement, elle occupe environ 20 % du marché mondial des enzymes (Bhat, 2000 ; Lekchiri *et al.*, 2006). Les performances élevées atteintes leur ouvrent des perspectives intéressantes pour différentes applications industrielles (Scriban, 1993), dans les industries de transformation de l'amidon, de brasserie, l'extraction de jus de fruits et légumes. L'une des applications potentielles des cellulases est la production d'éthanol-carburant à partir de la biomasse lignocellulosique (Gao *et al.*, 2008).

### 1.5.1.4. Microorganismes cellulolytiques

La cellulolyse est l'étape fondamentale de la transformation de la cellulose en sucres fermentescibles et en produits économiquement rentables, Elle correspond à l'hydrolyse biologique de la cellulose en molécules de plus petite taille comme les cellodextrines, le cellobiose et le glucose. Les cellulases sont largement répandues dans la nature (Xu *et al.*, 2000). Elles sont produites principalement par les champignons, les bactéries et les protozoaires qui catalysent l'hydrolyse de la cellulose. Cependant, il y a également des cellulases produites par d'autres organismes vivants comme : les plantes, les vers, les mollusques, les insectes, etc. (Odier, 1985). De ce fait, les cellulases peuvent avoir plusieurs origines : animale, végétale, et microbienne.

La flore cellulolytiques est très variée; elle se retrouve dans des écosystèmes divers constitués par les composts, les fumiers, les litières, les boues d'estuaires, le fond des lacs et le

tractus digestif des animaux. Ces microorganismes appartiennent à des groupes taxonomiques très variés pouvant être groupés suivant leur appartenance au groupe Eucaryotes ou Procaryotes, leur température de croissance qui permet de distinguer les microorganismes mésophiles et les microorganismes thermophiles, et enfin suivant leur comportement vis-à-vis de l'oxygène (Tchunden, 1990).

**a. Microorganismes procaryotes**

Ce groupe comprend les bactéries cellulolytiques et pseudocellulolytiques. Suivant le mode de respiration, on distingue les bactéries anaérobies strictes et les bactéries aérobies anaérobies facultatives.

- **Bactéries cellulolytiques**

Les bactéries sont moins étudiées que les champignons. Cependant certaines d'entre elles ont fait l'objet de nombreux travaux. *Clostridium thermocellum* est la bactérie cellulolytique la mieux connue et la plus étudiée ; Elle permet la conversion directe de la cellulose en éthanol, en acides organiques et en gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). C'est l'une des rares bactéries qui produit des cellulases aussi efficaces dans l'hydrolyse de la cellulose cristalline (Johnson *et al.*, 1982) que les cellulases de *Trichoderma reesei*. *Cl. thermocellum* est une bactérie anaérobie saprophyte. Son système enzymatique est très étudié. Les cellulases secrétées par cette bactérie ont tendance à s'associer en un complexe de haute masse molaire (2 millions de daltons) appelé cellulosome (Lamed *et al.*, 1983 ; Bayer *et al.*, 1983), composé d'au moins 14-18 polypeptides de masse molaire comprise entre 48 000 et 210000 daltons.

A côté de *Cl. thermocellum*, certaines bactéries ont été également étudiées et possèdent des caractéristiques remarquables. C'est le cas de *Bacteroides succinogenes* qui est capable de dégrader les celluloses les plus cristallines. Elle adhère fortement aux fibres de cellulose. Le système cellulolytique de cet organisme semble particulièrement complexe (Schellhorn, 1984). *Acetivibrio cellulolyticus*, bactérie anaérobie mésophile ne semble capable de fermenter que la salicine, le cellobiose et la cellulose en produisant principalement de l'acide acétique et des gaz (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) ; de plus cette bactérie possède une forte activité cellulase sur différents types de substrats cellulosiques (Patel, 1982). Les bactéries aérobies et aérobies-anaérobies facultatives comprennent les genres *Pseudomonas*, *Cellvibrio* et *Cellulomonas*. Les *Cellulomonas* sont des organismes capables d'utiliser de nombreuses sources de carbone et entre autres les hémicelluloses comme le xylane (Peiris, 1982). La fermentation de ces

sucres conduit à la production d'acétone, de lactate, de formate, de succinate, d'éthanol et de gaz carbonique.

Certaines souches d'actinomycètes produisent des cellulases : *Streptomyces reticuli* (Schlochtermeyer *et al.*, 1992), et *Thermomonospora fusca* (Tuncer *et al.*, 1999), des cellulases ont été aussi déterminées. Les archaebactéries comme *Thermotoga neapolitana* (Bok *et al.*, 1998), et *Pyrococcus horikoshii* (Ando *et al.*, 2002), constituent une source importante de cellulases thermostables pouvant résister à des températures supérieures à 100°C pendant plus d'une heure.

**Deuxième partie**  
**Partie expérimentale**

# **Chapitre 2**

## **Matériels et méthodes**

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été effectué pendant le mois de janvier. Un échantillon d'excréments de chèvre (*Capra hircus*) est prélevé à la commune de Mkhadma, wilaya de Biskra, à l'aide d'une spatule stérile et introduits dans un flacon stérile. Le flacon est acheminé immédiatement au laboratoire et conservé à 4°C.



**Figure 4.** Photo de l'échantillon d'excrément de chèvre (*Capra hircus*).

### 2.2. Isolement et sélection des souches cellulolytiques

#### 2.2.1. Enrichissement

Devant un bec benzène, 10 gramme de l'échantillon d'excrément de chèvre ont été pesée et introduit stérilement dans une fiole contenant 100 ml de milieu de culture synthétique liquide à base de CMC. Le milieu contient en g/l : CMC =10g, NaCl = 2,5 g, NH<sub>4</sub>Cl= 5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 5 g, MgSO<sub>4</sub> =0,2 g, Eau distillée =1l. Le milieu est ajusté à pH 7.

La suspension d'excrément à été bien mélangée puis incubée à une température de 40°C pendant 15 jours.

### **2.2.2. Isolement et sélection sur milieu de culture solide**

Après 15 jours d'incubation, une série de dilutions jusqu'à  $10^{-7}$  ont été effectuées en prélevant 1ml du milieu d'enrichissement et le transféré successivement dans des tubes contenant 9ml de l'eau distillé stérile.

Le même milieu solide à base de CMC est ensemencé en surface par 0.1 ml de dilutions appropriées, puis incubés à 40°C pendant 2 jours.

Les souches isolées sont sélectionnées sur la base de formation de zones claires autour des colonies poussant sur un milieu solide à base de CMC. En effet, les souches sécrètent dans le milieu solide des cellulases qui dégrade la CMC ce qui aboutie à la formation des zone claires autour des colonies.

Les colonies sélectionnées sur le milieu solide ont été purifiées par repiquage sur le même milieu puis incubées à 40°C pendant 48h.

Les souches purifiées ont été ensuite transférées dans des tubes de gélose nutritive inclinée pour être conservées à 4°C.

### **2.2.3. Sélection sur milieu de culture liquide**

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

Les souches montrant des zones claires sur milieu solide ont été ensemencées dans des tubes contenant 7ml de milieu liquide à base de CMC, puis incubées à 40°C pendant 48h.

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

## **2.3. Mesure de l'activité enzymatique**

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

Une solution de CMC (1%) a été préparée en dissolvant 1g de CMC dans 100 ml de tampon phosphate de sodium à pH 7 (voir Annexe 4).

Le mélange réactionnel contient 0,1 ml de surnageant (extrait enzymatique) et 0,9 ml de la solution de CMC (1%). Il a été incubé à 50°C pendant 30 minutes. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 1,5 ml de DNS (voir Annexe 3). Le mélange a été porté à ébullition à 100°C pendant 5 minutes puis refroidi dans une eau glacée.

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

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

La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de glucose de 0,01 à 0,9 mg/ml.

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

$$\text{Activité enzymatique (UI/ml)} = (\text{Cx} - \text{Ctb}) \times \text{D/t}$$

**Cx** : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (µmole/ml).

**Ctb**: Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (µmole/ml).

**D** : facteur de dilution

**T** : temps d'incubation (minutes)

Une unité (U ou umol / min) de l'activité CMCCase a été définie comme la quantité qui a produit un µmol de glucose par minute.

#### 2.4. Identification de la souche

La caractérisation morphologique, biochimique et physiologique de la souche sélectionnée est effectuée selon les méthodes d'identification conventionnelles (Renaud, 2000 ; Denis *et al.*, 2011 ; Claus *et al.*, 1989 ; Singleton, 2005).

### 2.4.1. Observations macroscopiques

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu CMC pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies sur milieu solide .Et trouble dans le milieu liquide (Denis *et al.*, 2011).

### 2.4.2. Observations microscopiques

Les souches âgées de 24 h et 48 h font l'objet d'une coloration de Gram, afin de déterminer le Gram et la forme des cellules (Denis *et al.*, 2011).

#### 2.4.2.1. Coloration de gram

Il a été effectué sur un frottis bactérien, préparé à partir des colonies suspectes en cultures pures, puis fixé et coloré par la méthode de Gram (Denis *et al.*, 2011).

- **Coloration avec le violet de gentiane**

Le violet de gentiane est un colorant basique qui se fixe sur les composants de cytoplasme bactérien, à ce moment toutes les bactéries sont de couleur violette pendant 30s. (Denis *et al.*, 2011).

- **Mordançages au lugol (30secondes).**

Le lugol est un mordant qui renforce l'adhésion du violet de gentiane au niveau cytoplasme bactérien (Denis *et al.*, 2011).

- **Décoloration à l'alcool (30 secondes).**

La bactérie Gram - ont une paroi mince et riche en lipide, ce qui permet le passage de l'alcool qui va entraîner avec lui violet de gentiane et la cellule vont devenir transparentes, la paroi des bactéries Gram+ par contre est épaisse, qui empêche l'alcool de pénétrer et de ce fait de décolorer les cellules (Denis *et al.*, 2011).

- **Coloration avec la fuchsine (1 minute)**

Cette étape sert à colorer la bactérie Gram négative qui se sont décolorée lors du traitement précédent, recouvrir la lame par fuchsine et laissé 1 munit avant de lavez avec l'eau distillé, puis sèche entre deux feuille papier filtre, examiner à immersion (Denis *et al.*, 2011).

### 2.4.2.2. Coloration des spores

La souche âgée de 24 h, 48 h et 72 h font l'objet d'une coloration des spores par le vert de malachite sur un frottis préparé préalablement. Puis l'ajoute des quelques gouttes de vert de malachite, flamber la lame dans le bec benzène jusqu'à l'apparition de la vapeur et laisser la refroidir. Le flambage répéter trois fois (RENAUD *et al.*, 2000).

### 2.4.2.3. Mobilité

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

## 2.4.3. Tests physiologiques

### 2.4.3.1. Type respiratoire

Le comportement des souches vis-à-vis de l'oxygène a été déterminé dans la gélose viande-levure. La souche estensemencée, dans la gélose maintenue en surfusion, par piqûre centrale jusqu'au fond du tube à l'aide d'une pipette boullée. Celle-ci est remontée, par la suite, dans un mouvement en spirale, jusqu'à 1 cm de la surface du milieu. La croissance est observé après 24, 48 ou 72 h d'incubation à 37°C (Renaud *et al.*, 2000).

### 2.4.3.2. Voies fermentaires

Les microorganismes diffèrent sur la base des produits terminaux qui dérivent de l'acide pyruvique durant la fermentation du glucose.

#### a. Réaction de Voges-Proskauer

Elle met en évidence les produits de la fermentation butanediolique. Le milieu Clark et Lubs estensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 48 h. Par la suite, dans un tube à hémolyse stérile, 1 ml de la culture est additionné, dans l'ordre, de 0,5 ml d' $\alpha$ -naphthol (6%) et de 0,5 ml de KOH (4M). Après une légère agitation pendant 30 secondes à une 30 minute, le tube est maintenu en position inclinée pendant 10 à 15 minutes. La présence de

l'acétoïne (réaction positive) se traduit par l'apparition, dans 2 à 5 min, d'une coloration rouge en surface pouvant diffusé dans le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

#### **b. Réaction au rouge de méthyle**

Le rouge de méthyle révèle l'acidification qui résulte des fermentations acides mixtes. Le milieu Clark et Lubs est ensemencé par la souche puis incubé à 37 °C pendant 4 jours. Par la suite, 2 ml de la culture sont transvasés dans un tube à hémolyse stérile, suivi de deux gouttes de l'indicateur. Une teinte rouge franche indique une réaction positive, une teinte jaune, une réaction négative (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.4.3.3. Production d'indole**

Elle est mise en évidence dans 1 ml de milieu urée-indol et dans 5 ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les milieux ont été ensemencés abondamment par la souche et incubés à 37°C pendant 24 h. Par la suite, cinq gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à la culture, suivi d'une agitation. Au repos, la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge à la surface des milieux (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.4.3.4. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)**

C'est un milieu différentiel par la capacité à mettre en évidence les fermentations du : glucose, lactose et/ou saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) et de gaz. Le rouge de phénol est l'indicateur colorant virant du rouge au jaune pour un résultat positif. Le noircissement du culot indique la présence de H<sub>2</sub>S (Renaud *et al.*, 2000).

La souche est ensemencée à la surface de la pente de la gélose puis par piqûre centrale du culot au moyen d'une pipette bouchée, puis incubé à 40°C pendant 48 h. La fermentation du lactose se traduit par un jaunissement à la surface (Denis *et al.*, 2007).

#### **2.4.3.5. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons**

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est Testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons incliné. Après incubation 50°C pendant 48h, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (Denis *et al.*, 1987).

#### **2.3.4.6. Production de sulfure d'hydrogène**

La souche estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du milieu Hajna-kligler. Après 24 h d'incubation à 37°C, La production de sulfure d'hydrogène se traduit par la formation d'un précipité noir dans le culot (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.3.4.7. Fermentation du glucose**

Le glucose est incorporé, aseptiquement, à une concentration finale de 0,5 % (v/v), au milieu MEVAG maintenu en surfusion. La souche estensemencée par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen d'une pipette boulée. Le milieu est recouvert par une couche de paraffine, puis incubé à 37°C pendant 48 h. La fermentation du glucose se traduit par un jaunissement dans tout le milieu (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.4.3.8. Températures de croissance**

L'aptitude à croître à différentes températures, à 5°C d'intervalle, est déterminée dans la gélose nutritive inclinée. Avant ensemencement, les géloses sont préincubées jusqu'à l'équilibre de leur température avec la température d'incubation. Les milieux ensemencés sont incubés pendant 3 jours à 55°C ou plus, 05 jours entre 30 et 50°C, 14 jours à 20°C et 25°C et 21 jours à 15°C (Claus *et al.*, 1989).

#### **2.4.3.9. pH de croissance**

La souche estensemencée dans 05 ml de bouillon nutritif ajusté au pH 4 à 12 .Un trouble microbien est observé après 21 jours d'incubation à 30° (Claus *et al.*, 1989).

#### **2.4.3.10. Croissance à différentes concentrations de NaCl**

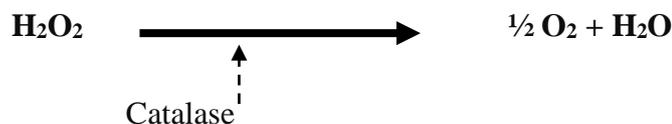
Des bouillons nutritifs (3 ml) contenant 0, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18 et 20 g /l de NaCl sont ensemencés par la souche. Les tubes sont incubés à 30°C, en position inclinée afin de favoriser l'aération. Un trouble microbien est observé après 7 et 14 jours d'incubation (Claus *et al.*, 1989).

### **2.4.4. Tests biochimiques**

#### **2.4.4.1. Catalase**

La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formé comme sous produit de processus

métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



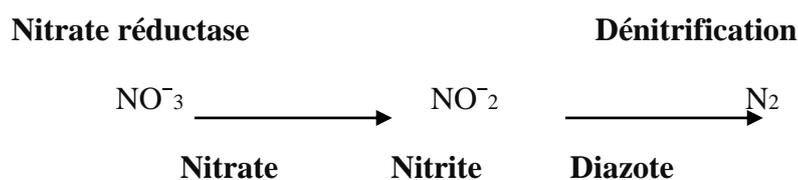
Ce test est réalisé selon la méthode sur lame. La souche est dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (v/v), sur une lame d'observation microscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène (Singleton, 2005).

#### 2.4.4.2. Oxydase

L'action de l'oxydase sur le réactif de Gordon et McLeod donne lieu à un produit chromogène. Ainsi, ce réactif est versé directement sur les colonies à la surface de gélose nutritive inclinée. La production de l'oxydase se traduit par une coloration violette intervenant dans les 10 à 30 secondes (Renaud *et al.*, 2000).

#### 2.4.4.3. Réduction des nitrates en nitrites

Le nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant les réactifs NR1 et NR2. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification selon :



Le bouillon nitrate estensemencé par une demi öse de la culture solide. Après 24 h d'incubation à 37°C, 5 gouttes de chacun des réactifs NR1 et NR2 sont ajoutées avec agitation. L'apparition d'une coloration rose ou rouge indique une réduction des nitrates en nitrites. Dans le cas contraire, le test est complété par l'épreuve de Zobell. Dans cette dernière, une pincée de poudre de Zinc est ajoutée au milieu, suivie d'une agitation pendant 5 min. L'apparition d'une couleur rouge brin indique la présence des nitrates, et la souche est nitrate réductase négative (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.4.4.4. Uréase**

Un ml de milieu urée-Indole estensemencé abondamment par la culture puis incubé à 37°C pendant 48 h. La variation de la couleur du milieu de l'orange au rouge indique un test positif (Renaud *et al.*, 2000).

#### **2.4.4.5. Gélatinase**

La souche estensemencée par strie dans deux géloses nutritives contenant 0,4% de gélatine. Après 3 ou 5 jours d'incubation, les boîtes sont inondées par 10 ml d'une solution d'acide sulfurique (1N) saturée par le sulfate de sodium. L'apparition, dans une heure, d'un éclaircissement autour et au dessous de la croissance indique une hydrolyse de la gélatine (Claus *et al.*, 1989).

#### **2.4.4.6. Hydrolyse de l'amidon**

La souche estensemencée par strie sur deux géloses à l'amidon. Après 3 jours d'incubation à 30°C, l'une des boîtes a été inondée par l'éthanol (90%). L'apparition, après 15 à 30 s, d'un éclaircissement autour de la croissance, en contraste avec le reste du milieu qui devient opaque, indique une hydrolyse de l'amidon. Dans le cas contraire, le test est répété sur l'autre gélose après 5 jours d'incubation (Claus *et al.*, 1989).

#### **2.4.4.7. Dégradation de la caséine**

La souche estensemencée par strie sur la gélose au lait (50% de lait écrémé et 50% d'agar). Une zone claire autour et au dessous de la croissance est observée après 7 ou 14 jours d'incubation à 30°C (Claus *et al.*, 1989).

# **Chapitre 3**

## **Résultats et discussion**

La chèvre (*Capra hircus*) est un animal ruminant consommant des matières lignocellulosiques. Il contient dans son système digestif une microflore microbienne capable de dégrader la cellulose. Certains de ces microorganismes se trouvent après digestion dans les excréments. Ces derniers constituent par conséquent une source potentielle d'isolement de microorganismes cellulolytiques.

### 3. Isolement et sélection des souches cellulolytiques

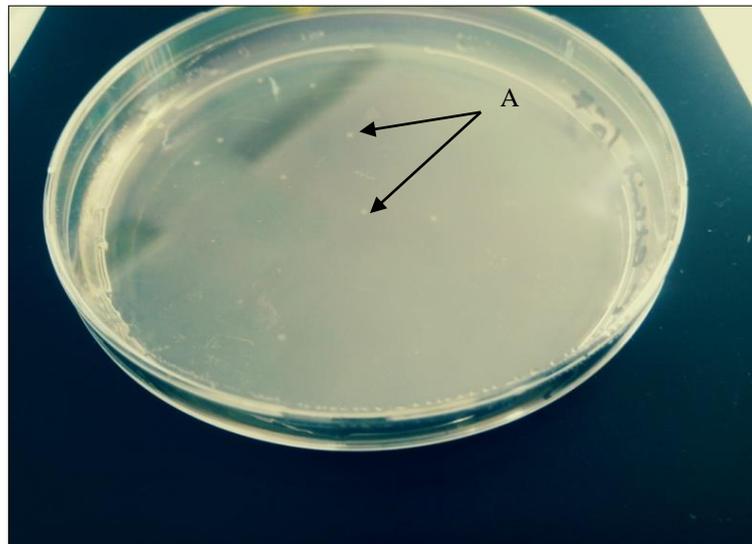
Les excréments de chèvre (*Capra hircus*) de la région de Mkhadma, wilaya de Biskra, à fait office d'une source d'isolement des microorganismes cellulolytiques.

#### 3.1. L'enrichissement

L'apparition de trouble dans le milieu d'enrichissement à base de CMC indique que ce milieu favoriserait la croissance de souches cellulolytiques.

#### 3.2. Isolement et sélection de souches cellulolytiques dans le milieu solide

Plusieurs souches sont isolées sur milieu synthétique solide à base de carboxyméthyl cellulose (CMC) à pH = 7 et 40°C. La dilution  $10^{-7}$  est la meilleure dilution pour l'isolement des souches car elle donnait des colonies bien espacées (fig. 5).



**Figure 5.** Les colonies des souches productrices de cellulase sur milieu solide synthétique à base de CMC.

Le développement de plusieurs souches sur un milieu ne contenant que la cellulose (CMC) comme seule source de carbone, indique bien que les excréments de chèvres sont une excellente source pour isoler des microorganismes cellulolytiques.

Parmi ces nombreuses souches, 10 souches ont été sélectionnées sur la base de la formation des zones claires autour des colonies. Une zone claire est révélatrice de la sécrétion de cellulases extracellulaires. En industrie, les enzymes extracellulaires sont plus intéressantes car faciles à produire et à purifier, réduisant ainsi le coût de leur production.

### 3.3.Sélection sur milieux de culture liquide

La sélection sur milieu liquide est basée sur la mesure de l'activité cellulase par la méthode DNS (Miller, 1959 ; Baily, 1992). Les activités enzymatiques sont présentées dans le tableau II.

Le milieu synthétique utilisé pour la sélection de la souche la plus performante parmi les 10 souches préalablement sélectionnées dans le milieu liquide à base de CMC, a permis de choisir la souche 10 pour sa grande activité cellulolytique. En effet, cette dernière possède une activité cellulolytique de 0,373 UI/ml.

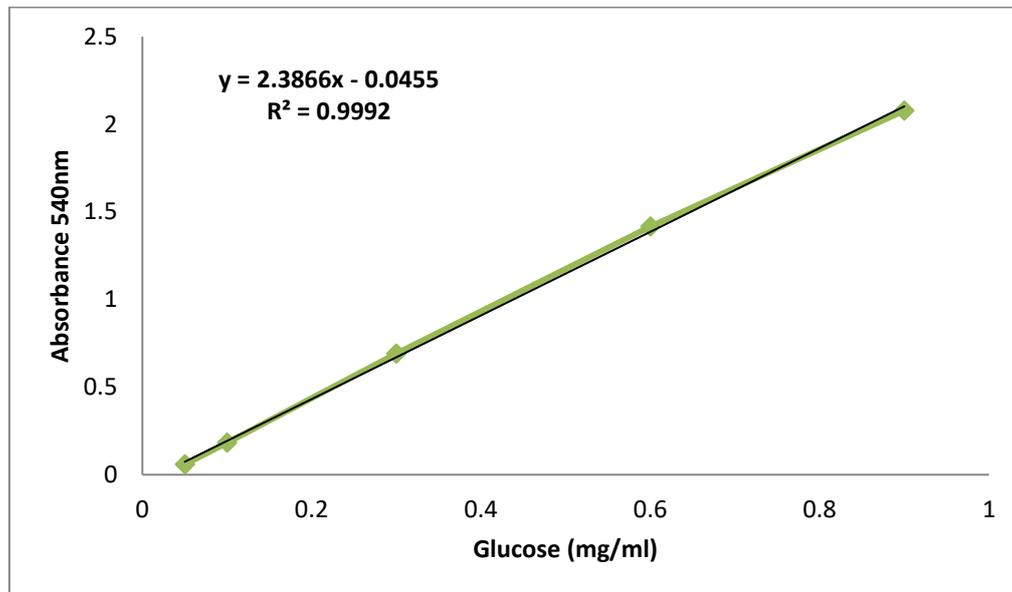
Sur le substrat soluble CMC, les souches S4, S5 et S6 possèdent également des activités enzymatiques appréciables 0,302, 0,369, 0,333 (UI/ml), respectivement, par rapport aux autres souches.

**Tableau II:** l'activité enzymatique CMCCase et l'écartype des souches isolées dans le milieu CMC à pH 7 et 50°C.

Souche	pH	Activité enzymatique (UI/ml)	Ecartype
S1	7	0,241	0,0270
S2	7	0,206	0,0190
S3	7	0,168	0,0269
S4	7	0,302	0,0178
S5	7	0,369	0,0175
S6	7	0,333	0,0731
S7	7	0,268	0,0019

<b>S8</b>	7	0,187	0,0250
<b>S9</b>	7	0,196	0,0155
<b>S10</b>	7	0,373	0,0406

La courbe d'étalonnage réalisée avec le glucose a été montrée sur la (fig. 6).



**Figure 6.** Courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.

### 3.4. Identification

#### 3.4.1. Observations macroscopiques (Caractérisation morphologique des colonies)

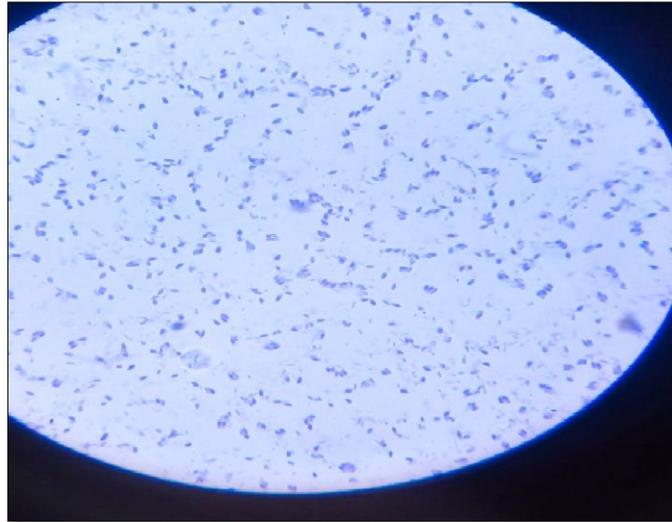
Les colonies produites sont généralement rond d'un diamètre d'environ 1 à 2 mm, Entières et bombées, de couleur crème et visqueuse dans le boîte de pétri après 3 à 5 jours d'incubation à 40 °C. (fig. 5).

#### 3.4.2. Observation microscopique

##### 3.4.2.1. Coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram, l'observation des frottis colorés nous a permis de déterminer le type, la forme et l'arrangement des cellules.

Au microscope optique à l'objectif à immersion (Gx100), il est révèlé que les cellules de la souche S10 sont des coccobacille (coccoïdes) à coloration Gram positive.



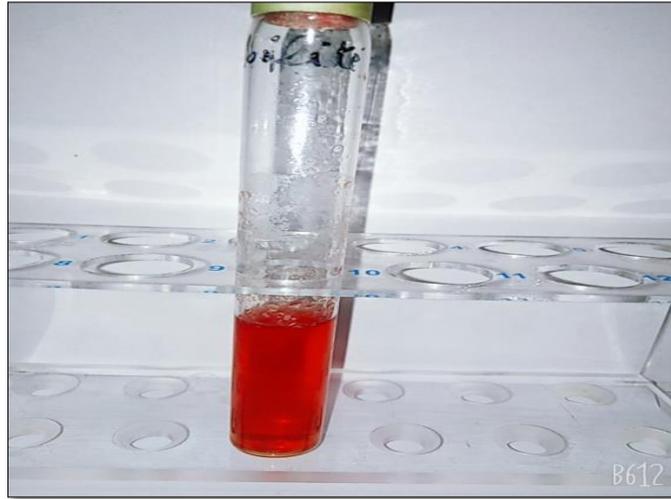
**Figure 7.** Observation microscopique de la souche S10 après la coloration de gram à Gx100

#### **3.4.2.2. La coloration des spores**

Après réalisation de la coloration des spores, l'observation nous a montré que la souche S10 est non sporulée.

#### **3.4.2.3. L'état frais**

La mobilité a été testé par deux testes ; l'examen à l'état frais et mannitol mobilité. Dans le premier test de l'examen a l'état frais, l'observation au microscope optique de la suspension bactérienne de la souche S10 a l'objectif x40 montré qu'il ya un déplacement dans des différentes directions sa signifier que cette souche est considérée comme bactérie mobile. Cette résultat est confirmé par le test de mannitol (Denis *et al.*, 2011), d'après le tube il ya une diffusion dans le milieu et aussi il n'ya pas de changement de couleur du rougeâtre vers la couleur jaunâtre donc la souche 10 est mobile avec l'absence d'acidification du milieu se qui indique que la souche ne fermente pas le mannitol.



**Figure 8.** Examen de mobilité (résultat positive).

### 3.4.3. Tests physiologiques

#### 3.4.3.1. Type respiratoire

Après 72h d'incubation des tubes de gélose viande foie (fig. 9), on observe la présence des colonies dans tout le milieu se qui montre que la souche S10 se développent en présence et en absence d'oxygène, donc elle est dit aéro-anaérobie facultative.



**Figure 9.** Test de type respiratoire (bactérie aéro-anaérobie facultative).

### 3.4.3.2. Voies fermentaires

#### a. Réaction de Voges-Proskauer

Après 48h d'incubation et l'ajout de 0,5 ml d' $\alpha$ -naphthol (6%) et de 0,5 ml de KOH (4M), on observe qu'il n'y a pas l'apparition d'une couleur rouge, donc pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (pas de production d'acétone). Sa montre que la souche est de VP négative (fig. 10).



Figure 10. Résultat de Voges-Proskauer (résultat négative).

#### b. Réaction au rouge de méthyle

Après l'incubation et l'ajout de deux gouttes de rouge de méthyle dans 2ml de milieu Clark et Lubs, on observe qu'il n'y a pas une coloration rouge, donc pas de fermentation du glucose par la voie des acides mixtes, ceci montre que la souche est RM négative (fig. 11).



Figure 11. Test de rouge de méthyle (résultat négative).

### 3.4.3.3. Production d'indole

Après l'incubation pendant 24h et l'ajoute de cinq gouttes du réactif de Kovacs, on observe que il n'ya pas la formation d'un anneau rouge(fig. 12). Sa signifié que la souche ne dégrade pas le tryptophane en indol et donc elle est possède indol négative.



**Figure 12.** Production d'indole (résultat négative).

### 3.4.3.4. Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)

Après l'incubation pendant 48h, on observe qu'il ya un changement de couleur et aussi la production d'un gaz (fig. 13), ce qui signifie que la souche fermente le glucose, lactose et le saccharose.



**Figure 13.** Résultat positive de test TSI.

### 3.4.3.5. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons

Après l'incubation, on remarque que il n'ya pas un changement de couleur ver le bleu c'est t-à-dire que la bactérie ne fait pas l'alcalinisation du milieu, mais elle est poussé dans le milieu donc elle est capable de dégradé le citrate alors elle à un citrate positive (fig. 14).



**Figure 14.** Citrate de simmons (résultat positive).

### 3.4.3.6. Production de sulfure d'hydrogène

Après 24h l'incubation on observé que il n'ya pas l'apparition d'un précipité noir dans le culot du tube donc la souche S10 est incapable de produire H<sub>2</sub>S et le test est négative.



**Figure 15.** Milieu Hajna-kligler (résultat négative).

### 3.4.3.7. Fermentation du glucose

Après l'incubation à 37°C pendant 48h, on observe une transformation de la couleur du milieu de rougeâtre à un couleur jaunâtre, se traduire par la fermentation du glucose par la souche S10, donc le test est positive.



**Figure 16.** Milieu MEVAG + glucose (résultat positive).

### 3.4.3.8. Températures de croissance

Après l'incubation dans différentes températures la souche S10, on observe que elle est fais leur croissance entre 30°-40°C, donc elle est considérée comme mésophile.

### 3.4.3.9. pH de croissance

Après 7 jours d'incubation, on observe que il y'a un grand trouble dans le tube à pH=7 donc c'est une bactérie neutrophile.

### 3.4.3.10. Croissance à différentes concentrations de NaCl

Après 14 jours d'incubation, on observe que il ya un trouble microbien dans tous les tubes, donc la bactérie fait la croissance normale dans des concentrations de NaCl entre 2-20 g/l.

## 3.4.4. Tests biochimiques

#### 3.4.4.1. Test de catalase

L'apparition des bulles d'air indique que la souche S10 est capable de produire l'enzyme respiratoire catalase qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau oxygénée  $H_2O_2$ .



**Figure 17.** Test de catalase (résultat positive).

#### 3.4.4.2. Test d'oxydase

Après 30sec de la position de la colonie bactérienne sur le disque d'oxydase, l'apparition de la couleur violet (fig. 18), montre que la souche possède une oxydase positive et donc elle possède l'enzyme respiratoire cytochrome oxydase.



**Figure 18.** Résultat de l'oxydase (oxydase positive).

### 3.4.4.3. Réduction des nitrates

Après 24h d'incubation et l'ajoute de 5 gouttes les réactifs NR1 et NR2 au bouillon nitraté, on n'observé pas un changement de couleur ver le rouge ce qui indique que il n'ya pas une réduction des nitrates en nitrites donc la bactérie possède une nitrate réductase négative.



**Figure 19.** Test du nitrate réductase après l'ajout de NR1 et NR2 (résultat négative).

### 3.4.4.4. Uréase

On n'observe pas une coloration rouge dans le tube après l'incubation ce qui traduit par la bactérie ne fait pas l'alcalinisation du milieu, et ne fait pas l'hydrolyse de l'urée et la formation de carbonate d'ammonium : uréase négative.



**Figure 20.** Test uréase (résultat négative).

#### 3.4.4.5. Gélatinase

Après 3 ou 5 jours d'incubation, et l'ajout de 10 ml d'une solution d'acide sulfurique (1N) saturée par le sulfate de sodium. On remarque que il ya un éclaircissement autour et au dessous de la croissance indique que la bactérie hydrolysé la gélatine.

#### 3.4.4.6. Hydrolyse de l'amidon

Après 3 jours d'incubation à 30°C, en inondée la boite par l'éthanol (90%). Après 15 à 30 s, on observe que il n'ya pas d'un éclaircissement autour de la croissance, et la couleur du milieu reste le même (ne devient pas opaque), ce qui indique que la souche ne hydrolyse pas l'amidon (fig. 21).



**Figure 21.** Résultat de l'hydrolyse de l'amidon (résultat négative).

#### 3.4.4.7. Dégradation de la caséine

Après l'incubation, on observe que il ya Une zone claire autour et au dessous de la croissance donc la souche est dégradé la caséine (fig. 22).



**Figure 22.** Dégradation de la caséine (résultat positive).

En résumé, La souche S10 est une bactérie coccobacille à Gram positif ne formant pas des spores, catalase et oxydase positive. En se basent sur ces caractères biochimiques et physiologiques, cette souche appartiendrait au genre *Cellulomonas*, notamment à l'espèce *Cellulomonas flavigena* (Field *et al.*, 2008).

Une comparaison des deux souches est indiquée dans le (tab. 3).

**Tableau III.** Comparaison des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques entre la souche S10 et la bactérie *Cellulomonas flavigena* (Field *et al.*, 2008).

		<b>Souche S10</b>	<i>Cellulomonas flavigena</i>
<b>La morphologie</b>		Coccobacilles	Coccobacille
<b>Coloration de Gram</b>		Gram positive	Gram positive
<b>Présence d'endospores</b>		-	-
<b>La mobilité</b>		Mobile	Mobile
<b>Tests physiologiques</b>	Type respiratoire	A. Ana. Fac	A. Ana. Fac
	T° de croissance	30°-40°C	30°C
		mésophile	mésophile
	pH de croissance	7	7
	Milieu TSI	+	+
	Catalase	+	+
	Oxydase	+	

<b>Tests biochimiques</b>	Nitrate réductase	-	-
	Uréase	-	-
	Gélatinase	+	+

(+) positive, (-) négative, (A. Ana. Fac) aérobie anaérobie facultatif.

### 3.4.5. Description de l'espèce *Cellulomonas flavigena*

*Cellulomonas flavigena* est une espèce du genre *Cellulomonas* et de la famille *Cellulomonadaceae*. Les membres du genre *Cellulomonas* présentent un intérêt particulier pour leur capacité à dégrader la cellulose et l'hémicellulose, en particulier en ce qui concerne l'utilisation de la biomasse comme source d'énergie de remplacement (Kellerman *et al.*, 1912 ; Bergey *et al.*, 1923).

Les cellules de *Cellulomonas flavigena* à un Gram positif avec un taux de décoloration très rapide. *Cellulomonas flavigena* est décrit comme non motile (Stackebrandt *et al.*, 1979), mais selon Thayer *et al.* (1984). Les cellules de *cellulomonas flavigena* possèdent un flagelle polaire multitrèche (Thayer *et al.*, 1984). *Cellulomonas flavigena* se développe dans des conditions anaérobies avec une température de croissance optimale de 30°C (Bergey *et al.*, 1923) et un pH optimal de 7 (Keddie *et al.*, 1952). *Cellulomonas flavigena* à un catalase mais pas d'uréase. L'esculine et la gélatine sont hydrolysées et le nitrate n'est pas réduit en nitrite. La souche est capable de fermenter le glucose, le maltose, le saccharose, le xylose et la dextrine, mais aucune fermentation du mannitol n'a été observée (Stackebrandt *et al.*, 1979).

Selon Field *et al.* (2008), la bactérie *Cellulomonas flavigena* classée dans le

Domaine : *Bacteria*, Phylum : *Actinobacteria*, Classe : *Actinobacteria*, Ordre : *Actinomycetales*, Famille : *Cellulomonadaceae*, Genre : *Cellulomonas*, Espèce : *Cellulomonas flavigena*

# **Conclusion**

L'objectif de ce travail consiste en l'exploitation d'une nouvelle source d'isolement de microorganismes producteur de cellulases, à savoir, les excréments de chèvre (*Capra hircus*) de la région de Mkhadma, et à la sélection d'une souche hyper-productrice de ces enzymes

Plusieurs souches ont été isolées sur un milieu solide base de CMC comme seule source de carbone. Ceci indique la richesse des excréments de chèvre en microorganismes cellulolytiques due à la présence de matière lignocellulosiques partiellement dégradés. Ces souche proviendraient de la microflore du rumen ou de l'intestin de cet ruminant.

10 souches ont été sélectionnées sur la base du diamètre de la zone claire entourant la colonie. Ceci indique que ces souches secrètent des cellulases extracellulaires.

La mesure de l'activité CMC<sub>Case</sub> à 50°C pH 7 de ces 10 souches dans le milieu liquide a aboutie à la sélection d'une souche montrant la plus grande sécrétion d'enzymes.

La caractérisation phénotypique de cette souche montre qu'elle appartiendrait au genre *Cellulomonas*. Les membres de ce genre sont connus par leur production abondante de cellulases et comme importants agents, confirmée dans ce travail, dans le recyclage du carbone contenu dans les matières lignocellulosiques. La souche montre des similarités avec l'espèce *Cellulomonas flavigena*.

L'isolement et la sélection de souches productrices de cellulases sont des étapes qui peuvent constituer un point de départ pour d'autres recherches :

- L'identification moléculaire de la souche.
- La production en fermenteur de ses cellulases
- La détermination des propriétés physicochimique de ses cellulases, à savoir leur activité et stabilité à différents pH, aux différentes températures et aux ions, le poids moléculaire et l'activité vis-à-vis de la cellulose.
- La purification des cellulases de la souche et la caractérisation de leurs propriétés physicochimiques ; et le poids moléculaire le pH et la température optimaux d'activité et de stabilité.

# **Références bibliographique**

**A**

Ando S., Ishia H., Kosugi Y., Ishikawa K. 2002. Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(1):430-433.

Acharya S., Chaudhary A., 2012. Bioprospection thermophiles pour la production de cellulases : une revue. *Braz J Microbiol* 43(3):844-856.

Ang .S.K., Suraini. A.Y., Madihah. A.A., Madihah. M.S. 2015. Isolation, Screening and Identification of Potential Cellulolytic and Xylanolytic Producers for Biodegradation of Untreated Oil Palm Trunk and Its Application in Saccharification of Lemongrass Leaves. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 45: 279–305.

**B**

Bergey, D.H., F.C. Harrison, R.S. Breed, B.W. Hammer and F.M. Huntoon. 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1st edn. Williams & Wilkins, Baltimore.

Bayer E A., Kenig R., Lamed R. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J Bacteriol* 156:818-827.

Bok J D., Yrnool D A., Eveleigh D E. 1998. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases Cel A and Cel B from *Thermotoga neapolitana*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12):4774-4781.

Bledzki A. K., Gassan J. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in polymer science* 24(2) : 221-274.

Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* (18): pp. 355-383.

Brown. M.R.J. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st Century. *J. Polym. Sci* 42:487–495.

Bailey M.J., Biely P., Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol*, 23:257-270.

**C**

Chesson A. 1987. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. *In: Hresign W, Cole DJA, editors. Recent Advances in Animal Nutrition. London, Butterworths, p. 71-89.*

**D**

Dar. R.A., Saba. I., Shahnawaz. M., Sangale. M.K., Ade.A.B., Rather. S.A., Qazi. P.H. 2013. Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. *Advances in Enzyme Research* 1(4) : 91-96.

**E**

Eloutassin N., Louaste B., Boudine L., Remmal A. 2014. Valorisation de la biomasse Lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération. *Energies Renouvelables*, (4): pp.600-609.

**G**

Gao J., Weng H., Zhou D., Yuan M., Guan F., Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solide state cultivation of corn stover. *Bioressour Technol* 99: 7623-7629.

**K**

Keddie, R. M., Leask, B. G., & Grainger, J. M. 1966. A comparison of coryneform bacteria from soil and herbage: cell wall composition and nutrition. *Journal of Applied Bacteriology* 29(1): 17-43.

Keddie, R.M. and D. Jones. 1981. Aerobic saprophytic coryneform bacteria. *In The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria* (edited by Starr, Stolp, Trüper, Balows and Schlegel). Springer, New York, pp. 1838–1878.

Kuhad R. Ch., Gupta R., Singh A. 2011. Microbial Cellulases And Their Industrial Applications, Sage-Hindawi. *Enzyme Research*, pp. 10.

Kellerman, K.K. and I.G. McBeth. 1912. The fermentation of cellulose. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II* 34: 485–494.

**L**

Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H., Pretorius I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* 66(3):506-577.

Lekchiri S., Moueqqit M., Lekchiri A. 2006. Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Faculté des Sciences, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohamed Ier, Oujda, Maroc.

Liu C.F., Sun C.R. 2010. In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, « Chapter 5 - Cellulose », pp. 131-167.

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

Leghlimi, H., Meraihi, Z., Boukhalfa-Lezzar, H., Copinet, E., & Duchiron, F. 2013. Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). *African Journal of biotechnology*, 12(5).

Lakhundi S., Ruqaiyyah S., Naveed A. K. 2015. Cellulose degradation a therapeutic strategy in the improved treatment of acanthamoeba infections. *Parasites Vectors* (8): pp.23.

**M**

Miyamoto, T., Takahashi, S. I., Ito, H., Inagaki, H., & Noishiki, Y. 1989. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal of biomedical materials research*, 23(1), pp. 125-133.

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

Mtui G. Y. 2012. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays* 7(15):1544-1555.

**O**

Odier. E., ROUAU. X. 1985. Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine.p :199-214. . Edition Gauthier-Villard, Paris.

O'Donohue M. J. 2013. La Biomasse simple source d'énergie ou source de matières Premières renouvelables. *Innovations Agronomiques* (26): pp. 41-50.

## P

Patel G B., Mc Kenzie G R. 1982. Metabolism of *Acetivibrio cellulolyticus* during optimized growth on glucose, cellobiose and cellulose. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 16: pp. 212-218.

Peiris S P., Rickard P A D. 1982. Comparison of the xylanolytic and cellulolytic activities of *Cellulomonas*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 14 (3):169-173.

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

Prakash D., Nawani N., Prakash M., Bodas M., Mandal A., Khetmalas M., Kapadnis B. 2013. Actinomycetes: a repertory of green catalyts with a potential revenue resource. *BioMed research international*, 2013.

Privas, E. 2013. *Matériaux ligno-cellulosiques: "Élaboration et caractérisation"* (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Paris).

## R

Reece J. B. et Campbell N.A. 2012. *Campbell biologie*. Paris: Pearson.

## S

Stackebrandt, E., & Kandler, O. 1979. Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 29(4):273-282.

Schellhorn H E., Forsberg C W. 1984. Multiplicity of extracellular  $\beta$ -(1,4) endoglucanases of *Bacteroides succinogenes* S85. *Can J Microbiol* 30(7):930-937.

Schlochtermeier A., Walter S., Schroder J., Moorman M., Schremp H. 1992. The gene encoding the cellulase (Avicelase) Cel 1 from *Sterptomyces reticuli* and analysis of protein domains. *Mol. Microbiol.* 6: pp. 611-621.

Scriban R. 1993. Biotechnologie. 4<sup>ème</sup> édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P. 40.

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

Sun R. 2010. Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose. Elsevier.

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

Stackebrandt, E., & Schumann, P. 2015. *Cellulomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1-14.

## T

Thayer, D. W. 1984. Motility and flagellation of cellulomonads. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(2):218-219.

Tchunden J. 1990. Cellulolyse Anaérobie Mésophile : Etude de l'amélioration de la production de cellulases par *Cl. cellulolyticum* ATCC 35 31 9. Thèse de Doctorat de l'Université Nancy I. France.

Tuncer M., Balli A S., Rob A., Wilson M T. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 38-47.

Thoorens, G., Krier, F., Leclercq, B., Carlin, B., & Evrard, B. 2014. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1-2):64-72.

## V

Varshney, V. K., & Naithani, S. 2011. Chemical functionalization of cellulose derived from nonconventional sources. In *Cellulose fibers: Bio-and nano-polymer composites*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 43-60.

**W**

Watanabe H., Tokuda G. 2001. Animal cellulases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 58(9):1167-1178.

Wilson D. B. 2011. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. Current opinion in microbiology 14(3):259-263.

**X**

Xu B., Hellman U., Ersson B., Janson J C. 2000. Purification, characterization and aminoacid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1,4 glucanase from Blue Mussel, *Mytilus edulis*. Euro J Biochem 267:4970-4977.

**Z**

Zhbankov R. G. 1992. Hydrogen bonds and structure of carbohydrates. Journal of molecular structure 270:523-539.

Zhang Y.H. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. J. Indus. Microbiol. Biotechnol 35(5):367–375.

Zha. Y., Slomp. R., Groenestijn. J.v., Punt. P.J. 2012. Preparation and Evaluation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysates for Growth by Ethanologenic Yeasts. chapter 16.In: Cheng. Q. Microbial Metabolic Engineering. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 834:245-259.

Zeitoun R. 2011. Procédés de fractionnement de la matière végétale: application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. Thèse de doctorat. INPT. Patents. Recent patents on biotechnology 7(3):207-218.

Zhang G., Li S., Xue Y., Mao L., Ma Y. 2012.Effects of salts on activity of halophilic cellulose with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus sp.* BG-CS10. Springer 16:35-43.

# **Annexes**

**Annexe 1:**

Composition du milieu synthétique solide à base de CMC (g/l), pH=7.

- CMC ..... 10 g.
- Extrait de levure ..... 2 g.
- NaCl ..... 2,5 g.
- NH<sub>4</sub>Cl ..... 5 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 5 g.
- MgSO<sub>4</sub>..... 0,2 g.
- Agar-Agar .....15 g.
- Eau distillée .....1000 ml

NB : pour la préparation du milieu synthétique liquide à base de CMC, les mêmes compositions sauf que l'élimination de l'agar et l'extrait de levure.

**Annexe 2 :**

Tampon phosphate

- Solution NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.2 M)..... 39ml (solution acide 2.76g/100ml) à pH=7.
- Solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2 M).....61ml (solution base 3.56g/100ml) à pH=7.

Mélange (tampon phosphate) = 39ml solution NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 61ml Solution Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

NB : doit être ajusté le pH à 7.

**Annexe 3 :**

Préparation de la solution DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique). Dans un litre.

- DNS .....10g
- NaOH .....16g
- Tartrate KNa .....300g

Dans un erlenmeyer de 1000ml.

- Ajouter 100 ml d'eau distillé sous agitation.
- Après mettez 16g de NaOH progressivement jusqu'à la dissociation totale.
- Puis ajouter 300g de tartrate et laisser le dissocié.
- Finalement ajouté le 10g de DNS.
- Après la dissociation complète de DNS, en ajouter le reste de l'eau distillé jusqu'à 1000ml.

**NB :** la préparation doit être sous agitation,

#### **Annexe 4 :**

Préparation de Solution de CMC (1%) :

- CMC.....1g
- Tampon phosphate .....100ml

En premier étape en ajoute 1g de CMC dans 90ml de tampon phosphate sous agitation j'jusqu'à da dissociation de CMC après en complété le volume à 100ml.

#### **Annexe 5 :**

Les valeurs de l'absorbance mesuré en 540 nm.

- ❖ La température d'incubation est 50°C.

	<b>blanc</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>S1</b>	0,126	0,124	0,147	0,12
<b>S2</b>	0,092	0,114	0,1	0,12
<b>S3</b>	0,12	0,09	0,106	0,077
<b>S4</b>	0,165	0,153	0,165	0,172
<b>S5</b>	0,195	0,196	0,21	0,192
<b>S6</b>	0,232	0,135	0,196	0,209

<b>S7</b>	0,16	0,144	0,146	0,145
<b>S8</b>	0,096	0,088	0,101	0,115
<b>S9</b>	0,12	0,11	0,096	0,111
<b>S10</b>	0,233	0,176	0,213	0,215

**Annexe 6:**

❖ Les valeurs de l'activité enzymatique.

	<b>AE 1</b>	<b>AE 2</b>	<b>AE 3</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Ecartype</b>
<b>S1</b>	0,229	0,272	0,222	0,241	0,0270
<b>S2</b>	0,211	0,185	0,222	0,206	0,0190
<b>S3</b>	0,167	0,196	0,142	0,168	0,0269
<b>S4</b>	0,283	0,305	0,318	0,302	0,0178
<b>S5</b>	0,363	0,389	0,355	0,369	0,0175
<b>S6</b>	0,250	0,363	0,387	0,333	0,0731
<b>S7</b>	0,266	0,270	0,268	0,268	0,0019
<b>S8</b>	0,163	0,187	0,213	0,187	0,0250
<b>S9</b>	0,204	0,178	0,205	0,196	0,0155
<b>S10</b>	0,326	0,394	0,398	0,373	0,0406

## ملخص

تم عزل سلالات بكتيرية سيليلوزية في وسط حراري معتدل عن طريق وسط صلب يحتوي على الكربوكسي ميثيل سيليلوز من فضلات الماعز لمنطقة مخادمة ولاية بسكرة. كخطوة أولى، تم عزل 10 سلالات واختيارها على وسط صلب يحتوي على الكربوكسي ميثيل سيليلوز استنادا الى تكوين مناطق شفاقة حول المستعمرات البكتيرية. في الخطوة ثانية، بناءا على قياس نشاط السيليلاز في طاف البكتيريا السائلة. اظهرت احدى السلالات اعلى نشاط انزيمي (0.373 وحدة دولية/مل) عند 50 درجة مئوية و درجة حموضة معتدلة، انها تنتمي الى جنس *Cellulomonas* وبشكل اكثر تحديدا للنوع *Cellulomonas flavigena*.

السيليلاز المنتج من طرف هذه البكتيريا ينشط في درجة حرارة 50 درجة مئوية و درجة حموضة معتدلة. وهي الخصائص المطلوبة للتطبيقات المحتملة في مصانع الورق و المحروقات.

الكلمات المفتاحية: فضلات الماعز، حرارة معتدلة، *Cellulomonas flavigena*، انزيم السيليلاز.

## Résumé

Des souches cellulolytiques mésophiles ont été isolées sur un milieu solide à base de carboxymethyl cellulose (CMC), à partir des excréments de la chèvre à la région de Mkhadema, wilaya de Biskra. Dans une première étape, 10 souches ont été isolées et sélectionnées sur le milieu synthétique solide à base de CMC, sur la base de formation de zones claires autour des colonies. Dans une deuxième étape, basée sur la mesure de l'activité cellulases dans les surnageant des cultures liquides, l'une des souches a montré l'activité cellulase la plus élevée (0.373 UI/ml) à 50° C et pH 7. Elle appartiendrait au genre *Cellulomonas* et plus précisément à l'espèce *Cellulomonas flavigena*.

Les cellulases produites par cette bactérie sont actives à de 50°C et pH 7, des propriétés qui sont requises pour des applications probables dans les industries de papeterie et de bioéthanol.

**Mots clés :** excrément de chèvre, mésophile, *Cellulomonas flavigena*, CMCCase.

## Abstract

Mesophilic cellulolytic strains were isolated on a carboxymethyl cellulose (CMC) solid medium, from the feces of the goat to the region of Mkhadema, wilaya of Biskra. In a first step, 10 strains were isolated on the solid synthetic medium based on CMC. In a second step, based on the measurement of cellulase activity in the supernatants of liquid cultures, one of the strains showed the highest cellulase activity. One of the strains showed the highest cellulase activity (0.373 UI/ml) at 50 ° C. and pH 7. It belongs to the genus *Cellulomonas* and more specifically to the species *Cellulomonas flavigena*.

The cellulases produced by this bacterium are active at 50 ° C and pH 7, properties that are required for probable applications in the paper and bioethanol industries.

**Key word:** goat, mesophilic, *Cellulomonas flavigena*, CMCCase

